



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



ANTİFİBROTİK İLAÇ PİRFENİDON'UN TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL ÇALIŞMALAR VE UYGULAMALARI

Özge SELÇUK

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bengi USLU**

ANKARA

2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİFİBROTİK İLAÇ PİRFENİDON'UN TAYİNİNE YÖNELİK
ELEKTROKİMYASAL ÇALIŞMALAR VE UYGULAMALARI

Özge SELÇUK

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bengi USLU

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 21L0237012 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayarak sunduğum “Antifibrotik İlaç Pirfenidon’un Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Çalışmalar ve Uygulamaları” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve etik değerlere uygun şekilde tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tamamıyla tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tez içerisindeki tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Adı Soyadı : Özge SELÇUK

Tarih :

İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Anabilim Dalında
Özge SELÇUK tarafından hazırlanan “ANTİFİBROTİK İLAÇ PİRFENİDON’UN
TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL ÇALIŞMALAR VE
UYGULAMALARI” adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından YÜKSEK
LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir
Tez Savunma Tarihi: 12/12/2022

İmza

Prof. Dr. H. Eda ŞATANA KARA

Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof.Dr. Sibel A. ÖZKAN

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Prof.Dr. Bengi USLU

Ankara 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

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1.Nadir Hastalıklar	1
1.2. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis Hastalığı	2
1.2.1. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	7
1.2.2. Pirfenidon	8
1.3. Elektrokimyasal Yöntemler	10
1.3.1. Voltametri	11
1.3.1.1.Dönüşümlü Voltametri	13
1.3.1.2.Diferansiyel Puls Voltametrisi	13
1.3.1.3. Kare Dalga Voltametrisi	13
1.3.1.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi	14
1.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi	15
1.4.1. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Tasarımı	16
1.5. Nanopartiküller	23
1.5.1.Kitosan	23
1.5.2.Elmas Nanopartikül	24
1.5.3.İyonik Sıvılar (IL)	25
1.6. Analitik Yöntem Validasyonu	26
1.6.1.Seçicilik	27
1.6.2. Kesinlik	28
1.6.3. Doğruluk	28
1.6.4.Doğrusallık	29
1.6.5. Duyarlılık	29
1.6.6. Çalışma Aralığı	30

1.6.7. Teşhis ve Tayin Alt Sınırı	30
1.6.8. Sağlamlık	31
1.6.9. Tutarlılık	31
1.6.10. Stabilité	31
1.7. Tez Maddesi Pirfenidon ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	31
2. GEREÇ VE YÖNTEM	34
2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
2.2. Elektrokimyasal Ölçümler	35
2.3. Çözeltilerin Hazırlanışı	35
2.4. Standart Pirfenidon Etkin Maddesinin Stok Çözeltisinin Hazırlanması	35
2.5. Tablet Çözeltisi Hazırlanması	35
2.6. Serum Örneklerinin Hazırlanışı	36
2.7. Pirfenidon için Moleküler Baskılanmış Elektrokimyasal Nanosensörünün Hazırlanması	36
3. BULGULAR	38
3.1. Pirfenidon'un Yalın CKE ile Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi	38
3.1.1. Yalın CKE ile pH ve Tampon Etkisi Çalışmaları	38
3.1.2. Yalın CKE ile Hız Taraması Çalışmaları	42
3.1.3. KDV Parametrelerinin Optimizasyonu	44
3.1.4. Pirfenidon'un Yalın CKE ile Elektrokimyasal Uygulaması	46
3.1.5. Gerçek Örnek Uygulaması	48
3.1.6. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Dozaj Şekline Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışması	50
3.1.7. Girişim Çalışmaları	51
3.2. Geliştirilen Moleküler Baskılanmış Polimer ile Voltametrik Çalışmalar	52
3.2.1. Geliştirilen Moleküler Baskılanmış Polimer Elektrodun Karakterizasyonu	52
3.2.1.1. Elektrokimyasal Karakterizasyonu	52
3.2.1.2. Yüzey Karakterizasyonu	55
3.2.2. Deneysel Koşulların Optimizasyonu	56
3.2.2.1. Modifiye Yüzeyin Optimizasyonu	57
3.2.2.2. Hedef Molekül Konsantrasyonunun Etkisi	58
3.2.2.2. Elektropolimerizasyon İçin Döngü Sayısı Etkisi	59
3.2.2.3. Uzaklaştırma Çözeltisinin Optimizasyonu	61
3.2.2.4. Uzaklaştırma Süresinin Optimizasyonu	61

3.2.2.5.Bağlanma Süresinin Optimizasyonu	62
3.2.3. Pirfenidon'un Elektrokimyasal Olarak Tanınması	63
3.2.4. Geliştirilen Sensörlerin Seçiciliklerinin İncelenmesi	65
3.2.5. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE Uygulamaları	66
3.2.6. Girişim Çalışmaları	68
3.2.7. Stabilitate Çalışmaları	69
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	70
4. TARTIŞMA	73
ÖZET	77
SUMMARY	78
KAYNAKLAR	79

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi kapsamında idiyopatik pulmoner fibrozis tedavisinde kullanılan yetim ilaç olarak geçen Pirfenidon tayinine yönelik ilk elektrokimyasal yöntem olarak moleküler baskılanmış polimer temelli nanosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen bu nanosensör ile insan serum ve farmasötik dozaj örneklerinden tayini için yüksek hassasiyet, doğruluk ve kesinlik uygulanmıştır.

Yüksek lisans süresince her gün yeni bir bilgi öğrendiğim, akademik hayatta bildiğim her şeyi bana öğreten, bana her anlamda sonsuz desteğini, anlayışını ve sabrını sürekli hissettiğim, her daim örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışmanım sayın Prof.Dr. Bengi USLU'ya en içten duygularıyla sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yüksek lisans öğreniminde bana destek veren değerli hocam Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca sağladıkları katkılar ve desteklerinden dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans boyunca çalışmalarına bilgi ve deneyimleriyle her zaman katkıda bulunan, her sorumuza cevap aldığımız Dr. Burçin BOZAL PALABIYIK'a destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisansa geldiğim ilk günden bu yana her konuda bildiklerini öğreten, her konuda, her zaman destek olan, çalışkanlığını örnek aldığım sayın Uzm. Kim. Müh. Cem ERKMEN'e ve bana çalışma arkadaşından daha ziyade dost olan kendisiyle tanıştığım için çok şanslı olduğum, her zaman en büyük desteği gördüğüm, birlikte minik Avrupa turu yaptığımız, tüm başarılarını desteklediğim Uzm. Kim. Müh. Didem Nur ÜNAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans öğrenimime değerli katkısı, sonsuz desteği ve anlayışı için bize hem bir

hoca hem bir arkadaş olan Doç. Dr. Sevinç KURBANOĞLU'na çok teşekkür ederim. Her konuda bize destek olan Dr. Çiğdem KANBEŞ DİNDAR'a çok teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, her konuda destek olan, tüm hayatım boyunca sonsuz sevgileri, her zaman ailem oldukları için gurur duyduğum canım annem Nihal SELÇUK, canım babam Ramazan SELÇUK ve biricik kardeşim Damla SELÇUK'a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında bana 2210-A Yüksek Lisans Burs Programı ile burs desteği veren TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarına 21L0237012 numaralı projemiz ile proje desteği katkısında bulunan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
BH	Bağıl hata
BMIMBr	1-Bütil-3-metilimidazolyum bromür
BSS	Bağıl standart sapma
C	Konsantrasyon
CHIT	Kitosan
CKE	Camsı karbon elektrot
DiaNPs	Elmas nanopartikül
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
DV	Dönüşümlü voltametrisi
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
EP	Potansiyel
EtOH	Etanol
FDA U.S.	Food and Drug Administration
I	Akım
ICH	International Conference on Harmonization
IL	İyonik sıvı
Ip	Pik akımı
İTK	İnce tabaka kromatografisi
İPF	İdiyopatik pulmoner fibrozis
K ₃ [Fe (CN) ₆]	Potasyum ferrisiyanür
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Potasyum ferrosiyanür
KCl	Potasyum klorür
KDV	Kare dalga voltametrisi
LC-ESI	Sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyonu
m	Eğim
MeOH	Metanol
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
MS/MS	Tandem kütle spektrometrisi
NIP	Baskılanmamış polimer

NPs	Nanopartikül
<i>o</i> -PD	orto-fenilendiamin
R^2	Regresyon katsayısı
R_{ct}	Yük transfer direnci
R_s	Çözelti direnci
SD	Standart sapma
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SK	Sıvı kromatografisi
TAS	Tayin alt sınırı (LOQ)
TS	Teşhis sınırı (LOD)
TS	Teşhis sınırı
UPSK	Ultra performanslı sıvı kromatografisi
UV	Mor ötesi
YB-İTK	Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ΔI	Pik akımları arasındaki fark

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.İdiyopatik pulmoner fibroziste alveoler hasar	3
Şekil 1.2.İPF tedavisinde kullanılan yöntemler	7
Şekil 1.3.Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması	10
Şekil 1.4.Voltametrik ölçümlerde kullanılan hücre ve üçlü elektrot sistemi gösterimi	12
Şekil 1.5.Analitık validasyon parametreleri	27
Şekil 2.1.Tasarlanan moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensörün hazırlanışı	37
Şekil 3.1. Pirfenidon'un moleküler yapısı	38
Şekil 3.2. Pirfenidon'un DV, DPV ve KDV voltamogramlarına göre farklı pH değerleri için pik akımı üzerine etkisini gösteren grafikler	40
Şekil 3.3. Pirfenidon'un DV, DPV ve KDV voltamogramlarına göre farklı pH değerleri için pik potansiyeli üzerine etkisini gösteren grafikler	41
Şekil 3.4. Pirfenidon'un artan tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları.	42
Şekil 3.5.Pirfenidon'un artan tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramlarına ait $v^{1/2}$ – Ip(A) ve log v–lop Ip (B) eğrileri grafikleri.	43
Şekil 3.6. Pirfenidon'un artan tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramlarına ait log v–Ep eğrisi grafiği.	44
Şekil 3.7. Yalın CKE ile kare dalga voltametrisi parametrelerinin optimizasyonu	45
Şekil 3.8. Pirfenidon'un 9,9 – 260 μ M aralığında diferansiyel puls voltamogramları ve kalibrasyon grafikleri	46
Şekil 3.9. Pirfenidon'un 20,0 – 260 μ M aralığında kare dalga voltamogramları ve kalibrasyon grafikleri (B)	47
Şekil 3.10. İnsan serum örneğinde kalibrasyon grafikleri	50
Şekil 3.11. Girişim maddelerinin Pirfenidon pik akımına % olarak etkisi	52
Şekil 3.12.Elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve dönüşümlü voltametri sonuçları	55
Şekil 3.13.MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörün SEM yüzey karakterizasyonu görüntüleri	56
Şekil 3.14. Modifiye elektrot yüzeyinin optimizasyonu	58
Şekil 3.15. Pirfenidon konsantrasyonu optimizasyonu	59
Şekil 3.16. Döngü sayısı optimizasyonu	60
Şekil 3.17. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE sensörünün dönüşümlü voltamogramları	60

Şekil 3.18. Uzaklaştırma çözeltisinin ve uzaklaştırma süresinin optimizasyonu	62
Şekil 3.19. Bağlanma çözeltisinin süresinin optimizasyonu	63
Şekil 3.20. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE sensörüne ait diferansiyel puls voltamogramları ve kalibrasyon eğrisi	64
Şekil 3.21. Geliştirilen sensörün seçiciliği	66
Şekil 3.22. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE ile insan serum örneklerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.	67
Şekil 3.23. Girişim maddelerinin MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE sensörü ile cevabının Pirfenidon pik akımına % olarak etkisi	69

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. İPF'nin tanısı için kullanılan klinik test ve çalışmalar.	6
Çizelge 1.2. Pirfenidon analizine yönelik literatürde yapılmış belirli çalışmalar	32
Çizelge 2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	34
Çizelge 3.1. Pirfenidon için elde edilen ait regresyon analizi sonuçları	48
Çizelge 3.2. Pirfenidon'un insan serum örneği kalibrasyon eğrisine ait analiz sonuçları	49
Çizelge 3.3. İnsan serum örneğinde yalın CKE ile Pirfenidon geri kazanım sonuçları.	49
Çizelge 3.4. Pirfect® tabletlerden yalın CKE ile elde edilen analiz sonuçları.	51
Çizelge 3.5. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE elektrokimyasal nanosensörü oluşturmak için elde edilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi sonuçları	55
Çizelge 3.6. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörünün kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları	65
Çizelge 3.7. Pirfenidon'un insan serum örneği kalibrasyon eğrisine ait analiz sonuçları	67
Çizelge 3.8. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörüne ait Pirfect® tabletlerden ve insan serum örneğinden elde edilen analiz sonuçları.	68

1. GİRİŞ

Yaşam tarzı, çevre kirliliği, mesleki bozukluklar, biyolojik faktörler ve iyatrojenik faktörler, bazıları ölümcül olan çeşitli hastalıklara neden olur. Hastalıklar, insan ömrü ve refahı için en büyük risklerden biridir, bu nedenle teşhis ve buna bağlı olarak uygun tedavi yaklaşımının belirlenmesi, hastaların hayatta kalma oranlarını artırmada en etkili adımdır. Akciğer hastalıkları, yüksek mortaliye sahip ciddi sağlık sorunlarından biridir.

1.1.Nadir Hastalıklar

Moleküler genetik, birçok nadir hastalığın nedenini karakterize etmiştir ve hastalıklara ait fenotipleri belirlemek, hastalıkları önlemek veya iyileştirmek, tedaviler tasarlamak için benzeri görülmemiş fırsatlar sunmaktadır. Nadir hastalık araştırmaları, bilim insanları için özel yaklaşımlar gerektirmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalar, araştırma programlarının finansmanı, yeni tedavilerin keşfi, test edilmesi ve onaylanması ayrıca klinik çalışmalar alanında bilim adamlarının eğitimi gibi zorlukları beraberinde getirmektedir. İstatistiksel olarak geçerli çalışmalar, nadir hastalıklar için yeni tedavileri ortaya koyabilmektedir (Dündar ve Karabulut, 2010; Köken ve ark., 2018; Ürek ve Karaman, 2019).

Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nin Yetim İlaç Yasası, endüstrinin nadir görülen hastalıklara yönelik tedaviler geliştirmek için klinik araştırmalara yatırım yapmasını teşvik etmiştir (Griggs ve ark., 2009). Nadir hastalıkların klinik görünümü, doğal seyri, patofizyolojisi ve genellikle gizemli doğası yüzyıllardır hekimleri etkilemektedir. Nadir hastalıklar, insan fizyolojisi ve biyomedikal bilimini benzersiz bakış açılarından incelemek için fırsatlar sunar. Nadir hastalıklar araştırılması sonucu, büyük bilimsel atılımlar ortaya çıkmış ve daha yaygın bozukluklara ilişkin bilgiler edinilmiştir. Nadir hastalıkların teşhisi ve tedavisine yönelik bilgi eksikliği bu konudaki araştırmaların önemini vurgulamaktadır (Griggs ve ark., 2009). Bu hastalıklara yönelik farkındalık; genel olarak nadir hastalıklar konusunda farkındalığı destekleyen grupların artışı, internete ulaşımın yaygınlaşması ile hasta gruplarını organize etmesine ve bilinçlenmesine ve dünya çapında

milyonlarca insana ulaşması, nadir hastalıkları olan insanlar hakkındaki hikayelerine artan ilgisi, nadir hastalık araştırmalarına ve hedefe yönelik ilaç geliştirmeye hükümetin artan ilgisi ve finansmanı ve son olarak akademik tıp kurumlarının nadir hastalıkları olan hastaları tedavi etmek ve bu hastalıklarla ilgili araştırma yapmak için düzenlenen uzmanlaşmış merkezleri desteklemesi gibi sebepler ile son otuz yılda artmıştır (Griggs et al., 2009).

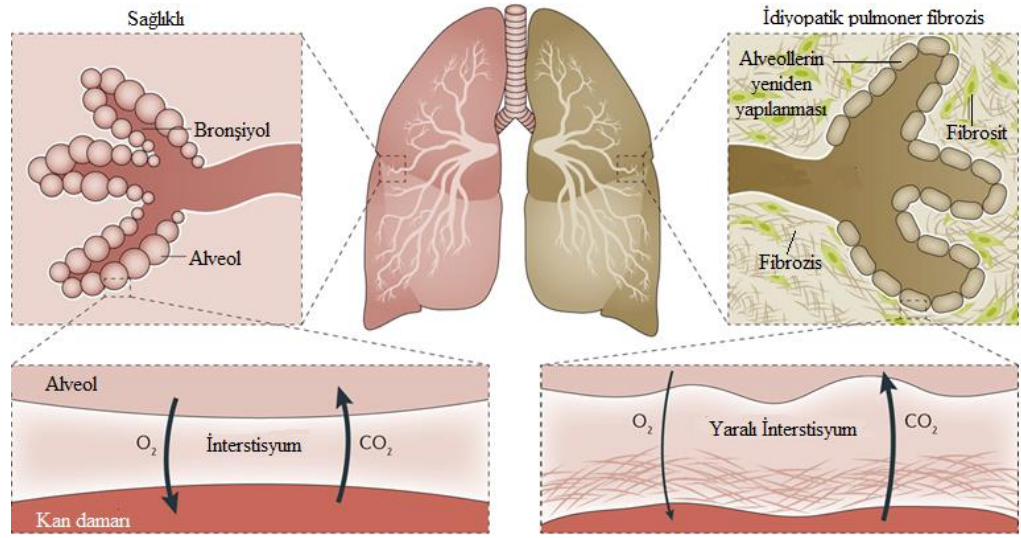
İlaç endüstrisi, gelir sağlamak adına, büyük hastalık popülasyonlarına odaklanırken, daha küçük nadir hastalık popülasyonları “yetim” kalmıştır (Cheung ve ark., 2004; Haffner ve ark., 2002; Wellman–Labadie ve Zhou, 2010). Böylece, hasta prevalansı 200.000'den az olan ve/veya ilaç geliştirme maliyetlerinin Amerika Birleşik Devletleri'nde satış yoluyla geri kazanılması olası olmayan bir hastalık olarak tanımlanan “yetim hastalık” kavramı ortaya çıkmıştır (Wellman–Labadie ve Zhou, 2010). Nadir görülen bir hastalığı tedavi etmek için kullanılan ilaçlara yetim ilaç denir, bu ilaçlara özel bir statü verilmesini sağlar. Avrupa Birliği'nde idiyopatik pulmoner fibrozis 10.000 kişiden 3 kişiden fazlasında görülmemiştir. Nadir hastalıklarda ve yetim ilaçlarda sınır 10.000 kişiden 5 kişide gözükmeleri şeklindedir. İdiyopatik pulmoner fibrozis nadir hastalıklar grubuna girmektedir, ve tedavisinde kullanılan Pirfenidon da yetim ilaç olarak kabul edilmektedir (Agency, 2015).

1.2. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis Hastalığı

Alveoller, akciğerlerde çok sayıda bulunan küçük, ince duvarlı hava keseleridir. Alveoller oksijenin kana girdiği ve karbondioksitin kandan çıktığı bölgedir. Alveoller, akciğerlerdeki ana hava yollarından ayrılan bronşiyol adı verilen küçük, dar tüplerin uçlarında bulunur. Temel olarak, hava burun ve ağızdan solunur ve boğazdan nefes borusuna (trakea) doğru ilerler. Trakea, bronşiyollerin bağlı olduğu bronş tüpleri adı verilen hava yollarına bölünür. Büyük ihtimalle, normal yara iyileşmesinin bir parçası olarak vücut, hasarlı epitel hücrelerini onarmaya çalışır. Bu yanıt, alveollerde ve çevreleyen akciğer dokusunda ilerleyici skarlaşmaya ve hasara yol açan anormaldir (Kolb ve ark., 2017; Spagnolo ve ark., 2021).

Akciğerin interstisyumu, akciğerler boyunca uzanan ve alveollere destek sağlayan dantel benzeri bir doku ağıdır. Minik kan damarları interstisyumdan geçer ve kan ile hava

arasındaki gaz değişimini kolaylaştırır. İnterstisyel akciğer hastalığı, tümü interstisyumu artan iltihaplanma, ödem ve/veya fibrozis dahil olmak üzere çeşitli şekillerde etkileyen birçok farklı durumu içeren bir hastalık kategorisidir. İdiyopatik pulmoner fibrozis, diğer interstisyel pnömoni ve aşırı duyarlılık pnömonisini içeren bu bozukluklar genellikle interstisyumun kalınlaşmasına neden olur ve gaz değişimini bozar. Koşullar genellikle eforla öksürük ve/veya nefes darlığı ile kendini gösterir. Bazı interstisyel akciğer hastalıkları akutken, diğerleri kronik, ilerleyici ve geri dönüşümsüzdür (Bergot, 2022; Fournier ve ark., 2022; León-román ve ark., 2022; Martinez ve ark., 2017; Spagnolo ve ark., 2021).



Şekil 1.1. İdiyopatik pulmoner fibroziste alveoler hasar

göstermiştir. İPF için bir tedavi olmamasına rağmen, bozukluğu yönetmek için çeşitli farklı tedaviler mevcuttur ve birkaç yeni tedavi seçeneği araştırılmaktadır. Sonuç olarak, etkilenen bazı bireyler için akciğer nakli gerektirecektir. İPF, akciğerlere benzer şekilde zarar veren ve bilinmeyen nedenlerle ortaya çıkan bir grup akciğer hastalığı olan idiyopatik interstisyel pnömoninin bir formu olarak sınıflandırılır. Bu hastalık grubu, yaygın parankimal akciğer hastalıkları olarak da bilinir. Toplu olarak, bu bozukluklar daha geniş bir şemsiye terim olan interstisyel akciğer hastalıkları (ILD'ler) altında sınıflandırılır. ILD'ler, akciğerlerde ilerleyici skarlaşma ile karakterize 200'den fazla hastalık içeren büyük bir hastalık grubunun altında sınıflandırılır ve İPF en yaygın şeklidir (Glass ve ark., 2020; Moran–Mendoza ve ark., 2019; Raghu ve ark., 2012).

İPF'nin tanısı için kullanılan klinik test ve çalışmalar Çizelge 1.1'de gösterilmiştir. İPF'nin erken evrelerinde hastalık asemptomatik ilerleyerek hiçbir semptom görülmeyebilir. Hastalığın ilerlemesi oldukça değişkendir. Bazı kişiler, semptomların bir miktar düzelmeden önce bir süre kötüleştiği 'alevenmeler' yaşayabilir. İlk karakteristik semptom, egzersiz gibi efor sırasında özellikle fark edilen dispne, yani nefes darlığıdır. Etkilenen bireyler ayrıca çok az veya hiç akıntı çıkarmayan hafif, kuru bir öksürük sergileyebilir. Bu verimsiz öksürük 30 günden fazla sürer. Hastalık ilerledikçe, etkilenen bireyler orta derecede efor veya egzersiz üzerine nefes darlığı geliştirir. Hızlı, yüzeysel solunum sergileyebilirler. Sonunda, minimum eforla veya istirahatte bile nefes darlığı gelişebilir. Etkilenen bireyler, kontrol edilemeyen tekrarlayan öksürük nöbetleri yaşayabilir. Oluşabilecek ek semptomlar arasında anormal yorgunluk, göğüste rahatsızlık, kademeli, istenmeyen kilo kaybı ve ağrıyan eklemler ve kaslar bulunur. Bazı kişilerde parmaklarda veya ayak parmaklarında genişleme meydana gelir. Clubbing, tırnakların ve ayak tırnaklarının altındaki dokunun şişip daha geniş ve yuvarlak hale gelmesidir. Etkilenen bireylerin kronik pnömoni gibi tekrarlayan göğüs enfeksiyonları geliştirme riski yüksektir (Moran–Mendoza ve ark., 2019; Spagnolo ve ark., 2021).

İPF'nin kesin, altta yatan nedeni tam olarak anlaşılmamıştır. İmmünolojik, çevresel ve genetik faktörler dahil olmak üzere farklı faktörlerin, bozukluğun gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. İPF geliştirme riskinin %30'unu oluşturan en güçlü risk faktörü, *MUC5B* genindeki, akciğerdeki en küçük hava yollarında (solunum bronşiyolları)

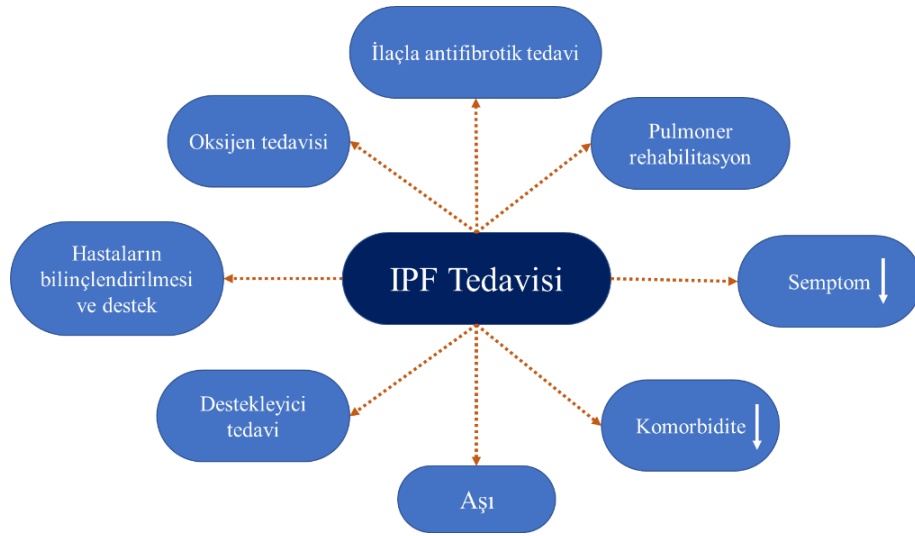
daha fazla mukus üretimi ile sonuçlanan bir varyasyondur. Uzun yıllar boyunca araştırmacılar, çoğu vakanın akciğerlerde aşırı skarlaşmaya neden olacak şekilde ilerleyen akciğerlerdeki genel inflamasyondan kaynaklandığını düşünüyorlardı. Bununla birlikte, araştırmacılar artık çoğu vakanın küçük hava yollarını ve alveolleri (epitel hücreleri) kaplayan belirli hücrelere verilen hasardan kaynaklandığına inanıyor.

Çizelge 1.1. İPF'nin tanısı için kullanılan klinik test ve çalışmalar.

Klinik Test	Uygulama	Kullanım amacı
Göğüs röntgeni	Akciğerlerde skarlaşmayı gösterebilir.	Bazı kişilerde tanı amaçlı kullanılabilir.
Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi	Belirli doku yapılarının kesit görüntülerini gösteren bir film oluşturmak için kullanılır. Skar dokusunun varlığını ve akciğer hasarının boyutunu ortaya çıkarabilir.	Bilgisayar tomografisi taramasından daha keskin, daha ayrıntılı resimlerini verir. Bazı durumlarda spesifik bulguların varlığı tanı koymak için yeterli olabilir.
Solunum fonksiyon testleri	Akciğerlerin oksijeni ne kadar iyi alıp verdiğini ve oksijeni kana ne kadar verimli aktardıklarını ölçmek için kullanılabilir. Kan basıncının, oksijen saturasyon seviyelerinin ve kalp fonksiyonunun izlenir.	Spesifik yöntemler değişiklik gösterir, ancak koşu bandında yürümek veya sabit bir bisiklete binmek egzersiz testi sırasında kullanılan yaygın yöntemlerdir.
Bronkoalveolar lavaj	Dar bir tüp soluk borusundan akciğerlere doğru kaydırılır ve tüpten steril bir solüsyon geçirilerek hücreleri yıkanır. Bu sıvı toplanır ve daha sonra tüp çıkarılır ve hücreler incelenir.	Diğer hastalıkları ekarte etmek için kullanılır.
Akciğer biyopsisi	Akciğerlerdeki çeşitli yerlerden akciğer dokusu örneklerinin çıkarılmasını içerir.	Belirli koşulları ekarte edebilir ve İPF tanısını doğrulayabilir.
Video yardımcı torakoskopi	Göğüs duvarında çok küçük bir kesiden küçük bir kamera ile tutturulmuş endoskop adı verilen dar bir tüpün yerleştirilmesini içerir.	Akciğerlerin veya göğüs boşluğu içindeki diğer yapıların incelemesini sağlar.

