



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**SARS-CoV-2 (COVID-19) TEDAVİSİNDE KULLANILAN
ANTİVİRAL İLAÇLARIN SEÇİCİ VE DUYARLI
SENSÖRLERLE TAYİNİ**

Ahmet ÇETİNKAYA

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SARS-CoV-2 (COVID-19) TEDAVİSİNDE KULLANILAN
ANTİVİRAL İLAÇLARIN SEÇİCİ VE DUYARLI
SENSÖRLERLE TAYİNİ

Ahmet ÇETİNKAYA

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Bu araştırma YÖK 100/2000 Bursu ile desteklenmiştir.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun
(TÜBİTAK) 123Z824 proje numarası ile desteklenmiştir.

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
BAP TDK-2023-2983 proje numarasıyla desteklenmiştir.

ANKARA
2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “SARS-CoV-2 (COVID-19) Tedavisinde Kullanılan Antiviral İlaçların Seçici ve Duyarlı Sensörlerle Tayini” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan hazırlanmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı : Ahmet ÇETİNKAYA

Tarih : 08.11.2023

İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında

Ahmet ÇETİNKAYA tarafından hazırlanan

“SARS-CoV-2 (COVID-19) Tedavisinde Kullanılan Antiviral İlaçların Seçici ve Duyarlı Sensörlerle Tayini.” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08.11.2022

Prof. Dr. Lokman UZUN

Hacettepe Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL

Ankara Üniversitesi

Raportör

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Bengi USLU

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU

Hacettepe Üniversitesi

Üye

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

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

SARS-CoV-2 (COVID-19) Tedavisinde Kullanılan Antiviral İlaçların Seçici ve Duyarlı Sensörlerle Tayini

Doktora tez çalışması kapsamında antiviral ilaçlardan ribavirin (RIB), molnupiravir (MOL), umifenovir (UMI) ve kamostat mesilat (KAM)'ın seçici ve hassas analizine yönelik moleküler baskılı polimer (MIP) temelli sensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerin elektrokimyasal ve yüzey karakterizasyonları dönüşümlü voltametri (DV), elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve temas açısı yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

RIB tespiti için ilk kez elektropolimerizasyon (EP) ve fotopolimerizasyon (FP) tekniklerinde sırasıyla pirol-para aminofenil boronik asit (Py-p-AFBA) ve urasil metakrilat (UraM) gibi farklı fonksiyonel monomerler kullanılarak MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. Poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerin analitik performansları diferansiyel puls voltametri (DPV) kullanılarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen sensörler, RIB'a karşı yüksek baskı faktörü (IF) ile mükemmel bir seçiciliğe sahiptir.

MOL'ün elektrokimyasal analizi için EP ve FP yöntemlerinde monomer olarak sırasıyla pirol-3-tiyonil boronik asit (Py-3-TBA) ve guanin metakrilat (GuaM) kullanılarak MIP temelli sensörler hazırlanmıştır. Geliştirilen Poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörlerin teşhis sınırı (TS) değerleri sırasıyla 6.01×10^{-13} M ve 1.13×10^{-13} M olarak hesaplanmıştır. Farmasötik formlarda ve ticari serum numunelerinde elde edilen iyi geri kazanım değerleri sensörlerin bu numunelere başarılı bir şekilde uygulanabildiğini göstermiştir.

UMI'nin seçici ve duyarlı analizi için fonksiyonel monomer olarak butil metakrilat (BuMA), gözenekli yapı oluşturmak için bor nitrür (B_3N_3) kullanılarak MIP temelli elektrokimyasal sensör hazırlanmıştır. Geliştirilen sensör DPV ve EIS gibi farklı elektroanalitik yöntemler kullanılarak UMI'nin analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. UMI@ B_3N_3 /BuMA@MIP/CKE sensörünün yüksek duyarlılığını gösteren TS değerleri DPV ve EIS yöntemleri için sırasıyla 4.82×10^{-14} M ve 2.34×10^{-14} M olarak hesaplanmıştır. Girişim ve IF analizleri geliştirilen sensörlerin yüksek seçiciliğini doğrulamıştır.

KAM'ın daha hassas ve duyarlı analizi için perde baskılı elektrotlar (SPAUE) kullanılarak hem MIP temelli sensör hem de sahte baskılı polimer (DIP) temelli sensörler hazırlanmıştır. Geliştirilen sensörlerin performansları dikkate alındığında poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAUE sensörünün hem analitik validasyon parametreleri hem de uygulanabilirliği açısından diğer etken maddelerle hazırlanmış DIP sensörlere göre oldukça etkili sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak; RIB, MOL, UMI ve CAM'ın elektrokimyasal analizi için geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin mevcut yöntemlere göre daha avantajlı ve alternatif yöntemler olduğu kanıtlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Ribavirin, Molnupiravir, Umifenovir, Kamostat mesilat, Elektrokimyasal sensör, Moleküler baskılı polimerler

SUMMARY

Determination of Antiviral Drugs Used in the Treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19) with Selective and Sensitive Sensors

Within the scope of my doctoral thesis, molecularly imprinted polymer (MIP) based sensors were developed for the selective and sensitive analysis of the antiviral drugs ribavirin (RIB), molnupiravir (MOL), umifenovir (UMI), and camostat mesylate (CAM). Electrochemical and surface characterizations of the developed sensors were evaluated using cyclic voltammetry (DV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), atomic force microscopy (AFM) and contact angle methods.

For the detection of RIB, MIP-based electrochemical sensors were developed for the first time using different functional monomers such as pyrrole-para aminophenyl boronic acid (Py-p-APBA) and uracil methacrylate (UraM) in electropolymerization (EP) and photopolymerization (PP) techniques, respectively. Analytical performances of poly(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/GCE and UraM/RIB@MIP/GCE sensors were evaluated using differential pulse voltammetry (DPV). The developed sensors have excellent selectivity with a high imprinting factor (IF) against RIB.

For the electrochemical analysis of MOL, MIP-based sensors were prepared by using pyrrole-3-thionyl boronic acid (Py-3-TBA) and guanine methacrylate (GuaM) as monomers in the EP and PP methods, respectively. The limit of detection (LOD) values of the developed poly(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/GCE and GuaM/MOL@MIP/GCE sensors were calculated as 6.01×10^{-13} M and 1.13×10^{-13} M, respectively. The good recovery values obtained in pharmaceutical forms and commercial serum samples showed that the sensors were successfully applied to these samples.

For the selective and sensitive analysis of UMI, a MIP-based electrochemical sensor was prepared using butyl methacrylate (BuMA) as a functional monomer and boron nitride (B_3N_3) to form a porous structure. The developed sensor has been successfully applied to the analysis of UMI using different electroanalytical methods such as DPV and EIS. LOD values indicating the high sensitivity of the UMI@ B_3N_3 /BuMA@MIP/GCE sensor were calculated as 4.82×10^{-14} M and 2.34×10^{-14} M for the DPV and EIS methods, respectively. Interference and IF analysis confirmed the high selectivity of the developed sensors.

For more sensitive and selective analysis of CAM, both MIP-based sensor and dummy imprinted polymer (DIP)-based sensors were prepared using screen printed gold electrodes (SPAuE). Considering the performances of the developed sensors, very effective results were obtained for the poly(Py-co-p-ABA)@CAM@MIP/SPAuE sensor in terms of both analytical validation parameters and applicability compared to DIP sensors prepared with other active compounds.

Consequently, MIP-based sensors developed for the electrochemical analysis of RIB, MOL, UMI, and CAM have proven to be more advantageous and alternative methods compared to existing methods.

Keywords: Ribavirin, Molnupiravir, Umifenovir, Camostat mesylate, Electrochemical sensor, Molecularly imprinted polymers

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	x
Simgeler ve Kısaltmalar	xiii
Şekiller	xvi
Çizelgeler	xix

1.	GİRİŞ	1
1.1.	Giriş ve Amaç	1
1.2.	COVID-19 Tanısına Yönelik Mevcut Yaklaşımlar	3
1.3.	Tez Kapsamında Kullanılan Antiviral Etken Maddelerle İlgili Bilgiler	4
1.3.1.	Molnupiravir	5
1.3.2.	Ribavirin	5
1.3.3.	Umifenovir	6
1.3.4.	Kamostat Mesilat	6
1.4.	Moleküler Baskılı Polimerler (MIPs)	8
1.4.1.	MIP'lerin Bileşenleri	9
1.4.1.1.	Hedef Molekül	9
1.4.1.2.	Fonksiyonel Monomer	9
1.4.1.3.	Çapraz Bağlayıcı	10
1.4.1.4.	Başlatıcı	11
1.4.1.5.	Porojenik Çözücü	11
1.4.2.	Moleküler Baskı Teknolojisi ve Yaklaşımları	12
1.4.2.1.	Kovalent Baskılama	13
1.4.2.2.	Kovalent Olmayan Baskılama	13
1.4.2.3.	Yarı Kovalent Baskılama	14
1.4.3.	MIP'lerin Zorlukları	14
1.4.4.	Moleküler Baskılama Uygulamalarına Yönelik Stratejilerin Geliştirilmesi	14
1.4.4.1.	MIP'leri Tasarlamak İçin Hesaplamalı Yaklaşımlar	14
1.4.4.2.	Dummy (Sahte) Baskılı Polimerler (DIP)	15
1.5.	Elektrokimya	16
1.5.1.	Elektrokimyada Kullanılan Elektrotlar	17
1.5.1.1.	Voltametri Yönteminde Kullanılan ÇalışmaElektrotları	17
1.5.1.2.	Voltametride Kullanılan Referans Elektrotları	18
1.5.1.3.	Voltametride Kullanılan Yardımcı (Karşıt) Elektrot	18
1.6.	Elektroanalitik Yöntemler	18
1.6.1.	Polorografi	20

1.6.2.	Voltametri	21
1.6.2.1.	Dönüştürümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DTV)	22
1.6.3.	Puls Voltametrisi (PV)	22
1.6.3.1.	Normal Puls Voltametri (NPV) ve Ters Puls Voltametrisi (TPV)	23
1.6.3.2.	Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)	23
1.6.3.3.	Kare Dalga Voltametrisi (KDV)	23
1.6.4.	Sıyırma Voltametri (SV)	23
1.6.4.1.	Anodik Sıyırma Voltametrisi (ASV)	24
1.6.4.2.	Katodik Sıyırma Voltametrisi (KSV)	24
1.6.4.3.	Adsorptif Sıyırma Voltametrisi (AdSV)	24
1.6.5.	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	25
1.7.	Elektroanalitik Sensörlerin Validasyonu	25
1.7.1.	Seçicilik ve Özgünlük	26
1.7.2.	Keskinlik	28
1.7.3.	Doğrusallık	29
1.7.4.	Aralık	31
1.7.5.	Duyarlılık	31
1.7.6.	Teşhis Sınırı (TS)	32
1.7.7.	Tayin Alt Sınırı (TAS)	33
1.7.8.	Doğruluk	34
1.7.9.	Sağlamlık (Kararlılık)	36
1.7.10.	Tutarlılık	37
1.7.11.	Stabilite	37
1.8.	Literatürde Tez Maddelerine Yönelik Yapılmış Çalışmalar	38
1.8.1.	RIB Antiviral Etken Maddesi İçin Yapılmış Çalışmalar	39
1.8.2.	MOL Antiviral Etken Maddesi İçin Yapılmış Çalışmalar	40
1.8.3.	UMI Antiviral Etken Maddesi İçin Yapılmış Çalışmalar	41
1.8.4.	KAM Antiviral Etken Maddesi İçin Yapılmış Çalışmalar	41
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	42
2.4.	Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
2.5.	Tez Çalışmasında Kullanılan Ekipmanlar	42
2.6.	Tez Çalışmasında Kullanılan Elektrokimyasal Sistem ve Bileşenler	43
2.7.	Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	44
2.7.1.	Destek Elektrolitlerin Hazırlanması	44
2.7.2.	Potasyum Ferrisiyanür/Ferrosiyanür Çözeltisinin Hazırlanması	44
2.7.3.	Antiviral İlaç Etken Maddelerin Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	44
2.7.5.	Ticari Serum ve İdrar Çözeltilerinin Hazırlanması	45
2.7.6.	Girişim Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	45
2.8.	Tez Çalışmasında Kullanılan Voltametrik Yöntemler	46
2.9.	Tez Çalışmasında Kullanılan MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörlerin Hazırlanması	47
2.9.1.	Poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE İçin MIP ve NIP Temelli Elektrotların Hazırlanması	47
2.9.2.	Poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE İçin MIP ve NIP Temelli Elektrotların Hazırlanması	48

2.9.3.	UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE İçin MIP ve NIP Temelli Elektrotların Hazırlanması	50
2.9.4.	Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAUE, poli(Py-co-p-ABA)@GUA@ DIP/SPAUE ve poli(Py-co-p-ABA)@DMF @DIP/SPAUE Sensörleri İçin MIP, DIP ve NIP Temelli Elektrotların Hazırlanması	51
2.10.	MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonları	55
2.11.	Kuantum Kimyasal Hesaplamaları	55
3.	BULGULAR	56
3.1.	RIB Etken Maddesine Ait Bulgular	56
3.1.1.	Polimerik Filmlerin Karakterizasyonu	56
3.1.1.1.	Sensörlerinin Elektrokimyasal Karakterizasyonları	56
3.1.1.2.	Polimerik Filmlerin Yüzey Karakterizasyonu	58
3.1.2.	DeneySEL Parametrelerin Optimizasyonu	60
3.1.2.1.	Monomer/Hedef Molekül Oranı	60
3.1.2.2.	EP Döngü Sayısı	61
3.1.2.3.	Damlatma Hacmi	61
3.1.2.4.	FP Süresi	62
3.1.2.5.	Hedef Molekülün Uzaklaştırma Çözeltileri ve Uzaklaştırma Süresi	62
3.1.2.6.	Hedef Molekülün Yeniden Bağlanma Süresi	63
3.1.3.	Poli(Py-co-p-APBA)]/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE Sensörlerinin Analitik Performansının Değerlendirilmesi	66
3.1.4.	Kapsül Formuna ve Ticari Serum Numunelerine Uygulanması	69
3.1.5.	Geliştirilen Sensörlerin Seçicilik Çalışmaları	71
3.1.6.	İnterferans Çalışmaları	74
3.1.7.	Stabilite	74
3.1.8.	Kuantum Kimyasal Hesaplamalar	75
3.2.	MOL Etken Maddesine Ait Bulgular	77
3.2.1.	Polimerik Filmlerin Karakterizasyonu	77
3.2.1.1.	Elektrokimyasal Karakterizasyonları	77
3.2.1.2.	Polimerik Filmlerin Yüzey Karakterizasyonu	80
3.2.2.	DeneySEL Parametrelerin Optimizasyonu	81
3.2.2.1.	Monomer/Hedef Molekül Oranı	81
3.2.2.2.	EP Döngü Sayısı	82
3.2.2.3.	Damlatma Hacmi	82
3.2.2.4.	FP Süresi	83
3.2.2.5.	Hedef Molekülün Uzaklaştırma Çözeltileri ve Uzaklaştırma Süresi	83
3.2.2.6.	Hedef Molekülün Yeniden Bağlanma Süresi	84
3.2.3.	Poli(Py-co-p-3-TBA)]/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE Sensörlerinin Analitik Performansının Değerlendirilmesi	87
3.2.4.	Kapsül Formuna ve Ticari Serum Numunelerine Uygulanması	90
3.2.5.	Geliştirilen Sensörlerin Seçicilik Çalışmaları	91
3.2.6.	İnterferans Çalışmaları	94
3.2.7.	Stabilite	94
3.2.8.	Kuantum Kimyasal Hesaplamalar	95
3.3.	UMI Etken Maddesine Ait Bulgular	97

3.3.1.	MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörün Karakterizasyonu	
3.3.1.1.	Elektrokimyasal Karakterizasyon	97
3.3.1.2.	Geliştirilen UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE sensörünün yüzey karakterizasyonu	98
3.3.2.	DeneySEL Koşulların Optimizasyonu	99
3.3.2.1.	Monomer/Hedef Molekül Oranı	99
3.3.2.2.	Damlatma Hacmi	100
3.3.2.3.	FP Süresi	100
3.3.2.4.	Hedef MolekülünUzaklaştırma Çözeltileri ve Uzaklaştırma Süresi	100
3.3.2.5.	Hedef Molekülün Yeniden Bağlanma Süresi	101
3.3.3.	UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE Sensörünün Analitik Performansının Değerlendirilmesi	103
3.3.4.	Ticari Serum ve İdrar Numunelerine Uygulanması	107
3.3.5.	Geliştirilen Sensörlerin Seçicilik Çalışmaları	109
3.3.6.	İnterferans Çalışmaları	111
3.3.7.	Stabilite	111
3.4.	KAM Etken Maddesine Ait Bulgular	112
3.4.1.	MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörün Karakterizasyonu	112
3.4.1.1.	Elektrokimyasal Karakterizasyon	112
3.4.1.2.	Geliştirilen Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE Sensörünün Yüzey Karakterizasyonu	113
3.4.2.	MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörlerin DeneySEL Parametrelerinin Optimizasyonu	115
3.4.2.1.	Monomer/Hedef Molekül Oranı	115
3.4.2.2.	EP Döngü Sayısı	115
3.4.2.3.	Hedef Molekülün Uzaklaştırma Çözeltileri ve Uzaklaştırma Süresi	116
3.4.2.4.	Hedef Molekülün Yeniden Bağlanma Süresi	116
3.4.3.	Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE, Poli(Py-co-p-ABA)@GUA@ DIP/SPAuE ve Poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP /SPAuE Sensörlerin Analitik Performanslarının Değerlendirilmesi	121
3.4.4.	Ticari Serum Numunelerine Uygulanması	125
3.4.5.	Geliştirilen Sensörlerin Seçicilik Çalışmaları	126
3.4.6.	İnterferans Çalışmaları	128
3.4.7.	Stabilite	128
4.	TARTIŞMA	130
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	134
KAYNAKLAR		137

ÖNSÖZ

Aralık 2019'da Çin'in Vuhan kentinde bir dizi atipik Pnömoni vakası Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) bildirildi. Koronavirüs hastalığının (COVID-19) neden olduğu SARS-CoV-2'nin insandan insana bulaştığı kesinleştikten sonra DSÖ tarafından salgın ilan edildi. Uluslararası öneme sahip bir halk sağlığı acil durumuna neden oldu. SARS-CoV-2 enfeksiyonlarının hızla artması ve bu virüse özel antiviral terapötik ajanların bulunmaması nedeniyle, acilen etkili bir SAR-CoV-2 aşısının geliştirilmesi çalışmaları hızlandı. Pekçok aşı üretilmiş olsa da istenilen sonuçlar elde edilemedi. Aşı çalışmalarında kullanılan antiviraller gözönünde bulundurularak SARS-CoV-2 (COVID-19) tedavisinde kullanılan ve yeni nesil antiviral ilaçlar olan ribavirin (RIB), kamostat mesilat (KAM), molnupiravir (MOL) ve umifenovir (UMI) tayini için mevcut yöntemlere göre daha hassas, seçici ve hızlı bir elektrokimyasal sensör geliştirilmesi oldukça büyük bir öneme sahiptir. Bu tez çalışmasında antiviral ilaçlar için oldukça seçici ve hassas tanıma bölgeleri içeren moleküler baskılanmış polimer (MIP) sensörler tasarlanmıştır. Ayrıca tasarlanmış sensörlerin ticari insan serum numunelerinde ve farmasötik dozaj formlarına yüksek hassasiyet, doğruluk ve kesinlikle uygulanmıştır.

Bir milletin uyanışı ve yeni bir umuda başlangıcı olan Cumhuriyetimiz 100 yaşında... Tüm insanlığa ilham kaynağı olan; insanların umutlarına ve özgürlüklerine olan inancı temsil eden; öğretileri, sözleri ve yaşam biçimi bizlere ve gelecek nesillere ışık olan; Türk milletinin gönlünde ilelebet yaşamaya devam edecek olan baş komutan Mustafa Kemal Atatürk'e minnettarlığımız ve teşekkürlerimiz sonsuz olacaktır. Onun açtığı yolda, gösterdiği hedefe ilerlemek ve bırakmış olduğu mirasları yaşatmak saygımız ve minnettarlığımızın en büyük ifadesi olacaktır. Cumhuriyetimizin 100. yılında hazırlamış olduğum bu tezi Mustafa Kemal Atatürk'e ve bu kutsal topraklar için mücadele eden arkadaşlarına armağan etmek benim için büyük bir onur ve şeref olacaktır.

Doktora eğitimim boyunca banaengin bilgisi ve öğretileriyle vermiş olduğu danışmanlığının yanında, aile yakınlığı sunan, laboratuvarını açarak doktora tez çalışmam için gerekli cihazlara ulaşmamı sağlayan, yaratıcılığı ve üretkenliğiyle rol modelim olan, büyük

bir sabır ve anlayışla tüm bilgi ve tecrübelerini bana aktarmaya çalışan, doktora tezimin şekillendirilmesi ve yayımlanması aşamalarında tüm desteklerini esirgemeyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan gerektiğinde mesai saatleri dışında da değerli zamanını ayıran sevgili ve çok kıymetli Tez Danışmanım sayın Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamın ilerlemesi ve tamamlanması sürecinde engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ve tez izleme komitesinde yer alan kıymetli hocalarım sayın Prof. Dr. Bengi USLU ve sayın Prof. Emirhan NEMUTLU'ya çok teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerinden her fırsatta faydalandığım, olumlu-olumsuz her zaman rahatlıkla ulaşabildiğim, büyük bir sabır ve özveriyle yardımlarını esirgemeyen, her konuda rahatlıkla tartışabildiğim, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin görünmeyen kahramanları kıymetli hocalarım sayın Prof. Dr. Lokman UZUN, Doç. Dr. Hasan NAZIR, Doç. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Altay ÜNAL'a çok teşekkür ederim.

İlk elektrokimyasal çalışmamda bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana destek olan kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL'a çok teşekkür ederim.

Doktoraya başlamamda büyük emekleri olan, unuttuğum bu yolu bana hatırlatan, her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Emin Şengün ÖZSÖZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzun yıllar önce biyosensör yaz okulu ile tanışma fırsatı bulduğum; duruşu, bilgisi ve alandaki tecrübesiyle rol model aldığım hocam sayın Prof. Dr. Suna TİMUR'a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora sürecimin en büyük kazanımları olan, zorlu süreçleri kolaylaştıran ve güzelleştiren, birlikte güzel anılar biriktirdiğimiz, her türlü sıkıntıda ve mutluluğumda yanımda olan, çok güzel çalışmalarda birlikte yürüdüğümüz kıymetli ekip arkadaşlarım Dr. S. İrem KAYA, Dr. Göksu ÖZÇELİKAY-AKYILDIZ, Dr. Leyla KARADURMUŞ, Dr. Ece ÖZKAN, Merve YENCE, Fatma BUDAK, Şeyda Nur SAMANCI ve Ensar PİŞKİN'e çok teşekkür ederim.

Gerçekleştirdiğimiz tüm çalışmalar ve aktivitelerde beraber çok güzel zamanlar geçirdiğimiz kıymetli hocalarım sayın Doç Dr. Mehmet Gökhan AğLAYAN, Doç. Dr. Mehmet GüMüşTAş, Doç. Dr. Nurgül KARADAş BAKIRHAN, Doç. Dr. Mesut HRKUL'a ve arkadaşlarım şeyda YAYLA, Manolya Müjgan GÜRBÜZ, Betül KARAÇOR ve Abdullah AL-FAYSAL'a da çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince sağladıkları katkılar ve desteklerinden dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın değerli ğretim yeleri, ğretim elemanları, idari personeline çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince bursiyerleri olmaktan gurur duyduğum 2247-C Stajyer Araştırmacı Burs Programı (STAR), 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteği Programı, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 1004-Mükemmeliyet Merkezi Destek Programı (Proje No: 20AG003) ve 1002-A Hızlı Destek Programı (Proje No: 123Z824), 2218-Yurt İçi Doktora Sonrası Araştırma Burs Programı için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK), 100/2000 YK Doktora Bursu Programı kapsamında Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı'na (YK) maddi ve manevi yardımları için çok teşekkür ederim.

Hazırlamış olduğum tez projemle (Proje No:TDK-2023-2983) doktora çalışmalarım için maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne sonsuz teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince sağladıkları katkılar ve desteklerinden dolayı Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü sayın Prof. Dr. Fügen AKTAN'a, değerli ğretim üyelerine ve tüm çalışan personele çok teşekkür ederim.

Son olarak, hayatım boyunca tüm desteklerini esirgemeyen, bana güvenen ve unuttuğum bu yolları hatırlatarak uzun bir aradan sonra yeniden bu yolda devam etmem için g veren, canım babam Hsn ÇETİNKAYA ve canım annem Rihan ÇETİNKAYA'ya sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca kendi hayallerini ve hedeflerini bir kenara bırakarak annem ve babam için tüm fedakarlığı gösteren ve her zaman desteklerini hissettiğim kıymetli ablalarım da özel teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Askorbik asit
ACN	Asetonitril
AFM	Atomik kuvvet mikroskopi
BH	Bağıl hata
BSS	Bağıl standart sapma
BuM	Butil metakrilat
<i>c</i>	Derişim
CKE	Camsı karbon elektrot
DPV	Diferansiyel puls voltametri
<i>D</i>	Difüzyon sabiti
DCE	Damlayan civa elektrodu
DIP	Dummy (Sahte) baskılı polimerler
DOP	Dopamin
DTV	Doğrusal taramalı voltametri
DV	Dönüşümlü voltametri
EKL	Elektrokemiluminesans
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
Eİ	Elektrosprey iyonizasyon
EP	Elektropolimerizasyon
ETOH	Etanol
FP	Fotopolimerizasyon
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GuaM	Guanin metakrilat
HAc	Asetik asit

I	Akım
I_p	Pik akımı
İEP	İndüktif eşleşmiş plazma
KDV	Kare dalga voltametri
KDSV	Kare dalga sıyırma voltametrisi
KS	Kütle spektrometri
m	Eğim
MeOH	Metanol
MIBK	Moleküler baskılı içi boş küreler
MIMs	Moleküler baskılı membranlar
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
NaOH	Sodyum hidroksit
NIP	Baskılanmamış polimer
p-ABA	Para amino benzoik asit
p-AFBA	Para amino fenil boronik asit
PAR	Parasetamol
Py	Pirol
r^2	Korelasyon katsayısı
R_{ct}	Yük transfer direnci
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SK	Sıvı kromatografisi
SPAuE	Perde baskılı altın elektrot
SS	Standart sapma
SV	Sıyırma voltametri
TAS	Tayin alt sınırı
3-TBA	3-tiyenil boronik asit
TS	Teşhis sınırı

UA	Ürik asit
UPSK	Ultra performans sıvı kromatografisi
UraM	Urasil metakrilat
UV	Ultraviyole
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi



ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. MIP'lerin özel tanıma süreçleri: (A) MIP'ler, (B) yüzey baskılanmış polimerler (SIP'ler)	8
Şekil 1. 2. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması	20
Şekil 2. 1. 100 mV/s tarama hızında 15 döngü ile 10 mM RIB, 50 mM Py ve 10 mM p-AFBA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları	47
Şekil 2. 2. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi	48
Şekil 2. 3. 100 mV/s tarama hızında 10 döngü ile 10 mM MOL, 50 mM Py ve 10 mM 3-TBA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları	49
Şekil 2. 4. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi	49
Şekil 2. 5. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi	51
Şekil 2. 6. 100 mV/s tarama hızında 10 döngü ile 10 mM KAM, 50 mM Py ve 10 mM p-ABA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları	52
Şekil 2. 7. 100 mV/s tarama hızında 10 döngü ile 10 mM GUA, 50 mM Py ve 10 mM p-ABA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları	53
Şekil 2. 8. 100 mV/s tarama hızında 10 döngü ile 10 mM DMF, 50 mM Py ve 10 mM p-ABA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları	54
Şekil 2. 9. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi	54
Şekil 3. 1. Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında (A) DV ve (B) EIS grafikleri; UraM/RIB@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında elde edilen (C) DV ve (D) EIS grafikleri	57
Şekil 3. 2. Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonları. (A) MIP ve NIP (B) NIP'in ATR-FTIR spektrumları; (C) MIP ve (D) NIP'nin SEM görüntüleri; (E) MIP ve (F) NIP'in temas açısı görüntüleri; (G) MIP ve (H) NIP'in AFM görüntüleri	59
Şekil 3. 3. UraM/RIB@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonları. (A) MIP ve NIP. (B) NIP'nin ATR-FTIR spektrumları; (C) MIP ve (D) NIP'nin SEM görüntüleri; (E) MIP ve (F) NIP'nin temas açısı görüntüleri; (G) MIP ve (H) NIP'nin AFM görüntüleri	60
Şekil 3. 4. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltisi, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) RIB için yeniden bağlanma süresi	64
Şekil 3. 5. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) damlatma hacmi, (C), FP süresi, (D) uzaklaştırma çözeltisi, (E) uzaklaştırma süresi, (F) RIB için yeniden bağlanma süresi	65
Şekil 3. 6. (A) Standart çözeltide ve (C) ticari serum çözeltisinde farklı RIB derişimlerine sahip poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözeltide ve (D) ticari serum çözeltisinde poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve NIP/CKE ile RIB'in kalibrasyon eğrisi	68
Şekil 3. 7. (A) Standart çözelti ve (C) ticari serum çözeltisinde farklı RIB derişimlerine sahip UraM/RIB@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözelti ve (D) ticari serum çözeltisinde UraM/RIB@MIP/CKE ve NIP/CKE ile RIB'in kalibrasyon eğrisi	69
Şekil 3. 8. (A) poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE; (B) UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin 1:1, 1:10 ve 1:100 oranında girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen çubuk grafikleri	74
Şekil 3. 9. A) Altı geleneksel hidrojen bağı ve bir karbon hidrojen bağı {(Uzaklık, Å; Aç, DHA,°): 1- 2.015, 143.410; 2- 1.724, 162.896; 3- 2.188, 118.312; 4- 2.677, 95.041; 5- 2.199, 131.491; 6- 2.374, 118.452; 7- 2.365, 145.878}. B) İki geleneksel hidrojen bağı, iki karbon hidrojen bağı ve bir pi-pi yığını {(Uzaklık, Å; Aç, DHA,°): 1- 1.929, 153.835; 2- 2.471, 120.068; 3- 2.361, 135.702; 4- 2.699, 103.426; 5- 4.546, }	76

Şekil 3. 10. A) Kimyasal yapısı, B) RIB-4-AFBA'nın optimize edilmiş yapısı {E(RB3LYP)= -1368.095919 Hartree (-37227.783361 eV)} ve C) elektrostatik potansiyel (ESP) harita (a.u., atom birimi)	76
Şekil 3. 11. A) Kimyasal yapısı, RIB-UraM'nin optimize edilmiş yapıları B1) RIB-UraM (1:1), {E(RB3LYP)= -1550.014809 Hartree (-42178.048129 eV)} ve B2) RIB-UraM (1:2) {E(RB3LYP)= -2194.009580 Hartree (-59702.037118 eV)} yapılarına ait enerji seviyeleri	77
Şekil 3. 12. Poli(Py-co-p-3-TBA)]/MOL@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında (A) DV ve (B) EIS grafikleri; GuaM/mOL@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında elde edilen (C) DV ve (D) EIS grafikleri	79
Şekil 3. 13. Poli(Py-co-p-3-TBA)]/MOL@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonları (A), GuaM/MOL@MIP/CKE sensörünün yüzey karakterizasyonları (B). MIP (a1, b1) ve NIP (a2, b2)'nin ATR-FTIR spektrumları; MIP (a3, b3) ve NIP (a4, b4)'in SEM görüntüleri; MIP (a5, b5) ve NIP (a6, b6)'in AFM görüntüleri; MIP (a7, b7) ve NIP (a8, b8)'in temas açısı görüntüleri	81
Şekil 3. 14. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltileri, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) MOL için yeniden bağlanma süresi	85
Şekil 3. 15. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) damlatma hacmi, (C), FP süresi, (D) uzaklaştırma çözeltileri, (E) uzaklaştırma süresi, (F) MOL için yeniden bağlanma süresi	86
Şekil 3. 16. (A) Standart çözelti ve (C) ticari serum çözeltisinde farklı MOL derişimlerine sahip poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözelti ve (D) ticari serum çözeltisinde poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve NIP/CKE ile MOL'ün kalibrasyon eğrisi	89
Şekil 3. 17. (A) Standart çözelti ve (C) ticari serum çözeltisinde farklı MOL derişimlerine sahip GuaM/MOL@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözelti ve (D) ticari serum çözeltisinde GuaM/MOL@MIP/CKE ve NIP/CKE ile MOL'ün kalibrasyon eğrisi	90
Şekil 3. 18. (A) poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE; (B) GuaM/MOL@MIP/CKE sensörlerinin 1:1, 1:10 ve 1:100 oranında girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen çubuk grafikleri	94
Şekil 3. 19. Poli(Py-co-3-TBA)/MOL kompleksi etrafındaki beş pirolün moleküler modelleme sonuçlarının şematik gösterimi	96
Şekil 3. 20. A) Kimyasal yapısı, B) MOL-GuaM'nin (1:1) optimize edilmiş yapıları {E(RB3LYP)= -1971.388051 Hartree (-53644.244489 eV)} ve C) MOL-GuaM'nin (1:2) optimize edilmiş yapılar {E(RB3LYP)= -2744.000884 Hartree (-74668.127477 eV)}	96
Şekil 3. 21. UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında (A) DV ve (B) EIS grafikleri	98
Şekil 3. 22. UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonları. (A) MIP ve (B) NIP'in SEM görüntüleri; (C) MIP ve (D) NIP'in AFM görüntüleri; (E) normal yüzey, (F) MIP ve (G) NIP'nin temas açısı görüntüleri	99
Şekil 3. 23. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) damlatma hacmi, (C), FP süresi, (D) uzaklaştırma çözeltileri, (E) uzaklaştırma süresi, (F) UMI için yeniden bağlanma süresi	102
Şekil 3. 24 (A) Standart çözeltide, (C) ticari serum çözeltisinde ve (D) idrar çözeltisinde farklı UMI derişimlerine sahip UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözeltide, (D) ticari serum çözeltisinde ve (E) idrar çözeltisinde UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE ve NIP/CKE ile UMI'nin kalibrasyon eğrisi	104
Şekil 3. 25. (A) Standart çözeltide, (C) ticari serum çözeltisinde ve (D) idrar çözeltisinde farklı UMI derişimlerine sahip UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE'nin EIS Nyquist eğrleri. (B) standart çözeltide, (D) ticari serum çözeltisinde ve (E) idrar çözeltisinde UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE ve NIP/CKE ile UMI'nin kalibrasyon eğrisi	105

Şekil 3. 26. (A) DPV, (B) EIS yöntemi kullanılarak UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE sensörünün 1:1, 1:10 ve 1:100 oranında girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen çubuk grafikleri	111
Şekil 3. 27. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün hazırlanması aşamalarında DV grafikleri	113
Şekil 3. 28. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörün yüzey karakterizasyonları. (A) MIP ve (B) NIP'in SEM görüntüleri; (C) MIP ve (D) NIP'in AFM görüntüleri; (E) normal yüzey, (F) MIP ve (G) NIP'nin temas açısı görüntüleri, (H) MIP ve NIP'in ATR-FTIR spektrumları	114
Şekil 3. 29. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörüne ait optimizasyon parametreleri için ΔIp değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltileri, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) KAM için yeniden bağlanma süresi	118
Şekil 3. 30. Poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE sensörüne ait optimizasyon parametreleri için ΔIp değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltileri, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) KAM için yeniden bağlanma süresi	119
Şekil 3. 31. Poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE sensörüne ait optimizasyon parametreleri için ΔIp değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltileri, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) KAM için yeniden bağlanma süresi	120
Şekil 3. 32 (A) Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE, (C) poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE, (E) poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE sensörlerin DP voltammogramları; (B) poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE, (D) poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE, (F) poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE sensörlerin kalibrasyon eğrisi	123
Şekil 3. 33. (A) Serum örneğinde Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE için DP voltammogramları, (B) serum numunesindeki çeşitli KAM derişimlerinin yeniden bağlanmasından sonra elde edilen kalibrasyon eğrileri	125
Şekil 3. 34. DPV yöntemi kullanılarak Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün 1:1, 1:10 ve 1:100 oranında girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen çubuk grafikleri	128

ÇİZELGELER

Çizelge 1. 1. SARS-CoV-2'de kullanılan ilaçlara ilişkin genel bilgiler	7
Çizelge 1. 2. RIB için geliştirilen analitik yöntemler	39
Çizelge 1. 3. MOL için geliştirilen analitik yöntemler	40
Çizelge 1. 4. UMI için geliştirilen analitik yöntemler	41
Çizelge 1. 5. KAM için geliştirilen analitik yöntemler	41
Çizelge 2. 1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	42
Çizelge 2. 2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihaz ve diğer ekipmanlar	43
Çizelge 2. 3. Tez çalışması kapsamında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri	43
Çizelge 3. 1. EIS ölçümlerinde elektronik eşdeğer devresinin elementlerine ait değerler	58
Çizelge 3. 2. Poli(Py-co-p-APBA)]/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin RIB için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreleri	67
Çizelge 3. 3. Kapsül formu ve serum numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları	71
Çizelge 3. 4. RIB ve benzeri ilaç maddelerinin seçicilik değerleri	73
Çizelge 3. 5. EIS ölçümlerinde elektronik eşdeğer devresinin elementlerine ait değerler	79
Çizelge 3. 6. Poli(Py-co-3-TBA)]/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörlerinin MOL için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreleri	88
Çizelge 3. 7. Kapsül formu ve serum numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları	91
Çizelge 3. 8. MOL ve benzeri ilaç maddelerinin seçicilik değerleri	93
Çizelge 3. 9. UMI@B ₃ N ₃ /BuMA@MIP/CKE sensörünün UMI için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreleri	106
Çizelge 3. 10. Ticari serum numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları	108
Çizelge 3. 11. İdrar numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları	108
Çizelge 3. 12. UMI ve benzeri ilaç maddelerinin seçicilik değerleri	110
Çizelge 3. 13. MIP and DIP sensörlerinin KAM için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreleri	124
Çizelge 3. 14. Ticari serum numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları	126
Çizelge 3. 15. KAM ve benzeri ilaç maddelerinin seçicilik değerleri	127

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Koronavirüsler (CoV), Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS-CoV) ve Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS-CoV) gibi çeşitli hastalıklara neden olan geniş bir virüs ailesidir. Şu anda COVID-19 (Korona Virüs Hastalığı 2019) olarak bilinen hastalığa neden olan ve daha önce insanlarda tanımlanmamış yeni bir türdür. Virüsün mevcut referans adı SARS-CoV-2 ve neden olduğu hastalık Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından COVID-19 olarak adlandırılmıştır (Abed Alah vd., 2020; N. Zhu vd., 2020). SARS-CoV-2'nin konakçı akciğer epitel hücrelerine invazyonu, transmembran spike glikoproteininin konak anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE-2) reseptörlerine bağlanmasıyla oluşur (Cuervo & Grandvaux, 2020; Ni vd., 2020). SARS-CoV-2 daha sonra proteini parçalamak ve tetiklemek için insan transmembran yüzey proteazı transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)'yi kullanır ve virüsün konakçı membran füzyonuna katılmasına izin verir (Huang vd., 2020; Tang vd., 2020). SARS-CoV-2 neden olduğu COVID-19, dünya çapında morbidite ve mortalitede önemli bir artışa yol açmıştır (Singh vd., 2021). Mayıs 2021'in ikinci haftasına kadar dünya çapında 266 milyondan fazla pozitif vaka görülmüş ve 5.26 milyondan fazla ölüm kayıtlara geçmiştir (Sharma vd., 2022). COVID-19'un önlenmesi için var olan aşılardan yanı sıra yenileri de geliştirilme aşamasında olmasına rağmen, bu hastalıkla mücadele için etkili antiviral ilaçlar şu anda yetersiz kalmıştır. Bazı ilaçlara yakın zamanda COVID-19 için acil kullanım izni (EUA) verilmiş olsa da tüm bu farmasötik ajanlardan istenilen sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle, basit bir oral antiviral ajanın geliştirilmesi, pandeminin başlangıcından beri anlaşılması zor bir hedef olmuştur (Singh vd., 2021). Tıp literatüründe tanımlandığı ve hayatımıza girdiği 2019 yılından bu yana küresel anlamda tahmin edilemeyecek boyutlara ulaşmış ve günlük rutin hayatı durma noktasına getirmiştir. Ancak bu karmaşık süreç birçok alanda çalışmaların hızlanmasına ve bilim dünyası açısından verimli sonuçlar alınmasına yol açmıştır. Mücadelede tedavi amaçlı kullanılabilecek bazı bilgilerin elde edilmesi amacıyla virüsün yapısı ve yaşam döngüsü, enfeksiyon oluşturma yolları ve patogenezi gibi özellikleri üzerine yoğun çalışmalar COVID-19'a karşı yürütülmektedir (Chellaseamy vd., 2020; Jomah vd., 2020; Kaushik vd., 2020). İlaç geliştirme çalışmalarının yanı sıra hastalığın teşhisine

yönelik sensör/cihazların geliştirilmesi de oldukça önemlidir. Doğru, kesin, hızlı sonuçlar ve pratik analizler sağlayan teşhis sistemleri, COVID-19 ile mücadelede ilk adım olarak öne çıkmaktadır.

Çalışmaların bir diğer basamağı ise farmasötik preparatlardan ve biyolojik örneklerden yeni geliştirilen ilaçların veya COVID-19 tedavisinde ilk kez kullanılan ilaçların analiz edilmesi ve belirlenmesi oluşturmaktadır. İlaçların etkileri, yan etkileri ve doz ayarlama çalışmaları dikkate alındığında serumdaki derişiminin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Farmasötik ve biyolojik numuneleri analiz ederken tespiti zorlaştıran bir sorun vardır. Bu ortamlar hedef analit dışında farklı bileşenler içeren karmaşık ortamlardır ve hedef analiti düşük derişimlerde içerirler. Bu nedenle geliştirilecek sensörün son derece seçici ve duyarlı olması, hızlı ve kolay analiz sağlaması, aynı zamanda çevre ve kullanıcı dostu olması amaçlanmaktadır (Kablan vd., 2022; Vural vd., 2023). Bu amaçla geliştirilen diğer sensörler arasında elektrokimyasal sensörler, kromatografi ve spektrofotometri gibi günümüzde mevcut olan diğer yöntemlere kıyasla yüksek hassasiyet, güvenilirlik, doğruluk, uygun fiyat, hızlilik, kolay uygulama ve taşınabilirlik gibi dikkat çeken özellikleriyle öne çıkmaktadır (Vural vd., 2023). Elektrokimyasal sensörler, çok daha az numune gerektirmesi, karmaşık ön hazırlık adımları içermemesi, analiz sürelerinin daha kısa olması ve kullanıcı dostu olması nedeniyle diğer yöntemlere göre popüler hale gelmiştir (Kablan vd., 2022). Hepsi bu genel avantajlara sahip olmakla birlikte, elektrokimyasal sensörler ölçülen sinyalin türüne göre farklı alt tekniklere ayrılmaktadır. Örneğin en çok kullanılan tekniklerden biri olan voltametrik tekniklerde akım ölçülürken, potansiyometrik teknikler potansiyel ölçümüne dayanmaktadır. Ayrıca hepsinde temel prensip, elektroaktif türlerin neden olduğu elektrokimyasal etkileşimlerin tespit edilmesidir. Elektrokimyasal sensörlerin performansının özellikle hassasiyet açısından artırılması amacıyla nanomalzemelerin modifikasyon malzemesi olarak kullanılması sıklıkla tercih edilmektedir. Elektriksel ve iletken özelliklerin iyileştirilmesi sayesinde, nanomateriyal bazlı bu elektrokimyasal sensörler elektron transfer kinetiğini hızlandırabilir ve sinyal yanıtını artırabilir (Allahverdiyeva vd., 2021; Kablan vd., 2022; Vural vd., 2023). Elektrokimyasal sensörlerde karşılaşılabilecek en önemli dezavantaj düşük seçicilik problemidir. Bu sorunun üstesinden gelmek için moleküler baskılı polimerler (MIP'ler) elektrokimyasal sensörlere entegre edilir. MIP'ler, hedef analit gibi şekillendirilmiş spesifik boşluklara sahip, hedefe karşı yüksek afinite ve seçiciliğe gösteren polimerik yapılardır. Bu benzersiz özellikler sayesinde elektrokimyasal sensörlere büyük seçicilik kazandırmak mümkündür. Bu nedenle MIP tabanlı elektrokimyasal sensörler için özellikle ilaç

analizlerinde birçok uygulama mevcuttur (Cetinkaya vd., 2022; Çorman vd., 2022; Kaya vd., 2022).

Bu tez kapsamında COVID-19 çalışmalarında en sık kullanılan antiviral ilaçlardan ribavirin (RIB), kamostat mesilat (KAM), molnupiravir (MOL) ve umifenovir (UMI) etken maddelerinin ayrı ayrı tayini için MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Şimdiye kadar bilimsel literatürde eksik kalan bu antiviral maddelerin daha seçici ve hassas tayini için elektrokimyasal polimerizasyon (EP) ve fotopolimerizasyon (FP) gibi farklı yöntemler kullanılarak spesifik sensörler geliştirilmiştir. Ayrıca, MIP'lerin tasarımında ve sentezinde çok önemli olan monomer ve şablon oranı, uzaklaştırma çözeltileri, uzaklaştırma süresi ve yeniden bağlanma süresi gibi deneysel parametreler optimize edilmiştir. Sensörlerin seçiciliğini gösteren baskı faktörleri (IF) hesaplanmıştır. Ayrıca sensörlerin dayanıklılığı stabilite çalışması ile belirlenmiştir. Geliştirilen MIP temelli sensörler spektroskopik (yüzey elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), temas açısı ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM)) ve elektrokimyasal (dönüşümlü voltametri (DV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)) yöntemlerle karakterize edilmiştir. Sonuçlar, geliştirilen sensörün diğer analitik tekniklere kıyasla farmasötik preparatlardan ve ticari insan serumu numunelerinde yüksek uygulanabilirlik, doğruluk ve kesinlik ile antiviral ilaçların seçici ve hassas belirlenmesine etkili bir çözüm üretmenin yanı sıra hızlı analiz süresi, düşük maliyet ve verimli analitik sinyalin başarılı bir şekilde üretildiği kanıtlanmıştır. Ayrıca, elektrot yüzeyindeki değişiklikler moleküler ve elektronik düzeyde kuantum kimyasal hesaplamalarla değerlendirilmiştir.

1.2. COVID-19 Tanısına Yönelik Mevcut Yaklaşımlar

Günümüzde viral hastalıkların tanısında kullanılan yöntemlere baktığımızda köklü yöntemlerin başında enzime bağlı immünosorbent assay (ELISA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri gelmektedir. Bu yöntemlerin ulaşılabilirlik ve hızlilik açısından eksiklikleri bulunmakta olup, farklı tekniklerle tanı alanında avantajlı seçeneklerin geliştirilmesi gerekmektedir. Özellikle COVID-19 salgınıyla birlikte hastalığın hızla teşhis edilip kontrol altına alınabilmesi için tanı testlerinin pratik, hızlı ve güvenilir olması daha da önemli hale gelmiştir. Bu amaçla testler, az miktarda viral RNA'nın hassas bir şekilde tespit edilmesini, kısa analiz süresinde çok sayıda numuneyi test edebilecek etkin kapasiteyi ve çok düşük yanlış pozitif/negatif sonuç olasılığını gerektirmelidir (Caruana vd., 2020).

COVID-19'u tespit etmek için teşhis sensörleri için hedef analit olarak çeşitli biyobelirteçler kullanılmaktadır. En önemlileri virüsün spike proteini veya spesifik RNA'sı ve COVID-19'a bağlı inflamasyon durumunda eksprese edilen spesifik metabolitlerdir (Madhurantakam vd., 2022). Antijen bazlı tanı testleri, koronavirüsün nükleokapsid (N), spike (S), zarf (E) ve membran (M) olan yapısal proteinlerine odaklanır. Bunlar arasında S proteini, N-terminal alanı, N-terminal S1 reseptör bağlama alanı (RBD) ve C-terminal S2 alt biriminden oluşan konakçı hücrelerde önemli rollere sahiptir. S ve N proteinleri ve RBD, tanısal biyobelirteçler olarak en önemli antijenlerdir. IgG, IgM veya SIgA gibi antikor bazlı testler de mevcuttur. Yine de enfeksiyondan günler veya haftalar sonra anlamlı sonuçlar verebildikleri için rutin analizler için pek işlevsel değildirler. Enfeksiyon süreci sırasında, S proteininin RBD'si, bir reseptör biyolojik belirteci olarak sınıflandırılan anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 ile etkileşime girer, dolayısıyla yüksek düzeyde ekspresyonu SARS-CoV-2 enfeksiyonuyla ilişkilidir (Chauhan vd., 2020; Madhurantakam vd., 2022; Ravina vd., 2022). Bunların dışında en genel anlamda vücudun enfeksiyonlara verdiği tepkileri temel alan biyobelirteçler de tanı amaçlı kullanılmaktadır. Bunlar arasında interleükinler, C-reaktif protein, prokalsitonin vb. yer alır (Kepczynski vd., 2021; Madhurantakam vd., 2022; Ravina vd., 2022). COVID-19'u tanımlamak için kullanılan diğer biyobelirteçler ORF1b ve ORF1a'dır. ORF1b esas olarak RNA sentezinde yer alan proteinleri kodlarken, ORF1a öncelikle proteazları ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisini bozan diğer proteinleri kodlar. Alt genomik RNA'lar spike, viral zarf, membran ve nükleokapsid gibi proteinleri kodlar. ORF1ab ve N proteinlerini kodlayan RNA'lar, terminolojiyi basitleştirmek için sırasıyla ORF1ab ve N RNA'lar olarak adlandırılan PCR ürünleriyle temsil edilir. Ayrıca, COVID-19 hastalarının özellikle ORF1ab ve N RNA'lar için viral yük dinamikleri dikkat çekmiştir (Bhargava, 2021).

1.3. Tez Kapsamında Kullanılan Antiviral Etken Maddelerle İlgili Bilgiler

COVID-19'un beklenmedik bir şekilde ortaya çıkması ve hızla tüm dünyayı etkisi altına alan bir salgına dönüşmesi nedeniyle etkinliği yüksek ilaçlara çok acil bir ihtiyaç doğmuştur. Bu nedenle özellikle bu sürecin ilk aşamalarında çeşitli viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antiviral etkileri kanıtlanmış ilaçların bu yeni koronavirüs türü üzerindeki etkinliği üzerine çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Ayrıca farklı amaçlar ve endikasyonlar için kullanılan ilaçlar, COVID-19 için yeniden kullanım adayı olarak değerlendirilmiştir (Awadasseid vd., 2021; Chellasamy vd., 2020; Muhammed vd., 2021). Bu süreçte söz konusu olan bir diğer durum ise klinik çalışmaları devam eden bazı ilaçların

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından acil kullanım için onaylanmasıdır. COVID-19 sürecinde tedavi protokollerinde yer alan ilaçların bir kısmı halen kullanılmaya devam edilirken bir kısmı da yapılan çalışmalarda etkisiz olduğu belirlendiğinden tedavi protokollerinden çıkarılmıştır. Ayrıca ülke çapında FDA veya Avrupa Birliği İlaç Ajansı (EMA) onayı olmadan tedavide denenilen bazı ilaçlar da olmuştur (Jomah vd., 2020; Yin vd., 2022). Tüm bu ön bilgiler ışığında SARS-CoV-2'de öncelikli olarak kullanılan ilaçlara genel bir bakış Çizelge 1.1'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

1.3.1. Molnupiravir

Molnupiravir (MOL), Alfavirüs enfeksiyonları için tasarlanmış bir antiviral ajandır. Pandemi ile birlikte emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite profilleri oldukça iyi olduğundan çalışmalar MOL'ün COVID-19 üzerindeki olası etkinliğine odaklanmıştır. Ana etki mekanizması, RNA virüsleri üzerinde etkili olan ribonükleozid analogu β -D-N4-hidroksisitidin ön ilacıdır. COVID-19 tedavisi için MOL'ün faz 3 klinik çalışmaları yürütülmüştür. MOL oral farmasötik formda mevcuttur ve FDA tarafından acil kullanım için onaylanan ilaçlar arasındadır. Aktif ilaç β -D-N4-hidroksisitidin'in RNA'ya bağımlı RNA polimeraz inhibisyon etkisi sayesinde hastaneye yatışlarda ve ölümlerde yaklaşık %50'lik bir azalma gözlemlenmiştir (Hashemian vd., 2022; Singh vd., 2021, 2022).

1.3.2. Ribavirin

Ribavirin (RIB), hepatit C virüsünün pegile α -interferon ile kombine tedavisinde önemli bir yere sahiptir (Bosch vd., 2007). RNA virüslerinin RIB ile ilişkili inhibisyonu geniş spektrumlu bir etkiye sahiptir. Bu nedenle SARS-CoV-2'ye karşı etkinliği de test edilmiştir. Ancak çalışmalarda kanıtlanmış in vitro etkiye rağmen in vivo olarak anlamlı bir virüs inhibisyonu gözlemlenmemiştir (Tong vd., 2020). Ribavirinin lopinavir-ritonavir kombinasyonu veya interferon-alfa ile birlikte kullanılmasını öneren çalışmalar da mevcuttur. Bu tür tedavi yaklaşımında zamanlama çok önemlidir ve hastanede kalış süresini önemli ölçüde azaltabilir (Gong vd., 2021; H. Li vd., 2021).

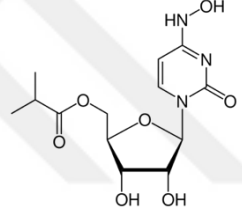
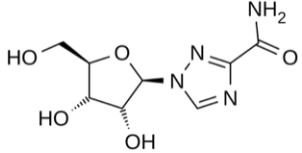
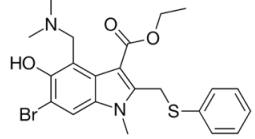
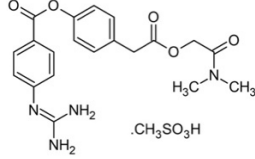
1.3.3. Umifenovir

Umifenovir (UMI), Rusya ve Çin'de grip, SARS ve Lassa virüsü tedavileri için onaylanmış geniş spektrumlu bir antiviral ajandır. SARS virüslerinin benzerliğinin yüksek olması, UMI'nin COVID-19 tedavisindeki etkinliğine ilişkin çalışmaların başlangıç noktasını oluşturmaktadır. UMI'nin etkinliği in vitro çalışmalarla doğrulanmıştır. Lopinavir ile birlikte uygulandığında klinik semptomlarda ve hastanede kalış sürelerinde azalma görülmüştür. Ayrıca bazı çalışmalar viral bağlanmayı önlediğini ve viral partikül salınımını inhibe ettiğini kanıtlamıştır (Alavi Darazam vd., 2021; Jomah vd., 2020; Ramachandran vd., 2022).

