

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SOMATOSTATİN VE BAZI ANALOGLARININ MİKTAR
TAYİNİ İÇİN ELEKTROANALİTİK YÖNTEMLER
GELİŞTİRİLMESİ**

Uzm. Kim. Ece ÖZKAN

Analitik Kimya Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2022

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SOMATOSTATİN VE BAZI ANALOGLARININ MİKTAR
TAYİNİ İÇİN ELEKTROANALİTİK YÖNTEMLER
GELİŞTİRİLMESİ**

Uzm. Kim. Ece ÖZKAN

Analitik Kimya Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Sedef KIR

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Somatostatin ve Bazı Analoglarının Miktar Tayini için Elektroanalitik
Yöntemler Geliştirilmesi
Uzm. Kim. Ece ÖZKAN
Danışman: Prof. Dr. Sedef KIR

Bu tez çalışması 04.07.2022 tarihinde jürimiz tarafından “Analitik Kimya Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Sibel Ayşıl ÖZKAN*
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ*
Başkent Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Prof. Dr. Dilek AK*
Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: *Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU*
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

01 Ağustos 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

04/07/2022

Uzm. Kim. Ece ÖZKAN

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Sedef KIR danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Kim. Ece ÖZKAN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen, akademik hayata başlamamı sağlayan, analitik kimyayı bana sevdiren, her zaman sonsuz desteğini ve anlayışını hissettiğim, çalışmalarımı dikkatle takip edip yol gösteren, kurtarıcım olan, bilgi ve birikimine hayran olduğum danışmanım Sayın Prof. Dr. Sedef KIR'a,

Doktora çalışmalarım boyunca bütün laboratuvar imkanlarını sunan, ekibinde yer veren, pozitif, mutlu ve huzurlu çalışabilmemi sağlayan, beni cesaretlendiren, bakış açımı değiştiren, akademik hayatıma yeni bir yön katan, sonsuz anlayışı ile yol gösteren Sayın Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a,

Her zaman yanımda ve destek olan, üstün bilgi ve deneyimleri ile rehberlik eden, tavsiyeleri ile yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya,

Doktora çalışmalarımın ilerlemesi ve tamamlanması sürecine katkı sağlayan, bilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN'a,

Doktora öğrenimim sırasında sağladığı imkanlar ve desteklerinden dolayı Başkent Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. A. Ahmet BAŞARAN'a,

Doktora sürecimde verdiği sonsuz destek ve anlayışı için Başkent Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ'e,

Doktora çalışmalarım boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım arkadaşlarımdan, pozitif ve keyifle çalışmamı sağlayan kardeşim İrem KAYA'ya; çalışmalarım sırasında yaşadığım her zorluğa çare bulan Ahmet ÇETİNKAYA'ya; yardımlarını esirgemeyen Göksu ÖZÇELİKAY'a ve ihtiyaç duyduğum her an yanıma koşan canım Ayşe KUŞ KALE'ye,

Hayattaki en büyük destekçilerim olan, bana her zaman inanan, varlıklarından güç aldığım canım annem Serda CİHAN ve bir tanem kardeşim Cansu ÖLMEZ'e,

Her zaman yanımda olan, desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen annem Bilen ÖZKAN'a, babam Mustafa Necati ÖZKAN'a ve kardeşim Tanyel ÖZKAN ÇENDEK'e,

Hayattaki en büyük şansım olan eşim Uğurcan ÖZKAN'a; hayat ışıklarım oğlum Can ve kızım Yaz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



ÖZET

Özkan E., Somatostatin ve Bazı Analoglarının Miktar Tayini için Elektroanalitik Yöntemler Geliştirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2022. Terapötik peptitler arasında yer alan büyüme hormonu (BH) inhibitörü somatostatin (SOM), akromegali ve nöroendokrin tümörlerin (NET) tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Metastatik nöroendokrin kanserlerde tümör gelişimini yavaşlatır veya durdurur. Aynı zamanda somatostatin, akromegali BH, insülin, glukagon ve diğer hormonların salınımını engelleyerek hipofiz tümörleri, endokrin pankreas ve karsinoid tümörlerde hormon hipersekresyonunu kontrol etmek için kullanılır. Moleküler baskılı polimerler (MIP), polimerize edici fonksiyonel monomerlerin kalıp moleküllerin varlığında baskılanmasıyla oluşturulur. Kalıp moleküller MIP'lerden çıkarıldığında, MIP'lerde molekülün yapısına özgün boşluklar meydana gelir. Tez çalışmasında BH inhibitörü olan SOM ve onun sentetik analogları olan Oktreotid (OC) ve Lanreotid (LAN)'in analizleri için gözenekli MIP tabanlı elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. N-metakriloil-L-aspartik asit (MAAsp) ve N-metakriloil-L-glutamik asit (MAGA) bir camsı karbon elektrot (CKE) üzerinde fotopolimerizasyon yöntemi kullanılarak sırası ile P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörlerini oluşturmak için fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır. P(ANI)@MIP/CKE sensörü ise anilinin (ANI) fonksiyonel monomer olarak kullanıldığı elektropolimerizasyon yöntemi ile oluşturulmuştur. Daha sonra, MIP sensörlerden daha yüksek verim elde etmek için kalıp molekülü uzaklaştırma çözeltisi ve süresi ile inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin doğrusal sonuç verdiği, kesin, doğru, duyarlı, seçici, tutarlı ve stabil olduğu bulunmuştur. Ayrıca, MIP sensörlerin analitik performansı, baskısız polimer (NIP) ile elektrokimyasal reaksiyonları karşılaştırılarak araştırılmıştır. Sensörlerin farmasötik preparat, ticari insan serumu ve hasta plazma örneklerine uygulanabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Moleküler baskılı polimer, Elektrokimyasal sensör, Somatostatin, Oktreotid, Lanreotid

ABSTRACT

Ozkan E., Development of Electroanalytical Methods for Quantification of Somatostatin and Some Analogs. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry Program, PhD Thesis, Ankara, 2022. The growth hormone (GH) inhibitor somatostatin, which is among the therapeutic peptides, has an important place in the treatment of acromegaly and neuroendocrine tumors (NET). It slows down or stops tumor development in metastatic neuroendocrine cancers. It is also used to control hormone hypersecretion in pituitary tumors, endocrine pancreas and carcinoid tumors by inhibiting the release of somatostatin, acromegaly GH, insulin, glucagon and other hormones. MIPs are formed by imprinting polymerizing functional monomers in the presence of template molecules. When template molecules are removed from MIPs, cavities occur in the structure of the specific molecule in MIPs. In the thesis study, porous MIP-based electrochemical sensors were developed for the analysis of SOM, which is a GH inhibitor, and its synthetic analogues Octreotide (OC) and Lanreotide (LAN). N-methacryloyl-L-aspartic acid (MAA_{sp}) and N-methacryloyl-L-glutamic acid (MAGA) were used as functional monomers to form the P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/GCE, P(HEMA-MAGA)@MIP/GCE sensors, respectively, using the photopolymerization method on a glassy carbon electrode (GCE). The P(ANI)@MIP/GCE sensor was created by electropolymerization method, in which aniline (ANI) was used as a functional monomer. Then, template removal solution and time and incubation time were optimized to obtain higher efficiency from MIP sensors. It has been found that the developed MIP-based sensors give linear results, are precise, accurate, sensitive, selective, rugged and stable. In addition, the analytical performance of MIP sensors was investigated by comparing their electrochemical reactions with non-imprinted polymer (NIP). The applicability of the sensors to pharmaceutical preparation, commercial human serum and patient plasma samples has been demonstrated.