1.2.1. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

2014 yılında FDA, İPF tedavisi için iki ilacı onaylanmıştır. İntedanib, akciğer dokusunun skarlaşmasına dahil olabilecek birçok yolu bloke eden bir kinaz inhibitörüdür. Pirfenidon, akciğer dokusunun skarlaşmasına karışabilecek birçok yola etki eder (Fournier ve ark., 2022; Lehtonen ve ark., 2016; Molina–Molina, 2019).



Şekil 1.2. İPF tedavisinde kullanılan yöntemler

Diğer çeşitli tedavi seçenekleri, İPF semptomlarını tedavi etmeyi, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmayı ve etkilenen bireylerin aktif ve sağlıklı kalmalarına ve yaşam kalitelerini korumalarına yardımcı olmayı amaçlamaktadır. Yaşamlarının bir noktasında, İPF'li çoğu birey, akciğerlerin kan dolaşımına oksijen transfer edememesini telafi etmek için ek oksijene (oksijen tedavisi) ihtiyaç duyacaktır. İlk başta, oksijen tedavisi sadece efor sarf edildiği zamanlarda gerekli olabilir, ancak bazı durumlarda sonunda sürekli olarak gerekli olabilir. Oksijen tedavisi nefes darlığını azaltabilir ve bireylerin daha aktif olmasını sağlayabilir.

İPF'li hastalar Şekil 1.2'de belirtilen tedavi yöntemlerinden faydalanabilmektedir. Kronik akciğer hastalığı olan bireyler için standart bir tedavi seçeneği olan pulmoner rehabilitasyon olarak bilinen bir programdan yararlanabilirler. Pulmoner rehabilitasyon

genellikle bir klinikte akciğer hastalığında deneyimli bir uzman ekibini içerir. Pulmoner rehabilitasyon bireylere egzersiz eğitimi hakkında bilgi verir; özel nefes alma stratejileri veya teknikleri, beslenme danışmanlığı ve enerji tasarrufu teknikleri. Bu uzmanlar ayrıca, hastalığın en iyi nasıl yönetileceği de dahil olmak üzere akciğer hastalığı konusunda eğitim verebilir ve psikolojik danışmanlık sağlayabilir. İlaç tedavisine gelince, uzun yıllar boyunca, prednizolon gibi kortikosteroid ilaçlar, sıklıkla azatioprin gibi bir immünosupresif ilaçla birlikte İPF'li hastaları tedavi etmek için kullanılmıştır. İlaçlar iltihabı azaltır ve bağışıklık sistemini baskılar. N–asetilsistein de bu ilaç rejimine eklenir.

İleri evrelerde İPF'li hastalar için akciğer nakli gerektirebilir. Bu tür ameliyatlar, ciddi hastalığı olan, diğer tedavilere yanıt vermeyen ve başka ciddi tıbbi komplikasyonları olmayan 65 yaş altı genç hastalarda daha olasıdır. Herhangi bir organ naklinde olduğu gibi, akciğer nakli de reddedilme veya enfeksiyon gibi önemli komplikasyon riski taşır. Gastroözofageal reflü, midede asit üretimini azaltan veya baskılayan standart ilaçlarla tedavi edilebilir. GÖRH tedavisi, İPF'li bireylerde özellikle önemli olabilir, çünkü bazı çalışmalar GÖRH tedavisi gören bireylerde daha uzun sağkalım süreleri ve daha düşük fibrozis skorları göstermiştir. Ek tedaviler semptomatiktir ve standart yönergeleri takip eder. Örneğin, akciğer enfeksiyonları ve öksürük ilaçları için antibiyotikler reçete edilebilir ve kodein kullanımı kronik öksürükten kurtulma sağlayabilir.

1.2.2. Pirfenidon

Pirfenidon, idiyopatik pulmoner fibrozisin tedavisi için oral bir piridondur. Pirfenidon (5–metil–1–fenil–2–[1H]–piridon), hayvan modellerinde fibrozisin ilerlemesini engelleyen yeni bir antifibrotik ajandır. Birkaç klinik çalışma, akciğer fonksiyonunu stabilize etmede ve akut alevlenme yaşayan İPF'li hasta sayısını azaltmada umut vaat etmiştir (Bando, 2016; Fournier ve ark., 2022; George ve Wells, 2017). Pirfenidon zorlu vital kapasitedeki (FVC) düşüşü önemli ölçüde azaltmıştır. Tedavi grupları arasında zaman içinde FVC'deki ortalama düşüşteki farklılıklar 157 ile 193 mL arasında değişmiştir. Tüm nedenlere bağlı mortalite, klinik araştırmalar ve mevcut takip süreleri boyunca Pirfenidon'dan önemli ölçüde etkilenmemiştir. Karaciğer enzim yükselmeleri ve ilaca bağlı karaciğer hasarı Pirfenidon ile ilişkilendirilmiştir; bu nedenle, tedavi sırasında karaciğer

fonksiyonunun izlenmesi gereklidir. Pirfenidon 2014 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Moran–Mendoza ve ark., 2019)

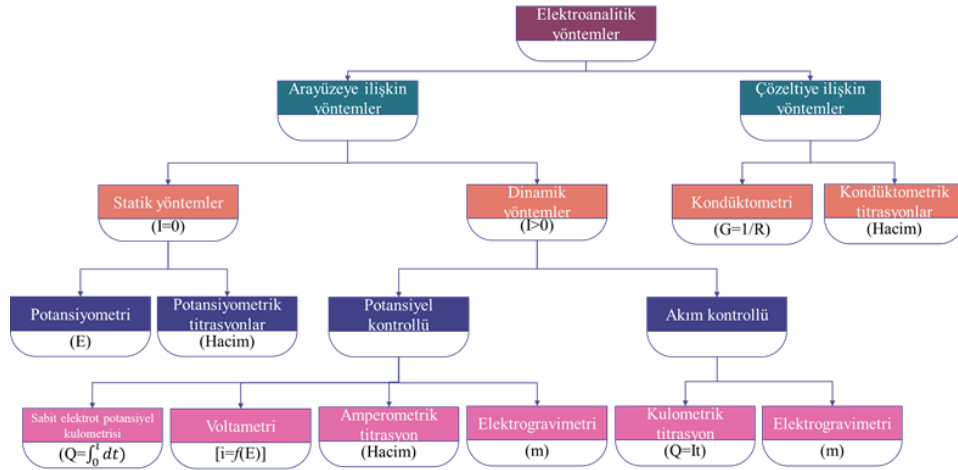
Bu olumlu klinik çalışmalar sonucunda Pirfenidon, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avrupa, Japonya ve diğer birçok ülkede İPF tedavisi için onaylanmıştır. Günlük kullanım dozu ağızdan 3 kez 267 mg'dır ve üçüncü haftaya kadar bu doz haftalık olarak günde 3 kez 801 mg'a yükseltilir. Başlıca yan etkiler gastrointestinal ve hepatiktir; hastalar genellikle bir ışığa duyarlılık deri döküntüsü geliştirir (Bando, 2016).

Pirfenidon'un anti-fibrotik etkisi, reaktif oksijen türlerinin, transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) gibi pro-fibrotik sitokinlerin ve tümör nekroz faktörü (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinlerin üretiminin inhibisyonundan kaynaklanabilir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PGDF) ekspresyonu yoluyla makrofajların ve fibroblastların proliferasyonunu indükleyerek akciğerlerdeki fibrotik süreçleri kolaylaştıran TGF- β 'nin baskılanması, Pirfenidon için anti-fibrotik aktivitenin ana mekanizması olarak kabul edilir. Pirfenidon çok az immünosupresif aktiviteye sahiptir (Spagnolo ve ark., 2021; Takeda ve ark., 2014).

Pirfenidon oral yoldan kullanılır, ortalama %58 bağlanma ile konsantrasyondan bağımsız bir şekilde plazma proteinlerine bağlanır. Serum albümini ana bağlayıcı proteindir. Pirfenidon esas olarak karaciğerde CYP1A2 tarafından 4 metabolite metabolize edilir. CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ve CYP2E1 gibi diğer enzimler de rol oynar. İnsan plazmasında önemli miktarlarda sadece Pirfenidon ve 5-karboksi-Pirfenidon metaboliti bulunur. Bir dozun yaklaşık %80'i idrarla, neredeyse tamamı 5-karboksi metaboliti (%99,6) olarak atılır. Ortalama terminal yarı ömrü yaklaşık 3 saattir. Pirfenidon, CYP1A2'nin birincil substratı ve ayrıca CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ve CYP2E1'in minör bir substratıdır. Güçlü veya orta derecede CYP1A2 inhibitörleri (örn. fluvoksamin, bazı kinolon antibiyotikleri) alan hastalarda doz ayarlaması gereklidir. Pirfenidon, in vitro olarak zayıf bir P-gp inhibitörüdür (Takeda ve ark., 2014; Taniguchi ve ark., 2010)..

1.3. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimya, anot ve katot içeren bir hücrede indirgeme–yükseltgenme olaylarının incelenmesidir. Redoks (yükseltgenme–indirgeme) reaksiyonları elektron alışverişini içerir. Yükseltgenmenin meydana geldiği katot ve indirgemenin meydana geldiği elektrot hücresi anottur. Elektrokimyasal analiz yapılacak bir sistemde incelenecek analiti içeren elektrolit bir çözelti, elektrotlar ve elektrotları birbirine bağlayan bir döngü sistemi gereklidir. Çok sayıda sistem, elektrokimyadan kapsamlı bir şekilde yararlanır. Elektroanalitik kimya, bir elektrokimyasal hücrede çözelti karışımlarının elektriksel özelliklerinin ölçülmesine dayalı olarak maddelerin kalitatif ve kantitatif analizlerini sağlayan bilim dalıdır ve Şekil 1.3'teki gibi sınıflandırılmaktadır. Elektroanalitik kimyada kullanılan yöntemler son yıllarda diğer yöntemlere göre (kromatografi vb.) daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni, elektroanalitik yöntemlerin daha hızlı, seçici, hassas, minyatürleştirilebilmesi, kolay numune hazırlama, ekonomik ve düşük teşhis limiti gibi avantajlarının olmasıdır (Skoog, 1992).



Şekil 1.3. Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması

Elektrokimya, disiplinler arası bilimin belki de en önde gelen örneği olan zorlayıcı ve geniş spektrumlu bir disiplindir. Elektrot–çözelti ara yüzünde adsorpsiyonla ilgili temel yönlerin incelenmesinden, sonunda uygulamalı analitik yönler (dedektörler ve sensör sistemleri) ve sentetik ilgili uygulamalara (elektrokristalizasyon) bir polimer matris içinde immobilizasyona kadar yük transfer işlemlerini içerir. Aslında, elektrokimyasal çalışmaların

çoğunluğu, elektrot-çözelti ara yüzünün veya karmaşık redoks sisteminin yapısal karakterizasyonuna ve genel yapının bir fonksiyonu olarak yük transfer kinetiğinin ve dinamiğinin incelenmesini amaçlamaktadır (Skoog, 1992).

Elektrokimyasal davranışın uygun şekilde incelenmesi örneğin, dönüşümlü voltametri ve impedans spektroskopisi ölçümleri, yapısal özellikler hakkında bilgi edinilmesine izin verir. Her halükârda, bağımsız bir teknik kullanılarak gerçekleştirilen, elektrokimyasal kanıtların tartışılmasından çıkarılan makul bir hipotezin çapraz kontrolü arzu edilir. Bu bağlamda, spektroskopik ve teorik yöntemlerin uyumlu çalışmaları, elektrokimyasal süreçlerin moleküler seviyeye kadar anlaşılmasındaki paradigma değişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Salzillo ve ark., 2022).

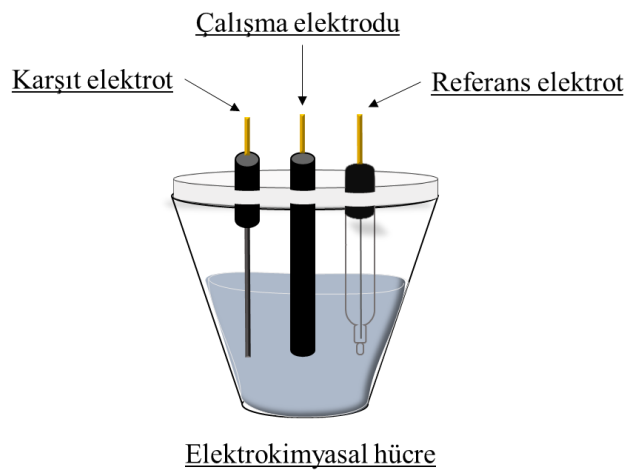
Elektrokimya tarafından sağlanan yeni dönüşümlerin çeşitliliği, büyük ölçüde, redoks araçları, uygulanan potansiyel, elektrot malzemesi ve hücre yapısı dahil olmak üzere elektrokimyasal sistemlerdeki benzersiz özelliklerin ve reaksiyon parametrelerinin bir sonucudur. Bu ek özellikler, reaktivite ve seçiciliği kontrol etmek için yeni yöntemler sunarken, aynı zamanda bir reaksiyon sisteminin boyutlarını artırır ve optimizasyonunu karmaşıktırır. Ancak bu zorluk, yüksek kaliteli veri kümelerinin oluşturulmasını kolaylaştıran yüksek verimli tarama platformlarının geliştirilmesinin yanı sıra reaksiyon keşfine yardımcı olmak için veri bilimi araçlarının giderek daha fazla benimsenmesine yol açmıştır. Elektrokimyasal sensörler (kimyasal ve biyolojik) son yıllarda tıbbi teşhis, kişisel koruma, tarım ve çevresel toksinlerin tespiti alanlarında aşırı bir etkiye sahiptir. Son yıllarda araştırmalar, analitin sensörün aktif yüzeyiyle etkileşimine dayanan ölçülebilir bir sinyalin çıkışına bağlı olan basit katı hal sensörlerinin yaratılmasına odaklanılmıştır. Bu yaklaşımın organik ve inorganik biyomolekülleri araştırmak için uygulanabilirliği de fark edilmiştir (Martinez Alvarado ve ark., 2022).

1.3.1. Voltametri

Voltametri, 1922'de Çek bilim adamı Jaroslav Heyrovský tarafından geliştirilen elektrokimyanın bir dalıdır. Prof. Heyrovský, voltametri alanındaki çalışmaları nedeniyle 1959'da kimya dalında Nobel Ödülü almıştır. 1960 ve 1970'te voltametride analitik

tekniklerin duyarlılığını ve aralığını geliştirmek için çok ilerleme kaydedildi (Barek ve ark., 2001; Zuman, 2001). Voltametrik yöntem, bir elektrokimyasal hücre reaksiyonu sırasında elektrokimyasal süreçlerde gözlemlenen akım ve voltaj arasındaki ilişkiyi takip eder. Voltametrik yöntemler, uygulanan potansiyel ve akımdaki zaman periyodundaki değişimini ölçmektedir. Bu yöntemlere aktif yöntemler denir, çünkü uygulanan potansiyel nedeniyle meydana gelen değişiklikler elektrot yüzeyindeki bir elektroaktif türün konsantrasyonunda bir farka neden olur. Şekil 1.4'te geleneksel üçlü elektrot sistemi görülmektedir. Bu, elektrokimyasal indirgeme veya oksidasyonun sonucudur (Zoski, 2006).

Yöntemler, çözünmüş inorganik ve organik bileşiklerin sayısının kantitatif olarak belirlenmesini, çeşitli ortamlarda oksidasyon ve indirgeme işlemlerinin temel çalışmalarını, elektron taşıma prosedürünün kinetiğini ve termodinamik özelliklerini içerir. Voltammetrik yöntemlerin uygulamaları, farmasötik açıdan ilgili bileşiklerin belirlenmesi için de kullanılabilir. İlaç analizi için voltametrik yöntemlerin kullanılması, hem organik hem de inorganik türler için mükemmel hassasiyet aralığı, hızlı tayin, kolay uygulama gibi çeşitli avantajları beraberinde getirmektedir (Gupta ve ark., 2011; Zoski, 2006). Voltametrik metotta, modifiye edilmemiş elektrotlar, reaksiyon mekanizmasındaki elektronların yavaş hareket etmesi nedeniyle hassasiyeti azaltır; nanopartiküller elektrokimyasal sensörün performansını ve biyoaktif moleküllerin ve çevresel örneklerin miktar tayini için bağlanma yeteneğini artırabilir (Skoog, 1992).



Şekil 1.4. Voltametrik ölçümlerde kullanılan hücre ve üçlü elektrot sistemi gösterimi

1.3.1.1.Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri (DV), tayin için bir elektrodun redoks özelliklerini, kararlılığını ve etkin yüzey alanını anlamak ve karakterize etmek için kullanılır. DV geleneksel üç elektrotlu sistem ile çalışır. DV'de, çalışma elektroduna uygulanan bir potansiyel, belirli bir voltaj aralığı ve voltaj tarama hızı ile potansiyel, belirli bir potansiyel aralığında taranırken, çalışma elektrodunda ortaya çıkan akım ölçülür. Üretilen akım daha sonra, çalışma elektrodu üzerinde meydana gelen oksidasyon sürecinden kaynaklanan anodik pik akımına (I_{p_a}) ve indirgeme sürecinden katodik pik akımına (I_{p_c}) dayalı olarak transdüser malzemesi hakkında bilgi sağlayan bir DV grafiği üretmek için potansiyele karşı çizilir. Pik akımların meydana geldiği potansiyeller, pik potansiyelleri olarak bilinir (E_p). Bu pik potansiyelleri, deneyler sırasında tarama hızlarını artırarak elektrot yüzeyindeki reaksiyonun elektrokimyasal tersinirliğinin analiz edilmesini sağlar. Elektrokimyasal olarak geri dönüşümlü reaksiyonlar genellikle türler ve elektrot arasında hızlı elektron transferi sağlarken, tersinmez reaksiyonlarda elektron transferi daha yavaştır (Elgrishi ve ark., 2018; Zoski, 2006).

1.3.1.2.Diferansiyel Puls Voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisinde (DPV), küçük genlikli, kısa darbeler doğrusal bir rampa üzerine bindirilir. Puls uygulanmadan önce ve her darbenin sonunda akım ölçülür ve akımlar arasındaki fark hesaplanır. Bu prosedür, arka plan akımını etkili bir şekilde azaltır ve bu nedenle, çoğu kapasitif akımdan arınmış bir Faradaik akımla sonuçlanır. DPV'nin en büyük avantajı, yüksek hassasiyete yol açan düşük kapasitif akımdır. DPV'deki küçük adım boyutları ayrıca daha dar voltametrik pik noktalarına yol açar ve bu nedenle DPV, benzer oksidasyon potansiyellerine sahip analitleri ayırt etmek için sıklıkla kullanılır (Skoog, 1992).

1.3.1.3. Kare Dalga Voltametrisi

Kare dalga voltametrisi (KDV) yönteminde bir merdiven potansiyeli üzerinde sabit genlikli simetrik kare dalga ile potansiyel dalga formunun üst üste bindirilmesi ile pulslar

elde edilir (Liu ve ark., 2010; Zoski, 2006). KDV’de bir katodik darbe ve aynı genliğe sahip bir anodik darbe arasında ortalanan bir merdiven potansiyel sinyali üzerine bir potansiyel darbe dizisi bindirilir. Her katodik darbe sırasında, analit elektrot yüzeyine yayılır ve hemen indirgenir. Anodik darbe sırasında, henüz indirgenmiş olan analit yeniden oksitlenir. Akım, her darbenin hemen öncesinde ve sonunda örneklenir ve bu iki nokta arasındaki akım farkı daha sonra bir kare dalga voltamogramında merdiven potansiyeline karşı çizilir. KDV’de, akımın önemli ölçüde geliştirilmiş bir Faradaik bileşenini ölçmek için her darbenin sonunda yeterince uzun bir akım örnekleme periyodu ayarlamak çok önemlidir. Bununla birlikte, KDV’de doğrusal bir potansiyel taramanın tamamlanması yalnızca birkaç dakika gerektirirken, analitik verilerin kolay yorumlanması için daha yüksek akım sağlar (Liu ve ark., 2010; Zoski, 2006).

1.3.1.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

Elektrot–elektrolit ara yüzünün incelenmesi için elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri kullanılır ve bu tür ara yüzlerin yorumlanması için en sık Randles–Ershler eşdeğer devresi uygulanır. Randles–Ershler eşdeğer devresinin ana parametreleri arasında çözelti direnci (R_s), yük transfer direnci (R_{ct}), Warburg impedansı (Z_w) ve elektrotun çift katmanının kapasitansı (C_{dl}) bulunur. İmpedans spektrumlarını çizmenin en sık kullanılan yolları Nyquist ve Bode grafikleridir (Liu ve ark., 2010). Nyquist çizimleri, devrenin elemanlarını tahmin etme yeteneği nedeniyle impedans çizimi için tercih edilir ve genellikle elektron transfer kinetiğini incelemek için kullanılır. Bode grafiklerinden, frekansın impedansa nasıl bağlı olduğu değerlendirilebilir. Ancak, impedansı çizmenin bu iki yolu, impedans ve kapasitans ilişkisini ortaya çıkarmaz. Bu boşluk, impedansı Z_{real} – C_{real} koordinatlarında çizerek oluşturulan devre ile kolayca atlanabilir.

EIS sensörlerinin iki gruba ayrılması (Faradaik ve Faradaik olmayan), elektriksel yük transferinin gözlenmesinden dolayı elektrolit ve elektrot ara yüzünde redoks türlerinin varlığı ile desteklenir. Yalnızca redoks reaksiyonlarının akımından dolayı daha yüksek hassasiyet faradaik sensörler için ne faradaik olmayanlar için daha karakteristiktir. EIS, basitliğinin yanı sıra, MIP sentezinin her adımının bir karakterizasyonunu ve hedef yeniden bağlamanın oldukça hassas bir şekilde okunmasını sağlar. EIS izleme, elektrikli çift katman

teorisine dayanmaktadır. Az miktarda redoks-aktif malzeme içeren bir sistem belirlemede hataya yol açabilir, bu nedenle Faradaik işlemin yalancı kapasitans etkileri de hesaba katılmalıdır.

1.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama teknolojisi, yapı öngörülebilirliği, tanıma özgüllüğü ve uygulama kolaylığı gibi benzersiz özellikler sayesinde çeşitli alanlara geniş çapta uygulanmıştır. Moleküler baskılama, yüksek seçicilik, basitlik, hızlilik ve mükemmel kararlılığın yanı sıra düşük maliyet ve çevre dostu olma özelliklerine atfedilen önemli avantajlar ilgi çekmiştir (Bozal-Palabiyik ve ark., 2020; Gui ve ark., 2018). Sonuç olarak, hedef bileşikler yüksek afinite ile seçici olarak bağlayabilen yapay reseptörler, karşılık gelen doğal biyo-reseptörlerinkine benzer şekilde tasarlanmakta ve üretilmektedir.

MIP'ler, şablon molekülleri şekil, boyut ve fonksiyonel grup olarak tamamlayan spesifik tanıma bölgelerine sahip sentetik polimerik malzemelerdir. MIP'ler, çeşitli polimerlerden kolayca sentezlenir ve belirli analitler için düşük maliyetle özel olarak üretilir. Çok yönlü malzemeler olarak, MIP'ler şablon esnekliği ve diğer doğal muadillerine göre daha yüksek fiziksel sağlamlık ve termal stabilite ile öne çıkmaktadır. Böylece MIP'ler, numune ön işleme, kromatografik ayırma, kimyasal ve biyolojik sensörler vb. alanlarda büyük ilgi uyandırmıştır. Bugüne kadar, çeşitli küçük moleküller, proteinler ve iyonlar üzerine bir dizi çalışma yapılmıştır. MIP'lere dayalı sensörler ile birçok maddenin tayini hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Lu ve ark., 2015).

MIP, "şablon" olarak adlandırılan hedef analitin varlığında monomerlerin, çapraz bağlayıcıların ve diğer gerekli bileşenlerin (yani başlatıcılar ve porojenler) polimerizasyonu ile hazırlanan tanıma malzemeleridir. Şablonun uzaklaştırılmasından sonra, analitin boyutunu, şeklini ve kimyasal işlevselliğini koruyan ve hedef analitin spesifik olarak tanınmasını sağlayan serbest boşluklar oluşturulur. Moleküler baskılama teknolojinin uygulanması, oldukça seçici analitik sistemleri elde etmenin pratik bir yoludur. Monomerin şablon molekül ile ana etkileşim türleri; şelasyon, elektrostatik, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağlarının oluşumu olarak ayırt edilebilir. Daha sonra

şablon molekülün uzaklaştırılmasından sonra bu özel bölgelerin oluşturulması, üç boyutlu boşluklar oluşur. Benzer şekilde, MIP'e benzer bir prosedür kullanılarak ancak şablon moleküller olmadan elde edilen polimerler, baskısız polimerler (NIP) olarak adlandırılır ve genellikle MIP'lerin etkinliğinin değerlendirilmesi ve doğrulanması için kullanılır (Madikizela ve ark., 2018).

1.4.1. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Tasarımı

Moleküler baskılama işlemi, fonksiyonel bir monomerin ve bir moleküler şablon etrafında bir çapraz bağlayıcının polimerizasyonunu içerir. İlk olarak, şablon–monomer kompleksleri, seçilen bir şablon molekül ile tamamlayıcı bir fonksiyonel monomer arasında elde edilir. Daha sonra kompleksin etrafında bir çapraz bağlama polimerizasyon reaksiyonu gerçekleştirilir. Şablon molekül uzaklaştırıldıktan sonra, baskılanmış bölgelerin, şablonları tamamlayan fonksiyonel grupların geometrisi ve konumu ile gözenekler sunan üç boyutlu bir ağ içerdiğine dikkat etmek önemlidir (Bozal–Palabiyik ve ark., 2020; Chen ve ark., 2016).

Analitik sistemlerdeki MIP'ler, bazı biyomoleküllerin yerini alabilir ve bu şekilde, polimerler, aşırı pH, organik baz ve otoklav işlemine karşı dikkate değer bir direnç sergilediler ve uzun vadeli bir kararlılık sergilemiştir. Moleküler şablonların çoklu yeniden kullanımı, düşük maliyetli olması, daha basit polimerizasyon aşaması ile kolayca yüzeyin elde edilmesi, MIP bileşimlerinin çoğu kez yığın halinde optimize edilmesi gerekir (bu, yığın ve sensör arasındaki yapışma özelliklerinde farklılıklara yol açabilir). MIP'lerin performansı ayrıca nanomalzemeler, metal–organik çerçeveler, manyetik ve diğer NP'ler dahil edilerek veya çeşitli MIT yüzey baskısı, segment baskısı, çok duyarlı baskı vb. kullanılarak geliştirilmiştir (Bozal–Palabiyik ve ark., 2020; Chen ve ark., 2016).

Son olarak, MIP kullanan elektrokimyasal yöntemler diğer bazı avantajları veya sınırlamaları karşılayabilir: kovalent bağlanma daha az esnektir, çünkü tersinir reaksiyonlar sınırlıdır ve termodinamik dengeye ulaşmak zordur, çünkü baskılı analitin bağlanması ve ayrışması oldukça yavaştır. Etkileşimleri bozmadan kovalent olmayan bağlanma, analitin

nispeten hızlı bağlanması ve uzaklaştırılması için kullanılır(Bozal–Palabiyik ve ark., 2020; Chen ve ark., 2016).

MIP katmanının kalınlığı, MIP tabanlı analitik sistemlerin önemli bir parametresidir. MIP katmanının kalınlığı, uygun elektrokimyasal parametrelerin seçilmesiyle kolayca uyarlanabilir ve sentezlenebilir. Daha kalın bir film, hedef moleküllerin tanınmasına fayda sağlayan daha fazla baskılı boşluk sağlamıştır. Bununla birlikte, MIP filmi çok kalınsa, baskılanmış boşlukların bir kısmı polimer matrisinde oldukça derine gömülebilir ve bu nedenle, yüksek kütle transfer direnci nedeniyle hedef moleküllerin aktif bölgeye erişmesi zordur. Öte yandan, daha ince MIP filmi oldukça sınırlı miktarda baskılanmış boşluklar üretir ve bu şekilde hedef molekülün tanınması karmaşıktır. 10 ile 100 nm aralığında olan etkili analitik sinyal iletimi için polimerik tabakanın ideal kalınlığını tanımladığını not etmek önemlidir(Bozal–Palabiyik ve ark., 2020; Chen ve ark., 2016).