1.3.4. Kamostat Mesilat

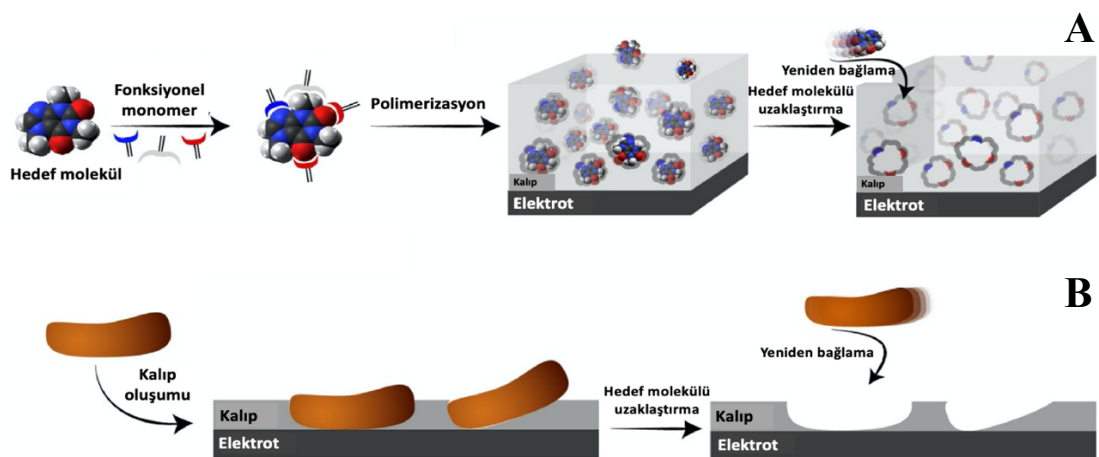
Kamostat mesilat (KAM), Japonya'da kronik pankreatit ve postoperatif reflü özofajit tedavisinde kullanılmaktadır ve etki mekanizması, insan trans-membran proteaz serin 2'nin inhibisyonudur. KAM'ın COVID-19 tedavisi üzerindeki etkisini bildiren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre hastanede yatan hastalarda veya yoğun bakım ünitesindeki hastalarda ölüm oranını önemli ölçüde azaltmıştır. Ek olarak, bazı çalışmalar, kronik pankreatit ve postoperatif reflü özofajitte onaylanmış kullanımına kıyasla, COVID-19 tedavisinde daha yüksek dozda KAM gerektiğini göstermiştir (Awadasseid vd., 2021; Sørensen vd., 2021; Tobback vd., 2022).

Çizelge 1. 1. SARS-CoV-2'de kullanılan ilaçlara ilişkin genel bilgiler

Antiviral İlaç	IUPAC Adı	Kimyasal Yapısı	Mekanizması	FDA Onaylı Klinik Kullanım	Ref.
MOL	[(2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-[4-(hidroksiamino)-2-oksopirimidin-1-il]oksolan-2-il]metil 2-metilpropanoat		Ribonükleosit analogu β -D-N4-hidroksisitidin için ön ilaç	Hafif-orta şiddette koronavirüs hastalığının tedavisinde acil kullanım onayı almıştır.	(Hashemian vd., 2022; Singh vd., 2021, 2022)
RIB	1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il]-1,2,4-triazol-3-karboksamid		İnozin monofosfat dehidrojenazın inhibisyonu	Kronik hepatit C virüsü enfeksiyonu olan yetişkinlerin tedavisinde kullanılmaktadır.	(Bosch vd., 2007; Crotty vd., 2002)
UMI	etil 6-bromo-4-[(dimetilamino)metil]-5-hidroksi-1-metil-2-(fenilsülfanilmetil)indol-3-karboksilat		Viral bağlanmanın önlenmesi, viral partikül salınımının engellenmesi	FDA tarafından onaylanmamıştır. Grip profilaksisi ve tedavisi için Rusya ve Çin'de onaylanmıştır.	(Alavi Darazam vd., 2021; Jomah vd., 2020; Ramachandran vd., 2022)
KAM	[4-[2-[2-(dimetilamino)-2-oksoetil]fenil] 4-(diaminometilidenamino)benzoat;metansülfonik asit		İnsan trans-membran proteaz serin 2 inhibisyonu	FDA tarafından onaylanmamıştır. Japonya'da kronik pankreatit ve postoperatif reflü özofajit için onaylanmıştır.	(Awadasseid vd., 2021; Sørensen vd., 2021; Tobback vd., 2022)

1.4. Moleküler Baskılı Polimerler (MIPs)

Moleküler baskılama, antikorlar, reseptörler, enzimler vb. gibi doğal biyolojik türevleri taklit eden sentetik biyolojik tanıma boşluklarına izin veren yenilikçi bir tekniktir (Çorman vd., 2022). Moleküler baskılamanın temeli, hedef analitin varlığında fonksiyonel monomerin aşırı çapraz bağlama maddeleri ile polimerizasyonuna dayanır. Hedef analitin uzaklaştırılmasından sonra, şablonun uzaysal ve kimyasal yapısındaki şablonu tamamlayıcı sentetik boşlukların, şablonu seçici olarak yeniden bağlanmasından sorumlu olarak ortaya çıkar. Burada, moleküler baskılama tekniği, doğal reseptörlerle karşılaştırılabilecek yüksek spesifik afiniteye ve doğal biyomoleküllere göre üstün stabiliteye sahip biyo-taklit reseptörlere olanak sağlar (Alexander vd., 2006). Plastik antikorlar ve/veya plastik enzimler olarak adlandırılan MIP'ler, biyomimetik elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesinde etkili malzemeler olarak ortaya çıkmıştır. İyi stabiliteye, yüksek sıcaklık ve basınç direncine ve uzun raf ömrüne sahip MIP'lerin oluşumu nispeten kolay gibi görünse de, uygun fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı kullanımı, fonksiyonel monomer, hedef ve çapraz bağlayıcı arasındaki optimum oranların belirlenmesi gibi bazı değişkenler göz önünde bulundurulmalıdır ve maksimum verimi elde etmek için iyi tartışılmalıdır (M. Gao vd., 2020). Ayrıca, proteinler, polipeptitler ve enzimler gibi makro yapılar için baskılı materyallerin yapımı, zayıf kütle transferi ve çözünürlük, denatürasyon ve karmaşık yapı nedeniyle bağlanma boşluklarındaki heterojen afinite göz önüne alındığında bazı doğal sınırlamalara sahiptir (Bhakta & Mishra, 2021; W. Chen vd., 2015; W. Li vd., 2021; Martín-Esteban, 2013; Pan vd., 2018; Piletska vd., 2009).



Şekil 1. 1. MIP'lerin özel tanıma süreçleri: (A) MIP'ler, (B) yüzey baskılanmış polimerler (SIP'ler). (Zelikovich ., 2023).

1.4.1. MIP'lerin Bileşenleri

1.4.1.1. Hedef Molekül

MIP yapısının önemli noktası, moleküler baskılama sırasında seçilen fonksiyonel monomerlere bağlı fonksiyonel grubun organizasyonunu yönlendirebilen bir hedef molekülün olmasıdır. MIP'lerin performansında, kalıpta amino, karboksil, hidroksil, amid ve ester gibi fonksiyonel grupların varlığı çok önemlidir. Genel olarak ideal bir kalıbın karşılanması için üç gereksinim vardır. İlk olarak, hedef molekülün polimerizasyon reaksiyonu sırasında mükemmel kimyasal stabilite sergilemelidir. İkincisi, fonksiyonel monomerlerle birleşerek hedef molekül-monomer kompleksi oluşturabilecek zengin fonksiyonel gruplar içermelidir. Son olarak, hedef molekül ile monomer arasındaki bağlanmanın polimerizasyona müdahale etmemesini veya polimerizasyon reaksiyonu sırasında dengesizleşmemesini sağlamak önemlidir. Şimdiye kadar proteinler veya hücreler gibi biyolojik makromoleküller biyomedikal alanlarda hedef molekül olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu basit yaklaşım, herhangi bir karmaşık kalıp hazırlama prosedürünü gerektirmez ve tipik olarak uygun bağlama kapasitesine ve yüksek seçiciliğe sahip MIP'ler sağlar (Adumitrăchioaie vd., 2018; L. Chen vd., 2016). Bununla birlikte, makromolekülleri baskılamaya yönelik bu yaklaşımın, bu moleküllerin karmaşıklığı, yüzeylerinde spesifik olmayan tanıma bölgelerinin varlığı, doğal makromoleküller için sınırlı polimerizasyon teknikleri ve hedef olmayan daha küçük moleküllerin bağlanma potansiyeli dahil olmak üzere önemli zorluklar içerebilir. Ayrıca, nispeten daha büyük baskılı alanlar, duyarlılığın azalmasına da neden olur. Bu zorlukların üstesinden gelmek için son gelişmeler, hedef proteinlerin moleküler baskılanması için hedef molekül olarak glikan, monosakarit, oligosakarit, epitop veya aptamer gibi sentetik reseptörlerin kullanımını ortaya çıkarmıştır (L. Chen vd., 2016).

1.4.1.2. Fonksiyonel Monomer

MIP'lerin geniş uygulama alanları nedeniyle, MIP hazırlanmasında kullanılacak fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlama maddeleri, hedef molekülün özellikleri (yük, boyut, kimyasal kimlik) dikkate alınarak seçilir. Uygun polimerlerin seçimi moleküler baskılamada en önemli faktörlerden biridir. Monomerler tipik olarak iki bağımsız tipte birim içerir: tanıma birimleri ve polimerize edilebilen birimler. Monomerlerin seçimi için önemli bir gereklilik, bunların hedef molekül ile etkileşime girebilecek fonksiyonel gruplara sahip

olmasıdır. Bu gruplar, bir hedef molekül-monomer kompleksi oluşturmak için hedef molekül hidrojen bağı, dipol, van der Waals etkileşimi veya π - π etkileşimi gibi kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler oluşturabilir. Hedef molekül ile polimer matrikste bulunan fonksiyonel grup arasındaki etkileşim, moleküler tanıma neden olur (Turiel & Esteban, 2019; Włoch & Datta, 2019). Bu süreç, ön polimerizasyon reaksiyonunda meydana gelir ve bir MIP'nin tanıma biriminin niteliğini ve niceliğini belirler. Moleküler olarak baskılanmış polimerler, fonksiyonel monomerler hedef moleküllerle yeterince reaksiyona girdiğinde kompleksler oluşturularak ve ardından baskılı moleküller üzerinde fonksiyonel monomerlerin fonksiyonel gruplarını hareketsiz hale getirmek için çapraz bağlama ajanları eklenerek hazırlanır. Daha sonra hedef molekül için üç boyutlu bir polimerik ağ oluşturulur. Bu nedenle, hedef molekül uzaklaştırıldıktan sonra bile bağlanma bölgesinin sağlam kalmasını sağlamak için polimerin yeterince çapraz bağlanması gerekir (Turiel & Esteban, 2019). Kovalent olmayan baskıda L-fenilalanin, 17 β -estradiol, metakrilik asit, 2-hidroksietil metakrilat, asetilsalisilik asit ve 4-vinil piridin fonksiyonel monomerler olarak yaygın şekilde kullanılır. Kovalent baskılamada, tersinir kovalent bağ oluşturma özelliklerinden dolayı fonksiyonel monomerler olarak sıklıkla 1,3-dioller, aminler ve boronik asitler tercih edilir. Ek olarak fonksiyonel monomerler, MIP'nin başarılı sentezi ve tasarımında önemli olmasının yanı sıra polimer matrisine stabil bağlanma parçaları oluşturmaya yardımcı olur (Çorman vd., 2022).

1.4.1.3. Çapraz Bağlayıcı

Baskı işlemine çapraz bağlayıcıların dahil edilmesi, fonksiyonel monomerlerin hedef moleküllerin etrafında yakından düzenlenmesini sağlar ve yüksek düzeyde çapraz bağlı bir polimerik matris ortaya çıkar. Bu, hedef moleküller uzaklaştırıldıktan sonra MIP'lerin morfolojisinin ve mekanik stabilitesinin doğru şekilde yönlendirilmesine olanak sağlar. Monomere benzer şekilde, polimerizasyon işleminde kullanılan çapraz bağlayıcı monomerlerin türü ve sayısı da MIP'lerin özelliklerinde önemli bir rol oynar. MIP'lerdeki mekanik stabilite ve tanıma bölgelerinin sayısı, polimerizasyon işlemi sırasında kullanılan çapraz bağlayıcının miktarına bağlıdır. Yetersiz miktarda çapraz bağlayıcı kararsız mekanik özelliklere yol açabilirken aşırı miktardaki çapraz bağlayıcı, MIP'lerin birim kütlesi başına tanıma bölgelerinin sayısını azaltabilir (Turiel & Esteban, 2019; Włoch & Datta, 2019). Bu nedenle, en iyi polimerizasyon sonuçlarını elde etmek için temel çapraz bağlayıcıların oranının önceden optimize edilmesi gereklidir. Ayrıca çapraz bağlama maddesinin türü de polimerizasyon sonrası MIP'nin kalitesini ve verimini belirler. Monomerlerin uygun

kombinasyonu ve oryantasyonu, yalnızca hedef molekül için gelişmiş afinite ve yüksek seçiciliğe yol açmakla kalmaz, aynı zamanda polimerin mekanik stabilitesini ve gözenekliliğini de belirler. Etilen glikol dimetakrilat (EDMA veya EGDMA), trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM) ve 1,4-divinil benzen (DVB) gibi çapraz bağlayıcılar moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Çorman vd., 2022).

1.4.1.4. Başlatıcı

Başlatıcılar, özellikle serbest radikal polimerizasyonunda MIP'lerin temel bileşenleridir ve serbest radikalleri elde etmek için termal veya fotokimyasal olarak tetiklenebilir. Termal ve fotokimyasal olarak kararsız hedef molekül, sırasıyla termal ve fotokimyasal olarak aktive edilen başlatıcılar kullanılarak polimerize edilemez. Polimerizasyon için düşük sıcaklığın kullanılması gerekli olduğunda fotokimyasal olarak aktif başlatıcılar uygulanır (Adumitrăchioaie vd., 2018; Malik vd., 2019). MIP'leri sentezlemek için genellikle ısı veya UV kaynaklı serbest radikal polimerizasyonu kullanılır. Serbest radikaller olan azobisnitriller en yaygın kullanılan başlatıcılar arasındadır. Özellikle 2,20-azobis-(izobütironitril) (AIBN) ve 2,20-azobis-(2,4-dimetilvaleronitril) (ADV N), MIP'lerin hazırlanmasında sıklıkla uygulama alanı bulmuştur. Özellikle, MIP'lerin hazırlanması uygulamalarına bakılırsa, AIBN en çok kullanılan başlatıcılardan biridir (Çorman vd., 2022).

1.4.1.5. Porojenik Çözücü

Çözücülerin, çapraz bağlayıcı ile gözenek oluşumu gibi MIP morfolojisi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Ön polimerizasyon kompleksinin stabilitesi solvent ortamından etkilendiğinden solvent seçimi MIP'lerin tanıma performansı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Örneğin, metanol ve su gibi yüksek polariteli çözücüler, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki bağları olumsuz etkileyerek MIP'lerin daha düşük seçiciliğe sahip sentezine yol açar. Bu nedenle polar solventlerin aksine diklorometan veya asetonitril gibi polar olmayan solventler tercih edilebilir. Bu durumda polar olmayan solventlerin dielektrik sabiti önemli olacaktır. Artan dielektrik sabiti hidrojen bağı etkileşimlerini etkilediği için MIP'in seçiciliği üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Özetle, seçicilik en iyi şekilde düşük dielektrik sabitine sahip apolar solventlerde sentezlenen MIP'lerde gözlemlenmiştir. Çözücünün türü ve polaritesi; polimerin gözenek yapısı, monomer-kalıp

molekül etkileşimi ve kalıp molekülün etkin şekilde uzaklaştırılması ile ilişkilidir (Włoch & Datta, 2019).

1.4.2. Moleküler Baskı Teknolojisi ve Yaklaşımları

İlk başlangıç noktası Polyakov'un silika jelin sentezlenmesi ve bunun baskılı boyalar için adsorpsiyon özelliklerinin bulunmasıyla ilgili araştırmalarına dayanmaktadır. (Sun vd., 2014; Wackerlig & Schirhagl, 2016). Daha sonra, doğal antikorlar ile spesifik antijenlerin şablon modeller olarak etkileşimi, 1940 yılında Pauling tarafından önerilmiştir (H. Zhu vd., 2018). Her iki ön gelişme de yapay moleküler tanımanın temelini oluşturmaktadır. Wulff ve arkadaşları biyomimetik katalitik uygulamalar için MIP sentezine ve tasarımına öncülük etti. Sonuç olarak MIP stratejisi, hedef moleküllerin tanınmasında en umut verici tekniklerden biri olarak sınıflandırılmaktadır. Hedef molekül, monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı MIP'lerin en önemli bileşenleridir. Ön-polimerizasyon kompleksi olarak adlandırılan hedef molekül-monomer kompleksi, 3D-polimer zincirlerini uygun koşullar altında stabilize etmek için yüksek oranda çapraz bağlama maddesi varlığında polimerize edilir. Kalıp moleküllerin polimerden çıkarılmasından veya çıkarılmasından sonra, damgalanmış boşluklar, tamamlayıcı geometrik boyuta ve kimyasal yapıya sahip sentetik reseptörler olarak açığa çıkar. Moleküler baskılama yaklaşımı, iyi bilinen “kilit anahtarı” biyotanıma modeline dayanır. En çok dikkat, antikorların, reseptörlerin ve diğer birçok pahalı afinite reaktifinin yerini alabilecek moleküler baskılı polimer bazlı yapıların geliştirilmesi ve uygulanmasına odaklanmıştır (Lu et vd., 2014). Substrat molekülleri, çeşitli metabolik biyokimyasal reaksiyonlarda yüksek seçicilik ve afinite ile yapay boşluklara bağlanır. Benzer şekilde, moleküler baskılama iki ana noktaya dayanmaktadır: (i) polimerik matrislerin yapısı ve (ii) şablon ile polimer arasındaki bağlanma etkileşiminin doğası. Sonuç olarak, hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasında uygun bağlanma gruplarına sahip tersinir kovalent, kovalent olmayan etkileşimlerin veya hibrit etkileşimlerin oluşmasına izin verilir. Geleneksel baskılama yöntemlerinin ilk örneklerinde polimerin fonksiyonel grupları hedef moleküle kovalent olarak bağlanır. Daha sonra kalıp-monomer etkileşimlerinin van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve dipolar etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimlerle mümkün olabileceği bildirilmiştir. Baskılama yaklaşımları için bu kovalent olmayan bağlanma ilk olarak 1988'de Klaus Mosbach ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Shi vd., 2015).

Verimli, spesifik ve seçici MIP bazlı malzemeler geliştirmek için MIP sentezindeki en önemli adım, uygun sentez yönteminin belirlenmesi ve iyi yönlendirilmiş/erişilebilir boşlukların tasarlanmasıdır. Fonksiyonel monomerler, hedef moleküllerle kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler gerçekleştirir ve polimerizasyon işleminden önce çözelti aşamasında karmaşık ağlar oluşturur. Bu nedenle, fonksiyonel monomerlerin hedef moleküller etrafındaki etkileşimlerine ve düzenlenmelerine bağlı olarak kullanılan baskılamalar üç tipte özetlemek mümkündür: kovalent baskılama, kovalent olmayan baskılama ve yarı kovalent baskılamadır.

1.4.2.1. Kovalent Baskılama

Ön polimerizasyon kompleksleri, stabil polimerler oluşturmak üzere fonksiyonel monomerlerin şablon moleküllere kovalent olarak bağlanması yoluyla sentezlenir. Kovalent bağların yüksek bağ kuvveti/kararlılığı, diğer sentez yöntemlerine göre daha seçici olan MIP'lerin sentezine olanak sağlar. Ayrıca, kovalent baskılamada seçici olmayan bağlanma olasılığının düşük olması, fonksiyonel monomerler ve hedef moleküller arasındaki stokiyometrik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, bu yaklaşımda bu kovalent bağları parçalamak için hedef molekülün uzaklaştırılması adımı sert çıkarma işlemi uygulanmalıdır ve nispeten yavaş adsorpsiyon kinetiği, fonksiyonel gruplar ve hedef moleküller arasındaki kovalent bağların yeniden oluşması nedeniyle geliştirilen MIP'lerin performansını sınırlamıştır (Wulff, 2002).

1.4.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama

MIP tasarımında kullanılan en yaygın etkileşim türü kovalent olmayan baskılamadır. Esas olarak ön polimerizasyon işlemi sırasında hedef molekül ile fonksiyonel monomerler arasında hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, π - π etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri dahil olmak üzere zayıf moleküller arası etkileşimlere izin verir. Ayrıca uygun bir çözücü ve monomerin seçilmesi, ön polimerizasyon kompleksinin polimerizasyon adımı stabil olması için esastır. Bununla birlikte, düşük bağlanma sabiti nedeniyle aşırı miktarda fonksiyonel monomer kullanılması istenmeyen seçicilik ile sonuçlanır (Ashley vd., 2017).

1.4.2.3. Yarı Kovalent Baskılama

MIP'lerin sentezinde kovalent ve kovalent olmayan baskılama dışında, yarı kovalent baskılama olarak adlandırılan yaklaşım, bu iki yaklaşım arasında hibrit bir yaklaşım olarak bilinmektedir. Bu yaklaşımda, kovalent bağlar kullanılarak ön polimerizasyon kompleksi oluşturulurken, hedef molekülün monomerle etkileşimi sırasında kovalent olmayan etkileşimlerden de eş zamanlı olarak yararlanılır (Ansari, 2017).

1.4.3. MIP'lerin Zorlukları

MIP tasarımının amaçlarından biri biyolojik örneklerdeki malzemelerin biyomoleküllere karşı seçiciliğini, duyarlılığını ve uyumluluğunu arttırmaktır. MIP'lerde kullanılan başlangıç malzemelerinin fizikokimyasal özellikleri ve sonuçta ortaya çıkan polimerik ağ, analit biyomoleküllerinin fizyolojik gereksinimleriyle uyumlu olmalıdır (Kryscio & Peppas, 2012). Baskı teknolojisi uygun koşullar altında en iyi performansı verebilmelidir. Baskılanmış polimerler geleneksel olarak polimerizasyon sırasında oluşturulan yoğun ağlardan meydana gelir (Alexander vd., 2006). MIP'lerde oluşabilecek zorluklardan biri, hedef molekülün büyük polimerik yapıda sıkışıp kalabilmesi ve bağlanma bölgelerini bulmak için kolayca ağa geri yayılamamasıdır (Manjunatha vd., 2021). Ağ yayılımındaki bu sınırlamalar, başarısız bir tanıma mekanizmasına neden olur. Çözücüler, monomer ve hedef molekül arasındaki etkileşimleri azaltmamak için boşluklara etkili bir şekilde yayılmamalıdır. Ayrıca MIP'in katalizde kullanımıyla ilgili birçok sorun bulunmaktadır. Çeşitli çözücülerde çözünmezlik, heterojen boşluklar, yüksek miktarda çapraz bağlanma nedeniyle yavaş kütle taşınması, sulu ortamda baskı hataları MIP'lerde karşılaşılabilecek sınırlamalardandır (Çorman vd., 2022; Zelikovich vd., 2023).

1.4.4. Moleküler Baskılama Uygulamalarına Yönelik Stratejilerin Geliştirilmesi

1.4.4.1. MIP'leri Tasarlamak İçin Hesaplamalı Yaklaşımlar

Moleküler baskılama ve uygulamalarının hızla gelişmesiyle birlikte, MIP tasarımı ve sentezinin yukarıda bahsedilen aşamalarının in silico çalışmaları için çeşitli araçlar benimsenmiştir. Bu araçlar, ön polimerizasyon karışımındaki olaylardan polimer-ligand etkileşimlerine ve hatta polimer morfolojisine kadar değişen yönler hakkında atomistik bilgiler

sunabilir. 21. yüzyılın başında moleküler damgalamanın yönlerini incelemek için hesaplamalı stratejilerin ilk uygulamalarından bu yana, bu alan özellikle son on yılda istikrarlı bir şekilde büyüdü. Bu gelişme, bu çalışmalar ve deneysel doğrulama arasındaki gerekli yinelemeli etkileşim yoluyla desteklenmiştir. Geçmişte, MIP davranışının altında yatan moleküler olaylara ilişkin bilgiler, polimer-ligand etkileşimlerine ilişkin ampirik çalışmalardan elde ediliyordu. Termodinamik modeller (Nicholls, 1998; Nicholls vd., 2021; Pande vd., 1997), hem polimerizasyon öncesi olayları hem de polimer tanıma özelliklerini açıklamak ve anlamak amacıyla uygulanmıştır. Daha yakın zamanlarda, polimerizasyon öncesi monomer-hedef molekül dengesinin olasılık bazlı stokastik simülasyonları (Wu vd., 2008) bu alana katkıda bulunmuştur. Daha da önemlisi, simüle edilen afinite dağılımları, MIP'lerde deneysel olarak ölçülen sonuçlarla eşleşiyordu. Ek olarak, polimerizasyon öncesi hedef molekül-monomer kompleksini ve sonrasında hedef molekülün yeniden bağlanmasını açıklayan matematiksel modeller de geliştirilmiştir (Curk vd, 2015).

MIP teknolojisinde hesaplamalı stratejilerin kullanımının son zamanlarda artmasının ardındaki ana neden, hesaplama gücünün artan uygun fiyatlılığı ve uygun yazılıma erişim ile ilgilidir (Schadt vd., 2010; Tomov vd., 2005). Bu, çok değişkenli analizlerin, elektronik yapı hesaplamalarının ve tam sistem tüm atom moleküler dinamik (MD) simülasyonlarının MIP tasarımı, sentezi ve değerlendirmesinin tüm yönlerine uygulanmasına olanak sağlamıştır.

MIP'lerin tasarımı ve değerlendirilmesi için elektronik yapı hesaplamalarına dayalı yarı deneysel ve yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) stratejilerinin de kullanımı artmaktadır. Toplu olarak kuantum kimyası olarak adlandırılan bu hesaplama yöntemleri sınıfı, incelenen sistemin atomik koordinatlarına ve elektron sayısına dayalı olarak elektronik Schrödinger denklemini çözmeyi amaçlamaktadır. Birkaç elektrondan daha fazlasına sahip sistemler için bu imkansızdır ve bu nedenle yaklaşık değerler gereklidir (Nicholls vd., 2021).

1.4.4.2. Dummy (Sahte) Baskılı Polimerler (DIP)

DIP'lerin hazırlanma prensibi MIP'lere benzer ve hedef molekülleri analiz etmek için sahte üç boyutlu yapılar oluştururlar. Böylelikle hedef molekülün farklı bir şekilde analiz edilmesini sağlar. DIP'ler, ilk olarak, uygun bir çözücü içerisinde, sahte moleküller ile fonksiyonel monomer arasında, sahte fonksiyonel grupların kovalent veya kovalent olmayan etkileşimleri sonucu bir ön polimer oluşur. İkinci aşamada, elektropolimerizasyon veya

fotopolimerizasyon yoluyla yüksek düzeyde çapraz bağlı üç boyutlu ağ yapısı oluşturmak için çapraz bağlama maddeleri ve başlatıcılar eklenir. Son olarak, sahte moleküllerin uzaklaştırılmasından sonra polimerde hedef bileşikler seçici olarak tanımlayabilen, hedef bileşiklere benzer gözenekler oluşturulur (R. N. Chen vd., 2021; Koster vd., 2001).

DIP'ler özellikle amino, hidroksil ve karboksil gibi fonksiyonel gruplara sahip, benzer moleküler yapı içeren bileşikler doğrudan analiz edebilir. MIP'ler ile karşılaştırıldığında DIP'lerin birçok avantajları vardır: (1) Hedef moleküller olarak uygun olmayan bazı bileşikler, benzer yapıya sahip sahte moleküller seçilerek baskılanabilir ve bu da MIP'in uygulama aralığını genişletir. (2) Karmaşık numunelerin analizinde, özellikle iz analizinde, artık hedef molekülün sızıntısı, analiz sonuçlarının doğruluğunu doğrudan etkileyecektir. DIP'ler kullanılarak bu durumun önüne geçilebilir. Bu aynı zamanda sahte moleküllerin diğer hedef moleküllere göre en büyük avantajlarından birisidir. (3) Ayrıca, bazı pahalı veya çevreyi kirleten hedef moleküller için veya fonksiyonel monomerlerle bağlanması zor olan hedef moleküller için sahte bir molekülün kullanılması deneyin maliyetini ve zorluğunu azaltabilir ve deneyin güvenilirliğini artırabilir (R. N. Chen vd., 2021; Yılmaz vd., 2000).

DIP'ler üzerine yapılan araştırmalar hâlâ sınırlıdır ve DIP'de geliştirilmesi gereken pek çok eksiklik vardır: (1) En önemlisi sahte molekülün hedef analitin yapısal analogu olması ve uzaysal yapının hedef analitle tamamen tutarlı olmamasıdır. Bu nedenle, DIP'lerin hedef analit için seçiciliği daha düşüktür. (2) Sahte moleküllerin seçimi için standart bir temel yoktur ve farklı baskılama ve tespit yöntemleri, aynı hedef analitlerde farklı etkilere sahip olabilmektedir. (3) MIP'e benzer şekilde, mevcut kullanımdaki fonksiyonel monomerler, çapraz bağlama maddeleri ve polimerizasyon yöntemlerinin önemli sınırlamaları vardır. Özellikle fonksiyonel monomer türleri bazı moleküler tanıma gerekliliklerini karşılayamayacak kadar azdır ve bu da DIP'lerin pratik uygulama gerekliliklerini karşılayamamasına neden olmaktadır (R. N. Chen vd., 2021; Kubiak vd., 2020).

1.5. Elektrokimya

Elektrokimya, elektriksel potansiyel farkı ile tanımlanabilir kimyasal değişim arasındaki ilişkiyle ilgilenen, maddenin elektrik enerjisiyle etkileşmesi sonrasında meydana gelen fiziksel değişiklikleri, kimyasal dönüşümleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen fiziksel kimyanın dalıdır. Bu reaksiyonlar, iyonik olarak iletken ve

elektronik olarak yalıtkan bir elektrolit (veya bir çözelti içindeki iyonik türler) ile ayrılan elektrotlar arasında elektronik olarak iletken bir faz aracılığıyla hareket eden elektronları içerir. Diğer bir ifadeyle elektrokimya, elektronların bir maddeden diğer bir maddeye elektron transferini inceler ve bu elektronların hareketi, analitin belirlenmesinde kullanılabilen bir akım üretir (Skoog vd., 1998). Ayrıca, elektrokimyasal reaksiyonlar (oksidasyon-redüksiyon gibi redoks reaksiyonları) elektrokimyasal bir hücre de meydana gelir. Uygun bir elektrolit çözeltisine batırılmış iki metal iletken (elektrot), bir elektrokimyasal hücreyi oluşturur (Skoog vd., 1998; Ozkan vd., 2015).

1.5.1. Elektrokimyada Kullanılan Elektrotlar

Elektrokimyasal hücrelerde, potansiyeli sabit olan bir referans elektrot ve bir çalışma elektrotu bulunan iki elektrotlu sistemler ile iki elektrotlu hücrelerdeki elektrotlara ek olarak bir de yardımcı (karşıt) elektrot içeren üç elektrotlu sistemler elektrokimyasal analizlerde kullanılan sistemlerdir. Genellikle üç elektrotlu sistemler daha çok kullanılmaktadır (S. Chen, 2007). Gerçekleştirilecek elektrokimyasal analizin ve analitin özellikleri, en iyi elektrokimyasal hücre sisteminin ve elektrotların belirlenmesinde kullanılabilir (Wang, 2006).

1.5.1.1. Voltametri Yönteminde Kullanılan Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrotları tipik olarak iyi bilinen yüzey alanına ve morfolojiye sahip, kimyasal olarak stabil malzemelerden yapılır. Yaygın örnekler arasında genellikle cilalı bir disk veya mikroeletrot olarak platin veya camı karbon bulunur. Analitle ilgili reaksiyonun gerçekleştiği ve potansiyeli referans elektrota bağlı olarak değişen elektrot, bir elektrokimyasal hücrede çalışma elektrotu olarak bilinir. Potansiyostat bu potansiyeli kontrol eden cihazdır. Çalışma elektrodu yüzeyinde, elektrokimyasal hücre çözeltisindeki analitin elektron değişim süreçleri gerçekleşir ve analit derişimindeki değişiklikler, akımın bu potansiyele uygun olarak farklılaşmasına neden olacaktır (S. Chen, 2007).

Çalışma elektrotları karbon temelli, metal temelli ve cıva temelli olmak üzere sınıflandırılabilir. Karbon temelli katı elektrotlar, camı karbon elektrot (CKE), karbon pasta elektrot (KPE) ve perde baskılı karbon elektrot (SPCE); metal temelli elektrotlar (ME), platin, altın, gümüş ve perde baskılı altın elektrotlar (SPAuE); asılı cıva elektrot (ACE) ve damlayan

cıva elektrot (DCE) gibi cıva temelli elektrotlar da çok sıklıkla çalışma elektrotu olarak kullanılmaktadır (Ozkan vd., 2003; Ozkan vd., 2015).

1.5.1.2. Voltametrیده Kullanılan Referans Elektrotları

Bilinen ve sabir bir potansiyele sahip referans elektrotlar, polarize olmayan davranış sergileyen elektrotlardır. Çalışma elektrodunun potansiyelini karşılaştırmanın bir yolu referans elektrodun potansiyeli ile karşılaştırılmasıdır. Çünkü referans elektrodun potansiyeli analit çözeltisinin derişiminden etkilenmez ve sabit kalır. Tercih edilen referans elektrotlar arasında bu özellikleri sağlayan ve redoks çiftleri olan Ag/AgCl elektrot ve doymuş kalomel elektrotlardır (Hg/Hg₂Cl₂). Doymuş bir kalomel elektrot, KCl içeren ve doymuş bir Hg/Hg₂Cl₂ çözeltisi ile temas halinde cıvadan oluşan bir sistemdir. Ag/AgCl elektrot ise Ag elektrotun AgCl ile doyurulmuş KCl çözeltisine daldırıldığı bir sistemdir (Wang, 2006; Skoog vd., 2014; Ozkan vd., 2015).

1.5.1.3. Voltametrیده Kullanılan Yardımcı (Karşı) Elektrot

Çalışma elektrodunun redoks reaksiyonunu engellemeden çalışma elektrodu için gerekli akımı sağlayan elektrota yardımcı (karşı) elektrot denir. Elektrokimyasal hücre sistemi için yardımcı elektrotların seçiminde titanyum ve platin gibi kimyasal olarak inert metallerin kullanılması tercih edilir (Pletcher vd., 2001; Scholz, 2010).

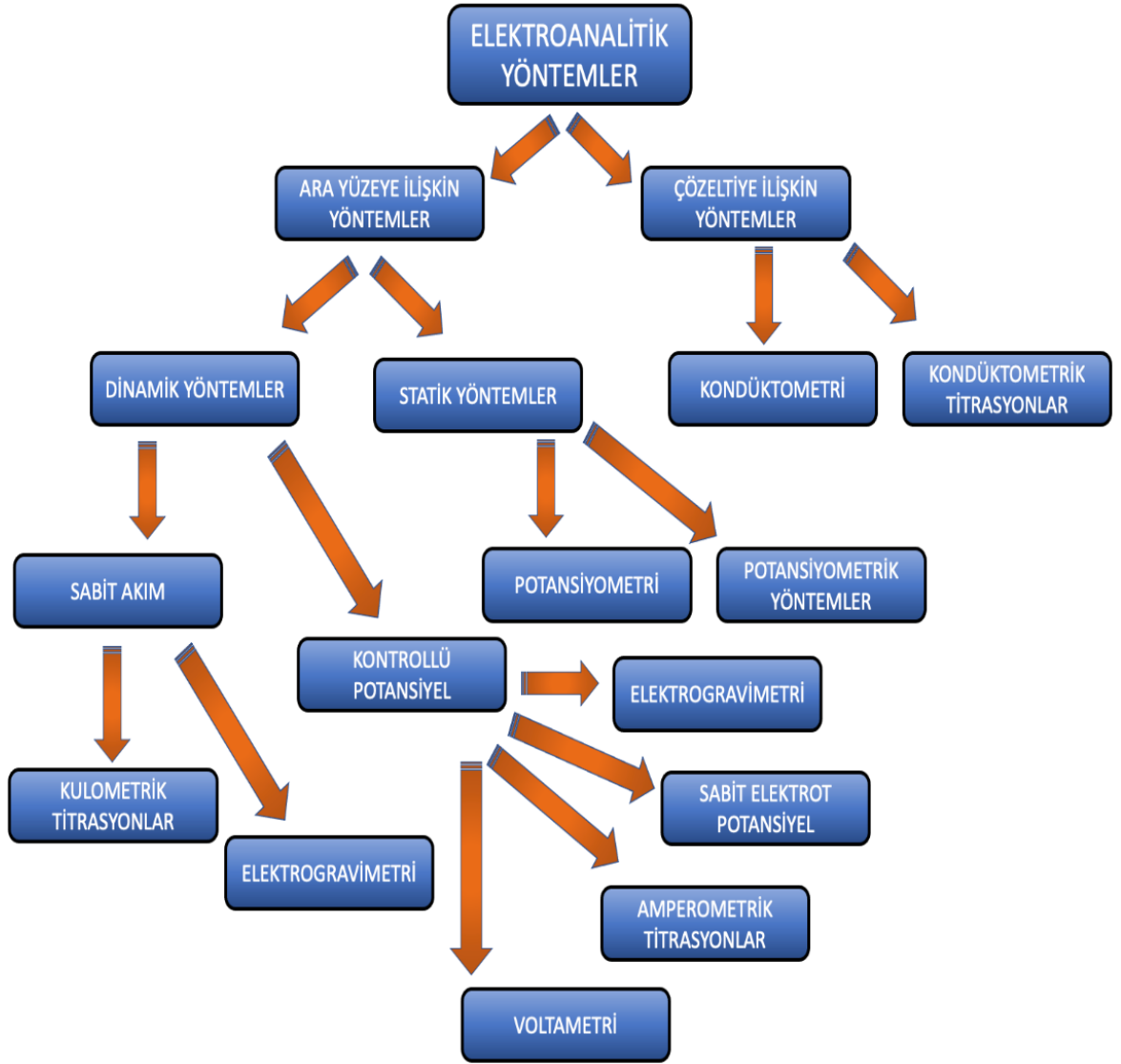
1.6. Elektroanalitik Yöntemler

Elektrokimyasal teknikler, çözelti-elektrot sistemine bir elektriksel bir kuvvet uygulayarak yük, akım ve potansiyel dahil olmak üzere elektriksel özellikleri ölçer. Başka bir deyişle, numunede bulunan analitin derişimini ölçmek için uygun bir elektriksel özelliğin kullanılmasını içerir (Skoog vd., 1998).

Elektrokimyasal yöntemler, ölçümlerin son derece düşük tespit limitlerinde yapılmasına olanak tanır. Bu yöntemler, adsorpsiyon derecesi, denge ve kimyasal reaksiyonların hız sabitleri, kütle aktarım hızı ve arayüzdeki yük aktarım hızı dahil sistemler hakkında detaylı bilgiler sunar (Skoog vd., 1998).

Analiz edilecek maddenin çözeltisinin elektriksel özelliklerine bağlı olarak, elektrokimyasal teknikler hem kalitatif hem de kantitatif analitik teknikleri kapsamaktadır. Yükü, potansiyeli ve akımı dahil olmak üzere analitin özellikleri ve bunların kimyasal parametrelerle ilişkisi değerlendirilir. Kapsamlı bir karakterizasyon olanağı sunması, düşük teşhis limitine ulaşması ve ucuz olması gibi faydaları sayesinde elektrokimyasal tekniklerin çevresel analizler, biyomedikal analizler ve endüstriyel uygulamalar dahil olmak üzere geniş bir kullanım alanı vardır (Wang, 2006; Skoog vd., 2018).

Elektroanalitik yöntemleri genel olarak hem arayüze ilişkin hem de çözeltiye ilişkin yaklaşımlar olarak kategorize edilebilirler. Bu yöntemler net akımın dengeden uzak olduğu ($i \neq 0$) dinamik yöntemler ve net akımın sıfır olduğu ($i = 0$) ve yöntemin dengede olduğu statik yöntemler olarak da sınıflandırılabilirler. Şekil X'de elektrokimyasal tekniklerin daha ayrıntılı bir sınıflandırması verilmiştir (Kissinger ve Heineman, 1996).



Şekil 1. 2. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması

1.6.1. Polorografi

Polorografi, çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodunu (DCE) kullanan voltametrik tekniğin en eski ve daha temel türüdür. Diğer voltametrik teknikler gibi akım da polorografide uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülür. Polorografi, ilk olarak Heyrovsky tarafından önerilmiş ve geniş katodik potansiyel aralığı, değiştirilebilir DCE yüzeyi ve tekrarlanabilirliği nedeniyle 1950 ile 1970 yılları arasında popüler olarak kullanılmıştır. Ancak köklü bir teknik olmasına rağmen cıva kullanımının toksisite ve kolay oksidasyon gibi dezavantajları nedeniyle pratikliği yoktur. Bu nedenle polorografinin modern

versiyonunda mekanik olarak cıva damlamasını sağlamak için geliştirilmiş cihazlar kullanılmaktadır (Bond, 1980).

1.6.2. Voltametri

Çek bilim adamı Jaroslav Heyrovsky, 1920'lerde "voltametri" tekniğini keşfeden ilk kişi oldu. Voltametri terimi "voltamperometri"den alınmıştır. Günümüzde "damla cıva elektrotlu voltammetri" için yaygın olarak kullanılan bu teknik için ilk başta "polarografi" kelimesi önerildi. Bu tekniğin bir tür "elektrokimya" olduğu düşünülmektedir. Bu tekniklerin sayısı diğer tüm elektroanalitik tekniklerden daha fazla olduğu için genellikle elektroanaliz terimiyle tanımlanır. Teknik temel olarak, sistematik bir şekilde değişen potansiyel (v) ile incelenecek elektroaktif bir maddenin çözeltiye batırılmış çalışma elektrotları aracılığıyla akım (I) akışının ölçülmesini içerir. Günümüzde bu teknik, biyolojik ve çevre açıdan önemli türlerin analizine yönelik basit, ucuz ve hızlı teknik olması nedeniyle önem kazanmaktadır. Analit, voltametrik tepe potansiyeli sayesinde hızlı bir şekilde analiz edilebildiğinden üstün seçicilik ve hassasiyet sunar (Bond, 1980; Skoog vd., 1998; Bagotsky, 2006).

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

Voltammetriyi, yani uygulanan potansiyelin (E) etkilerini ve redoks akımının davranışını tanımlayan birkaç iyi bilinen yasa vardır. Nerst veya Butler-Volmer denklemlerine göre elektrot yüzeyinde (C_O^0 : oksidasyon türlerin derişimi; ve C_R^0 : redoks türlerin derişimi) redoks türlerinin derişimleri sırasıyla uygulanan potansiyel ve reaksiyon hızı (k_o) tarafından kontrol edilir. Ayrıca, Fick yasasının difüzyonda önemli bir rol oynadığı çözelti-elektrot arayüzünde redoks akımı (Faradaik akım) ile madde akışı arasındaki ilişki açıklanmaktadır. İnorganik, fiziksel ve biyokimyacılar, farklı ortamlardaki oksidasyon ve indirgeme süreçlerini, yüzeylerdeki adsorpsiyon süreçlerini ve kimyasal olarak değiştirilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron transfer mekanizmalarını incelerken sıklıkla voltametriyi tercih etmektedirler (Bond, 1980; Skoog vd., 1998; Bagotsky, 2006).

1.6.2.1. Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DTV)

Dönüşümlü voltametri (DV), kantitatif analiz/belirleme amacıyla kullanılabilecek bir teknik olmasına rağmen en önemli kullanımı, oksidoredüksiyon reaksiyonlarının mekanizması ve elektrot süreçleri hakkında niteliksel bilgi elde etmektir. Hızlı ve önemli bilgi sağlaması nedeniyle elektrokimyasal analizin ilk adımı olarak uygulanan önemli ve tercih edilen bir tekniktir. DV, başlangıç ve son elektrot potansiyeli arasında periyodik potansiyel döngülerinin uygulanmasına dayanmaktadır. İleri ve geri taramalardan oluşan tek bir taramada geniş bir potansiyel aralığının değerlendirilmesi mümkündür. Ancak tarama hızının değiştirilmesi redoks reaksiyon kinetiğini değiştirir (Ozkan vd., 2015; Pletcher vd., 2001; Skoog vd., 2018).

Tarama hızının (v) hedef analitin voltametrik tepkisi üzerindeki etkisinin araştırılmasında DV tekniği kritik bir yere sahiptir. Bu amaçla seçilen analitin derişiminin elektrokimyasal davranışı DV yöntemi kullanılarak optimum pH ortamında 0.005 ile 1.000 $V.s^{-1}$ arasındaki v aralığında değerlendirilir. Bu adımda, farklı değişkenler arasındaki ilişkiler (tepe akımı (I_p) ile v 'nin karekökü ($v^{1/2}$) ve $\log I_p$ ile $\log v$) değerlendirilir ve elde edilen denklemler yorumlanır. $\log I_p$ 'ye karşı $\log v$ 'nin eğim değeri, oksidasyon sürecinin difüzyon veya adsorpsiyon kontrollü olup olmadığı hakkında bilgi verir. Eğim değeri teorik değer olan 0.5'e yakınsa süreç difüzyon kontrollüdür. Eğim değeri teorik değer olan 1.0'a yakınsa proses adsorpsiyon kontrollüdür. Eğim değeri 0.5 ile 1.0 arasında bir ara değer ise prosesin difüzyon kontrollü adsorpsiyon olması önerilmektedir (Ozkan vd., 2015; Pletcher vd., 2001).

Doğrusal tarama voltametrisi (DTV) prensipte DV ile aynı olmasına rağmen, DV'deki çoklu potansiyel taramalardan farklı olarak, DTV yalnızca bir potansiyel taramaya sahiptir ve genellikle niceliksel amaçlar için tercih edilir (Ozkan vd., 2015; Pletcher vd., 2001).

1.6.3. Puls Voltametrisi (PV)

Voltametrik teknikler gelişip farklılaştıkça ölçüm hassasiyetini artırma eğiliminde oldular. Bu amaçla potansiyelin bir adım (puls) olarak uygulanmasıyla, faradaik olmayan akımın ölçülen akım üzerindeki etkisi ihmal edilebilir bir düzeye indirilir ve neredeyse tamamen faradaik akımın ölçülmesi mümkün olur. Bu tekniklerde puls genliği, puls genişliği, örnekleme periyodu ve puls periyodu gibi parametrelerin optimize edilmesi önemlidir. Puls

yöntemleri uygulanan potansiyelin modülasyonuna göre farklılık gösterir (Ozkan vd., 2015; Pletcher vd., 2001).

1.6.3.1. Normal Puls Voltametri (NPV) ve Ters Puls Voltametrisi (TPV)

Normal puls voltammetrisi (NPV), artırılmış amplitüdlü puls serilerinin uygulanmasına ve her puls arasında 0.1-5 saniye süreyle temel potansiyelin uygulanmasına dayanır. Bu, elektrotun başlangıç koşullarına geri dönmesini sağlar. Bu nedenle yüzey kirlenmesi sorunlarının önlenmesi amaçlanmaktadır. Ters darbe voltammetrisinin (TPV) puls serisi, NPV'nin ayna görüntüsüdür ve elektrot reaksiyon ürünlerini doğrudan değerlendirmek için kullanılır (Ozkan vd., 2015; Pletcher vd., 2001).

1.6.3.2. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Diferansiyel puls voltammetrisi (DPV), çok yüksek oranda faradaik akım sağlama yeteneği sayesinde en hassas voltametrik yöntemlerden biridir. Bu yöntemde fark, pulsun iki farklı noktasındaki (pulsu uygulamadan önce ve pulsun sonuna yakın) akım ölçülerek hesaplanır. Böylece şarj akımının etkisinin mümkün olduğu kadar azaltılması amaçlanmaktadır. Bu avantajları sayesinde DPV günümüzde elektrokimyasal sensör uygulamalarında en çok tercih edilen yöntemdir (Ozkan vd., 2015; Pletcher vd., 2001).

1.6.3.3. Kare Dalga Voltametrisi (KDV)

Kare dalga voltametrisi (KDV), yüksek frekans sayesinde çok hızlı analiz sağlaması gibi önemli bir avantajla öne çıkmaktadır. Ayrıca akım ölçümü DPV'ye benzer. Bir merdiven rampasına kare dalga tipi bir potansiyelin uygulanmasıyla elde edilir. KDV'de en çok kullanılan yöntemdir ve sıyırma yöntemleriyle birleştirilebilir (Ozkan vd., 2015; Pletcher vd., 2001).

1.6.4. Sıyırma Voltametri (SV)

Sıyırma yöntemleri, etkili ön derişim işlemi ve elektrokimyasal sıyırma adı verilen bir ölçüm adımıyla entegrasyonu sayesinde dikkate değer bir hassasiyet sağlar. Ön derişim işlemi, analitin elektrot yüzeyinde birikmesini veya birikmesini ve ölçümden önce bir dengeleme

periyodunu mümkün kılar. Analitin akışı ve birikmesi, elektrotun karıştırılması veya döndürülmesiyle artırılabilir. Çok düşük teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) değerlerine ulaşabilme yeteneği, sıyırma voltametrik yöntemlerini diğerlerine göre daha avantajlı hale getirmektedir. Sıyırma teknikleri DPV ve KDV gibi yöntemlerle birleştirilerek tercih edilmektedir. Ancak bu çalışmalarda bazı parametrelerin yanı sıra bazı parametrelerin de optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla ön optimizasyon adımı birikim potansiyeli ve birikim süresi optimize edilir. Bu aşamalarda bir parametre sabit tutularak diğerinin optimum değeri bulunarak pik yüksekliğindeki artış değerlendirilir (Ozkan vd., 2015; Pletcher vd., 2001).

1.6.4.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi (ASV)

Bu yöntem genel olarak metal iyonların tayini için sıklıkla kullanılır. Tayin sürecinde analit, elektrot yüzeyinde biriktirme aşamasında indirgendikten sonra bir kez daha oksitlenir. ASV tekniği özellikle mükemmel doğruluğu, eşzamanlı çoklu analiz yeteneği ve düşük teşhis limiti nedeniyle eser metal analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ozkan vd., 2015).

1.6.4.2. Katodik Sıyırma Voltametrisi (KSV)

Bu yöntemle ASV arasındaki tek fark, ön derişim sırasında analitin oksidasyonudur. ASV'nin aksine biriktirme adımı analit yükseltgenirken elektrot yüzeyinde tayin edilme aşamasında indirgenir. Organik ve inorganik iyonlardan oluşan farmasötik bileşikler, KSV kullanılarak tayin edilir. Bu teknik girişim ve seçicilik sorunları nedeniyle çok tercih edilmemektedir (Ozkan vd., 2015).

1.6.4.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi (AdSV)

Bu yöntemde analitin elektrot yüzeyine adsorpsiyonu ile ön derişim elde edilir ve AdSV çoğunlukla adsorbe edilebilir organik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılır. Çok düşük derişimdeki kimyasalları doğru bir şekilde analiz edebilme yeteneği nedeniyle son zamanlarda uygulama olarak sıklıkla kullanılmıştır. Analitin elektrot yüzeyine adsorpsiyonu, sıyırma işleminin ilk adımıdır. Ölçümlerdeki mükemmel hassasiyetinden dolayı ilaç analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ozkan vd., 2015).

1.6.5. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal impedans tekniği biyolojik sistemlerdeki ölçümler için basit, ucuz, hızlı ve invaziv olmayan bir tekniktir. “İmpedans”, elektrotlar arasına uygulanan alternatif akımın varlığında bir elektrik devresinin direncinin özelliklerini inceleyen fiziksel bir değişkeni ifade eder. Bu sistemde akım akış tepkisi, küçük bir sinüzoidal potansiyel uygulanarak ve geniş bir frekans aralığında uygulanan potansiyelden frekanstaki (f) değişiklikler tespit edilerek ölçülür. Uyarma frekansının değiştirilmesiyle elde edilen matematiksel ilişkiler incelendiğinde, impedans tepkisi, hem gerçek hem de sanal bileşenlerden oluşan, frekansın bir fonksiyonu olarak karmaşık bir sayı olarak karşımıza çıkmaktadır. EIS, içsel malzeme özelliklerini değerlendirme ve elektrokimyasal sistemin iletkenlik/direnç veya kapasitifliğinde yer alan belirli süreçleri araştırma kapasitesine sahiptir. Bu sistemler, malzemelerin ve biyosensör transdüksiyonlarının karakterizasyonu ve analizi için çok yararlı araçlar olarak hizmet vermektedir (Wang, 2006).

Elektrolit bazlı sistemlerin EIS analizinde ohmik direnç, kapasitans, sabit faz elemanı ve Warburg impedansı (W) olmak üzere dört unsur kullanılır. Her bir sistemin impedans davranışını araştırmak için uygun bir eşdeğer devrenin seçilmesi gerekir. Eşdeğer devreler, paralel ve/veya seri impedans bileşenlerinin iyi tanımlarını sağladıkları için deneysel impedans verilerine yaklaşmak için yararlı araçlardır. Randles devresi en yaygın olarak elektrolit ortamına daldırılmış elektrotlar için kullanılır; çözelti direncini (R_s), yük (elektron) transfer direncini (R_{ct}), çift katmanın kapasitansını (C_{dl}) ve Warburg impedansı (W) olarak gösterilen kütle transfer elemanını içerir (Bard & Faulkner, 2001).