Keywords: Molecular imprinted polymer, Electrochemical sensor, Somatostatin, Octreotide, Lanreotide

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
İÇİNDEKİLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xxi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Büyüme Hormonu	3
2.2. Büyüme Hormonu Engelleyiciler	5
2.2.1. Somatostatin	6
2.2.2. Oktreotid	7
2.2.3. Lanreotid	8
2.3. Seçilen Büyüme Hormonu Engelleyiciler İçin Kaynak Çalışmaları	11
2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi ve MIP'ler	15
2.4.1. MIP'lerin Bileşenleri	18
2.4.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri	24
2.4.3. MIP'lerin Analitik Uygulamaları	26
2.5. Elektrokimya	28
2.5.1. Elektrokimyasal Hücre Çeşitleri	29
2.5.2. Elektrokimyasal Hücrenin Bileşenleri	32
2.5.3. Elektrokimyasal Çift Tabaka	33
2.5.4. Elektrokimyasal Akımlar	34

2.5.5. Elektrokimyasal Kütle Aktarım Yolları	34
2.5.6. Elektrokimyasal Yöntemler	36
2.5.7. Polarografi	37
2.5.8. Voltametrik Yöntemler	39
2.5.9. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (111, 112)	55
2.6. Analitik Yöntem Validasyonu (94, 120-122)	56
3. DENEYSEL KISIM	61
3.1. Kullanılan Cihazlar	61
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	62
3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler	63
3.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	64
3.4.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanması	64
3.4.2. Girişim Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanması	65
3.4.3. Destek Elektrolit Çözeltisinin Hazırlanması	65
3.4.4. Potasyum Ferrisiyanür/Ferrosiyanür Çözeltisinin Hazırlanması	65
3.4.5. Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması ve Analizleri	66
3.4.6. Plazma Örneklerinin Hazırlanması	66
3.4.7. Polimerizasyonda Kullanılan Diğer Çözeltilerin Hazırlanması	67
3.4.8. Etik Kurul İzni	67
3.5. Elektrokimyasal Analiz Yöntemi	68
3.5.1. Fonksiyonel Monomerlerin Sentezi	68
3.5.2. MIP ve NIP Tabanlı Elektrokimyasal Sensörlerin Hazırlanması	69
3.5.3. MIP Tabanlı Elektrokimyasal Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu	71
3.5.4. Uygulanan Voltametrik Çalışma Koşulları	71
3.5.5. MIP Tabanlı Elektrokimyasal Sensörlerin Analitik Performanslarının Değerlendirilmesi	72
3.5.6. Uygulamalar	74
3.5.7. Hasta Plazma Örneklerinin Analizi	75

4. BULGULAR	76
4.1. MIP Tabanlı P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE Sensörü ile SOM'un Elektrokimyasal Analizi	76
4.1.1. P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE Sensörün Karakterizasyonu	76
4.1.2. P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE Sensörün Optimizasyon Koşulları	80
4.1.3. Yöntemin Analitik Performansı	84
4.1.4. Yöntemin Uygulamaları	93
4.2. MIP Tabanlı P(ANI)@MIP/CKE Sensörü ile OC'nin Elektrokimyasal Analizi	94
4.2.1. P(ANI)@MIP/CKE Sensörün Karakterizasyonu	94
4.2.2. P(ANI)@MIP/CKE Sensörün Optimizasyon Koşulları	97
4.2.3. Yöntemin Analitik Performansı	100
4.2.4. Yöntemin Uygulamaları	109
4.3. MIP Tabanlı P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE Sensörü ile LAN'ın Elektrokimyasal Analizi	111
4.3.1. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE Sensörün Karakterizasyonu	111
4.3.2. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE Sensörün Optimizasyon Koşulları	114
4.3.3. Yöntemin Analitik Performansı	117
4.3.4. Yöntemin Uygulamaları	126
5. TARTIŞMA	127
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	138
7. KAYNAKLAR	141
8. EKLER	150
EK 1. Etik Kurul	
EK 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
EK 3. Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
EK 4. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	154

SİMGELER VE KISALTMALAR

¹H-qNMR	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
AA	Askorbik asit
AdSV	Adsorptif sıyırma voltametri
AIBN	N,N-azobisisobütironitril
ANI	Anilin
ASV	Anodik sıyırma voltametrisi
BH	Büyüme hormonu
BH	Bağlı hata
BSS	Bağlı standart sapma
CE	Kapiler elektrokforez
CKE	Camsı karbon elektrot
CSP	Kiral sabit faz
CV	Dönüşümlü voltametri
CZE	Kapiler zone elektroforez
DMSO	Dimetil sülfoksit
DOP	Dopamin
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
EP	Elektropolimerizasyon
FDA	Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Uygulamaları Kurumu
FP	Fotopolimerizasyon
FRP	Serbest radikal polimerizasyonu

FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HAc	Asetik asit
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPLC-MALDI-MS	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süreli kütle spektrometrisi
I	Akım
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı
IF	Baskılama faktörü
IGF-1	Büyüme faktörü 1
IGF-2	Büyüme faktörü 2
KDV	Kare dalga voltametrisi
KSV	Katodik sıyırma voltametrisi
L-Trp	L-triptofan
LAN	Lanreotid
LC-QTOF-MS	Sıvı kromatografisi uçuş zamanlı kütle spektroskopisi
LLOQ	En düşük alt tayin sınırı
LOD	Gözlenebilme sınırı
MA-Bt	Metakriloil amido-benzotriazol
MAAsp	N-metakriloil-L-aspartik asit
MAGA	N-metakriloil-L-glutamik asit
MEPS	Paketlenmiş sorbent
MI-SPE	Moleküler baskılı katı faz ekstraksiyon
MICSP	Moleküler olarak baskılanmış kiral durağan faz
MIP	Moleküler baskılı polimer
MSPD	Matris katı faz dağılımı

NET	Nöroendokrin tümörlerinin
NIP	Baskılanmamış polimer
NPV	Normal puls voltametrisi
o-PD	Orto-fenilendiamin
OC	Oktreotid
PANI	Polianilin
PVA	Polivinil alkol
R²	Korelasyon katsayısı
R_{ct}	Yük transfer direnci
RP-HPLC-MS	Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kütle spektroskopisi
S/G	Sinyal/gürültü
SBSE	Karıştırma çubuğu emici ekstraksiyon
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
SHE	Standart hidrojen elektrot
SLM	Destekli sıvı membranlar
SOM	Somatostatin
SOM-14	Somatostatin-14
SOM-28	Somatostatin-28
SPE	Katı faz ekstraksiyon
SPME	Katı faz mikro ekstraksiyon
SV	Sıyırma voltametrisi
UV	Ultraviyole
ΔI	Pik akımları arasındaki fark

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Somatotropinin molekül yapısı	3
2.2.	Hipotalamusta somatostatin ve BH arasındaki etkileşimler	4
2.3.	Büyüme hormonu etkileri	5
2.4.	Somatostatinin kimyasal formülü	6
2.5.	MIP'lerin oluşum basamakları	16
2.6.	A) MIP ve B) NIP yüzey şekilleri	18
2.7.	MIP'lerin polimerizasyon bileşenleri	19
2.8.	A) Kovalent, B) Kovalent olmayan ve C) Yarı kovalent baskılama yöntemleri	25
2.9.	Elektrokimyasal hücre şeması	32
2.10.	A) Çözelti ile elektrot yüzeyi arasında oluşan elektriksel çift tabaka B) Mesafeye karşı potansiyel grafiği	33
2.11.	Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması	36
2.12.	Örnek bir polarogram gösterimi	38
2.13.	Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre	40
2.14.	Çalışma elektrotları	42
2.15.	Ticari olarak üretilen CKE	43
2.16.	Camsı karbon elektrodun yapısı; A) Grafitleşen amorf, B) Grafitleşmeyen amorf, C) Grafen şeritler ve D) Karbon levha parçaları. La: Düzlem içi mikro kristal uzunluk ve Lc: Düzlemler arası mikro kristal uzunluk	44
2.17.	A) Ag/AgCl elektrodun yapısı, B) Ticari olarak üretilen Ag/AgCl elektrot	46
2.18.	Ticari olarak üretilen platin tel	47
2.19.	A) DTV için potansiyel dalga formu, B) Genel bir DT voltamogramı	47