Her şey göz önüne alındığında, MIP'lerin kalitesi, çözültide diğer girişim moleküllerinin ve diğer türlerin bir arada bulunmasına rağmen analitin benzersiz bir şekilde tanınması, baskılanmış analitin birleşmesi ve ayrışması ve çeşitli ara yüzlerin yorumlanması ile belirlenir(Bozal–Palabiyik ve ark., 2020; Chen ve ark., 2016).

MIP, spesifik afiniteye sahip boşlukların oluşturulduğu iyi bilinen bir yaklaşımdır. Bu fonksiyonel malzemeler çoğunlukla küçük moleküllerin ayrılması, algılanması ve katalizi için kullanılır. Son yirmi yılda, MIP konsepti nanopartiküller, virüsler ve hücreler gibi büyük varlıkların baskılanması için genişletilmiştir (Bozal–Palabiyik ve ark., 2020; Chen ve ark., 2016). MIP, fonksiyonel monomerlerin Van Der Waals, hidrojen bağı ve daha fazlası gibi farklı moleküler kuvvetler tarafından müdahale edilen şablonun etrafında düzenlendiği bir kendi kendine montaj işlemi ile hazırlanmıştır. Monomerler genellikle bir çapraz bağlayıcı varlığında polimerize edilerek bir polimer matris elde edilir. Bu şablonu gömer. İkincisi, şablon ile uyumlu spesifik yapısal ve fonksiyonel afiniteye sahip boşluklarla sonuçlanan polimerden çıkarılır. MIP'ler, küçük analitlerin, yani tipik olarak moleküllerin algılanması ve ayrılması için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, proteinler, virüsler, bakteriler ve nanopartiküller gibi önemli ölçüde daha büyük şablonlara kolayca uygulanamazlar. MIP matrisi boyunca sınırlı yayılmaları, bu büyük varlıkların çıkarılmasını ve yeniden alınmasını

neredeyse imkânsız hale getirir (Adumitrăchioaie ve ark., 2018; Bozal-Palabiyik ve ark., 2020; L. Chen ve ark., 2016; Scheller ve ark., 2019; Yarman ve ark., 2018).

Moleküler baskılama üç ana adımdan oluşur; monomer-şablon kompleksinin oluşumu, kompleksin polimerizasyonu ve şablonun uzaklaştırılması (Alvarez-Lorenzo ve Concheiro, 2013; Canfarotta ve ark., 2018; Huynh ve Le, 2018).

Elektrokimyasal sensörler en hızlı büyüyen kimyasal sensör sınıfını temsil etmektedir (Stradiotto ve ark., 2003). Bu sensörler, kimyasal olarak seçici bir katmanı (tanıma elemanı) bir elektrokimyasal dönüştürücüye bağlayarak bir sistemin bileşimi hakkında gerçek zamanlı bilgi veren cihazlardır (Antuna-Jimenez ve ark., 2012). Elektrokimyasal sensörlerin hazırlanması ve kullanımı çok kolaydır, hızlı tepki süreleri vardır, düşük maliyetlidir, minyatürleştirilebilir ve araştırmacıların çok sayıda analit tespiti yapmasına izin verir (Antuna-Jimenez ve ark., 2012; Bozal-Palabiyik ve ark., 2020). Elektrokimyasal dönüştürücüler, malzeme bilimindeki ve elektronikteki ilerlemelerden faydalanarak sensörlerin yüksek duyarlılık, seçicilik ve kullanım kolaylığı gibi gereksinimlerini karşılayabilmektedir (Muzyka ve ark., 2013). Duyarlılık, elektrokimyasal sensörler ve MIP teknolojisinin birleştirilmesiyle önemli ölçüde geliştirilebilir ve elektrokimyasal tekniklerle, cihazların minyatürleştirilmesi ve hatta hasta başında analiz yapılan cihazların elde edilmesi mümkün olabilir (Adumitrăchioaie ve ark., 2018).

İlaç analizinde MIP'lerin kullanımı son yıllarda artmıştır, çünkü bunlar sadece istenen molekülü analiz etmek için kullanılabilir. Günümüzde insanların çoğunun şu veya bu şekilde hayatlarının bir bölümünde ilaç kullandıkları göz önüne alınırsa, bu ilaçların ve bazı durumlarda miktarlarının tespit ve analizleri son derece önemli hale gelmiştir. Dahası kimyasal ve biyolojik materyallerin tespit ve analizleri yalnızca teşhis ve tedavinin gelişimi için değil, aynı zamanda doping kontrolü, ilaç endüstrisinde kalite kontrolü, klinik toksikoloji, adli tıp ve çevre çalışmaları gibi alanlarda da özellikle istenmeyen veya beklenmeyen maddelerin varlığının anlaşılması için de hayati bir öneme sahiptir (Adumitrăchioaie ve ark., 2018).

Bir MIP'in sentezi için gereken temel bileşenler, şablon (hedef/analit) molekülü, bir veya daha fazla fonksiyonel monomer, bir çapraz bağlayıcı, bir polimerizasyon başlatıcı ve çözücünden oluşur (Lingxin Chen ve ark., 2016; R. Li ve ark., 2019; Moreno Bondi ve ark., 2013; Saylan ve Denizli, 2019).

Şablon molekülü, fonksiyonel monomer ile etkileşimlerden sorumlu olduğu ve polimer yüzeyinde seçici boşlukların oluşumuna yol açtığı için baskıda önemli bir rol oynar. Genellikle, hedef molekül şablon olarak seçilir. Bununla birlikte, hedef bileşiğin toksik, pahalı veya sınırlı bulunabilirlikte olduğu bazı uygulamalarda, hedef molekülün bir yapısal analogunun kullanılması tercih edilir (Lingxin Chen ve ark., 2016; Moreno Bondi ve ark., 2013). Fonksiyonel monomer, baskılı boşluklardaki hedef molekül ile bağlanma etkileşimlerinden sorumlu fonksiyonel grupları sağlar. Farklı işlevlere sahip çok çeşitli fonksiyonel monomerler ticari olarak temin edilebilir ya da şablon moleküldeki özgül işlevleri hedeflemek için sentezlenebilirler (Adumitrăchioaie ve ark., 2018; Moreno Bondi ve ark., 2013).

Monomer–analit kompleksinin oluşumu için, şablon ile monomerlerin fonksiyonel grupları arasındaki bağlanma tipine dayanarak kovalent ve kovalent olmayan şeklinde iki ana gruba ayrılabilir (Canfarotta ve ark., 2018; Moreno Bondi ve ark., 2013).

Kovalent baskılamada, şablon molekülünün tersinir bağlanma ile polimerize edilebilir monomerlerle reaksiyonundan oluşur. Polimerizasyon, çözünmeyen sert bir ağ oluşturmak için çok fazla çapraz bağlayıcının varlığında gerçekleşir. Kovalent bağların şablon ekstraksiyonu için ayrılması gerekir, bu da şablon molekül için sterik ve fonksiyonel olarak tamamlayıcı bağlanma bölgelerini oluşturur. Bu yaklaşımın avantajlarından biri spesifik olmayan etkileşimlerin olasılığını azaltmasıdır. Çünkü şablon–monomer komplekslerinin stokiometrisi, yalnızca baskılanmış boşluklarda bulunan bağlayıcı gruplara sahip polimerlerin hazırlanmasına izin verir. Ayrıca, polimerizasyon sırasında komplekslerin yüksek kararlılığı nedeniyle, elde edilen ağlar, kovalent olmayan yaklaşım kullanılarak hazırlanan MIP'lere göre daha homojen bir bağlanma yeri dağılımı ve üstün seçicilik gösterir. Bununla birlikte, kovalent baskı uygulamasında kullanılabilecek fonksiyonel monomer ve şablon sınırlıdır. Diğer dezavantajlar arasında, polimerizasyondan önce

şablon–monomer kompleksinin sentezlenmesi ihtiyacı, genellikle MIP sentezinden sonra şablonun ayrılması ve tekrar kullanım için gereken çabanın daha fazla olması ve hedef tanıma için kovalent bağı yeniden kurma ihtiyacı nedeniyle yavaş bağlanma kinetiğine sahip olmasıdır (Canfarotta ve ark., 2018; Lingxin Chen ve ark., 2016; Moreno Bondi ve ark., 2013; Yarman ve ark., 2018).

Kovalent olmayan baskılama, MIP sentezi için en başarılı ve en yaygın olarak uygulanan yöntem kendi kendine birleşme yaklaşımı olarak da bilinen kovalent olmayan etkileşimlerdir. Kovalent baskıyla karşılaştırıldığında avantajları arasında, polimerizasyondan önce şablon molekülün kimyasal türevlendirilmesini gerektirmeyen sentez aşamasının basitliği ve polimerik ağdan şablon uzaklaştırılmasının kolaylığı yer alır. Ticari monomerler kullanılarak çok çeşitli fonksiyonel gruplar hedeflendirilebilir ve substrat ile geri dönüşümlü etkileşimler genellikle hızlıdır, bu da tanıma bölgelerinde molekülün serbestçe değişimine izin verir. Bu yaklaşımda genel olarak fonksiyonel monomerin analite mol oranının fazla olması gerekir. Sonuç olarak fazla miktarda fonksiyonel monomer, bağlanma bölgelerinin dışına dağıtılarak özgül olmayan bağlanmayı artırır ve MIP'in kapasitesini azaltır. Öte yandan, söz konusu etkileşimlerin zayıflığı nedeniyle, polimer, geniş bir aralıkta afinite sabitine sahip heterojen bir bağlanma bölgesi ile karakterize edilecektir; böylece kovalent olmayan MIP genellikle sadece şablon molekülü değil, aynı zamanda yapısal olarak benzeyen diğer bileşikler de tanıyabilecektir (Canfarotta ve ark., 2018; Farooq ve ark., 2018; Moreno Bondi ve ark., 2013; Yarman ve ark., 2018).

Yüzey baskılama yönteminde ise kalıp ve fonksiyonel monomerler organik bir çözücü içinde reaksiyona girerek polimer oluşturur. Polimerlerin yüzeyi MIP'leri elde edecek şekilde modifiye edilir ve basılı boşluklar polimer parçacıkların yüzeyinde bulunur. Yüzey baskılama yöntemi elektropolimerizasyon, *in situ* fotopolimerizasyon ve sandviç yöntemi olarak ayrılabilir (J. Li ve ark., 2012). Elektrokimyasal MIP sensörlerinde elektropolimerizasyon en çok tercih edilen polimerizasyon yöntemlerinden biridir ve MIP ve dönüştürücü birleştirme teknikleri içerisinde detaylı olarak bahsedilmiştir (Adumitrăchioaie ve ark., 2018; Dmitrienko ve Apyari, 2018; J. Li ve ark., 2012).

MIP tabanlı sensörlerin tasarımında önemli bir konu, analit ile polimerin birleştirilmesi için uygun bir yöntem bulmaktır (Muzyka ve ark., 2013). Elektropolimerizasyon, elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesinde kullanılan en yaygın yaklaşımdır. Elektropolimerizasyon, bir elektrot yüzeyinde moleküler olarak baskılı bir polimer filmin sentezini mümkün kılar. Elektrokimyasal olarak hazırlanmış bir polimer filmin kalitesi, elektrot malzemesinin tipi, akım yoğunluğu, uygulanan potansiyel, sıcaklık, çözücü, elektrolit, su varlığı ve monomer konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenir. Elektropolimerizasyonda polimerin kalınlığı, akım yoğunluğu ve uygulanan voltaj gibi çeşitli parametrelerle kontrol edilebilir, bu da polimerin elektrot yüzeyinde düzgün bir şekilde kaplanmasıyla sonuçlanır (Muzyka ve ark., 2013; Suriyanarayanan ve ark., 2017).

MIP hazırlama adımlarının son fakat en önemli aşamalarından biri şablonun uzaklaştırılmasıdır ve bu adım MIP'in hedef analite duyarlılığını güçlü bir şekilde etkiler (Huynh ve Le, 2018). MIP'lerde kalan şablon moleküller varsa, yeniden bağlama için daha az boşluk kalacağından sensör verimliliği azalabilir. MIP'lerin performansı ile ilgisine rağmen, şablonun uzaklaştırılması çok az ilgi görmüştür ve MIP geliştirmede en az maliyet gerektiren adımdır (Lorenzo ve ark., 2011; Moreno Bondi ve ark., 2013). Şablonun uzaklaştırılması için ekstraksiyon yöntemleri kullanılır (Lorenzo ve ark., 2011). Şablonun uzaklaştırılması, MIP'in kullanıma hazır olma yolunda sadece bir adımdır. Şablon uzaklaştırılmasından sonra MIP boşluğunun geri kalan yapısı da oldukça önemlidir. Şablonun uzaklaştırılma derecesini ve MIP boşluğunun hatasızlığını karakterize etmek için kimyasal teknikler geliştirilmiştir (Huynh ve Le, 2018).

MIP'nin kalitesi, NIP'e kıyasla çözültide diğer girişim yapan moleküllerin bir arada bulunmasına rağmen, analitin özel olarak tanınma yeteneği ile belirlenir. Bu yetenek, baskılama faktörü (IF) ve seçicilik faktörü (α) gibi parametrelerle karakterize edilebilir. IF, aşağıdaki formüle göre bulunur:

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}}$$

Burada Q_{MIP} , MIP üzerindeki denge bağlama kapasitesidir ve Q_{NIP} , NIP üzerindeki denge bağlama kapasitesidir. 1'den büyük herhangi bir IF değeri MIP oluşumunun başarılı sonucu olarak kabul edilir.

Baskılama faktörü ile ilgili, monomerlerin ve şablon moleküllerin kendi kendine birleşmesi bulgularıyla desteklenmektedir. Bu tür kendi kendine montaj, polimerizasyon öncesi süreçte moleküllerin sıralanmasını içerir. Moleküllerin kendiliğinden bir araya gelme sürecinde dizilişi sırasında olumlu ve olumsuz enerji terimlerinin rekabet etmesi bir yana, şablon moleküllerin ve monomerlerin oranı MIP'nin nihai verimliliğinde önemli bir rol oynar. Dolayısıyla, şablon moleküllerin oranının artması ve monomer ve şablon molekülün kompleksini oluşturma yeteneğini artırmaya çalışan monomerler, düşen seçiciliğin nedeni olabilir.

Bu durumda bir seçicilik faktörü olan α parametresi, MIP'nin analitin analitik sinyalini girişim yapan molekülden ayırt etme yeteneğini açıklar ve aşağıdaki eşitlikten bulunur:

$$\alpha = \frac{Q_{analit}}{Q_{girişim\ molekülü}}$$

Burada Q_{analit} , analitin denge bağlama kapasitesidir ve $Q_{girişim\ molekülü}$, α MIP üzerinde karışan molekülün denge bağlama kapasitesidir.

Adsorpsiyon, desorpsiyon, analitin difüzyonu, yük taşınması ve yük transferi, MIP'nin performansını etkileyen anahtar parametrelerdir. Elektrokimyasal polimerizasyonun, polimer tabakasının kalınlığının kontrolü ve elektrot yüzeyinin herhangi bir şekli üzerinde polimer oluşturma yeteneği gibi diğer avantajlarına rağmen, elektrokimyasal polimerizasyon ve MIP oluşturma yönteminin yeşil kimya gereksinimlerini karşıladığı kabul edilebilir.

1.5. Nanopartiküller

İlaçların elektrokimyasal analizinde nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, çeşitli nanomalzemelerle modifiye edilmiş birçok çalışma elektrotu kullanılmıştır. Nanopartiküller, mükemmel fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı nanobilimde büyük ilgi görmektedir. Elektrokimyasal sensörlerin performansı, farklı nanomalzemelerin modifikasyonu ile analit ve elektrot yüzeyi arasındaki etkileşimle geliştirilebilir. Elektrot yüzeyi modifiye edici olarak görev yapan karbonlu ve metal nanopartiküller, geniş bir potansiyel pencere, yüksek yüzey–hacim oranı, düşük tespit limiti, kolay işlevselleştirme ve düşük arka plan akımı gibi birçok avantaja sahiptir. Bu tür nanomalzemelerin bir arada kullanımı sinerjik etkiler yaratır. Sinerjizm sergileyen bir nanokompozit, bir elektrotun algılama yeteneğinde çok katlı bir gelişme göstermek için önerilmiştir (Joshi ve Kim, 2020; Wang ve ark., 2020).

1.5.1. Kitosan

Kitinin deasetillenmiş bir türevi olan kitosan (CHIT), [(1,4) –2–amino–2–deoksi–D –glukan], doğal kitinin deasetilasyonu ile elde edilen lineer, doğal, zayıf alkali bir polisakkarit, doğal olarak oluşan biyouyumlu bir biyopolimerdir. Bu sensörlerde iyi elektrokatalitik aktiviteye, geniş spesifik yüzey alanına ve yüksek hassasiyete sahip olmasını sağlar. Kitosan, çapraz bağlayıcı bir hidrofilik polimerdir. “Akıllı” bir nano yapı gibi mükemmel özellikleri nedeniyle birçok uygulama alanına sahiptir ve elektriksel, katalitik, tekrar kullanılabilir ve çok işlevlidir (Z. Yang ve ark., 2018). Mükemmel yapışma, kimyasal modifikasyona elverişlilik, toksik olmama, güçlü mekanik dayanım, operasyonel fizibilite ve kullanım kolaylığı gibi birçok çekici özelliğinden dolayı biyolojik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Jayakumar ve ark., 2010). İyi biyouyumluluk ve iyi film oluşturma kabiliyetine sahip olduğunu ve hidroksil ve amino fonksiyonel gruplarının biyolojik olarak aktif moleküllerle reaksiyona girebileceğini belirtmekte fayda var (Jayakumar ve ark., 2010; Zhou ve ark., 2017).

1.5.2.Elmas Nanopartikül

Iwaki ve arkadaşları, 1983'te ve daha sonra Pleskov ve arkadaşları, 1987'de elektrot malzemesi olarak elması sunmuşlardır (Iwaki ve ark., 1983; Pleskov ve ark., 1987). Ultra yüksek basınçlı yüksek sıcaklıktan ziyade atmosferik altı iletken yüzeylerde elmas büyümesi için oldukça etkili yöntemlerin daha sonra geliştirilmesi, elmas bazlı malzemelerinin gelişimini hızlandırmıştır. İletken elmas ve elektrokimyanın birlikteliği yarı iletken elektrokimya elmas elektrokimyası alanında yeni bir alan açmıştır (Foord ve ark., 2007; Fujishima ve ark., 2005; Tokuda ve ark., 2015; N. Yang ve ark., 2016).

Ultramikroelektrot, nanoelektrotlar gibi küçük boyutlu elektrotlar, düzlemsel makroskobik elektrotlara kıyasla düşük ohmik direnç, gelişmiş kütle taşıma, düşük akımları ve çözelti direncinin zararlı etkilerinin yanı sıra hızlı ölçümler gibi çeşitli avantajlar sunar. Bununla birlikte, tek küçük boyutlu elektrot, yalnızca geleneksel elektrokimyasal kurulumlarla tespit edilmesi nispeten zor olan küçük akım üretir. Bu diziler ve topluluklar, bireysel küçük boyutlu elektrotların sinyalini yükseltir ancak tek tek elektrotların faydalı özelliklerini kaybetmez. Sensör uygulamaları için uygulanırlarsa , hassasiyet, tespit limiti ve tekrar üretilebilirlik ile ilgili performansları oldukça iyileşir (Mochalin ve ark., 2012; N. Yang ve ark., 2016). Nano boyutlu elmaslar, diğer tüm nanomalzemeler arasında önemli üstün özelliklere sahiptir. Bu malzeme sp³ hibridize karbondan oluşur, grimsi bir renge sahiptir ve 10 nm'den küçüktür. Elektrooksidasyon için dikkate değer bir elektrot malzemesi olarak kabul edilmiştir. Uygun fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle bileşiklerin farmasötik dozaj formlarında ve/veya biyolojik materyallerde. Üstün sertlik ve Young modülü, optik özellikler, biyoyumluluk, yüksek termal iletkenlik, elektriksel direnç ve kimyasal kararlılık üstün özelliklerden bazılarıdır. Elmas nanopartikül (DiaNP), tüm bu özellikleri ve sensör uygulamalarında elektron transferini hızlandırması, kararlılığı, biyoyumluluğu, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği nedeniyle elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesinde kullanılan karbon bazlı nanomalzemeler sınıfındadır (Zang ve ark., 2007).

1.5.3.İyonik Sıvılar (IL)

IL'lerin elektrokimyasal özellikleri ilk olarak 1975'lerde, kloroalüminat ve IL'lerin elektrokimyası araştırılmıştır. 1990'lı yıllarda imidazolyum IL'lerdeki gelişmeler ve IL'lerin dikkat çekici elektrokimyasal özelliklerinin anlaşılmasıyla birlikte elektrokimya uygulamalarında kullanımları dikkat çekmeye başlamıştır. IL'ler, düşük buhar basıncına, yüksek stabiliteye ve iletkenliğe sahip oldukları ve birçok bileşiği çözebildikleri için bu yaklaşımların bir parçasıdır. İyonik sıvılar yüksek sıcaklıklarda, elektrolit olarak veya ısınlama altında kullanılabildikleri için elektrokimyasal yöntemler için uygundur. İyonik sıvıların termal, elektrokimyasal ve radyolitik kararlılıkları iyi bilinir ve birçok uygulama sağlar. Günümüzde, geniş kalite yelpazesi nedeniyle bir analitin belirlenmesinde elektrokimyasal sensör platformlarında tercih edilmektedir. Çeşitli nanomalzemeler ile kullanıldıklarında sensörün hassasiyetini arttırdıkları ve elektrokimyasal reaksiyonu hızlandırdıkları görüldüğü için elektrokimyasal sensörlerde modifiye edici ajan olarak kullanılırlar. Böylece algılama limitleri düşük, hassas ve kararlı sensörler geliştirmeyi amaçlamaktadır. Bu anlamda çevre dostu bir malzeme yaklaşımı olarak IL'ler her geçen gün artmaktadır (Richu ve ark., 2022; Unal ve ark., 2021).

Genellikle asimetrik katyon ve anyonlardan oluşan erimiş tuzlar olarak bilinir ve ayrıca 100 °C'nin altında sıvı halde bulunur. Sıvı elektrolitler olarak tanımlanırlar. Katyon–anyon kombinasyonunun oluşumu, sıvı faz olarak bilinen düzenli bir yapı sunar. Katyonların ve anyonların seçimi, IL'lerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin çeşitliliğine izin verir. İyonik sıvılar, yüksek kararlılık, yüksek elektrik iletkenliği ve çok düşük buhar basıncı gibi önemli özelliklere sahip olup, aynı zamanda çevre açısından iyi çözücülerdir. IL'ler elektrokataliz, elektrodepozisyon, elektrosentez, elektrikli cihazlar ve sensörler gibi elektrokimyasal uygulamalarda uygulanmıştır.

Oda sıcaklığında sıvı olan iyonik sıvılar, buhar basıncı, termal kararlılık, mükemmel iyonik iletkenlik, geniş potansiyel penceresi, yüksek kimyasal kararlılık ve yüksek polarite eksikliği nedeniyle kimyasal işlemler için yenilikçi susuz ortam olarak giderek daha fazla dikkat çekiyor. İyonik sıvıların viskozite gibi kimyasal ve fiziksel özellikleri, iyonik sıvıların bileşenleri olan organik katyonların ve anyonların uygun modifikasyonu ile değiştirilebilir.

Bununla birlikte, sulu elektrolitik çözeltilerde araçların varlığında ve yokluğunda, iyonik sıvı içeren toplu karbon pasta elektrotlarında doğrudan elektron transferi veya aracılı elektron transferi davranışını açıklamak için Laviron denklemini kullanan birkaç rapor vardır. Ancak çözünmüş türlerin kütle transferine ve adsorpsiyonuna bağlı olan yüzey evrim hızı parametresi üzerine çalışmalar bildirilmiştir (Noritomi ve ark., 2022).

1.6. Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon, test ve ardından üretimde gerçekleştirilen bir prosedür, süreç veya aktivitenin tüm aşamalarda istenen uygunluk seviyesini koruduğunu gösteren belgeli kanıt oluşturma sürecidir. Farmasötik endüstrisinde, ürünlerin nihai testine ve uyumluluğuna ek olarak, prosesin tutarlı bir şekilde beklenen sonuçları üreteceğinden emin olunması da çok önemlidir. Herhangi bir farmasötik fabrikanın temel amacı, sürekli olarak, mümkün olan en düşük maliyetle gerekli özellik ve kalite ürün üretmektir. İlaç endüstrisinde uzun süredir validasyon çalışmaları yapılmasına rağmen, endüstrilerinin son yıllarda kalite güvence programına daha fazla önem vermesi ve verimli bir üretim operasyonu için temel olması nedeniyle validasyona olan ilgi giderek artmaktadır.

Validasyon kavramı, ilaç maddelerinin ve ilaç ürünlerinin kalite kontrolü için kullanılan analitik yöntemlerden klinik deneyler, etiketleme veya proses kontrolü için bilgisayarlı sistemlere kadar geniş bir faaliyet yelpazesini kapsayacak şekilde yıllar içinde genişlemiştir. ancak düzenleyici gereklilikler tarafından öngörülmemiştir ve en iyi şekilde mevcut iyi üretim uygulamalarının önemli ve ayrılmaz bir parçası olarak görülür. Doğrulama kelimesi basitçe geçerliliğin değerlendirilmesi veya etkililiği kanıtlama eylemi anlamına gelir. Validasyon, tesisin çeşitli disiplinlerinden kişilerin dahil olduğu bir ekip çalışmasıdır. İlaç endüstrisi pahalı malzemeler, gelişmiş tesisler, ekipman ve yüksek nitelikli personel kullanır. Hata maliyetinin düşürülmesi ve üretkenliğin artırılması isteniyorsa, üretim prosesi parti doğrulamasının ayrıntılı çalışması ve kontrolü gereklidir. İstenilen ürünü üretilip üretilmeyeceğini bilmeden ekipman kullanmak, ürünün spesifikasyonları karşıladığından emin olmak için süreç kontrolleri veya incelemeleri yapıp yapamayacaklarına dair güvencesi olmayan kişileri çalıştırmamak mümkün olmayacaktır. Bu sebepler validasyonun önemini göstermektedir (Swartz ve Krull, 2018).

Genel olarak validasyonun dört ana türü vardır. Bunlar metot validasyonu, ekipman validasyonu, analitik yöntem validasyonu ve safsızlık validasyonudur. Analitik prosedür, analizi gerçekleştirme yolunu ifade eder. Her analitik testi gerçekleştirmek için gerekli adımları ayrıntılı olarak açıklamalıdır. Bu, bunlarla sınırlı olmamak üzere; numune, referans standart ve reaktiflerin hazırlanması, aparatın kullanımı, kalibrasyon eğrisinin oluşturulması, hesaplama için formüllerin kullanımı, vb. içerebilir. Aşağıda Şekil 1.5'te analitik validasyon parametrelerinden bahsedilmektedir.



Şekil 1.5. Analitik validasyon parametreleri

1.6.1. Seçicilik

Herhangi bir analitik yöntem validasyonun en önemli kısmı seçicilik analizidir. Seçicilik; bir analitin kimliğini sağlamak için yapılır, analitin yapısında olması beklenebilecek bileşenlerin varlığının kesin olarak değerlendirilmesi yeteneğidir. Tipik olarak bunlar, safsızlıkları, bozundurucuları, matrisi vb. içerebilir. Bireysel bir analitik prosedürün özgüllüğünün olmaması, diğer destekleyici analitik prosedür(ler) ile telafi edilebilir.

Saflık Testleri: gerçekleştirilen tüm analitik prosedürlerin, bir analitin safsızlık içeriğinin doğru bir şekilde ifade edilmesini sağlamak için, yani ilgili madde testi, ağır metaller, artık solvent içeriği vb.

Tahlil: bir numunedeki analitin içeriği veya gücü hakkında doğru bir ifadeye izin veren kesin bir sonuç sağlamak.