1.7. Elektroanalitik Sensörlerin Validasyonu

Geliştirilen analitik yöntemlerin/sensörlerin etkinliğinin ve güvenilirliğinin değerlendirilmesi, uluslararası kuruluşlar tarafından belirlenen belirli standartları karşılayıp karşılamadığına göre yapılabilmektedir. Elde edilen sonuçların doğruluk, güvenilirlik ve tutarlılığın sağlanması için belirli parametreleri karşılaması önemlidir. Bu amaçla gerçekleştirilen işlemlere validasyon, değerlendirilen kriterlere ise validasyon parametreleri adı verilmektedir. Bunların ayrıntılarını (tanım, içerik, kriterler, nasıl uygulanacağı vb.) en kapsamlı şekilde açıklayan kabul edilen kılavuz, Uluslararası Uyum Konferansı (ICH)

tarafından yayınlanmaktadır (Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995). Bu parametreler aşağıda açıklanmıştır:

1.7.1. Seçicilik ve Özgünlük

Doğrulama sürecinin ilk adımı, bir yöntemin safsızlıklar, bozunma ürünleri, benzer yapıya sahip bileşikler vb. varlığından etkilenmeden hedef molekülü tespit etme kapasitesi olarak tanımlanan seçiciliktir. Seçiciliği değerlendirmek için, hedef molekül, girişim etkisi yaratabilecek moleküllerin varlığında ve yokluğunda belirlenir. Özgünlük ve seçicilik, algılama ve seçici belirleme olaylarıyla ilgilidir ve her ikisi de elektroanalitik yöntemin güvenilirliği hakkında fikir verir. Seçicilik ve özgüllük terimleri sıklıkla birbirinin yerine kullanılır (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

Genel olarak spesifiklik, ilaç aktif bileşiklerinin belirlenmesine yönelik elektroanalitik yöntemlerin oluşturulmasında ele alınan ilk doğrulama parametresidir. “Numune matrisinde beklenebilecek bileşenin varlığında analiti doğru ve spesifik olarak ölçebilme yeteneği olan bir elektroanalitik yöntem” olarak tanımlanabilir. Özgüllük, yalnızca tek bir parametrenin ölçülebildiği elektroanalitik tekniklere uygun şekilde uygulanır. Önerilen elektroanalitik yöntemlerin spesifikliğini kanıtlamak için analit, destekleyici elektrolit, analitli ve/veya analitsiz matris, başlangıç malzemesinin safsızlıkları, bozunma ürünleri veya metabolitlerin tümü analiz edilmelidir. Elektroanalitik yöntemlerin bir avantajı olarak genellikle farmasötik dozaj formlarının inaktif bileşenlerinden etkilenmezler (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

Seçicilik ise genellikle elektroanalitik yöntemler gibi tüm analitik tekniklere uygulanabilir. Dozaj formlarında veya biyolojik numunelerde bulunan müdahalelerden arınmış karışımlar veya matrislerdeki belirli analitleri belirlemek için bir yöntemin ne ölçüde kullanılabileceğini ifade eder. Aynı zamanda bir yöntemin belirli bir analiti diğer maddelerden ayırt etme yeteneğidir. Bir elektroanalitik yöntemin seçiciliği, tipik olarak, analitlerin ayrılmasının girişimlerden arınmış olduğunun gösterilmesiyle doğrulanır. Girişimlerin kaynağı safsızlıklar, bozunma bileşikleri, yardımcı maddeler, endojen maddeler ve numune matrisi olabilir. Genel bir kural olarak seçicilik, herhangi bir girişimin göz ardı edilebilmesi

için yeterince iyi olmalıdır. Yanıtın diğer tüm yanıtlardan ayırt edilmesi durumunda yöntemle seçici denir. Analitin mevcudiyetine, uygun referans örneklerine, analit içermeyen matrise ve ilgilenilen derişime bağılı olarak seçiciliğı incelemek için çeşitli test prosedürleri ve istatistiksel hesaplama yöntemleri kullanılabilir (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

Matris bileşimi bilinmiyorsa sistematik matris etkileri test edilebilir. Bunun için standart toplama eğrilerinin eğimleri karşılaştırılabilir. Referans örnekleri veya analit içermeyen bir örnek matrisi mevcutsa, seçiciliğın elde edilmesi için student-t ve F testleri kullanılabilir. Student-t ve F testlerinin hesaplanması için, biri matrisli ve diğeri matrissiz olmak üzere iki set test numunesi hazırlanır. İlgili denklemler kullanılarak student-t ve F değerleri hesaplandıktan sonra hesaplanan değerler, teorik student-t ve F tablolarından bulunan uygun teorik student-t ve F değerleriyle karşılaştırılmalıdır. Hesaplanan student-t ve F değerleri teorik student-t ve F değerlerinden daha küçükse (belirtilen serbestlik derecesi ile), matrisin analizi etkilemediğı varsayımı yapılır. Hesaplanan F ve t değerlerinin beklenen değeri aşması durumunda matrisin sonuçlar üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğı söylenir (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

Analit içermeyen matris veya yardımcı maddeler mevcut olmadığında seçicilik, standart ekleme eğrilerindeki eğimler karşılaştırılarak test edilebilir. Bunun için her derişim seviyesinde aynı analit ilavesini içeren iki numune seti hazırlanır. Bir set örnek matrisini ve temel analitin seviyesini içermeyen, diğeri set ise temel analitin bulunduğı örnek matrisini içerir. Standart eklemeden sonra, bu iki set örneğinin sonuçları, aynı grafikte analit ekleme derişiminin bir fonksiyonu olarak çizilmelidir. Bu eğrilerin eğimleri karşılaştırılır ve bu iki doğrusal regresyon eğrisinin eğimleri aynı ise matrisin analiz sonucunu etkilemez. Ayrıca, elektroanalitik yöntemlerin dozaj formlarında veya biyolojik örneklerde farmasötik analizlerde uygulanmasının çoğı, oksidasyon veya indirgeme potansiyellerine bağılı olarak olası etkileşimlerden etkilenmemektedir (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

1.7.2. Kesinlik

Hassasiyet, prosedür homojen bir numunenin birden fazla numunesine tekrar tekrar uygulandığında, bireysel test sonuçları arasındaki uyum derecesi olarak tanımlanır. Yalnızca rastgele hataların dağılımına bağlıdır ve gerçek değerle ilişkili değildir. Kesinlik genellikle tekrarlanan analizin standart veya bağıl standart sapmaları olarak ifade edilir. Sayısal olarak kesinlik için büyük bir sayı, sonuçların dağınık olduğunu ve kesinliğin zayıf olduğunu gösterir. İyi hassasiyet, kritik olarak benzer koşulların sağlanmasına bağlıdır. Kesinlik üç düzeyde ele alınabilir ve tekrarlanabilirlik, orta kesinlik ve tekrar edilebilirlik olarak (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

Tekrarlanabilirlik: Tekrarlanabilirlik kesinliğin en düşük derecesini temsil eder. Aynı analist, aynı ekipman, aynı laboratuvar ve aynı zaman aralığı gibi aynı koşullar altında, çalışma bileşiği üzerinde aynı yöntemin kullanılmasıyla elde edilen bu değer, diğer belirtilerin yokluğunda belirli bir olasılıkla yapılabilirliğini ifade eder. Bu nedenle elektroanalitik prosedürün tamamının aynı numune çözeltisinde en az altı kez uygulanması esastır ve %BSS değerinin raporlanması önemlidir. Tekrarlanabilirlik çok sayıda veriyle (en az 6 kez) yapılmalıdır. Bir elektroanalitik analiz yöntemi için tekrarlanabilirlik kriteri ≤ 1.0 olmalıdır. Ancak bir safsızlık veya eser miktar analizi için ya da biyolojik matriks içerisindeki analizlerde bu kesinlik kriteri ≤ 5.0 olarak kabul edilmektedir.

Orta kesinlik: Farklı stok çözelti, farklı günler, farklı analistler, farklı ekipmanlar vb. gibi laboratuvar içi varyasyonları sonucu ortaya çıkan kesinlik derecesidir. Bunu tahmin etmek için, belirli bir laboratuvar da birkaç haftalık bir süre boyunca elde edilen bir dizi ölçümün %BSS'si kullanılır. Orta kesinlik, çeşitli koşullar altında toplam kesinliktir ve günler arası, çalışmalar arası veya analizler arası kesinlik olarak da adlandırılabilir. Bir analiz yöntemi için kesinlik kriteri olarak orta kesinliğin %BSS değerinin ≤ 2.0 olması gerekir. Ancak bir safsızlık veya eser miktar analizi için %BSS değeri ≤ 5.0 'e kadar kabul edilirken, biyolojik matriks içerisindeki analizlerde %BSS değerinin ≤ 10 'a kadar çıktığı gözlenmiştir.

Tekrar elde edilebilirlik: Tekrar elde edilebilirlik, farklı analistler, farklı ekipmanlar, farklı laboratuvarlar vb. gibi farklı koşullar altında araştırılan test bileşiği üzerinde aynı yöntemle elde edilen iki tek test sonucu arasındaki mutlak farkın altındaki değerdir.

Yöntem farklı laboratuvarlarda kullanılacaksa tekrarlanabilirlik parametresi önemlidir. Yöntem farklı laboratuvarlarda kullanılacaksa tekrarlanabilirlik parametresi önemlidir. Tekrarlanabilirlik, “sağlamlık” olarak adlandırılan diğer analitik doğrulama prosedürüyle bazı benzerliklere sahiptir. Farklı laboratuvarlar arasındaki muhtemelen ekipman ve farklı analistler vb. farklılıklar nedeniyle analiz sonucunda elde edilen tekrar elde edilebilirliğin ek katkıları içermesi beklenebilir. Bazen orta kesinlik yerine tekrar elde edilebilirlik kullanılabilir. Ayrıca, Bir analiz yönteminin kesinlik kriteri, tekrar elde edilebilirliğin %BSS değeri ≤ 2.0 olmalıdır. Bir safsızlık veya eser miktar tanalizi için bu kesinlik parametresinin %BSS değerinin ≤ 10 'a kadar çıktığı gözlenmiştir.

1.7.3. Doğrusallık

Doğrusallık, kantitatif belirleme çalışmaları için gerekli ve oldukça önemli bir parametredir. Diğer analitik yöntemler gibi elektroanalitik teknikler için yapılan bir doğrusallık çalışması, bir numunedeki örnek çözeltilerin miktarının veya derişiminin bir fonksiyonu olarak elde edilen sinyalin doğru orantılı olarak artma kapasitesini gösteren önemli bir validasyon parametresidir. Bir elektroanalitik yöntemin doğrusallığı, derişimine karşı elektroanalitik tepkinin kalibrasyon grafiğinin ne kadar iyi bir düz çizgiye yaklaştığının bir ölçüsüdür. Standart çözeltilerdeki analit derişimlerinin seçimi, incelenen numunelerde beklenen analit içeriğini yansıtmalıdır; genellikle bilinen numune derişiminin %50-150'si aralığında doğrusallık gösterilmelidir. Minimum altı farklı derişim seviyesindeki standart çözeltilerin numuneleri ölçülür. Genellikle her derişim seviyesi için en az üç tekrar edilebilir ölçüm alınmalıdır. Ayrıca, elektroanalitik kimyada hassasiyetin belirlenmesinde doğrusallığın alt sınırının belirlenmesi gerekir. Analiz edilen numuneler, en az 5 farklı analiti uygun derişimlerde içeren ve uygun miktarlarda analit eklenmiş uygun destekleyici elektrolit çözeltiler ile seri olarak seyreltilmiş çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Elektroanalitik cevap ile analit derişimi arasındaki ilişkiyi tanımlamak için esas olarak doğrusal regresyon yöntemi kullanılır. Doğrusal regresyon yöntemi kullanılarak önerilen yöntem için doğrusallık, doğruluk (standart hata tahmini), teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) tanımlanabilir. Doğrusal eğrinin gün ölçümleri arasında tekrarlanabilir olması önemlidir. Farmasötik dozaj formlarından aktif olmayan bileşenler veya biyolojik sıvılardan endojen maddeler gibi genel matris etkilerine yönelik bir test, tipik bir test ortamından türetilen bir test çözeltilisine saf farmasötik bileşik ilavelerinin elektroanalitik yönteminin uygulanmasıyla yapılabilir. Bu yöntem kısaca standart ekleme tekniği adı verilmektedir. Standart ekleme tekniği, normal

elektroanalitik prosese benzer şekilde aynı son seyreltmeyi sağlayacak şekilde yapılmalı ve standart ekleme aralığı, prosedür tanımlı kalibrasyon doğrulamasıyla aynı aralığı kapsamalıdır. Elde edilen kalibrasyon eğrisi doğrusalsa, olağan kalibrasyon fonksiyonu ile analit ekleme grafiği arasındaki eğimler ve korelasyon katsayısı, farkın önemi açısından karşılaştırılabilir. Önem eksikliği, farmasötik dozaj formlarında veya biyolojik numunelerde tespit edilebilir genel matris etkilerinin olmadığı anlamına gelir. Kalibrasyon doğrusal değilse anlamlılık testleri için daha karmaşık bir tekniktir. Bununla birlikte, elektroanalitik yöntemler kullanıldığında, farmasötiklerdeki yardımcı maddelerin ve biyolojik ortamdaki endojen maddelerin çoğunun elektro-inaktif doğasından dolayı bu tür girişimler tespit edilememektedir (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

Genellikle veriler doğrusal en küçük kareler regresyon yöntemi kullanılarak hesaplanır. Regresyon çizgisinin kendisinden elde edilen veriler, doğrusallık derecesinin matematiksel tahminlerinin sağlanmasında yardımcı olabilir. Ortaya çıkan grafik eğimi (m), y-kesişim noktası (n), kalan kareler toplamı ve korelasyon katsayısı (r) veya belirleme katsayısı (r^2), doğrusallık hakkında istenen bilgiyi sağlar. Çoğu yöntem için 0.999'un üzerinde bir doğrusallık korelasyon katsayısı veya belirleme katsayısı kabul edilebilirdir. Eğim ve y-kesişim değerleri ölçüm tekniğine bağlıdır. Korelasyon katsayısı (r), elektroanalitik tepki ve elektroaktif bileşik derişimi gibi bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin boyutunu gösterir. Doğrusallığı kabul edilebilir "r" değerinden daha düşük olan elektroanalitik yöntemlerin doğrusal olmayan olarak ele alınması ve daha karmaşık çok noktalı kalibrasyonlar veya doğrusal olmayan regresyon tipi istatistiksel modelleme kullanılması gerekebilir. Yanıtın bir veya daha fazla büyüklük düzeyinde ölçülmesi gerekiyorsa, doğrusallığın belirlenmesi için en küçük kareler yönteminin ciddi eksiklikleri olabilir. Bu istatistiksel analizde eğim, kesişme ve korelasyon katsayısı, doğrusallığın düşük ve/veya yüksek derişim sınırından ciddi şekilde etkilenebilir. Doğrusallığın kontrol edilmesi ve ilgili doğrulama parametrelerinin elde edilmesi için %BSS veya eğim ve kesişme standart hatası hesaplanmalıdır. Doğrusallık, elektroanalitik sinyalin ölçülen değerin boyutuna orantılı bağımlılığını tanımlayan bir özelliktir ve belirli bir aralıkta analit derişim seviyesine bağlı çift denklemlerle ifade edilebilir. Regresyon iki değişken arasındaki ilişkinin türünü, korelasyon ise ilişkinin derecesini tanımlar (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

1.7.4. Aralık

Tüm kantitatif yöntemler için aralık belirtilmelidir. Genellikle aralık doğrusallığı içerir. Elektroanalitik yöntemlerin aralığı, ilaç aktif bileşiklerinin üst ve alt derişim değerleri arasındaki aralıktır. Analitik prosedürün uygun düzeyde kesinlik, doğruluk ve doğrusallığa sahip olduğu gösterilmiştir. Kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik, elektroanalitik yöntem için kriterlerin oluşturulmasında tanımlandığı gibidir. Ana bileşen tahlili için ham madde derişimleri hedef ölçüm seviyesine yakın ölçülmelidir. Aralık normalde yöntemle elde edilen test sonuçlarıyla aynı birimlerle ifade edilir. Ölçülecek çalışma numunelerinde derişim aralığı hedef miktarı kapsamalıdır. Saf veya saflığı bilinen farmasötik olarak aktif bileşiklerle çalışmak için ICH, belirtilen minimum aralığın test derişiminin %50 ila 150'si olmasını gerektirir. Ancak elektroanalitik çalışmalar daha geniş derişim aralıkları gerektirir. Bu aralığın validasyon sürecinde elde edilen doğrusallık çalışmalarından sonra elde edilmesi gerekmektedir (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology," 1995).

1.7.5. Duyarlılık

Doğrusallık bölümünde belirtildiği gibi hassasiyet, kalibrasyon çizgisinin eğimi olarak ifade edilebilir ve doğrusallık çalışmaları sırasında ölçülür. Hassasiyet, doğrusallıktan sapmaları tespit etmek için kullanılan önemli bir validasyon parametresidir. İki farklı derişimi ayırt etme yeteneğidir ve kalibrasyon eğrisinin eğimi ile belirlenir. Duyarlılık, çalışma analitin derişimi değıştikçe tepkinin ne kadar değıştiğini açıklayan bir parametredir (Burgess, 2001; Ozkan vd., 2015). Duyarlılık analite ve çalışan elektroanalitik tekniğe bağlıdır. Ayrıca sıfır kesişimli doğrusal yanıt fonksiyonu durumunda hassasiyet belirli bir dağılım aralığında sabittir. Bu aralık derişim aralığına, çalışma tekniğine ve uygulama ortamına bağlı olarak ayarlanmalıdır. Yanıt fonksiyonunun doğrusal olduğu analizler için hassasiyet derişime göre sabittir ve kalibrasyon eğrisinin eğimine eşittir. Duyarlılık ile TS arasındaki ilişki yalnızca doğrusal tepki fonksiyonuyla tespit için geçerlidir. Doğrusal olmayan tepki fonksiyonunda derişime bağlı olarak hassasiyetin değışmesi nedeniyle bu tür bir ilişki elde edilemez. Yukarıda açıklanan hassasiyetin önemine rağmen, belirlenmesi zorunlu olan doğrulama parametreleri seti içerisinde yer almamaktadır. Hassasiyet, kalibrasyon hattının parametrelerine dayalı olarak kolayca belirlenebilir (Burgess, 2001; Ozkan vd., 2015).

1.7.6. Teşhis Sınırı (TS)

TS, bir numunede araştırılan bileşiğin tespit edilebilecek en düşük miktarıdır ancak kabul edilebilir bir belirsizlikle ölçülmesi zorunlu değildir. Bir elektroanalitik yöntemin TS'si, eğer buna yakın derişimlerde kantitatif ölçümler yapılacaksa önemli bir parametredir. Özellikle TS, farmasötikler ve/veya biyolojik numunelerdeki ilaç aktif bileşiklerinin eser analizi, toplu ilaç numunesindeki eser safsızlıklar, bitmiş dozaj formlarındaki bozunma ürünleri veya biyolojik numunelerdeki ilaçların metabolitleri üzerinde çalışmak için gereklidir. Elektroanalitik çalışmalarda TS, enstrümantal veya enstrümantal olmayan yöntemler kullanılarak tanımlanabilir. TS hesaplama yaklaşım türleri aşağıda verilmiştir. Bu tür TS hesaplamaları resmi kılavuzlar ve farmakopeler tarafından tavsiye edilmektedir (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

1. Görsel değerlendirme yöntemi: TS, ilaç aktif bileşiklerinin bilinen analit derişimlerine sahip elektroanalizi ile ve bileşiğin güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği minimum seviyenin belirlenmesiyle belirlenir.

2. Sinyal-gürültü oranı yöntemi: Sinyal-gürültü oranı yöntemi genellikle ayırma ve spektrometrik yöntemlerde TS'nin hesaplanmasında kullanılır. Elektroanalitik çalışmalarda metodolojinin doğası ve destekleyici elektrolitler nedeniyle gürültü net olarak elde edilememektedir. Bu nedenle bu tür TS hesaplaması elektroanalitik tekniklerde yaygın olarak kullanılmaz.

3. Yanıtın standart sapması ve eğim yöntemi kullanılarak yapılan hesaplama dayalı olarak: Bu yöntem kullanılarak TS, aşağıdaki denklem ile ifade edilebilir:

$$TS = 3x \frac{SS}{m}$$

Eşitlikte “SS” standart sapma ve “m” ilgili kalibrasyon çizgisinin eğimidir. Bu yaklaşım çoğunlukla TS hesaplaması için elektroanalitik yöntemlerde kullanılır. Dolayısıyla

bu denklem kullanılarak yanıt derişim birimlerine dönüştürülebilir. Bu denklem aynı zamanda eğim fonksiyonuna bağlı olarak TS ile hassasiyet arasındaki ilişkiyi de göstermektedir. Standart sapma(lar)ın elde edilmesi için; boş yanıtın büyüklüğü, uygun sayıda boş numunenin (genellikle 3 ile 6 arasında) analiz edilmesiyle ölçülür ve bu yanıtlardan standart sapma hesaplanır. Diğer yaklaşım ise analite karşılık gelen bir cevabın en düşük kalibrasyon standardının uygun bir sayıyla (genellikle 3 ile 6 arasında) ölçülmesi ve standart sapmanın hesaplanmasıdır. Diğer yol ise regresyon çizgisinin standart sapmasının veya regresyon çizgilerinin y kesim noktalarının standart sapmasının hesaplanmasıdır. Bu standart sapma, yukarıdaki denklem kullanılarak TS'nin hesaplanmasında kullanılabilir.

1.7.7. Tayin Alt Sınırı (TAS)

TAS, numune matrisinde kabul edilebilir bir doğruluk ve hassasiyet düzeyinde ölçülebilen en düşük derişimdir. Özellikle bir ürünlerdeki safsızlıkların ve/veya bozunma ürünlerinin veya düşük seviyelerde aktif bileşenin belirlenmesi için kullanılır. Birçok farmasötik ve biyolojik uygulama için TAS genellikle TS'den daha yararlı bir parametredir. TAS her zaman TS'den yüksektir ve genellikle LOD'nin sabit katı olarak alınır (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

Yukarıda verilen TS hesaplamalarına benzer şekilde, sürecin aletsiz mi yoksa aletli mi olduğuna bağlı olarak TAS'ı belirlemek için ICH kılavuzunda çeşitli yaklaşımlar verilmiştir.

1. Görsel değerlendirme yöntemi: TAS, ilaç aktif bileşiklerinin bilinen analit derişimlerin elektroanalizi ile ve bileşik miktarının kabul edilebilir doğruluk ve hassasiyetle belirlenebileceği minimum seviyenin belirlenmesiyle belirlenir.

2. Sinyal-gürültü oranı yöntemi: TAS için bu tür hesaplama yöntemi, yalnızca kromatografik ve spektrometrik yöntemler gibi temel gürültü sergileyen ölçüm yöntemlerine uygulanabilir. Elektroanalitik çalışmalarda metodolojinin doğası ve destekleyici elektrolitin doğası gereği gürültü net olarak elde edilememektedir. Bu nedenle TAS için bu tür hesaplamalar elektroanalitik tekniklerde yaygın olarak kullanılmaz.

3. Yanıtın standart sapması ve eğim yöntemi kullanılarak yapılan hesaplamaya dayalı olarak: Bu yöntem kullanılarak TAS, aşağıdaki denklem ile ifade edilebilir:

$$TAS = 10x \frac{SS}{m}$$

Eşitlikte “SS” ve “m” TS hesaplamasında kullanılan aynı değerlerdir. Bu yaklaşım çoğunlukla TAS hesaplaması için elektroanalitik yöntemde kullanılır. Dolayısıyla bu denklem kullanılarak yanıt derişim birimlerine dönüştürülebilir. Bu denklem aynı zamanda eğim fonksiyonuna bağlı olarak TAS ile duyarlılık arasındaki ilişkiyi de göstermektedir.

1.7.8. Doğruluk

Doğruluk, elektroanalitik yöntemler için oldukça önemli validasyon parametresidir. Doğru veya kabul edilmiş bir referans değeri olarak benimsenen değer ile bulunan değer arasındaki uyumun yakınlığı olarak tanımlanabilir. Bir yöntemin doğruluğu rastgele hata bileşenlerinin yanı sıra sistematik hata bileşenlerinden de etkilenir. Sistematik hata aynı zamanda bağlı hata (%BH) ve yöntemin kesinliği olarak da bilinen rastgele hata olarak da bilinir. ICH yönergeleri, doğruluk çalışmaları için minimum üç derişim seviyesinde üç kopyanın test edilmesini önerir. Doğruluk aynı zamanda elde edilen tek ölçüm ile gerçek veya beklenen değer arasındaki uyum derecesi olarak da tanımlanır. Doğrulamanın bu iki parametresinin açıklamasından görülebileceği gibi, kesinlik olmadığında doğruluğun pek bir anlamı yoktur. %BH kabul edilebilir olmasına rağmen, genellikle deneysel olarak elde edilen değer in yüzdesi olarak sunulur (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

Validasyon çalışmalarında doğruluk ve kesinlik iki bağımsız özellik gibi görünmektedir. Pratik olarak doğruluğun kesinliğe bağlı olduğu söylenebilir. Bir yöntem kesin olmadan da doğru olabilir, ancak bu yalnızca tesadüf eseri ortaya çıkar. Her ölçümün daha doğru sonucundan daha kesin sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca, doğruluk parametresi elde edilen kalibrasyon eğrilerinin düşük, orta ve yüksek analit derişimlerinde üçer kez ölçüm yapılarak %geri kazanım hesaplanmasıyla bulunur. Genellikle %95 ve %105 aralığında %geri

kazanım değerleri elde edilir (Krull & Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

$$\%BSS = \frac{SS}{\text{hesaplanan değer ortalaması}}$$

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

1. Referans standart bir yöntemle karşılaştırma: Bir yöntemin doğruluğunu elde etmek için bu yöntemi kullanarak, önerilen yöntemin üç farklı derişim seviyesinde (düşük, orta, yüksek) en az dokuz ölçümle gerçekleştirilir ve elde edilen sonuçlardan %geri kazanım değerleri hesaplanır. Dolayısıyla numune hazırlama tekniğindeki değişkenlik ve/veya sapma, araştırılan bileşiğin yalnızca bir derişim için en aza indirilebilir. Elde edilen sonuçlar diğer kaynaklardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmalıdır. Bu karşılaştırma işleminde student-t ve F testleri kullanılır. Student-t testi ile iki yöntemin sonuçlarının ortalamaları kıyaslanırken, F testi ile de yöntemlerin standart sapmaları arasındaki farklılıklar hesaplanarak elde edilir. Elde edilen değerlerin teorik değerlerden küçük veya yakın olması durumunda tasarlanmış yöntemlerin referans alınan yöntem kadar hassas olduğu sonucuna varılır.

2. Kör matrise analizi yapılan maddenin ilave edilmesi ve geri kazanımı: Deneyler kör matris ortamının varlığında gerçekleştirilir. Bu tip geri kazanım çalışmaları için hala iyi karakterize edilmiş ve saflığı bilinen standart maddeler ihtiyaç duyulmaktadır. Analit referans standardı, plasebo olarak adlandırılabilir boş matris ortamına farklı derişim seviyelerinde eklenir. Bu tekniği kullanarak, aktif olmayan bileşenler ile farmasötik olarak aktif bileşik arasındaki olası etkileşimler ve potansiyel etkiler araştırılabilir. Her bir çalışma derişim seviyesindeki geri kazanım, eklenen bilinen miktarla karşılaştırılarak belirlenir. Normal bir analizde analit için beklenen seviyenin %50, 75, 100, 125 ve 150' sinde olmalıdır. Her seviyede en az üç tekrarlı deney gerçekleştirilmelidir. Ayrıca boş matris yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar, yüzde geri kazanım sonuçlarına dönüştürülebilir ve önerilen yöntemin doğruluğunu göstermek için %BSS ve %BH değerleri ile raporlanır.

3. Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi: Bu yöntemde, bilinen miktardaki bileşik, incelenen bileşiğin bir kısmını zaten içeren bir numune matrisine farklı seviyelerde eklenir. Eklenen ve eklenmemiş numune sonuçları arasındaki fark, eklenen analitin geri kazanılan kısmıdır ve bu, eklenen bilinen miktarla karşılaştırılabilir. Genel olarak, bu tekniği kullanan standart ekleme için, farklı deneylerde matrikse beklenen çalışma bileşiği derişimin %25, %50 ve %100' ünü eklemek iyi bir yaklaşımdır. Ölçülen miktarlar, ortalama geri kazanım yüzdesi sonuçları, %BSS ve %BH sonuçlarıyla birlikte eklenen miktara göre raporlanır. ICH, belirtilen aralığı kapsayan minimum derişim seviyeleri üzerinden minimum dokuz tespitten veri toplanmasını önerir.

1.7.9. Sağlamlık (Kararlılık)

Bir elektroanalitik metodun sağlamlığı, elektroanalitik koşullardaki çok küçük değişiklikler karşısında nihai sonuçlarını ne kadar iyi koruyabildiğinin göstergesidir. Çalışma koşullarını uygun ve güvenilir bir aralıkta tutmak ve önemli unsurların öngörülebilmesi ve yönetilebilmesi için kritik parametrelerin belirlenmesi ve kontrol edilmesi sağlamlığın temel amacıdır. Genel olarak bir elektroanalitik yöntem, sonuçlarda beklenmedik değişikliklere yol açmadan diğer laboratuvarlarda veya farklı koşullar altında tekrarlanabiliyorsa sağlam olarak kabul edilir. Tipik kullanımda ne kadar güvenilir olduğunun bir göstergesidir. Sağlamlığı değerlendirmek için genellikle özgüllük, seçicilik, hassasiyet, kesinlik ve doğruluk gibi parametrelerin yöntem üzerindeki performansları dikkate alınır. Ancak sağlamlık testleri, özellikle günlük uygulamalarda problem çözmeye harcanan zaman dikkate alındığında, farklı laboratuvarlarda kullanılan biyolojik ve farmasötik numunelerin analizini etkileyebilir. Geliştirilen elektroanalitik yöntemin ne kadar sağlam olduğunu belirlemek için çeşitli parametrelerin değerlendirilmesi gerekir. Bir elektrokimyasal yöntemin sağlamlığına ilişkin bir çalışma, destekleyici elektrolit, tamponun doğıası, pH, iyonik güç, puls periyodu, puls genişliği, sıcaklık vb. gibi elektroanalitik yöntem için çok önemli olan deneysel değişkenlerin dikkatli bir şekilde seçilmesiyle başlamalıdır. Ardından, metodun farklı deneysel koşullar altında uygulanması için sistematik bir prosedür takip edilmelidir. İlk olarak, uygun bir maksimum değişkenliğe sahip parametreler genellikle sağlamlık testi yapılmadan önce tanımlanır. Her parametre değiştirilirken diğerleri belirli bir seviyede sabit tutulur. Günümüzde sağlamlık testleri için genellikle deneysel tasarım yaklaşımları seçilmektedir. Sağlamlık çalışması, elektroanalitik sürecin doğrulanmasında çok önemli bir bileşendir (Krull

& Swartz, 1999; Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995).

1.7.10. Tutarlılık

Tutarlık, geliştirilen analitik yöntemle bir numune analiz edilirken aynı laboratuvarda farklı analizciler ve cihazlar, kullanılan kimyasalların markalarının değişmesi, farklı laboratuvarlarda aynı analizciler ve aynı marka ve model cihazlar gibi durumlarında tekrar elde edilebilirliği ifade eder. Elde edilen %BSS değerleri temel alınarak yöntemin tutarlılığı değerlendirilir (Burgess, 2001; Swartz ve Krull, 2012).

1.7.11. Stabilité

Stabilite genellikle çalışılan analitlerin ilaç aktif bileşiklerini, bozunma ürünleri, proses safsızlıkları, ekspiyanlar, endojen maddeler veya diğer potansiyel safsızlıklar gibi farklı deneysel koşullardaki kararlılığını gösteren bir parametredir. Bu validasyon parametresi, deney sonucunda bozunma ürününün meydana gelip gelmediği hakkında da bilgi verir. Ayrıca, kısa süreli stabilite, uzun süreli stabilite, dondurma-çözme stabilitesi ve zorlanmış bozunma çalışmaları gibi dört farklı yöntem kullanılarak stabilite çalışmaları gerçekleştirilmektedir (Ozkan, 2012).

Stabilite testinin amacı, numune toplama, işleme, saklama, hazırlama, analiz vb. tüm süreç boyunca ilgili analitlerde meydana gelen herhangi bir bozulmayı tespit etmektir. Formülasyon geliştirme üzerinde çalışan araştırmacılar, ilaç etken maddelerin işleme ve depolama koşulları altında bozunma ürünleri üretme eğiliminden dolayı zorluklarla karşılaşabilir ve bu da sonuçta ilaç etken maddesinin ticari kullanılabilirliğini tehlikeye atabilir. Tekrarlanabilir ve güvenilir bulgular elde etmek için standartların, reaktiflerin, çalışma elektrotlarının, destekleyici elektrolitlerin ve örneklerin hepsinin gerekli süre boyunca stabil kalması gerekir. Sıcaklık ve zaman stabilitesi tüm reaktifler ve solüsyonlar için kritik öneme sahiptir. Numune işleme ve elektroanaliz sırasında ortaya çıkabilecek koşulların karşılaştırılması için stabilite testi sırasındaki benzer koşullar kullanılmalıdır. Ana stok çözeltisindeki etken maddenin stabilitesi, çalışma yönteminin bir parçası olarak değerlendirilmelidir. İlacın aktif bileşenlerinin ve varsayılan metabolitlerin stabilitesinin doğrulanması önemlidir. Tüm reaktiflerin, destekleyici elektrolitlerin, tamponların ve

Bu tez kapsamında çalışılması planlanan antiviral ilaç etken maddeleri RIB, MOL, KAM ve UMI için literatürde yer alan ve farklı analitik teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiş çalışmalar özetlenmiştir.

Bu tez kapsamında çalışılması planlanan antiviral ilaç etken maddeleri RIB, MOL, KAM ve UMI için literatürde yer alan ve farklı analitik teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiş çalışmalar özetlenmiştir.

1.8.1. RIB Antiviral Etken Maddesi İçin Yapılmış Çalışmalar

Çizelge 1. 2. RIB için geliştirilen analitik yöntemler

Yöntem	Doğrusallık Aralık	Teşhis Sınırı	Uygulama	Geri Kazanım (%)	Ref
DPV	13.0-160.0 µM	3.0 µM	-	-	(Cheng vd., 2006)
KDASV	0.2 µM-0.1 nM	0.202 nM	Tablet İdrar Serum	99.20-99.68 100.12- 100.16 99.9-99.99	(Abdel Gaber vd., 2017)
SK-KS/KS	40.95 µM -40.95 nM	40.95 nM	Serum	74.2	(Y. Liu vd., 2006)
YPSK-UV	4.10 µM-320.0 nM	320.0 nM	Serum	76.43	(D'Avolio vd., 2006)
YPSK -KS/S	40.95 µM-4,10 nM	13.51 nM	Kan	63.2	(Meléndez vd., 2009)
SK-KS/KS	0.21- 204.75 µM	-	Serum	98.6-101.8	(Danso vd., 2011)
YPSK-UV	0.133-255.9 µM	1.28 nM	Serum	80.1	(D'Avolio vd., 2012)
KS/KS	65.52 µM-8.19 nM	-	Plazma	47.8-553.4	(Kromdijk vd., 2013)
EKL	0.2-50.0 µM	85.0 nM	Tablet	93.0-102.0	(Kong vd., 2017)
YPSK-UV	0.82-102.4 µM	0.66 µM	Kapsül	99.75- 100.03	(El-Shorbagy vd., 2020)
SK-KS	819.0 µM-4095.0 nM	1150,70 nM	Karaciğer homojenatı	97.70-99.46	(El-Yazbi ., 2021)
MIP	-	-	-	-	(Xu & Xu, 2012)
MIMs	-	-	-	-	(M. Chen vd., 2022)
MIP	4.91 µM-102.38 nM	31.20 nM	Göl suyu Yumurta	92.9-98.5 87.5-93.1	(Hu vd., 2022)
MIP	81.5-204.75 µM	33.17 µM	Yem	92-105	(Ma vd., 2019)
MIBK	-	-	Musluk suyu Jiaohe suyu Moshui suyu	90.25 92.30 91.50	(W. Chen vd., 2022)
MIMs	0.015-3.5 µM	3.0 nM	Granüller	96.5-99.2	(Q. Gao vd., 2023)

1.8.2. MOL Antiviral Etken Maddesi İçin Yapılmış Çalışmalar

Çizelge 1. 3. MOL için geliştirilen analitik yöntemler

Yöntem	Doğrusallık Aralık	Teşhis Sınırı	Uygulama	Geri Kazanım (%)	Ref
TF-YPSK	0.1–60.0 µg/mL	0.05 µg/mL	-	-	(Reçber vd., 2022)
TF- YPSK-UV	0.2–80 µg/mL	0.04 µg/mL	Kapsül	100.58	(Annadi vd., 2022)
UYPSK–KS/KS	2.5-10 ng/mL	-	Kan Fetus Plasenta Amniyotik sıvı	97.72-99.4 97.64-101.03 98.13-100.10 99.27-100.87	(Chang vd., 2023)
UV	5–25 µg/mL	0.02 µg/mL	Kapsül	99.99 ± 1.23	(Sharaf vd., 2022)
HP-TLC	3.75–100.00 µg/mL	1.21 µg/mL	-	-	(Saraya vd., 2022)
SK-KS-KS	2.5–5000 ng/mL	-	Plazma Tükürük	95-100 65-86	(Amara ., 2021)
SK-KS-KS	20.0–10000.0 ng/mL	-	Plazma	96.4-97.6	(Gouda vd., 2022)
UPLC-MS-MS	2.25–100 µg/mL	0.68	Biyolojik örnek Plazma	99.10-100.25	(Nakka vd., 2023)
SK-KS-KS	1–5000 ng/mL	-	-	72.2-76.2	(Parsons vd., 2021)
UV	1–12 µg/mL	-	Kapsül	99.68	(Abdelazim vd., 2023)
Floresans	10 µM-1 nM	2.24 nM	Kapsül	98-102 98.8 99.0	(Younis vd., 2023)
KDV	0.09-4.57 µM	0.03 µM	Serum	99.1	(Kablan vd., 2022)
DV	0.25-750 µM	0.05 µM	İdrar	98.2-100.6	(Vural vd., 2023)

1.8.3. UMI Antiviral Etken Maddesi İçin Yapılmış Çalışmalar

Çizelge 1. 4. UMI için geliştirilen analitik yöntemler

Yöntem	Doğrusallık Aralık	Teşhis Sınırı	Uygulama	Geri Kazanım (%)	Ref
YPSK-İEP-KS	5.0-10.0 µg/mL	3.3 µg/mL	Atık su Nehir suyu Biyolojik çamur	-	(Ul'yanovskii vd., 2022)
SK-Eİ-KS	1.0-1000 ng/mL	-	Serum	95-105	(X. Liu, Huang vd., 2007)
YPSK-UV	0.08-20.0 µg/mL	-	Fare serumu	89.7-92.7	(X. Liu Chen vd., 2007)

1.8.4. KAM Antiviral Etken Maddesi İçin Yapılmış Çalışmalar

Çizelge 1. 5. KAM için geliştirilen analitik yöntemler

Yöntem	Doğrusallık Aralığı	Teşhis Sınırı	Uygulama	Geri Kazanım (%)	Ref
UYPSK-KS-KS	1.0-100 ng/mL	-	Serum	90-100	(Sørensen vd., 2021)

Bu tez kapsamında COVID-19 çalışmalarında en sık kullanılan antiviral ilaçlardan RIB, MOL, UMI ve KAM etken maddelerinin ayrı ayrı tayini için MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Şimdiye kadar bilimsel literatürde eksik kalan bu antiviral maddelerin daha seçici ve hassas tayini için spesifik sensörlerin geliştirilmesi literatüre önemli katkılar sağlayacaktır. Geliştirilen sensörün diğer analitik tekniklere kıyasla farmasötik preparatlarda ve ticari insan serum numunelerinde antiviral ilaçların seçici ve hassas tayinine yönelik etkili bir çözüm üretmelerinin yanı sıra hızlı analiz süresi, düşük maliyet ve verimli analitik sinyalin başarılı bir şekilde üretildiğini kanıtlayacaktır. Ayrıca dayanıklı, hızlı, hassas, seçici, kullanıcı ve çevre dostu MIP temelli sensörlerin geliştirilmesi hedeflenecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

Çizelge 2. 1. Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Saflık Derecesi (%)	Firma
Ribavirin (C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅)		Sanovel Pharm
Molnupiravir (C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₇)		Sanovel Pharm
Kamostat mesilat (C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₅ ·CH ₃ SO ₃ H)	>98	Sigma-Aldrich
Umifenovir (C ₂₂ H ₂₅ BrN ₂ O ₃ S)		Sigma-Aldrich
Asetonitril (C ₂ H ₃ N)	≥99.9	Merck
Etanol (C ₂ H ₆ O)	≥99.9	Merck
Metanol (CH ₄ O)	≥99.9	Merck
Asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	≥99	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH)	>97	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit (HCl)	%37	Merck
Fosforik asit (H ₃ PO ₄)	>85.0	Merck
Potasyum ferrisiyanür (K ₄ [Fe(CN) ₆])	≥99.0	Merck
Potasyum ferrisiyanür (K ₃ [Fe(CN) ₆])	≥98.5	Merck
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	≥98.0	Sigma-Aldrich
Sodyum sülfat (Na ₂ SO ₄)	≥99.0	Merck
Dopamin (C ₈ H ₁₁ NO ₂)		Alfa-Aesar
2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN)	≥98.0	Merck
Borik asit (H ₃ BO ₃)	≥99	Sigma-Aldrich
Askorbik asit (C ₆ H ₈ O ₆)		Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (C ₂ H ₆ OS)	≥99	Merck
2-hidroksietil metakrilat (C ₆ H ₁₀ O ₃)	≥99	Sigma-Aldrich
Etilen glikol dimetakrilat (C ₁₀ H ₁₄ O ₄)	≥98	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür (KCl)	≥99	Merck
Ürik asit (C ₅ H ₄ N ₄ O ₃)	≥99	Sigma-Aldrich
Parasetamol (CH ₃ CONHC ₆ H ₄ OH)	≥97	Sigma-Aldrich
Asetik asit (CH ₃ COOH)	≥99.7	Merck
Lamivudin (C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S)	≥98	Sigma-Aldrich
Zidovudin (C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄)		Sigma-Aldrich
Zalsitabin (C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₃)		Sigma-Aldrich
Emtrisitabin (C ₈ H ₁₀ FN ₃ O ₃ S)	≥98	Sigma-Aldrich

2.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Ekipmanlar

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

Çizelge 2. 2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihaz ve diğer ekipmanlar

Cihaz	Marka – Model
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)
Raman spektrometre	JASCO NRS-4500 Confocal Raman Microscope
Damla şekil analizörü	KRUSS DSA100 (Hamburg, Germany)
Taramalı elektron mikroskobu	SEM, TESCAN GAIA 3, (Brno – Kohoutovice, Czech Republic)
UV lamba	UVP-B 100 AP – Analytik Jena US LLC (Canada)
Santrifüj cihazı	Nüve NF-200 (Ankara, Turkey)
Otomatik mikro pipetler ve uygun pipet uçları	Eppendorf AG (Almanya)/ ISOLAB Laborgeräte GmbH (Eschau, Almanya)
Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)	NanoMagnetics marka AFM sistemi

2.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Elektrokimyasal Sistem ve Bileşenler

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

Çizelge 2. 3. Tez çalışması kapsamında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri

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

2.7. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.7.1. Destek Elektrolitlerin Hazırlanması

Elektrokimyasal analizlerde özellikle elektropolimerizasyon yöntemiyle geliştirilen sensörlerde hem elektrot yüzeyindeki polimerizasyon işlemi hem de hedef moleküllerin uzaklaştırılması destek elektrolit çözeltileri kullanılarak gerçekleştirildi. 0.1 M asetat tampon çözeltisi (AT), farklı pH'larda fosfat tamponu (FT) ve Britton-Robinson tamponu hazırlamak için istenilen miktarlar tartılarak saf suda çözüldü. Tampon çözelti hazırlandıktan sonra pH'ı ölçüldü ve 1.0 M HCl veya 1.0 M NaOH kullanılarak pH ayarlaması yapıldı. Hazırlanan tampon çözelti +4°C'de buzdolabında saklandı ve kullanılacağı zaman oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

2.7.2. Potasyum Ferrisiyanür/Ferrosiyanür Çözeltisinin Hazırlanması

Elektrokimyasal ölçümlerde redoks probu olarak 5.0 mM potasyum ferrisiyanür/ferrosiyanür ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) çözeltisi kullanıldı. Bunun için 0.1 M KCl içinde ayrı ayrı hazırlanan 10 mM'lık potasyum ferrisiyanür ve potasyum ferrosiyanür çözeltileri bilinen miktarlarda alınarak karıştırıldı ve tez projesi kapsamında hazırladığımız modifiye elektrotların elektrokimyasal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla da kullanıldı.

2.7.3. Antiviral İlaç Etken Maddelerin Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Tez kapsamında çalışılan RIB ve MOL etken maddelerinden uygun miktarlarda tartılarak, 10 mM'lık standart stok çözeltileri ultra saf su içerisinde hazırlanırken, KAM ve UMI etken maddelerinin aynı derişime sahip stok çözeltileri de dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltiler +4°C 'de buzdolabında saklandı. Kullanılmadan önce buzdolabından çıkartılıp ortam sıcaklığına gelmesi beklendi.

2.7.4. Kapsül Çözeltilerinin Hazırlanması

Kapsül analizi için, her biri 200 mg RIB içeren Viron kapsullerinden 10 mM RIB kapsül stok çözeltisi hazırlamak için hesaplanan miktar, hassas bir terazide tartıldı ve ultra saf su içinde çözüldü. Hazırlanan çözelti dakika ultrasonik banyoda bekletildi ve 5000 rpm'de 20

dakika santrifüj edildi. Daha sonra ana stok çözeltisi ultra saf su ile seyreltilerek ara stok çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler geri kazanım çalışmalarında kapsül formundaki RIB'in belirlenmesi için standart kalibrasyon verileri kullanılarak hesaplandı. Her biri 200 mg MOL içeren Viron kapsullerinden 10 mM MOL kapsül stok çözeltisi benzer adımlar takip edilerek hazırlandı. Tabletlerdeki RIB ve MOL miktarını incelemek için, bilinen tablet derişimlerine bilinen miktarda saf antiviral ilaç etken maddeleri eklenerek geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi ve DPV yöntemi ile incelendi.

2.7.5. Ticari Serum ve İdrar Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmalardan önce -20°C dondurucuda saklanan, Sigma Aldrich firmasından alındığı şekilde doğrudan kullanılan ticari serum numuneleri oda sıcaklığında (25°C) çözüldü. Ticari serum numuneleri şu şekilde hazırlandı; 1.0 mL 10 mM ilaç etken maddesi, 3.6 mL ticari serum örneği ve 5.4 mL asetonitril test tüpüne alınarak seyreltildi. Hazırlanan ticari serum solüsyonu 15 dakika sonikatörde bekletildi. Daha sonra hazırlanan ticari serum çözeltisi, protein kalıntılarının çökeltilmesi için 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Benzer prosedür idrar çözeltisi içinde uygulandı. Gönüllü kişiden alınan idrar örnekleri de ticari serum numunelerine uygulanan yöntem ile aynı şekilde hazırlandı, sonikatörde bekletildi ve santrifüj edildi. Elde edilen kalibrasyon denkleminde ait veriler kullanılarak geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi. Geri kazanım sonuçları, bilinen bir derişimde ticari serum numunelerine saf antiviral ilaç etken çözeltisi eklenerek hesaplandı ve her derişim için yüzde bağıl standart sapma (% BSS) değerleri elde edildi.

2.7.6. Girişim Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Girişim çalışmaları için kanda bulunan bazı önemli biyolojik moleküllerin (dopamin (DOP), askorbik asit (AA), parasetamol (PAR) ve ürik asit (UA)) ve iyonların (KNO₃, Na₂SO₄ ve MgCl₂), 10 mM'lık stok çözeltileri ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlere bu girişim ajanların etkisi olup olmadığı incelenmiştir.

2.7.7. Tez Çalışmasında Kullanılan Diğer Çözeltilerin Hazırlanması

Axitinib, tiyofenol, tadalafıl, zolmitriptan, sumatriptan, L-triptofan, lamivudin, zidavudin, zalsitabin, emtrisitabin, metformin HCl, L-ariginin, otilonyum bromür,

ipratropyum bromür ve repaglinid etken maddeleri geliştirilen sensör uygulamalarında seçicilik çalışmalarında kullanılmıştır. Bu etken maddelerden 1.0 mM stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 15 dakika sonikatörde bekletilmiştir.

2.8. Tez Çalışmasında Kullanılan Voltametrik Yöntemler

2.8.1. Dönüşümlü Voltametri

Tez çalışması kapsamında antiviral ilaç etken maddelerin belirlenmesine yönelik çalışmalarda sensör yüzeyi çalışma elektrotu olarak camsı karbon elektrot (CKE) ve perde baskılı altın elektrot (SPAUE) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektropolimerizasyon işlemi MIP ve NIP için elektrotların hazırlanmasında -0.2 ile 1.6 V arasında 100 mV/s'lik bir tarama hızında belirli sayıda döngü alınması şeklinde uygulanmıştır. MIP ve NIP elektrotların hazırlanma yöntemleri aynı şekildedir, sadece elektrotlar hazırlanırken NIP yönteminde hedef molekül eklenmemektedir. DV yöntemi ayrıca RIB, MOL, KAM ve UMI için geliştirilen sensörlerin hazırlama aşamalarında karşılaştırma ve elektrokimyasal karakterizasyon için de kullanılmıştır.

2.8.2. Diferansiyel Puls Voltametri

RIB, MOL, KAM ve UMI için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin analitik performanslarının değerlendirilmesi için 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ve 100 mM KCl içeren bir solüsyonda DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

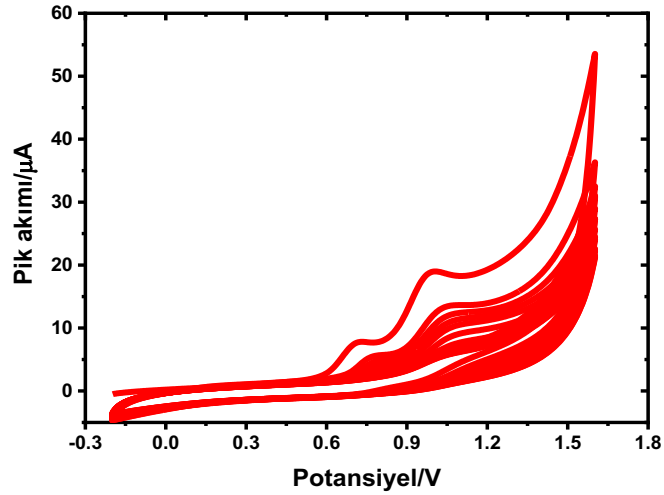
2.8.3. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

RIB, MOL, KAM ve UMI için hem geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin elektrokimyasal karakterizasyonu için hem de UMI için geliştirilen sensörün analitik performansının değerlendirilmesinde de elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemi kullanılmıştır. Elektrokimyasal tüm ölçümler 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir.

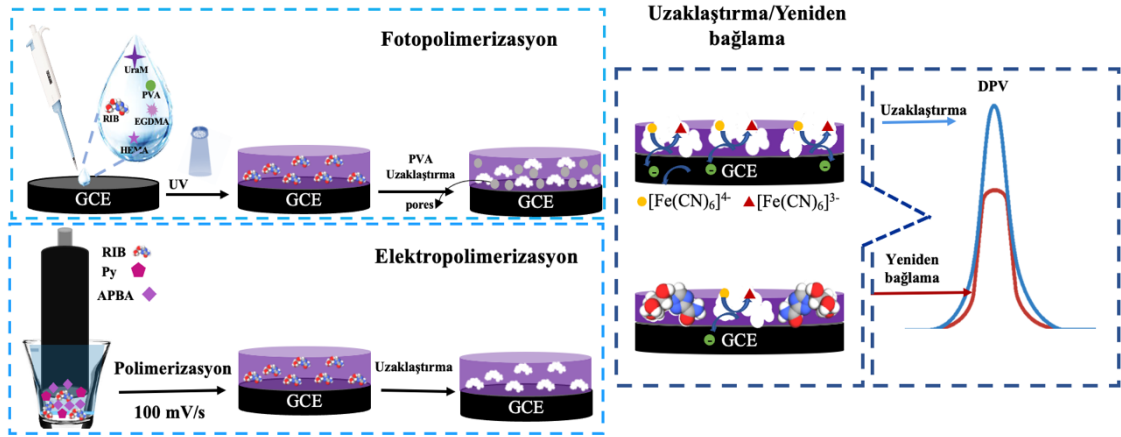
2.9. Tez Çalışmasında Kullanılan MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörlerin Hazırlanması

2.9.1. Poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE İçin MIP ve NIP Temelli Elektrotların Hazırlanması

Elektrot yüzeyi ultra saf su: metanol (1:1, v/v) karışımı kullanılarak temizlendikten sonra, CKE yüzeyi alümina bulamacı içeren bir parlatma pedi kullanılarak cilalandı, ultra saf suyla yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Elektropolimerizasyon çözeltisi (EP), pirol (Py, 50 mM), para aminofenil boronik asit (p-AFBA, 10 mM), RIB (10 mM) ve destekleyici elektrolit çözeltisi (pH 7.4, fosfat tampon çözeltisi (FT)/katkılayıcı/karşı iyon olarak 100 mM LiClO₄) kullanılarak hazırlandı. EP, 100 mV/s tarama hızında -0.2 ile +1.6 V arasında 15 döngü DV ile gerçekleştirildi (Şekil 2.1). Polimerizasyondan sonra elektrot ultra saf su ile yıkandı. Hedef molekül daha sonra pH 7.5 FT içerisinde 5 döngü DV ile polimerik filmde uzaklaştırıldı. Daha sonra, bilinen derişimlerde hazırlanan RIB moleküllerinin uzaklaştırılan boşluklara yeniden bağlanması için bir ThermoShaker (500 rpm, 25°C) kullanılarak 10 dakika süreyle gerçekleştirildi. Geliştirilen sensörlerin genel şematik gösterimi Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2. 1. 100 mV/s tarama hızında 15 döngü ile 10 mM RIB, 50 mM Py ve 10 mM p-AFBA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları



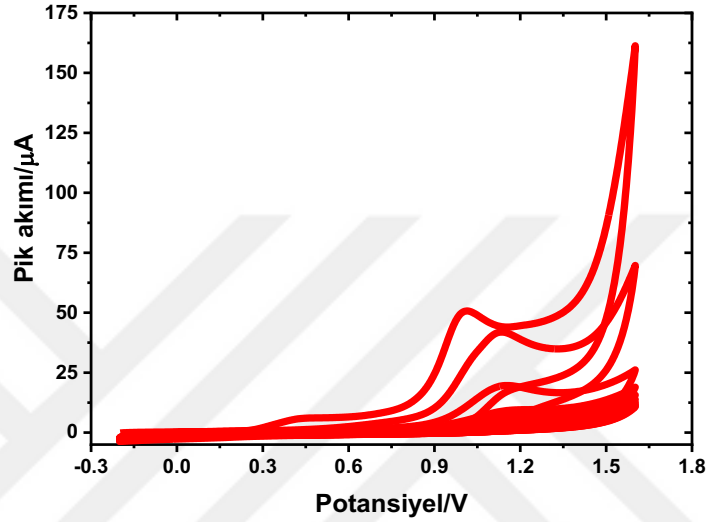
Şekil 2. 2. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

Fotopolimerizasyon çözeltisi (FP) için hedef molekül RIB (10 mM, 0.1 mL), fonksiyonel monomer urasil metakrilat (UraM, 10 mM, 0.1 mL) ön polimerizasyon çözeltisine 0.5 mL HEMA (temel monomer) ve 0,1 mL EGDMA (çapraz bağlayıcı) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika karıştırıldı. Ardından, başlatıcı (AIBN, 2 mg/mL) ve polivinil pirolidin (PVP, 25 mg/mL) çözeltisinden eklendi ve bu çözeltiden 0.25 µL'lik kısım CKE yüzeyine damlatıldı ve ardından oda sıcaklığında 100W, 365 nm UV lamba altında 5 dakika tutularak FP işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra, MIP yapısındaki spesifik boşlukları ortaya çıkarmak için modifiye edilmiş CKE sensörü, ThermoShaker (500 rpm, 25°C) ile 5M asetik asit çözeltisi içerisinde 15 dakika süreyle uzaklaştırıldı. Son aşamada, ThermoShaker (500 rpm, 25°C) kullanılarak 15 dakika yeniden bağlama işlemi gerçekleştirildi ve RIB moleküllerini oluşturulan spesifik boşluklara yeniden bağlamak için bilinen derişimlerdeki RIB çözeltileri kullanıldı. Kontrol deneyleri, MIP'ler için uygulanan prosedürün aynısı ile RIB eklenmeden hazırlanan baskısız polimer (NIP) kullanılarak gerçekleştirildi.