2.20.	A) CV'de potansiyel dalga formu ve B) Genel bir CV voltamogramı	48
2.21.	CV'de tersinir, yarı tersinir ve tersinmez dönüşümlü voltamogramlar	49
2.22.	Çalışma elektroduna potansiyel pulslar uygulandığında zamana karşı faradayik ve kapasitif akımın değişimi	50
2.23.	A) NPP için potansiyel dalga formu, B) Genel bir NP voltamogramı	50
2.24.	A) DPV için potansiyel dalga formu, B) Genel bir DP voltamogramı	52
2.25.	A) ve B) Kare dalga potansiyel zaman dalga formu, C) Genel bir KDV voltamogramı	54
4.1.	P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamakları için empedans spektrumları	77
4.2.	P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamaklarında elde edilen CV voltamogramları	78
4.3.	A) P(HEMA), B) P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE ve C) P(HEMA-MAA _{sp})@NIP/CKE'nin FTIR spektrumları	79
4.4.	A) P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE ve B) P(HEMA-MAA _{sp})@NIP/CKE için polimerik yapıların SEM görüntüleri	80
4.5.	Monomer:hedef molekül oranı optimizasyonu	81
4.6.	FP çözelti hacmi optimizasyonu	81
4.7.	A) Uzaklaştırma çözeltileri, B) 5 M HAc çözeltisi için uzaklaştırma sürelerinin grafiği	83
4.8.	SOM'un polimerik matristeki boşluklara inkübasyon süresi	84
4.9.	(A) Farklı SOM derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve (B) P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE ve P(HEMA-MAA _{sp})@NIP/CKE'deki ΔI ve SOM derişimleri arasında doğrusal ilişki	85
4.10.	Ticari serum örneklerinde A) Farklı SOM derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE ve	87

	P(HEMA-MAA _{sp})@NIP/CKE'deki ΔI ve SOM derişimleri arasında doğrusal ilişki	
4.11	P(HEMA-MAA _{sp})@MIP/CKE sensörün A) Standart çözelti ve B) Ticari insan serumu ile yapılan çalışmalarında elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri	88
4.12.	SOM ve benzeri moleküller için ΔI değerleri	91
4.13.	P(ANI)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamakları için empedans spektrumları	94
4.14.	P(ANI)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basmaklarında elde edilen CV voltamogramları	95
4.15.	A) P(ANI)@MIP/CKE'nin SEM görüntüleri; B) P(ANI)@MIP/CKE'nin Raman spektrumları; C) Çıplak CKE ve D) P(ANI)@MIP/CKE'nin temas açısı ölçümleri	96
4.16.	10 döngü ile ANI'nin EP işleminin CV voltamogramları	97
4.17.	A) Farklı OC derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(ANI)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(ANI)@MIP/CKE ve P(ANI)@NIP/CKE'deki ΔI ve OC derişimleri arasında doğrusal ilişki	101
4.18.	Ticari serum örneklerinde A) Farklı OC derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(ANI)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(ANI)@MIP/CKE ve P(ANI)@NIP/CKE'deki ΔI ve OC derişimleri arasında doğrusal ilişki	103
4.19.	P(ANI)@MIP/CKE sensörün A) Standart çözelti ve B) Ticari insan serumu ile yapılan çalışmalarında elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri	104
4.20.	OC ve benzeri moleküller için ΔI değerleri	107
4.21.	Hasta ve kontrol plazma örneklerine ait DP voltamogramları	110
4.22.	P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamakları için empedans spektrumları	111
4.23.	P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basmaklarında elde edilen CV voltamogramları	112
4.24.	HEMA, NIP ve MIP polimerik yapılara ait FTIR spektrumları	113

4.25.	Polimerik yapıların SEM görüntüleri: A) HEMA; B) NIP ve C) MIP	114
4.26.	A) Farklı LAN derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@NIP/CKE'deki ΔI ve LAN derişimleri arasında doğrusal ilişki	118
4.27.	Ticari serum örneklerinde A) Farklı LAN derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@NIP/CKE'deki ΔI ve LAN derişimleri arasında doğrusal ilişki	120
4.28.	P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün A) Standart çözelti ve B) Ticari insan serumu ile yapılan çalışmalarda elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri	121
4.29.	LAN ve benzeri moleküller için ΔI değerleri	124

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Endojen, sentetik ve peptit olmayan SOM agonistlerinin bağlanma afiniteleri	7
2.2.	Büyüme hormonu engelleyicilere ilişkin moleküler özellikler	9
2.3.	Seçilen büyüme hormonu engelleyicilerin analiz yöntemlerini içeren kaynaklar	12
2.4.	MIP’lerde kullanılan fonksiyonel monomerler	21
2.5.	MIP’lerde kullanılan çapraz bağlayıcılar	22
2.6.	Elektrokimyasal hücre çeşitleri	31
4.1.	P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörün kalibrasyon doğrularının özellikleri	88
4.2.	P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörün doğrusallık kontrol grafiklerine ilişkin özellikler	89
4.3.	Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörü kullanılan yöntemin analitik performans parametreleri	90
4.4.	SOM, OC ve LAN için IF değerleri	91
4.5.	SOM için tutarlılık çalışması sonuçları (n = 6)	92
4.6.	Girişim yapan bileşenlerin varlığında SOM tayin sonuçları (n=3)	92
4.7.	Somatosan® ampul analiz sonuçları (n=3)	93
4.8.	SOM eklenmiş ticari insan serum örneklerinin analiz sonuçları (n=3)	93
4.9.	P(ANI)@MIP/CKE sensörünün optimizasyon parametreleri	99
4.10.	P(ANI)@MIP/CKE sensörün kalibrasyon doğrularının özellikleri	104
4.11.	P(ANI)@MIP/CKE sensörün doğrusallık kontrol grafiklerine ilişkin özellikler	105
4.12.	Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(ANI)@MIP/CKE sensörü kullanılan yöntemin analitik performans parametreleri	106

4.13.	OC, SOM ve LAN için IF değerleri	107
4.14.	OC için tutarlılık çalışması sonuçları (n = 6)	108
4.15.	Girişim yapan bileşenlerin varlığında OC tayin sonuçları	108
4.16.	Sandostatin® ampul analiz sonuçları (n=3)	109
4.17.	OC eklenmiş ticari insan serum örneklerinin analiz sonuçları (n=3)	109
4.18.	Hasta ve kontrol plazma örneklerinin analiz sonuçları (n=3)	110
4.19.	P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörünün optimizasyon parametreleri	116
4.20.	P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün kalibrasyon doğrularının özellikleri	121
4.21.	P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün doğrusallık kontrol grafiklerine ilişkin özellikler	122
4.22.	Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörü kullanılan yöntemin analitik performans parametreleri	123
4.23.	LAN, SOM ve OC için IF değerleri	124
4.24.	LAN için tutarlılık çalışması sonuçları (n = 6)	125
4.25.	Girişim yapan bileşenlerin varlığında LAN tayin sonuçları (n=3)	125
4.26.	Somatuline Autogel® tek kullanımlık enjektör analiz sonuçları (n=3)	126
4.27.	LAN eklenmiş ticari insan serum örneklerinin analiz sonuçları (n=3)	126

1. GİRİŞ

Çağımızın en önemli hastalıklarından olan kanser, vücuttaki hücrelerin normal özellikleri dışında bir farklılık göstermesi ve kontrolsüz çoğalması ile ortaya çıkar. Kanser, Dünyada ve ülkemizde en yaygın ikinci ölüm nedenidir. SOM ve analogları olan OC ve LAN, SOM reseptörleri pozitif olan hastalarda tümör büyümesini baskılayabilmekte; böylece metastatik nöroendokrin kanser ve karsinoid tümörlerin gelişimini yavaşlatmakta veya durdurmakta; hırıltılı solunum, kızarıklık ve mide bulantısı gibi belirtileri de ortadan kaldırmaktadırlar. Bu amaçla, somatostatin ve analogları klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Ayrıca akromegali ve devlik gibi somatostatin ile ilgili bozuklukların tedavisinde de kullanılmaktadırlar (2).