1.6.2. Kesinlik

Tekrarlanabilirlik, kısa bir zaman aralığında aynı çalışma koşulları altında kesinliğini ifade eder. Bu laboratuvarlardan laboratuvara kesinlik, ara kesinlik tahmininde birleştirilebilir, çünkü belirli bir test yönteminin birden fazla laboratuvarda çalıştırılması mümkündür. Önerilen testler, iki farklı günde en az iki analistten ve en az üç konsantrasyonda üç tekrardan oluşur. Laboratuvarlardan laboratuvara değişkenlik tahmin edilecekse, deney tasarımı her laboratuvarda yapılmalıdır. Analist ve gün değişkenliği bir araya gelerek ara kesinliği verir (eğer laboratuvarlardan laboratuvara tahmin ediliyorsa buraya eklenir), oysa analist ve gün hesaba katıldıktan sonraki varyasyon tekrarlanabilirliktir. Varyans bileşenleri veya varyansın ayrıştırılması, farklı varyasyon kaynaklarını ilgili bileşenlerine bölmek için istatistiksel bir yöntemdir. İstatistiksel programlar, varyans bileşenlerini hesaplamak için yaygın olarak kullanılır. Tekrarlanabilirlik; kısa bir zaman aralığında aynı çalışma koşulları altında hassasiyeti ifade eder. Tekrarlanabilirlik aynı zamanda analiz içi kesinlik olarak da adlandırılır. Ara kesinlik; laboratuvar içi varyasyonları ifade eder: farklı günler, farklı analistler, farklı ekipman vb. Tekrar üretilebilirlik; laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (işbirlikçi çalışmalar, genellikle metodolojinin standardizasyonuna uygulanır) (Guy, 2014; ICH, 1995).

1.6.3. Doğruluk

Bir analitik prosedürün doğruluğu, bir gerçek değer veya kabul edilen bir referans değer olarak kabul edilen değer ile pratik olarak bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade eder. Bu, bir dizi ölçülen değerlerin ortalaması ile gerçek ortalama değer arasındaki fark olan gerçeklikten farklıdır. Kesinliğin yokluğunda doğruluğun çok az anlamı vardır. ICH yönergeleri, en az üç konsantrasyonda üç setin test edilmesini önerir. Verilerin kesinliği, gözlemlenen kesinliği ve doğruluk çalışmalarının geçerliliğini doğrulamak için önceki çalışmalardan veya geliştirme çalışmalarından elde edilen gözlemlenen kesinlik ile karşılaştırılmalıdır. ICH yönergeleri, doğruluk sonuçlarının raporlanması için güven

aralıklarının kullanılmasını önerir. Güven aralıkları, ortalamayla ilgili olasılık ifadeleri için kullanılır; örneğin, ortalama geri kazanım yüzdesi %95–105 olmalıdır. Uygun doğruluk spesifikasyonlarını ayarlamak için tolerans aralıkları kullanılabilir. Bunlar, örneğin, hiçbir bireysel geri kazanım yüzdesinin %80'den az veya %120'den fazla olmaması gerektiğini söylemektedir. Tolerans aralıkları, numune ortalamasından ve numune standart sapmasından hesaplanır (Ozkan, 2018).

1.6.4. Doğrusallık

Bir analitik prosedürün belirli bir aralıkta numunedeki analit konsantrasyonuyla doğru orantılı test sonuçları elde etme yeteneğidir. Aralık, konsantrasyon ile yöntemin tepkisi arasında doğrusal bir ilişki sürdüren en küçük ve en büyük konsantrasyondur. ICH yönergeleri herhangi bir kesinlik kanıtı gerektirmez, ancak yeterli kesinlik olmadan doğrusal ilişkinin garanti edilemeyeceği açıktır. Doğrusallığı göstermek için kullanılan en yaygın yöntem en küçük kareler regresyonudur. Bazen doğrusal bir uyum elde etmek için verileri dönüştürmek gerekir. Doğrusal aralık boyunca her biri en az üç bağımsız okuma için test edilen en az beş doz seviyesi önermektedir. Yöntemin doğruluğunu test etmek için bu örnekleri kullanmak mümkündür. Doğruluk, her düzeyde yanlılığın olmamasıdır ve yanlılık testin aralığı boyunca tutarlı olduğu sürece, yöntem doğrusal kabul edilir. Kalıntı analizi veya gözlenen değer eksi tahmin edilen değer (doğrusal denklemden), verilerde yeterli doğrusallık olup olmadığını değerlendirmeye yardımcı olabilir (Ozkan, 2018).

1.6.5. Duyarlılık

Duyarlılık, doğrusal çalışma aralığında elde edilen kalibrasyon doğrusunun eğimi ile ifade edilmektedir. Geliştirilen yöntemin, literatürde yer alan çalışmalar ile karşılaştırılması açısından önemlidir.

1.6.6. Çalışma Aralığı

Bir analitik prosedürün aralığı, analitik prosedürün uygun bir kesinlik, doğruluk ve doğrusallık düzeyine sahip olduğunun gösterildiği numunedeki üst ve alt konsantrasyonu arasındaki aralıktır(Gumustas ve ark.,, 2013).

1.6.7. Teşhis ve Tayin Alt Sınırı

Ayrı bir analitik prosedürün teşhis sınırı, bir numunede tespit edilebilen ancak kesin bir değer olarak nicel olarak ölçülmesi gerekmeyen en düşük analit miktarıdır. Bir tahlilin teşhis sınırı, tespit edilebilen ancak mutlaka nicelendirilebilen en düşük konsantrasyondur; niceleme limiti, kabul edilebilir kesinlik ile ölçülebilen en düşük konsantrasyondur. Bireysel bir analitik prosedürü tayin alt sınırı, bir numunedeki analitin uygun hassasiyet ve doğrulukla kantitatif olarak belirlenebilen en düşük miktarıdır. Tayin alt sınırı, numune matrislerindeki düşük bileşik seviyeleri için kantitatif analizlerin bir parametresidir ve özellikle safsızlıkların ve bozunma ürünlerinin belirlenmesi için kullanılır. Tayin alt sınırı, rapor edilebilecek en düşük analit seviyesidir. ICH yönergeleri, saptama ve niceleme sınırlarını belirlemek için üç farklı yöntem önermektedir. Bunlar: sinyal–gürültü belirleme ve standart sapma ve eğim yöntemidir. Her yöntem farklı sonuçlar verecektir. Sinyal sesi yöntemi en mantıklı olanıdır, çünkü analitin düşük seviyelerini boş veya arka plan örneğiyle karşılaştırmaya dayanır(Gumustas ve ark.,, 2013).

Sinyal–gürültü oranının belirlenmesi, bilinen düşük analit konsantrasyonlarına sahip numunelerden alınan ölçülen sinyallerin boş numunelerinkilerle karşılaştırılmasıyla ve ardından analitin güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği minimum konsantrasyonun belirlenmesiyle gerçekleştirilir. 3:1 ve 2:1 arasındaki bir sinyal–gürültü oranı, algılama limitini tahmin etmek için genellikle kabul edilebilir olarak kabul edilir(Ozkan, 2018)..

1.6.8. Sağlamlık

Analitik bir prosedürün sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük ama belirgin değişikliklerden etkilenmesine karşı ölçüsüdür ve güvenilirliğinin bir göstergesidir. Ortam sıcaklığı, çözeltilerin pH'sı, kullanılan tamponların konsantrasyonu gibi deneysel şartlarda meydana gelen küçük değişikliklerin analiz sonuçlarını etkilemediğinin göstergesidir(Ozkan, 2018)..

1.6.9. Tutarlılık

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın farklı analizciler, farklı cihazlar tarafından, farklı laboratuvarlarda ölçüm alınması, reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi gereklidir.

1.6.10. Stabilité

Stabilité, yöntemin güvenilirliği ve sağlamlığıyla doğrudan ilişkilidir. Analit, numune ve tampon çözelti gibi kullanılan tüm çözeltilerin stabiliteleri değerlendirilmelidir.

1.7. Tez Maddesi Pirfenidon ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Pirfenidon'un tayinine yönelik elektrokimyasal çalışma literatürde bulunmamaktadır. Literatürde kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle Pirfenidon tayini çalışılmıştır. Bu kısımda, yüksek lisans tezi kapsamında Pirfenidon ilaç etkin maddesi analizine yönelik çeşitli analitik yöntemler kullanılarak yapılmış belirli çalışmalar Çizelge 1.2.'de sunulmuştur. Yüksek lisans tezi kapsamında geliştirilen elektrokimyasal metotlar ile literatürde yapılmış yöntemlerin kıyaslaması yapılacaktır.

Çizelge 1.2. Pirfenidon analizine yönelik literatürde yapılmış belirli çalışmalar

Analit	Yöntem	Analiz koşulları	Çalışma aralığı	TAS	Uygulama	Kaynak
Sabit faz: C ₁₈ kolonu						
Pirfenidon	LC-ESI-MS-MS	Mobil faz: ACN – %0,1 formik asit 40:60 (v/v)	2–2000 ng/mL	2 ng/mL	Sıçan plazması	(Tong ve ark., 2010)
Pirfenidon	YBSK	Sabit faz: C ₁₈ Zorbax Eclipse Mobil faz: ACN: Su (35:65 %v/v) Akış hızı 0.7 ml/dk	0,2–5,0 µg/mL	0,14 µg/mL	Tablet ve kapsül	(Pamar ve ark., 2014)
Pirfenidon	LC-ESI	Sabit faz: Agilent Zorbax Plus C ₁₈	0.005–15 µg/mL	0.005 µg/mL	İnsan plazması	(Wen ve ark., 2014)
5-Karboksi-Pirfenidon	–MS-MS	Mobil faz: ACN: Amonyum format çözeltisi (5 mM) (60:40, v/v).				
Pirfenidon	UBSK-MS/MS	Sabit faz: Acquity UPLC BEH C ₁₈ Mobil faz: ACN–0.1% Formik asit içeren su	5–2000 ng/mL	5 ng/mL	Sıçan plazması	(Sun ve ark., 2015)
Pirfenidon	YB-ITK	Mobil faz: Toluene–MeOH (8:2, v/v)	100–1.200 ng/nokta	40 ng/nokta	Sıçan serumu	(Sonali G. Thorat ve Chikhale, 2016)
Pirfenidon	YBSK	Mobil faz: Fosfat tamponu (pH 3.5): ACN (72:28, v/v) Sabit faz: Eclipse XDB-C18 kolonu (150 x 4,6 mm, 5 µm) Akış hızı: 1 mL/dk	5–70 µg/mL			
	ITK	Mobil faz: Toluene: Metanol (8:2 v/v) Sabit faz: Silika Jel 60 F254 TLC Plakası	800–1600 ng/nokta	1,667 ng/nokta	Tablet	(SG Thorat ve ark., 2016)
	UV-spektroskopisi	Çözücü: MeOH, λ= 311 nm	10–60 µg/mL			
	Floresans spektroskopisi	Tween – 80 miselar ortamı λ _{em} = 396 nm λ _{ex} = 318 nm	0,5 – 5 µg/mL	0,11 µg/mL	İnsan idrarı ve tablet	(Sambhani ve Biju, 2018)
Pirfenidon	Misel elektrokinetik kapiller kromatografik	15 °C, V= 30 kV 80 cm, 75 µm i.d.	6,25–200 µM	4,0 µM	İnsan plazması	(Sotgia ve ark., 2020)

Bu tez çalışmasının amacı, daha önce literatürde elektrokimyasal analizi bulunmayan Pirfenidon'un elektrokimyasal davranışını incelemek ve aydınlatmak ve tayinini gerçekleştirmektir. Bu tez çalışması kapsamında, Pirfenidon tayinine yönelik ilk kez moleküler baskılama teknolojisi ile geliştirilmiş moleküler baskılanmış polimer temelli elektrokimyasal nanosensörün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, geliştirilen farmasötik dozaj formu olan Pirfect® tabletten ve serum örneklerinden analizi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

Çizelge 2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Formül	Firma
Pirfenidon	$C_{12}H_{11}NO$	Nobel İlaç A. Ş
Pirfect® tablet	–	Nobel İlaç A. Ş
Asetik asit	CH_3COOH	Merck
Fosforik asit	H_3PO_4	Sigma-Aldrich
Borik asit	H_3BO_3	Sigma-Aldrich
Sülfürik asit	H_2SO_4	Sigma-Aldrich
Sodyum fosfat monobazık tuzu	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit	$NaOH$	Merck
Orto-fenilendiamin	$C_6H_8N_2$	Sigma-Aldrich
Asetonitril	CH_3CN	Merck
Etanol	C_2H_5OH	Merck
Metanol	CH_3OH	Merck
Sodyum nitrat	$NaNO_3$	Merck
Sodyum klorür	$NaCl$	Sigma-Aldrich
Kalsiyum klorür	$CaCl_2$	Sigma-Aldrich
Potasyum ferrisiyanür	$K_3[Fe(CN)_6]$	Sigma-Aldrich
Potasyum ferrosiyanür	$K_4[Fe(CN)_6]$	Sigma-Aldrich
Askorbik asit	$C_6H_8O_6$	Sigma-Aldrich
Ürik asit	$C_5H_4N_4O_3$	Sigma-Aldrich
Dopamin	$C_8H_{11}NO_2$	Alfa-Aesar
Glukoz	$C_6H_{12}O_6$	
Elmas nanopartikül (<10 nm)	–	Sigma-Aldrich
Kitosan	$C_{56}H_{103}N_9O_{39}$	Sigma-Aldrich
1-Bütül-3-metilimidazolyum bromür (BMIBr) iyonik sıvısı	$C_8H_{15}BrN_2$	Sigma-Aldrich

2.2. Elektrokimyasal Ölçümler

Elektrokimyasal ölçümler, Autolab PGSTAT204 potansiyostatında (Eco Chemie, Hollanda) NOVA 2.1.5 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler, çalışma elektrotu olarak bir GCE ($\Phi = 3$ mm), yardımcı elektrot olarak bir platin tel ve referans elektrot olarak bir Ag/AgCl 3,0 M KCl ile geleneksel üç elektrotlu bir sistemle gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri 0,1 M KCl içeren 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ve 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisinde yapılmıştır. 0,1 Hz ila 10 kHz frekans aralığına sahip Nyquist grafikleri çizilmiştir. Sistem potansiyeli 0,23 V olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan sensörün yüzey karakterizasyonu için ZEISS EVO 40 (Merlin, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır.

2.3. Çözeltilerin Hazırlanışı

Deneyisel çalışmalarda analit için optimum ortamı sağlayacak elektrolit çözeltisi olarak farklı pH değerlerinde, farklı tampon ve destekleyici elektrolitler hazırlanmıştır. 0,1 M ve 0,5 M H_2SO_4 çözeltileri, fosfat, asetat ve Britton–Robinson tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler gerekli hesaplamalar yapılarak stok çözeltilerinden ultra saf su ile seyreltilmiş ve 5 M NaOH ile gereken pH değerlerine ayarlanmıştır.

2.4. Standart Pirfenidon Etkin Maddesinin Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Pirfenidon suda çözünen bir etkin maddedir. Standart Pirfenidon etkin maddesinin stok çözeltisi için 1,0 mM konsantrasyonu seçilmiştir. 1,0 mM konsantrasyonda stok çözeltisi için 18,5 mg tartılıp balon jodede ultra saf suda hazırlanmış ve ultra saf su ile 0,1 L'ye tamamlanmıştır.

2.5. Tablet Çözeltisi Hazırlanması

10 adet Pirfect® tablet (200 mg Pirfenidon içerir) havanda homojen toz haline gelene kadar ezilmiştir. Oluşan homojen tozdan ultra saf su içinde çözülerek 1 mM stok numune

çözeltisi elde edilmiştir. Standart numune solüsyonları, Pirfenidon'un stok numune solüsyonundan uygun kısımlar alınarak ve 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Geri kazanımı hesaplamak için sabit numune çözeltisine belirli miktarlarda Pirfenidon standart çözeltisi eklenmiştir. Geri kazanım yüzdesi, beş paralel ölçümden hesaplanmıştır. Karşılık gelen regresyon denklemi, farmasötik dozaj formundaki ve insan serumu gibi biyolojik örnekte Pirfenidon içeriğini tayin etmek için kullanılmıştır.

2.6. Serum Örneklerinin Hazırlanışı

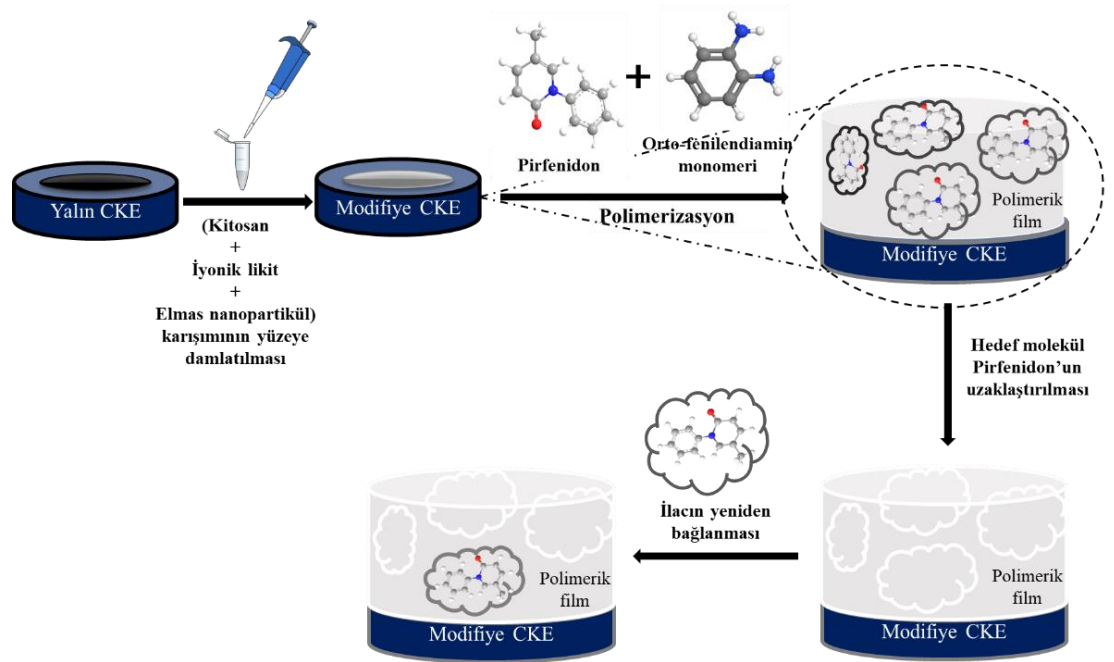
Sentetik serum numuneleri, 1 mL 1 mM Pirfenidon stok solüsyonu, 3.6 mL insan serumu ve 5.4 mL asetonitril karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu çözelti karışımı, 15 dakika ultrasonik hale getirildi ve serum protein kalıntılarını çıkarmak için 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Berrak süpernatant, uygun miktarlarda serum numunesi hazırlamak için 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde seyreltilmiştir. Diferansiyel puls voltamogramları, serum numunelerinde çeşitli Pirfenidon konsantrasyonlarında kaydedilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizildi ve ilgili kalibrasyon denklemleri Pirfenidon miktarının belirlenmesi için kullanılmıştır.

2.7. Pirfenidon için Moleküler Baskılanmış Elektrokimyasal Nanosensörünün Hazırlanması

Kitosan çözeltisi 0,5 mg tartılarak %1 asetik asit çözeltisi içerisinde çözülmüştür. 2 mg elmas nanopartikül 1 mL ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. İyonik sıvı çözeltisi için 10 mg BMIBr kristali tartılmış ve 1 mL ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. Tüm modifikasyon çözeltileri ultrasonik banyo kullanılarak homojen bir şekilde hazırlanmıştır.

Modifikasyondan önce, yalın CKE'nin yüzeyi, alümina süspansiyonu ile bir parlatma bezi üzerinde parlatılmış, ardından ultra saf su ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Farklı oranlarda ve farklı hacimlerde modifikasyon çözeltisi elektrot yüzeyine damlatıldı ve kurutma makinesi altında 10 dakika kurutulmuştur. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi moleküler

baskılanmış elektrokimyasal nanosensör hazırlamak için, modifikasyon çözeltisi elektrot yüzeyine damlatıldıktan sonra 0,025 mM Pirfenidon ve 5 mM o-PD monomeri içeren pH 5,2 asetat tampon çözeltisi dönüşümlü voltametri yöntemiyle yüzeyde elektropolimerizasyon ile kaplanır. Optimize edilmiş uzaklaştırma çözeltilerinin içerisine daldırılarak elektrot yüzeyinde analite özgü boşluklar oluşturulur. Kontrol için, baskılama performansını değerlendirmek için Pirfenidon olmadan aynı koşullar altında baskılanmamış bir nanosensör (NIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE) sentezlenmiştir. Geliştirilen MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE elektrokimyasal sensörün analitik performansı NIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE sensörü kullanılarak kontrol edilmiştir. 0,1 M KCl içeren 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) çözelti içerisinde DPV ve DV yöntemleri ile MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE ve NIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE sensörleri ile gerçekleştirilmiştir.

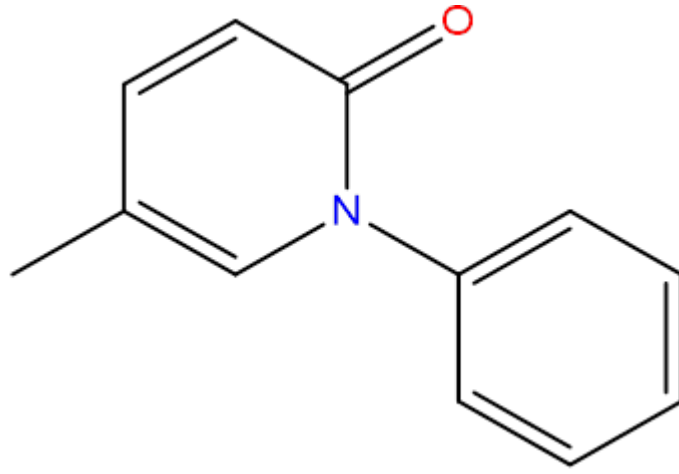


Şekil 2.1. Tasarlanan moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensörün hazırlanışı

3. BULGULAR

3.1.Pirfenidon'un Yalın CKE ile Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

Şekil 3.1.'de görülen Pirfenidon'un CKE ile elektrokimyasal olarak incelemek için voltametrik yöntemlerden DV, DPV ve KDV'de çalışmaya karar verilmiştir.



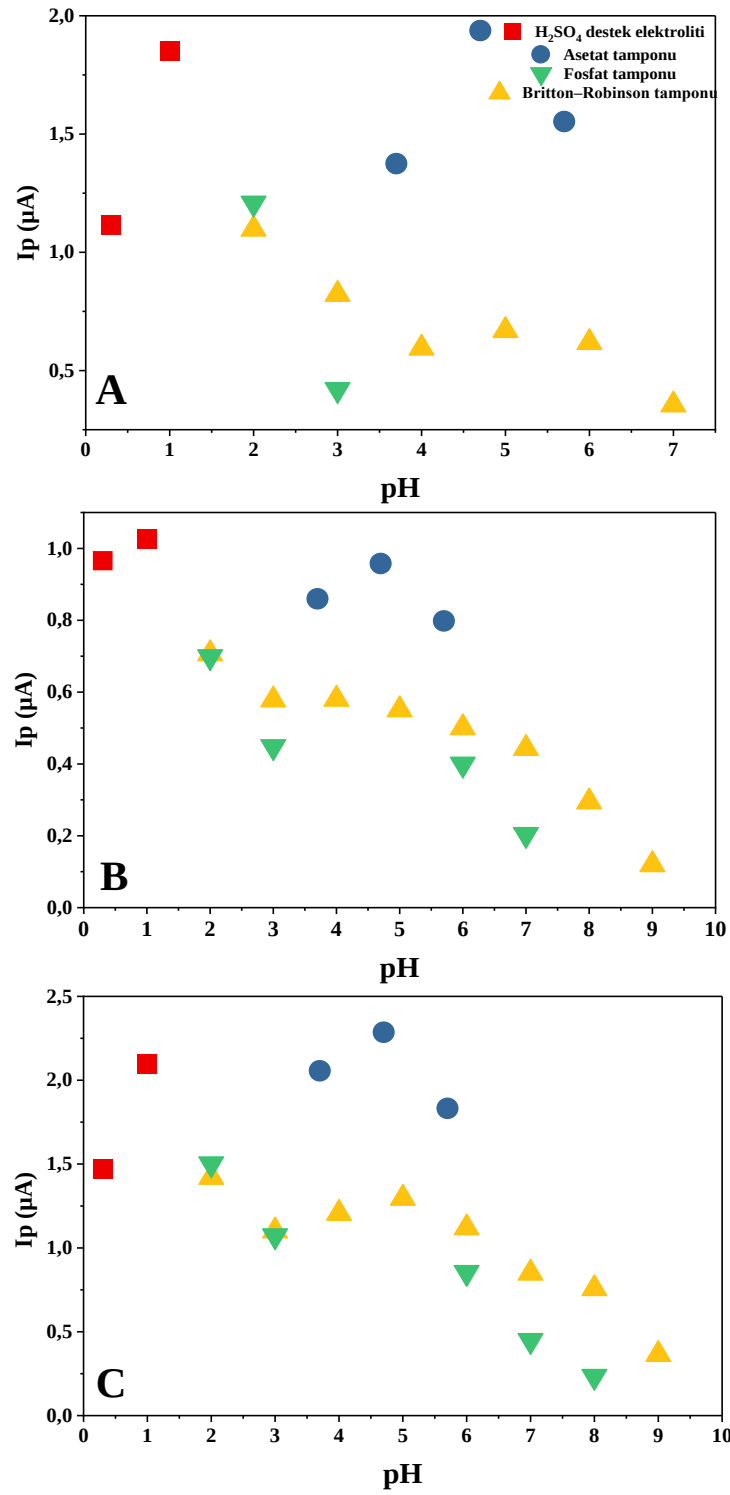
Şekil 3.1. Pirfenidon'un moleküler yapısı

3.1.1. Yalın CKE ile pH ve Tampon Etkisi Çalışmaları

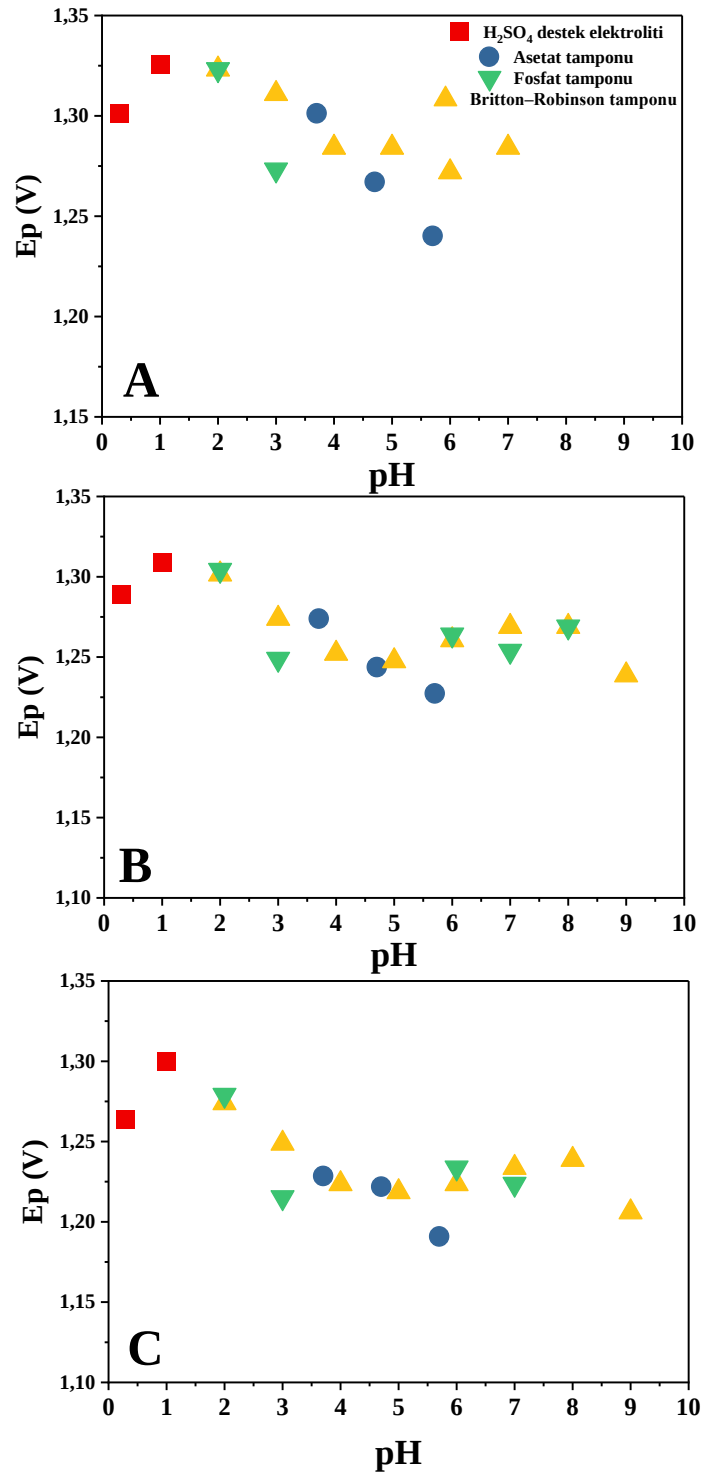
Optimum ortamın bulunması amacıyla yalın CKE ile pH çalışması 10,0 mM Pirfenidon için pH 2 – 12 Britton–Robinson, pH 2 – 8 fosfat ve pH 3,7 – 5,7 asetat tamponları, 0,1 M ve 0,5 M H₂SO₄ destek çözeltileri kullanılarak yapılmıştır. DV, DPV ve KDV yöntemleriyle pH ve tampon değişimine bağlı pik akımları ve pik potansiyeli davranışı incelenmiştir. Şekil 3.2'de pH değerleri – pik akımı üzerine etkisini gösteren grafiklerde gözlendiği gibi Pirfenidon'un yükseltgenme piki pH arttıkça düşmüştür. DV (Şekil 3.2A) yönteminde pH 7'den sonra, DPV (Şekil 3.2B) ve KDV (Şekil 3.2C) yöntemlerinde pH 9'dan sonra Pirfenidon'un yükseltgenme piki gözlenmemiştir. pH 4,7 asetat tamponunda ve 0,1 M H₂SO₄ destek elektrolitinde en yüksek akım değerleri elde edilmiştir. Akım değerleri iki ortamda da yakın gelmesine rağmen 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti ortamında yükseltgenme pikinin daha stabil olduğu bulunmuştur. Elde edilen

sonuçlar, Pirfenidon'un yükseltgenme pik akımının destekleyici elektrolit olarak kullanılan çözeltinin pH değerine büyük ölçüde bağlı olduğunu kanıtlanmıştır.