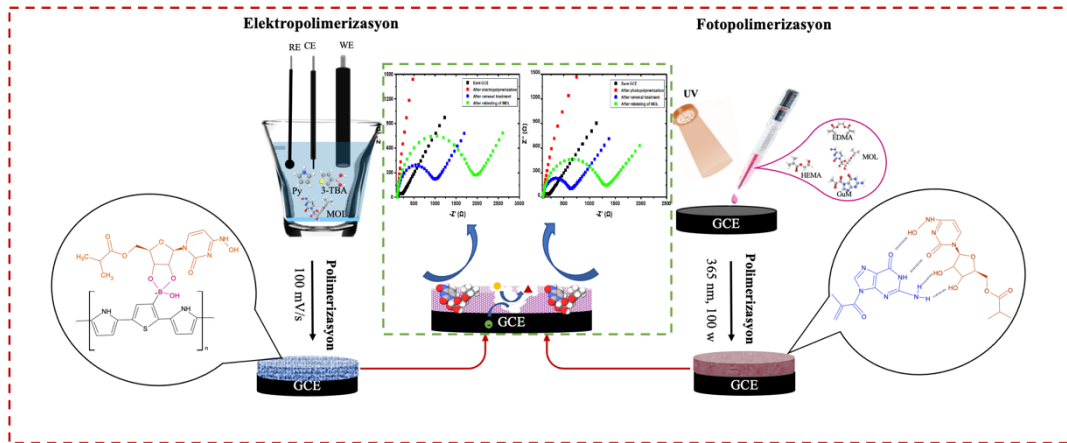
2.9.2. Poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE İçin MIP ve NIP Temelli Elektrotların Hazırlanması

İlk olarak, CKE 15 dakika boyunca etanol ve saf su (1:1, v/v) karışımı içinde sonikatörde bekletildi. Daha sonra, CKE'nin yüzeyi 1.0 mikron alümina süspansiyonu içinde parlatıldı, saf su ile temizlendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Py (50 mM), 3-tiyenil boronik asit (3-TBA, 10 mM) ve MOL (10 mM), EP işlemi için destekleyici elektrolit olarak LiClO₄ (0,1 M) içeren FT (pH 7.5) çözeltisi kullanıldı. Elektrot, 100 mV/s tarama hızında -0.2 ile +1.6

V arasında 10 döngü DV ile tarandı (Şekil 2.3). Polimerizasyon sonlandırıldıktan sonra film, ultra saf su ile yıkandı. Daha sonra şhedef molekül, FT (pH 7.5) içerisinde 7 döngü DV kullanılarak uzaklaştırıldı. Daha sonra elektrotlar, açığa çıkan boşluklara yeniden bağlanmak için ThermoShaker'da 500 rpm'de 25°C'de bilinen derişimlerde MOL çözeltisi ile 10 dakika süreyle yeniden bağlama işlemi gerçekleştirildi. Geliştirilen sensörlerin genel şematik gösterimi Şekil 2.4.'de verilmiştir.



Şekil 2. 3. 100 mV/s tarama hızında 10 döngü ile 10 mM MOL, 50 mM Py ve 10 mM 3-TBA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları



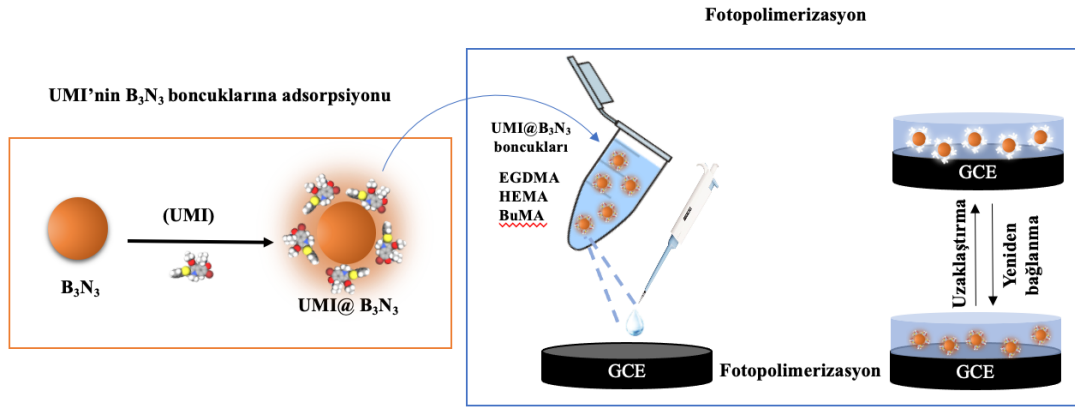
Şekil 2. 4. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

FP için stok monomer çözeltisi, monomer:hedef molekül kompleksi (10 mM guanin metakrilat (GuaM) ve 10 mM MOL), HEMA (100 μ L, temel monomer) ve EGDMA (20 μ L,

Çapraz bağlayıcı) ile hazırlandı. Hazırlanan    zelti 10 dakika sonikatörde bekletildi ve bu    zeltiye başlatıcı olarak 2-hidroksi-2 metilpropiofenon (2  L) ilave edildi. Daha sonra bu karışımdan 0.5  L doğrudan elektrot yüzeyine damlatıldı ve 5 dakika UV ışık altında tutuldu. MOL hedef molekülü, uzaklaştırma    zeltisinin varlığında 10 dakika boyunca 25 C'de 650 rpm'de bir ThermoShaker kullanılarak polimerik kaplamadan uzaklaştırıldı. NIP'ler, MOL eklenmeden aynı koşullar kullanılarak kontrol çalışmaları için hazırlandı.

2.9.3. UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE İçin MIP ve NIP Temelli Elektrotların Hazırlanması

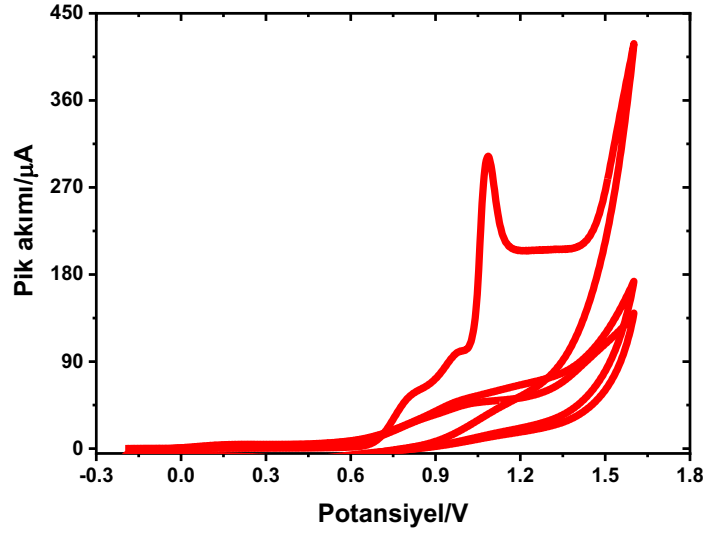
İlk olarak, CKE 15 dakika boyunca etanol ve saf su (1:1, v/v) karışımı içinde sonikatörde bekletildi. Daha sonra, CKE'nin yüzeyi 1.0 mikron alümina süspansiyonu içinde parlatıldı, saf su ile temizlendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Hedef molekül UMI (10 mM) ve B₃N₃ (0.1mg/mL) karışımı fosfat tamponunda (pH: 7.4; 100 mM, 50.0 mL) gerçekleştirildi ve UMI'nin gözenek oluşturu B₃N₃ ile adsorpsiyonu için 2 saat sonikatörde tutuldu. UMI@B₃N₃ metanol (1.0 mL) içerisinde dağıtıldı ve 20  L butil metakrilat (BuMA, fonksiyonel monomer), 100  L HEMA (temel monomer) ve 20  L EGDMA ( apraz bağlayıcı) içeren bir    zelti ile karıştırıldı. Başlatıcı (2-hidroksi-2-metil propiyofenon, 2  L) eklendikten sonra, bu    zeltinin 0.5  L'lik bir kısmı CKE yüzeyine damlatıldı. Polimerizasyon, bir UV lambası (365 nm, 100 W) altında 5 dakika süreyle gerçekleştirildi. Polimerizasyon sonrasında hedef molekül uzaklaştırma    zeltisi kullanılarak polimerik yapıdan uzaklaştırıldı ve gözenekli yapılar oluşturuldu. NIP temelli sensörler CKE'de aynı şekilde ancak hedef moleküller eklenmeden hazırlandı. Geliştirilen sensörün genel şematik gösterimi şekil 2.5.'de verilmiştir.



Şekil 2. 5. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

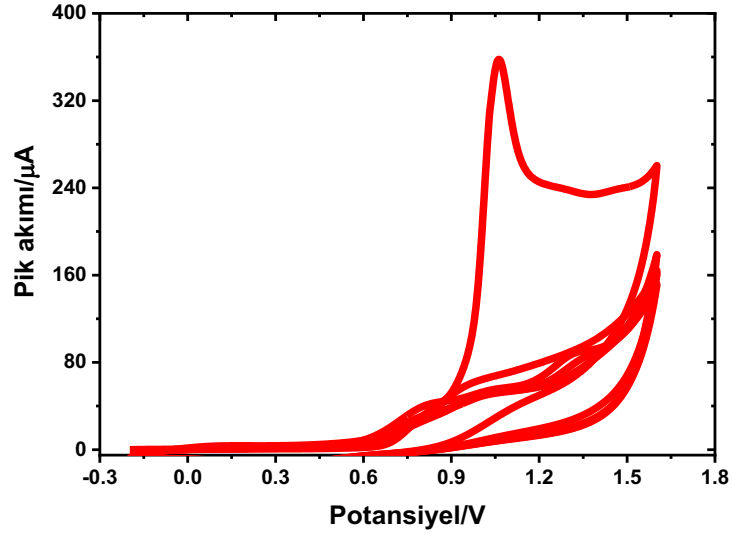
2.9.4. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE, poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE ve poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE Sensörleri İçin MIP, DIP ve NIP Temelli Elektrotların Hazırlanması

İlk olarak, perde baskılı altın elektrotlar (SPAuE) 0.1 M H_2SO_4 ile 100 mV/s tarama hızında -0.2 ile +1.6 V arasında 15 döngü DV ile yüzey aktivasyonu gerçekleştirildi. Py (10 mM), para amino benzoik asit (p-ABA, 10 mM) ve KAM (10 mM), EP işlemi için destekleyici elektrolit olarak 0.1 M NaCl içeren FT (pH 7.0) çözeltisi kullanıldı ve 100 mV/s tarama hızında -0.2 ile +1.6 V arasında 3 döngü DV ile polimerizasyon gerçekleştirildi (Şekil 2.6). Polimerizasyon sonlandırıldıktan sonra film, ultra saf su ile yıkandı. Daha sonra hedef molekül, pH 7.5 FT içerisinde 7 döngü DV kullanılarak uzaklaştırıldı. Sonrasında elektrotlar, açığa çıkan boşluklara yeniden bağlanmak için ThermoShaker'da 500 rpm'de 25°C'de bilinen derişimlerde KAM çözeltisi ile 10 dakika süreyle yeniden bağlama işlemi gerçekleştirildi. Geliştirilen sensörlerin genel şematik gösterimi Şekil 2.9'da verilmiştir.



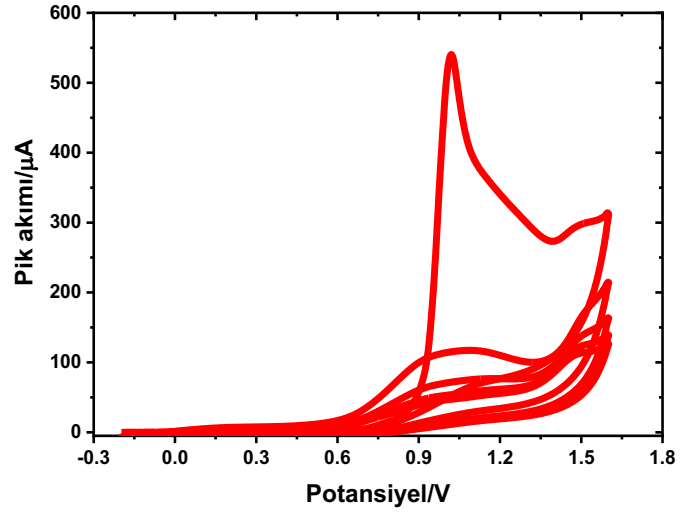
Şekil 2. 6. 100 mV/s tarama hızında 10 döngü ile 10 mM KAM, 50 mM Py ve 10 mM p-ABA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları

Guanidin (GUA) içinde aynı ön işlem adımları uygulandı ve elektrotların aktivasyonu için DV tekniği ile 0.1 M H₂SO₄ kullanılarak gerçekleştirildi. Py (50 mM), para amino benzoik asit (p-ABA, 10 mM) ve GUA (10 mM), EP işlemi için destekleyici elektrolit olarak 0.1 M NaCl içeren FT (pH 7.0) çözeltisi kullanıldı ve 100 mV/s tarama hızında -0.2 ile +1.6 V arasında 5 döngü DV ile polimerizasyon gerçekleştirildi (Şekil 2.7). Polimerizasyon sonlandırıldıktan sonra film, ultra saf su ile yıkandı. Daha sonra hedef molekül, pH 7.5 FT içerisinde 7 döngü DV kullanılarak uzaklaştırıldı. Sonrasında elektrotlar, açığa çıkan boşluklara yeniden bağlanmak için ThermoShaker'da 500 rpm'de 25°C'de bilinen derişimlerde GUA çözeltisi ile 10 dakika süreyle yeniden bağlama işlemi gerçekleştirildi.

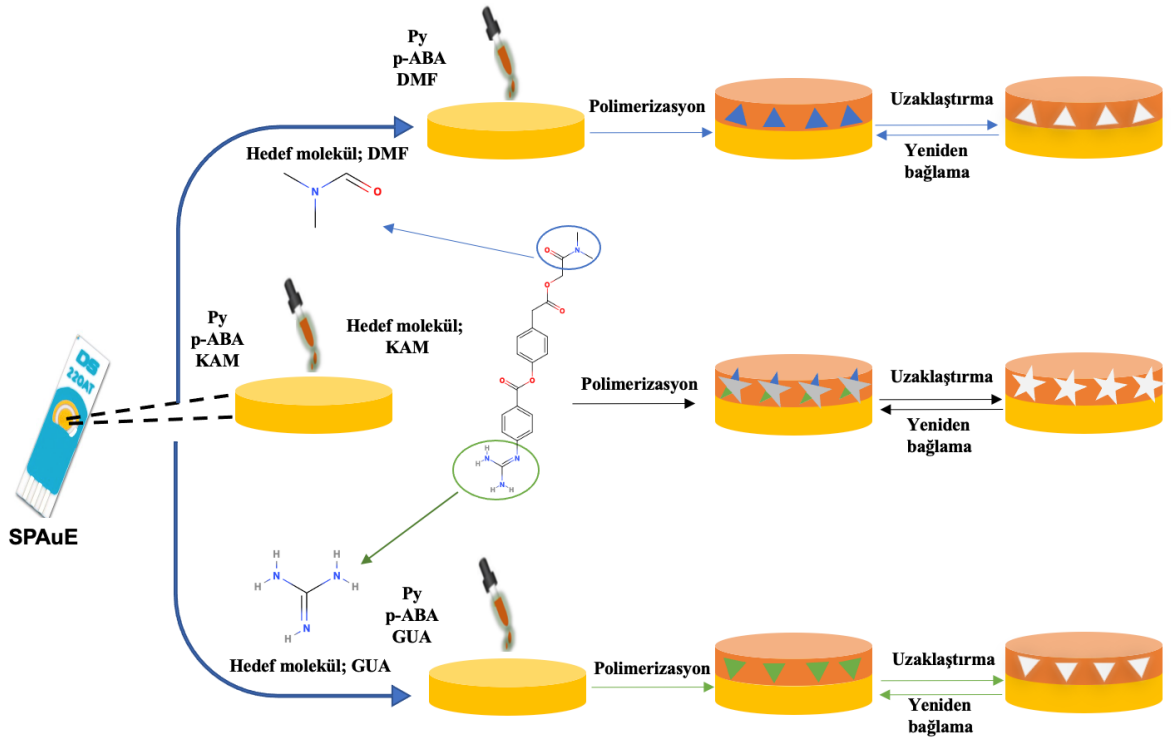


Şekil 2. 7. 100 mV/s tarama hızında 10 döngü ile 10 mM GUA, 50 mM Py ve 10 mM p-ABA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları

KAM ve GUA’da olduğu gibi dimetil form amit (DMF) içinde aynı ön işlem adımları uygulandı ve elektrotların aktivasyonu için DV tekniği ile 0.1 M H_2SO_4 kullanılarak gerçekleştirildi. Py (50 mM), para amino benzoik asit (p-ABA, 10 mM) ve DMF (10 mM), EP işlemi için destekleyici elektrolit olarak 0.1 M NaCl içeren FT (pH 7.5) çözeltisi kullanıldı ve 100 mV/s tarama hızında -0.2 ile +1.6 V arasında 5 döngü DV ile polimerizasyon gerçekleştirildi (Şekil 2.8). Polimerizasyon sonlandırıldıktan sonra film, ultra saf su ile yıkandı. Daha sonra hedef molekül, pH 7.5 FT içerisinde 3 döngü DV kullanılarak uzaklaştırıldı. Sonrasında elektrotlar, açığa çıkan boşluklara yeniden bağlanmak için ThermoShaker’da 500 rpm’de 25°C’de bilinen derişimlerde DMF çözeltisi ile 10 dakika süreyle yeniden bağlama işlemi gerçekleştirildi. Geliştirilen sensörlerin genel şematik gösterimi Şekil 2.9’da verilmiştir.



Şekil 2. 8. 100 mV/s tarama hızında 10 döngü ile 10 Mm DMF, 50 mM Py ve 10 mM p-ABA çözeltisi karışımındaki EP işleminin döngüsel voltammogramları



Şekil 2. 9. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

2.10. MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonları

Tez çalışmasında RIB, MOL, KAM ve UMI için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin karakterizasyonları için elektrokimyasal yöntemler olan DV ve EIS teknikleri kullanılmıştır. Bunlara ek olarak; sensörlerin morfolojik karakterizasyonları taramalı elektron mikroskopisi (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), temas açısı analizi ve atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.

2.11. Kuantum Kimyasal Hesaplamaları

Prensip olarak moleküllerin enerji, bağlanma ve polarizasyon gibi temel özelliklerinin hesaplanması, onların fizikokimyasal davranışlarının tahmin edilmesine olanak sağlar. Bu çalışmada, Gaussian 2016 (Revizyon C.01) program paketi (Dennington vd., 2009; Frisch vd., 2013) kullanılarak moleküllerin temel özelliklerinin hesaplanması için hibrit Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT/B3LYP) yaklaşımı uygulanmıştır. Hesaplamalar moleküllerin optimizasyonunu ve doğal bağ yörünge (NBO) analizini içerir. Optimizasyon hesaplamaları için 6-31G(d), NBO analizi için ise 6-311++G(d,p) adı verilen bir temel set kullanıldı. Ayrıca her bir molekülün optimizasyon hesaplaması sonrasında aynı teori seviyesinde frekans analizi hesaplamaları gerçekleştirildi ve optimize edilen yapıların stabilizasyonu hayali frekans numarası NImag-local minimum (NImag=0) ile kontrol edildi. Hesaplama sonuçlarını görüntülemek için Gaussian program paketinin bir parçası olan GaussView (ver. 6.1.1) programı ve Chemissian (ver. 4.38) programı (Leonid, 2023) kullanıldı. Ek olarak, RIB'nin şablon özelliğini tartışmaya yardımcı olmak için bazı elektronik, enerjik ve geometrik tanımlayıcılar (Gaussian 2016 ve BIOVIA Discovery Studio 2022 programları kullanılarak) (Eberhardt vd., 2021; Leonid, 2023; Marriss vd., 2009) hesaplandı. Öte yandan sensör yüzey modifikasyonunda ko-monomer olarak kullanılan Py'nin RIB ve MOL hedef moleküllerine sırasıyla p-APBA ve 3-TBA monomerlerine maksimum bağlanma sayısını bulmak için kör yerleştirme hesaplaması yapıldı (Trott vd., 2010).

3. BULGULAR

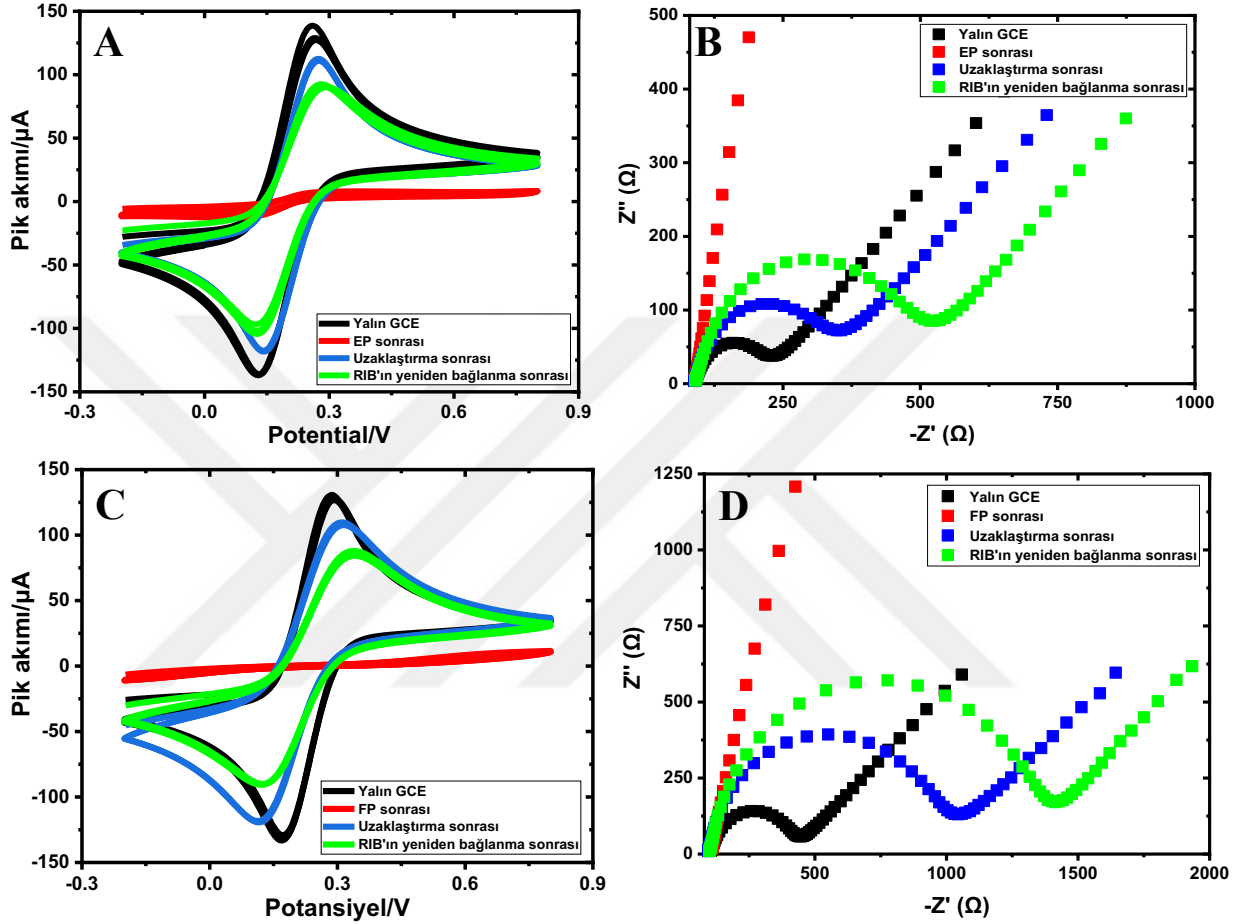
3.1. RIB Etken Maddesine Ait Bulgular

3.1.1. Polimerik Filmlerin Karakterizasyonu

3.1.1.1. Sensörlerinin Elektrokimyasal Karakterizasyonları

Poli(Py-co-p-AFBA)]/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları da DV ve EIS yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. Bu yöntemler elektrot yüzeyinin iletkenliğini, yük aktarım direncini ve elektron aktarım süreçlerini tanımlayan temel tekniklerdir. poly(Py-co-p-APBA)]/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin elektrokimyasal davranışı, redoks probu olarak 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Sensörler, yalnız CKE, polimerizasyon, uzaklaştırma ve yeniden bağlama gibi hazırlık aşamalarında elde edilen tepe akım ve direnç değerleri değerlendirilerek karakterize edildi. EP ve FP işlemlerinin her adımına ilişkin DV ve EIS grafikleri Şekil 3.1'de verilmiştir. Her iki yöntemde de (Şekil 3.1.A ve Şekil 3.1.C), yalnız CKE yüzeyinde elektron transferini engelleyen hiçbir faktör bulunmadığından $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunun pik akım değerleri maksimum olarak elde edilmiştir (siyah çizgi). Polimerizasyon işlemlerinden sonra, CKE yüzeyi elektron transferini önleyen polimerik bir film ile kaplandığından $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunun pik akım değeri gözlenememiştir (kırmızı çizgi). RIB molekülünün polimerik filmde uzaklaştırılmasından sonra, RIB'e özgü spesifik boşluklar oluştu ve $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunun pik akımı değeri, yalnız CKE'ninkinden daha düşük elde edilmiştir (mavi çizgi). Son olarak, RIB'in bilinen derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla elde edilen pik akımı değeri, polimerik film üzerindeki boşlukların kapanması nedeniyle hedef molekülün uzaklaştırılması sonrası elde edilen pik akımı değerinden daha düşük elde edilmiştir (yeşil çizgi). EIS ölçümlerinde Nyquist grafikleri ve yük aktarım direncindeki (R_{ct}) değişiklikler değerlendirildi (Şekil 3.1.B, Şekil 3.1.D ve Çizelge 3.1) ve aynı adımlar uygulandı. EIS sonuçlarına göre yalnız CKE yüzeyi elektron transferi kolay gerçekleştiği için en düşük R_{ct} değerlerine (siyah noktalar) sahiptir. Polimerizasyon sonrası CKE yüzeyinde polimerik filmlerin oluşması elektron transferini engellediğinden R_{ct} değerleri (kırmızı noktalar) en yüksek değere ulaşır. RIB molekülleri uzaklaştırıldıktan sonra MIP yüzeylerinde spesifik boşluklar oluşur ve elektron transferinin

gerçekleşmesiyle R_{ct} değerleri (mavi noktalar) düşer. Ancak RIB'nin yeniden bağlanmasıyla boşluklar kısmen dolar, elektron transferi zorlaşır ve R_{ct} değerlerinin (yeşil noktalar) yeniden yükselmesine neden olur. Bu, RIB moleküllerinin geliştirilen MIP sensörlerindeki belirli boşluklara seçici olarak bağlandığını gösterir.



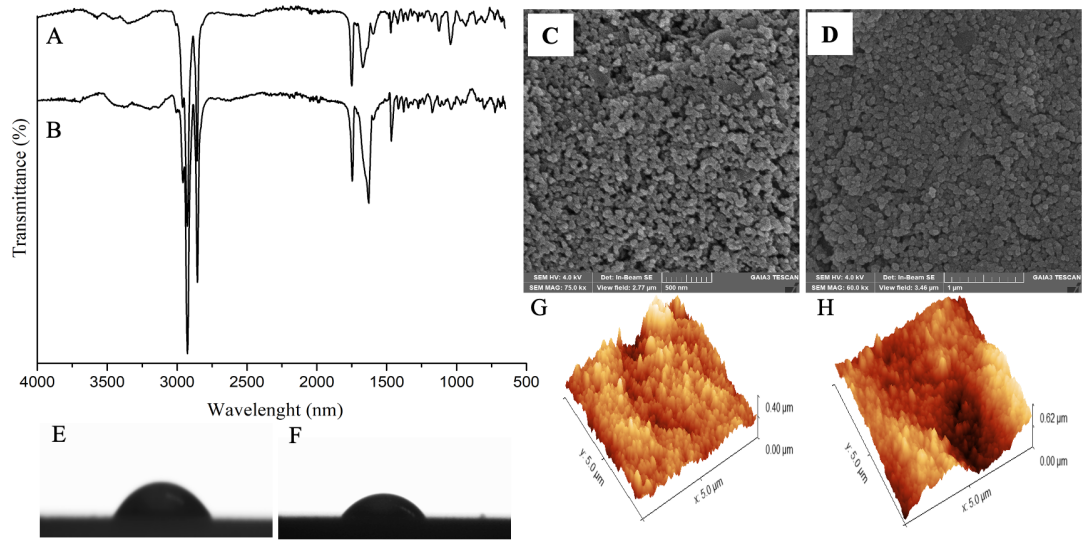
Şekil 3. 1. Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında (A) DV ve (B) EIS grafikleri; UraM/RIB@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında elde edilen (C) DV ve (D) EIS grafikleri.

Çizelge 3. 1. EIS ölçümlerinde elektronik eşdeğer devresinin elementlerine ait değerler

	EP			PP		
	R_p (Ω)	R_{ct} (Ω)	CPE	R_p (Ω)	R_{ct} (Ω)	CPE
Yalın CKE	89.60	145.84	0.836	104.0	321.0	0.889
Polimerizasyon sonrası	86.47	4805.3	0.847	103.0	7560.0	0.830
Hedef molekülün uzaklaştırılması sonrası	88.25	274.76	0.862	95.0	898.0	0.902
Hedef molekülün yeniden bağlanma sonrası	89.76	433.22	0.853	100.0	1240.0	0.915

3.1.1.2. Polimerik Filmlerin Yüzey Karakterizasyonu

Geliştirilen CKE yüzeylerinin karakterizasyonu, EIS ve DV dışında, taramalı SEM, AFM, FTIR ve temas açısı ölçümleri ile de incelenmiştir. FTIR, SEM, AFM ve temas açısı ölçümleri poli(Py-co-p-APBA) filminin oluşumunu doğruladı. Poli(Py-co-p-APBA)'nın FTIR spektrumları Şekil 3.2.A ve Şekil 3.2.B'de verilmiştir. FTIR spektrumunda 1597 ve 1470 cm^{-1} 'deki bantlar benzenoid halkalarının C=C gerilme titreşimlerine; 2815 ve 2927 cm^{-1} 'de görülen pikler aromatik C-H gerilme titreşimine; 3283 cm^{-1} 'deki pikler ise N-H gerilmesine ait bantlardır. Ek olarak, 1375 , 1177 ve 1042 cm^{-1} 'deki bantlar ise sırasıyla B-O gerilmesinden, B-O-H bükülmesinden ve B-O-H-deformasyonundan kaynaklanmaktadır; bu da boronik asit gruplarının filmlerin yüzeyine başarıyla dahil edildiğini göstermiştir. Poli(Py-co-p-APBA) filminin morfolojik bir çalışması SEM ile incelenmiştir (Şekil 3.2). MIP'da, boşlukların oluşumundan dolayı daha fazla boşlukla birlikte pürüzlü ve düzensiz yapılar görünmektedir. MIP elektrotu dar ve kümelenmiş parçacıklara sahipken, NIP elektrotu çok daha kalın parçacık boyutuna sahiptir, bu da polimerik filmin elektrot yüzeyinde başarıyla sentezlendiğini göstermiştir (Şekil 3.2.C ve Şekil 3.2.D). Şekil 3.2.C'de verilen polimerik filmin hidrofiliğini sağlamak için de temas açısı ölçümü yapılmıştır. MIP elektrot yüzeyinin temas açısı değeri 50.9° , NIP elektrot yüzeyinin temas açısı değeri ise 57.0° olarak bulunmuştur. Bu sonuç, elektrot yüzeyinde tanıma boşluklarının ve pürüzlülüğün oluşması nedeniyle MIP'in NIP'dan nispeten daha hidrofilik olduğunu göstermiştir (Şekil 3.2.E ve Şekil 3.2.F). Yıkama sonrasında MIP ve NIP için AFM görüntüleri alınmıştır. NIP'in AFM'si düzenli bir yapı sergilerken, MIP kümelenmenin hedef molekülün baskılanmasıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir (Şekil 3.2.G ve Şekil 3.2.H).

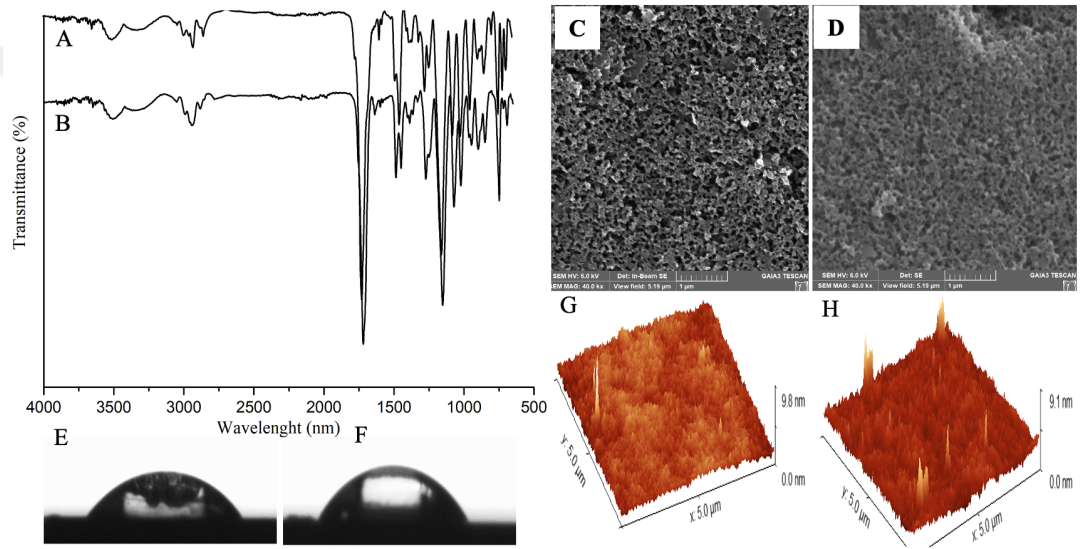


Şekil 3. 2. Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonları. (A) MIP ve NIP (B) NIP'in ATR-FTIR spektrumları; (C) MIP ve (D) NIP'nin SEM görüntüleri; (E) MIP ve (F) NIP'in temas açısı görüntüleri; (G) MIP ve (H) NIP'in AFM görüntüleri.

Poli(HEMA-UraM)'nin yüzey fonksiyonel gruplarının varlığı ATR-FTIR spektrumları ile doğrulanmıştır. Şekil 3.3'de sırasıyla C=O , -C-O-C ve -C-O titreşimlerine karşılık gelen, 1710, 1105 ve 1047 cm^{-1} 'deki bantlara sahip MIP filmlerinin FTIR spektrumlarını göstermektedir. Amit I, amid II ve amid III gerilme titreşimlerini gösteren 1619, 1440 ve 1268 cm^{-1} 'deki karakteristik bantlar, fonksiyonel grupların film yüzeyine başarılı bir şekilde dahil edildiğini göstermiştir. NIP polimerik filmi de ayrıca aynı fonksiyonel monomer olan UraM'ye sahip olması nedeniyle benzer bantlar sergilemiştir (Şekil 3.3.A ve Şekil 3.3.B). Polimerik filmin morfolojileri de SEM görüntüleriyle karakterize edilmiştir. Sonuçlar, hem MIP hem de NIP filminin gözenekliliğe sahip olduğunu açıkça göstermiştir; bu da PVP'nin varlığının malzemelerdeki mezo gözenekli yapıların oluşmasını sağlamıştır. Öte yandan MIP, polimerik film içindeki belirli boşlukların oluşumunu sağlayarak NIP'den daha iyi gözenek boyutu ve gözenek hacmine sahiptir (Şekil 3.3.C ve Şekil 3.3.D). Şekil 3.3.E ve Şekil 3.3.F'de verilen polimerik malzemelerin hidrofilik özelliklerini araştırmak için temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Temas açıları MIP ve NIP filmleri için sırasıyla 65.7° ve 68.1° olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar, MIP ve NIP filminin hidrofiliklik sergilediğini ve NIP'in, benzer fonksiyonel gruplara sahip olması nedeniyle MIP ile benzer hidrofobiklik gösterdiğini açıkça göstermektedir. 3 boyutlu görüntüden elektrot yüzeyinde oluşan MIP ve NIP filminin yüzey derinliğinin 9.8 ve 9.1 nm olduğu belirlendi.

Pürüzlülük yüzeyinin ortaya çıkmasının, elektrot yüzeyinde polimerik film oluşumunu başarıyla onayladığını göstermiştir (Şekil 3.3.G ve Şekil 3.3.H).

EP ve FP teknikleri için SEM ve AFM görüntüleri karşılaştırıldığında, sonuçlar FP'nin EP'ye kıyasla daha düşük bir kalınlığa sahip olmasının yanı sıra gözenekli bir yapı sağladığını göstermiştir. Bunun nedeni, polimerizasyondan sonra PVP'nin uzaklaştırılmasının polimer ağının yapısını değiştirmesi olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, FP ve EP arasındaki bu kalınlık farkı, polimerizasyon tekniğinin, başlatıcının, monomerin ve çapraz bağlayıcının seçiminden önemli ölçüde etkilendiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 3. 3. UraM/RIB@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonları. (A) MIP ve NIP (B) NIP'nin ATR-FTIR spektrumları; (C) MIP ve (D) NIP'nin SEM görüntüleri; (E) MIP ve (F) NIP'nin temas açısı görüntüleri; (G) MIP ve (H) NIP'nin AFM görüntüleri.

3.1.2. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

3.1.2.1. Monomer/Hedef Molekül Oranı

Monomer:hedef molekül oranının optimize edilmesi, kararlı ve verimli polimerik filmler üretmek için çok önemlidir. Polimerik filmlerin oluşumu doğrudan monomer ve şablon arasındaki etkileşimlerle ilişkili olduğundan optimal oranın belirlenmesi gerekir. Ayrıca moleküler baskılama tekniklerinde monomer:şablon oranı sensörlerin seçiciliğini de

geliştirebilir. Bununla birlikte, monomerin çok fazla kullanılması, kalıp için seçici olmayan bir elektrokimyasal reaksiyona neden olabilir ve bu da baskı bölgelerini bozabilir. Bu bağlamda EP ve FP ile hazırlanan polimerik filmler için farklı monomer:hedef molekül oranları (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1) kullanılmış ve uzaklaştırmadan sonra ve polimerizasyon sonrası elde edilen pik akımları arasındaki farklar hesaplanmıştır (Şekil 3.4.A ve Şekil 3.5.A). Hem EP hem de FP ile elde edilen ΔI değerlerine göre her iki sensör için de en verimli ve stabil polimeri sağlayan 1:1 oran optimum değer olarak seçilmiştir. Burada, RIB ile fonksiyonel monomerler (AFBA veya UraM) arasındaki olası etkileşimlerin, iyi eşleşmiş fonksiyonel gruplarla ilişkili olarak monovalent etkileşim yoluyla önceden tahmin edildiğini belirtmek gerekir. Başka bir deyişle fonksiyonel monomerler, mümkün olduğu kadar yüksek özgüllük ve seçicilik elde etmek amacıyla anahtar-kilit ilişkisi gibi tamamlayıcı bir yapı oluşturmak amacıyla yapısal özelliklerine göre seçilmiştir. Bu sonuçlar çalışmada uygulanan seçim kriterlerini açıkça doğrulamıştır.

3.1.2.2. EP Döngü Sayısı

EP yöntemi, dayanıklı ve kullanışlı bir polimerik film oluşturmak için çok önemlidir. Uygun monomerlerin ve oranların seçilmesinden sonra uygun kalınlık ve stabiliteye sahip bir polimer oluşturmak için 5, 10, 15, 20 ve 25 döngü ile DV yöntemi kullanılmıştır. Analiz, hedef molekülün uzaklaştırılma sonrası ve EP sonrası pik akımları arasındaki farklar üzerinden değerlendirilmiştir. 15 döngüden sonra pik akımları arasındaki fark azalmış ve bundan sonraki döngü sayılarında değişmeden kalmıştır. Sonuç olarak EP için en güvenilir ve kararlı döngü sayısı olarak 15 döngü kullanılmıştır (Şekil 3.4.B).

3.1.2.3. Damlatma Hacmi

CKE yüzeyine damlatılan polimerizasyon çözeltisinin hacmi, polimerik filmin kalınlığı ve polimer oluşum süreci ile doğrudan ilişkilidir ve optimize edilmesi gerekir. Bu nedenle elektrot yüzeyine farklı hacimlerde polimerizasyon çözeltisi (0,25, 0,5, 0,75, 1,0 ve 1,50 μL) damlatılmıştır ve UraM/RIB@MIPCKE sensörü için difüzyon sınırlaması, kalınlık ve iletkenlik açısından iyi bir polimerik film elde edecek şekilde optimize edilmiştir. Hedef molekülün uzaklaştırılma sonrası ve FP sonrası elde edilen pik akımları arasındaki farklar alınarak değerlendirilmiş ve optimum damlama hacmi 0,25 μL olarak elde edilmiştir (Şekil 3.5.B).

3.1.2.4. FP Süresi

UraM/RIB@MIP/CKE sensörü, dalga boyu ve güç yoğunluğu sırasıyla 365 nm ve 100 W olan bir UV lambası kullanılarak elde edilmiştir. FP süresi bir UV lambası altında optimize edilmesi, CKE yüzeyinde stabil bir polimerik film oluşturmaya sağlayacaktır. CKE yüzeyine 0,25 µL polimerizasyon çözeltisi damlatıldıktan sonra 5, 7, 10, 15 ve 20 dakika boyunca UV ışığına maruz bırakılmıştır. Daha sonra, hedef molekülün uzaklaştırıldıktan sonra ve FP'den sonra tepe akımlarındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır. Sensör hazırlama süresinin çok uzun olmadığı göz önüne alındığında optimum polimerizasyon süresi olarak 5 dakika seçilmiştir (Şekil 3.5.C).

3.1.2.5. Hedef Molekülün Uzaklaştırma Çözeltileri ve Uzaklaştırma Süresi

MIP filmlerinden hedef moleküllerinin polimerik filme zarar vermeden çıkarılması çok önemli bir adımdır. Bu adımda hedef molekül uzaklaştırıldıktan sonra spesifik boşluklar oluşturulur ve analit bu boşluklara kolayca bağlanır. Bu nedenle hem EP hem de FP için uygun uzaklaştırma çözeltileri seçilmiştir. EP için, Britton-Robinson tamponu (BRB, pH 9.0 için), PBS (pH 6.0, 7.0, 7.5 ve 8.0 için) ve bu tamponlarla birlikte hacimce 1:1 oranında sodyum klorür (NaCl, 0.25 M), metanol (MeOH), asetronitril (ACN) ve aseton test edilmiştir. Çözücülerin hedef molekülün uzaklaştırılması sonrası ve EP sonrası pik akımları arasındaki fark alınarak değerlendirilmiştir. Hedef molekülün uzaklaştırma işlemi üzerindeki etkiler incelendiğinde, pH 7.5 PBS kullanılarak elde edilen pik akımları diğer çözücülere göre daha yüksekti ve uzaklaştırma çözücüsü olarak seçilmiştir (Şekil 3.4.C). Uzaklaştırma çözeltisi olarak pH 7.5 PBS'yi seçtikten sonra, uzaklaştırma adımı için döngü sayısı da belirlenmelidir. Hedef moleküller, DV yöntemi kullanılarak 1, 3, 5, 7 ve 10 döngüyle çıkarılmıştır. Şekil 3.4.D'de görüldüğü gibi en iyi sonuç 5 döngüde elde edilmiştir ve tüm deneylerde kullanılan uzaklaştırma döngü sayısı adımı olarak seçilmiştir.

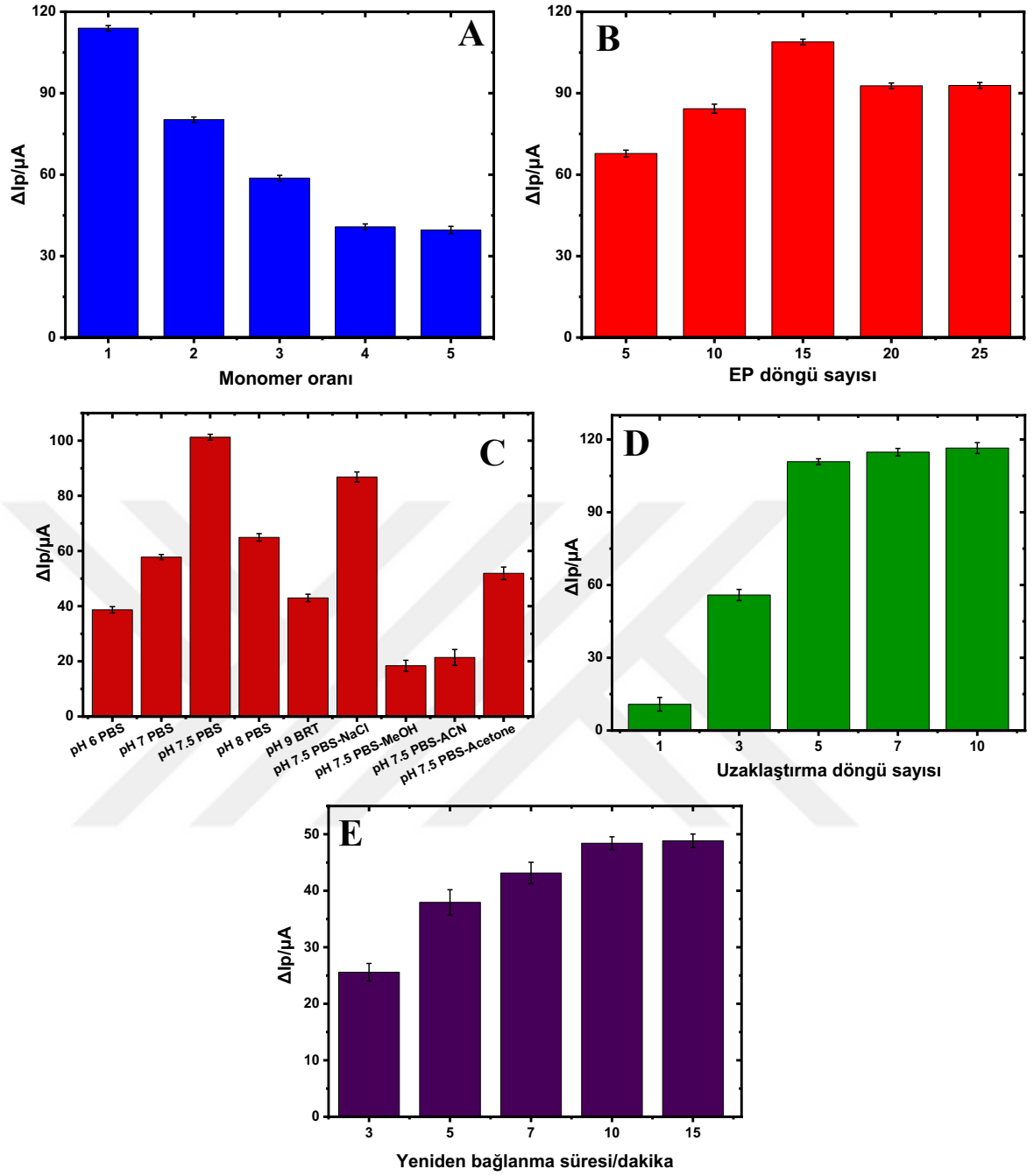
FP için HAc (5.0 M), MeOH, NaOH (1.0 M), HCl (1.0 M), aseton ve ACN içeren uzaklaştırma çözeltileri test edilmiştir ve en iyi uzaklaştırma çözeltisi olarak 5 M HAc belirlenmiştir (Şekil 3.5.D). Uzaklaştırma işleminde, 5.0 M HAc içerisine daldırılan modifiye sensör, bir ThermoShaker (500 rpm, 25°C) kullanılarak farklı sürelerde (5, 10, 15, 20 ve 25 dakika) inkübe edilmiştir. Uzaklaştırma süresi, hedef molekülün uzaklaştırma sonrası ve FP

sonrası pik akımları arasındaki fark alınarak değerlendirilmiştir. FP için en iyi uzaklaştırma süresi 15 dakika olarak seçilmiştir (Şekil 3.5.E).

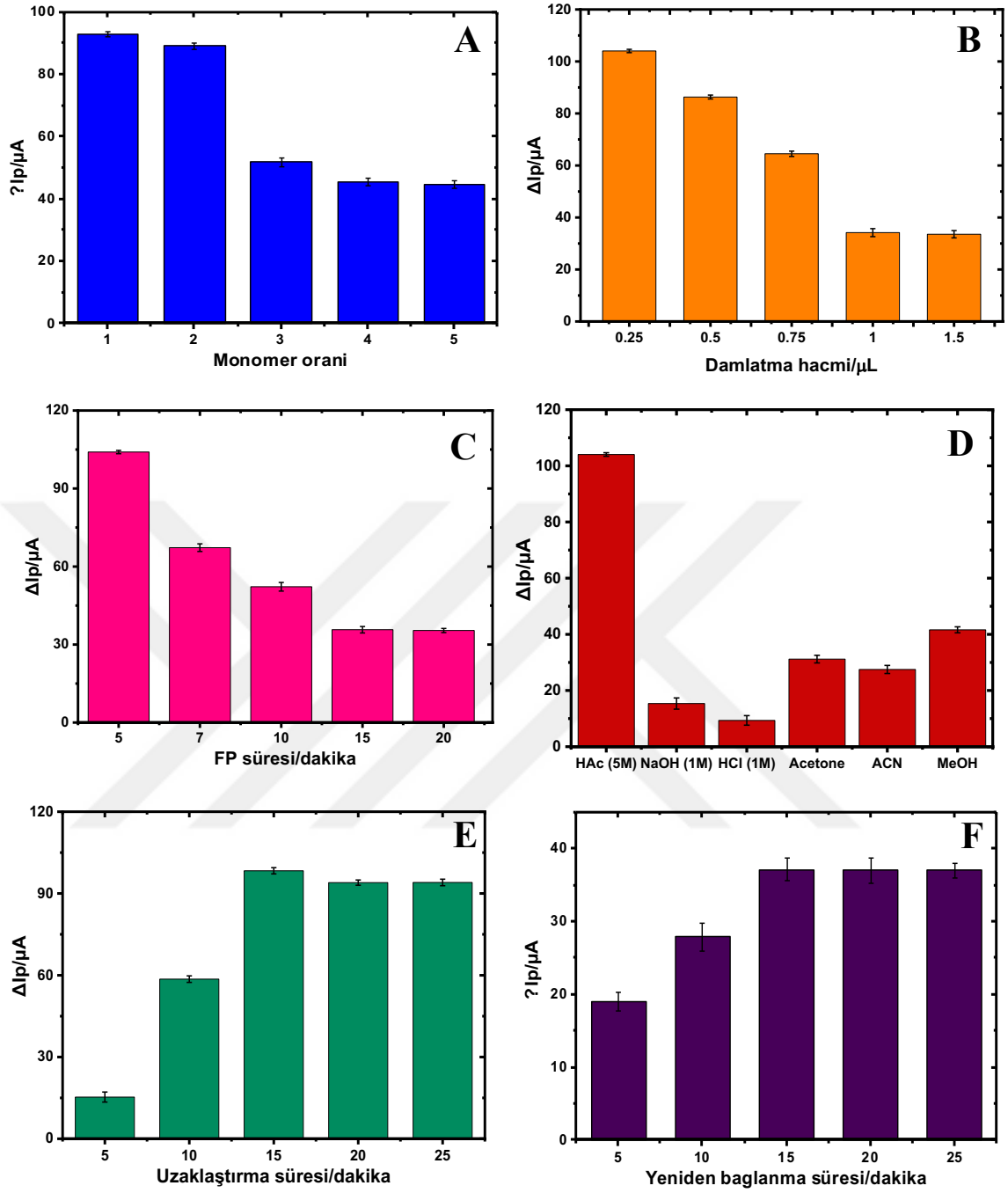
3.1.2.6. Hedef Molekülün Yeniden Bağlanma Süresi

Yeniden bağlama işlemi analiz süresini ve performansını belirleyen önemli bir parametredir. Bu nedenle EP için hazırlanan MIP tabanlı sensör, farklı zamanlarda (3, 5, 7, 10 ve 15 dakika) yeniden bağlanma üzerindeki etkisini değerlendirmek için 5.0×10^{-10} M RIB çözeltisine daldırılmıştır ve ThermoShaker (500 rpm, 25°C) kullanılarak incelenmiştir. Yeniden bağlanma ve uzaklaştırma sonrası pik akımları arasındaki fark değerlendirildiğinde 10. dakikada en yüksek değere ulaştıktan sonra ΔI 'nin hemen hemen aynı kaldığı görülmüştür. Bu nedenle Şekil 3.4.E'ye göre poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE sensörü için yeniden bağlanma süresi 10 dakika olarak seçilmiştir.

EP için izlenen adımların aynısı FP için de uygulanmıştır. FP için hazırlanan MIP tabanlı sensör, farklı zamanlarda (5, 10, 15, 20 ve 25 dakika) yeniden bağlanma üzerindeki etkisini değerlendirmek için 5.0×10^{-12} M RIB çözeltisine daldırılmıştır ve ThermoShaker (500 rpm, 25°C) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yeniden bağlanma ve çıkarma sonrasındaki pik akımları arasındaki fark hesaplanarak, stabil ve etkili bağlanma için en uygun yeniden bağlanma süresi bulunmuştur. Şekil 3.5.F'ye göre UraM/RIB@MIP/CKE sensörünün yeniden bağlanma süresi 15 dakika olarak seçilmiştir.



Şekil 3. 4. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltileri, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) RIB için yeniden bağlanma süresi.



Şekil 3. 5. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) damlatma hacmi, (C), FP süresi, (D) uzaklaştırma çözeltileri, (E) uzaklaştırma süresi, (F) RIB için yeniden bağlanma süresi.