Kaynaklarda SOM, OC ve LAN elektrokimyasal davranışlarının incelenmediği ve analizleri için elektrokimyasal bir yöntem bulunmadığı saptanmış olup, büyüme hormonu engelleyici bu üç maddenin elektrokimyasal analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Elektrokimyasal analizler, kullanım kolaylığı, hassasiyet, çok yönlülük, küçültmeye olanak sağlama özelliklerinin yanında elektrot yüzeyinin modifikasyonu yapılarak seçicilik ve özgünlüğün artırılabilmesi açısından da tercih edilmektedir (3). Elektrotların modifikasyonunda, elektrotları yüksek iletkenlikli nanomateryallerle birlikte hassas ve seçici MIP'ler ile modifiye etmek en sık kullanılan bir uygulamadır (4).

SOM ve analoglarının insan sağlığı üzerine olumlu etkileri ve tedavide yaygın kullanımı göz önüne alındığında bu maddelerin tayini için hassas, etkili, hızlı ve seçici bir yöntem geliştirilmesinin büyük bir öneme sahip olduğu görülmektedir.

Bu tez kapsamında elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesi; sensörlerin hassasiyet ve seçiciliğinin artırılması için MIP'lerin kullanılması; sensörlerin performansının değerlendirilmesi; geliştirilen sensörler kullanılarak SOM ve

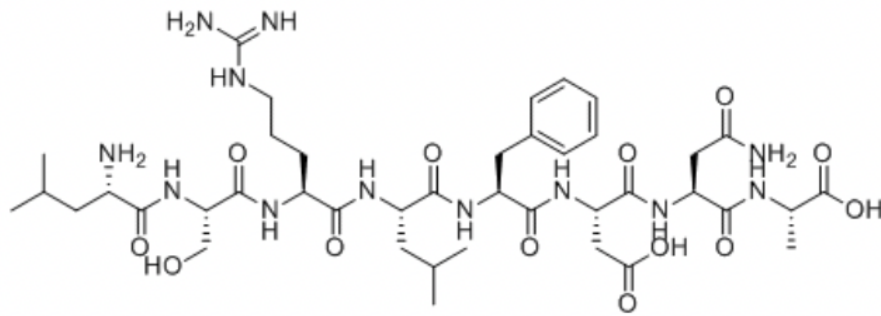
analoglarının elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi; elektrokimyasal yöntemlerin optimizasyon, validasyon çalışmaları ve geliştirilen yöntemler ile farmasötik preparat ve plazmadan SOM, OC ve LAN miktar tayinlerinin yapılması hedeflenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

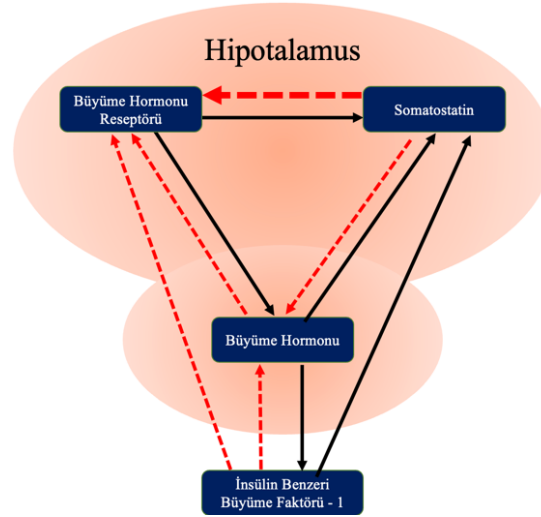
2.1. Büyüme Hormonu

Organizmanın büyümesi, somatotropik veya hipotalamo-hipofizeal-IGF-1 eksenini olarak da adlandırılan bir nöroendokrin sistem tarafından kontrol edilir. Eksenin anahtar bileşeni, hipofizin ön lobunda (adenohipofiz) bulunan asidofilik somatotropik hücreler tarafından üretilen 22 kDa, 191 aminoasit, tek zincirli polipeptid olan BH veya somatotropindir (5) (Şekil 2.1). BH salınımı, insanda 24 saatlik bir döngüde 10-20 tepe sıklığı ile sıçanlar ve insanlar dahil olmak üzere bir dizi türde ritmik bir model gösterir (6).



Şekil 2.1. Somatotropinin molekül yapısı.

BH, hücresel düzeyde metabolizmayı düzenleyen somatomedinler aracılığıyla etkilerini gösterir (Şekil 2.2). Somatomedinler öncelikle karaciğerde hepatositler tarafından üretilir ve vücuttaki hemen hemen her hücrenin büyümesini ve bölünmesini sağlar. Somatomedinlerin üç ana formu; somatomedin A, B ve C'dir. Somatomedin A ve C, insülin ile yapısal benzerlikleri paylaştıklarından, sırasıyla insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2) ve -1 (IGF-1) olarak da adlandırılır. Karaciğer hücreleri, hipotalamik BH salgısına yanıt olarak öncelikle IGF-1 üretir. BH, somatomedinler yoluyla hücre büyümesini uyarmanın yanı sıra, yağ ve karbonhidrat metabolizmasının güçlü bir aracısıdır (7).



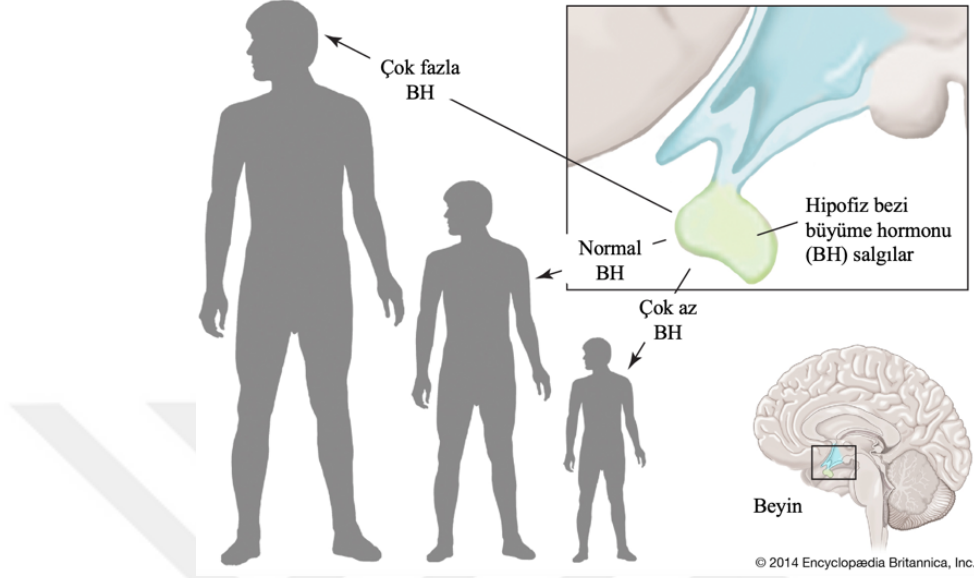
Şekil 2.2. Hipotalamusta somatostatin ve BH arasındaki etkileşimler.