Şekil 3.3'te farklı pH değerlerinin pik potansiyeli üzerindeki etkisi görölmektedir. Pik potansiyeli ve pH arasındaki bağımlılık, -59.53 mV/pH eğimiyle doğrusal olmadığı gözlenmiştir, bu da meydana gelen elektrot reaksiyonunda protonların olmadığını sadece elektronların olduğunu göstermektedir. Pirfenidon için, tampon çözeltisinin pH'ı arttıkça pik potansiyelleri neredeyse sabit olarak ölçüldü, bu da protonların oksidasyon sürecinde bir rol oynamadığını göstermiştir. 10 mM Pirfenidon için en yüksek pik akımın ve en düzgün pik şeklinin gözlendiği 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit çözeltisi sonraki çalışmalar için en uygun ortam olarak seçilmiştir. 10 mM Pirfenidon'un 0,1 M H_2SO_4 destek çözeltisinde elde edilen yükseltgenme sinyali tek pik olarak DPV (Şekil 3.3B) yönteminde +1309 mV'da, KDV (Şekil 3.3C) yönteminde +1300 mV'da gözlenmiştir.



Şekil 3.2. 10,0 mM Pirfenidon'un DV(A), DPV(B) ve KDV(C) voltamogramlarına göre farklı pH değerleri için pik akımı üzerine etkisini gösteren grafikler. (□): H₂SO₄ destek elektroliti, (Δ): Britton-Robinson tamponu, (○): Asetat tamponu, (▽): Fosfat tamponu



Şekil 3.3. 10,0 mM Pirfenidon'un DV(A), DPV(B) ve KDV(C) voltamogramlarına göre farklı pH değerleri için pik potansiyeli üzerine etkisini gösteren grafikler. ($\square$): H_2SO_4 destek elektroliti, ($\triangle$): Britton–Robinson tamponu, ($\bullet$): Asetat tamponu, (∇): Fosfat tamponu

3.1.2. Yalın CKE ile Hız Taraması Çalışmaları

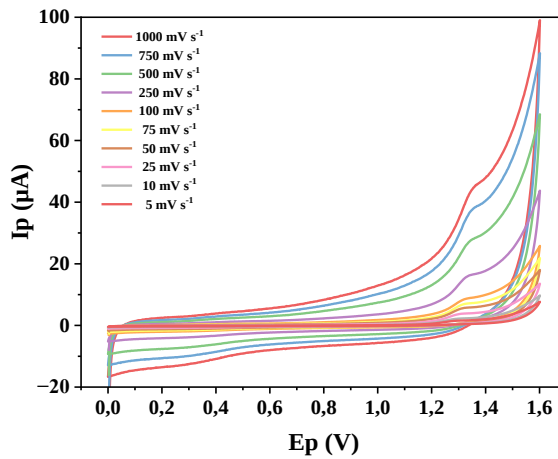
Şekil 3.4'te görüldüğü gibi, 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde 20,0 mM Pirfenidon konsantrasyonunda sırasıyla 5 – 1000 mV s⁻¹ aralığındaki tarama hızlarında voltamogramlar kaydedilmiştir. 20,0 mM Pirfenidon için yapılan hız taraması deneylerinden elde edilen sonuçlar 5 – 1000 mV/s aralığında $v^{1/2}$ ile I_{pa} arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir (Şekil 3.5A). Bu verilere ait doğru denklemi,

$$I_{pa}(\mu A) = 0,121 v^{1/2} \text{ mV/s} + 0,105; R^2 = 0,998$$

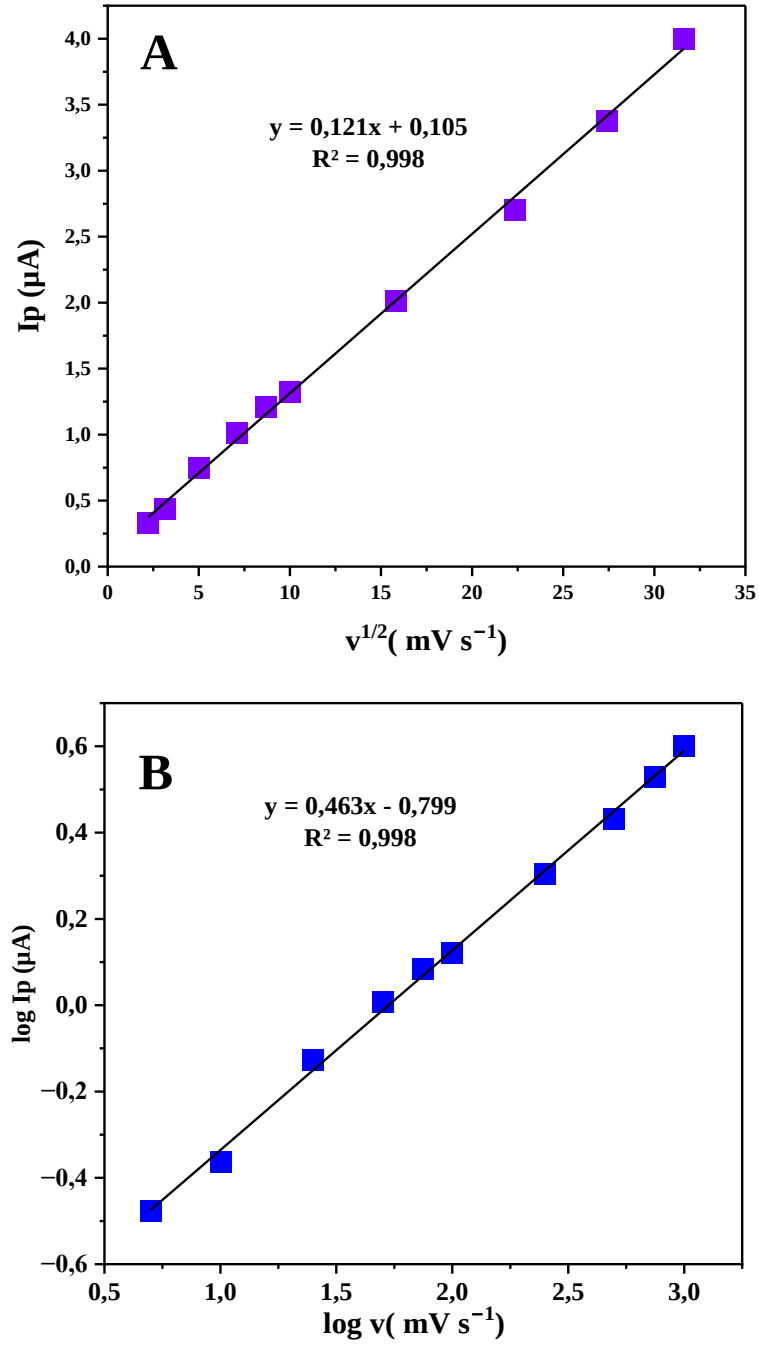
olarak bulunmuştur. $\log v - \log i_p$ eğrisinden (Şekil 3.5B) elde edilen doğru denklemi,

$$\log I_{pa}(\mu A) = 0,463 \log v \text{ mV/s} - 0,799; R^2 = 0,998$$

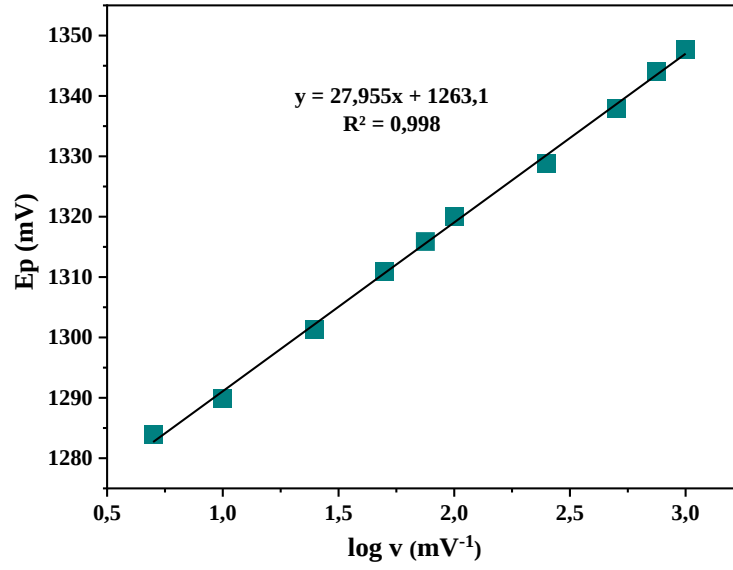
olarak bulunmuştur. $\log v - \log i_p$ eğrisinin eğim değeri 0,463 olarak bulunmuştur (Laviron, 1979; Laviron ve ark., 1980). Ayrıca $v^{1/2} - I_{pa}$ arasında doğrusal bir ilişki olması da difüzyon kontrollü olduğunu destekler. 5 – 1000 mV s⁻¹ aralığında tarama hızı, potansiyelin hız artışıyla birlikte 66 mV daha pozitif potansiyel değerlerine kaydığı görülmüştür.



Şekil 3.4. 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde 20,0 mM Pirfenidon'un yalın CKE ile 5–1000 mV s⁻¹ aralığında Pirfenidon'un artan tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları.



Şekil 3.5. 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde 20,0 mM Pirfenidon'un yalın CKE ile 5– 1000 mV s⁻¹ tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramlarına ait $v^{1/2}$ – I_p (A) ve $\log v$ – $\log I_p$ (B) eğrileri grafikleri.



Şekil 3.6. 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde 20,0 mM Pirfenidon'un yalın CKE ile 5– 1000 mV s⁻¹ tarama hızlarında elde edilen dönlüşümlü voltamogramlarına ait log v–Ep eğrisi grafiği.

0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde yapılan tarama hızı çalışmalarından faydalanarak elektron sayısı hesaplanmıştır. (Laviron, 1979);

$$E_p \text{ (mV)} = 27,955 \log v \text{ (mV s}^{-1}\text{)} + 1263,1; R^2 = 0,998$$

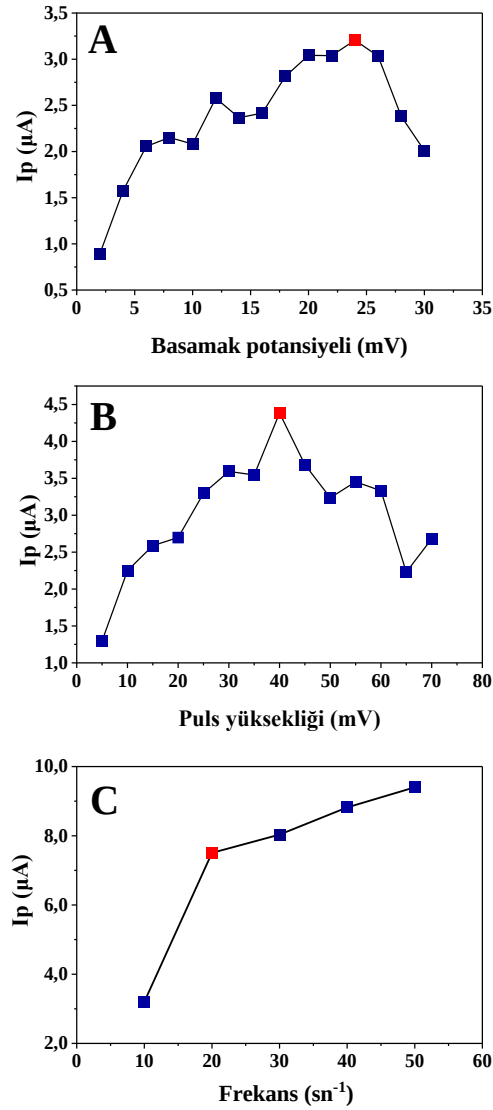
Şekil 3.6'da görüldüğü gibi, Ep–logv eğrisinin eğim değeri 27,955 olarak bulunmuş ve αn değeri 2,11 olarak hesaplanmıştır (Gosser, 1993). Buradan yola çıkarak Pirfenidon'un yükseltgenme reaksiyonunda aktarılan elektron sayısı 4,22 (~4) olarak hesaplanmıştır.

$$E_p = E^{0'} - \frac{2,303 RT}{\alpha n F} \log \frac{RTk^0}{\alpha n F} + \frac{2,303 RT}{\alpha n F} \log v$$

3.1.3. KDV Parametrelerinin Optimizasyonu

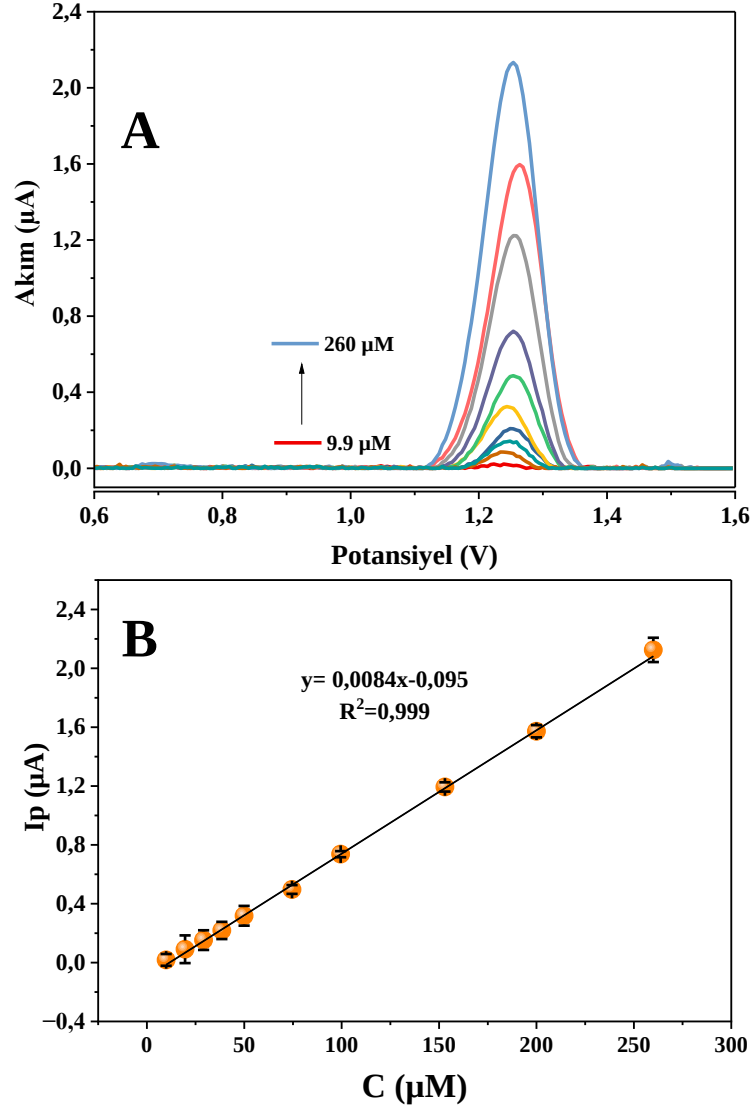
KDV yöntemi için önce parametrelerin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için yalın CKE ile 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde 20,0 mM Pirfenidon çözeltisi kullanılmıştır. Basamak potansiyeli değerleri; 2–30 mV aralığında (Şekil 3.7A), kare dalga yüksekliği; 5–70 mV aralığında (Şekil 3.7B), kare dalga frekans değerleri; 10–50 Hz

aralığında (Şekil 3.7C) değiştirilerek kare dalga voltamogramları alınmıştır. En uygun parametre olarak, step potansiyeli 0,024 V, puls yüksekliği 0,04 V, frekans: 20 sn⁻¹ olarak bulunmuştur. Frekans değerinde 20 Hz'den sonra pik şekilleri bozulduğu için daha yüksek değerler seçilmemiştir.



Şekil 3.7. 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde 20,0 mM Pirfenidon'un yalın CKE ile kare dalga voltametri parametrelerinin optimizasyonu; Basamak potansiyeli (A), Puls yüksekliği (B), Frekans (C).

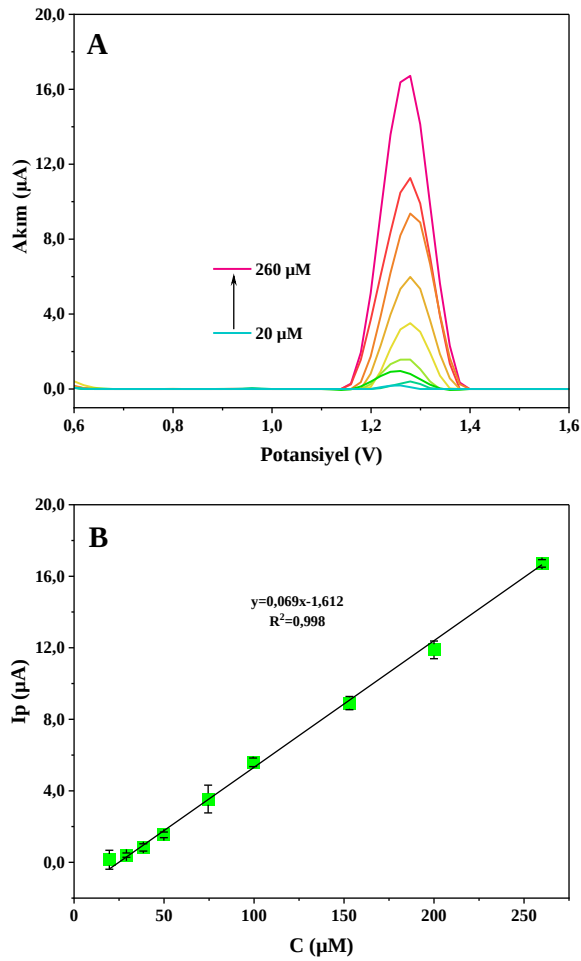
3.1.4. Pirfenidon'un Yalın CKE ile Elektrokimyasal Uygulaması



Şekil 3.8. Pirfenidon'un artan konsantrasyonlarında 9,90 µM – 260,0 µM aralığında diferansiyel puls voltamogramları (A), DPV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri (B). DPV parametreleri: basamak potansiyeli: 5 mV, puls yüksekliği: 25 mV).

Pirfenidon için CKE ile DPV yöntemi kullanılarak 0,1 M H₂SO₄ asit destek çözeltisi içerisinde analiz çalışmaları yapılmıştır. DPV yöntemi ile 9,90 µM – 260,0 µM konsantrasyon aralıklarında doğrusallık elde edilmiştir. Doğrusal aralıktaki bazı konsantrasyon değerlerine ait voltamogramlar Şekil 3.8A'da ve bu verilere ait kalibrasyon doğruları da Şekil 3.8B'de verilmiştir.

Pirfenidon için CKE ile KDV yöntemi kullanılarak 0,1 M H₂SO₄ asit destek çözeltisi içerisinde analiz çalışmaları yapılmıştır. KDV yöntemi ile 9,90 μ M – 260,0 μ M konsantrasyon aralıklarında doğrusallık elde edilmiştir. Doğrusal aralıktaki bazı konsantrasyon değerlerine ait voltamogramlar Şekil 3.9A’da ve bu verilere ait kalibrasyon doğrusu Şekil 3.9B’de verilmiştir. TS ve TAS değerleri DPV için sırasıyla 2,48 μ M ve 8,26 μ M; KDV için sırasıyla 4,75 μ M ve 15,84 μ M bulunmuştur. TS ve TAS sonuçları, doğrusal aralığın en düşük konsantrasyonunun standart sapmasına (SD) ve kalibrasyon denkleminin eğimine (m) dayanmaktadır, validasyon parametreleri Çizelge 3.1.’de özetlenmiştir.



Şekil 3.9. Pirfenidon’un artan konsantrasyonlarında 20,0 μ M– 260,0 μ M aralığında kare dalga voltamogramları (A), KDV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri (B). KDV parametreleri: basamak potansiyeli: 24 mV, puls yüksekliği: 40 mV, frekans: 20 Hz).

Çizelge 3.1. Pirfenidon için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

Parametreler	0,1 M H ₂ SO ₄ Destek elektroliti	
	DPV	KDV
Doğrusallık Aralığı (µM)	9,9–260,0	20,0–260,0
Eğim (µA µM ⁻¹)	0,0084	0,0694
Eğimin Standart Hatası	8,8×10 ⁻⁵	12,7×10 ⁻⁴
Kesişim (µA)	-0,09518	-1,6196
Kesişimin Standart Hatası	0,012	0,106
Regresyon Katsayısı (R ²)	0,999	0,998
Tehiş Sınırı (µM)	2,48	4,75
Tayin Alt Sınırı (µM)	8,26	15,84
Gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS) *	1,15	2,19
Günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) *	2,10	3,40

*Tekrar edilebilirlik çalışmaları 5 değer kullanılarak elde edilmiştir.

3.1.5. Gerçek Örnek Uygulaması

Pirfenidon için geliştirilen elektrokimyasal tayin yöntemleri, Pirfenidon'un biyolojik örneklerde araştırılması amacıyla insan serum örneklerine uygulanmıştır. Yalın CKE ile serum örneğinde 0,1 M H₂SO₄ içerisinde DPV yöntemi ile 30–200 µM, KDV yöntemi ile 48–200 µM konsantrasyon aralıklarında doğrusallık gözlenmiştir (Şekil 3.10). Serum örneğinde, TS ve TAS değerleri DPV için sırasıyla 8,53 µM ve 28,44 µM; KDV için sırasıyla 12,60 µM ve 42 µM bulunmuştur. Pirfenidon tayini için DPV ve KDV yöntemleri daha duyarlı olması sebebiyle insan serum numunelerinden Pirfenidon'un % geri kazanım çalışmalarına uygulanmıştır. Elde edilen konsantrasyon–pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları ise Çizelge 3.2'de ve geri kazanım sonuçları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. Pirfenidon'un insan serum örneği kalibrasyon eğrisine ait analiz sonuçları ve validasyon parametreleri.

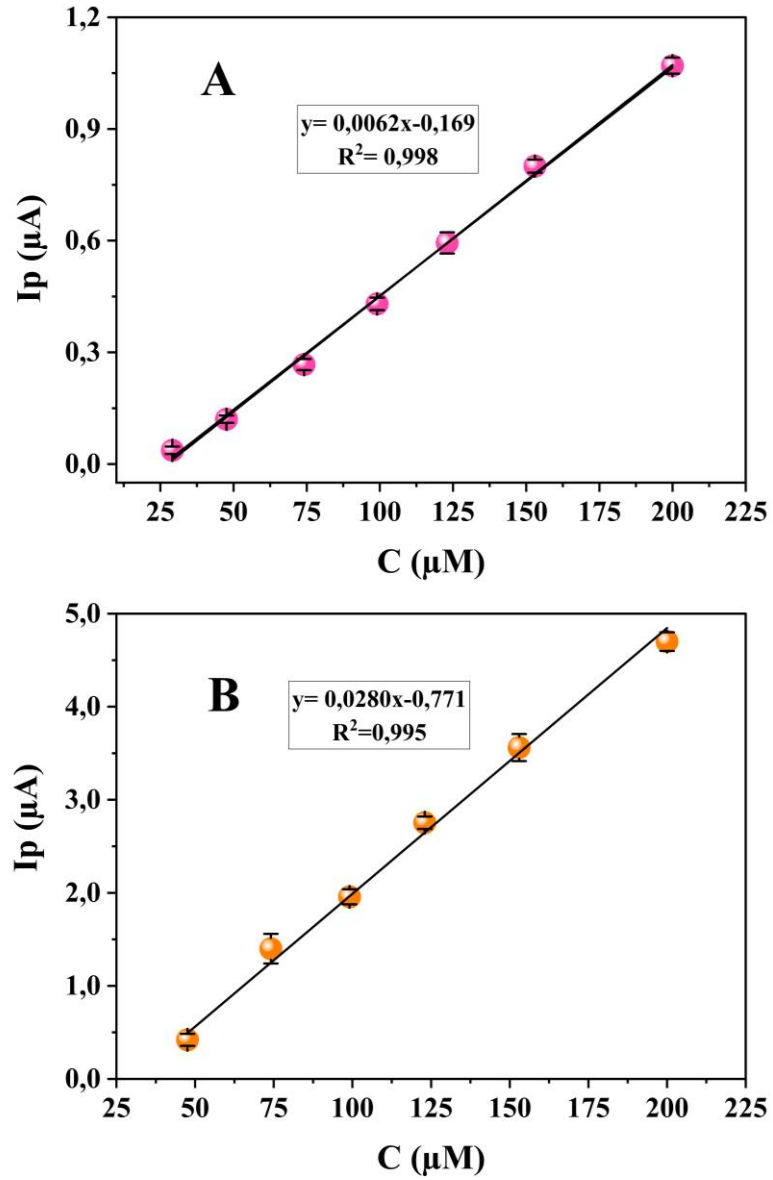
Parametreler	İnsan serumu	
	DPV	KDV
Doğrusallık Aralığı (μM)	30,0–200,0	48,0–200,0
Eğim ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0,0062	0,0279
Eğimin Standart Hatası	$2,1 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4}$
Kesişim (μA)	–0,1692	–0,7709
Kesişimin Standart Hatası	0,014	0,111
Regresyon Katsayısı (R^2)	0,998	0,995
Teşhis Sınırı (μM)	8,53	12,60
Tayin Alt Sınırı (μM)	28,44	42,00
Gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS) *	1,15	2,19
Günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) *	2,10	3,34

*Tekrar edilebilirlik çalışmaları 5 değer kullanılarak elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. İnsan serum örneğinde yalın CKE ile Pirfenidon geri kazanım sonuçları.

Parametreler	0,1 M H_2SO_4 Destek elektroliti	
	DPV	KDV
Eklenen standart madde miktarı (μM)	50,00	100,00
Bulunan madde miktarı (μM)*	48,64	106,32
%Ortalama geri kazanım*	97,27	106,32
%BSS	1,75	2,51

*5 değer kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 3.10. Pirfenidon tayininde yalın CKE ile insan serum örneğinde artan konsantrasyonlarında DPV(A) ve KDV(B) yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri

3.1.6. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Dozaj Şekline Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışması

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu incelemek için Pirfect® tablet formülasyonlarından Pirfenidon'un miktar tayinini yapabilmek için çözeltiler hazırlanmış ve Pirfenidon standart çözeltileri ile aynı koşullarda voltamogramlar elde edilmiştir. (Çizelge 3.4).