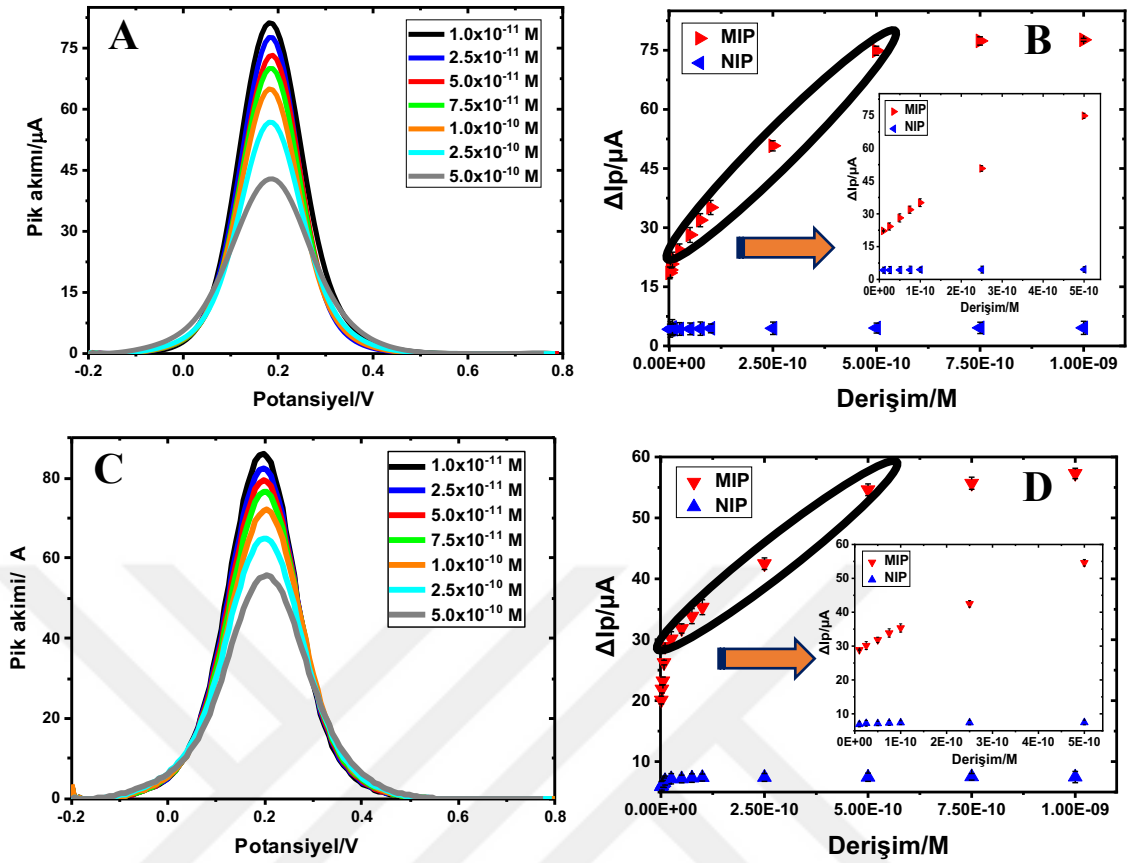
3.1.3. Poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE Sensörlerinin Analitik Performansının Değerlendirilmesi

Poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE'nin analitik performansı, 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks çözeltisinde DPV tekniği kullanılarak farklı RIB derişimlerinin yeniden bağlanmasıdan sonra değerlendirildi. Kalibrasyon grafiği farklı derişimlerdeki standart RIB çözeltileri ile oluşturulmuş ve 1.0×10^{-11} M ile 5.0×10^{-10} M arasında değişen derişimlerde doğrusallık aralığı elde edilmiştir. Poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE sensörü, RIB'ın belirlenmesi için $\Delta I (\mu\text{A}) = 1.10 \times 10^{11} C (\text{M}) + 21.15$ ($r = 0.996$) regresyon denklemiyle doğrusal bir yanıt göstermiştir. Bazı regresyon parametreleri Çizelge 3.2'de özetlenmiştir. Verilen derişim aralığında TS ve TAS değerleri sırasıyla 8.6×10^{-13} M ve 2.87×10^{-12} M olarak belirlenmiştir. TS ve TAS değerlerini hesaplamak için TS $\left(TS = 3x \frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}} \right)$ ve TAS $\left(TAS = 10x \frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}} \right)$ formülleri kullanılmıştır (Ozkan vd., 2015; "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology," 1995). Sonuçlar poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE sensörünün oldukça iyi bir duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Geliştirilen sensör, optimize edilmiş koşullar altında RIB tespiti için DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6.A). Poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE sensörün performansını doğrulamak amacıyla aynı derişim aralığında RIB'ı belirlemek için NIP tabanlı sensöre de uygulandı. NIP tabanlı sensör doğrusallık sergilemedi (Şekil 3.6.B) ve elde edilen kalibrasyon eğrileri birbirinden çok farklıdır. MIP eğrisi (kırmızı renk), RIB derişimine yanıt olarak ΔI 'de orantılı bir artışla doğrusal bir yanıt göstermiştir. Bununla birlikte, RIB'da NIP'a özgü boşluklar bulunmadığından, NIP eğrisi (mavi renk), MIP'a kıyasla ihmal edilebilir bir ΔI değeri sergilemiştir. Bu nedenlerden dolayı poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE sensörünün RIB tespiti için iyi hassasiyet ve seçicilik gösterdiği açıktır.

Çizelge 3. 2. Poli(Py-co-p-APBA)]/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin RIB için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreleri

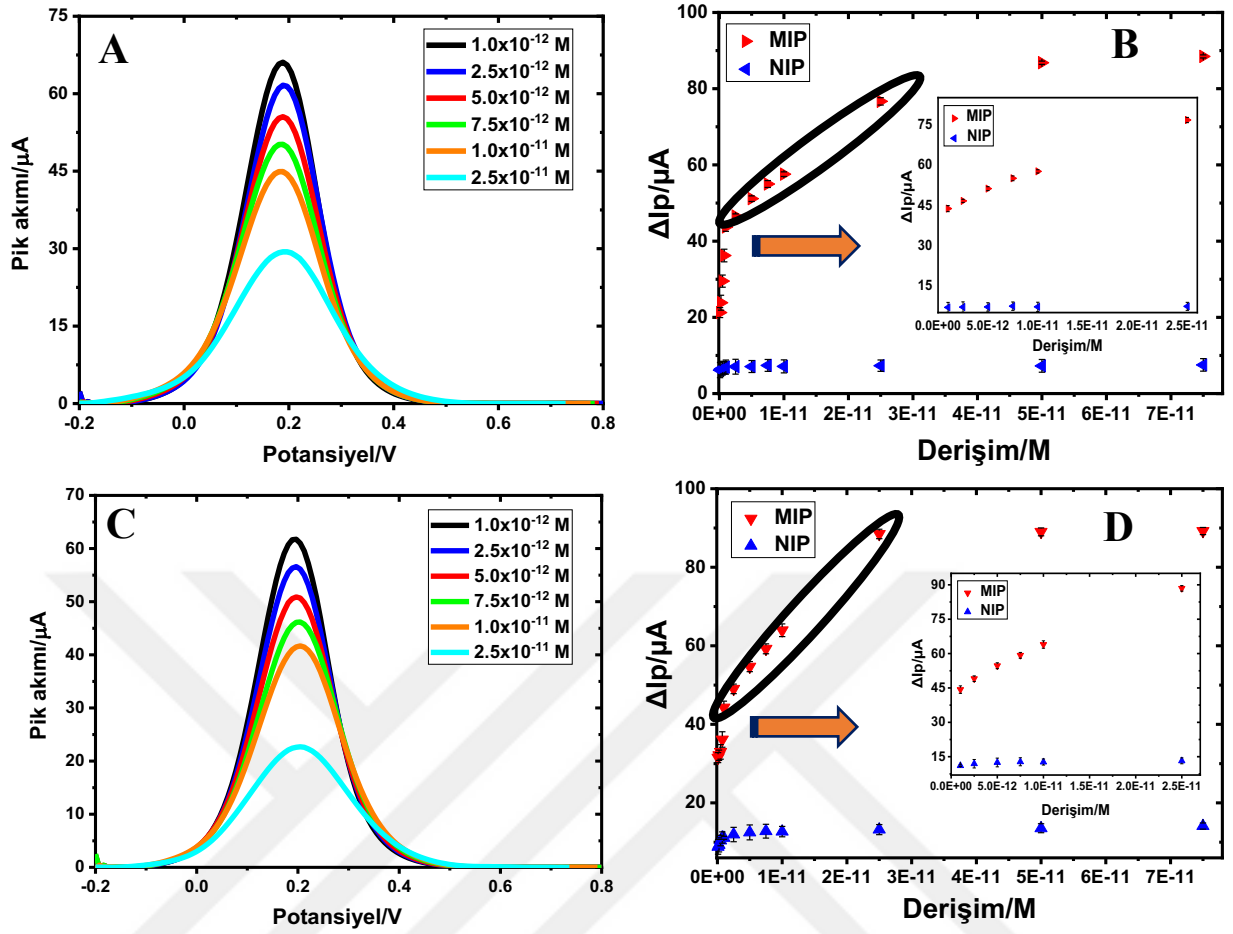
	EP		FP	
	Standart çözelti	Ticari serum	Standart çözelti	Ticari serum
Doğrusal çalışma aralığı (M)	$1.0 \times 10^{-11} - 5.0 \times 10^{-10}$	$1.0 \times 10^{-11} - 5.0 \times 10^{-10}$	$1.0 \times 10^{-12} - 2.5 \times 10^{-11}$	$1.0 \times 10^{-12} - 2.5 \times 10^{-11}$
Eğim ($\mu\text{A/M}$)	1.10×10^{11}	0.54×10^{11}	1.35×10^{12}	1.76×10^{12}
Eğimin standart hatası	3.02×10^9	1.78×10^9	5.57×10^{10}	6.81×10^{10}
Kesişim (μA)	21.15	28.46	43.74	45.03
Kesişimin standart hatası	0.20	0.160	0.56	0.85
Korelasyon katsayısı (r)	0.996	0.997	0.997	0.997
Teşhis sınırı (M)	8.6×10^{-13}	2.65×10^{-12}	2.63×10^{-13}	2.81×10^{-13}
Tayin alt sınırı (M)	2.87×10^{-12}	8.83×10^{-12}	8.77×10^{-13}	9.37×10^{-13}
Tekrarlanabilirlik BSS%)*	1.12	0.73	0.90	0.91
Tekrar üretilebilirlik (BSS%)*	1.70	1.49	1.76	1.86

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



Şekil 3. 6. (A) Standart çözeltide ve (C) ticari serum çözeltisinde farklı RIB derişimlerine sahip poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözeltide ve (D) ticari serum çözeltisinde poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve NIP/CKE ile RIB'in kalibrasyon eğrisi.

Optimum deneysel koşullar altında, DPV yöntemi ve $5.0 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak UraM/RIB@MIP/CKE'nin analitik performansı, $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ ile $2.5 \times 10^{-11} \text{ M}$ aralığındaki RIB derişimleri kullanılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2.). UraM/RIB@MIP/CKE sensörü, seçici ve hassas RIB belirlemesi için doğrusal bir yanıt göstermiştir (kırmızı renk) ve regresyon denklemi $\Delta I (\mu\text{A}) = 1,35 \times 10^{12} \text{ C (M)} + 43.74$ ($r = 0,997$) olarak bulunmuştur. TS ve TAS değerleri $2.63 \times 10^{-13} \text{ M}$ ve $8.77 \times 10^{-13} \text{ M}$ olarak hesaplanmıştır. Sensörün analitik performansı kontrol etmek ve seçiciliği değerlendirmek için NIP tabanlı sensor (mavi renk), RIB'nin aynı derişim aralığında uygulanmıştır. Şekil 3.7.A, artan RIB derişimlerine karşı $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pik akımı değerinin azaldığı görülmüştür. MIP ve NIP tabanlı sensörler için ΔI değerlerine karşı RIB derişimine karşılık kalibrasyon eğrileri Şekil 3.7.B'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 7. (A) Standart çözelti ve (C) ticari serum çözeltisinde farklı RIB derişimlerine sahip UraM/RIB@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözelti ve (D) ticari serum çözeltisinde UraM/RIB@MIP/CKE ve NIP/CKE ile RIB'in kalibrasyon eğrisi.

3.1.4. Kapsül Formuna ve Ticari Serum Numunelerine Uygulanması

Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE'nin fizibiliteleleri kapsül formları ve ticari serum numuneleri ile başarıyla uygulanmıştır. RIB'nin kapsül içindeki yardımcı maddelerden herhangi biriyle etkileşime girip girmediğini bulmak için, önceden analiz edilmiş çeşitli kapsül formülasyonlarına bilinen miktarlarda ilaç maddesi eklendikten sonra geri kazanım çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Geri kazanım çalışmalarının bulguları, önerilen prosedürlerin yeterli kesinliğe ve doğruluğa sahip olduğunu ve yaygın olarak kullanılan farmasötik yardımcı maddelerle herhangi bir etkileşimin olmadığını göstermiştir. (Çizelge 3.3).

Ticari serum numuneleri kullanılarak elde edilen DP voltammogramları ve kalibrasyon eğrileri EP ve FP için sırasıyla Şekil 3.6. ve Şekil 3.7'de verilmiştir. EP için poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE sensörünün optimum koşullardaki TS ve TAS değerleri sırasıyla 2.65×10^{-12} M ve 8.83×10^{-12} M olarak hesaplanmıştır. Sensör, doğrusal regresyon denklemi $\Delta I (\mu A) = 0.54 \times 10^{11} C(M) + 28.46 (\mu A)$ ($r = 0,997$) (Çizelge 3.2) dahilinde bu aralıkta bir RIB algılama olasılığı sergilemiştir. Ticari serum numuneleri için DPV verilerine dayanarak MIP tabanlı sensör, RIB derişimine göre orantılı bir ΔI artışıyla doğrusal bir yanıt göstermiştir, ancak NIP tabanlı sensör, MIP ile karşılaştırıldığında önemsiz bir ΔI değeri sergilemiştir.

Diğer bir yöntem olan FP, geliştirilen UraM/RIB@MIP/CKE sensörüne ilk olarak ticari serum numunelerinde belirli derişimlerde spike uygulanmış ve RIB tespiti için 1.0×10^{-12} M ve 2.5×10^{-11} M derişim aralığında analiz edilmiştir. MIP tabanlı ve NIP tabanlı sensörlerin DP voltammogramları ve kalibrasyon eğrileri ticari serum numuneleri için verilmiştir (Şekil 3.7.C ve Şekil 3.7.D). Çok iyi tekrarlanabilir değerler sergileyen UraM/RIB@MIP/CKE sensörünün TS ve TAS değerleri sırasıyla 2.81×10^{-13} M ve 9.37×10^{-13} M olarak bulunmuştur. Doğrusal regresyon denklemi $\Delta I (\mu A) = 1.76 \times 10^{12} C (M) + 45.03$ ($r = 0.997$) olarak elde edilmiştir. Kapsül formu ve ticari serum numuneleri için geri kazanım sonuçları sırasıyla %99.17 ve %101.09 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar UraM/RIB@MIP/CKE sensörünün gerçek numunelere başarıyla uygulandığını göstermektedir. Ayrıca her iki yöntem verileri student t testi ve F testi yönünden kıyaslandığında, elde edilen değerler teorik kabul edilen değerden küçük olduğundan her iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığından geliştirilen sensörlerin kullanılabilir olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3. 3. Kapsül formu ve serum numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçlar

	EP		FP	
	Kapsül form	Ticari serum	Kapsül form	Ticari serum
Eklenen miktar (mg)	200.000	-	200.000	-
Bulunan miktar (mg)*	201.649	-	199.426	-
BSS%	1.84	-	1.49	-
BH%	-0.82	-	0.29	-
Hesaplanmış t değeri	0.32			
Hesaplanmış F değeri	0.62			
Eklenen miktar (mg)	1.000	1.000	1.000	1.000
Bulunan miktar (mg)*	0.995	1.012	0.992	1.011
Geri kazanım (%)	99.55	101.18	99.17	101.09
BSS%	1.86	1.56	1.15	1.75
BH%	0.45	-1.18	0.83	-1.09

*Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5'tir. Teorik student-t ve F değerleri sırasıyla 2.13 ve 6.26'dır.

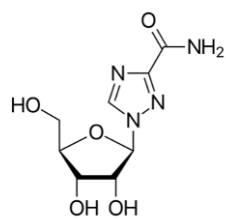
3.1.5. Geliştirilen Sensörlerin Seçicilik Çalışmaları

MIP'lerin etkinliğini değerlendirmek için önemli bir parametre olan seçicilik çalışması, diğer benzer moleküllerin uzaklaştırıldıktan sonra RIB'e uygun boşluklara afinitesi olarak değerlendirildi. Bu amaçla molnupiravir (MOL), lamivudin (LAM), zidovudin (ZID), zalsitabin (ZAL) ve emtrisitabin (EMT) gibi yapısal ve kimyasal olarak benzer bileşikler kullanılmıştır. Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin seçicilikleri de DPV ölçümleri kullanılarak araştırılmıştır. Seçicilik katsayısı (k), $k = \frac{\text{mevcut değer şablonu/mevcut değer-rakip}}{\text{mevcut değer}}$ olarak tanımlandı ve RIB için bulunan seçiciliğin (k') daha büyük olduğunu bulundu; bu da diğer bileşiklerle karşılaştırıldığında MIP'in hedef molekül RIB ile oldukça iyi bağlanma eğilimlerine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, EP için elde edilen k' değerlerine göre RIB baskılı sensör MOL, LAM, ZID, ZAL ve EMT moleküllerine sırasıyla 4.38, 6.10, 6.72, 5.99 ve 6.58 kat seçiciyken, FP için elde edilen k' değerlerine göre RIB baskılı sensör MOL, LAM, ZID, ZAL ve EMT moleküllerine sırasıyla 4.5, 7.13, 6.82, 6.88 ve 7.07 kat daha seçici olduğu bulunmuştur. Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE, NIP yüzeylerine kıyasla RIB'e karşı MOL, LAM, ZID, ZAL ve

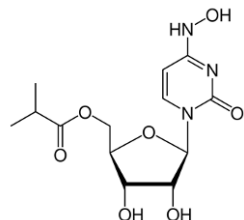
EMT'den daha fazla seçicilik göstermiştir (Çizelge 3.4). Ayrıca UraM/RIB@MIP/CKE sensörü, RIB için poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE sensöründen daha yüksek seçicilik değerleri sergilemiştir. Bu durum UraM/RIB@MIP/CKE sensörü ile hazırlanmış yüzeyin daha ince ve gözenekli yapılardan oluştuğu sonucuna varılmıştır.



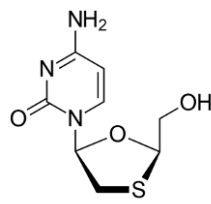
Çizelge 3. 4. RIB ve benzeri ilaç maddelerinin seçicilik değerleri



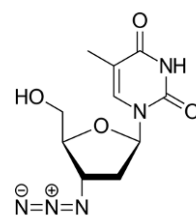
RIB



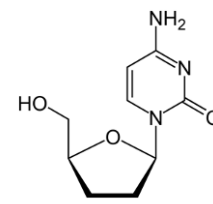
MOL



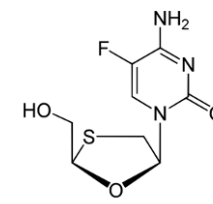
LAM



ZID



ZAL

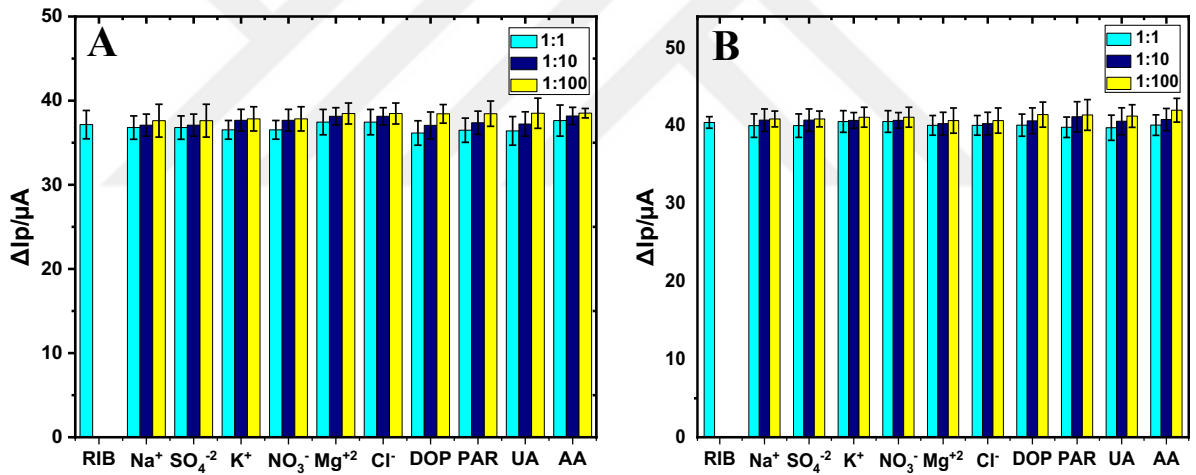


EMT

EP						PP				
MIP/CKE			NIP/CKE			MIP/CKE		NIP/CKE		
Etken Madde	$\Delta I/\mu A$	$k_{(MIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(NIP)}$	$k'_{(MIP/NIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(MIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(NIP)}$	$k'_{(MIP/NIP)}$
RIB	31.90	-	4.53	-	-	54.98	-	7.61	-	-
MOL	14.01	2.28	8.65	0.52	4.38	18.25	3.01	12.34	0.62	4.85
LAM	7.58	4.21	6.59	0.69	6.10	11.17	4.92	11.00	0.69	7.13
ZID	7.42	4.30	7.06	0.64	6.72	12.21	4.50	11.47	0.66	6.82
ZAL	7.73	4.13	6.59	0.69	5.99	10.23	5.37	9.79	0.78	6.88
EMT	6.83	4.67	6.38	0.71	6.58	10.81	5.09	10.52	0.72	7.07

3.1.6. İnterferans Çalışmaları

Yapısal olarak benzer kimyasal yapıli moleküllele karşı seçicilik çalışmalarıının yanı sıra, MIP tabanlı sensörlerin performansı biyolojik sıvılarda bulunan K^+ , Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} , dopamin (DA), askorbik asit (AA), ürik asit (UA) ve parasetamol (PAR) gibi diğler bazı bileşiklerden de etkilenebilir. Seçicilik testi için poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerindeki RIB derişimleri sırasıyla 7.5×10^{-11} M ve 7.5×10^{-12} M olarak kullanılmıştır. %BSS ve %geri kazanım değlerleri, 100 kat daha fazla etkileşim maddesinin varlığında belirlenmiş ve poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörleri için BSS değlerleri sırasıyla ≤ 1.85 ve ≤ 1.97 olarak bulunmuştur. Ayrıca MIP tabanlı sensörlerin geri kazanım değlerleri sırasıyla %97.32-103.62 ve %98.47-103.89 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.8). Bu sonuçlar, interferans ajanların varlığında RIB tespiti için geliştirilen sensörlerin performansını önemli ölçüde etkilemediğini ortaya koymuştur.



Şekil 3. 8. (A) poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE; (B) UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin 1:1, 1:10 ve 1:100 oranında girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen çubuk grafikleri.

3.1.7. Stabilitite

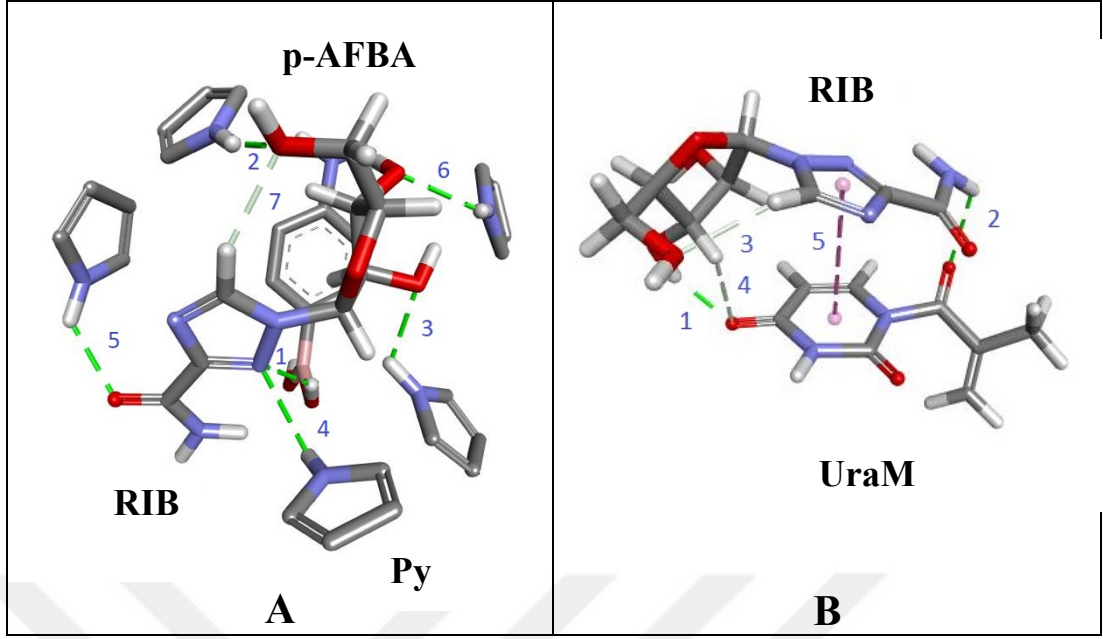
Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin tekrarlanabilirliğini belirlemek için kesinlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE için sensörün tekrarlanabilirliği üç farklı (2.5×10^{-11} M, 7.5×10^{-11}

M ve 2.5×10^{-10} M) derişimler ile tekrar edilebilir 5 sonuç elde edilerek hesaplanmıştır. UraM/RIB@MIP/CKE sensörü için ise hassasiyetinin iyi olmasından dolayı daha düşük derişimler denenmiştir. 2.5×10^{-12} M, 7.5×10^{-12} M ve 2.5×10^{-11} M gibi düşük derişimler kullanılarak UraM/RIB@MIP/CKE sensörün tekrar edilebilirliği belirlenmiştir. Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörleri için %BSS değerleri sırasıyla ≤ 1.23 ve ≤ 0.27 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin elektrotlar arası tekrar edilebilirliği 2.5×10^{-12} M RIB için test edilmiştir. 5 farklı elektrotun yanıtı değerlendirilerek sensörlerin %BSS değerleri hesaplanmıştır. UraM/RIB@MIP/CKE sensörüyle hazırlanan polimerik filmin %BSS değeri 0.49 elde edilirken, poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE sensörü kullanıldığında ise %BSS değeri 1.72 olarak hesaplanmıştır. Her iki sensör kıyaslandığında UraM/RIB@MIP/CKE ile geliştirilen sensörün oldukça iyi performans sergilediği görülmüştür.

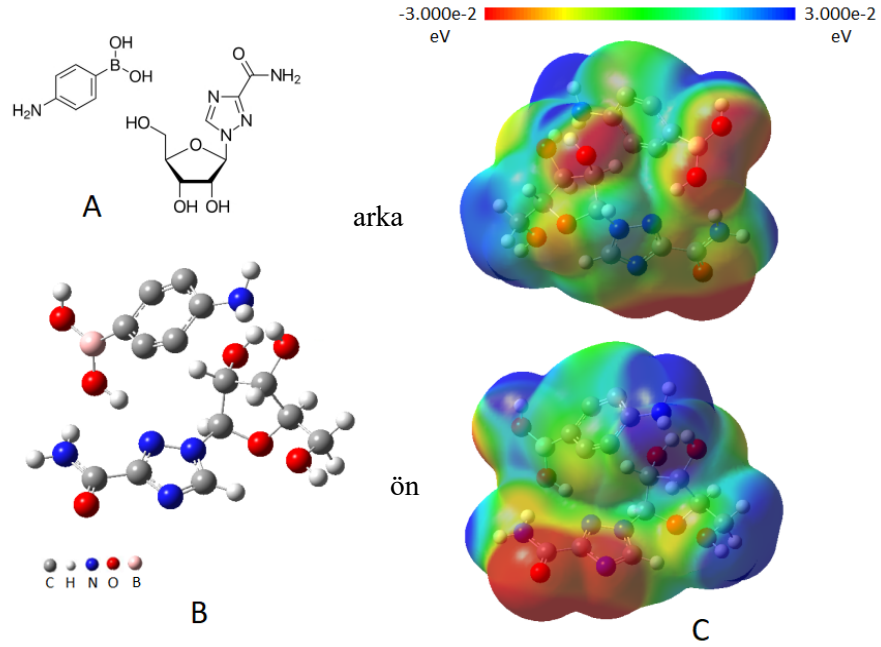
Geliştirilen Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerin stabilitesini değerlendirmek için 1., 3., 5., 7., 10. ve 15.güne kadar elektrotlar desikatörde saklandı. Polimerizasyon sonrası pik akımı değerleri okunarak elektrotların performansları hesaplandı. Stabilitate çalışmaları sonucunda poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE yöntemiyle geliştirilen sensörün 3 gün, UraM/RIB@MIP/CKE sensörün ise 7 gün stabil kalmıştır. Bu verilere göre RIB için FP kullanılarak geliştirilen sensörün daha iyi stabiliteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

3.1.8. Kuantum Kimyasal Hesaplamalar

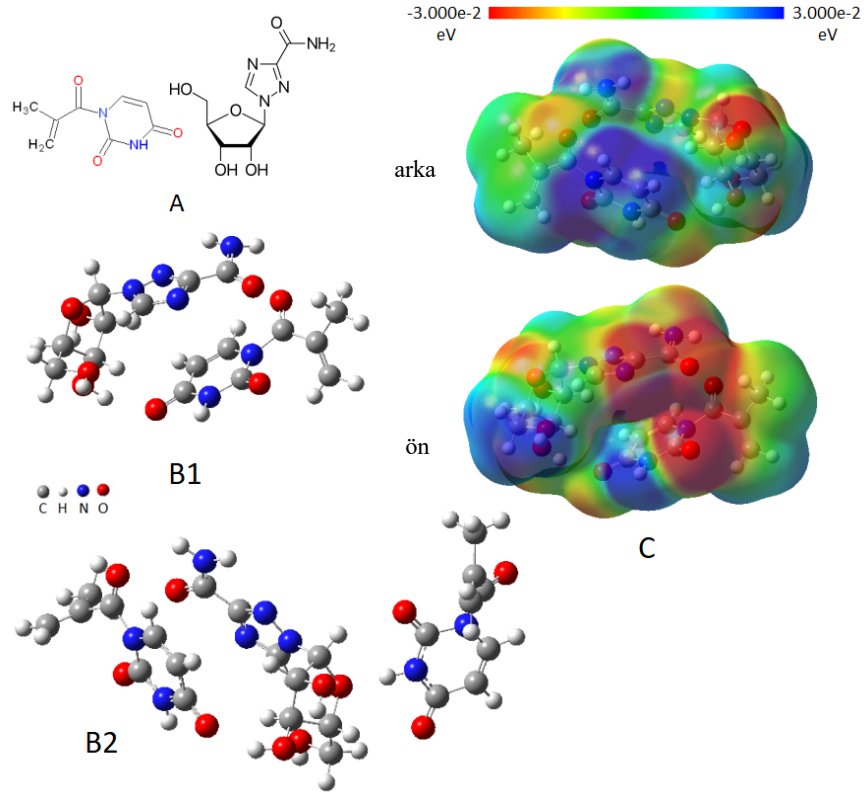
Poli(Py-co-p-AFBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörlerinin kuantum kimyasal hesaplamalar sonucunda hedef molekül: monomer oranı bulunmuştur. RIB-p-AFBA çiftinin Py ile kuantum kimyasal hesaplamaları, yapıya en fazla 5 Py molekülünün eklenebileceğini ve RIB ile p-AFBA oranının ise 1:1 olduğu bulunmuştur (Şekil 3.9.A ve Şekil 3.10), bu da deneysel sonuçları doğrulamaktadır (Şekil 3. 4A). Ayrıca, RIB-UraM formunun optimum oranı da 1:1 olarak hesaplandı (Şekil 3.9.B ve Şekil 3.11) ve bu da yapılan deneysel çalışmaları doğrulamıştır (Şekil 3.5.A). (RIB-UraM; 1:1, $E = -42178.048129$ eV; 1:2, $E = -59702.037118$ eV). Ek olarak elde edilen enerji hesaplamalarına göre stabilitedeki 1:2'lik bir artışın RIB çözünürlüğünü azalttığını göstermektedir ki bu da istenmeyen bir durumdur. Kararlılık arttığında hedef molekülün uzaklaştırılması zor olacağından sensör performansını etkileyecektir.



Şekil 3. 9. A) Altı geleneksel hidrojen bağı ve bir karbon hidrojen bağı {(Uzaklık, Å; Açıl, DHA,°): 1- 2.015, 143.410; 2- 1.724, 162.896; 3- 2.188, 118.312; 4- 2.677, 95.041; 5- 2.199, 131.491; 6- 2.374, 118.452; 7- 2.365, 145.878}. B) İki geleneksel hidrojen bağı, iki karbon hidrojen bağı ve bir pi-pi yığılması {(Uzaklık, Å; Açıl, DHA,°): 1- 1.929, 153.835; 2- 2.471, 120.068; 3- 2.361, 135.702; 4- 2.699, 103.426; 5- 4.546, }.



Şekil 3. 10. A) Kimyasal yapısı, B) RIB-4-AFBA'nın optimize edilmiş yapısı {E(RB3LYP)= -1368.095919 Hartree (-37227.783361 eV)} ve C) elektrostatik potansiyel (ESP) harita (a.u., atom birimi).



Şekil 3. 11. A) Kimyasal yapısı, RIB-UraM'nin optimize edilmiş yapıları B1) RIB-UraM (1:1), {E(RB3LYP)= -1550.014809 Hartree (-42178.048129 eV)} ve B2) RIB-UraM (1:2) {E(RB3LYP)= -2194.009580 Hartree -59702.037118 eV)} yapılarına ait enerji seviyeleri

3.2. MOL Etken Maddesine Ait Bulgular

3.2.1. Polimerik Filmlerin Karakterizasyonu

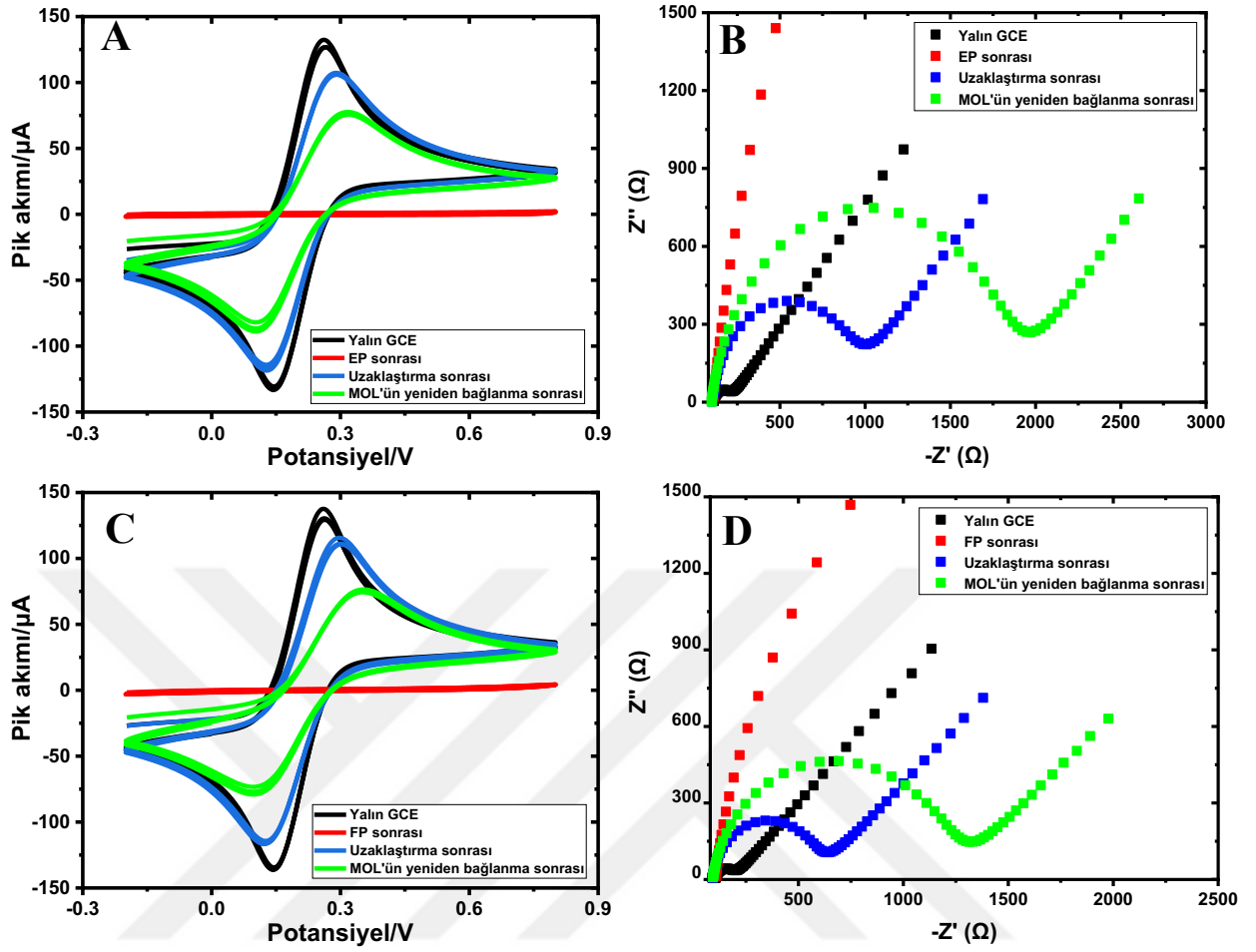
3.2.1.1. Elektrokimyasal Karakterizasyonları

Hazırlanan MIP temelli CKE yüzeylerinin iletkenlik ve yük transfer özelliklerinin incelenmesi için elektrokimyasal karakterizasyonlardan yararlanılmalıdır. Burada DV ve EIS, yalın ve modifiye elektrot yüzeylerindeki elektron transfer süreçlerini tam olarak ortaya çıkarmak için en etkili ve önemli tekniklerdir. Sonuç olarak her ikisi de, elektrokimyasal karakterizasyon için redoks probu görevi gören 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde ölçümler gerçekleştirmek için kullanılmıştır.

İlk olarak, yalın CKE, poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörleri üzerinde DV ölçümleri (polimerizasyondan sonra, MOL

uzaklaştırıldıktan sonra ve yeniden bağlandıktan sonra) gerçekleştirildi (Şekil 3.12.A. ve Şekil 3.12.C.). Redoks probunun en büyük pik akım değerlerinin (siyah çizgi), yüzeyde polimerik bir kaplamanın bulunmamasından dolayı yalnız CKE'lere karşılık geldiği bulunmuştur. Öte yandan CKE yüzeyinde aktif ve verimli elektron göçünü engelleyen yalıtkan bir polimerik kaplamanın oluşması, polimerizasyon sonrasında redoks probunun pik akım değerlerinin (kırmızı çizgi) ortaya çıkmasını engellemiştir. MOL'un uzaklaştırılmasının ardından MIP filminin yapısında özel bağlanma boşlukları meydana geldiğinden redoks probunun pik akım değerlerinin (mavi çizgi) arttığı görülmüştür. Redoks probunun pik akım değerleri (yeşil çizgi), MOL'un yeniden bağlanması bir sonucu olarak beklendiği gibi azalma gözlenmiştir.

Aynı prosedürler, EIS ölçümlerinde Nyquist grafiklerini ve yük aktarım direncindeki (R_{ct}) değişiklikleri analiz etmek için de kullanılmıştır (Şekil 3.12.B, Şekil 3.12.D ve Çizelge 3.5). EIS verileri, yalnız CKE yüzeyinin (siyah noktalar), elektron iletiminin kolay olması nedeniyle en düşük R_{ct} değerlerine sahip olduğunu göstermektedir. Polimerizasyon sonrasında CKE yüzeyinde elektron taşınmasını engelleyen polimerik kaplamalar olduğundan R_{ct} değerleri (kırmızı noktalar) en büyük değere ulaşır. MOL molekülleri uzaklaştırıldığında MIP yüzeylerinde özel boşluklar oluşur ve elektron transferi gerçekleştiğinde R_{ct} değerleri (mavi noktalar) düşer. Ancak MOL'un yeniden bağlanmasından sonra boşluklar kısmen dolar, elektron taşınması zorlaşır ve R_{ct} değerleri (yeşil noktalar) yeniden artar. Bu, MOL moleküllerinin tasarlanan MIP sensörlerindeki yalnızca belirli boşluklara bağlandığını göstermektedir.



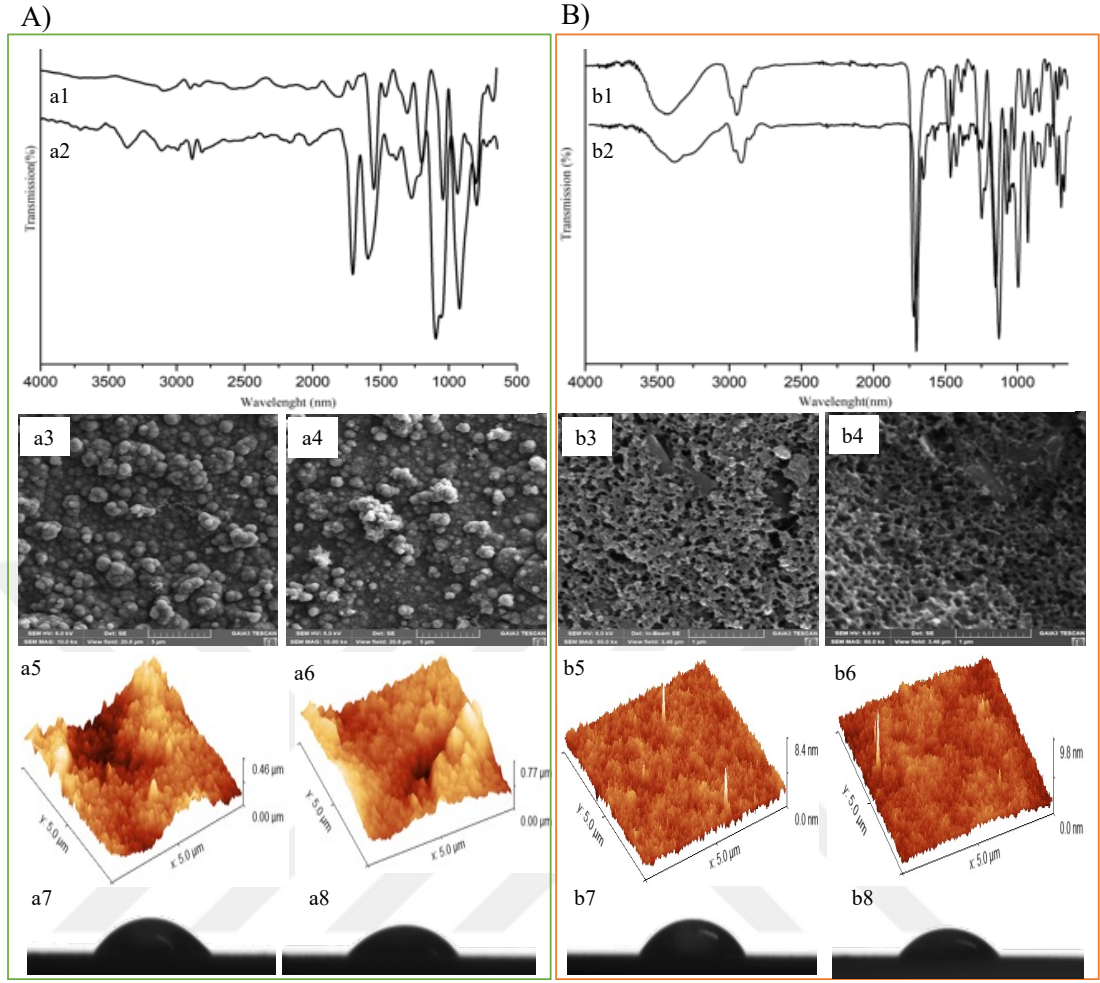
Şekil 3. 12. Poli(Py-co-p-3-TBA)]/MOL@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında (A) DV ve (B) EIS grafikleri; GuaM/mOL@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında elde edilen (C) DV ve (D) EIS grafikleri.

Çizelge 3. 5. EIS ölçümlerinde elektronik eşdeğer devresinin elementlerine ait değerler

	EP			FP		
	R_p (Ω)	R_{ct} (Ω)	CPE	R_p (Ω)	R_{ct} (Ω)	CPE
Yalın CKE	110.0	102	0.872	102.0	93.8	0.867
Polimerizasyon sonrası	105.0	22000	0.877	101.0	7510	0.877
Hedef molekülün uzaklaştırılması sonrası	103.0	825	0.917	90.7	517	0.909
Hedef molekülün yeniden bağlanma sonrası	99.2	1740	0.890	90.6	1160	0.869

3.2.1.2. Polimerik Filmlerin Yüzey Karakterizasyonu

Geliştirilen sensörlerin karakterizasyon sonuçları Şekil 3.13'de detaylı bir şekilde verilmiştir Şekil 3.13.a1'de NIP filminin ATR-FTIR spektrumları görülmektedir. 3110 ve 2910 cm^{-1} 'de gözlenen bantlar sırasıyla aromatik tiyofen halkasının aromatik C-H gerilme bandına ve N-H gerilmesine aittir. 1630, 1381, 1183 ve 1049 cm^{-1} civarındaki bantlar sırasıyla tiyofenoidin C=C gerilmesinin, B-O gerilmesinin, B-O-H bükülmesinin ve 3-TBA için B-O-H- deformasyonunun tipik özellikleridir. Öte yandan, Şekil 3.13.a2, MIP için polimerizasyon sonrası hedef molekülden kaynaklanabilecek O-H ve C=O bağlarına karşılık gelen 3335 cm^{-1} ve 1744 cm^{-1} 'deki güçlü bantları göstermektedir; bu, NIP ve MIP temelli elektrokimyasal sensör filmlerinin başarılı bir şekilde üretildiğini gösterir. Şekil 3.13.b1'de MIP filmlerinin FTIR spektrumunda 1070, 1154 ve 1723 cm^{-1} 'de gözlenen bantlar sırasıyla -C-O, -C-O-C ve -C=O gerilmesine karşılık gelmektedir. Am I, II ve III bantları yaklaşık 1594, 1486 ve 1273 cm^{-1} 'de görüldü, bu da GuaM'ın polimerik ağa başarılı bir şekilde entegre edildiğini göstermektedir. 1680 cm^{-1} 'de gözlenen bant, MIP'de NIP'e göre hedef molekülün varlığından kaynaklanabilecek şekilde farklıydı (Şekil 3.13.b2). Şekil 3.13.a3'te gösterildiği gibi, MIP filmi yoğun ve düzensiz bir yapı sergilemiştir. Ayrıca NIP'in SEM görüntülerinin de benzer şekillere sahip olduğu görülmektedir ve bu da aynı koşullar altında sentezlendiklerinden beklenen bir durumdur. Öte yandan, PP işlemleriyle sentezlenen elektrotlarda (Şekil 3.13.b3 ve 3.13.b4), EP işlemleriyle sentezlenen elektrotla karşılaştırıldığında poroz yapıcı ajan PVP maddesinin uzaklaştırılmasıyla gözenekli yapılar oluşmuştur. Şekil 3.13.a5, 3.13.a6, 3.13.b5 ve 3.13.b6 geliştirilen sensörlerin tipik AFM görüntülerini göstermektedir. MIP ve NIP yüzeyleri için yüzey derinlikleri EP için 0.46 μm ve 0.77 μm , FP için ise sırasıyla 8.4 nm ve 9.8 nm olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, film oluşumunun başarılı bir şekilde elde edildiğini ve ayrıca SEM görüntülerinin sonuçlarına iyi bir şekilde desteklendiğini göstermiştir. Ayrıca bu sonuçlar, PP ile karşılaştırıldığında polimerizasyon döngüleri nedeniyle EP ile sentezlenen elektrotlar için yüzey pürüzlülüğünün arttığını doğrulamaktadır. Temas açısı ölçümü Şekil 3.13.a7, 3.13.a8, 3.13.b7, ve 3.13.b8'de gösterilmiştir. EP ile sentezlenen elektrot üzerinde elde edilen temas açısı değerleri MIP ve NIP için sırasıyla 60.5 ve 65.0°, FP ile sentezlenen temas açısı değeri ise MIP ve NIP için sırasıyla 70.5° ve 72.8° olarak bulunmuştur. MIP filmi, MIP'lerin tanıma boşluklarının karakterinden dolayı NIP'den nispeten daha yüksek bir hidrofiliklik sergilemiştir.



Şekil 3. 13. Poli(Py-co-p-3-TBA)]/MOL@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonları (A), GuaM/MOL@MIP/CKE sensörünün yüzey karakterizasyonları (B). MIP (a1, b1) ve NIP (a2, b2)'nin ATR-FTIR spektrumları; MIP (a3, b3) ve NIP (a4, b4)'in SEM görüntüleri; MIP (a5, b5) ve NIP (a6, b6)'in AFM görüntüleri; MIP (a7, b7) ve NIP (a8, b8)'in temas açısı görüntüleri.

3.2.2. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

3.2.2.1. Monomer/Hedef Molekül Oranı

Kararlı ve etkili polimerik filmler oluşturmak için monomer:hedef molekül oranı optimize edilmelidir ve ideal oran belirlenmelidir. Çünkü monomer ile hedef molekül arasındaki etkileşimler, polimerik filmlerin nasıl geliştiğini doğrudan etkilemektedir. Monomer:hedef molekül oranı aynı zamanda moleküler baskılama tekniklerinde sensörlerin seçiciliğini de arttırmaktadır. Ancak monomerin aşırı kullanımı hedef molekül için seçici

olmayan bir elektrokimyasal reaksiyona yol açabilir ve bu da baskılama bölgelerinin bozulmasına neden olabilir. Bu durumda EP ve FP ile yapılan polimerik filmler için çeşitli monomer: hedef molekül oranları (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1) kullanılmıştır ve hedef molekülün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen pik akımı değerleri ile FP sonrasında elde edilen pik akımı değerleri farkı alınarak hesaplanmıştır (Şekil 3.14.A ve Şekil 3.15.A). En etkili ve stabil polimerleri elde etmek amacıyla monomer:hedef molekül oranı, hem EP hem de FP ile elde edilen ΔI değerlerine dayalı olarak her iki sensör için en iyi değer olan 1:1 oranı seçilmiştir. MOL ve fonksiyonel monomerler (3-TBA veya GuaM) arasındaki iyi eşleşmiş fonksiyonel grupların potansiyel etkileşimleri, en yüksek düzeyde özgüllük ve seçicilik elde etmek amacıyla anahtar-kilit ilişkisine benzer tamamlayıcı bir yapı oluşturmak üzere yapısal özellikleri dikkate alınarak seçilmiştir. Bu bulgular çalışmanın seçim kriterlerini açıkça desteklemiştir.

3.2.2.2. EP Döngü Sayısı

EP işlemi sağlam ve pratik bir polimerik film üretmek için gereklidir. Uygun monomerlerin ve oranların seçilmesinin ardından istenen kalınlık ve stabiliteye sahip bir polimer elde etmek için DV tekniği kullanılarak 5, 10, 15, 20 ve 25 döngü sayıları ile üretilmiştir. En iyi ve tekrar edilebilir döngü sayısını belirlemek için, hedef molekülün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen pik akımı değerleri ile FP sonrasında elde edilen pik akımı değerleri farkı alınarak değerlendirilmiştir. Pik akımları arasındaki fark 10 döngüde maksimum değere ulaşmış ve 20 döngüden sonra değişmeden kalmıştır. Bu nedenle EP için en güvenilir ve etkili döngü sayısı 10 döngü olarak belirlenmiştir (Şekil 3.14.B).

3.2.2.3. Damlatma Hacmi

MIP filminin stabilitesi ve kalınlığı aynı zamanda CKE yüzeyine damlatılan monomer çözeltisinin miktarından da etkilenir. Ayrıca aşağıda da değinileceği gibi polimerizasyon işleminin süresi açısından da önemli kriterlerden biridir. Burada 0,25 ile 1,50 μL arasındaki farklı hacimler kullanılarak damlatma hacmi miktarı değerlendirilmiş ve hedef molekülün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen pik akımı değerleri ile FP sonrasında elde edilen pik akımı değerleri farkı alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen pik akım değerlerine göre en iyi damlatma hacmi miktarı 0,25 μL olarak bulunmuştur (Şekil 3.15.B).

3.2.2.4. FP Süresi

Poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE sensörünü oluşturmak için sırasıyla 365 nm ve 100 W dalga boyu ve güç yoğunluğuna sahip bir UV lambası kullanıldı. UV lambası altında FP süresi optimize edilerek CKE yüzeyinde stabil bir polimerik film oluşturuldu. CKE yüzeyine 0,25 µL polimerizasyon çözeltisi damlatıldıktan sonra 5, 7, 10, 15 ve 20 dakika boyunca UV ışığına maruz bırakılmıştır. En iyi FP süresi, hedef molekülün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen pik akımı değerleri ile FP sonrasında elde edilen pik akımı değerleri arasındaki farklar hesaplanarak belirlenmiştir. İyi tekrarlanabilir ve stabil polimerizasyonun 5. dakika'da sağlanabileceği bulunmuştur (Şekil 3.15.C).

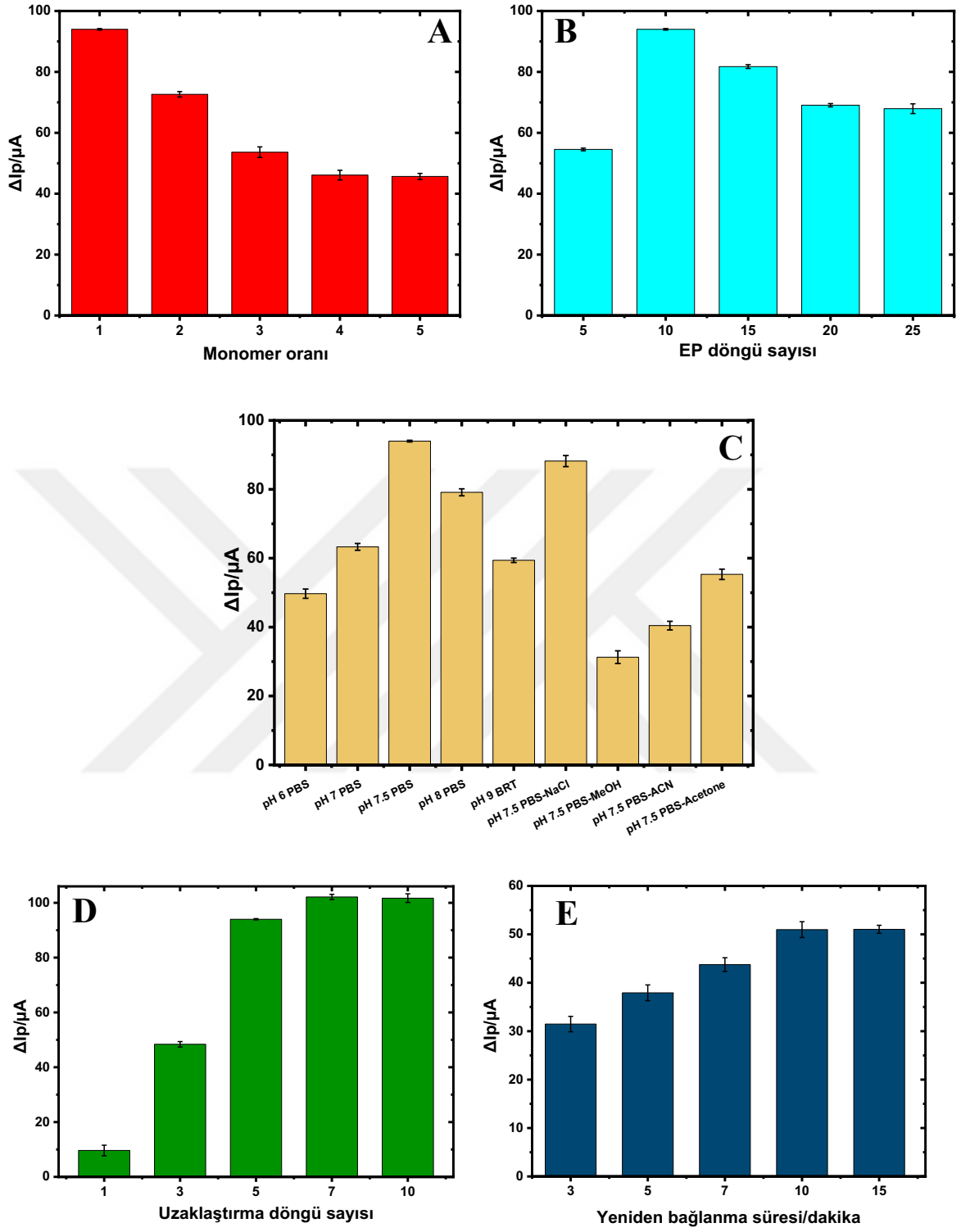
3.2.2.5. Hedef Molekülün Uzaklaştırma Çözeltileri ve Uzaklaştırma Süresi

İşlemdeki kritik bir aşama, polimerik filme zarar vermeden MIP filmlerinden kalıp moleküllerinin uzaklaştırılmasıdır. Bu adımda kalıp molekülün uzaklaştırılmasının ardından belirli bir boşluk oluşturulur ve analit bu boşluğa kolaylıkla bağlanır. Hem EP hem de FP için uygun uzaklaştırma solüsyonları kullanılmıştır. EP yönteminde, uzaklaştırma çözeltileri olarak FT (pH 6.0, 7.0, 7.5 ve 8.0 için) ve Britton-Robinson tamponu (pH 9.0 için BRT) kullanılmıştır. En iyi pik akım değeri pH 7,5 olan FT çözeltisinde elde edilmiştir. Bu tampon, 1:1 hacim oranında sodyum klorür (NaCl, 0.1 M), metanol (MeOH), asetonitril (ACN) ve aseton ile karıştırılmıştır ve MOL'u ne kadar iyi uzaklaştırabildiğini görmek için test edilmiştir. 1, 3, 5, 7 ve 10 döngüden sonra hedef molekülleri ortadan kaldırmak için DV yaklaşımı kullanılmıştır. Şekil 3.14.D'de görülebileceği gibi en iyi sonuca 7 döngüden sonra ulaşılmıştır ve tüm adımlarda bu uzaklaştırma döngü sayısı kullanılmıştır. Çeşitli asidik/bazik çözeltilerin ve organik çözücülerin (1M HCl, 15M HAc, 5M NaOH, metanol, asetonitril ve aseton) etkileri FP yönteminde değerlendirilmiştir. En yüksek ΔI değeri 5M HAc ile elde edilmiştir ve uzaklaştırma süresi bu adımda optimize edilmiştir (Şekil 3.15.D). Burada 5, 10, 15, 20 ve 25 dakikalık uzaklaştırma süreleri değerlendirilmiştir ve gözlemlenen en kararlı ve tekrarlanabilir sonuçlar nedeniyle optimum uzaklaştırma süresi olarak 10 dakikaya karar verilmiştir (Şekil 3.15.E).