Somatomedinler, geri bildirim mekanizmalarıyla somatotropik eksenı etkiler. IGF-1, uzun döngü geri bildirimi ile inkübe edilmiş bazal hipotalamik dokudan somatostatin salınımını artırır (8). Ayrıca, periventriküler somatostatinerjik nöronları etkileyen insülin benzeri büyüme faktörlerinden zengin bir karışımın intraserebroventriküler uygulaması, sıçanlarda BH salınımını azaltır (9). IGF-1 ayrıca doğrudan somatotroplara da etki eder; IGF-1'in adenohipofize infüzyonu, plazma BH'sini baskılar (10) ve IGF-1, akromegalik hastalarda hipofiz adenom hücrelerinden BH salınımını inhibe eder (11).

Ayrıca, hipotalamik nöronlar da portal dolaşıma somatostatin salgırlar. Somatostatinerjik perikaryanın birincil konumu olan preoptik alanın periventriküler bölgesinin elektriksel uyarımı, sıçanlarda BH plazma düzeylerinin baskılanmasıyla sonuçlanır (12).

BH'ye bağlı büyüme, doğum sonrası aşamalı olarak gelişirken, fetal ve erken doğum sonrası büyüme BH'den bağımsızdır. Erken gelişim sırasında BH'nin aşırı salgılanması veya BH gen mutasyonları nedeniyle BH üretiminin olmaması cücelikle sonuçlanır. Buna karşılık, ergenlikten önceki aşırı salgı, gigantizm olarak adlandırılan bir fenotip verebilir. Ayrıca yetişkinlerde hipofiz adenomlarının neden olduğu aşırı büyüme hormonu salgılanması akromegali olarak bilinen bir duruma yol açar. Büyük

parmaklar, eller ve ayaklar bu bozukluğun ayırt edici özellikleridir. BH ayrıca proteinlerin, karbonhidratların ve lipidlerin metabolizmasını da etkiler (13) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Büyüme hormonunun etkileri.

Sonuç olarak, BH olan SOM aynı zamanda BH engelleyici olarak da kullanılmaktadır.

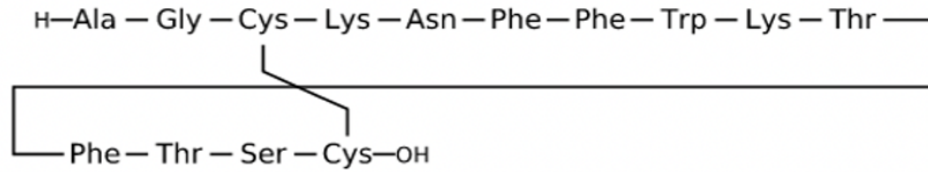
2.2. Büyüme Hormonu Engelleyiciler

Kanser vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan 100'den fazla hastalık grubunu içerir. Ülkemizde en sık görülen kanser türlerinden olan; akciğer, bağırsak, mide, apandis, rektum tümörleri (nöroendokrin ve karsinoid kanserler) ve hipofiz bezi tümörlerinin tedavisinde biyomatrikslerdeki terapötik peptidlerin ve proteinlerin analizi çok önemli hale gelmektedir. Terapötik peptitler genellikle hormonlar veya nörotransmitterler gibi endojen peptitlerin sentetik analoglarıdır. Endojen insan serum peptitlerinin analizi, teşhis veya tedavi amacıyla kullanılmaktadır. BH engelleyici olan SOM de terapötik peptidler arasında yer almaktadır. Son yıllarda, SOM ve onun sentetik analogları olan OC ve LAN akromegali ve NET tedavisinde ve metastatik nöroendokrin kanserlerde tümörün

gelişimini yavaşlatmak veya durdurmak için kullanılmaktadır (14). BH, hipofiz tümörlerinde insülin, glukagon ve diğer hormonların salınımını ile endokrin pankreas ve karsinoid tümörlerde hormon aşırı salgılanmasını kontrol etmek için kullanılır (15).

2.2.1. Somatostatin

SOM, 1973 yılında ön hipofizden büyüme hormonu salınımını güçlü bir şekilde inhibe eden bir peptit olarak keşfedilmiştir (16) (Şekil 2.4). SOM, gastrointestinal sistemde ve insan beyninin birçok alanında bulunan 14 (SOM-14) veya 28 (SOM-28) amino asitli bir peptittir (17). SOM antiproliferatif ve inhibitör etkileri olan bir tetradekapeptiddir (18).



Şekil 2.4. Somatostatinin kimyasal formülü.

SOM'un, BH salgılanmasının hipotalamik düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı ve tirotropin salgılatıcı hormon, dopamin ve norepinefrin salınımını engellediği bilinmektedir (19). BH, insülin, glukagon, gastrin ve diğer peptit hormonları gibi çeşitli endokrin salgılar üzerinde engelleyici özelliklere sahiptir (20). Periferik sinir sisteminde SOM'un noisepsiyon ve inflamatuvar süreçler üzerinde engelleyici etkileri de bulunmaktadır.

Vücutta SOM reseptörleri (SOMR) beş farklı alt tipde bulunmaktadır. Bu reseptörlerin tümü, nanomolar afinite ile SOM-14 ve SOM-28'e bağlanır; tek istisna, SOM-28'i SOM-14'den 5 ila 10 kat daha yüksek bir afinite ile bağlayan SOMR5'dir (Tablo 2.1) (21).

SOM, nöroendokrin tümörlerin tedavisinde kullanılabilmekte, ancak 1-3 dakikalık yarı ömre sahip olduğu için klinik uygulamalarda tercih edilmemektedir. Bu nedenle, aynı SOM reseptörlerine daha yüksek afinite, benzer aktivite ve daha uzun terapötik etkilerle bağlanan uzun ömürlü analoglar olan OC ve LAN sentezlenmiştir.

Tablo 2.1. Endojen, sentetik ve peptid olmayan SOM agonistlerinin bağlanma afiniteleri.

Bağlanma sabitleri (nM)					
Reseptörler					
Agonistler	SOMR1	SOMR2	SOMR3	SOMR4	SOMR5
SOM-14	0,1-2,26	0,2-1,3	0,3-1,6	0,3-1,8	0,2-0,9
SOM-28	0,1-2,2	0,2-4,1	0,3-6,1	0,3-7,9	0,05-0,4
OC	290-1140	0,4-2,1	4,4-34,5	>1000	5,6-32
LAN	500-2330	0,5-1,8	43-107	66-2100	0,6-14

SOM-14 ve SOM-28'in IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, amino asit dizisi ve molekül yapısı Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında SOM-14 ile çalışılmıştır.

2.2.2. Oktreotid

SOM'un sentetik analoglarından biri olan OC, klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Yarı ömrü 4-6 hafta arasındadır (22). OC'nin inhibitör etkileri, tümöral hormon hipersekresyonunun (akromegali, NET'ler, pankreas tümörleri ve karsinoid tümörler), gastrointestinal kanama, dumping sendromu ve pankreatit baskılanması dahil olmak üzere çeşitli klinik tedavilerde uygulanır (21). Peptid reseptör aracılı terapi için kemoterapötik bir ajan olarak OC, malign karsinoid ve diğer endokrin tümörlerin tedavisinde başarıyla kullanılmıştır (23).