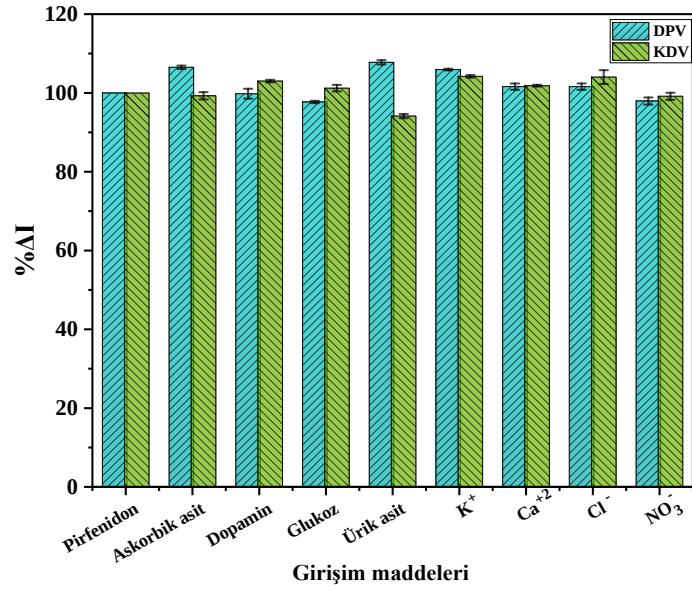
Çizelge 3.4. Pirfenidon içeren Pirfect® tabletlerden yalın CKE ile elde edilen analiz sonuçları.

Parametreler	0,1 M H ₂ SO ₄	
	DPV	KDV
Etiket miktarı (mg)	200,00	200,00
Bulunan madde miktarı (mg)*	213,15	206,40
%BSS	0,53	0,46
İlave edilen standart madde miktarı (µM)	50,00	50,00
Bulunan madde miktarı (µM)*	52,24	48,96
%Ortalama geri kazanım*	104,49	97,91
%BSS	3,28	1,85

*5 değerden hesaplanmıştır.

3.1.7.Girişim Çalışmaları

Pirfenidon'un yalın CKE ile tayininde gerçek örnekler ile çalışırken pik akımını değiştireceği düşünülen endojen hormonlar ve iyonlar ile analizi yapılmıştır. Yalın CKE, dopamin, askorbik asit ve ürik asit gibi endojen maddelerle ve Na⁺, Ca⁺², Cl⁻, NO₃⁻, gibi iyonlarla girişim özellikleri incelenmiştir. Girişim etkisi gösteren bileşenlerin Pirfenidon ile 1:10 oranında karıştırılmasıyla hesaplanmıştır. Şekil 3.11'de verildiği gibi, girişim maddelerinin Pirfenidon'un yükseltgenme pik sinyalindeki değişimi %97,63 ile %105,98 arasında elde edilmiştir.



Şekil 3.11. Girişim maddelerinin yalın CKE ile cevabının Pirfenidon pik akımına % olarak etkisi

3.2. Geliştirilen Moleküler Baskılanmış Polimer ile Voltametrik Çalışmalar

3.2.1. Geliştirilen Moleküler Baskılanmış Polimer Elektrodun Karakterizasyonu

3.2.1.1. Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Pirfenidon, MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE elektrokimyasal nanosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve DV yöntemleri kullanılarak elektropolimerizasyondan önce, elektropolimerizasyondan sonra, uzaklaştırma işleminden sonra ve Pirfenidon'un bağlanmasından sonra sonuçları karşılaştırmak için uygulanmıştır. EIS, modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrot yüzey özelliklerinin etkili bir şekilde karşılaştırılması ve geliştirilen sensörün karakterizasyonu için önemli bir tekniktir. EIS ile yalın ve polimer baskılı elektrotların her aşamasının karakterizasyonu için $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ kullanılmıştır. Her adımda dikkate değer impedans spektrum değişiklikleri Şekil 3.12A'daki gibi gözlenmiştir.

Nyquist diyagramının daha yüksek frekanslar için yarım dairesi elektron transfer prosedürüne karşılık gelirken, düşük frekansın lineer kısmı difüzyona karşılık gelir. Yalın

CKE için hızlı elektron transfer kinetiği ile difüzyonla sınırlı bir süreç izlenebilir. Elektropolimerizasyondan sonra MIP iletken değildir ve yüzey elektron transferinde son derece dirençlidir. Böylece, maksimum dirençli impedans spektrumları elde edilmiştir. Pirfenidon'un çıkarılmasından sonra, boşlukların oluşması nedeniyle impedans değeri azalır ve daha sonra elektron transfer elektronlarını kolaylaştırdığı için $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sinyali gözlemlenebilir. Son olarak, Pirfenidon 'in bağlanmasından sonra yarım daire iyileştirilir. Elde edilen bu sonuçlar, polimerik matrisin Pirfenidon 'e bağlanmak için yeterli kapasiteye sahip olduğu şeklinde yorumlanabilir. Geliştirilen elektrodun performansı, bir redoks probu olan 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içeren 100 mM KCl çözeltisinde DV ve EIS teknikleri kullanılarak araştırılmıştır. DV, sensörlerin elektrokimyasal karakterizasyonu için en temel yöntemdir. Elektropolimerizasyon, uzaklaştırma ve bağlanma prosedürlerini değerlendirmek için DV yöntemi uygulanmıştır. Şekil 3.12B 'de görüldüğü gibi, yalnız CKE maksimum pik akımına sahiptir. Elektropolimerizasyondan sonra, polimer oluşumu tarafından inhibe edilen elektron transferi nedeniyle $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pik akımı elde edilemez. Pirfenidon'un desorpsiyonundan sonra, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pik akımı tekrar elde edilmiştir. Bu sonuç, bağlanmaya ve artan elektron transferine izin veren boşlukların oluşumunu göstermiştir. Son olarak, Pirfenidon'un bağlanmasından sonra, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ için uygun bağlanma boşluklarındaki azalma nedeniyle $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sinyalinde önemli bir azalma elde edilmiştir. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörünün elektrokimyasal algılama alanında mükemmel seçicilik ve hassasiyet, olağanüstü tekrarlanabilirlik gibi birçok avantajı vardır.

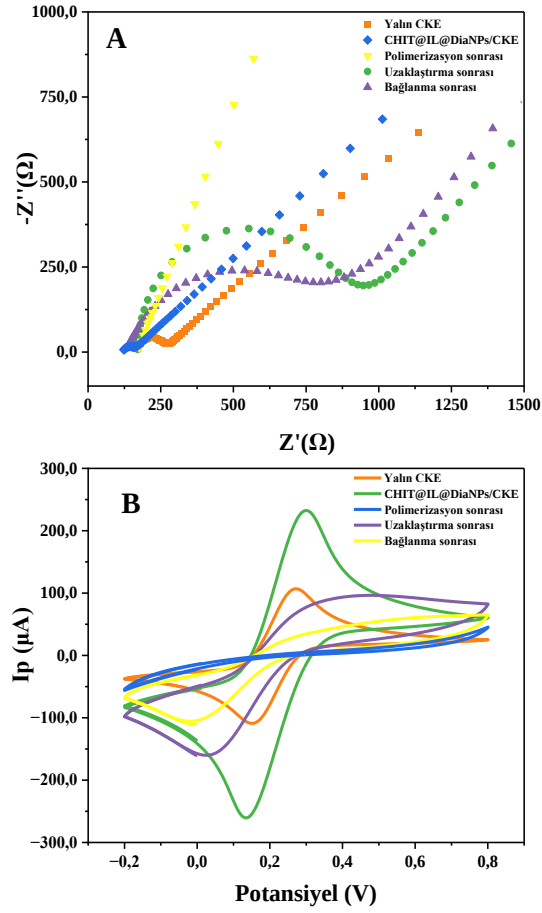
Şekil 3.12B'de gösterildiği gibi, yalnız CKE 274 mV potansiyelinde küçük bir redoks pik noktası elde edilmiştir. CHIT@IL@DiaNPs/CKE daha yüksek akım yanıtı ve 300 mV'da daha pozitif E_p potansiyelinde cevap vermiştir.

Farklı tarama hızlarındaki (v) pik akım (I_{pa}) değerleri, $v^{1/2}$ (Randles Sevcik denklemi, eğim değerlerinden hesaplanmıştır;

$$I_p = 2,686 \times 10^5 \times n^{3/2} \times A \times c \times D^{1/2} \times v^{1/2}$$

A'nın aktif yüzey alanını (cm^2) gösterdiği yerde, I_{pa} pik akımıdır (A), n aktarılan elektronların sayısıdır, D difüzyon katsayısıdır ve c redoks probu ferri ferronun konsantrasyonudur. Potasyum ferrosiyanür redoks probu için, ortam sıcaklığında ve basıncında $n=1$ ve $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ve $c = 5 \text{ mM}$ 'dir. Yalın CKE ve CHIT@IL@DiaNPs/CKE yüzey alanları sırasıyla $0,091 \text{ cm}^2$ ve $0,248 \text{ cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Modifikasyondan sonra elektrotun yüzey alanında bir artış elde edildi.

EIS'den alınan sonuçlar, Şekil 3.12A.'da sunulan eğriler DV sonuçlarıyla iyi bir uyum içindedir. Şekil 3.12.'de, 100 mM KCl içeren $5 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi 'de yalın CKE, CHIT@IL@DiaNPs/CKE, polimerizasyon sonrası MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE, uzaklaştırma sonrası MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE ve Pirfenidon'un yeniden bağlanması sonrası MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE Nyquist grafikleri, gözükmemektedir. Çizelge 3.5'te görüldüğü gibi, yalın CKE'nin R_{ct} 'si ($92,92 \Omega \text{ cm}^2$) > CHIT@IL@DiaNPs/CKE ($27,64 \Omega \text{ cm}^2$) olması modifiye elektrodun yüzeyinde direncin azaldığı göstermektedir. Yalın CKE ile karşılaştırıldığında CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin redoks probu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ve elektrot yüzeyi arasında daha hızlı bir elektron transfer hızına sahip olduğunu göstermiştir. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin polimerizasyon sonrası direnci en düşük gelmiştir, en düşük yük transfer direnci, daha hızlı bir elektron transfer kinetiğinden kaynaklanmış olabilir. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin uzaklaştırma sonrası direnci artmıştır, Pirfenidon'un yeniden bağlanması ile MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin direnci düşmüştür.



Şekil 3.12. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE elektrokimyasal nanosensörü oluşturmak için her adımda elde edilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi eğrileri (A) ve dönüşümlü voltamogramları (B).

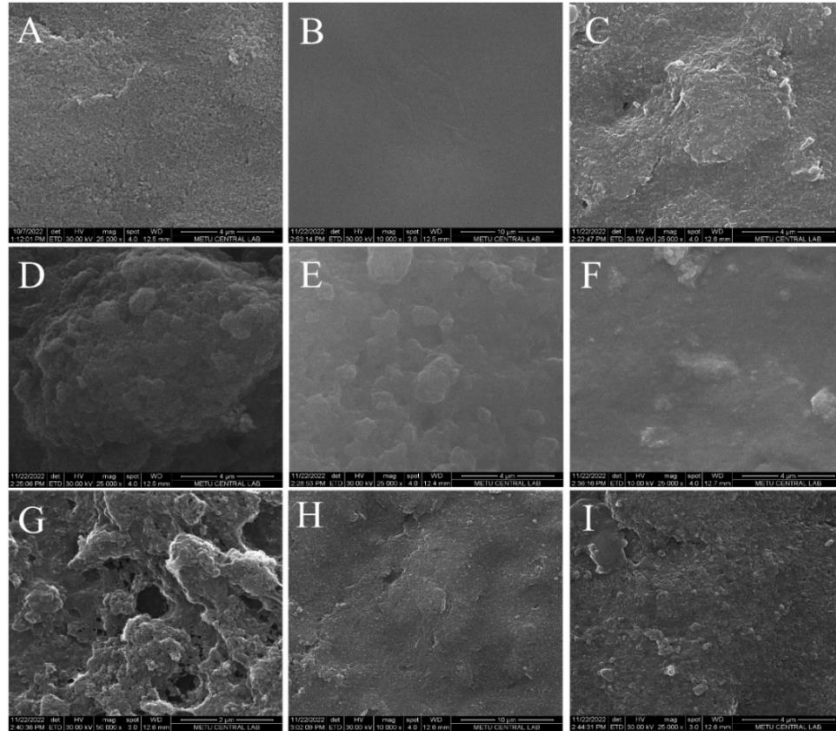
Çizelge 3.5. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE elektrokimyasal nanosensörü oluşturmak için her adımda elde edilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi sonuçları.

Elektrotlar	R_s	C	R_{ct}
Yalın CKE	166,99	$4,75 \times 10^{-3}$	92,92
CHIT@IL@DiaNPs/CKE	121,66	$2,69 \times 10^{-7}$	27,64
Polimerizasyon sonrası CHIT@IL@DiaNPs/CKE	143,04	$1,16 \times 10^{-1}$	0,75
Uzaklaştırma sonrası CHIT@IL@DiaNPs/CKE	161,46	$2,80 \times 10^{-2}$	686,43
Bağlanma sonrası CHIT@IL@DiaNPs/CKE	170,58	$1,96 \times 10^{-2}$	351,04

3.2.1.2. Yüzey Karakterizasyonu

Geliştirilen CKE yüzeylerinin karakterizasyonu, EIS ve DV dışında, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile de incelenmiştir. Yalın CKE (Şekil 3.13A) ile kıyaslandığında CHIT/CKE (Şekil 3.13B)'nin yüzeyinin çok daha pürüzsüz ve gürültüsüz olduğu

görülmüştür. İyonik sıvı/CKE (Şekil 3.13C) ve DiaNP/CKE (Şekil 3.13D) yüzeyleri daha pürüzlü yüzeyler görülmüştür. Uzaklaştırma sonrası MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE (Şekil 3.13G) sensöründe polimerizasyon sonrası MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE (Şekil 3.13F) sensörü yüzeyine göre boşluklu olduğu gözlenmiştir. NIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensör yüzeylerinde polimerizasyon sonrası (Şekil 3.13H) ve uzaklaştırma sonrası (Şekil 3.13I) bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 3.13. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörün SEM yüzey karakterizasyonu görüntüleri; Yalın CKE (A), CHIT/CKE (B), IL/CKE (C), DiaNP/CKE (D), CHIT@IL@DiaNPs/CKE (E), MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE Polimerizasyon sonrası (F), MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE Uzaklaştırma sonrası (G), NIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE Polimerizasyon sonrası(H), NIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE Uzaklaştırma sonrası(I)

3.2.2. DeneySEL Koşulların Optimizasyonu

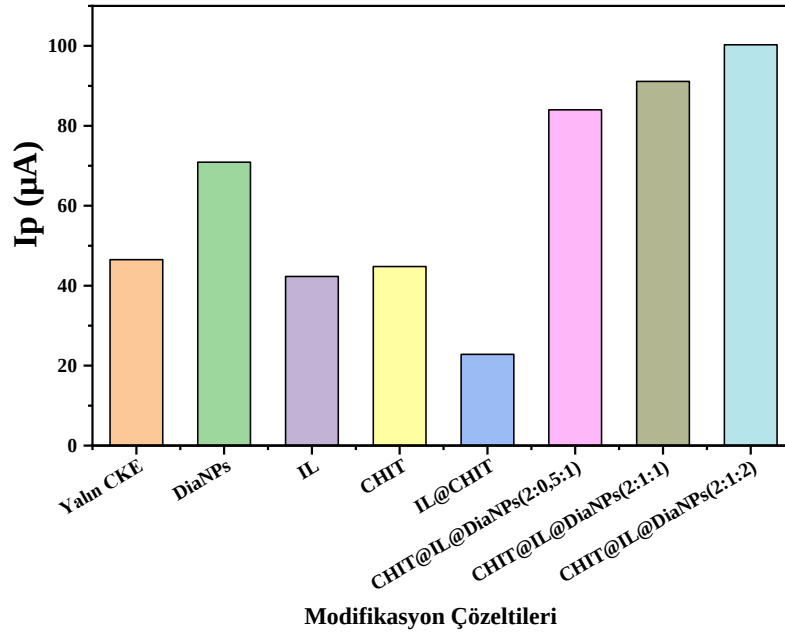
Elektrot yüzeyinin modifikasyonu, monomerin doğası, monomerin hedef analite oranı, elektropolimerizasyon sırasında pH ve CV tarama döngüsü sayısı, uzaklaştırma çözeltisi, uzaklaştırma süresi ve yeniden bağlanma süresi, MIP ile modifiye edilmiş sensörün performansını etkileme eğiliminde olan temel faktörlerdir. Tüm bu parametreler, elektrot yüzeyinde yeterli kalınlıkta ve iyi fiziksel

stabiliteye sahip bir polimer elde edilmesini sağlar, böylece analiti tanıyabilen seçici boşluklar elde etmenin yolu açılır. Bunun ışığında, MIP'nin geliştirilmesi ve uygulanması için en iyi deneysel koşulları elde etmek amacıyla bu faktörler incelenmiş ve optimize edilmiştir.

Optimizasyon adımı ile ilgili tüm deneyler DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve DV yöntemi ile desteklenmiştir. Ek olarak, her bir parametre için optimum durumu değerlendirmek üzere şablonun çıkarılmasından sonra ve yeniden bağlanmadan sonra probun oksidasyonu ile ilgili akımdaki (ΔI) değişiklikler dikkate alınmıştır.

3.2.2.1. Modifiye Yüzeyin Optimizasyonu

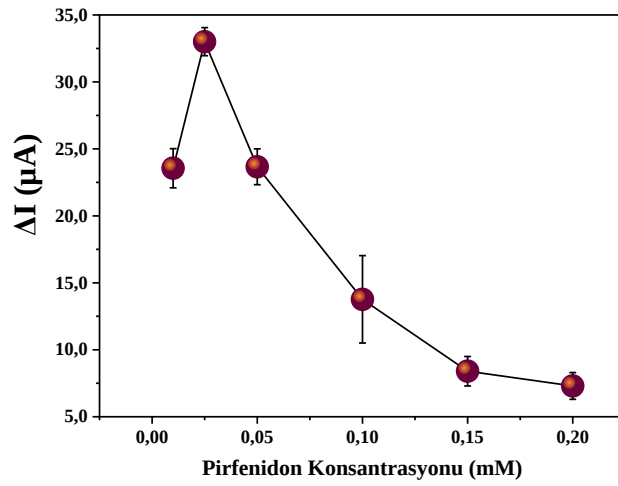
Yalın CKE yüzeyi, elektrot yüzeyinin iyileştirilmesi için farklı nanopartikül ve modifikasyon ajanlarıyla oranları değiştirilerek optimize edilmiştir. Modifikasyon miktarı, elektrot yüzeyinin özelliklerini ve fonksiyonlarını değiştirebilir. Bununla ilgili olarak, filmin kalınlığı, Pirfenidon tayini için çok önemli bir kontrol faktörü olmuştur. Modifikasyon ajanlarından elmas nanopartikül, iyonik sıvı ve kitosan çözeltilerinin farklı oranlarda incelenmiştir (Şekil 3.14). En iyi yüzey cevabının 4 mg/mL elmas nanopartikül, %0,5 gram kitosan çözeltisi içeren %1 asetik asitlik çözeltisi ve 10 mg/mL iyonik sıvı karışımının 2:2:1 oranıyla karıştırılmasıyla bulunmuştur. Film kalınlığının ve yüzey sayısının artması pik akımında bir azalmaya neden olmuştur, bu da filmin daha kalın hale geldiğini ve dolayısıyla elektron transfer hızının engellendiğini göstermiştir.



Şekil 3.14. Modifiye elektrot yüzeyinin optimizasyonu

3.2.2.2. Hedef Molekül Konsantrasyonunun Etkisi

Moleküler baskılanmış filmin optimizasyonu ve değerlendirilmesi, MIP tabanlı nanosensör tasarımının en kritik aşamasıdır. Monomerin hedef moleküle molar oranını optimize ederek, uygun bağlanma boşlukları ve kararlı ve homojen polimer oluşumu sağlanabilir. Bu nedenle monomer/kalıp oranı incelenmiştir. Monomer oranı 5 mM o-PD olarak sabit tutulmuştur. Polimerizasyon çözeltisi içerisinde 0,01 mM–0,20 mM Pirfenidon konsantrasyonları arasında incelenmiştir. Farklı oranlarda hazırlanan elektrotların DPV ve DV cevapları, elektropolimerizasyon öncesi, elektropolimerizasyon sonrası, uzaklaştırma sonrası ve bağlama sonrasında kontrol edilmiştir. Sonuç olarak, Şekil 3.15’te görüldüğü gibi, monomer/hedef molekül molar oranının iyi stabilite, kolay uzaklaştırma ve bağlama işlemi sağladığı oran 5 mM o-PD:0,025 mM Pirfenidon olarak bulunmuştur ve optimum oran olarak seçilmiştir.



Şekil 3.15. Polimerizasyon çözeltisinde Pirfenidon konsantrasyonu optimizasyonu

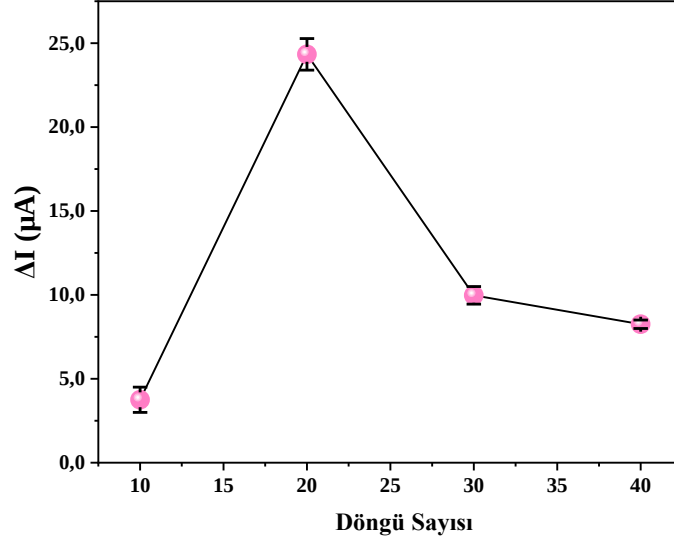
3.2.2.2. Elektropolimerizasyon İçin Döngü Sayısı Etkisi

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

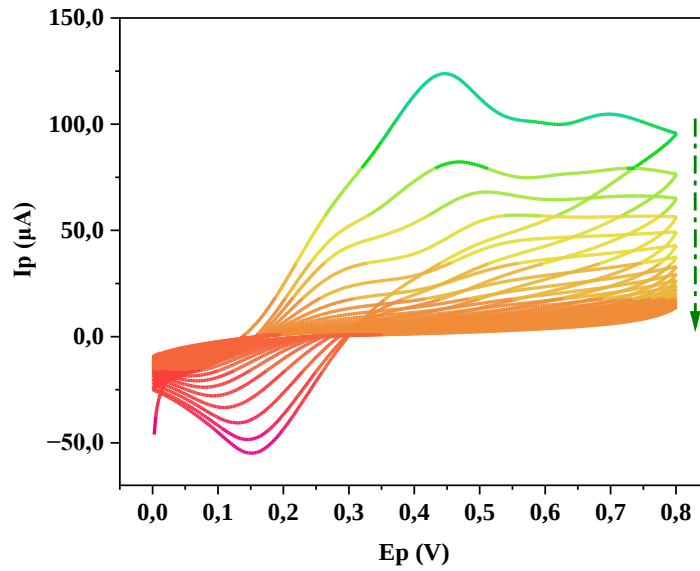
Optimum döngü sayısını belirlemek amacıyla daha önce belirlenen koşullar altında çeşitli döngü sayılarında polimerizasyonlar gerçekleştirilmiştir. DV döngü sayısının etkisini karşılaştırmak için; elektropolimerizasyon sırasında 10,20,30 ve 40 döngü gerçekleştirilmiştir. Daha doğru bir değerlendirme elde etmek için Pirfenidon'un uzaklaştırmasından sonra ve 1 μM Pirfenidon'un bağlanmasından sonraki pik akımları (I_p) ölçümü arasındaki fark (ΔI_p) kontrol edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, elektropolimerizasyon için en uygun döngü sayısı olarak 20 döngü sayısı bulunmuştur (Şekil 3.16). 20 döngüden daha fazla döngü sayısında elektropolimerizasyon gerçekleştiğinde ise gözlenen pik akımlarının arasındaki farkta azalma meydana gelmiştir. Daha doğru bir değerlendirme elde etmek için Pirfenidon'un uzaklaştırmasından sonra ve 1 μM Pirfenidon'un bağlanmasından sonraki pik akımları (I_p) ölçümü arasındaki fark (ΔI_p) kontrol edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda; Şekil 3.17'de dönüşümlü voltamogramları görüldüğü gibi, 0,0 – 0,8 V

potansiyel tarama aralığında, hedef molekül konsantrasyonu 0,025 mM, potansiyel tarama hızı 50 mV/s ve döngü sayısı 20 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.16. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE elektrokimyasal nanosensörünün, (-0,2) – (0,8) V arasındaki potansiyel aralığında 5 mM o-PD ve 0,025 mM Pirfenidon içeren 0,1 M asetat tampon (pH 5,2) ortamında döngü sayısı etkisi.



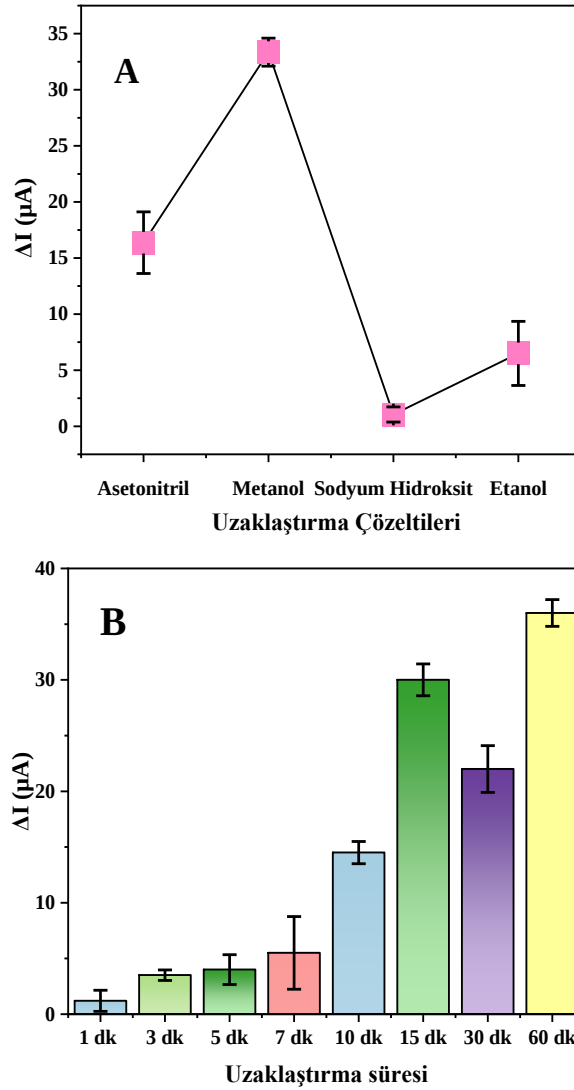
Şekil 3.17. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE elektrokimyasal nanosensörünün (-0,2) – (+0,8) V arasındaki potansiyel aralığında 5 mM o-PD ve 0,025 mM Pirfenidon içeren 0,1 M asetat tamponu (pH 5,2) ortamında 20 döngü sayısı ile elde edilen dönüşümlü voltamogramları.

3.2.2.3. Uzaklaştırma Çözeltilisinin Optimizasyonu

Sensörü optimize etmek için bir diğer önemli parametre de düzgün bir uzaklaştırma işlemidir. Uzaklaştırma çözeltisi ve uzaklaştırma için seçilen süre, polimer filme zarar vermeden yeterli uzaklaştırma elde etmek için optimize edilmelidir. İlk olarak ACN, MeOH, asetik asit, 5 M NaOH, EtOH gibi farklı uzaklaştırma çözeltileri kullanılmıştır. Metanol, diğer solüsyonlara kıyasla Pirfenidon'un etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağladı ve sonuç olarak sonraki çalışmalarda uzaklaştırma çözeltisi olarak kullanılmıştır (Şekil 3.18A).