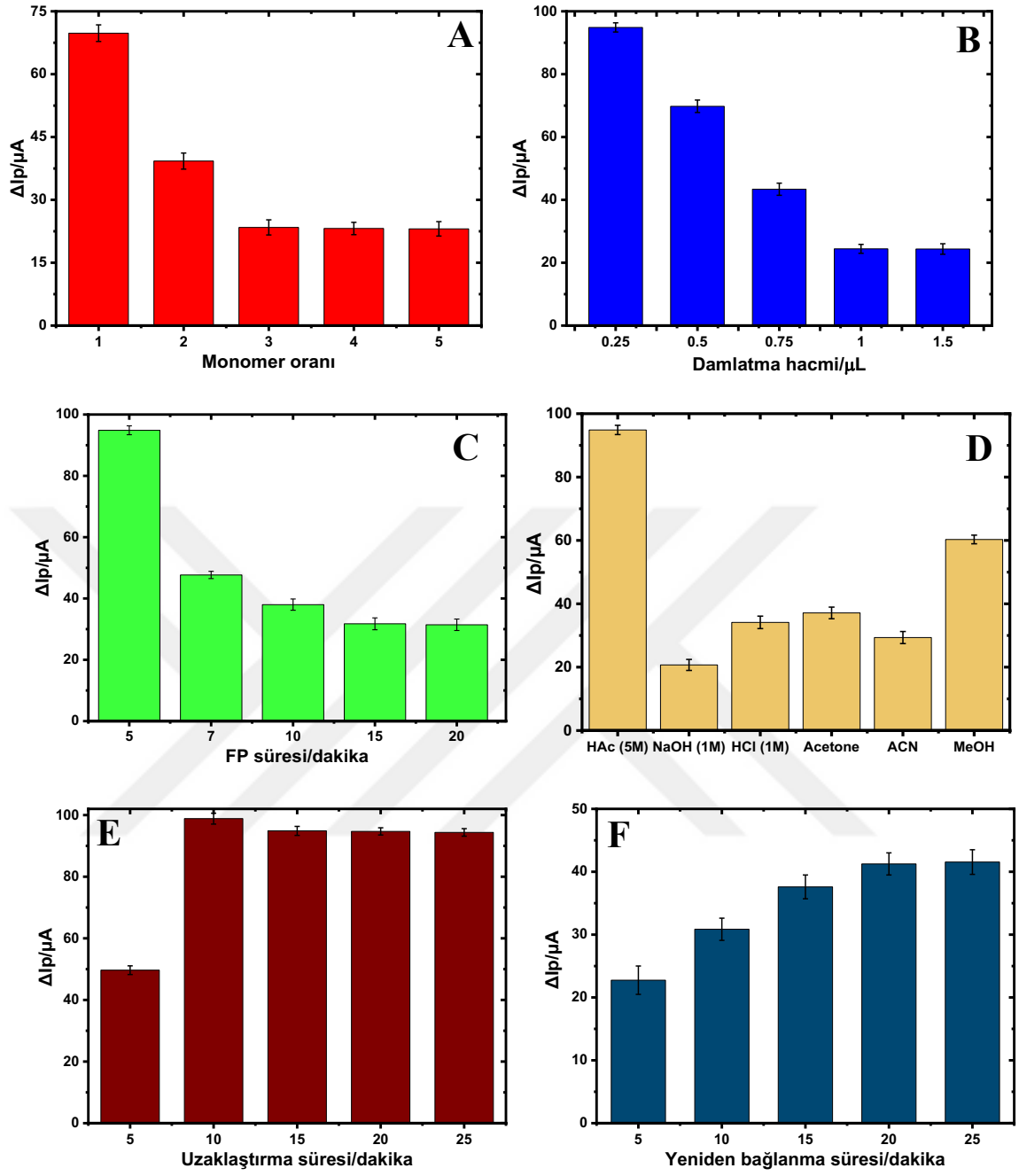
3.2.2.6. Hedef Molekölün Yeniden Bağlanma Süresi

Yeniden bağlama işlemi analiz süresini ve performansını belirleyen önemli bir parametredir. Bu nedenle EP için hazırlanan MIP tabanlı sensör, farklı zamanlarda (3, 5, 7, 10 ve 15 dakika) yeniden bağlanma üzerindeki etkisini değerlendirmek için 5.0×10^{-10} M MOL çözeltisine daldırıldı ve ThermoShaker (500 rpm, 25°C) kullanılarak incelenmiştir. Yeniden bağlanma ve uzaklaştırma sonrası pik akımları arasındaki fark değerlendirildiğinde 10. dakikada en yüksek değere ulaştığı ve sonrasında ΔI 'nin hemen hemen aynı kaldığı görülmüştür. Bu nedenle Şekil 3.14.E'ye göre GuaM/MOL@MIP/CKE sensörü için yeniden bağlanma süresi 10 dakika olarak seçilmiştir.

EP için izlenen adımların aynısı FP için de uygulanmıştır. FP için hazırlanan MIP tabanlı sensör, farklı zamanlarda (5, 10, 15, 20 ve 25 dakika) yeniden bağlanma üzerindeki etkisini değerlendirmek için 5.0×10^{-12} M MOL çözeltisine daldırıldı ve ThermoShaker (500 rpm, 25°C) kullanılarak gerçekleştirildi. Yeniden bağlanma ve uzaklaştırma sonrasındaki tepe akımları arasındaki fark hesaplanarak, stabil ve etkili bağlanma için en uygun yeniden bağlanma süresi bulunmuştur. Şekil 3.15.F'ye göre poli(Py-co-3TBA)/MOL@MIP/CKE sensörünün yeniden bağlanma süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 14. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltileri, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) MOL için yeniden bağlanma süresi.



Şekil 3. 15. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) damlatma hacmi, (C), FP süresi, (D) uzaklaştırma çözeltileri, (E) uzaklaştırma süresi, (F) MOL için yeniden bağlanma süresi.

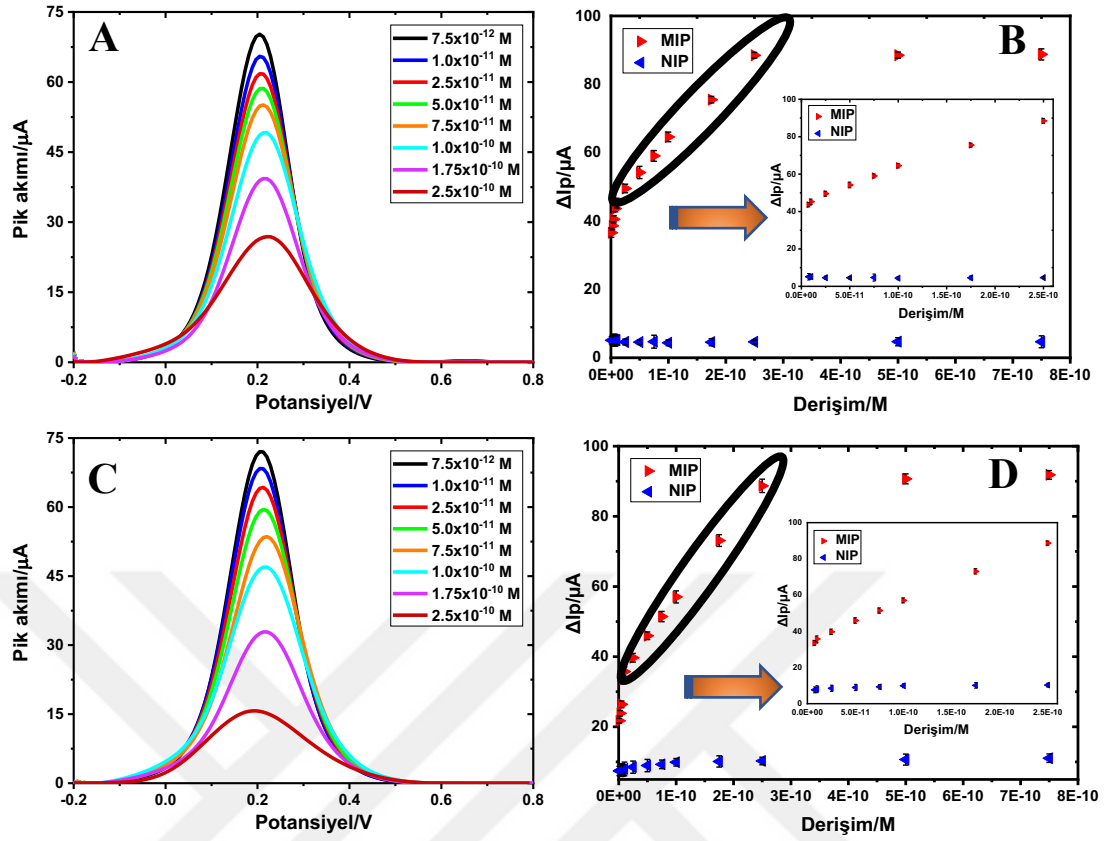
3.2.3. Poli(Py-co-p-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE Sensörlerinin Analitik Performansının Değerlendirilmesi

Poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE sensörünün analitik performansı, DPV tekniği kullanılarak farklı MOL derişimlerinin yeniden bağlanması ile 7.5×10^{-12} M ve 2.5×10^{-10} M arasında doğrusallık elde edilmiştir (Şekil 3.16 ve Çizelge 3.6). Regresyon denklemi bu derişim aralığında $\Delta I (\mu A) = 1.80 \times 10^{11} (\mu A/M) \times C(M) + 44.44$ ($r = 0,996$) olarak hesaplanmıştır. Tüm bu ölçümlerde redoks probu olarak 5.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmıştır. Regresyon parametrelerinin sonuçları Çizelge 3.6'da özetlenmiştir. Ayrıca TS ve TAS değerleri sırasıyla 6.01×10^{-13} M ve 2.00×10^{-12} M olarak bulunmuştur. TS $\left(TS = 3x \frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}}\right)$ ve TAS $\left(TAS = 10x \frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}}\right)$ formülleri kullanılarak hesaplanmıştır (Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995). İdeal koşullar altında, poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE sensörü için mükemmel sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.16.A). NIP tabanlı sensörün performansı, incelenen derişim aralığında MOL'ü belirlemek için poli(Py-co-3-TBA)/MOL@NIP/CKE kullanılarak da araştırılmıştır. MIP eğrisi (kırmızı renk), MOL derişimleriyle orantılı olarak artan ΔI ile doğrusal bir yanıt gösterirken, NIP için herhangi bir doğrusallık elde edilememiştir. NIP eğrisi (mavi renk), MOL için NIP'e özgü tanıma bölgeleri olmamasından dolayı MIP'in aksine küçük bir ΔI değeri sergilemiştir (Şekil 3.16.B). Bu sonuçlar, poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE sensörünün MOL tespiti için iyi bir duyarlılığa ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermiştir.

Çizelge 3. 6. Poli(Py-co-3-TBA)]/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörlerinin MOL için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreleri

	EP		FP	
	Standart çözelti	Ticari serum	Standart çözelti	Ticari serum
Doğrusal çalışma aralığı (M)	$7.5 \times 10^{-12} - 2.5 \times 10^{-10}$	$7.5 \times 10^{-12} - 2.5 \times 10^{-10}$	$7.5 \times 10^{-13} - 2.5 \times 10^{-11}$	$7.5 \times 10^{-13} - 2.5 \times 10^{-11}$
Eğim ($\mu\text{A/M}$)	1.80×10^{11}	2.23×10^{11}	1.86×10^{12}	1.95×10^{12}
Eğimin standart hatası	6.49×10^{10}	4.89×10^{10}	6.74×10^{10}	4.28×10^{10}
Kesişim (μA)	44.44	33.84	39.11	28.87
Kesişimin standart hatası	0.77	0.58	0.80	0.51
Korelasyon katsayısı (r)	0.996	0.999	0.996	0.998
Teşhis sınırı (M)	6.01×10^{-13}	1.79×10^{-12}	1.13×10^{-13}	6.93×10^{-14}
Tayin alt sınırı (M)	2.00×10^{-12}	5.97×10^{-12}	3.76×10^{-13}	2.31×10^{-13}
Tekrarlanabilirlik BSS%)*	1.07	1.23	0.89	1.11
Tekrar üretilebilirlik (BSS%)*	1.76	1.83	1.62	1.97

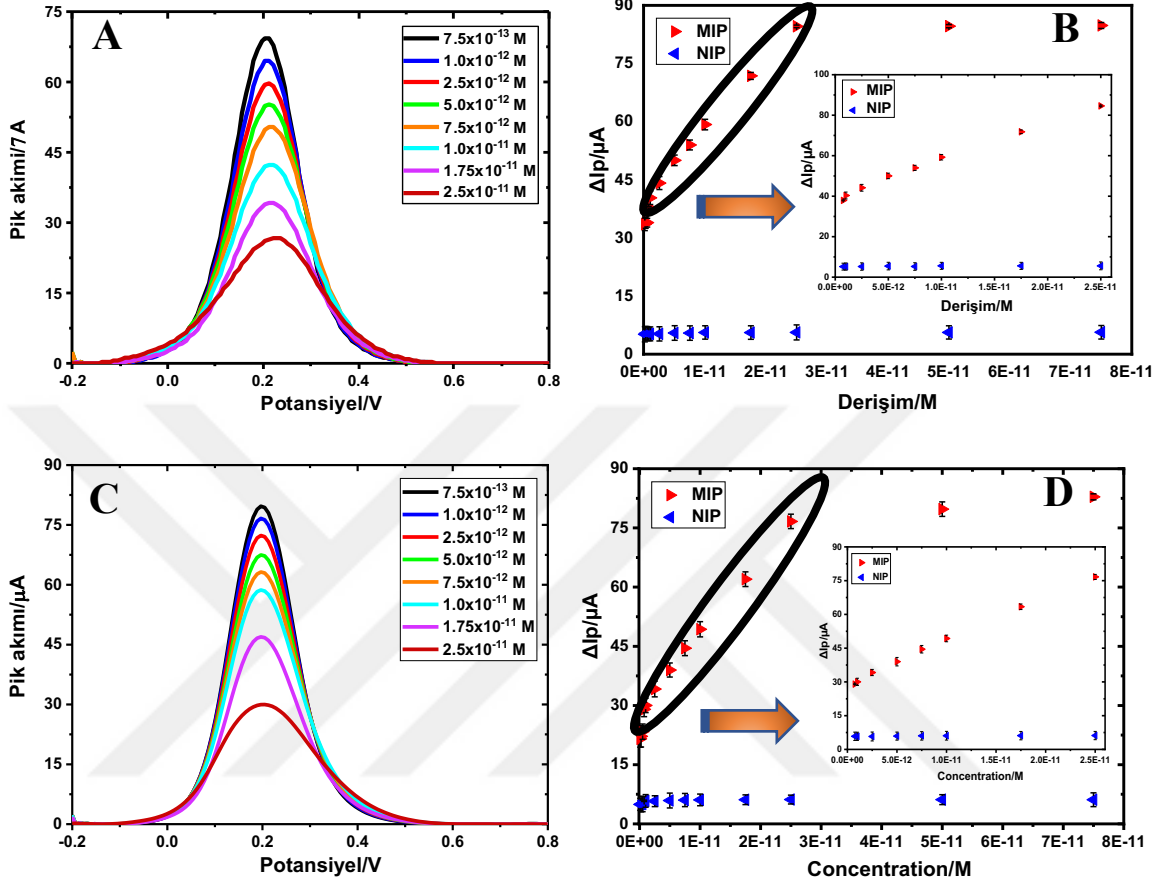
*Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5 'tir.



Şekil 3. 16. (A) Standart çözelti ve (C) ticari serum çözeltisinde farklı MOL derişimlerine sahip poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözelti ve (D) ticari serum çözeltisinde poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve NIP/CKE ile MOL'un kalibrasyon eğrisi.

GuaM/MOL@MIP/CKE sensörünün analitik performansı, ideal deney koşulları altında, 7.5×10^{-13} M ile 2.5×10^{-11} M MOL derişim aralığı kullanılarak DPV yöntemiyle değerlendirilmiştir (Çizelge 3.5). Regresyon denklemi; $\Delta I (\mu A) = 1.86 \times 10^{12} (\mu A/M) \times C (M) + 39.11$ ($r = 0.996$) belirtilen derişim aralığında elde edilmiştir. GuaM/MOL@MIP/CKE sensörü seçici ve hassas MOL tespiti için doğrusal bir yanıt sergilemiştir. TS ve TAS değerleri sırasıyla 1.13×10^{-13} M ve 3.76×10^{-13} M olarak hesaplanmıştır. NIP temelli sensörün, MOL ile aynı derişim aralığında analitik performansı kontrol edildi (mavi renk) ve azalan $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ zirveleri ile artan MOL derişimleri arasındaki ilişki Şekil 3.17.A'da verilmiştir. Şekil 3.17.B'de MIP ve NIP tabanlı sensörler için MOL derişimine karşı ΔI değerlerinin grafikleri gösterilmiştir. Sonuçlar, MOL tespiti için GuaM/MOL@MIP/CKE'nin iyi seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ile karşılaştırıldığında, GuaM/MOL@MIP/CKE sensörünün gözenekli bir yapı ve daha ince bir

polimerik film oluřturması nedeniyle daha dűřűk deriřimlerde MOL'un tespit edilmesini műmkűn kılmuřtır.



řekil 3. 17. (A) Standart  zelti ve (C) ticari serum çözeltisinde farklı MOL deriřimlerine sahip GuaM/MOL@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözelti ve (D) ticari serum çözeltisinde GuaM/MOL@MIP/CKE ve NIP/CKE ile MOL'űn kalibrasyon eęrisi.

3.2.4. Kapsűl Formuna ve Ticari Serum Numunelerine Uygulanması

Geliřtirilen. MIP temelli elektrokimyasal poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörlerinin MOL tayini için kapsűl formuna ve ticari serum numunelerine bařarıyla uygulanmuřtır. Sensör, belirlemede yűksek hassasiyet,  zgűllűk ve doęrulukla karmařık matrislerde műkemmел performans göstermiřtir (izelge 3.7). Geri kazanım çalıřmaları sırasında numunelere bilinen miktarlarda analit eklenmiř ve numunelerdeki analit deriřiminin  lűlmesi için poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörleri kullanılmıřtır. Elde edilen sonuçlar, műkemmел geri

kazanım yüzdeleri ve %BSS değerleri ile oldukça tatmin ediciydi. Ayrıca, kullanılan yöntemlerin performans karşılaştırmasında student t testi ve Fisher testleri kullanıldı (Çizelge 3.7). Elde edilen değerlerin teorik değerlerden düşük olması iki yöntemin performansı arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir.

Çizelge 3. 7. Kapsül formu ve serum numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları

	EP		FP	
	Kapsül form	Ticari serum	Kapsül form	Ticari serum
Eklenen miktar (mg)	200.000	-	200.000	-
Bulunan miktar (mg)*	201.778	-	199.013	-
BSS%	1.97	-	1.24	-
BH%	-0.89	-	0.49	-
Hesaplanmış t değeri	0.32			
Hesaplanmış F değeri	0.38			
Eklenen miktar (mg)	10.000	10.000	10.000	10.000
Bulunan miktar (mg)*	10.135	9.909	9.940	10.097
Geri kazanım (%)	101.35	99.09	99.40	100.97
BSS%	1.50	1.56	1.87	1.60
BH%	-0.14	0.91	0.60	-0.97

*Elde edilen %BSS değerlerinin ölçüm sayısı 5'tir. Teorik student-t ve F değerleri sırasıyla 2.13 ve 6.26'dır.

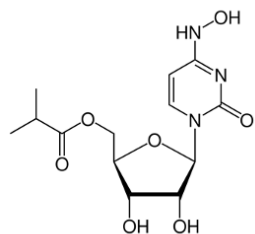
3.2.5. Geliştirilen Sensörlerin Seçicilik Çalışmaları

Hedef molekül için daha fazla seçicilik ve afinite elde etme yeteneği, MIP'leri elektrokimyasal sensörlere entegre etmenin temel faydasıdır. Bu faydayı vurgulamak ve benzer yapılara sahip diğer bileşiklerle (RIB, LAM, ZID, ZAL ve EMT gibi) karşılaştırıldığında sensörün seçiciliğini göstermek için baskı faktörü (IF) hesaplamaları gerçekleştirildi. Hedef molekülün (MOL) ΔI değerlerinin rakip ilaçların (RIB, LAM, ZID, ZAL ve EMT) değerlerine oranı, seçicilik katsayısı (k) değerini hesaplamak için kullanıldı. MIP/CKE ve NIP/CKE için MOL seçicilik katsayıları, MIP'ler tarafından kazanılan spesifik tanıma yeteneğini gösteren göreceli seçicilik katsayısını (k') tahmin etmek için de hesaplandı. Çizelge 3.8'de, hem poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE hem de GuaM/MOL@MIP/CKE

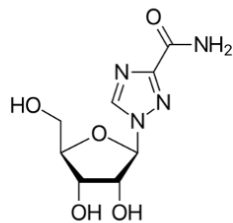
yüzeylerinin, NIP yüzeylerine kıyasla MOL'ee karşı RIB, LAM, ZID, ZAL ve EMT'den daha yüksek seçicilik sergilediğini göstermiştir. GuaM/MOL@MIPCKE ayrıca MOL için poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE'ye göre daha fazla seçicilik sergilemiştir.



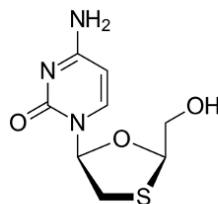
Çizelge 3. 8. MOL ve benzeri ilaç maddelerinin seçicilik değerleri



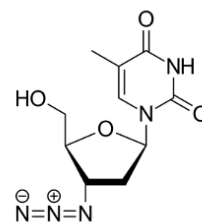
MOL



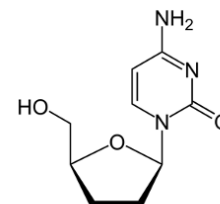
RIB



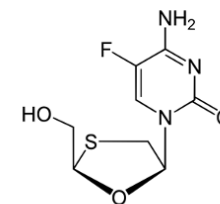
LAM



ZID



ZAL

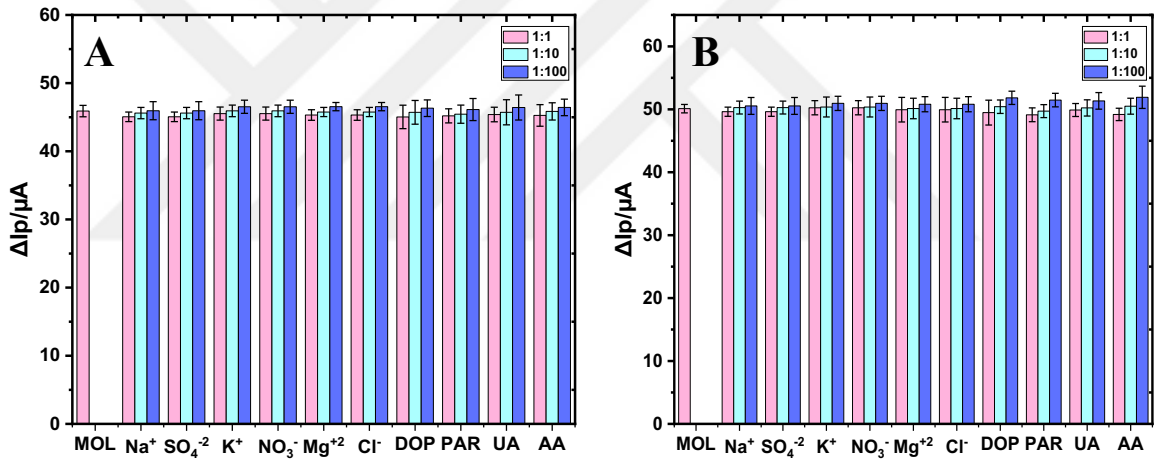


EMT

EP						PP				
MIP/CKE			NIP/CKE			MIP/CKE		NIP/CKE		
Etken Madde	$\Delta I/\mu A$	$k_{(MIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(NIP)}$	$k'_{(MIP/NIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(MIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(NIP)}$	$k'_{(MIP/NIP)}$
MOL	54.21	-	4.58	-	-	55.02	-	5.68	-	-
RIB	27.47	1.97	9.12	0.50	3.94	22.62	2.21	10.29	0.55	4.02
LAM	16.37	3.31	7.57	0.61	5.43	10.77	4.64	8.49	0.67	6.93
ZID	18.22	2.98	8.60	0.53	5.62	12.35	4.05	9.63	0.59	6.86
ZAL	21.15	2.56	10,75	0.42	6.10	11.34	4.41	9.55	0.60	7.35
EMT	21.63	2.51	11.08	0.41	6.12	12.14	4.12	10.09	0.55	7.49

3.2.6. İnterferans Çalışmaları

MIP tabanlı sensörlerin performansı, biyolojik sıvılarda bulunan K^+ , Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} , dopamin (DA), askorbik asit (AA), ürik asit (UA) ve parasetamol (PAR) gibi çeşitli maddelerden etkilenebilir. Seçicilik testi için kullanılan MOL derişimleri, poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörleri için sırasıyla 5.0×10^{-11} M ve 5.0×10^{-12} M'dır. %BSS ve %geri kazanım değerleri, 100 kat daha fazla interferans ajanların varlığında hesaplandı. Ayrıca, poly(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörlerine ait %BSS değerleri sırasıyla %1.72 ve %1.99 olarak hesaplanmıştır. MIP tabanlı sensörlerin geri kazanım değerleri sırasıyla %98.18–102.69 ve %98.05–103.72 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, girişim yapan maddelerin MOL tespiti için tasarlanan sensörlerin etkinliği üzerinde düşük etki gösterdiğini veya hiç etki göstermediğini kanıtlamıştır (Şekil 3.18).



Şekil 3. 18. (A) poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE; (B) GuaM/MOL@MIP/CKE sensörlerinin 1:1, 1:10 ve 1:100 oranında girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen çubuk grafikleri.

3.2.7. Stabillite

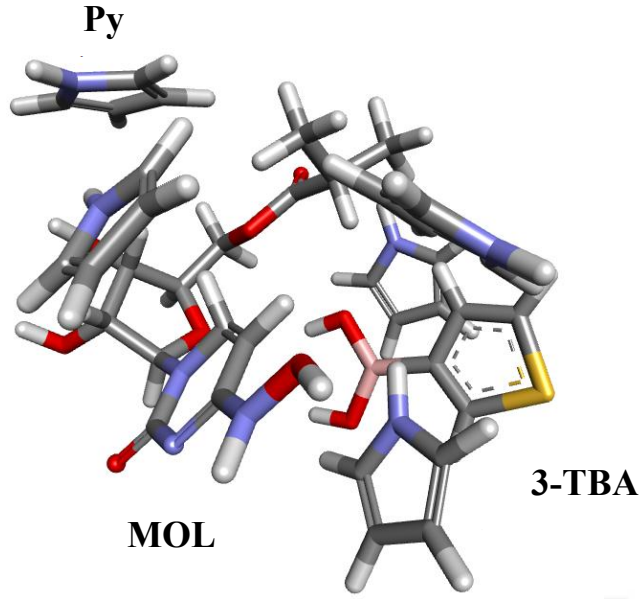
EP yöntemi kullanılarak geliştirilen poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE sensörünün tekrarlanabilirliğini belirlemek için kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Bunun için sensörün tekrarlanabilirliği üç farklı (1.0×10^{-11} M, 5.0×10^{-11} M ve 1.0×10^{-10} M) derişimler için tekrar edilebilir 5 sonuç ile belirlenmiştir. Elde edilen %BSS değerleri ≤ 1.85 olarak hesaplanmıştır. Aynı işlemler FP metodu kullanılarak geliştirilen GuaM/MOL@MIP/CKE

sensörü içinde uygulanmıştır. Bu sensörün hassasiyetinin iyi olması dolayısıyla daha düşük derişimler tercih edilmiştir. 1.0×10^{-12} M, 5.0×10^{-12} M ve 1.0×10^{-11} M derişimler için elde edilen ölçümler sonucunda %BSS değeri ≤ 1.22 olarak bulunmuştur. Ayrıca poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörleri için elektrotlar arası tekrar edilebilirlik 1.0×10^{-12} M MOL için test edilmiştir. 5 farklı elektrotun yanıtı değerlendirilerek sensörlerin %BSS değerleri hesaplanmıştır. GuaM/MOL@MIP/CKE sensörüyle tasarlanan polimerik film kullanılarak elde edilen %BSS değeri 0.96 elde edilirken, poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE sensörü kullanıldığında ise %BSS değeri 2.68 olarak hesaplanmıştır. Her iki sensör kıyaslandığında GuaM/MOL@MIP/CKE ile tasarlanan sensörün oldukça iyi performans sergilediği görülmüştür.

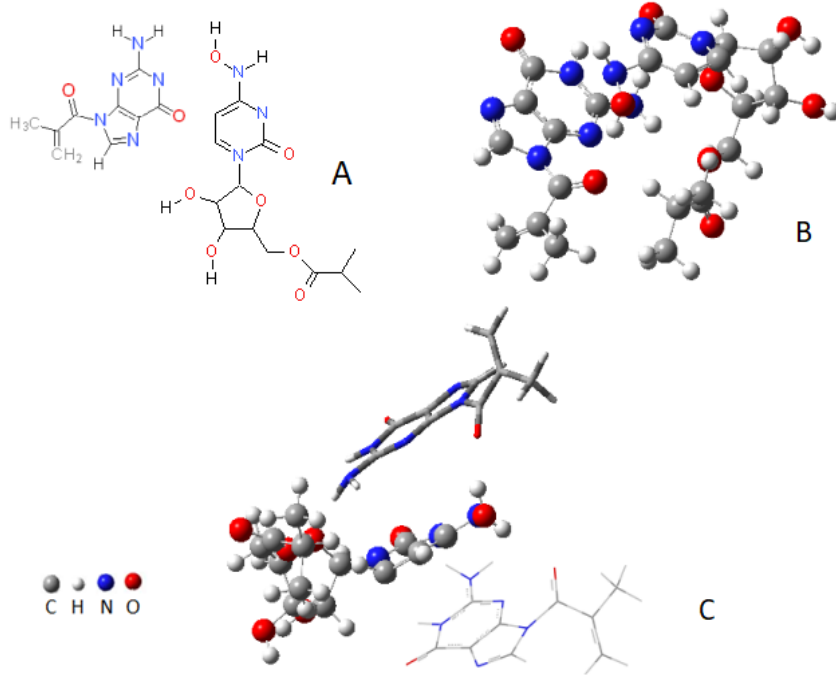
Son olarak, geliştirilen sensörlerin stabilitesini değerlendirmek için 1., 3., 5., 7., 10. ve 15.güne kadar elektrotlar desikatörde saklandı ve polimerizasyon sonrası pik akımı değerleri okunarak hesaplandı. Stabilitate çalışmaları sonucunda EP yöntemiyle geliştirilen sensör 2 gün, FP yöntemiyle hazırlanan sensör ise 5 gün stabil kalmıştır. Bu veriler ışığında MOL için FP kullanılarak oluşturulan sensörün daha iyi stabiliteye sahip olduğu sonucuna varılabilir.

3.2.8. Kuantum Kimyasal Hesaplamalar

Poli(Py-co-3 TBA)/MOL@MIP/CKE'nin Py ile kuantum kimyasal hesaplaması, yapıya 5'e kadar Py molekülünün eklenebileceğini ve 3-TBA ile de hedef molekülün 1:1 olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 3.19), bu da deneysel olarak elde ettiğimiz hedef molekül: monomer oranını doğrulamış oldu (Şekil 3.14.A). İdeal GuaM/MOL@MIP/CKE sensörü içinde monomer: hedef molekül oranı 1:1 olarak belirlendi (Şekil 3.20). Elde edilen sonuçlar optimizasyon parametrelerinde elde edilen sonuçlarla desteklendi (Şekil 3.15.A), (MOL-GuaM; 1:2, $E = -74668.127477$ eV; 1:1, $E = -53644.244489$ eV). Ayrıca, enerji hesaplamalarına dayalı sonuçlar, stabilitedeki 1:2'lik bir artışın MOL çözünürlüğünde kabul edilemez bir azalmaya yol açtığını göstermektedir (Şekil 3.20).



Şekil 3. 19. Poli(Py-co-3-TBA)/MOL kompleksi etrafındaki beş pirolün moleküler modelleme sonuçlarının şematik gösterimi.



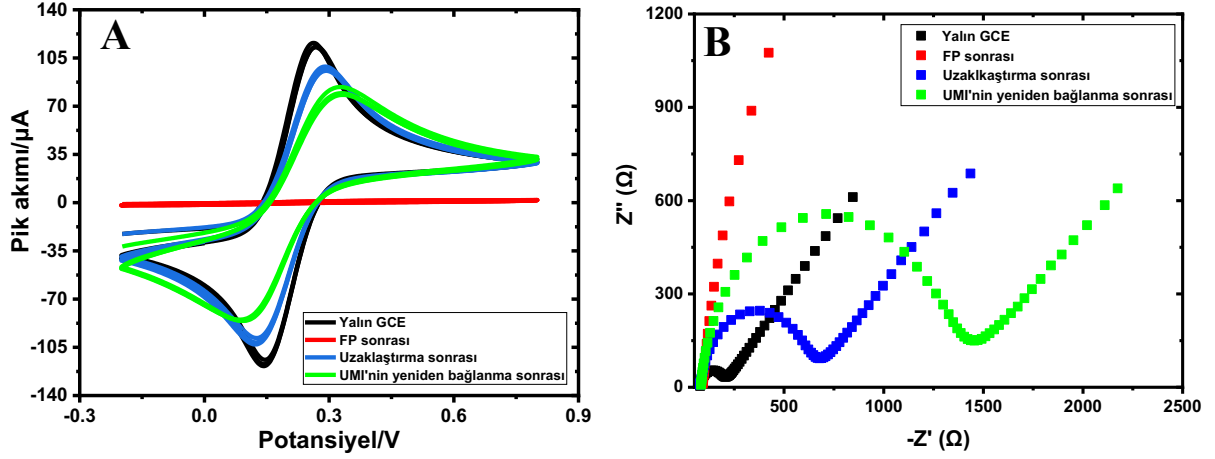
Şekil 3. 20. A) Kimyasal yapısı, B) MOL-GuaM'nin (1:1) optimize edilmiş yapısı $\{E_{\text{(RB3LYP)}} = -1971.388051 \text{ Hartree} (-53644.244489 \text{ eV})\}$ ve C) MOL-GuaM'nin (1:2) optimize edilmiş yapılar $\{E_{\text{(RB3LYP)}} = -2744.000884 \text{ Hartree} (-74668.127477 \text{ eV})\}$.

3.3. UMI Etken Maddesine Ait Bulgular

3.3.1. MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörün Karakterizasyonu

3.3.1.1. Elektrokimyasal Karakterizasyon

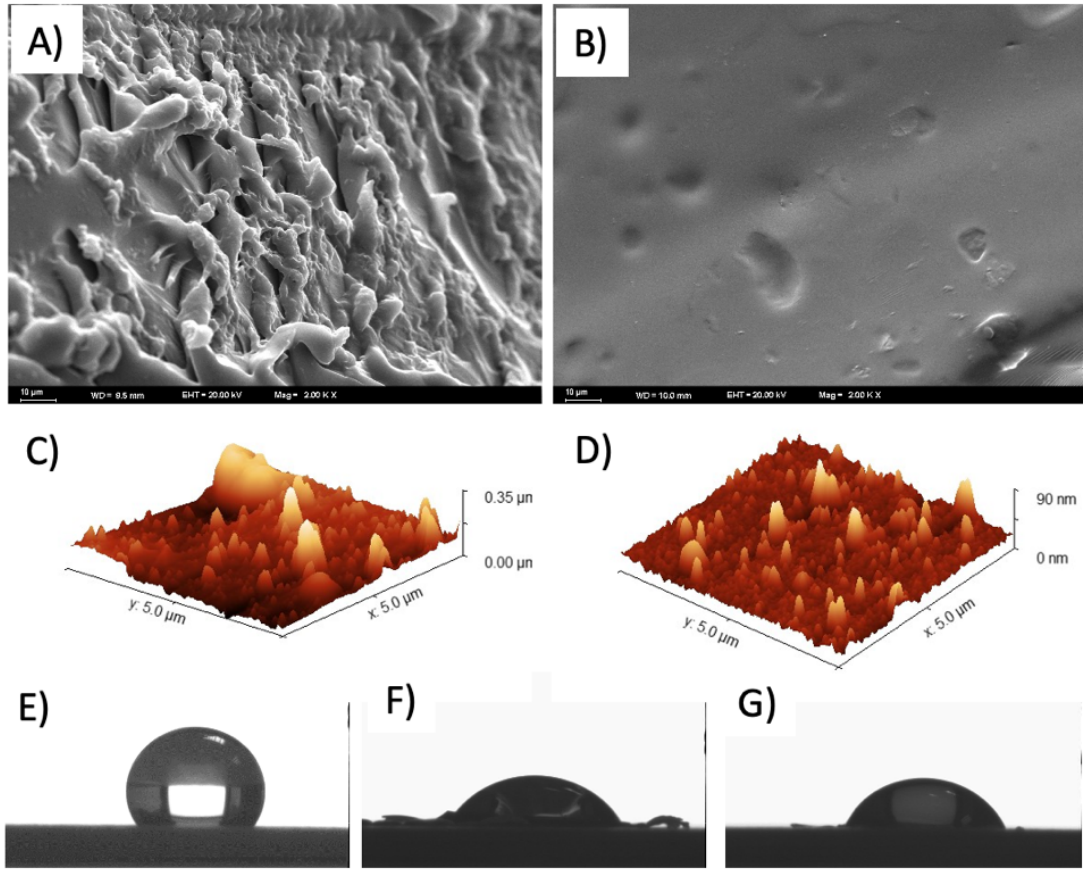
UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu, EIS ve DV yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen bu sensörün elektrokimyasal karakterizasyonu 5.0 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün farklı polimerizasyon aşamalarında elektrokimyasal davranışını değerlendirmek için DV yöntemi kullanılmıştır. Şekil 3.21.A'ya bakıldığında, elektron transferini engelleyen hiçbir faktör bulunmadığından [Fe(CN)₆]^{3-/4-} redoks probunun pik akım değerleri maksimum olarak elde edilmiştir (siyah çizgi). Polimerizasyon işlemlerinden sonra, CKE yüzeyi elektron transferini önleyen polimerik bir film ile kaplandığından [Fe(CN)₆]^{3-/4-} redoks probunun pik akım değeri gözlenmemiştir (kırmızı çizgi). UMI molekülünün polimerik filmde uzaklaştırılmasından sonra, UMI'ya özgü boşluklar oluştuğundan [Fe(CN)₆]^{3-/4-} redoks probunun pik akımı değeri, yalın CKE'ninkinden daha düşük elde edilmiştir (mavi çizgi). Son olarak, UMI'nın bilinen derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla elde edilen pik akımı değeri, polimerik film üzerindeki boşlukların kapanması nedeniyle hedef molekülün uzaklaştırılması sonrası elde edilen pik akımı değerinden daha düşük elde edilmiştir (yeşil çizgi). Şekil 3.21.B, EIS için Nyquist grafiklerini göstermektedir. Elektrot yüzeyi elektron transfer akışı için bloke edildiğinde R_{ct} değeri artar ve elektron transfer akışı için difüzyon engelleri olmadığında ise R_{ct} değeri azalır. Yalın CKE, UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörü için polimerizasyon aşamasından önce en küçük R_{ct} değerine (138,99 Ω) sahiptir. Polimerizasyon sonrasında elektrot yüzeyi yalıtkan malzemeye kaplandığında elektron transferi gerçekleşmediği için R_{ct} değeri (7966.2 Ω) en yüksek değerine ulaşmıştır. Hedef molekülün uzaklaştırılması sonrasında, polimerik matris üzerindeki baskılı spesifik boşluklar nedeniyle R_{ct} değeri 578.29 Ω olarak bulunmuştur. Yeniden bağlanmanın ardından sensörün direnci yeniden artmıştır (1279.8 Ω). Bu da UMI moleküllerinin baskılı polimerik boşluklara tanındığını ve bağlandığını göstermiştir.



Şekil 3. 21. UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün hazırlanması aşamalarında (A) DV ve (B) EIS grafikleri.

3.3.1.2. Geliştirilen UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün yüzey karakterizasyonu

UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE filminin yüzey karakterizasyonları SEM ile incelenmiştir (Şekil 3.22). MIP’de, spesifik boşlukların oluşumundan dolayı pürüzlü ve düzensiz yapılar görülmektedir. MIP elektrotu dar ve kümelenmiş parçacıklara sahipken, NIP elektrotu çok daha kalın parçacık boyutuna sahiptir, bu da polimerik filmin elektrot yüzeyinde başarıyla sentezlendiğini göstermiştir (Şekil 3.22.A ve 3.22.B). Ayrıca MIP ve NIP için AFM görüntüleri alınmıştır. NIP’in AFM’si düzenli bir yapı sergilerken, MIP kümelenmenin hedef molekülün baskılanmasından olabileceği düşünülmektedir (Şekil 3.22.C ve Şekil 3.22.D). Polimerik filmin hidrofilikliğini sağlamak için de temas açısı ölçümü gerçekleştirilmiştir. Yüzeyde herhangi bir şey yokken temas açısı değeri 122.5° olarak bulunmuştur (Şekil 3.22.E). MIP elektrot yüzeyinin temas açısı değeri 52.9° elde edilirken NIP elektrot yüzeyinin temas açısı değeri ise 60.2° olarak bulunmuştur. MIP’in uzaklaştırma sonrası elektrot yüzeyinde spesifik boşlukların oluşması ve gözenekli yapıların fazla olması dolayısıyla NIP’e göre daha hidrofilik olduğunu göstermiştir (Şekil 3.22.F. ve Şekil 3.22.G.).



Şekil 3. 22. UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonları. (A) MIP ve (B) NIP'in SEM görüntüleri; (C) MIP ve (D) NIP'in AFM görüntüleri; (E) normal yüzey, (F) MIP ve (G) NIP'nin temas açısı görüntüleri.

3.3.2. Deneysel Koşulların Optimizasyonu

3.3.2.1. Monomer/Hedef Molekül Oranı

UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörü için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu süreçteki ilk ve en önemli adım, fonksiyonel monomer ile hedef molekül arasındaki oranın optimize edilmesidir. Bu optimizasyon, kararlı ve etkili bir polimerik yapı oluşturmak için gerçekleştirilir. Monomer: hedef molekül oranları (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1), hedef molekülün uzaklaştırma sonrası pik akımı değeri ile polimerizasyon sonrası pik akımı değerleri arasındaki farklar (ΔI) alınarak değerlendirilmiştir. Monomer: hedef molekül arasındaki optimum oran 4:1 olarak bulunmuştur (Şekil 3.23.A).

3.3.2.2. Damlatma Hacmi

CKE yüzeyine damlatılan polimerizasyon çözeltisinin miktarı, filmin kalınlığını ve stabilitesini belirlemede önemli bir parametredir. Elektrot yüzeyine farklı miktarlarda polimerizasyon çözeltisi (0.25, 0.50, 0.75, 1.0 ve 1.25 μL) damlatılmıştır. Hedef molekülün uzaklaştırma sonrası pik akımı değerleri ile FP sonrası elde edilen pik akım değerleri arasındaki farklar alınarak belirlenmiştir ve optimum damlatma hacmi 0.50 μL olarak elde edilmiştir (Şekil 3.23.B).

3.3.2.3. FP Süresi

UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörü UV lambası (365 nm ve 100 W) kullanılarak hazırlanmıştır. CKE yüzeyinde stabil bir polimerik film yapısı oluşturmak için FP süresi optimize edilmelidir. CKE yüzeyine 0.5 μL polimerizasyon çözeltisi damlatıldıktan sonra, UV altında 3., 5., 7., 10. ve 15. dakikada polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Sensör hazırlama süresinin çok uzun olmadığı göz önüne alındığında optimum FP süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 3.23.C).

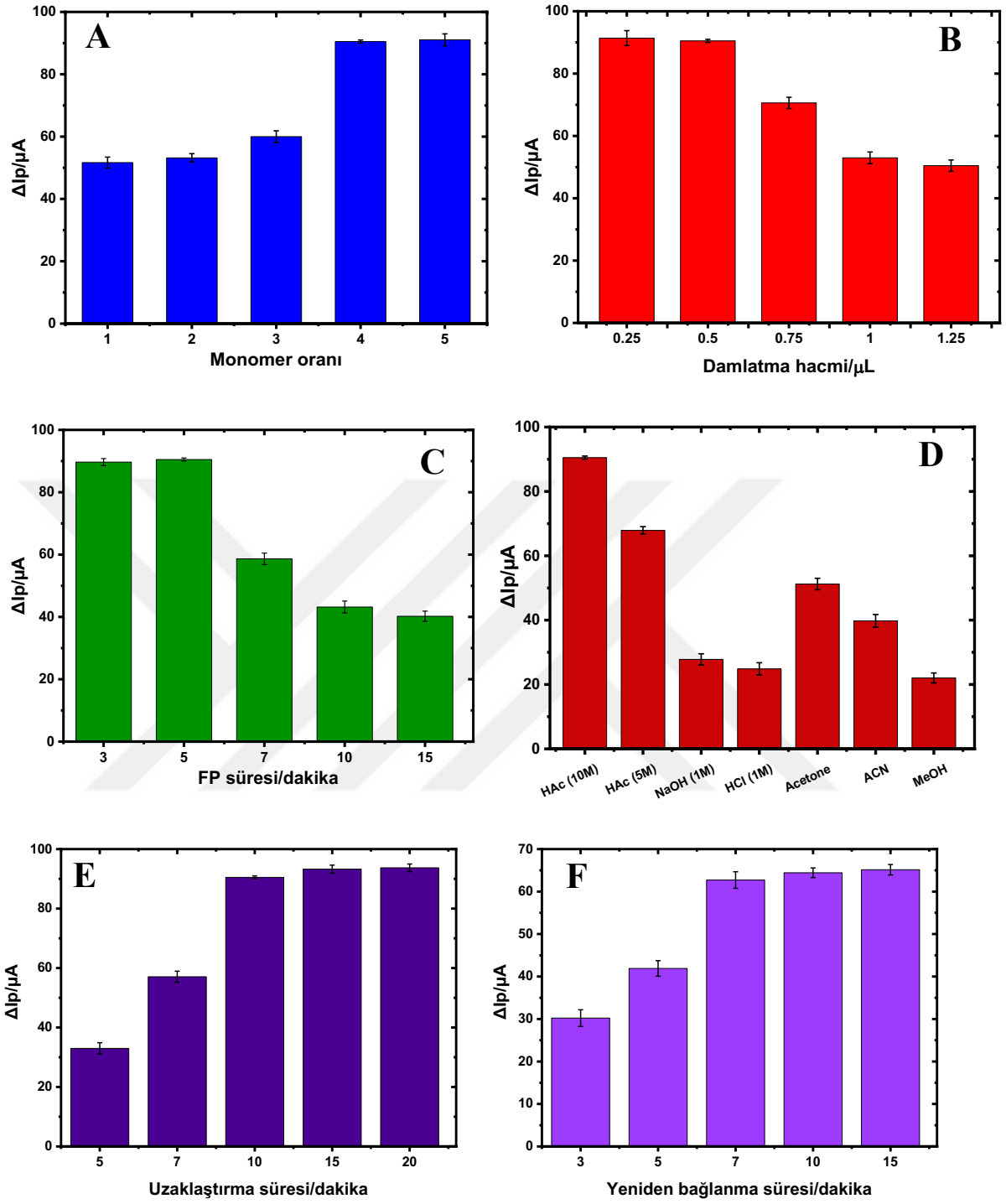
3.3.2.4. Hedef Molekülün Uzaklaştırma Çözeltileri ve Uzaklaştırma Süresi

Geliştirilen UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörü üzerinde, hedef molekülün çıkarma adımlarını optimize etmek için farklı uzaklaştırma çözeltileri ve süreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Asetik asit (5 M ve 10 M), sodyum hidroksit (1 M), metanol, asetonitril, aseton ve hidroklorik asit (1 M), hedef molekülün uzaklaştırma sonrası pik akımı değeri ile FP sonrası elde edilen pik akımı değerleri arasındaki fark hesaplanarak uzaklaştırma çözeltilerin performansları test edilmiştir (Şekil 3.23.D). Sonuçlara göre en uygun uzaklaştırma çözeltisi olarak 10 M HAc seçilmiştir. Daha sonra, uzaklaştırma süresi 650 rpm'lik bir Thermo-Shaker kullanılarak farklı zamanlarda (5, 7, 10, 15 ve 20 dakika) optimize edilmiştir. Pik akımları arasındaki fark 10 dakika sonrasında sabit kaldığından uzaklaştırma süresi olarak 10 dakika seçilmiştir (Şekil 3.23.E).

3.3.2.5. Hedef Molekölün Yeniden Bağlanma Süresi

Yeniden bağlama süresi optimizasyonu, 5.0×10^{-12} M UMI çözeltisi kullanılarak 650 rpm'lik bir Thermo-Shaker'da farklı zamanlar (3, 5, 7, 10 ve 15 dakika) kullanılarak gerçekleştirildi. Buradaki amaç, UMI' nin baskılı polimer yapının boşluklarına stabil şekilde bağlanmasını sağlamaktır. Uzaklaştırma sonrası ve yeniden bağlama sonrası pik akımları arasındaki farklara göre, optimum yeniden bağlama süresi 7 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 3.23.F).





Şekil 3. 23. DPV'nin ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) damlatma hacmi, (C), FP süresi, (D) uzaklaştırma çözeltileri, (E) uzaklaştırma süresi, (F) UMI için yeniden bağlanma süresi.