OC'nin IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, , amino asit dizisi ve molekül yapısı Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

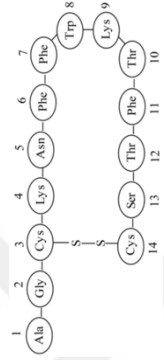
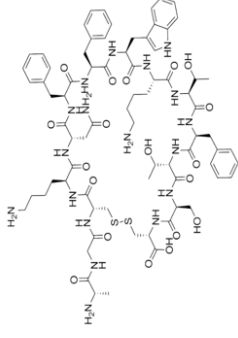
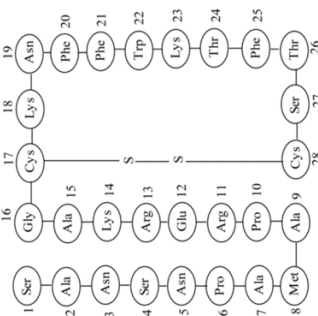
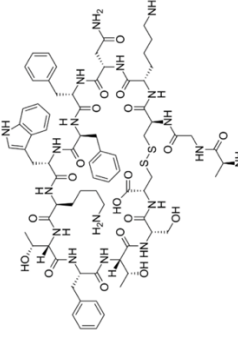
2.2.3. Lanreotid

LAN, akromegali ve nöroendokrin tümörleri tedavi etmek için kullanılan SOM analogudur; tercihen hipofiz SOMR'ne bağlanır, BH salgılanmasını engeller ve insülin benzeri büyüme faktörü I seviyesini azaltır (24). LAN genel bir antitümör ajanı olarak endokrin olmayan tümörlere karşı da aktivite gösterir.

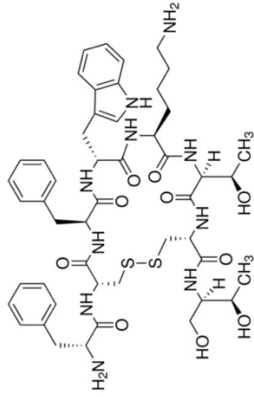
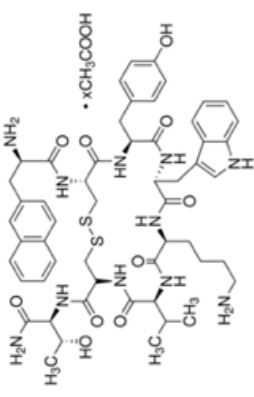
LAN, daha uzun etkili bir SOM analogu olarak üretilmiş sentetik siklik bir oktapeptiddir ve klinik çalışmalarda ilaç tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Yarılanma ömrü 4-5 haftadır (25).

LAN'nin IUPAC adlandırılması, kapalı formülü, molekül ağırlığı, amino asit dizisi ve molekül yapısı Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. BH engelleyicilere ilişkin moleküler özellikler.

Maddeler	IUPAC adlandırması	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g mol ⁻¹)	Amino asit dizisi	Molekül yapısı
SOM-14	L-alanyl-glycyl-L-cysteiny-L-lysyl-L-asparagyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cysteine (3->14)-disulfide	C ₇₆ H ₁₀₄ N ₁₈ O ₁₉ S ₂	1637,88		
SOM-28	L-seryl-L-alanyl-L-asparagyl-L-seryl-L-asparagyl-L-prolyl-L-alanyl-L-methionyl-L-alanyl-L-prolyl-L-arginyl-L-alpha-glutamyl-L-arginyl-L-lysyl-L-alanyl-glycyl-L-cysteiny-L-lysyl-L-asparagyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cysteine (17->28)-disulfide	C ₁₃₇ H ₂₀₇ N ₄₁ O ₃₉ S ₃	3148,56		

Tablo 2.2. (Devam) BH engelleyicilere ilişkin moleküler özellikler.

Maddeler	IUPAC adlandırması	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g mol ⁻¹)	Amino asit dizisi	Molekül yapısı
OC	10-(4-aminobütil)-19-(2-amino-3-fenilpropanol)-amino-16-benzil-N-(1,3-dihidroksibütan-2-il)-7-(1-hidroksietil)-13-(1H-indol-3-ilmetil)-6,9,12,15,18-pentaoksos-1,2-dithia-5,8,11,14,17-pentazasikloikosan-4-karboksamid	C ₄₉ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₀ S ₂	1019,24	DPhe - Cys - Phe Thr(ol) - Cys - Thr Lys DTrp	
LAN	3-(2-naphthyl)-D-alanyl-L-cysteinyll-L-tyrosyl-D-tryptophyll-L-lysyl-L-valyl-L-cysteinyll-L-threoninamide (2->7)-disulfide	C ₅₄ H ₆₉ N ₁₁ O ₁₀ S ₂ · xC ₂ H ₄ O ₂	1096,32	DβNal - Cys - Tyr Tre - Cys - Val Lys DTrp	

2.3. Seçilen Büyüme Hormonu Engelleyiciler İçin Kaynak Çalışmaları

Kaynak taraması sonucunda, tez kapsamında çalışılan BH engelleyicilerin analizlerine ilişkin bulunan çalışmalar Tablo 2.3’de gösterilmiştir.



Tablo 2.3. Seçilen BH engelleyicilerin analiz yöntemlerini içeren kaynaklar.

Analit	Yöntem	Doğrudan-Dolaylı	Uygulama	Nitel-Nicel	Kaynak
SOM	RP-LC-MS	Dolaylı (Sistein)	Standart çözelti	Nitel	(26)
SOM	LC-MALDI-MS	Dolaylı (İnsülin)	Taş pisi balığı ve Kareius bicoloratus	Nitel	(27)
SOM	RP-LC-QTOF-MS	Dolaylı (Mono iyonlu peptid)	Sıçanın merkezi sinir sistemi	Nitel	(16)
SOM	LC-QTOF-MS	Doğrudan	Fare plazması	Nicel LOD: 2,5 fmol/ml LLOQ: 8,3 fmol/mL	(28)
SOM	CZE	Doğrudan	Farmasötik preparat	Nicel Doğrusallık aralığı: 0,02-0,35 mg/mL LOD: 10 µg/mL LLOQ: 0,02 mg/ml	(20)
SOM	Florometrik görüntüleme cihazı	Dolaylı (Kalsiyum)	İnsan rekombinant somatostatin reseptörü	Nitel	(29)
SOM	Sandviç ELISA	Doğrudan	Farmasötik preparat	Nitel	(30)
SOM	İmmünohistokimyasal	Doğrudan	İnsan plazması	Nitel	(31)
SOM	İmmünohistokimyasal	Doğrudan	İnsan varyon adrenal tümör	Nitel	(18)
SOM	İmmünohistokimyasal	Doğrudan	İnsülinoma hastaları	Nitel	(32)

Tablo 2.3. (Devam) Seçilen BH engelleyicilerin analiz yöntemlerini içeren kaynaklar.

Analit	Yöntem	Doğrudan-Dolaylı	Uygulama	Nitel-Nicel	Kaynak
OC	RP-LC	Doğrudan	Farmasötik preparat	Nicel Doğrusallık aralığı: 0-100 µg/mL	(33)
OC	RP-HPLC	Dolaylı (Treonin, fenilalanin, triptofan, sistein, treonin-ol ve lizin)	Standart çözelti	Nitel	(2)
OC	LC-MS/MS	Doğrudan	İnsan plazması	Nicel Doğrusallık aralığı: 0,025–25,0 ng/mL	(15)
OC	LC-MS/MS	Doğrudan	İnsan plazması	Nicel Doğrusallık aralığı: 0,5–25,0 ng/mL LOD: 0,25 ng/mL LLOQ: 0,5 ng/mL	(14)
OC	HPLC	Doğrudan	İnsan pankreas sıvısı	Nicel Doğrusallık aralığı: 0,1–15,0 µg/mL LOD: 0,025 µg/mL LLOQ: 0,1 µg/mL	(34)

Tablo 2.3. (Devam) Seçilen BH engelleyicilerin analiz yöntemlerini içeren kaynaklar.