3.2.2.4. Uzaklaştırma Süresinin Optimizasyonu

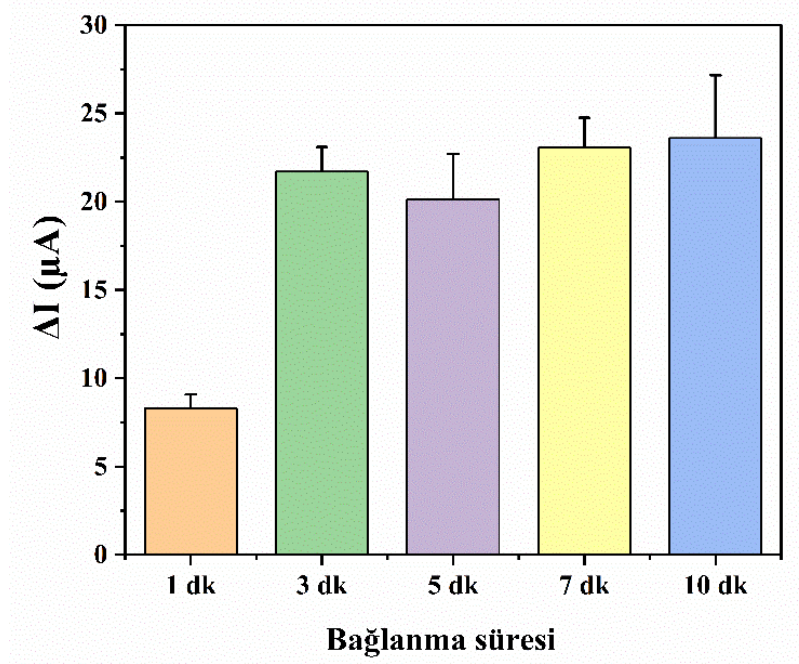
Daha sonra, geliştirilen sensörün etanolde inkübe edilmesi için uygun süre optimize edilmiştir. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE, 1, 3, 5, 7 ve 10 dakika süreyle metanol içinde inkübe edilmiştir. 1 μ M Pirfenidon'un 5 dakika bağlanmasından sonra, farklı sürelerde ΔI_p değerleri kontrol edilmiştir (Şekil 3.18B). Uzaklaştırma süresi arttıkça MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin akım cevabı da paralel olarak artmıştır. Pirfenidon, polimer matrisinden aşamalı olarak çıkarılmıştır. 15. dakikadan sonra, 30. dakikada akım cevabı azaldı. 15 ile 60 dakika arasındaki fark az olduğu için 15. dakika yeterli bulunmuştur. Sonuç olarak, uzaklaştırma işlemi için en uygun süre 15 dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 3.18. Uzaklaştırma çözeltilisinin(A) ve uzaklaştırma süresinin optimizasyonu(B)

3.2.2.5. Bağlanma Süresinin Optimizasyonu

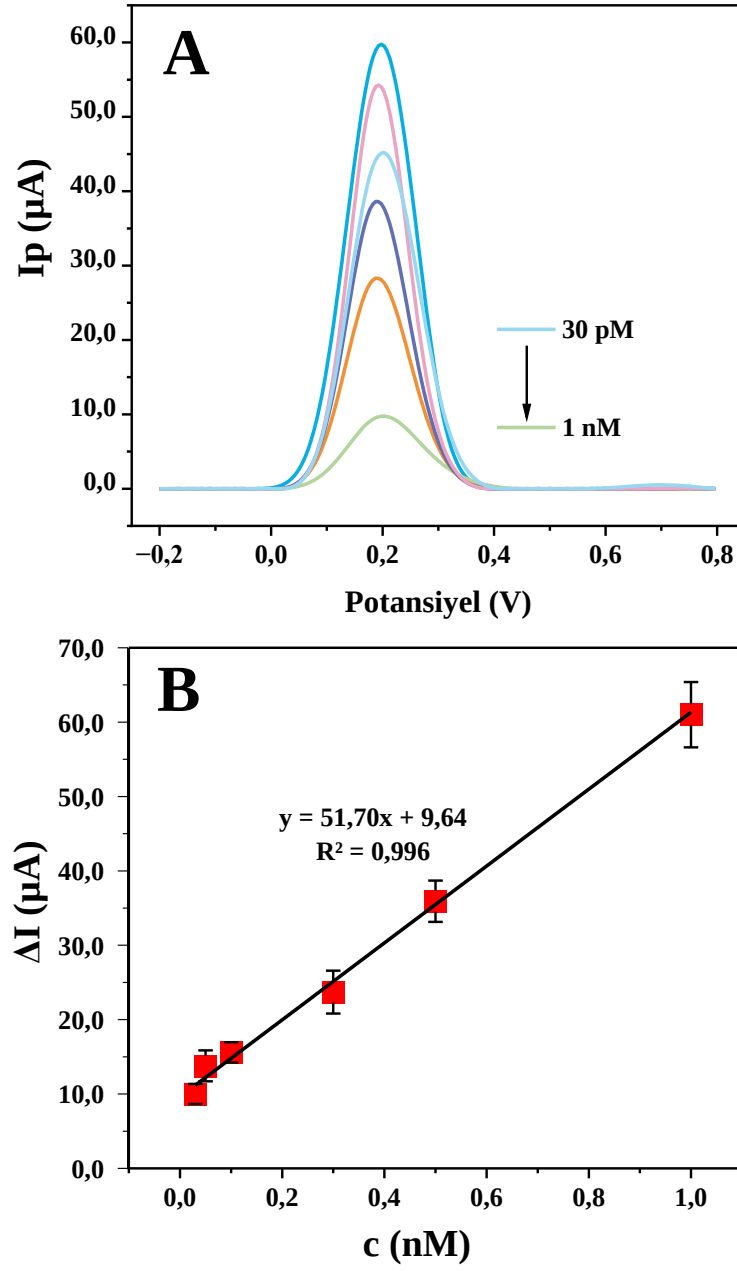
MIP temelli sensörlerde bir diğer önemli parametre, sensörün bağlanma süresi ve genel analitik performansı ile ilgili olduğu için inkübasyon süresinin optimize edilmesidir. Bağlanma süresinin etkisini incelemek için; 1, 3, 5, 7 ve 10 dakika, Pirfenidon inkübe edilerek incelenmiştir. Şekil 3.19'da ΔI_p değerlerinin 3. dakikada arttığını göstermektedir. 3. dakika sonra ΔI_p belirgin bir artış gözlenmemiştir. Bu, 3 dakikalık inkübasyon süresinin Pirfenidon için optimum bağlanma koşulunu sağladığını göstermiştir.



Şekil 3.19. Bağlanma çözeltisinin süresinin optimizasyonu

3.2.3. Pirfenidon'un Elektrokimyasal Olarak Tanınması

Pirfenidon'un analitik eğrisi, MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin analitik performansını değerlendirmek için kullanılmıştır. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin pik akımı, Pirfenidon konsantrasyonunun inkübasyonundan sonra redoks probu ile 0.20 V'ta anodik pik akımı kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 3.20. Pirfenidon tayininde MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörüne ait diferansiyel puls voltamogramları(A) ve kalibrasyon eğrisi(B)

ΔI ve Pirfenidon konsantrasyonları arasında aşağıdaki doğrusal regresyon denklemini sergileyen 30,0 pM–1,0 nM arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur (Şekil 3.20):

$$\Delta I = 51,70 [\text{Pirfenidon}(\text{nM})] + 9,64; (R^2 = 0,996)$$

TS ve TAS sonuçları, doğrusal aralığın en düşük konsantrasyon kalibrasyon denkleminin eğimine (m) ve standart sapmaya dayanmaktadır. TS ve TAS sırasıyla 9,29 pM ve 28,15 pM olarak bulunmuştur (Çizelge 3.6). Pirfenidon'un farklı konsantrasyonlarda bağlanmasıyla MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin DPV'si Şekil 3.20'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörünün Pirfenidon tayini için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

Parametreler	DPV
Doğrusallık Aralığı	30,0 pM–1,0 nM
Eğim ($\mu\text{A nM}^{-1}$)	51,70
Eğimin Standart Hatası	2,69
Kesişim (μA)	9,64
Kesişimin Standart Hatası	0,67
Regresyon Katsayısı (R^2)	0,996
Teshis Sınırı (pM)	9,29
Tayin Alt Sınırı (pM)	28,15
Gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS) *	0,32
Günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) *	0,97

*Tekrar edilebilirlik çalışmaları 5 değer kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.4. Geliştirilen Sensörlerin Seçiciliklerinin İncelenmesi

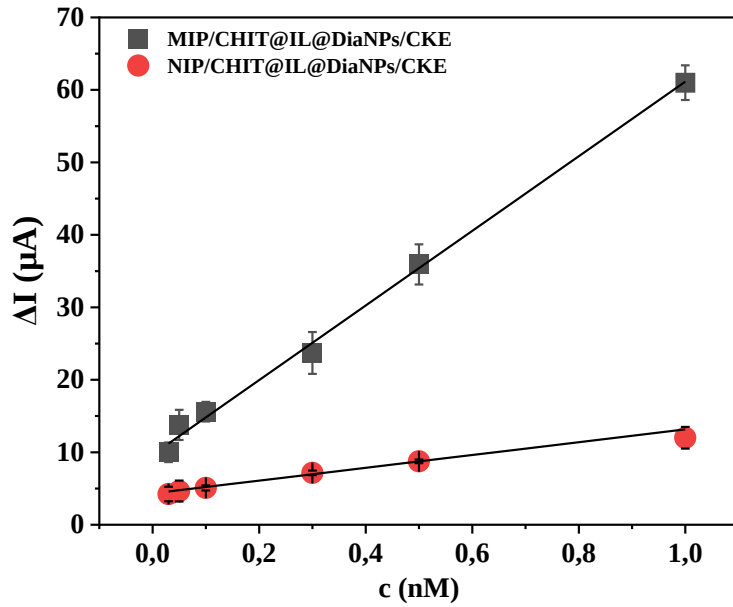
Önerilen sensörün seçiciliği, baskılama faktörü (IF) açısından araştırılmıştır. Aşağıdaki denklem kullanılarak baskılanmış elektrotun (ΔI (MIP)) baskılanmamış (ΔI (NIP)) elektrotun akım cevabına oranı olarak tanımlanır.

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

Burada, $\Delta I = I_0 - I$, burada I_0 ve I , sırasıyla Pirfenidon'un uzaklaştırılması ve bağlanmasından elde edilen elektrotun pik sinyalleridir. Aynı şekilde geliştirilen moleküler baskılanmış elektrokimyasal nanosensörün baskılama faktörü, MIP ve NIP için oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin oranı olarak da hesaplanabilir (Cieplak ve ark., 2020; Ndunda, 2020). NIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin Pirfenidon konsantrasyonuna karşı ΔI oluşturulan kalibrasyon eğrisi;

$$\Delta I = 8,94 \text{ (nM)} + 4,35; (R^2 = 0,987)$$

şeklinde. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE elektrokimyasal sensörü için elde edilen baskılama faktörleri Pirfenidon 5,81 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE'nin Pirfenidon'a seçici olarak bağlanabileceğini ispatlamıştır.



Şekil 3.21. Pirfenidon'un belirli konsantrasyonlarının (30,0 pM –1,0 nM) bağlanmasıyla MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE ve NIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE sensörleri arasındaki doğrusal ilişki.

Geliştirilen MIP sensörünün karşılaştırılması için NIP sensörü kullanılmıştır. Şekil 3.21'de Pirfenidon moleküllerinin baskılanmamış sensöre bağlanmamasının yorumlayabileceği, farklı Pirfenidon konsantrasyonları bağlandığında ΔI değerlerinin neredeyse değişmeden kaldığını gösterir.

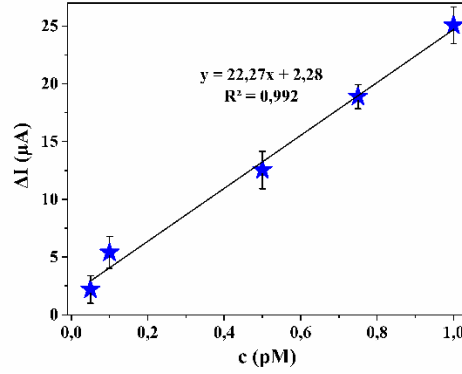
3.2.5. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE Uygulamaları

Önerilen MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörünün analitik performansları, pratik olarak farmasötik tablet dozaj formu ve ticari serum numunesine optimum koşullar altında gösterilmiştir. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörü ile tablet formundan ve insan serum örneğinden Pirfenidon tayini I_p ve Pirfenidon konsantrasyonu arasındaki ilişki

incelenmiştir. Doğrusallık, TS (Çizelge 3.7) ve nicel Pirfenidon geri kazanımları (Çizelge 3.8) ile araştırılmıştır. Şekil 3.22, MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörünün, insan serum numunelerinde standart ekleme yöntemi kullanılarak Pirfenidon konsantrasyonunun bağlanmasıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. ΔI ve Pirfenidon konsantrasyonları arasında aşağıdaki doğrusal regresyon denklemini sergileyen 50,0 pM–1,0 nM arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur:

$$\Delta I = 22,27 [\text{Pirfenidon}(\text{nM})] + 2,28; (R^2 = 0,992) \text{ (Şekil 3.22)}$$

Serum örneğinde, TS ve TAS sırasıyla 14,35 pM ve 43,5 pM olarak bulunmuştur.



Şekil 3.22. Pirfenidon tayini için MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörüne ait insan serum örneklerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Çizelge 3.7. Pirfenidon'un insan serum örneği kalibrasyon eğrisine ait analiz sonuçları ve validasyon parametreleri.

Parametreler	DPV
Doğrusallık Aralığı	50,0 pM–1,0 nM
Eğim ($\mu A \text{ nM}^{-1}$)	22,27
Eğimin Standart Hatası	1,16
Kesişim (μA)	2,28
Kesişimin Standart Hatası	0,75
Regresyon Katsayısı (R^2)	0,992
Teşhis Sınırı (pM)	14,35
Tayin Alt Sınırı (pM)	43,50
Gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS) *	0,61
Günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) *	1,37

*Tekrar edilebilirlik çalışmaları 5 değer kullanılarak elde edilmiştir.

Çizelge 3.8. MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörüne ait Pirfenidon içeren Pirfect® tabletlerden ve insan serum örneğinden elde edilen analiz sonuçları.

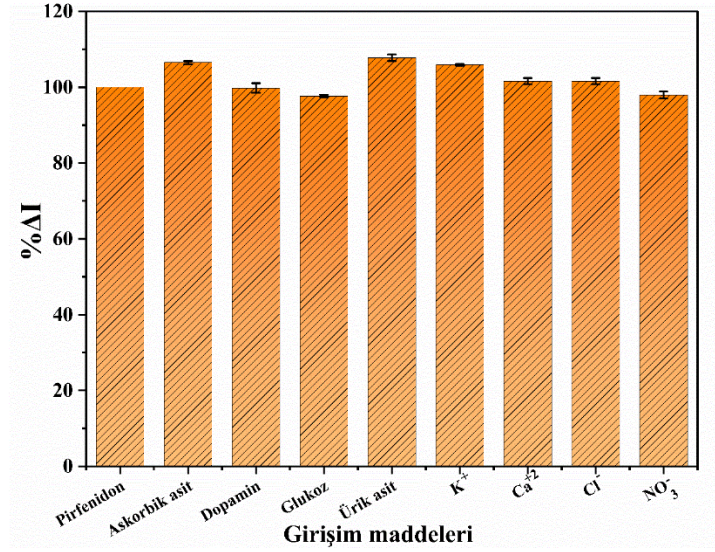
Parametreler	Asetat tamponu (pH 5,2)	İnsan serumu
Etiket miktarı (mg)	200,00	–
Bulunan madde miktarı (mg)*	201,91	–
%Ortalama geri kazanım	100,96	–
%BSS	0,98	–
İlave edilen standart madde miktarı (pM)	500,00	500,00
Bulunan madde miktarı (pM)*	478,72	516,67
%Ortalama geri kazanım*	95,74	103,3
%BSS	0,44	1,05

*Tekrar edilebilirlik çalışmaları 5 değer kullanılarak elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik, beş tekrarlı ölçüm için bir MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörü test edilerek değerlendirilmiştir. 500 pM Pirfenidon beş ölçümü için BSS değeri %0,98’dir.

3.2.6. Girişim Çalışmaları

MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörü, dopamin, askorbik asit ve ürik asit gibi endojen maddelerle ve Na^+ , Ca^{+2} , Cl^- , NO_3^- , gibi iyonlarla girişim özellikleri incelenmiştir (Şekil 3.23). $I=I_m/I_0$ ve BSS (%) değerleri, girişim etkisi gösteren bileşenlerin Pirfenidon ile 1:10 oranında karıştırılmasıyla hesaplanmıştır. Önerilen MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörü, girişim maddelerinin varlığında neredeyse aynı şekilde uygulanmıştır. Ürik asit varlığında Pirfenidon’un ΔI %107,75 $\pm$ 0,85 bulunmuştur. Diğer girişim maddeleriyle %97,95 $\pm$ 0,90 – %105,94 $\pm$ 0,22 oranda girişim yaptığı bulunmuştur.



Şekil 3.23. Girişim maddelerinin MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörü ile cevabının Pirfenidon pik akımına % olarak etkisi

3.2.7. Stabilite Çalışmaları

MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörünün stabilitesi 10 günlük bir zaman diliminde belirli günlerde ölçüm alınarak belirlenmiştir. Hazırlanan nanosensör ortam koşullarından etkilenmesini en aza indirmek için 25°C’de oda koşullarında desikatör içerisinde bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörü 7. günde %92,3 kadar, 10. günde %87,2 stabilite göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez kapsamında idiyopatik pulmoner fibrozis tedavisinde kullanılan Pirfenidon etkin maddesinin ilk defa elektrokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Giriş bölümünde nadir hastalıklardan, yetim ilaçlardan ve öneminden ve idiyopatik pulmoner fibrozis hastalığından bahsedilmiştir. Tez kapsamında kullanılan ilaç etkin maddesi pirfenidon hakkında bilgiler verilmiştir. Voltametri ve moleküler baskılama yönteminin kullanılmasından dolayı, elektrokimyasal yöntemler, voltametri, moleküler baskılama teknolojisi ve analitik validasyon ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Gereç ve yöntem kısmında tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve ekipmanlardan bahsedilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanılan voltametrik yöntemler anlatılmıştır. Moleküler baskılama temelli elektrokimyasal sensörün hazırlanışı ayrıntılı bir şekilde anlatılmış ve sonuçlar bulgular bölümünde verilmiştir.

Pirfenidon'un elektrokimyasal davranışı öncelikle yalın CKE ile incelenmiştir. pH 2–12 aralığındaki tamponlar ve destek elektrolitleri ile DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak Pirfenidon'un davranışı incelenmiştir. pH 2 – 12 aralığındaki pH değerlerinde DV'de Pirfenidon için indirgenme yönünde pik gözlenmemiştir. DV yöntemi ile Pirfenidon'un tayini için elektrodun redoks özelliklerini, kararlılığını ve etkin yüzey alanını anlamak ve karakterize etmek için kullanılmıştır.

MIP'ler uygun maliyetli, oldukça seçici ve sağlam afiniteli ligandlardır ve bu da onları teşhis açısından aşırı pH ve sıcaklık gibi zorlu ortamlarda ilaçların tespiti ve miktar tayini için mükemmel adaylar yapar. İlaçların tayini için elektrokimyasal MIP'ler ilgi çekmektedir, çünkü bu yöntemler taşınabilir cihazlara entegrasyon için en yüksek vaadi vaat ediyor. Çeşitli hedefler için elektrokimyasal MIP tabanlı sensörlerle ilgili yayınların sayısında artış olmasına rağmen, gelecekteki ticari uygulamalar için geliştirilmeleri gerekmektedir. Sentez protokollerinin basit ve seri üretimle uyumlu tutulması gerekmesine rağmen, nanomalzemelerin MIP tabanlı sensörlerin analitik performansını önemli ölçüde iyileştirdiği açıktır. MIP tabanlı sensörlerin elektrokimyasal algılama kullanan uygulamalarının, yüksek özgüllüğü, doğal basitliği ve düşük maliyetli bileşenleri nedeniyle ticari uygulamalar için en

umut verici olduğu gör÷lmektedir. Bu platformlar, sınırlı kaynaklara sahip alanlarda veya yüksek miktarda numunenin gerekli olduğu saha içi testler için özellikle uygundur. Önümüzdeki yıllarda, nanoteknolojideki yenilikler ve MIP'lerin serigrafi teknolojisi gibi seri üretim sensörlere entegrasyonu, MIP tabanlı sensörlerin ticari uygulamalarının önünü açacaktır. Böylece Pirfenidon tayininde doğru ve hassas ölçümler yapılarak doz ayarlaması sağlanabilir.

Pirfenidon'un daha hassas tayini için nanopartiküllerle modifiye edilmiş moleküler baskılanmış elektrot geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple kitosan, iyonik sıvı ve elmas nanopartikülleri ile elektrot yüzeyi modifiye edilerek yüzey alanı artırılmıştır. Pirfenidon tayini için ilk MIP temelli bir elektrokimyasal sensör, CKE üzerinde CHIT@IL@DiaNPs modifikasyon çözeltisi kullanılarak kurutma makinesi altında 10 dakika kurutulmuştur. 5 mM o-PD monomeri ve 0,025 mM Pirfenidon içeren polimerizasyon çözeltisi ile elektropolimerizasyon yöntemiyle yüzeyde oluşturulmuştur.

MIP ile geliştirilen nanosensör yüzeyinin karakterizasyon çalışmaları, EIS ve DV elektrokimyasal yöntemleri ve SEM yüzey karakterizasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen sensörün doğrusal çalışma aralığı 30,0 pM– 1,0 nM ve TS değeri 9,29 pM olarak DPV yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Aynı koşullar altında kontrol amaçlı, hedef molekül Pirfenidon'u içermeyen NIP polimer yüzeyi de üretilmiş ve baskılama faktörü hesaplanmıştır. Geliştirilen MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörü, 5,81 baskılama faktörü ile Pirfenidon'a karşı mükemmel bir seçiciliğe sahiptir.

MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörünün, insan serum numunelerinde standart ekleme yöntemi kullanılarak Pirfenidon konsantrasyonun bağlanmasıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. ΔI ve Pirfenidon konsantrasyonları arasında aşağıdaki doğrusal regresyon denklemini sergileyen 50,0 pM–1,0 nM arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur, TS ve TAS sırasıyla 14,35 pM ve 43,5 pM olarak bulunmuştur.

Önerilen sensör, tabletlerde ve ticari serum numunelerinde iyi bir geri kazanım yüzdesi ile Pirfenidon'u belirlemek için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Yapılan stabilite çalışması sonucunda geliştirilen sensörün stabilitesi 7. günde pik akımının %92,3'sı elde edilmiştir.

Sonuç olarak yüksek lisans tez çalışmaları kapsamında, Pirfenidon'un elektrokimyasal davranışı aydınlatılmaya çalışılmış ve Pirfenidon tayini için geliştirilen moleküler baskılanmış elektrokimyasal nanosensörün, ekonomik, basit numune hazırlama prosedürüne sahip, çok düşük Pirfenidon konsantrasyonlarına duyarlı, seçici ve stabil gibi üstün özellikleri sayesinde Pirfenidon'un tayini için klinik çalışmalar için oldukça avantajlı analiz yöntemleri olarak değerlendirilebileceği ön görülmektedir.

4. TARTIŞMA

Yüksek lisans tez çalışmaları kapsamında nadir hastalıklardan biri olan idiyopatik pulmoner fibrozis tedavisinde kullanılan Pirfenidon etkin maddesinin tayini için yalın CKE ile elektrokimyasal davranışı incelenmiş ve moleküler baskılama temelli elektrokimyasal nanosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerin etkinliği ve doğruluğu birtakım elektrokimyasal, spektroskopik ve mikroskobik yöntemler kullanılarak test edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Pirfenidon ilaç etkin maddesinin farmasötik dozaj formu olan Pirfect® tabletten ve serum numunesinden analizleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Giriş bölümünde nadir hastalıklardan, yetim ilaçlardan ve öneminden ve idiyopatik pulmoner fibrozis hastalığından bahsedilmiştir. Tez kapsamında kullanılan ilaç etkin maddesi pirfenidon hakkında bilgiler verilmiştir. Voltametri ve moleküler baskılama yönteminin kullanılmasından dolayı, elektrokimyasal yöntemler, voltametri, moleküler baskılama teknolojisi ve analitik validasyon ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

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

Yalın CKE ile 0,1 M H₂SO₄ destek elektroliti içerisinde DPV yöntemi ile 9,9–260 µM, KDV yöntemi ile 20–260 µM konsantrasyon aralığında doğrusallık görülmüştür. TS ve TAS değerleri DPV için sırasıyla 2,48 µM ve 8,26 µM; KDV için sırasıyla 4,75 µM ve 15,84 µM bulunmuştur. Yalın CKE ile serum örneğinde 0,1 M H₂SO₄ içerisinde DPV yöntemi ile 30–200 µM, KDV yöntemi ile 48–200 µM konsantrasyon aralıklarında doğrusallık gözlenmiştir. Serum örneğinde, TS ve TAS değerleri DPV için sırasıyla 8,53 µM ve 28,44 µM; KDV için sırasıyla 12,60 µM ve 42 µM bulunmuştur.

Pirfenidon içeren Pirfect® tabletlerdeki yardımcı maddelerin, Pirfenidon tayinine yönelik geliştirilen elektrokimyasal yöntemi etkileyip etkilemediğini belirlemek için, saf Pirfenidon için kullanılan yöntemler tabletlere de uygulanmıştır. Geri kazanım çalışmasının %99,65 ile %100,55 arasında olması geliştirilen yöntemin oldukça seçici olduğunu ve tablet yardımcı maddelerinden etkilenmediğini göstermiştir. Geliştirilen yöntem için geri kazanım deneylerinin sonuçları kesin, tekrarlanabilir, seçici, duyarlı bir nanosensör geliştirildiğini kanıtlamıştır.

Tez çalışmalarının ikinci kısmında analiz edilen pirfenidon ilaç etkin maddesi için, moleküler baskılama temelli nanosensörler hazırlandıktan sonra akım cevabındaki değişimler DV ve DPV teknikleri kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Bütün elektrokimyasal ölçümler, 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 100 mM KCl içeren bir solüsyonda DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Pirfenidon analizi için ilk kez MIP temelli elektrokimyasal sensörü geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Asetat tamponu (0,1 M, pH 5,2) içerisinde 5 mM o-PD çözeltisi ve 0,025 mM Pirfenidon çözeltisi ile elektropolimerizasyon yöntemi ile -0,2 ve 0,8 V DV ile arasında 50 mV/s'lik bir tarama hızında 20 döngü sayısı ile polimerik yüzey oluşturulmuştur. Moleküler baskılama filmin optimizasyonu için monomer/hedef molekül oranının etkisi araştırılmış ve 1:1 oranı optimum olarak bulunmuştur. Hem polimer film kalınlığını hem de geliştirilmiş baskılı sensörün seçicilik, kararlılık ve hassasiyet gibi özelliklerine çok büyük etkisi olan DV döngü sayısı ve tarama hızı etkisi araştırılmıştır. 20 döngü sayısı elektropolimerizasyon için en uygun döngü sayısı olarak bulunmuştur.

En önemli parametrelerden biri hedef molekülün polimerik film yüzeyinden uzaklaştırma işlemidir. Polimerik film yüzeyine zarar vermeden yeterli uzaklaştırma işleminin gerçekleştirilebilmesi için uzaklaştırma çözeltisi ve uzaklaştırma için seçilen süre optimize edilmiştir. Metanol, diğer solüsyonlara kıyasla Pirfenidon'un etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağladığı için Uzaklaştırma çözeltisi olarak kullanılmıştır. Uzaklaştırma işlemi sonrasında elde edilen akım ile elektropolimerizasyon sonrası elde edilen akım arasındaki cevapta meydana gelen fark yüzeyde oluşan boşlukların varlığını doğrulamaktadır. Daha sonra, geliştirilen sensörün etanolde uzaklaştırma süresi optimize

edilmiştir. 15. dakikadan sonra akım cevabı azalmıştır ve 15 dakika optimum süre olarak seçilmiştir. Seçilen uzaklaştırma çözeltisi ve süresinin polimerik filme zarar verip vermediği Pirfenidon'un yeniden bağlanması ile kontrol edilerek doğrulanmıştır.