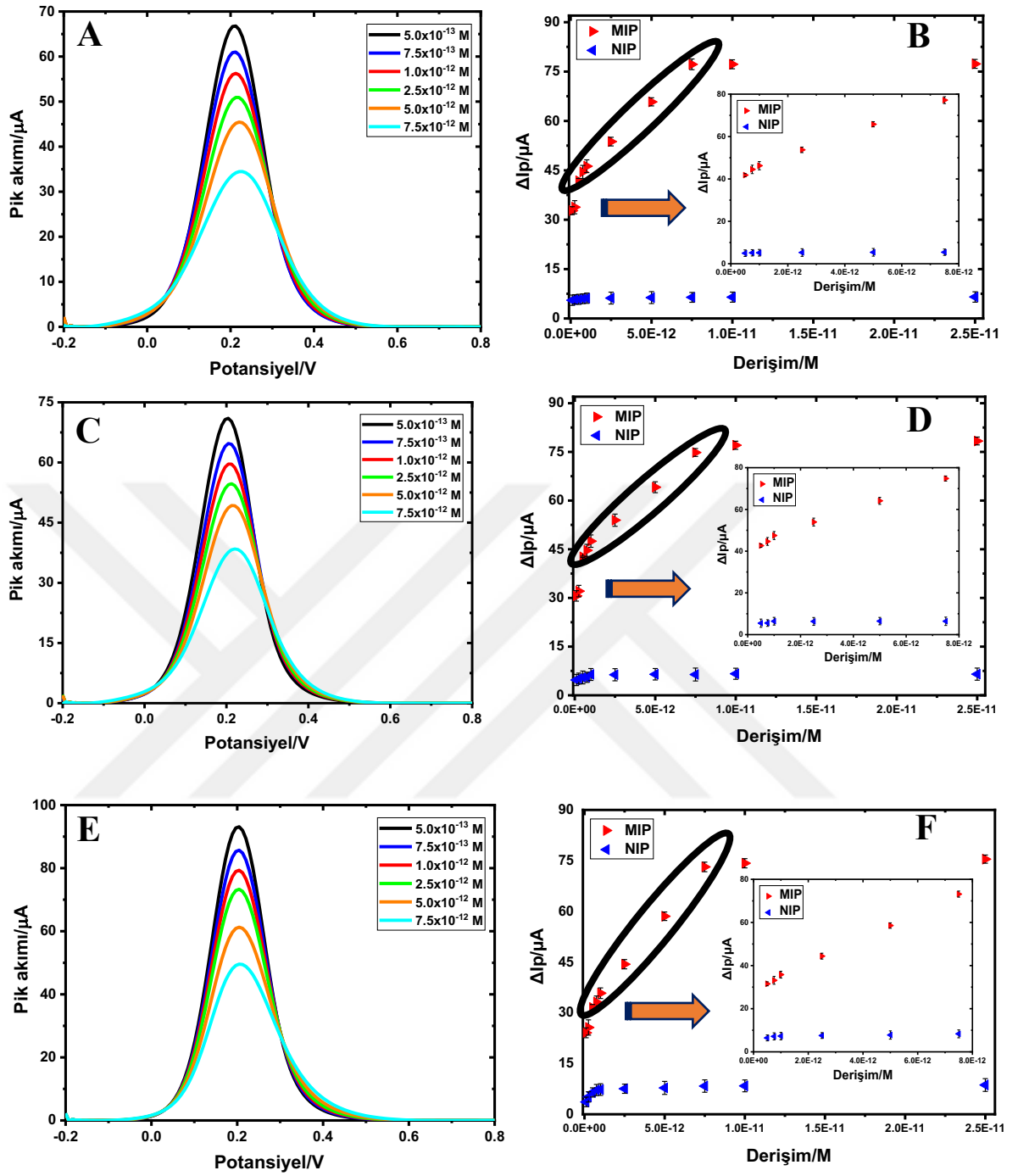
3.3.3. UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE Sensörünün Analitik Performansının Değerlendirilmesi

UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün analitik performansı, DPV ve EIS teknikleri kullanılarak farklı UMI derişimlerinin yeniden bağlanması ile sırasıyla 5.0x10⁻¹³-7.5x10⁻¹² M ve 2.5x10⁻¹³-5.0x10⁻¹² arasında doğrusallık elde edilmiştir (Şekil 3.24, Şekil 3.25 ve Çizelge 3.9). Regresyon denklemleri bu derişim aralığında DPV ve EIS için aşağıda hesaplanmıştır:

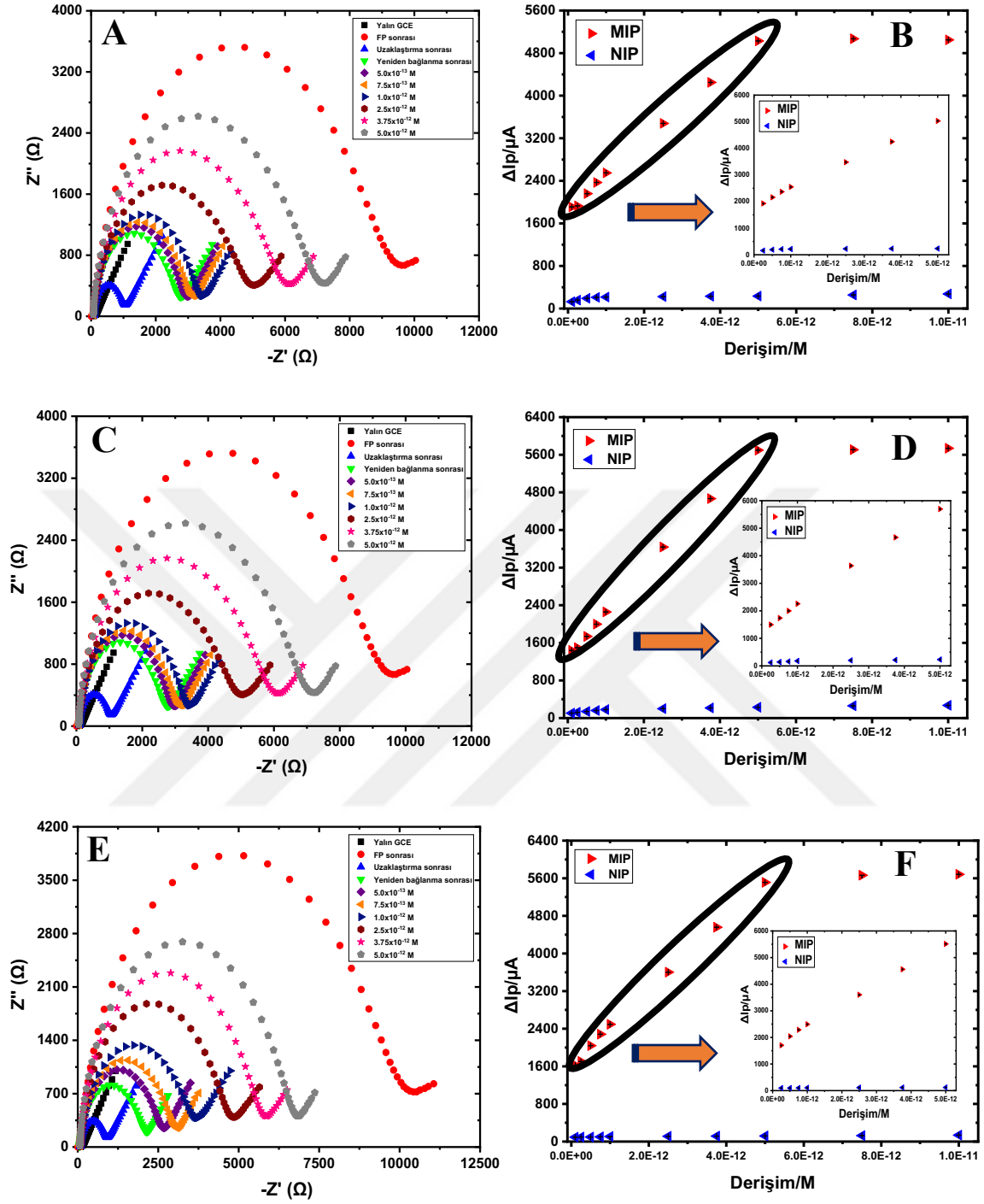
$$\Delta I (\mu A) = 1.35 \times 10^{12} (\mu A/M) \times C(M) + 43.74 (r= 0,997) \text{ (DPV için)}$$

$$\Delta I (\mu A) = 0.65 \times 10^{13} (\mu A/M) \times C(M) + 30.43 (r= 0,999) \text{ (EIS için)}$$

Tüm bu ölçümlerde redoks probu olarak 5.0 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} çözeltisi kullanılmıştır. Regresyon parametrelerinin sonuçları Çizelge 3.8'de detaylı bir şekilde özetlenmiştir. Ayrıca TS ve TAS değerleri DPV ve EIS için sırasıyla 4.82x10⁻¹⁴-1.61x10⁻¹³ M ve 2.34x10⁻¹⁴-7.81x10⁻¹⁴ M olarak bulunmuştur. TS $\left(TS = 3x \frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}}\right)$ ve TAS $\left(TAS = 10x \frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}}\right)$ formülleri kullanılarak hesaplanmıştır (Ozkan vd., 2015; “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology,” 1995). İdeal koşullar altında, UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörü için mükemmel sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.19.A ve Şekil 3.20.A). NIP tabanlı sensörün performansı, incelenen derişim aralığında UMI'yi belirlemek için UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE kullanılarak da araştırılmıştır. MIP eğrisi (kırmızı renk), UMI derişimiyle orantılı olarak artan ΔI ile doğrusal bir yanıt gösterirken, NIP için herhangi bir doğrusallık elde edilememiştir. NIP eğrisi (mavi renk), UMI için NIP'e özgü tanıma bölgeleri olmamasından dolayı MIP'in aksine küçük bir ΔI değeri sergilemiştir (Şekil 3.19.B ve 3.20.B). Bu sonuçlar, UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün UMI tespiti için iyi bir duyarlılığa ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca DPV ve EIS teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen sensör için elde edilen validasyon parametreleri dikkate alındığında DPV tekniğine EIS tekniğiyle daha düşük doğrusallık aralığı, düşük BSS değeri ve daha hassas sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3. 24 (A) Standart çözeltide, (C) ticari serum çözeltisinde ve (D) idrar çözeltisinde farklı UMI derişimlerine sahip UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE'nin DP voltammogramları. (B) standart çözeltide, (D) ticari serum çözeltisinde ve (E) idrar çözeltisinde UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE ve NIP/CKE ile UMI'nin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 3. 25. (A) Standart çözeltide, (C) ticari serum çözeltisinde ve (D) idrar çözeltisinde farklı UMI derişimlerine sahip UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE'nin EIS Nyquist eğrleri. (B) standart çözeltide, (D) ticari serum çözeltisinde ve (E) idrar çözeltisinde UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE ve NIP/CKE ile UMI'nin kalibrasyon eğrisi.

Çizelge 3. 9. UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün UMI için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreler

DPV				EIS		
	Standart	Serum	İdrar	Standart	Serum	İdrar
Doğrusal çalışma aralığı (M)	5.0x10 ⁻¹³ – 7.5x10 ⁻¹²	5.0x10 ⁻¹³ – 7.5x10 ⁻¹²	5.0x10 ⁻¹³ – 7.5x10 ⁻¹²	2.5x10 ⁻¹³ – 5.0x10 ⁻¹²	2.5x10 ⁻¹³ – 5.0x10 ⁻¹²	2.5x10 ⁻¹³ – 5.0x10 ⁻¹²
Eğim (µA/M)	1.35x10 ¹²	4.55x10 ¹²	5.91x10 ¹²	0.65x10 ¹³	0.88x10 ¹³	0.78x10 ¹³
Eğimin standart hatası	5.57x10 ¹⁰	0.15x10 ¹⁰	9.05x10 ¹⁰	0.14x10 ¹²	0.15x10 ¹²	0.18x10 ¹²
Kesişim (µA)	43.74	41.00	28.99	1806.38	1333.76	1622.99
Kesişimin standart hatası	0.56	0.59	0.33	30.43	38.05	43.75
Korelasyon katsayısı (r)	0.997	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999
Teşhis sınırı (M)	4.82x10 ⁻¹⁴	6.48x10 ⁻¹⁴	5.96x10 ⁻¹⁴	2.34x10 ⁻¹⁴	3.81x10 ⁻¹⁴	3.85x10 ⁻¹⁴
Tayin alt sınırı (M)	1.61x10 ⁻¹³	2.16x10 ⁻¹³	1.99x10 ⁻¹³	7.81x10 ⁻¹⁴	1.27x10 ⁻¹³	1.28x10 ⁻¹³
Tekrarlanabilirlik BSS%)*	1.21	1.64	1.78	0.45	0.66	0.74
Tekrar üretilebilirlik (BSS%)*	1.65	2.38	2.75	0.87	0.93	0.98

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

3.3.4. Ticari Serum ve İdrar Numunelerine Uygulanması

Geliştirilen. MIP temelli elektrokimyasal $UMI@B_3N_3/BuMA@MIP/CKE$ sensörünün MOL tayini için ticari serum ve idrar numunelerine başarıyla uygulanmıştır. Sensör, belirlemede yüksek hassasiyet, özgüllük ve doğrulukla karmaşık matrislerde mükemmel performans göstermiştir (Çizelge 3.10 ve Çizelge 3.11). Geri kazanım çalışmaları sırasında numunelere bilinen miktarlarda analit eklenmiş ve numunelerdeki analit derişiminin ölçülmesi için $UMI@B_3N_3/BuMA@MIP/CKE$ sensörleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, mükemmel geri kazanım yüzdeleri ve BSS değerleri ile oldukça tatmin ediciydi.



Çizelge 3. 10. Ticari serum numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları

DPV				EIS		
Serum				Serum		
Numune derişimi (M)	1.00×10^{-12}	2.50×10^{-12}	5.00×10^{-12}	5.00×10^{-13}	7.50×10^{-13}	1.00×10^{-12}
Eklenen miktar (M)	4.00×10^{-12}	2.50×10^{-12}	2.50×10^{-12}	5.00×10^{-13}	2.50×10^{-13}	1.50×10^{-12}
Bulunan miktar (M)*	4.96×10^{-12}	4.94×10^{-12}	7.51×10^{-12}	1.02×10^{-12}	1.03×10^{-12}	2.53×10^{-12}
Geri kazanım (%)*	99.11	98.87	101.45	102.45	102.01	101.88
BSS%	1.60	1.86	1.77	0.90	1.23	1.05
BH%	0.89	1.13	-1.45	-2.45	-2.01	-1.88

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

Çizelge 3. 11. İdrar numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları

DPV				EIS		
İdrar				İdrar		
Numune derişimi (M)	1.00×10^{-12}	2.50×10^{-12}	5.00×10^{-12}	5.00×10^{-13}	7.50×10^{-13}	1.00×10^{-12}
Eklenen miktar (M)	4.00×10^{-12}	2.50×10^{-12}	2.50×10^{-12}	5.00×10^{-13}	2.50×10^{-13}	1.50×10^{-12}
Bulunan miktar (M)*	5.02×10^{-12}	5.03×10^{-12}	7.52×10^{-12}	9.95×10^{-13}	9.94×10^{-12}	2.51×10^{-12}
Geri kazanım (%)*	100.38	100.59	101.06	99.48	99.35	100.28
BSS%	1.86	1.94	1.73	1.08	0.96	1.23
BH%	-0.38	-0.59	-1.06	0.52	0.65	-0.28

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

3.3.5. Geliştirilen Sensörlerin Seçicilik Çalışmaları

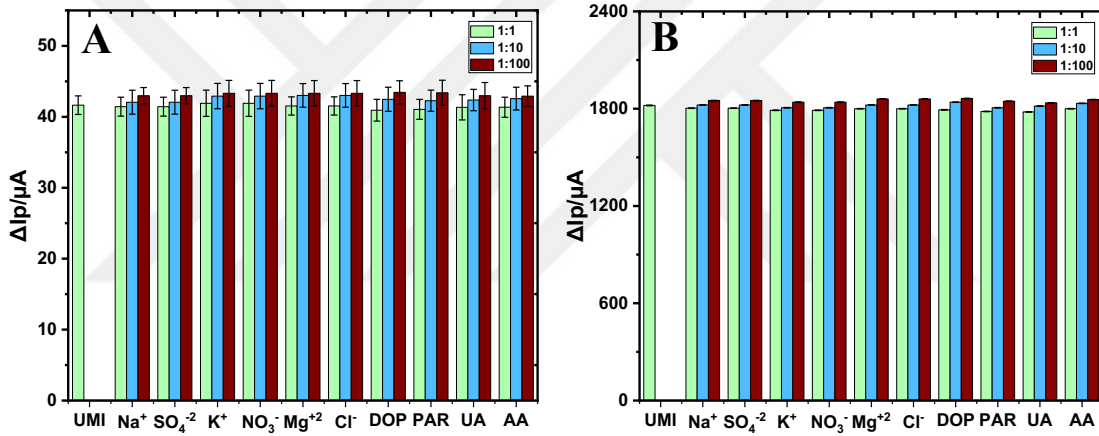
MIP'leri elektrokimyasal sensörlere entegre etmenin temel faydalarından biri de daha fazla seçicilik ve afinite yeteneklerine sahip olmalarıdır. Geliştirilen sensörün hem DPV hem de EIS yöntemleri kullanılarak benzer yapılara sahip akitinib (AXI), tiyofenol (THP), tadalafile (TAD), zolmitriptan (ZOL), sumatriptan (SUM) ve L-triptofan (L-TRP) ile karşılaştırıldığında sensörün seçiciliğini göstermek için baskı faktörü (IF) hesaplamaları gerçekleştirildi. Hedef molekülün (MOL) ΔI değerlerinin rakip ilaçların (AXI, THP, TAD, ZOL, SUM ve L-TRP) değerlerine oranı, seçicilik katsayısı (k) değerini hesaplamak için kullanıldı. MIP/CKE ve NIP/CKE için MOL seçicilik katsayıları, MIP'ler tarafından kazanılan spesifik tanıma yeteneğini gösteren göreceli seçicilik katsayısını (k') tahmin etmek için de hesaplandı. Çizelge 3.12'de, DPV ve EIS yöntemleri kullanılarak UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün NIP yüzeylerine kıyasla UMI'ye karşı AXI, THP, TAD, ZOL, SUM ve L-TRP'den daha yüksek seçicilik sergilediğini göstermiştir. Ayrıca, UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörü EIS yöntemi ile DPV'ye göre daha fazla seçicilik sergilemiştir.

Çizelge 3. 12. UMI ve benzeri ilaç maddelerinin seçicilik değerleri

DPV						EIS				
MIP/CKE			NIP/CKE			MIP/CKE		NIP/CKE		
Etken Madde	$\Delta I/\mu A$	$k_{(MIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(NIP)}$	$k'_{(MIP/NIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(MIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(NIP)}$	$k'_{(MIP/NIP)}$
UMI	48.71	-	6.33	-	-	2600	-	250	-	-
AXI	15.24	3.20	12.95	0.49	6.53	992	2.62	712	0.35	7.49
THP	12.92	3.77	10.55	0.60	6.29	952	2.73	690	0.34	8.03
TAD	14.14	3.44	12.84	0.49	6.99	1008	2.58	740	0.34	7.59
ZOL	15.27	3.19	13.13	0.48	6.62	988	2.63	710	0.35	7.51
SUMA	15.62	3.12	13.95	0.45	6.87	998	2.61	720	0.35	7.46
L-TRP	15.22	3.20	13.28	0.48	6.71	1028	2.53	750	0.33	7.67

3.3.6. İnterferans Çalışmaları

MIP temelli elektrokimyasal UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün performansı, biyolojik sıvılarda bulunan K⁺, Cl⁻, Na⁺, SO₄²⁻, dopamin (DA), askorbik asit (AA), ürik asit (UA) ve parasetamol (PAR) gibi çeşitli maddelerden etkilenip etkilenmediği test edilmiştir. Seçicilik testi için DPV ve EIS yöntemleri ile 1.0x10⁻¹² M UMI kullanılmıştır. BSS ve geri kazanım değerleri, 100 kat daha fazla interferans ajanların varlığında hesaplanmıştır. Ayrıca, UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün %BSS ve %geri kazanım değerleri DPV için sırasıyla ≤1.85 ve %97.32–103.01 olarak elde edilirken, EIS için ise bu değerler sırasıyla ≤1.37 ve %98.35–102.38 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, girişim yapan maddelerin UMI tespiti için tasarlanan sensörlerin etkinliği üzerinde düşük etki gösterdiğini veya hiç etki göstermediğini kanıtlamıştır (Şekil 3.26).



Şekil 3. 26. (A) DPV, (B) EIS yöntemi kullanılarak UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün 1:1, 1:10 ve 1:100 oranında girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen çubuk grafikleri.

3.3.7. Stabilité

Geleştirilen UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün tekrarlanabilirliğini belirlemek için üç farklı derişimlerde tekrar edilebilir 5 sonuç ile kesinlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen %BSS değerleri sonuçlarına göre ≤2.69 olarak bulunmuştur. Ayrıca geliştirilen sensörün elektrotlar arası tekrar edilebilirliği 2.5x10⁻¹² M UMI için test edilmiş ve 5 farklı elektrotun yanıtı değerlendirilerek sensörlerin %BSS değerleri hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlara göre %BSS değeri 2.05 olarak bulunmuştur. Son olarak,

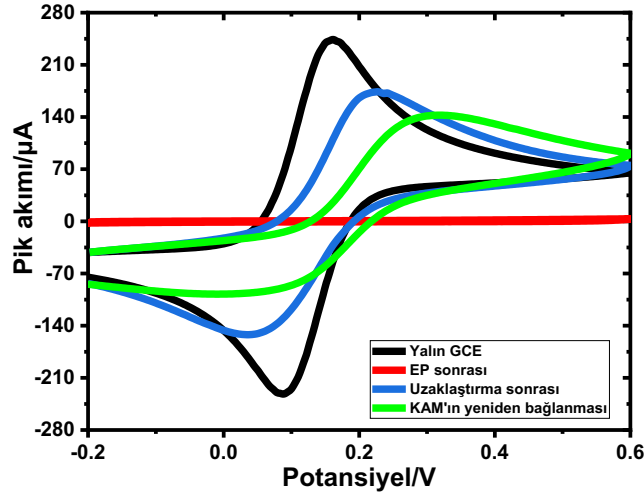
geliştirilen sensörlerin stabilitesini değerlendirmek için 1., 3., 5., 7.,10. ve 15.güne kadar elektrotlar desikatörde saklandı ve polimerizasyon sonrası pik akımı değerleri okunarak hesaplandı. Stabilitate çalışmaları sonucunda FP yöntemiyle geliştirilen sensörün performansı 5.günün sonunda %94.8, 7.günün sonunda %90.45, 10.günün sonunda %84.3 ve 15.günün sonunda ise %77.6 olarak bulunmuştur Bu verilere göre UMI için FP kullanılarak geliştirilen sensörün performansı 5. günden sonra azalmaktadır. Sonuç olarak UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün stabilitesi 5 gün olarak elde edilmiştir.

3.4. KAM Etken Maddesine Ait Bulgular

3.4.1. MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörün Karakterizasyonu

3.4.1.1. Elektrokimyasal Karakterizasyon

Elektrokimyasal karakterizasyon, MIP kaplı elektrot yüzeyinin iletken özellikleri hakkında değerli bilgiler verir ve bu amaçla DV yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan MIP temelli SPAuE yüzeylerinin iletkenlik ve yük transfer özellikleri açısından elektrokimyasal karakterizasyon yoluyla incelenmesi gerekmektedir. Burada DV ve çıplak ve değiştirilmiş elektrot yüzeyleri üzerinde elektron transfer süreçlerini iyice göstermek için önemli yöntemlerdir. Bu nedenle redoks probu olarak 5.0 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} çözeltisi kullanıldı. İlk adım olarak, yalın SPAuE ve poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörü üzerinde DV ölçümleri yapıldı (EP'den sonra, KAM'ın uzaklaştırılmasından sonra ve yeniden bağlandıktan sonra) (Şekil 3.27). Yüzeyde polimerik bir filmin bulunmaması sayesinde redoks probu en yüksek pik akımı değerine ulaşır. Öte yandan, SPAuE yüzeyinde aktif ve etkili elektron transferini engelleyen yalıtkan polimerik filmin oluşması nedeniyle EP'den sonra redoks probunun pik akımı değeri kaybolur. KAM'ın uzaklaştırılmasından sonra, MIP filminin yapısında spesifik bağlanma boşluklarının oluşması, elektron transferinin hızlanmasına ve redoks probunun pik akımı değerinde artışa neden olur. KAM'ın yeniden bağlanması ile beklendiği gibi redoks probunun zirvesinde bir azalmaya gözlenir.

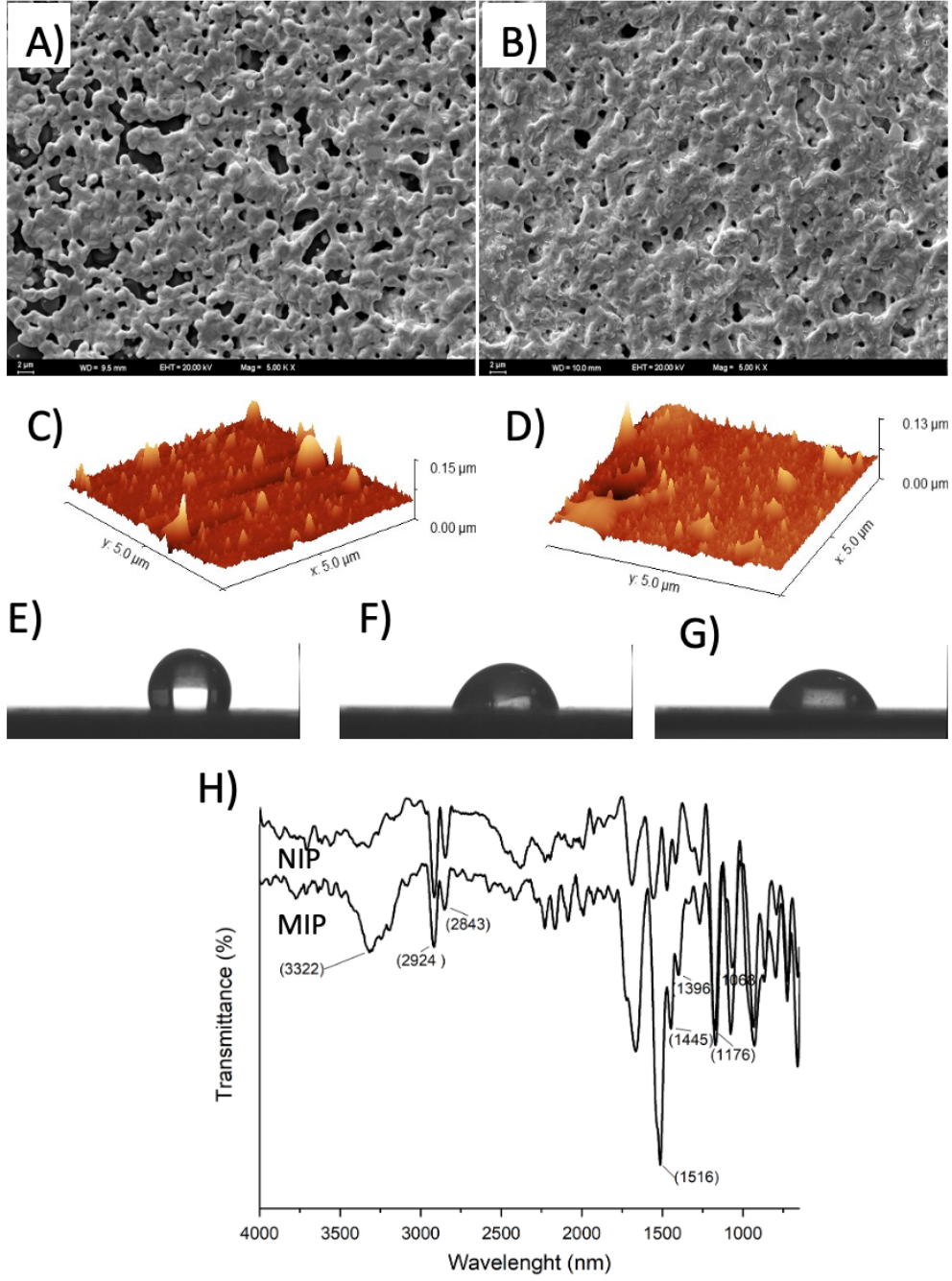


Şekil 3. 27. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün hazırlanması aşamalarında DV grafikleri.

3.4.1.2. Geliştirilen Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE Sensörünün Yüzey Karakterizasyonu

Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün yüzey karakterizasyonu FTIR, SEM, AFM ve temas açısı ölçümleriyle gerçekleştirildi. SEM kullanılarak poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün morfolojik analizi yapıldı (Şekil 3.28.A ve Şekil 3.28.B). MIP için pürüzlü ve düzensiz yapıların yanı sıra daha gözenekli ve boşluklu yapılar elde edilirken, NIP yüzeyinde ise daha kalın yapılar mevcuttur. Şekil 3.28.E'de gösterilen polimerik filmin hidrofiliğini doğrulamak için temas açısı ölçümleri yapıldı. Boş yüzeyin temas açısı değeri 106.5° (Şekil.2.28.E), MIP elektrot yüzeyinin temas açısı değeri 78.9° (Şekil 3.2.F) ve NIP elektrot yüzeyinin ise 71.6° (Şekil 3.2.G) olarak bulundu. Elektrot yüzeyinde tanıma boşluklarının ve pürüzlülüğün oluşması nedeniyle bu sonuç MIP'nin NIP'den önemli ölçüde daha hidrofilik olduğunu göstermiştir. NIP ve MIP için AFM görüntüleri elde edildi ve sonuçlara göre NIP'in AFM'sinin Şekil 3.28.D düzenli bir yapı ortaya koyarken MIP yüzeyinin düzensiz olması hedef molekülün baskılanmasıyla bağlantılı olabileceğini gösterdi. FTIR spektrumlarına göre, 1516 ve 14745 cm^{-1} 'deki bantlar benzenoid halkalarının C=C gerilme titreşimlerini gösterir; 2843 ve 29274 cm^{-1} 'deki bantlar ise aromatik C-H gerilme titreşimlerine ait bantlardır ve 3332 cm^{-1} 'deki bant N-H gerilmesiyle ilişkilidir. Ayrıca, 1396 , 1176 ve 1068 cm^{-1} 'deki bantlar sırasıyla B-O gerilmesinin, B-O-H bükülmesinin ve B-O-H deformasyonuna ait bantları göstermektedir. Bu da geliştirilen

sensörün yüzeyinde boronik asit grupların etkili bir şekilde entegre edildiğini gösterir (Şekil 3.28.H).



Şekil 3. 28. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörün yüzey karakterizasyonları. (A) MIP ve (B) NIP'in SEM görüntüleri; (C) MIP ve (D) NIP'in AFM görüntüleri; (E) normal yüzey, (F) MIP ve (G) NIP'nin temas açısı görüntüleri, (H) MIP ve NIP'in ATR-FTIR spektrumları.

3.4.2. MIP Temelli Elektrokimyasal Sensörlerin Deneysel Parametrelerinin Optimizasyonu

3.4.2.1. Monomer/Hedef Molekül Oranı

Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörü için EP ile yapılan polimerik filmler için çeşitli monomer: hedef molekül oranları (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1) kullanılmıştır ve hedef molekülün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen pik akımı değerleri ile EP sonrasında elde edilen pik akımı değerleri farkı alınarak hesaplanmıştır (Şekil 3.29.A). En etkili ve stabil polimerleri elde etmek amacıyla monomer:hedef molekül oranı bu sensör için en iyi değer olan 1:1 oranı seçilmiştir. KAM ve fonksiyonel monomer (Py-co-p-ABA) arasındaki fonksiyonel grupların potansiyel etkileşimlerinin yüksek olması hedef moleküle özgünlük ve seçicilik kazandırır. DIP'lerin sentezi için poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE ve poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE'de aynı polimer hazırlama ön adımları uygulanarak hedef molekülün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen pik akımı değerleri ile EP sonrasında elde edilen pik akımı değerleri farkı alınarak hesaplanmıştır. poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE ve poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE sensörleri için iyi monomer :hedef molekül oranı sırasıyla 3:1 ve 1:1 olarak bulunmuştur (Şekil 3.30.A ve Şekil 3.31.A).

3.4.2.2. EP Döngü Sayısı

Uygun monomerlerin ve oranların seçilmesinin ardından istenen kalınlık ve stabiliteye sahip bir polimer elde etmek için DV tekniği kullanılarak 3, 5, 7, 10 ve 15 döngü sayıları ile üretilmiştir. En iyi ve tekrar edilebilir döngü sayısını belirlemek için, hedef molekülün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen pik akımı değerleri ile EP sonrasında elde edilen pik akımı değerleri farkı alınarak değerlendirilmiştir. Pik akımları arasındaki fark 3 döngüde maksimum değere ulaşmış ve 10 döngüden sonra değişmeden kalmıştır. Bu nedenle EP için en kararlı ve tekrar edilebilir döngü sayısı 10 döngü olarak belirlenmiştir (Şekil 3.29.B). Aynı işlemler DIP temelli sensörler içinde denenmiştir. GUA ve DMF kullanılarak hazırlanan DIP temelli sensör de EP işlemi için her iki sensör 5 döngü DV ile polimerize olmuştur (Şekil 3.30.B and Şekil 3.31.B).

3.4.2.3. Hedef Molekölün Uzaklaştırma Çözeltileri ve Uzaklaştırma Süresi

Bu adımda hedef molekülün uzaklaştırılmasının ardından belirli bir boşluk oluşturulur ve analit bu boşluğa kolaylıkla bağlanır. EP yönteminde, uzaklaştırma çözeltileri olarak; asetat tampon çözeltisi (AT, pH 4.7) , FT (pH 6.0, 7.0 ve 8.0) ve Britton-Robinson tamponu (pH 9.0 için BRT) kullanılmıştır. En iyi pik akım değeri pH 7.0 olan FT çözeltisinde elde edilmiştir. Bu tampon, 1:1 hacim oranında sodyum klorür (NaCl, 0,1 M), metanol (MeOH), asetonitril (ACN) ve aseton ile karıştırılmıştır ve KAM'ı ne kadar iyi uzaklaştırabildiğini görmek için test edilmiştir. En iyi uzaklaştırma çözeltisi olarak pH 7.0 FT-0.1 M NaCl seçildi (Şekil 3.29.C). DIP temelli sensörler içinde uzaklaştırma çözeltisi olarak FT (pH 6.0, 7.0 ve 8.0) ve Britton-Robinson tamponu (pH 9.0 için BRT) kullanılmıştır. En iyi pik akım değeri pH 7.5 olan FT çözeltisinde elde edilmiştir. Bu tampon, 1:1 hacim oranında sodyum klorür (NaCl, 0,1 M), metanol (MeOH), asetonitril (ACN) ve aseton ile karıştırılmıştır ve KAM'ı ne kadar iyi uzaklaştırabildiğini görmek için test edilmiştir. Her iki DIP temelli sensör içinde pH 7.5 FT-0.1 M NaCl seçilmiştir (Şekil 3.30.C and Şekil 3.31.C)

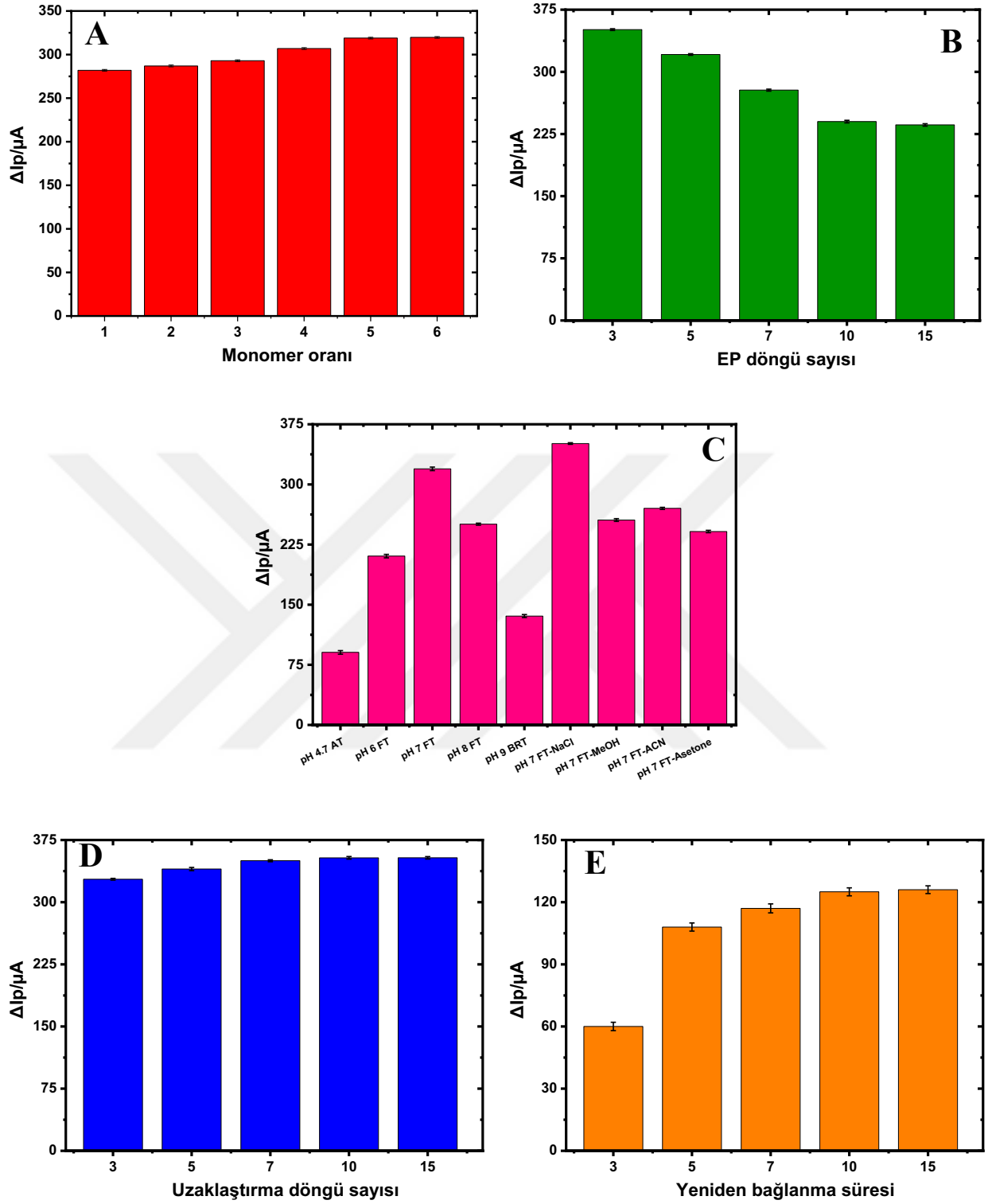
MIP ve DIP temelli sensörler için uzaklaştırma süresi de optimize edildi. Bunun içinde 3, 5, 7, 10 ve 15 döngüden sonra hedef molekülleri ortamdan uzaklaştırmak için DV yaklaşımı kullanıldı. Şekil 3.29.D'de görülebileceği gibi en iyi sonuca 10 döngüden sonra ulaşılmıştır ve tüm adımlarda bu uzaklaştırma döngü sayısı kullanılmıştır. Ayrıca DIP temelli sensörler içinde aynı uzaklaştırma döngü sayıları test edilmiştir. En yüksek ΔI değeri GUA ile hazırlanan sensörde 7 döngü ile elde edilirken, DMF ile hazırlanan sensörde ise 3 döngü ile elde edilmiştir. MIP ve NIP için en kararlı ve tekrarlanabilir sonuçlar optimum uzaklaştırma döngü sayıları süresi olarak belirlenmiştir (Şekil 3.30.D ve 3.31.D).

3.4.2.4. Hedef Molekölün Yeniden Bağlanma Süresi

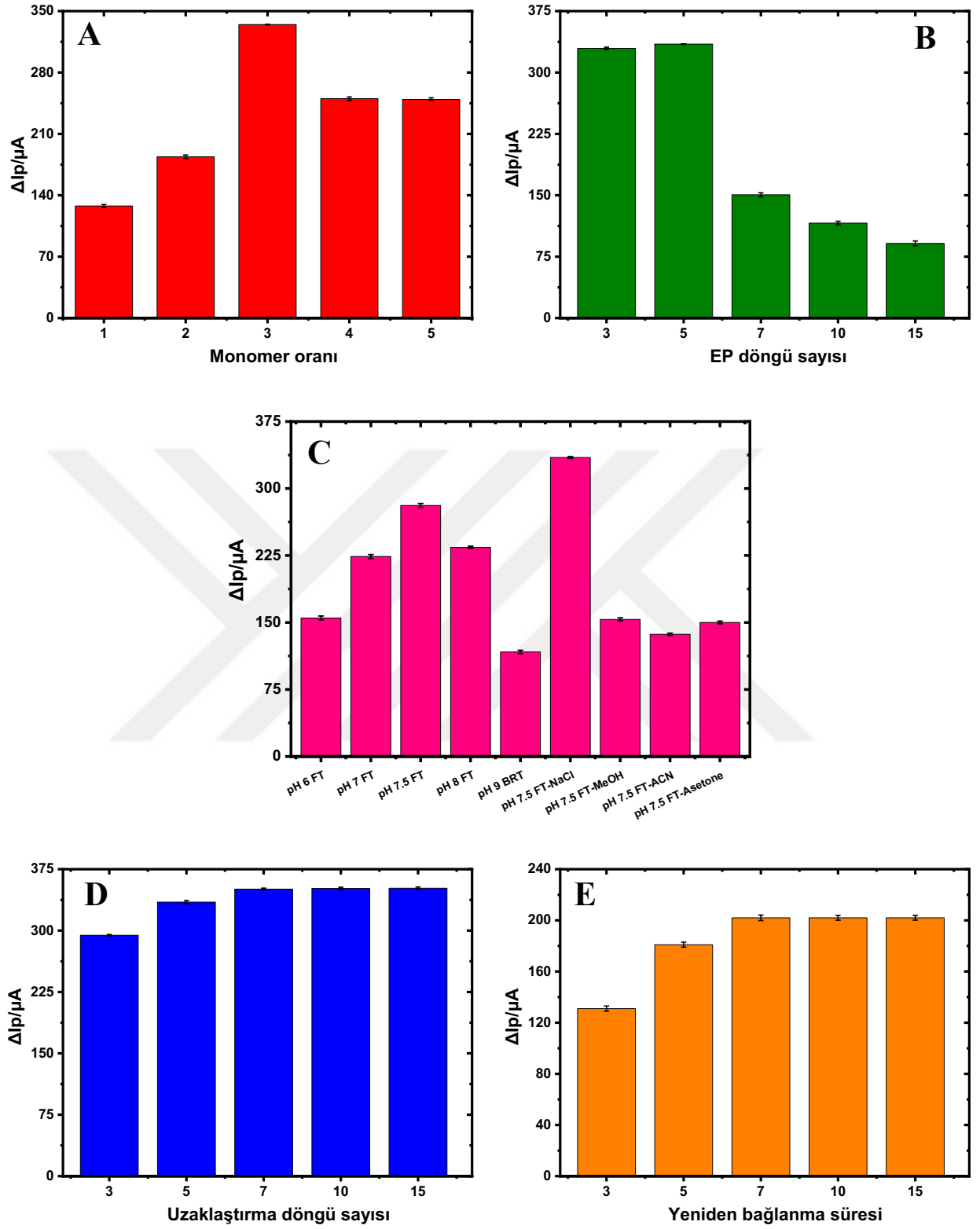
Optimizasyon parametrelerinden önemli olan diğer bir parametre hedef molekülün yeniden bağlanması işlemidir. EP için hazırlanan MIP tabanlı sensör, farklı sürelerde (3, 5, 7, 10 ve 15 dakika) yeniden bağlanma üzerindeki etkisini değerlendirmek için 5×10^{-12} KAM çözeltisine daldırıldı ve ThermoShaker (500 rpm, 25°C) kullanılarak incelenmiştir. Hedef molekülün yeniden bağlanması ve uzaklaştırma sonrası pik akımları arasındaki fark değerlendirildiğinde 10. dakikada en yüksek değere ulaştığı ve sonrasında ΔI 'nin hemen hemen aynı kaldığı görülmüştür (3.29.E). KAM için gerçekleştirilen tüm adımlar DIP temelli

sensörler içinde uygulandı. Hazırlanan DIP tabanlı sensörler içinde yeniden bağlanma süresi olarak 3, 5, 7, 10 ve 15 dakika denendi ve bağlanma üzerindeki etkisini değerlendirmek için 5.0×10^{-12} M KAM çözeltisine kullanıldı ve ThermoShaker (500 rpm, 25°C) kullanılarak gerçekleştirildi. Yeniden bağlanma ve uzaklaştırma sonrasındaki tepe akımları arasındaki fark hesaplanarak, stabil ve etkili bağlanma için en uygun yeniden bağlanma süresi hesaplandı. DIP temelli sensörlerden poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE için yeniden bağlanma süresi 7 dakika iken, poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE için yeniden bağlanma süresi 5 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 3.30.D ve 3.31.D).

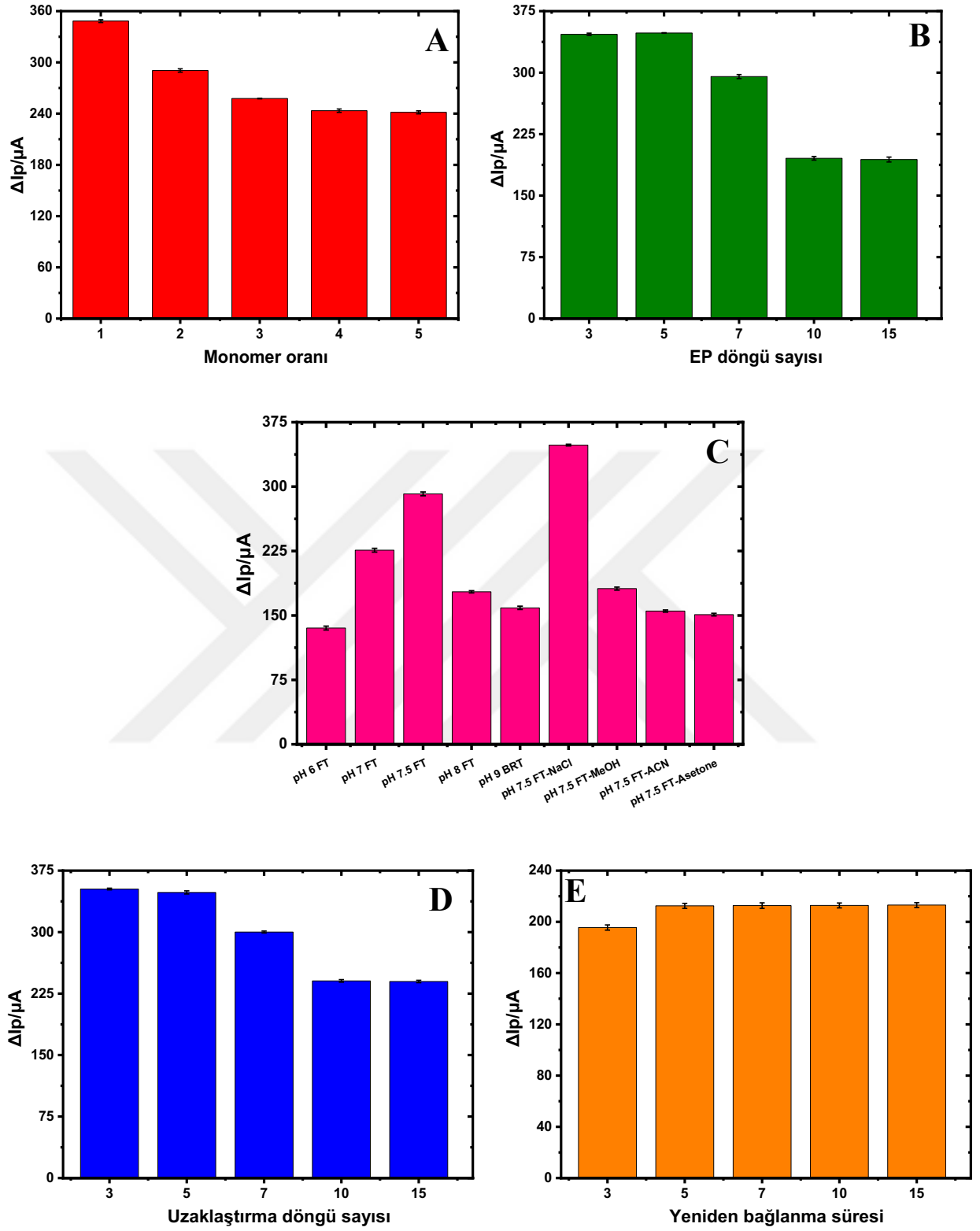




Şekil 3. 29. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörüne ait optimizasyon parametreleri için ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltileri, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) KAM için yeniden bağlanma süresi.



Şekil 3. 30. Poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE sensörüne ait optimizasyon parametreleri için ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltileri, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) KAM için yeniden bağlanma süresi.



Şekil 3. 31. Poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE sensörüne ait optimizasyon parametreleri için ΔI_p değerlerinin grafikleri. (A) monomer oranı, (B) EP döngü sayısı, (C) uzaklaştırma çözeltileri, (D) uzaklaştırma döngü sayısı, (E) KAM için yeniden bağlanma süresi.

3.4.3. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE, Poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE ve Poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE Sensörlerin Analitik Performanslarının Değerlendirilmesi

Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün analitik performansı, 2.5×10^{-13} M ile 2.5×10^{-12} M arasındaki doğrusal derişim aralığında KAM'ın belirlenmesiyle değerlendirilmiştir (Şekil 3.32.A ve Şekil 3.32.B). Bu derişim aralığında 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu kullanılarak dolaylı ölçümlerle regresyon denklemi $\Delta I(\mu\text{A}) = 7.37 \times 10^{13} (\mu\text{A/M}) \times C(\text{M}) + 103.02$ ($r = 0.998$) elde edildi. Baskılama prosesi ile kazanılan seçiciliği göstermek amacıyla aynı derişim aralığında KAM'ın belirlenmesi için NIP/SPAuE'de gerçekleştirilmiştir. NIP'in, poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün KAM'a olan ilgisini ve seçiciliğini doğrulayan doğrusal bir yanıt vermediğine dikkat edilmelidir. TS ($TS = 3 \times \frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}}$) ve TAS ($TAS = 10 \times \frac{\text{standart sapma}}{\text{eğim}}$) formülleri kullanılarak sırasıyla 2.34×10^{-13} M ve 7.79×10^{-13} M olarak hesaplandı (Ozkan vd., 2015; "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology," 1995).

DIP temelli elektrokimyasal sensörlerden poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE ve poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE'nin analitik performansı DPV tekniği kullanılarak (Şekil 3.32.C, Şekil 3.32.E) farklı KAM derişimlerinin yeniden bağlanması ile sırasıyla 2.5×10^{-12} - 2.5×10^{-11} M ve 2.5×10^{-12} - 5.0×10^{-11} arasında doğrusallık elde edilmiştir (Şekil 3.32.D, Şekil 3.32.F ve Çizelge 3.13). Regresyon denklemleri bu derişim aralığında Poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE ve poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE sensörleri için aşağıda hesaplanmıştır:

$$\Delta I(\mu\text{A}) = 4.05 \times 10^{12} (\mu\text{A/M}) \times C(\text{M}) + 178.79 \quad (r = 0.999)$$

$$(\text{Poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE})$$

$$\Delta I(\mu\text{A}) = 2.32 \times 10^{12} (\mu\text{A/M}) \times C(\text{M}) + 217.67 \quad (r = 0.999)$$

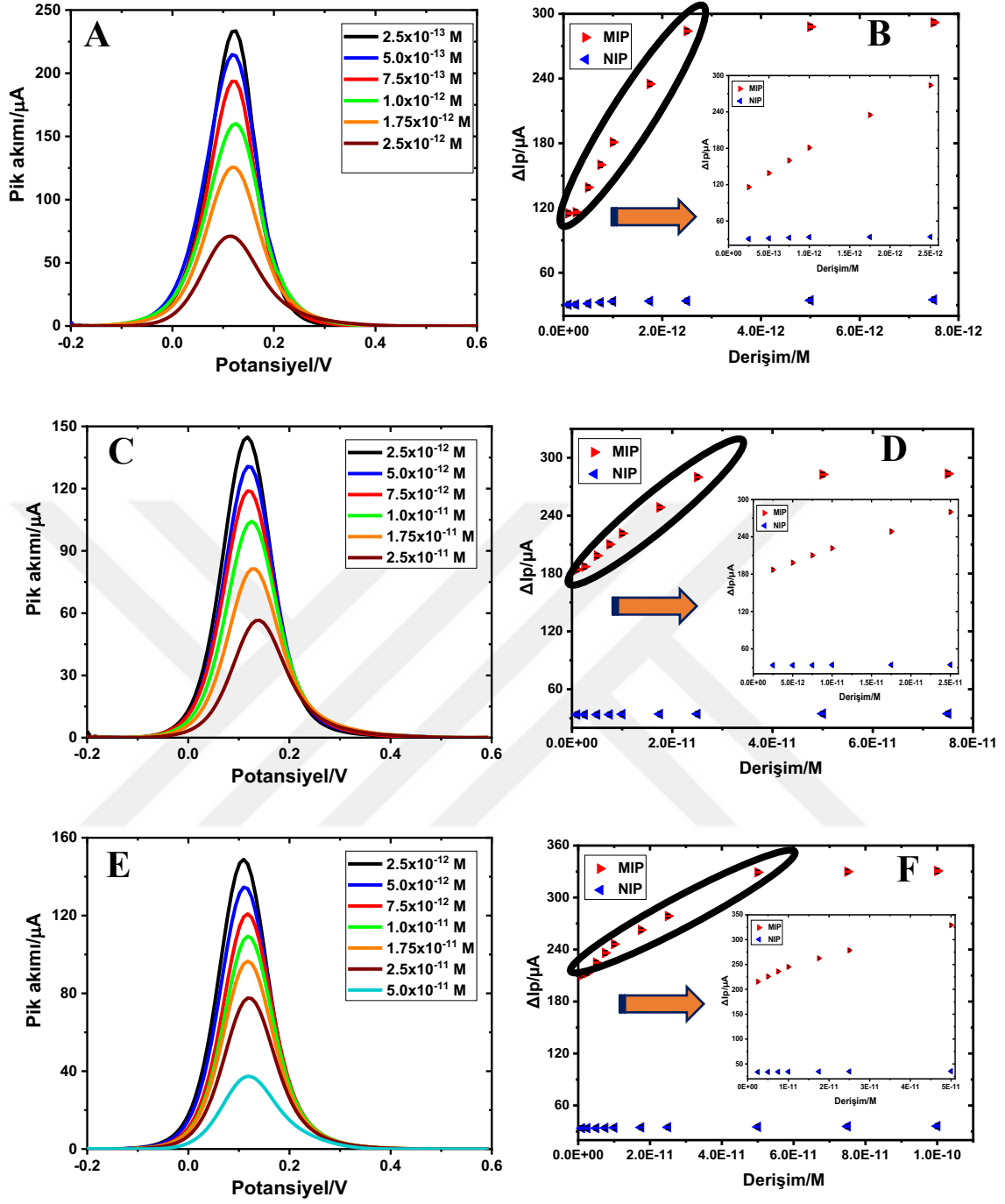
$$(\text{Poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE})$$

Tüm bu ölçümlerde redoks probu olarak 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmıştır. Regresyon parametrelerinin sonuçları Çizelge 3.13'de detaylı bir şekilde özetlenmiştir. Ayrıca

DIP temelli sensörler için TS ve TAS değerleri sırasıyla 8.35×10^{-14} - 2.78×10^{-13} M ve 2.38×10^{-13} - 7.92×10^{-13} M olarak bulunmuştur.

MIP ve DIP temelli sensörler karşılaştırıldığında, MIP temelli poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörü optimum koşullar altında diğer sensörlere göre oldukça hassas ve daha seçici yöntem sundu (Şekil 3.32.A). İncelenen derişim aralığında KAM'ın belirlenmesiyle, NIP temelli sensörün performansı hedef molekül KAM'ın yokluğunda sensörler hazırlanarak test edildi. Şekil 3.32.B'de MIP eğrisi (kırmızı renk), KAM derişimleriyle orantılı olarak artan ΔI ile doğrusal bir yanıt gösterdi. KAM için NIP'e özgü tanıma bölgeleri olmadığından, NIP eğrisi (mavi renk) MIP'den oldukça küçük bir ΔI değerine sahiptir.





Şekil 3. 32 (A) Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE, (C) poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE, (E) poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE sensörlerin DP voltammogramları; (B) poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE, (D) poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE, (F) poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE sensörlerin kalibrasyon eğrisi.

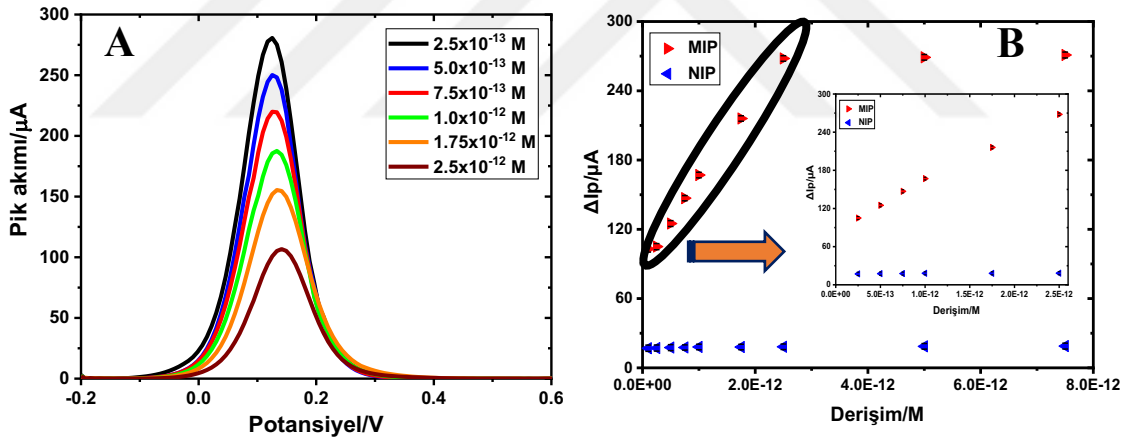
Çizelge 3. 13. MIP and DIP sensörlerinin KAM için kalibrasyon eğrisine ait regresyon verileri ve validasyon parametreler

	poli(Py-co-p- ABA)@KAM@MIP/SP AuE	poli(Py-co-p- ABA)@GUA@DIP/SP AuE	poli(Py-co-p- ABA)@DMF@DIP/SP AuE
Doğrusal çalışma aralığı (M)	$2.5 \times 10^{-13} - 2.5 \times 10^{-12}$	$2.5 \times 10^{-12} - 2.5 \times 10^{-11}$	$2.5 \times 10^{-12} - 5.0 \times 10^{-11}$
Eğim ($\mu\text{A/M}$)	7.37×10^{13}	4.05×10^{12}	2.32×10^{12}
Eğimin standart hatası	2.20×10^{12}	9.04×10^{10}	1.38×10^{11}
Kesişim (μA)	103.02	178.79	217.67
Kesişimin standart hatası	3.17	1.25	2.97
Korelasyon katsayısı (r)	0.998	0.999	0.991
Teşhis sınırı (M)	2.34×10^{-13}	8.35×10^{-14}	2.38×10^{-13}
Tayin alt sınırı (M)	7.79×10^{-13}	2.78×10^{-13}	7.92×10^{-13}
Tekrarlanabili rlik BSS%)*	1.28	1.34	1.49
Tekrar üretilebilirlik (BSS%)*	1.85	2.25	2.33

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

3.4.4. Ticari Serum Numunelerine Uygulanması

KAM'ın kantitatif analizi, MIP tabanlı sensörün düşük derişimlerde çok yüksek afiniteye sahip olduğunu belirledi. Analiz sonuçlarına göre geliştirilen sensörün hassasiyetini gösteren çok düşük LOD (4.19×10^{-14} M) ve LOQ (1.40×10^{-13} M) değerleri elde edilmiştir. Elde edilen DP voltammogramların tepe akımlarına göre doğrusal regresyon denklemi $\Delta I (\mu A) = 7.14 \times 10^{13} (M) + 91.13$ ($R = 0,999$) olarak bulunmuştur (Şekil 3.33). NIP tabanlı sensör tarafından elde edilen kalibrasyon eğrileri doğrusal değildi. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörü ticari serum numunelerinde KAM'ın doğru tespiti için başarıyla geliştirildi ve değerlendirildi. Sensör, karmaşık matrislerde KAM'ı tespit etmede yüksek hassasiyet, seçicilik ve doğruluk gösterdi (Çizelge 3.14). Geri kazanım çalışmaları sırasında, numunelere analitin bilinen derişimleri eklenmiş ve numunelerdeki analitin derişimini ölçmek için Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE kullanılmıştır. Geri kazanım çalışmalarından elde edilen sonuçlar, çok iyi geri kazanım yüzdeleri ve BSS değerleri ile oldukça tatmin ediciydi.