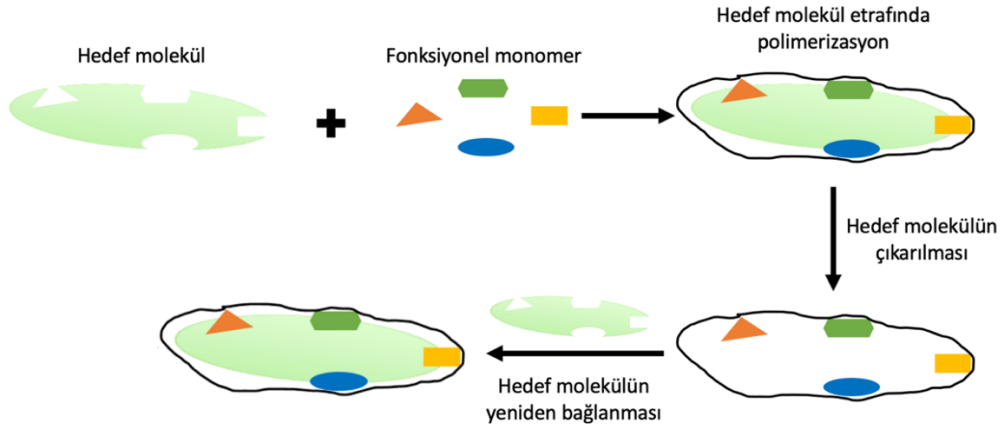
Analit	Yöntem	Doğrudan-Dolaylı	Uygulama	Nitel-Nicel	Kaynak
OC	¹ H-qNMR	Doğrudan	Farmasötik preparat	Nicel Gün içi BSS: % 0,36 Günler arası BSS: % 0,41	(35)
OC	İmmünohistokimyasal	Doğrudan	Akciğer nöroendokrin tümörler	Nitel	(1)
LAN	RIA	Doğrudan	İnsan plazması	Nicel	(24)
LAN	Radyoaktivite	Doğrudan	Sıçan plazması	Nitel	(23)
OC-LAN	Sintigrafi	Dolaylı (Fosfat diyabeti)	Paget kemik hastalığı	Nitel	(36)

2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi ve MIP'ler

Moleküler baskılama teknolojisi, genellikle molekülün bir anahtarla eşleşmesi için kilit yapma yöntemi olarak tanımlanır. Farmasötik biyoteknoloji, kimya endüstrileri, su arıtma ve gıda ve çevre analizi dahil olmak üzere farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu malzemeler, sabit faz olarak kromatografide, tanıma elemanı olarak sensör teknolojisinde, örnek hazırlama ve kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesi gibi farklı alanlarda başarıyla uygulanmıştır. Baskılı polimerler çeşitli avantajlar sunar, hazırlanmaları basit, kararlı, sağlam ve ucuzdur. İlaçlar, aminoasitler, peptitler, proteinler, herbisitler ve pestisitler, endokrin bozucular, ağır metaller, şekerler ve türevleri, toksinler, nükleotid bazlar, steroidler, antibiyotikler, katkı maddeleri, vitaminler, alkaloidler, melamin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar vb. gibi farklı fizikokimyasal özelliklere sahip çok sayıda kimyasal bileşik etkili bir şekilde baskılanmıştır (37).

MIP'ler, kalıp olarak adlandırılan hedef molekülleri özel olarak bağlayabilen yapay olarak oluşturulmuş tanıma elemanlarına sahip sentetik malzemelerdir (38). MIP'ler, fonksiyonel monomerlerin kalıp molekül varlığında baskılanmasıyla oluşturulur. Kalıp moleküller MIP'lerden çıkarıldığında MIP'lerde spesifik molekülün yapısında boşluklar meydana gelir ve bu sayede MIP'ler hedef molekülü güçlü etkileşimlerle tanıyabilmektedir (Şekil 2.5). MIP'ler üç boyutlu polimerik kalıplar olup çok karmaşık ortamlarda bile tayin edilecek maddeye ilişkin çok üstün ve spesifik adsorpsiyon özelliklerine sahiptir. MIP, örnek hazırlama basamağında katı faz ekstraksiyonundan (SPE), HPLC ve sensörlerde katman tanımaya kadar birçok kullanım alanı sunar. Bu polimerler, kararlı, sağlam, kolay ve ucuz bir şekilde hazırlanabilir ve çok çeşitli moleküller için sentezlenebilirler.



Şekil 2.5. MIP'lerin oluşum basamakları.

MIP'lerin sentezi, termal polimerizasyon, elektropolimerizasyon (EP) veya fotopolimerizasyon (FP) ile gerçekleştirilebilir. Polimerizasyonun zincir reaksiyonu, daha sonra reaksiyonun aktif merkezleri haline gelen monomer moleküllerinin aktivasyonu ile başlar. Bir polimerizasyon karışımında radikal oluşumu, genellikle spesifik bir başlatıcı molekülün varlığı veya serbest elektronların hareketi ile gerçekleştirilir. Başlatıcı olarak, aktif bir radikal oluşturmak üzere ısı veya ışık etkisi altında ayrışabilen termal ve fotopolimerizasyon maddeleri kullanılır. Aktivasyondan sonra, polimer zincirinin büyümesi, zincir kırılana veya dış etki artık ortada olmayana kadar devam eder (39).

Termal polimerizasyon: FRP'nin en iyi bilinen başlatıcısı, izobütironitril radikallerine ısıtıldığında parçalanarak N,N-azobisisobütironitril (AIBN) (40). Radikallerin bazıları birbirine bağlanır ve deaktive olur. Bu nedenle, başlangıçta oluşan izobütironitril kalıntılarının yalnızca bir kısmı, monomerlerin polimerizasyonunu başlatabilir (41). Termal başlatıcıların en büyük dezavantajı oldukça pahalı olmasıdır. Ayrıca, safsızlık izleri polimerizasyonu hızlandırabilir, geciktirebilir ve tekrarlanamayan sonuçlara yol açabilir. Bununla birlikte, polimerizasyonu engelleyen oksijenin dikkatli bir şekilde uzaklaştırılması ve saflaştırılmış taze monomerin kullanılması, tekrarlanabilir polimerizasyon elde edilmesini sağlar (42). MIP'lerin sentezi için termal polimerizasyonun önemli bir eksikliği, reaksiyonu başlatmak için yüksek bir sıcaklığa (85–160 °C) ihtiyaç

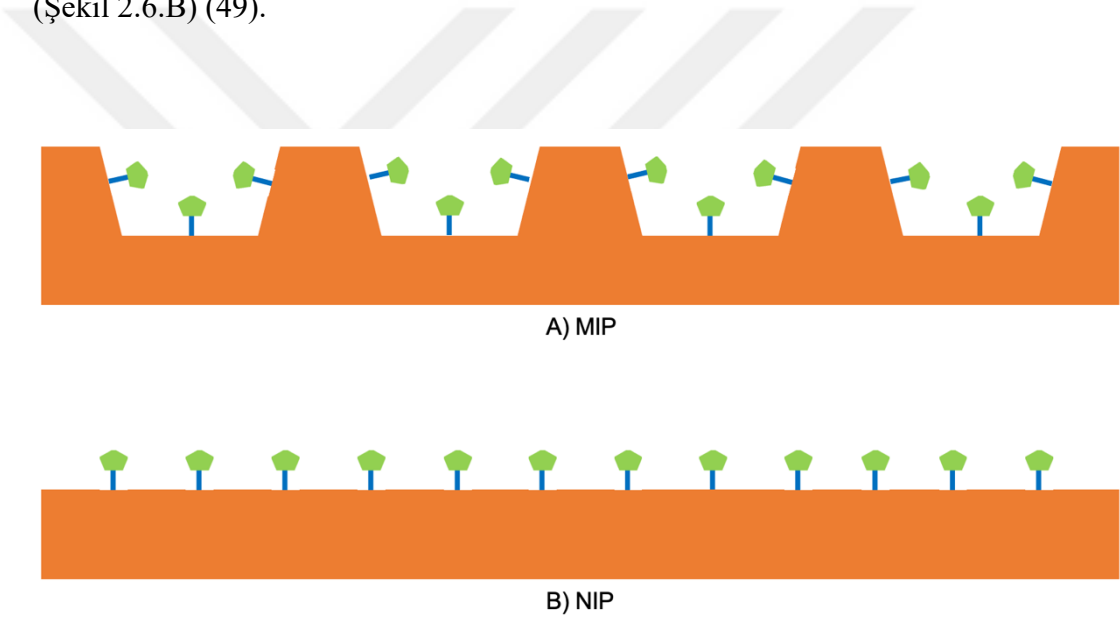
duyulmasıdır (43). Diğer bir dezavantaj, bilinen termal polimerizasyon başlatıcılarının suda çözünmez olmalarıdır (41). Bu da sulu çözeltilerin tercih edildiği MIP sentezi için kullanımlarını sınırlar.