Geliştirilen sensörün analitik performansına etkisi çok önemli olduğu için bağlanma süresi optimize edilmiştir. Bağlanma süresinin kontrolü için farklı bağlanma sürelerinde bağlanma sonrası ve uzaklaştırma sonrası akım cevabı arasındaki fark ile kontrol edilmiştir. Bağlanmanın 3 dakikaya kadar arttığı ve 3 dakikadan sonra bağlanmanın azaldığı gözlenmiştir. 3 dakika optimum bağlanma süresi olarak seçilmiştir.

Analitik yöntemlerde en önemli validasyon parametrelerden biri olan sensörün seçiciliği, baskılanmamış polimer elektrot üretilerek yapılmıştır. Baskılama faktörü Pirfenidon için 5,81 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar geliştirilen sensörün Pirfenidon'a karşı yeterince seçici olduğunu doğrulamaktadır. Sensörün seçiciliğini incelemek amacıyla Pirfenidon 10 katı fazla konsantrasyonda dopamin, askorbik asit, ürik asit, glukoz, Na^+ , Ca^{+2} , Cl^- ve NO_3^- varlığında analiz edilmiş ve sinyaldeki değişim belirlenmiştir. Sonuçlar, sensörün Pirfenidon'un girişim yapması muhtemel maddelerin varlığında seçici bir şekilde tayin edebildiğini göstermektedir.

Geliştirilen elektrokimyasal nanosensörün farklı konsantrasyonlarda bağlanması ile Pirfenidon miktar tayini yapılmıştır. 30,0 pM– 1,0 nM konsantrasyon aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir. TS ve TAS sırasıyla 9,29 pM ve 28,15 pM olarak bulunmuştur. Geliştirilen sensörlerin gerçek örneklerle uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, Pirfenidon içeren Pirfect® tabletinden tayini yapılmıştır. Ticari serum numunelerine ekleme yöntemi ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

MIP/CHIT@IL@DiaNPs/CKE nanosensörünün, insan serum numunelerinde standart ekleme yöntemi kullanılarak Pirfenidon konsantrasyonunun bağlanmasıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. ΔI ve Pirfenidon konsantrasyonları arasında aşağıdaki doğrusal regresyon denklemini sergileyen 50,0 pM–1,0 nM arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur, TS ve TAS sırasıyla 14,35 pM ve 43,5 pM olarak bulunmuştur.

Geliştirilen moleküler baskılama temelli nanosensörün Pirfenidon'a karşı tekrarlanabilirliğini araştırmak amacıyla, Pirfenidon aynı nanosensör ile beş defa analiz edilmiş ve tekrarlanabilirliğin ölçütü olarak pik akımlarının % bağıl standart sapması %0,32 olarak hesaplanmıştır. Sensörün tekrar üretilebilirliğini araştırmak amacıyla Pirfenidon, beş farklı nanosensör ile analiz edilmiş ve yeniden üretilebilirliğin ölçütü olarak pik akımlarının % bağıl standart sapması %0,97 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar geliştirilen sensörün Pirfenidon'un elektrokimyasal tayini için tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Geliştirilen sensörün stabilitesi 7 gün boyunca test edilmiş; 7. günde pik akımının %92,3'sı elde edilmiştir.

İlaç etkin maddesi olan Pirfenidon'u elektrokimyasal olarak tayin etmek için, moleküler baskılama tabanlı bir elektrokimyasal nanosensör oluşturulmuş ve karakterize edilmiştir. Geliştirilen nanosensör kullanılarak Pirfenidon için elektrokimyasal analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler hızlı, hassas, tekrarlanabilir, herhangi bir ön işleme ihtiyaç duymayan, ilaç analizlerinde yaygın olarak kullanılır, uygulaması daha kolaydır ve diğer analiz yöntemlerine göre daha ucuzdur. Geliştirilen yöntemler de valide edilmiştir. Bu özellikler göz önüne alındığında, rutin analiz yöntemlerinin, Pirfenidon'u analiz etmek için standart ve klinik yöntemlerin yerine geçebileceğine inanılmaktadır.

ÖZET

Antifibrotik İlaç Pirfenidon'un Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Çalışmalar ve Uygulamaları

Akciğer hastalıkları, yüksek mortaliteye sahip, dünyanın ciddi sağlık sorunlarından biridir. İdiyopatik pulmoner fibrozis, esas olarak yaşlı yetişkinlerde ortaya çıkan ve akciğerlerde görülen, nedeni bilinmeyen, kronik bir hastalık olarak tanımlanır. Pirfenidon (5-metil-1-fenil-2-[1H]-piridon), yan etkileri az olan bir antifibrotik ajandır. Bu tez çalışmasında Pirfenidon'un tayini için ilk defa elektrokimyasal yöntem geliştirilmiştir. Pirfenidon'un elektrokimyasal davranışını incelemek için yalın elektrot ile daha hassas tayini için moleküler baskılanmış nanosensör ile çalışmalar yapılmıştır. Çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot (CKE) kullanılmıştır. Pirfenidon'un elektrokimyasal davranışı için yalın CKE ile dönüşümlü voltametri (DV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve kare dalga voltametrisi (KDV) yöntemleri kullanılmıştır. Pirfenidon'un yükseltgenme davranışı farklı destek elektrolitleri ve tampon çözeltileri ile pH 2,0 – 12,0 arasındaki pH değerlerinde incelenmiştir, 0,1 M H₂SO₄ destek elektrolitinin en uygun ortam olduğu belirlenmiştir. DV yöntemi ile hız taraması çalışmaları maddenin elektrot yüzeyine difüzyon temelli taşınma mekanizmasına sahip olduğunu göstermektedir. Yalın CKE ile 0,1 M H₂SO₄ içerisinde DPV yöntemi ile 9,9 – 260 µM, KDV yöntemi ile 20 – 260 µM konsantrasyon aralıklarında doğrusallık gözlenmiştir. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) değerleri DPV için sırasıyla 2,48 µM ve 8,26 µM; KDV için sırasıyla 4,75 µM ve 15,84 µM bulunmuştur. Bu tez çalışması kapsamında, Pirfenidon'un farmasötik formu ve serum örneğinden tayini için hassas sonuçlar elde etmek amacıyla moleküler baskılanmış elektrokimyasal nanosensör geliştirilmiştir. Kitosan, iyonik sıvı ve elmas nanopartikülleri ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyi üzerine moleküler baskılama teknolojisi kullanılarak yüzeyde Pirfenidon'a özgü boşluklar yaratılmıştır. DV, Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile modifiye edilmiş olan elektrotlar karakterize edilmiştir. Optimum koşullar altında doğrusal çalışma aralığı 30,0 pM – 1,0 nM olarak bulunmuştur. TS ve TAS sırasıyla 9,29 pM ve 28,15 pM olarak bulunmuştur. Geliştirilen yüzeyin seçiciliği, baskılama faktörü incelenmiş ve baskılanmış olan Pirfenidon'a yüksek seçiciliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin gerçek serum örneklerinde başarı ile uygulanabileceği belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin ve nanosensörün uygulanabilirliği farmasötik dozaj şekillerinden ve serum örneğinden geri kazanım ve doğrusallık çalışmaları yapılarak gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: İdiyopatik Pulmoner Fibrozis, Moleküler Baskılanmış Polimer Nanosensör, Voltametri, Pirfenidon.

SUMMARY

Electrochemical Studies and Applications for the Determination of the Antifibrotic Drug Pirfenidone

One of the major health issues in the globe with a high mortality rate is lung illness. Idiopathic pulmonary fibrosis is a chronic lung condition with no recognized origin that mostly affects older people. Pirfenidone (5-methyl-1-phenyl-2-[1H]-pyridone) is a relatively safe antifibrotic medication. In this thesis, first time electrochemical technique for determining pirfenidone was developed. Studies were conducted employing a molecularly imprinted nanosensor for a more sensitive determination with a bare electrode to study the electrochemical behavior of pirfenidone. The working electrode was a glassy carbon electrode (GCE). Simple GCE and the cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), and square wave voltammetry (SWV) methods were employed to study the electrochemical behavior of pirfenidone. It was discovered that 0.1 M H₂SO₄ supporting electrolyte was the best medium after studying the oxidation behavior of pirfenidone with various supporting electrolytes and buffer solutions at pH values between 2.0 and 12.0. The material possesses a diffusion-based transport mechanism to the electrode surface, according to scan rate experiments with the CV technique. In 0.1 M H₂SO₄ with bare GCE, linearity was seen in the concentration ranges of 9.9–260 µM using the DPV method, and 20–260 µM using the SWV method. The limit of detection (LOD) and lower limit of detection (LOQ) values were found to be 2.48 µM and 8.26 µM, 4.75 µM and 15.84 µM, respectively; for DPV and SWV. In the context of this thesis, a molecularly imprinted electrochemical nanosensor has been created in order to get accurate results while determining the presence of pirfenidone in serum samples and pharmaceutical forms. Pirfenidone-specific cavities were made on the electrode surface utilizing molecular imprinting technology on the electrode surface modified with chitosan, ionic liquid, and diamond nanoparticles. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and scanning electron microscopy (SEM) were used to assess the modified electrodes. Under optimum parameters, it was found that the linear range was 30.0 pM–1.0 nM. It was calculated that LOD and LOQ were, respectively, 9.29 pM and 28.15 pM for DPV technique. The fabricated electrode surface's selectivity and imprinting factor were investigated, and it was found to have a high selectivity to the imprinted pirfenidone. The method that has been developed has been discovered to perform well with real serum samples. By undergoing recovery and linearity investigations using pharmaceutical dosage forms and serum samples, it has been shown that the developed technology and nanosensor are feasible.

Keywords: Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Molecularly Imprinted Polymer, Nanosensor, Pirfenidone, Voltammetry.

KAYNAKLAR

- ADUMİTRĂCHIOAIE A, TERTIŞ 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.
- AGENCY EM. (2015). *Pirfenidone for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis* (C. 44). https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/04/241-public-summary-positive-opinion-orphan-designation-pirfenidone-treatment-idiopathic-pulmonary_en.pdf adresinden erişildi.
- ALVAREZ-LORENZO C, CONCEIRO A. (2013). Molecular Imprinting: A Historical Perspective. C. Alvarez-Lorenzo ve A. Concheiro (Ed.), *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers* içinde (ss. 1–22). United Kingdom: A Smithers Group Company.
- ANTUNA-JIMENEZ D, DÍAZ-DÍAZ G, BLANCO-LOPEZ MC, LOBO-CASTANON MJ, MÍRANDA-ORDÍEREZ AJ, TUNON-BLANCO P. (2012). Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors: Past, Present and Future. S. Li, Y. Ge, S. A. Piletsky ve J. Lunec (Ed.), *Molecularly Imprinted Sensors: Overview and Applications* içinde (ss. 1–34). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- BANDO M. (2016). Pirfenidone: Clinical trials and clinical practice in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Investigation*, **54**(5), 298–304.
- BAREK J, FOGG AG, MUCK A, ZİMA J. (2001). Polarography and Voltammetry at Mercury Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **31**(4), 291–309.
- BERGOT E. (2022). Ethnographic survey of patients and caregiver’s life journey in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine and Research*, 100955.
- BOZAL-PALABIYİK B, ERKMEN C, USLU B. (2020). Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors: Analytical and Pharmaceutical Applications Based on Ortho-Phenylenediamine Polymerization. *Current Pharmaceutical Analysis*, **16**(4), 350–366.
- CANFAROTTA F, CECCHINI A, PİLETISKY S. (2018). Nano-sized Molecularly Imprinted Polymers as Artificial Antibodies. W. Kutner ve P. S. Sharma (Ed.), *Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications* içinde (ss. 1–27). United Kingdom: The Royal Society of Chemistry.
- CHEN L., WANG X, LU W, WU X, LI J. (2016). Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*, **45**(8), 2137–2211.
- CHEN LİNGXİN, WANG X, LU W, WU X, LI J. (2016). Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*, **45**(8), 2137–2211.

- CHEUNG RY, COHEN JC, ILLINGWORTH P. (2004). Orphan drug policies: implications for the United States, Canada, and developing countries. *Health LJ*, **12**, 183.
- CIEPLAK M, WĘGŁOWSKI R, ISKIERKO Z, WĘGŁOWSKA D, SHARMA PS, NOWORYTA KR, ... KUTNER W. (2020, Ağustos). Protein Determination with Molecularly Imprinted Polymer Recognition Combined with Birefringence Liquid Crystal Detection. *Sensors (Basel, Switzerland)*. Switzerland.
- DMİTRİENKO SG, APYARI VV. (2018). Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis, Properties, and Application in Analysis of Real Samples. S. N. Shtykov (Ed.), *Nano-Analytics: Nanoobjects and Nanotechnologies in Analytical Chemistry* içinde (ss. 303–341). Berlin: De Gruyter.
- DÜNDAR M, KARABULUT SY. (2010). Türkiye’de nadir hastalıklar ve yetim ilaçlar; medikal ve sosyal problemler. *Erciyes Tıp Dergisi*, **32**(3), 195–200.
- ELGRİSHİ N, ROUNTREE KJ, MCCARTHY BD, ROUNTREE ES, EISENHART TT, DEMPSEY JL. (2018). A Practical Beginner’s Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, **95**(2), 197–206.
- FAROOQ S, NİE J, CHENG Y, YAN Z, Lİ J, ASİM S, ... ZHANG H. (2018). Molecularly imprinted polymers’ application in pesticide residue detection. *Analyst*, **143**, 3971–3989.
- FOORD JS, HU J, HOLT KB. (2007). Diamond ultramicroelectrodes. *physica status solidi (a)*, **204**(9), 2940–2944.
- FOURNIER D, BOUZİLL G, POLARD E, SCAİLTEUX L. (2022). Pulmonary Pharmacology & Therapeutics Real-world safety profiles of pirfenidone and nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis patients, **76**(July).
- FUJİSHİMA A, EİNAGA Y, RAO TN, TRYK DA. (2005). *Diamond electrochemistry*. Elsevier.
- GEORGE PM, WELLS AU. (2017). Pirfenidone for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, **10**(5), 483–491.
- GLASS DS, GROSSFELD D, RENNA HA, AGARWALA P, SPIEGLER P, KASSELMAN LJ, ... REİSS AB. (2020). Idiopathic pulmonary fibrosis: Molecular mechanisms and potential treatment approaches. *Respiratory Investigation*, **58**(5), 320–335.
- GOSSE DK. (1993). *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms* (C. 43). VCH New York.
- GRİGGS RC, BATSHAW M, DUNKLE M, GOPAL-SRIVASTAVA R, KAYE E, KRİSCHER J, ... MERKEL PA. (2009). Clinical research for rare disease: Opportunities, challenges, and solutions. *Molecular Genetics and Metabolism*, **96**(1), 20–26.
- GUİ R, JİN H, GUO H, WANG Z. (2018). Recent advances and future prospects in molecularly imprinted polymers-based electrochemical biosensors. *Biosensors*

and *Bioelectronics*, **100**, 56–70.

GUMUSTAS M, KURBANOGU S, USLU B, OZKAN SA. (2013). UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, **76**(21), 1365–1427.

GUPTA VK, JAIN R, RADHAPYARI K, JADON N, AGARWAL S. (2011). Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—a review. *Analytical biochemistry*, **408**(2), 179.

GUY RC. (2014). International Conference on Harmonisation. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, **2**(June 1995), 1070–1072.

HAFFNER ME, WHITLEY J, MOSES M. (2002). Two decades of orphan product development. *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**(10), 821–825.

HUYNH T-P, LE T-A. (2018). Synthetic Chemistry for Molecular Imprinting. W. Kutner ve P. S. Sharma (Ed.), *Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications* içinde (ss. 28–64). United Kingdom: The Royal Society of Chemistry.

ICH Topic Q 2 (R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. (1995).

IWAKI M, SATO S, TAKAHASHI K, SAKAIRI H. (1983). Electrical conductivity of nitrogen and argon implanted diamond. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, **209–210**, 1129–1133.

JAYAKUMAR R, MENON D, MANZOOR K, NAIR S V, TAMURA H. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*, **82**(2), 227–232.

JOSHI A, KIM K-H. (2020). Recent advances in nanomaterial-based electrochemical detection of antibiotics: Challenges and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, **153**, 112046.

KÖKEN AH, HAYIRLIDAĞ M, BÜKEN NÖ. (2018). Sağlık hakkı bağlamında nadir hastalıklar ve yetim ilaçlar. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Ethics, Law and History-Special Topics*, **4**(1), 91–98.

KOLB M, BONELLA F, WOLLIN L. (2017). Therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine*, **131**, 49–57.

LAVIRON E. (1979). General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **101**(1), 19–28.

LAVIRON E, ROULLIER L, DEGRAND C. (1980). A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: Part II. Theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction. *Journal of*

Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, **112**(1), 11–23.

- LEHTONEN ST, VEIJOLA A, KARVONEN H, LAPPI-BLANCO E, SORMUNEN R, KORPELA S, ... KAARTEENAHÖ R. (2016). Pirfenidone and nintedanib modulate properties of fibroblasts and myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, **17**(1).
- LEÓN-ROMÁN F, VALENZUELA C, MOLINA-MOLINA M. (2022). Idiopathic pulmonary fibrosis, **159**, 189–194.
- LI J, WEI G, ZHANG Y. (2012). Molecularly Imprinted Polymers as Recognition Elements in Sensors. S. Li, Y. Ge, S. A. Piletsky ve J. Lunec (Ed.), *Molecularly Imprinted Sensors: Overview and Applications* içinde (ss. 35–55). Amsterdam, Netherlands: Elsevier B.V.
- LI R, FENG Y, PAN G, LIU L. (2019). Advances in molecularly imprinting technology for bioanalytical applications. *Sensors (Switzerland)*, **19**(1), 177.
- LIU X, DUCKWORTH PA, WONG DKY. (2010). Square wave voltammetry versus electrochemical impedance spectroscopy as a rapid detection technique at electrochemical immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **25**(6), 1467–1473.
- LORENZO RA, CARRO AM, ALVAREZ-LORENZO C, CONCEIRO A. (2011). To remove or not to remove? The challenge of extracting the template to make the cavities available in molecularly imprinted polymers (MIPs). *International Journal of Molecular Sciences*, **12**(7), 4327–4347.
- LU B, XIA J, WANG Z, ZHANG F, YANG M, LI Y, XIA Y. (2015). Molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electrode modified with an imprinted pyrrole film immobilized on a β -cyclodextrin/gold nanoparticles/graphene layer. *RSC Advances*, **5**(101), 82930–82935.
- MADIKIZELA LM, TAVENGWA NT, TUTU H, CHIMUKA L. (2018). Green aspects in molecular imprinting technology: From design to environmental applications. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, **17**, 14–22.
- MARTÍNEZ ALVARADO JI, MEINHARDT JM, LIN S. (2022). Working at the interfaces of data science and synthetic electrochemistry. *Tetrahedron Chem*, **1**, 100012.
- MARTÍNEZ FJ, COLLARD HR, PARDO A, RAGHU G, RICHELDI L, SELMAN M, ... WELLS AU. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature Reviews Disease Primers*, **3**(1), 17074.
- MOCHALIN VN, SHENDEROVA O, HO D, GOGOTSI Y. (2012). The properties and applications of nanodiamonds. *Nature Nanotechnology*, **7**(1), 11–23.
- MOLINA-MOLINA M. (2019). The future of pharmacological treatment in idiopathic pulmonary fibrosis. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, **55**(12), 642–647.

- MORAN-MENDOZA O, COLMAN R, KALLURI M, CABALTEJA C, HARLE I. (2019). A comprehensive and practical approach to the management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, **13**(7), 601–614.
- MORENO BONDI MC, URRACA JL, CARRASCO S, NAVARRO-VILLOSLADA F. (2013). Preparation of Molecularly Imprinted Polymers. C. Alvarez-Lorenzo ve A. Concheiro (Ed.), *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers* içinde (ss. 23–86). United Kingdom: A Smithers Group Company.
- MUZYKA K, PILETSKY S, ROZHITSKII M. (2013). Molecularly Imprinted Polymer-based Voltammetric Sensors. C. Alvarez-Lorenzo ve A. Concheiro (Ed.), *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers* içinde (ss. 197–228). United Kingdom: Smithers Rapra Technology Ltd.
- NDUNDA EN. (2020). Molecularly imprinted polymers—A closer look at the control polymer used in determining the imprinting effect: A mini review. *Journal of Molecular Recognition*, **33**(11).
- NORITOMI Y, KUBOKI T, NORITOMI H. (2022). Promotion of the redox reaction at horseradish peroxidase modified electrode combined with ionic liquids under irreversible electrochemical conditions. *Results in Chemistry*, **4**, 100666.
- OZKAN SA. (2018). Analytical method validation: the importance for pharmaceutical analysis. *Pharm Sci*, **24**(1), 1–2.
- PARMAR VK, DESAI SB, VAJA T. (2014). RP-HPLC and UV Spectrophotometric Methods for Estimation of Pirfenidone in Pharmaceutical Formulations. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, **76**(3), 225–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035534> adresinden erişildi.
- PELSKOV Y V, SAKHAROVA AY, KROTOVA MD, BOULOV LL, SPITSYN B V. (1987). Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, **228**(1–2), 19–27.
- RAGHU G, COLLARD HR, ANSTROM KJ, FLAHERTY KR, FLEMING TR, KING JR. TE, ... BROWN KK. (2012). Idiopathic pulmonary fibrosis: Clinically meaningful primary endpoints in phase 3 clinical trials. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **185**(10), 1044–1048.
- RICHU, SHARMHAL A, KUMAR A, KUMAR A. (2022). Insights into the applications and prospects of ionic liquids towards the chemistry of biomolecules. *Journal of Molecular Liquids*, **368**, 120580.
- SALZILLO T, MARCHETTI A, VEJPRAVOVA J, FANJUL BOLADO P, FONTANESI C. (2022). Molecular electrochemistry. An overview of a cross-field: Electrochemistry/spectroscopic/theoretical integrated approach. *Current Opinion in Electrochemistry*, **35**, 101072.
- SAMBHANI NG, BIJU VMN. (2018). A Micelle-Enhanced Spectrofluorimetric Determination of Pirfenidone: Application to Content Uniformity Testing and

- Human Urine. *Journal of Fluorescence*, **28**(4), 951–957.
- SAYLAN Y, DENİZLİ A. (2019). Molecularly imprinted polymer-based microfluidic systems for point-of-care applications. *Micromachines*, **10**(11), 766.
- SCHELLER FW, ZHANG X, YARMAN A, WOLLENBERGER U, GYURCSÁNYI RE. (2019). Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for biopolymers. *Current Opinion in Electrochemistry*, **14**, 53–59.
- SKOOG DA. (1992). *Principles of instrumental analysis*. Fourth edition. Fort Worth : Saunders College Pub., [1992] ©1992. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999674775302121> adresinden erişildi.
- SOTGIA S, FOIS AG, SOTGIU E, ZINELLU A, PALIOGIANNIS P, MANGONI AA, CARRU C. (2020). Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of pirfenidone and 5-carboxy-pirfenidone by direct injection of plasma from patients receiving treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Microchemical Journal*, **154**, 104536.
- SPAGNOLO P, KROPSKI JA, JONES MG, LEE JS, ROSSI G, KARAMPITSAKOS T, ... RYERSON CJ. (2021). Idiopathic pulmonary fibrosis: disease mechanisms and drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, **222**, 107798.
- STRADIOTTO NR, YAMANAKA H, ZANONI MVB. (2003). Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **14**(2), 159–173.
- SUN W, JIANG Z, ZHOU L, CHEN R, WANG Z, LI W, ... CHEN R. (2015). Determination and pharmacokinetic study of pirfenidone in rat plasma by UPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, **981–982**(3), 14–18.
- SURIYANARAYANAN S, MANDAL S, RAMANUJAM K, NICHOLLS IA. (2017). Electrochemically synthesized molecularly imprinted polythiophene nanostructures as recognition elements for an aspirin-chemosensor. *Sensors & Actuators B: Chemical*, **253**, 428–436.
- SWARTZ ME, KRULL IS. (2018). *Analytical method development and validation*. CRC press.
- TAKEDA Y, TSUJINO K, KIJIMA T, KUMANOGOH A. (2014). Efficacy and safety of pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis. *Patient preference and adherence*, **8**, 361.
- TANIGUCHI H, EBINA M, KONDOH Y, OGURA T, AZUMA A, SUGA M, ... NUKIWA T. (2010). Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, **35**(4), 821 LP – 829.
- THORAT S G, PADMANE SP, TAJNE MR, ITTADWAR AM. (2016). Development and validation of simple, rapid and sensitive UV, HPLC and HPTLC methods for the estimation of pirfenidone in tablet dosage form. *Journal of the Chilean Chemical*

Society, **61**(2), 2978–2981.

- THORAT SONALI G., CHIKHALE R V. (2016). Determination and Pharmacokinetic Study of Pirfenidone in Rat Serum by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, **54**(7), 1115–1119.
- TOKUDA N, JIANG X, ZHUANG H, LARSSON K, ARNAULT J, YU Y, ... FOORD JS. (2015). Novel Aspects of Diamond: From Growth to Applications.
- TONG S, WANG X, JIANG H, XU X, PAN Y, CHEN K, ... HU G. (2010). Determination of Pirfenidone in Rat Plasma by LC–MS-MS and Its Application to a Pharmacokinetic Study. *Chromatographia*, **71**(7–8), 709–713.
- UNAL DN, SADAK S, USLU B. (2021). A Review on Electrochemical and Optical Sensing Platform Based on Ionic Liquids for Different Molecules Determination. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **0**(0), 1–27.
- ÜREK D, KARAMAN S. (2019). ÖNEMLİ BİR HALK SAĞLIĞI SORUNU OLARAK NADİR HASTALIKLAR VE YETİM İLAÇLAR. *Hacettepe Sağlık İdaresi Dergisi*, **22**(4), 863–878.
- WANG Z, HU T, LIANG R, WEI M. (2020). Application of zero-dimensional nanomaterials in biosensing. *Frontiers in Chemistry*, **8**, 320.
- WELLMAN-LABADIE O, ZHOU Y. (2010). The US Orphan Drug Act: Rare disease research stimulator or commercial opportunity? *Health Policy*, **95**(2), 216–228.
- WEN Y-G, LIU X, HE X-L, SHANG D-W, NI X-J, ZHANG M, ... QIU C. (2014). Simultaneous Determination of Pirfenidone and Its Metabolite in Human Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of Analytical Toxicology*, **38**(9), 645–652.
- YANG N, FOORD JS, JIANG X. (2016). Diamond electrochemistry at the nanoscale: A review. *Carbon*, **99**, 90–110.
- YANG Z, LI P, MCDONAGH A, LI S, LV M, LI Y, ... FENG C. (2018). Chitosan-based nano-biocomposites and their applications in medicine and pharmaceuticals. *Current Organic Chemistry*, **22**(7), 628–640.
- YARMAN A, KURBANOGU S, JETZSCHMANN KJ, OZKAN SA, WOLLENBERGER U, SCHELLER FW. (2018). Electrochemical MIP-Sensors for Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, **25**, 4007–4019.
- ZANG JB, WANG YH, ZHAO SZ, BIAN LY, LU J. (2007). Electrochemical properties of nanodiamond powder electrodes. *Diamond and Related Materials*, **16**(1), 16–20.
- ZHOU L, ZHANG X, MA L, GAO J, JIANG Y. (2017). Acetylcholinesterase/chitosan-transition metal carbides nanocomposites-based biosensor for the organophosphate pesticides detection. *Biochemical Engineering Journal*, **128**, 243–249.

ZOSKI CG. (2006). *Handbook of electrochemistry*. Elsevier.

ZUMAN P. (2001). Electrolysis with a Dropping Mercury Electrode: J. Heyrovsky's Contribution to Electrochemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **31**(4), 281–289.