Şekil 3. 33. (A) Serum örneğinde Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE için DP voltammogramları, (B) serum numunesindeki çeşitli KAM derişimlerinin yeniden bağlanmasından sonra elde edilen kalibrasyon eğrileri

Çizelge 3. 14. Ticari serum numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları

Serum			
Numune derişimi (M)	5.00×10^{-13}	7.50×10^{-13}	1.00×10^{-12}
Eklenen miktar (M)	5.00×10^{-13}	2.50×10^{-13}	0.75×10^{-12}
Bulunan miktar (M)*	9.94×10^{-13}	9.96×10^{-13}	1.73×10^{-12}
Geri kazanım (%)*	99.36	99.47	100.51
BSS%	1.62	1.18	1.29
BH%	0.64	0.53	-0.51

3.4.5. Geliştirilen Sensörlerin Seçicilik Çalışmaları

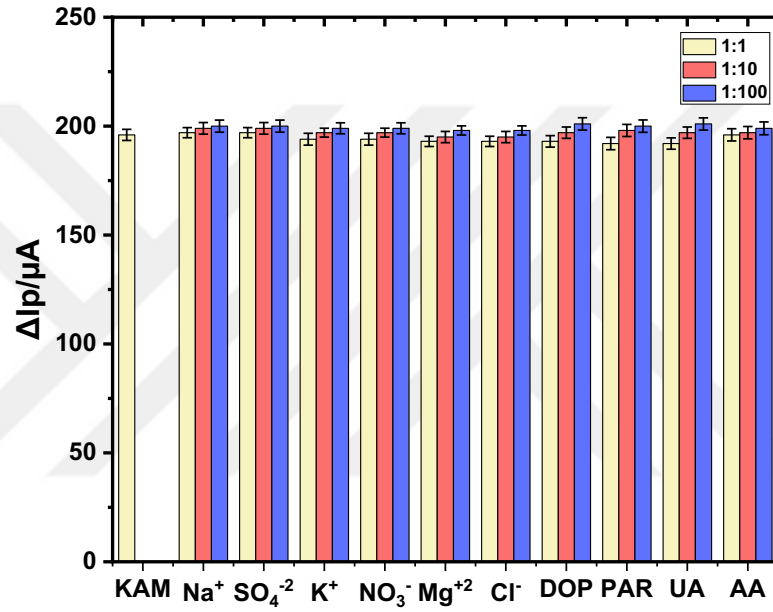
MIP'leri elektrokimyasal sensörlere entegre etmenin en büyük avantajı, hedef molekül için üstün seçicilik ve afinite elde etmektir. Bu avantajı vurgulamak ve benzer yapılara sahip diğer moleküllere (metformin (MET), L-arjinin (L-ARG), otilyum bromür (OTI), ipratropium bromür (IPR), repaglinide (REPA), guanidin (GUA) ve dimetilformamit (DMF) kıyasla sensörün seçiciliğini doğrulamak için baskılama faktörü (IF) hesaplandı. IF hesaplanırken KAM için elde edilen ΔI değerleri diğer moleküller için elde edilen değerlerle karşılaştırıldı. Bu hesaplama hem MIP hem de NIP için yapıldı. Göreceli IF (IF'), MIP ve NIP için bulunan IF değerlerinin birbirine oranı olarak hesaplandı. Poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE ve poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE ile yapılan sensörlerin KAM'a seçicilik katsayısı sırasıyla 2.06 ve 2.36 olarak hesaplandı. Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörü, poli(Py-co-p-ABA)@GUA@DIP/SPAuE ve poli(Py-co-p-ABA)@DMF@DIP/SPAuE'ye göre KAM'a karşı iyi performans göstermiştir ve elde edilen değerler Çizelge 3.15' de verilmiştir.

Çizelge 3. 15. KAM ve benzeri ilaç maddelerinin seçicilik değerleri

Etken Madde	MIP/SPAuE		NIP/SPAuE		
	$\Delta I/\mu A$	$k_{(MIP)}$	$\Delta I/\mu A$	$k_{(NIP)}$	$k'_{(MIP/NIP)}$
KAM	139.45	-	13.4	-	-
MET	48.52	2.87	34.29	0.39	6.53
L-ARG	55.30	2.52	43.67	0.31	6.29
OTI	33.90	4.11	28.40	0.47	6.99
IPR	22.60	6.17	19.50	0.69	6.62
REPA	26.50	5.26	22.70	0.59	6.87
GUA	50.66	2.75	30.65	0.44	6.25
DMF	47.45	2.94	29.72	0.45	6.53

3.4.6. İnterferans Çalışmaları

Dopamin (DOP), parasetamol (PAR), askorbik asit (AA), ürik asit (UA), katyonlar (Na^+ , K^+ ve Mg^{2+}) ve anyonlar (Cl^- , NO_3^- ve SO_4^{2-}) gibi biyolojik numunelerde bulunan en yaygın interferans ajanların KAM ile etkileşip etkileşmediği değerlendirildi. Girişim çalışmalarında 100 kat daha fazla girişim maddesi eklenerek 7.5×10^{-13} M KAM kullanıldı. Bu girişim ajanlarının poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörü üzerindeki KAM'ın belirlenmesinde önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir (Şekil 3.34).



Şekil 3. 34. DPV yöntemi kullanılarak Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün 1:1, 1:10 ve 1:100 oranında girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen çubuk grafikleri.

3.4.7. Stabilitite

Poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün tekrarlanabilirliğini belirlemek için üç farklı (2.5×10^{-13} M, 7.5×10^{-13} M ve 1.75×10^{-12} M) derişimler için tekrar edilebilir 5 sonuç ile kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen %BSS değeri ≤ 2.17 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca geliştirilen sensörün elektrotlar arası tekrar edilebilirliği 7.5×10^{-13} M KAM için test edilmiştir. 5 farklı elektrotun yanıtı değerlendirilerek sensörlerin %BSS değerleri hesaplanmıştır ve elde edilen %BSS değeri 1.92 olarak bulunmuştur. Son olarak, geliştirilen sensörlerin stabilitesini değerlendirmek için 1., 3., 5., 7. ve 10.güne kadar

elektrotlar desikatörde saklandı ve polimerizasyon sonrası pik akımı değerleri okunarak hesaplandı. Stabilit e  alışmaları sonucunda EP yöntemiyle geliştirilen sensörün performansı 3.günün sonunda %95, 5.günün sonunda %88, 7.günün sonunda %82 ve 10.günün sonunda %75 olarak stabil kalmıştır. Bu veriler ışığında KAM için EP kullanılarak oluşturulan sensörün performansı 3. günden sonra azalmaktadır. Sonuç olarak, poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün stabilitesi 3 gün olarak elde edilmiştir.



4. TARTIŞMA

Doktora tezi kapsamında antiviral ilaç etken maddelerinden RIB, MOL, UMI ve KAM için MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. Bu sensörlerin hazırlanması, karakterizasyonu, deneysel koşulların optimizasyonu, sensörün analitik performansının değerlendirilmesi ve validasyonu için çeşitli elektrokimyasal, spektroskopik ve mikroskopik tekniklerden yararlanılmıştır. Geliştirilen sensörlerin doğruluğunun ve uygulanabilirliğinin ortaya koyulması için farmasötik dozaj formlarına, ticari serum ve idrar numunelerinden analizleri gerçekleştirilmiştir ve başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Giriş bölümünde antiviral ilaçların önemi , COVID-19 tanısına yönelik mevcut yaklaşımlar, tez kapsamında kullanılan antiviral ilaç etken maddeleri hakkında bilgiler, moleküler baskılama teknolojisi ve MIP temelli yaklaşımlar ayrıntılı bir şekilde tartışılmıştır. Ayrıca, bu bölümde kullanılan elektrokimyasal yöntemler, elektroanalitik sensörlerin validasyonu ve tezde kullanılan antiviral ilaçlarla ilgili literatürde yer alan mevcut çalışmalarla ilgili detaylı bilgiler de sunulmuştur.

Gereç ve yöntem kısmında tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, ekipmanlar ve elektrokimyasal sistem ve bileşenleri hakkında detaylı bilgiler verilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan antiviral ilaç etken maddelerinin standart çözeltilerinin hazırlanması, destek elektrolitlerin, farmasötik dozaj formların, ticari serum ve idrar numunelerin ve girişim çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanması anlatılmıştır. Antiviral ilaç etken maddeleri için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlere ait tüm sonuçlar Bulgular kısmında ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

DV, DPV ve EIS temelli elektrokimyasal ölçümlerde redoks probu olarak 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti doğrudan hedef moleküle ait pik akımlarını ölçmek yerine hedef molekülün uzaklaştırılması ve yeniden bağlanmasından sonra elde edilen pik akımı değerleri arasındaki farkların değerlendirilmesiyle analizlerin dolaylı yöntem ile gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Böylelikle doğrudan yöntemlere göre daha düşük derişimlerde çalışma ve daha düşük TS ve TAS değerlerine ulaşma imkanı sağlamıştır.

Doktora tezi kapsamında çalışılan antivirallerden ilk olarak bu grubun en çok bilinen ve kullanılan RIB'in elektrokimyasal analizi için farklı polimerizasyon teknikleri kullanılarak MIP temelli sensörler geliştirilmiştir ve validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak EP yöntemi için polimerizasyon çözeltisi pirol (Py, 50 mM), para aminofenil boronik asit (p-AFBA, 10 mM), RIB (10 mM) ve destekleyici elektrolit çözeltisi (pH 7.4, fosfat tampon çözeltisi (FT)/katkılayıcı/karşı iyon olarak 100 mM LiClO₄) kullanılarak hazırlanmıştır. EP, 100 mV/s tarama hızında -0.2 ile +1.6 V arasında 15 döngü DV ile gerçekleştirilmiştir. Monomer: hedef molekül oranı, EP döngü sayısı, uzaklaştırma çözeltileri, uzaklaştırma döngü sayısı ve hedef molekülün yeniden bağlanma süresi gibi sensörün performansını arttıran optimizasyon parametreleri belirlenmiştir. Diğer bir yöntem olan FP için polimerizasyon çözeltisi RIB (10 mM, 0.1 mL), fonksiyonel monomer UraM (10 mM, 0.1 mL), polivinil pirolidin (PVP, 25 mg/mL), 0.5 mL HEMA (temel monomer) , 0.1 mL EGDMA (çapraz bağlayıcı) ve başlatıcı (AIBN, 2 mg/mL) eklenerek hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 0.25 µL'lik kısım CKE yüzeyine damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında 100W, 365 nm UV lamba altında 5 dakika tutularak FP işlemi gerçekleştirilmiştir. Sensörün performansını etkileyen monomer: hedef molekül oranı, damlatma hacmi, FP süresi, uzaklaştırma çözeltileri, uzaklaştırma süresi ve hedef molekülün yeniden bağlanma süresi gibi deneysel parametreler optimize edilmiştir. Her iki sensör için belirlenen en iyi optimizasyon parametreleri kullanılarak RIB analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, kapsül formuna ve ticari serum numunelerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Geliştirilen sensörler için seçicilik, interferans ve stabilite çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Validasyon parametreleri yönünden kıyaslandığında FP yönteminin daha hassas, daha düşük doğrusallık aralığı, düşük TS (8.63×10^{-13} M) ve TAS (2.87×10^{-12} M) değerleri ve sensörün stabilitesinin daha uzun olduğu görülmüştür.

MOL için ilk kez MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Moleküler baskılanmış gözenekli polimerik filmler EP ve FP yöntemleri kullanılarak hazırlanmıştır. EP için Py (50 mM), 3-tiyenil boronik asit (3-TBA, 10 mM) ve MOL (10 mM), EP işlemi için destekleyici elektrolit olarak LiClO₄ (0,1 M) içeren FT (pH 7.5) çözeltisi kullanılmıştır ve elektrot, 100 mV/s tarama hızında -0.2'den +1.6 V'ye kadar 10 döngü DV ile taranarak polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. FP için stok monomer çözeltisi, monomer:hedef molekül kompleksi (10 mM GuaM ve 10 mM MOL), HEMA (100 µL, temel monomer) ve EGDMA (20 µL, çapraz bağlayıcı) karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 10 dakika sonikatörde bekletilmiştir ve bu çözeltiye başlatıcı olarak 2-hidroksi-2 metilpropiofenon (2 µL) ilave edildikten sonra 0,5 µL doğrudan elektrot yüzeyine

damlatılmışır ve 5 dakika UV ışık altında tutulup polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerin farklı derişimlerde bağlanması ile MOL için miktar tayini yapılmıştır. EP ve FP yöntemleri kullanılarak geliştirilen sensörlerin doğrusalık aralığı sırasıyla 7.5×10^{-12} – 2.5×10^{-10} M ve 7.5×10^{-13} – 2.5×10^{-11} M olarak elde edilmiştir. Ayrıca, EP ve FP için TS ve TAS değerleri sırasıyla 6.01×10^{-13} – 2.00×10^{-12} M ve 1.13×10^{-13} - 3.76×10^{-13} M olarak bulunmuştur. Sensörlerin tekrar üretilebilirliğini araştırmak amacıyla MOL, beş farklı sensör ile analiz edilmiş ve pik akımlarının %BSS değeri hesaplanmıştır. Sonuçlar geliştirilen sensörlerin MOL'un elektrokimyasal tayini için tekrarlanabilir olduğunu kanıtlamıştır.

UMI için ilk kez MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen UMI@B₃N₃/BuMA@MIP/CKE sensörünün DPV ve EIS yöntemleri ile UMI'nin analizinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Sensörün doğrusal çalışma aralığı DPV kullanılarak 5.0×10^{-13} M ile 7.5×10^{-12} M, EIS kullanılarak 2.5×10^{-13} M ile 5.0×10^{-12} M arasında bulunmuştur. Her iki yöntemin UMI analizi için validasyon parametreleri yönünden değerlendirildiğinde EIS yönteminin daha hassas ve daha etkili olduğu görülmüştür. Geliştirilen sensörün uygulanabilirliğini göstermek amacıyla ticari serum ve idrar numunelerine standart ekleme yöntemi ile UMI içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile gerçekleştirilmiştir.

KAM için perde baskılı altın elektrotlar (SPAuE) kullanılarak ilk kez MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak, SPAuE'ler kullanılmadan önce 0.1 M H₂SO₄ ile 100 mV/s tarama hızında -0.2'den +1.6 V'ye kadar 15 döngü DV ile yüzey aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Moleküler baskılanmış gözenekli polimerik filmler EP yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. EP için Py (50 mM), para amino benzoik asit (p-ABA, 10 mM) ve KAM (10 mM), destekleyici elektrolit olarak 0.1 M NaCl içeren FT (pH 7.0) çözeltisi kullanılmıştır ve 100 mV/s tarama hızında -0.2'den +1.6 V'ye kadar 3 döngü DV ile polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. KAM'ın kimyasal yapısında benzer moleküller baskılanarak yalancı MIP temelli sensörler geliştirilmiştir. Bunun içinde GUA ve DMF etken maddeleri kullanılmıştır. Bu iki etken madde içinde ayrı ayrı MIP temelli sensörler geliştirilmiştir. KAM için takip edilen polimerizasyon adımları aynı şekilde GUA ve DMF içinde hazırlanmıştır. GUA ve DMF için 100 mV/s tarama hızında -0.2'den +1.6 V'ye kadar 5 döngü DV ile polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerin validasyon parametreleri dikkate alındığında KAM tayini için ticari serum numunelerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerde standart KAM çözeltileri ticari serum numunelerine

ilavesiyle geri kazanım çalışmaları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. %99.36 ile %100.51 arasında elde edilen %geri kazanım sonuçları sensörün ticari serum analizlerinde uygulanabilirliğini göstermiştir.

Sonuç olarak, RIB, MOL, UMI ve KAM'ın analizi için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörler bu moleküllerin analizi için literatürde yer alan diğer çalışmalara kıyasla daha hassas, daha kolay uygulanabilir, daha düşük maliyetli, çevre ve kullanıcı dostu olması dolayısıyla öne çıkmaktadır. Ayrıca geliştirilen bu sensörler ayrıntılı bir şekilde valide edilmiştir ve tüm bu özellikler dikkate alındığında geliştirilen analiz yöntemlerinin RIB, MOL, UMI ve KAM'ın rutin ve klinik analizler için alternatif yöntemler olabileceği düşünülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında antiviral ilaç etken maddelerden RIB, MOL, UMI ve KAM'ın elektrokimyasal analizi için MIP temelli sensörlerin geliştirilmesi ve bu sensörlerin farmasötik formlara, ticari serum ve idrar numunelerine başarılı bir şekilde uygulanması hedeflenmiştir. Bu antiviral ilaç etken maddelerin analizi için geliştirilen MIP temelli elektrokimyasal sensörlerin analitik yöntem validasyonunun yapılması ve analitik uygulamalar sırasında hızlı, seçici, duyarlı, kararlı, pratik olması ve kolayca üretilmesi amaçlanmıştır.

Poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE ve UraM/RIB@MIP/CKE sensörleri, RIB'ın farmasötik formlarda ve ticari serum numunelerinde belirlenmesi için farklı polimerizasyon teknikleri kullanılarak geliştirilen ilk MIP temelli elektrokimyasal sensörlerdir. Poli(Py-co-p-APBA)/RIB@MIP/CKE sensörü, RIB varlığında Py ve p-AFBA monomerlerinin elektropolimerizasyonu ile hazırlanırken, UraM/RIB@MIP/CKE sensörü ise RIB varlığında UraM fonksiyonel monomerin fotopolimerizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Her adım, diferansiyel puls voltametri (DPV) ve dönüşümlü voltametri (DV) teknikleri kullanılarak redoks probu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ile kontrol edilmiştir. (MIP) ile geliştirilen sensör yüzeylerinin karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (ft-ir), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), ve temas açısı ölçümleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) tekniği ve DV yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca RIB benzeri maddeler, MIP tabanlı elektrokimyasal sensörün seçiciliğini incelemek için uygulanmıştır. Önerilen (1S,2S)-PSDO@MIP/CKE sensörü, standart çözelti ve sentetik serum numunesi için sırasıyla 2.98×10^{-16} M ve 3.01×10^{-16} M çok düşük teşhis sınırı (TS) elde edilmiştir. Geliştirilen sensörün hassasiyetinin çok yüksek olduğu bulunmuştur. Önerilen MIP sensörü, geleneksel tekniklere göre umut verici bir alternatif tekniktir.

MOL'un hassas ve seçici tespiti için MIP temelli poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörleri geliştirilmiştir. Tasarlanan sensörler, camsı karbon elektrot (CKE) üzerinde EP ve FP yöntemleri kullanılarak hazırlanmıştır. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak hedef molekül MOL'un uzaklaştırılması ve yeniden bağlanmasıyla ilgili MIP yüzeyindeki değişiklikleri gözlemlemek için DPV ve DV

teknikleri kullanılmıştır. Bu sensörlerin uygulanabilirliğini kontrol etmek için aynı koşullar altında hedef molekül MOL içermeyen (NIP) polimer yüzeyler hazırlanmıştır. EP ve FP kullanılarak hazırlanan sensörlerin doğrusallık aralığı sırasıyla $7.5 \times 10^{-12} - 2.5 \times 10^{-10}$ M ve $7.5 \times 10^{-13} - 2.5 \times 10^{-11}$ M olarak elde edilmiştir. Geliştirilen poli(Py-co-3-TBA)/MOL@MIP/CKE ve GuaM/MOL@MIP/CKE sensörlerin seçicilik testleri, diğer benzer moleküllere kıyasla MOL'e karşı yüksek bir seçicilik sergilemiştir. Ek olarak, önerilen sensör, tıbbi formullarda ve ticari serum numunelerinde iyi bir geri kazanım yüzdesi ile MOL'u belirlemek için başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

UMI tespiti için ilk MIP temelli bir elektrokimyasal sensör, CKE üzerinde UMI, B_3N_3 , BuMA, HEMA, EGDMA ve başlatıcı kullanılarak hazırlanmıştır. Aynı koşullar hedef molekül UMI içermeyen NIP polimer yüzeyde geliştirilen sensörün uygulanabilirliğini kontrol etmek için hazırlanmıştır. MIP ile geliştirilen sensör yüzeylerinin elektrokimyasal karakterizasyonları EIS ve DV teknikleri ile, yüzey karakterizasyonları ise SEM, AFM ve temas açısı teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerin DPV ve EIS yöntemleri kullanılarak elde edilen doğrusal çalışma aralığı sırasıyla $5.0 \times 10^{-13} - 7.5 \times 10^{-12}$ M ve $2.5 \times 10^{-13} - 5.0 \times 10^{-12}$ M olarak elde edilmiştir. Geliştirilen UMI@ B_3N_3 /BuMA@MIP/CKE sensörü, UMI'ye karşı mükemmel bir seçicilik göstermiştir. Önerilen sensör, ticari serum ve idrar numunelerinde iyi bir geri kazanım yüzdesi ile UMI'yi belirlemek için başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

KAM'ın seçici ve hassas tayini için, Py ve p-ABA monomerleri kullanılarak SPAuE üzerine elektropolimerizasyon ile MIP temelli bir elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sensör KAM'ın kimyasal yapısında yer alan GUA ve DMF yapıları ile de DIP temelli sensörler hazırlanmıştır. Molekülün tamamının baskılanması ile belirli bölgelerinden baskılanması arasındaki farklar validasyon açısından tartışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre KAM molekülünün tamamen baskılanması KAM'ın analizinde daha hassas ve etkili sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Seçicilik açısından da GUA ve DMF ile kıyaslandığında yaklaşık olarak 6 kat daha seçici olduğu bulunmuştur. Ayrıca, poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün karakterizasyonu için DV, EIS, SEM, AFM ve temas açısı yöntemleri kullanılmıştır. Optimize edilmiş deneysel koşullar altında KAM derişimin 2.5×10^{-13} M ile 2.5×10^{-12} M aralığında ΔI değerine karşı doğrusallık gösterdiği bulunmuştur. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda TS ve TAS değerleri 2.34×10^{-13} M ve 7.74×10^{-13} M olarak bulunmuştur. poli(Py-co-p-ABA)@KAM@MIP/SPAuE sensörünün

ticari serum numunelerinde uygulabilirliğinin doğrulanması için analizler gerçekleştirilmiştir. IF ve girişim çalışmaları ile geliştirilen sensörünün yüksek duyarlılığa, iyi bir seçicilik ve tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermiştir

Sonuç olarak doktora tez çalışması kapsamında antiviral ilaç etken maddeleri olan RIB, MOL, UMI ve KAM tayini için oldukça hassas ve seçici MIP temelli elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir ve bu sensörler ucuz, hazırlaması kolay, evre ve kullanıcı dostu olması, farmasötik formlara, ticari serum ve idrar numunelerine kolaylıkla uygulanabilmesi açısından ilaçların sensörün ilaçların rutin ve klinik analizlerinde avantajlı sensörler olarak değerlendirilebileceği ön görölmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdel Gaber, A. A., Ahmed, S. A., & Abdel Rahim, A. M. (2017). Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of Ribavirin in pharmaceutical dosage form, urine and serum. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2175–S2181. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.051>
- Abdelazim, A. H., Abourehab, M. A. S., Abd Elhalim, L. M., Almrasy, A. A., & Ramzy, S. (2023). Green adherent spectrophotometric determination of molnupiravir based on computational calculations; application to a recently FDA-approved pharmaceutical dosage form. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 285. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121911>
- Abed Alah, M., Abdeen, S., & Kehyayan, V. (2020). The first few cases and fatalities of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) in the Eastern Mediterranean Region of the World Health Organization: A rapid review. In *Journal of Infection and Public Health* (Vol. 13, Issue 10, pp. 1367–1372). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.009>
- Adumitrăchioaie, A., Tertiș, M., Cernat, A., Săndulescu, R., & Cristea, C. (2018). Electrochemical methods based on molecularly imprinted polymers for drug detection. A review. *International Journal of Electrochemical Science*, 13(3), 2556–2576. <https://doi.org/10.20964/2018.03.75>
- Alavi Darazam, I., Shokouhi, S., Mardani, M., Pourhoseingholi, M. A., Rabiei, M. M., Hatami, F., Shabani, M., Moradi, O., Gharehbagh, F. J., Irvani, S. S. N., Amirdosara, M., Hajiesmaeili, M., Rezaei, O., Khoshkar, A., Lotfollahi, L., Gachkar, L., Dehbsneh, H. S., Khalili, N., Soleymaninia, A., & Torabinaid, P. (2021). Umifenovir in hospitalized moderate to severe COVID-19 patients: A randomized clinical trial. *International Immunopharmacology*, 99(April), 107969. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107969>
- Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., O'Mahony, J., & Whitcombe, M. J. (2006). Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition*, 19(2), 106–180. <https://doi.org/10.1002/jmr.760>
- Allahverdiyeva, S., Yunusoğlu, O., Yardım, Y., & Şentürk, Z. (2021). First electrochemical evaluation of favipiravir used as an antiviral option in the treatment of COVID-19: A study of its enhanced voltammetric determination in cationic surfactant media using a boron-doped diamond electrode. *Analytica Chimica Acta*, 1159. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338418>
- Amara, A., Penchala, S. D., Else, L., Hale, C., FitzGerald, R., Walker, L., Lyons, R., Fletcher, T., & Khoo, S. (2021). The development and validation of a novel LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of Molnupiravir and its metabolite β-d-N4-hydroxycytidine in human plasma and saliva. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 206. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114356>
- Annadi, A. M., El Zahar, N. M., El-Din A. Abdel-Sattar, N., Mohamed, E. H., Mahmoud, S. A., & Attia, M. S. (2022). Development and validation of molnupiravir assessment in bulk powder and pharmaceutical formulation by the RP-HPLC-UV method. *RSC Advances*, 12(53), 34512–34519. <https://doi.org/10.1039/d2ra05066h>
- Ansari, S. (2017). Combination of molecularly imprinted polymers and carbon nanomaterials as a versatile biosensing tool in sample analysis: Recent applications and challenges. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 93, pp. 134–151). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.05.015>
- Ashley, J., Shahbazi, M. A., Kant, K., Chidambara, V. A., Wolff, A., Bang, D. D., & Sun, Y. (2017). Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 91, pp. 606–615). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.018>

- Awadasseid, A., Wu, Y., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2021). Effective drugs used to combat SARS-CoV-2 infection and the current status of vaccines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111330>
- Bagotsky, V. S. (2006). Fundamentals of Electrochemistry, 2nd Edition. *Fundamentals of Electrochemistry*, 51–60.
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications* (Second Ed). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0277-8>
- Bhakta, S., & Mishra, P. (2021). Molecularly imprinted polymer-based sensors for cancer biomarker detection. *Sensors and Actuators Reports*, 3(August), 100061. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100061>
- Bhargava, A. (2021). Dynamic aspects of ORF1ab and N RNA cycle threshold values among COVID-19 patients in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 87(October 2020), 104657. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104657>
- Bond, A. M. (Alan M. (1980). *Modern polarographic methods in analytical chemistry*. 518.
- Bosch, M. E., Sánchez, A. J. R., Rojas, F. S., & Ojeda, C. B. (2007). Ribavirin: Analytical determinations since the origin until today. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(2), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.004>
- Burgess, C. (2001). *Valid Analytical Methods and Procedures*. Royal Society of Chemistry.
- Caruana, G., Croxatto, A., Coste, A. T., Opota, O., Lamoth, F., Jaton, K., & Greub, G. (2020). Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection and interpretation of microbiological results. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 26, Issue 9, pp. 1178–1182). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.019>
- Cetinkaya, A., Kaya, S. I., Atici, E. B., Çorman, M. E., Uzun, L., & Ozkan, S. A. (2022). A semi-covalent molecularly imprinted electrochemical sensor for rapid and selective detection of tiotropium bromide. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04335-6>
- Cetinkaya, A., Kaya, S. I., Çorman, M. E., Karakaya, M., Bellur Atici, E., & Ozkan, S. A. (2022). A highly sensitive and selective electrochemical sensor based on computer-aided design of molecularly imprinted polymer for the determination of leflunomide. *Microchemical Journal*, 179(April), 107496. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107496>
- Chang, C.-H., Peng, W.-Y., Lee, W.-H., Lin, T.-Y., Yang, M.-H., Dalley, J. W., & Tsai, T.-H. (2023). *Transfer and biotransformation of the COVID-19 prodrug molnupiravir and its metabolite β-D-N4-hydroxycytidine across the blood-placenta barrier*. www.thelancet.com
- Chauhan, D. S., Prasad, R., Srivastava, R., Jaggi, M., Chauhan, S. C., & Yallapu, M. M. (2020). Comprehensive Review on Current Interventions, Diagnostics, and Nanotechnology Perspectives against SARS-CoV-2. *Bioconjugate Chemistry*, 31(9), 2021–2045. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00323>
- Chellasamy, G., Arumugasamy, S. K., Govindaraju, S., & Yun, K. (2020). Analytical insights of COVID-19 pandemic. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 133). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116072>
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. (2016). Molecular imprinting: Perspectives and applications. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 45, Issue 8, pp. 2137–2211). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6cs00061d>
- Chen, M., Lu, J., Gao, J., Yu, C., Xing, W., Dai, J., Meng, M., Yan, Y., & Wu, Y. (2022). Design of self-cleaning molecularly imprinted membrane with antibacterial ability for high-selectively separation of ribavirin. *Journal of Membrane Science*, 642. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2021.119994>
- Chen, R. N., Kang, S. H., Li, J., Lu, L. N., Luo, X. P., & Wu, L. (2021). Comparison and recent progress of molecular imprinting technology and dummy template molecular imprinting technology. In *Analytical Methods* (Vol. 13, Issue 39, pp. 4538–4556). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d1ay01014j>

- Chen, S. (2007). Practical electrochemical cells. In C. G. Zoski (Ed.), *Handbook of Electrochemistry* (pp. 33–56). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-044451958-0.50003-3>
- Chen, W., Ma, Y., Pan, J., Meng, Z., Pan, G., & Sellergren, B. (2015). Molecularly imprinted polymers with stimuli-responsive affinity: Progress and perspectives. *Polymers*, 7(9), 1689–1715. <https://doi.org/10.3390/polym7091478>
- Chen, W., Zhang, L., Sun, Y., Yu, H., & Fu, M. (2022). pH-Responsive molecularly imprinted hollow spheres for selective separation of ribavirin from water samples. *Chemical Engineering Journal*, 450. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138064>
- Cheng, W., Jin, G., & Zhang, Y. (2006). Direct electron transfer of hemoglobin on PSS/SWNTs film modified Au electrode and its interaction with ribavirin. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 114(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.03.088>
- Çorman, M. E., Ozcelikay, G., Cetinkaya, A., Kaya, S. I., Armutcu, C., Özgür, E., Uzun, L., & Ozkan, S. A. (2022). Metal-organic frameworks as an alternative smart sensing platform for designing molecularly imprinted electrochemical sensors. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116573>
- Crotty, S., Cameron, C., & Andino, R. (2002). Ribavirin's antiviral mechanism of action: Lethal mutagenesis? *Journal of Molecular Medicine*, 80(2), 86–95. <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0308-0>
- Cuervo, N. Z., & Grandvaux, N. (2020). Ace2: Evidence of role as entry receptor for sars-cov-2 and implications in comorbidities. *ELife*, 9, 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.61390>
- Curk, T., Dobnikar, J., & Frenkel, D. (2015). Rational design of molecularly imprinted polymers. *Soft Matter*, 12(1), 35–44. <https://doi.org/10.1039/c5sm02144h>
- Danso, D., Langman, L. J., & Snozek, C. L. H. (2011). LC-MS/MS quantitation of ribavirin in serum and identification of endogenous isobaric interferences. *Clinica Chimica Acta*, 412(23–24), 2332–2335. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.016>
- D'Avolio, A., de Nicolò, A., Simiele, M., Turini, S., Agnesod, D., Boglione, L., Cusato, J., Baietto, L., Cariti, G., Calcagno, A., Sciandra, M., di Perri, G., & Bonora, S. (2012). Development and validation of a useful HPLC-UV method for quantification of total and phosphorylated-ribavirin in blood and erythrocytes of HCV+ patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.030>
- D'Avolio, A., Ibañez, A., Sciandra, M., Siccardi, M., de Requena, D. G., Bonora, S., & di Perri, G. (2006). Validation of liquid/liquid extraction method coupled with HPLC-UV for measurement of ribavirin plasma levels in HCV-positive patients. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 835(1–2), 127–130. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.019>
- Dennington, R., Keith, T., & Millam, J. (2009). *GaussView* (Version 5.0.9). Semichem Inc., Wallingford CT.
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). “AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings”, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61 (8), 3891–3898.
- El-Shorbagy, H. I., Elsebaei, F., Hammad, S. F., & El-Brashy, A. M. (2020). A green stability-indicating RP-HPLC-UV method using factorial design for determination of ribavirin, sofosbuvir and ledipasvir: Application to average content, acid degradation kinetics and in vitro drug interactions study. *Microchemical Journal*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105251>
- El-Yazbi, A. F., Khalifa, Y., Elkhatab, M. A. W., & El-Yazbi, A. F. (2021). Green analytical method for the determination of sofosbuvir, ledipasvir, ribavirin and complex silymarin flavonoids simultaneously in biological fluids. *Microchemical Journal*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.105964>
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., & Cheeseman, J. R. (2009). *Gaussian 2016 Revision C.01*. Gaussian Inc., Wallingford CT.

- Gao, M., Gao, Y., Chen, G., Huang, X., Xu, X., Lv, J., Wang, J., Xu, D., & Liu, G. (2020). Recent Advances and Future Trends in the Detection of Contaminants by Molecularly Imprinted Polymers in Food Samples. *Frontiers in Chemistry*, 8(December), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.616326>
- Gao, Q., Jin, D., Xu, J., Huang, H., Cheng, H., & Xue, H. (2023). Determination of ribavirin by molecularly imprinted electrochemical sensors using pyrro-1-propionyl-alaninoyl-chitooligosaccharide and pyrrole as bifunctional monomers on Prussian blue-gold nanocomposite films. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 230. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115378>
- Gong, W. J., Zhou, T., Wu, S. L., Ye, J. L., Xu, J. Q., Zeng, F., Su, Y. Y., Han, Y., Lv, Y. N., Zhang, Y., & Cai, X. F. (2021). A retrospective analysis of clinical efficacy of ribavirin in adults hospitalized with severe COVID-19. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 27(6), 876–881. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.02.018>
- Gouda, A. S., Marzouk, H. M., Rezk, M. R., Salem, A. M., Morsi, M. I., Nouman, E. G., Abdallah, Y. M., Hassan, A. Y., & Abdel-Megied, A. M. (2022). A validated LC-MS/MS method for determination of antiviral prodrug molnupiravir in human plasma and its application for a pharmacokinetic modeling study in healthy Egyptian volunteers. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1206. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123363>
- Hashemian, S. M. R., Pourhanifeh, M. H., Hamblin, M. R., Shahrzad, M. K., & Mirzaei, H. (2022). RdRp inhibitors and COVID-19: Is molnupiravir a good option? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 146(December 2021), 112517. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112517>
- Hu, X., Guo, Y., Wang, T., Liu, C., Yang, Y., & Fang, G. (2022). A selectivity-enhanced ratiometric fluorescence imprinted sensor based on synergistic effect of covalent and non-covalent recognition units for ultrasensitive detection of ribavirin. *Journal of Hazardous Materials*, 421. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126748>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X. feng, Xu, W., & Liu, S. wen. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 41, Issue 9, pp. 1141–1149). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Jomah, S., Asdaq, S. M. B., & Al-Yamani, M. J. (2020). Clinical efficacy of antivirals against novel coronavirus (COVID-19): A review. In *Journal of Infection and Public Health* (Vol. 13, Issue 9, pp. 1187–1195). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.013>
- Kablan, S. E., Reçber, T., Tezel, G., Timur, S. S., Karabulut, C., Karabulut, T. C., Eroğlu, H., Kır, S., & Nemutlu, E. (2022). Voltammetric sensor for COVID-19 drug Molnupiravir on modified glassy carbon electrode with electrochemically reduced graphene oxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 920. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116579>
- Kaushik, A. K., Dhau, J. S., Gohel, H., Mishra, Y. K., Kateb, B., Kim, N. Y., & Goswami, D. Y. (2020). Electrochemical SARS-CoV-2 Sensing at Point-of-Care and Artificial Intelligence for Intelligent COVID-19 Management. In *ACS Applied Bio Materials* (Vol. 3, Issue 11, pp. 7306–7325). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01004>
- Kaya, S. I., Cetinkaya, A., Atici, E. B., Çorman, M. E., Uzun, L., & Ozkan, S. A. (2022). Electrochemical sensing of acridinium bromide with metal ion-assisted molecularly imprinted films. *Microchemical Journal*, 108128. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108128>
- Kepeczynski, C. M., Genigeski, J. A., Koski, R. R., Bernknopf, A. C., Konieczny, A. M., & Klepser, M. E. (2021). A systematic review comparing at-home diagnostic tests for SARS-CoV-2: Key points for pharmacy practice, including regulatory information. *Journal of the American Pharmacists Association*, 61(6), 666–677.e2. <https://doi.org/10.1016/j.japh.2021.06.012>
- Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1996). *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*. 986.
- Kong, D., Liu, Y., Wang, Z., Jiang, L., Cheng, J., Xu, L., Zhuang, Q., Lu, C. H., Chi, Y., & Wei, Q. hua. (2017). Establishment of an electrochemiluminescence quenching method for ribavirin

- detection in Ru(bpy)₃²⁺/TEA system. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 801, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.07.021>
- Koster, E. H. M., Crescenzi, C., Den Hoedt, W., Ensing, K., & De Jong, G. J. (2001). Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 73(13), 3140–3145. <https://doi.org/10.1021/ac001331x>
- Kromdijk, W., Pereira, S. A., Rosing, H., Mulder, J. W., Beijnen, J. H., & Huitema, A. D. R. (2013). Development and validation of an assay for the simultaneous determination of zidovudine, abacavir, emtricitabine, lamivudine, tenofovir and ribavirin in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 919–920, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.005>
- Krull, I. S., & Swartz, M. (1999). Analytical method development and validation for the academic researcher. In *Analytical Letters* (Vol. 32, Issue 6, pp. 1067–1080). Marcel Dekker Inc. <https://doi.org/10.1080/00032719908542878>
- Kryscio, D. R., & Peppas, N. A. (2012). Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 8, Issue 2, pp. 461–473). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.005>
- Kubiak, A., Ciric, A., & Biesaga, M. (2020). Dummy molecularly imprinted polymer (DMIP) as a sorbent for bisphenol S and bisphenol F extraction from food samples. *Microchemical Journal*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104836>
- Leonid, S. (2023). Chemissian. Ver. 4.38, Available from: <http://www.chemissian.com>
- Li, H., Xiong, N., Li, C., Gong, Y., Liu, L., Yang, H., Tan, X., Jiang, N., Zong, Q., Wang, J., Lu, Z., & Yin, X. (2021). Efficacy of ribavirin and interferon- α therapy for hospitalized patients with COVID-19: A multicenter, retrospective cohort study. *International Journal of Infectious Diseases*, 104, 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.01.055>
- Li, W., Zhang, X., Li, T., Ji, Y., & Li, R. (2021). Molecularly imprinted polymer-enhanced biomimetic paper-based analytical devices: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1148, 238196. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.071>
- Liu, X., Chen, X. H., Zhang, Y. Y., Liu, W. T., & Bi, K. S. (2007). Determination of arbidol in rat plasma by HPLC-UV using cloud-point extraction. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 856(1–2), 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.06.009>
- Liu, X., Huang, Y. W., Li, J., Li, X. B., Bi, K. S., & Chen, X. H. (2007). Determination of arbidol in human plasma by LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(1), 371–375. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.06.039>
- Liu, Y., Xu, C., Yan, R., Lim, C., Yeh, L. T., & Lin, C. C. (2006). Sensitive and specific LC-MS/MS method for the simultaneous measurements of viramidine and ribavirin in human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 832(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.12.034>
- Lu, W., Li, H., Meng, Z., Liang, X., Xue, M., Wang, Q., & Dong, X. (2014). Detection of nitrobenzene compounds in surface water by ion mobility spectrometry coupled with molecularly imprinted polymers. *Journal of Hazardous Materials*, 280, 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.041>
- Ma, J. K., Huang, X. C., & Wei, S. L. (2019). Rapid determination of antiviral medication ribavirin in different feedstuffs using a novel magnetic molecularly imprinted polymer coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 42(21), 3372–3381. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900576>
- Madhurantakam, S., Muthukumar, S., & Prasad, S. (2022). Emerging Electrochemical Biosensing Trends for Rapid Diagnosis of COVID-19 Biomarkers as Point-of-Care Platforms: A Critical Review. *ACS Omega*, 7(15), 12467–12473. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00638>

- Malik, M. I., Shaikh, H., Mustafa, G., & Bhanger, M. I. (2019). Recent Applications of Molecularly Imprinted Polymers in Analytical Chemistry. *Separation and Purification Reviews*, 48(3), 179–219. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1457541>
- Manjunatha, H., Janardan, S., Ratnamala, A., Ratnam, K. V., Rao, L. V., Ramesh, S., Naidu, K. C. B., Kumar, N. S., Khan, A., & Asiri, A. M. (2021). Electrochemical aspects of metal-organic frameworks. In *Metal-Organic Frameworks for Chemical Reactions* (pp. 65–109). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822099-3.00004-6>
- Martín-Esteban, A. (2013). Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 45(1), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.023>
- Meléndez, M., Rosario, O., Zayas, B., & Rodríguez, J. F. (2009). HPLC-MS/MS method for the intracellular determination of ribavirin monophosphate and ribavirin triphosphate in CEMss cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(5), 1233–1240. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.02.006>
- Morris, M.G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., & A. J. Olson (2009). “Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility”, *J. Computational Chemistry*, 16, 2785–91.
- Muhammed, Y., Yusuf Nadabo, A., Pius, M., Sani, B., Usman, J., Anka Garba, N., Mohammed Sani, J., Opeyemi Olayanju, B., Zeal Bala, S., Garba Abdullahi, M., & Sambo, M. (2021). SARS-CoV-2 spike protein and RNA dependent RNA polymerase as targets for drug and vaccine development: A review. *Biosafety and Health*, 3(5), 249–263. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2021.07.003>
- Nakka, S., Muchakayala, S. K., & Manabolu Surya, S. B. (2023). A sensitive UPLC-MS/MS method for the simultaneous assay and trace level genotoxic impurities quantification of SARS-CoV-2 inhibitor-Molnupiravir in its pure and formulation dosage forms using fractional factorial design. *Results in Chemistry*, 6, 101019. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101019>
- Ni, W., Yang, X., Yang, D., Bao, J., Li, R., Xiao, Y., Hou, C., Wang, H., Liu, J., Yang, D., Xu, Y., Cao, Z., & Gao, Z. (2020). Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. In *Critical Care* (Vol. 24, Issue 1). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03120-0>
- Nicholls, I. A. (1998). Towards the rational design of molecularly imprinted polymers. *Journal of Molecular Recognition*, 11(1–6), 79–82. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199812\)11:1/6<79::AID-JMR394>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199812)11:1/6<79::AID-JMR394>3.0.CO;2-B)
- Nicholls, I. A., Golker, K., Olsson, G. D., Suriyanarayanan, S., & Wiklander, J. G. (2021). The use of computational methods for the development of molecularly imprinted polymers. *Polymers*, 13(17). <https://doi.org/10.3390/polym13172841>
- Ozkan, S. A. (2012). *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation*. 350.
- Ozkan, S. A., Kauffmann, J.-M., & Zuman, P. (2015a). Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences. In F. Scholz (Ed.), *Monographs in Electrochemistry*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47138-8>
- Ozkan, S. A., Kauffmann, J.-M., & Zuman, P. (2015d). *Electroanalytical Techniques Most Frequently Used in Drug Analysis*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47138-8_3
- Ozkan, S. A., Uslu, B., & Aboul-Enein, H. Y. (2003). Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 33(3), 155–181. <https://doi.org/10.1080/713609162>
- Pan, J., Chen, W., Ma, Y., & Pan, G. (2018). Molecularly imprinted polymers as receptor mimics for selective cell recognition. *Chemical Society Reviews*, 47(15), 5574–5587. <https://doi.org/10.1039/c7cs00854f>
- Pande, V. S., Grosberg, A. Y., & Tanaka, T. (1997). PHYSICA ® How to create polymers with protein-like capabilities" A theoretical suggestion. In *Physica D* (Vol. 107).
- Parsons, T. L., Kryszak, L. A., & Marzinke, M. A. (2021). Development and validation of assays for the quantification of β -D-N4-hydroxycytidine in human plasma and β -D-N4-hydroxycytidine-

- triphosphate in peripheral blood mononuclear cell lysates. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1182. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122921>
- Piletska, E. V., Guerreiro, A. R., Whitcombe, M. J., & Piletsky, S. A. (2009). Influence of the Polymerization Conditions on the Performance of Molecularly Imprinted Polymers. *Macromolecules*, 42(14), 4921–4928. <https://doi.org/10.1021/MA900432Z>
- Pletcher, D., Greff, R., Peat, R., & Robinson, J. (2001). *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Woodhead Publishing Limited. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)87868-x](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)87868-x)
- Ramachandran, R., Bhosale, V., Reddy, H., Atam, V., Faridi, M. M. A., Fatima, J., Shukla, V., Khan, Z. A., Khan, H., Singh, V., Negi, M. P. S., Srivastava, M., Srivastava, A. K., Tripathi, C. B., Ghosh, N., Majumdar, N., Tripathi, R. K., Rath, S. K., Mishra, P. R., ... Kundu, T. K. (2022a). Phase III, Randomized, Double-blind, Placebo controlled trial of Efficacy, Safety and Tolerability of Antiviral drug Umifenovir vs Standard care of therapy in non-severe COVID-19 patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 115, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.025>
- Ramachandran, R., Bhosale, V., Reddy, H., Atam, V., Faridi, M. M. A., Fatima, J., Shukla, V., Khan, Z. A., Khan, H., Singh, V., Negi, M. P. S., Srivastava, M., Srivastava, A. K., Tripathi, C. B., Ghosh, N., Majumdar, N., Tripathi, R. K., Rath, S. K., Mishra, P. R., ... Kundu, T. K. (2022b). Phase III, Randomized, Double-blind, Placebo controlled trial of Efficacy, Safety and Tolerability of Antiviral drug Umifenovir vs Standard care of therapy in non-severe COVID-19 patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 115, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.025>
- Ravina, Kumar, A., Manjeet, Twinkle, Subodh, Narang, J., & Mohan, H. (2022). Analytical performances of different diagnostic methods for SARS-CoV-2 virus - A review. *Sensors International*, 3(July), 100197. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2022.100197>
- Reçber, T., Timur, S. S., Erdoğan Kablan, S., Yalçın, F., Karabulut, T. C., Neslihan Gürsoy, R., Eroğlu, H., Kır, S., & Nemutlu, E. (2022). A stability indicating RP-HPLC method for determination of the COVID-19 drug molnupiravir applied using nanoformulations in permeability studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 214. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114693>
- Saraya, R. E., Deeb, S. El, Salman, B. I., & Ibrahim, A. E. (2022). Highly sensitive high-performance thin-layer chromatography method for the simultaneous determination of molnupiravir, favipiravir, and ritonavir in pure forms and pharmaceutical formulations. *Journal of Separation Science*, 45(14), 2582–2590. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200178>
- Schadt, E. E., Linderman, M. D., Sorenson, J., Lee, L., & Nolan, G. P. (2010). Computational solutions to large-scale data management and analysis. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 11, Issue 9, pp. 647–657). <https://doi.org/10.1038/nrg2857>
- Scholz, F. (Ed.). (2010). *Electroanalytical Methods* (2nd, revis ed.). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8>
- Sharaf, Y. A., El Deeb, S., Ibrahim, A. E., Al-Harrasi, A., & Sayed, R. A. (2022). Two Green Micellar HPLC and Mathematically Assisted UV Spectroscopic Methods for the Simultaneous Determination of Molnupiravir and Favipiravir as a Novel Combined COVID-19 Antiviral Regimen. *Molecules*, 27(7). <https://doi.org/10.3390/molecules27072330>
- Sharma, T., Baig, M. H., Khan, M. I., Alotaibi, S. S., Alorabi, M., & Dong, J. J. (2022). Computational screening of camostat and related compounds against human TMPRSS2: A potential treatment of COVID-19. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 30(3), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.01.005>
- Shi, L., Hou, A. G., Chen, L. Y., & Wang, Z. F. (2015). Electrochemical sensor prepared from molecularly imprinted polymer for recognition of TNT. *Polymer Composites*, 36(7), 1280–1285. <https://doi.org/10.1002/pc.23032>

- Singh, A. K., Singh, A., Singh, R., & Misra, A. (2021). Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 15(6), 102329. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.102329>
- Singh, A. K., Singh, A., Singh, R., & Misra, A. (2022). An updated practical guideline on use of molnupiravir and comparison with agents having emergency use authorization for treatment of COVID-19. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 16(2), 102396. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2022.102396>
- Skoog, D. A., Holler, F. James., & Nieman, T. A. (1998). *Principles of instrumental analysis*.
- Skoog, D. A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (2018). Principles of Instrumental Analysis. In *Principles of Instrumental Analysis* (Seventh Ed).
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. James., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Ninth Edit). Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Sørensen, L. K., Hasselstrøm, J. B., Gunst, J. D., Søgaard, O. S., & Kjolby, M. (2021). Determination of camostat and its metabolites in human plasma – Preservation of samples and quantification by a validated UHPLC-MS/MS method. *Clinical Biochemistry*, 96, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.07.007>
- Sun, X., Wang, J., Li, Y., Yang, J., Jin, J., Shah, S. M., & Chen, J. (2014). Novel dummy molecularly imprinted polymers for matrix solid-phase dispersion extraction of eight fluoroquinolones from fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1359, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.007>
- Swartz, M. E., & Krull, I. S. (2012). Handbook of Analytical Validation. In *Handbook of Analytical Validation*. Taylor & Francis Group, LLC. <https://doi.org/10.1201/b12039>
- Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J. A., Whittaker, G. R., & Daniel, S. (2020). Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. In *Antiviral Research* (Vol. 178). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104792>
- Tobback, E., Degroote, S., Buysse, S., Delesie, L., Van Dooren, L., Vanherrewege, S., Barbezange, C., Hutse, V., Romano, M., Thomas, I., Padalko, E., Callens, S., & De Scheerder, M. A. (2022). Efficacy and safety of camostat mesylate in early COVID-19 disease in an ambulatory setting: a randomized placebo-controlled phase II trial. *International Journal of Infectious Diseases*, 122, 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.06.054>
- Tomov, S., McGuigan, M., Bennett, R., Smith, G., & Spiletic, J. (2005). Benchmarking and implementation of probability-based simulations on programmable graphics cards. *Computers and Graphics (Pergamon)*, 29(1), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.cag.2004.11.008>
- Tong, S., Su, Y., Yu, Y., Wu, C., Chen, J., Wang, S., & Jiang, J. (2020). Ribavirin therapy for severe COVID-19: a retrospective cohort study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(3), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106114>
- Trott, O., Olson, A.J. (2010). “AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading”, *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461.
- Turiel, E., & Esteban, A. M. (2019). Molecularly imprinted polymers. In *Solid-Phase Extraction* (pp. 215–233). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00008-X>
- Ul'yanovskii, N. V., Kosyakov, D. S., Sypalov, S. A., Varsegov, I. S., Shavrina, I. S., & Lebedev, A. T. (2022). Antiviral drug Umifenovir (Arbidol) in municipal wastewater during the COVID-19 pandemic: Estimated levels and transformation. *Science of the Total Environment*, 805. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150380>
- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. (1995a). In *International Conference on Harmonisation (ICH) Guideline*.
- Vural, K., Karakaya, S., Dilgin, D. G., Gökçel, H. İ., & Dilgin, Y. (2023). Voltammetric determination of Molnupiravir used in treatment of the COVID-19 at magnetite nanoparticle modified carbon paste electrode. *Microchemical Journal*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108195>

- Wackerlig, J., & Schirhagl, R. (2016). Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: A Review. In *Analytical Chemistry* (Vol. 88, Issue 1, pp. 250–261). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03804>
- Wang, J. (2006). Analytical Electrochemistry. In *John Wiley & Sons, Inc* (Third Edit). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471790303>
- Włoch, M., & Datta, J. (2019). Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 86, pp. 17–40). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/BS.COAC.2019.05.011>
- Wu, X., Carroll, W. R., & Shimizu, K. D. (2008). Stochastic lattice model simulations of molecularly imprinted polymers. *Chemistry of Materials*, 20(13), 4335–4346. <https://doi.org/10.1021/cm8002645>
- Wulff, G. (2002). Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chemical Reviews*, 102(1), 1–27. <https://doi.org/10.1021/cr980039a>
- Xu, L., & Xu, Z. F. (2012). Molecularly imprinted polymer based on multiwalled carbon nanotubes for ribavirin recognition. *Journal of Polymer Research*, 19(8). <https://doi.org/10.1007/s10965-012-9942-1>
- Yilmaz, E., Haupt, K., & Mosbach, K. (2000). The use of immobilized templates - A new approach in molecular imprinting. *Angewandte Chemie - International Edition*, 39(12), 2115–2118. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20000616\)39:12<2115::AID-ANIE2115>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000616)39:12<2115::AID-ANIE2115>3.0.CO;2-V)
- Yin, J., Li, C., Ye, C., Ruan, Z., Liang, Y., Li, Y., Wu, J., & Luo, Z. (2022). Advances in the development of therapeutic strategies against COVID-19 and perspectives in the drug design for emerging SARS-CoV-2 variants. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 824–837. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.01.026>
- Younis, H. M., Youssef, A. O., El-Sheikh, S. M., Sheta, S. M., & Attia, M. S. (2023). Preparation and Characterization of Fe-Gallic acid MOF for determination of antiviral Molnupiravir as inhibitor for RNA Corona virus replication. *Microchemical Journal*, 194, 109297. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109297>
- Zelikovich, D., Dery, L., Sagi-Cohen, H., & Mandler, D. (2023). Imprinting of nanoparticles in thin films: Quo Vadis? In *Chemical Science*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d3sc02178e>
- Zhu, H., Zhang, H., & Xia, Y. (2018). Planar Is Better: Monodisperse Three-Layered MoS₂ Quantum Dots as Fluorescent Reporters for 2,4,6-Trinitrotoluene Sensing in Environmental Water and Luggage Cases. *Analytical Chemistry*, 90(6), 3942–3949. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04893>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>