Elektropolimerizasyon (EP): Elektrokimyasal polimerizasyonun termal polimerizasyona göre birçok avantajı vardır. İlk olarak, reaksiyon ürünü, doğrudan elektrot veya sensör dönüştürücünün yüzeyinde biriken bir polimer filmidir. Bir başka avantajı, yeterince saf polimerler elde etmeyi sağlamasıdır (44). Son olarak, polimer kaplamanın gözeneklilik ve morfoloji gibi özellikleri, aktarılan elektrik yükü miktarı, çözelti pH'ı, elektrolit yapısı gibi deney koşullarının seçimiyle kontrol edilebilir. Dezavantajları ise, elektrolitlerin kararsızlığı, yüksek kaliteli polimer katmanların elde edilebildiği sınırlı sayıda monomer ve ayrıca yüksek düzeyde çapraz bağlı polimerlerin karmaşık yapısıdır (45). EP, yalnızca altın, gümüş veya grafit gibi elektriksel olarak iletken yüzeylerde MIP film oluşumu için uygundur. Bununla birlikte, polimer doğrudan sensör dönüştürücü üzerinde biriktirilebilir ve polimer tabakasının kalınlığı, elektrot aracılığıyla, geçen elektrik yükünün miktarı ile kolayca kontrol edilebilir. Ayrıca, EP'dan sonra polimer filmler, şablonun çıkarılması dışında herhangi bir ek işlem gerektirmez ve doğrudan analit tayini için uygulanabilir (46).

Fotopolimerizasyon (FP): FP'da polimerizasyonun başlaması UV veya görünür ışık radyasyonu altında gerçekleşir. Bu tür radikal oluşumu termal aktivasyon enerjileri gerektirmez ve polimerizasyon oda sıcaklığında ve hatta çok düşük sıcaklıklarda ilerler (41). FP'da, zincir transfer olasılığı genellikle yüksektir, bu da önemli sayıda dallanmış makromolekül ile sonuçlanır (47). Başarılı bir FP işlemi için oksijensiz bir ortam sağlamak gereklidir, çünkü moleküler oksijen başlatıcının aktif durumunu fiziksel olarak söndürebilir ve ayrıca reaktif olmayan peroksit radikalleri oluşturarak serbest radikallerin veya aktif radikal bölgelerin sayısını azaltabilir. Bu problem, bir hava atmosferinde monomerlerin polimerizasyonunu başlatan poliaromatik tiyoksanton antrasen gibi özel fotobaşlatıcılar ile çözülebilir (48).

MIP sentezi, kalıp:monomer etkileşimlerini arttıran uygun bir çözücü içinde büyük miktarda çapraz bağlayıcı ve polimer başlatıcı varlığında bir kalıp molekülün

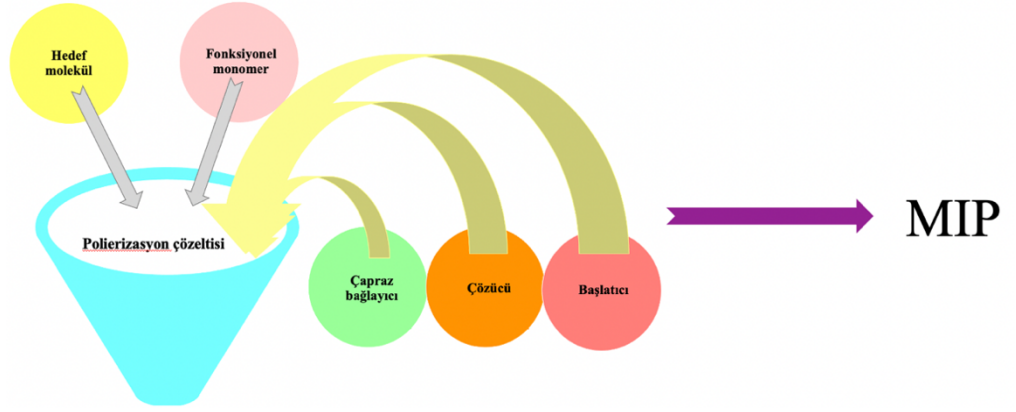
etrafındaki monomerlerin polimerizasyonu ile gerçekleştirilir. Polimerizasyondan sonra, hedef molekül, polimer ağı içinde boyut, şekil ve kimyasal işlevsellikler açısından tamamlayıcı boşluklar bırakarak çıkarılır. Buna göre, elde edilen MIP, yeniden bağlama deneylerinde hedef molekülü ve ilgili bileşikler tanıyabilir (Şekil 2.6.A). Monomerlerin, çapraz bağlayıcıların ve çözücülerin türü ve miktarının, hedef analitler için kapasite, afinite ve seçicilik açısından elde edilen malzemelerin nihai özelliklerini etkilediği iyi bilinmektedir. Bu nedenle, optimum MIP'nin sentezi farklı formülasyonlar kullanılarak denenmektedir. Herhangi bir MIP tabanlı analitik yöntemin geliştirilmesinde, baskılı olmayan polimer olarak adlandırılan NIP, MIP ile aynı koşullarda ancak şablon molekül bulunmadan sentezlenir ve MIP ile karşılaştırılır (Şekil 2.6.B) (49).



Şekil 2.6. A) MIP ve B) NIP yüzey şekilleri.

2.4.1. MIP'lerin Bileşenleri

MIP'ler, analizi gerçekleştirilecek bir hedef molekül, polimerizasyonu sağlayacak bir fonksiyonel monomer, hedef molekülün etrafında monomeri sabitleyici bir çapraz bağlayıcı, hedef molekülü çıkaran uygun bir çözücü ve reaksiyonu hızlandıran bir başlatıcı varlığında oluşturulurlar (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. MIP'lerin polimerizasyon bileşenleri.

2.4.1.1. Hedef Molekül

MIP hazırlanırken polimerik yapıda kalıp oluşturmak için bir hedef molekül olması zorunludur. Hedef molekül olarak analiz edilecek madde seçilir. Kalıp molekül polimerizasyon koşulları altında kararlı, ucuz, toksik olmayan ve kolay bulunabilir özelliklere sahip olmalıdır (49). Polimer ağına bağlanma bölgeleri hedef moleküle özgüdür. Böylece MIP'ler seçici olarak hedef analiti yeniden bağlayabilir.

Genel olarak ideal bir kalıp molekülün üç gereksinimi karşılaması gerekir; polimerizasyonu engellemeyen, monomerlerle kompleks oluşturabilen fonksiyonel gruplar içermelidir ve reaksiyon sırasında kimyasal stabilitesi çok yüksek olmalıdır (50, 51).

Küçük organik moleküller ve metal iyonlar için MIP'ler yüksek seçicilikle kullanılmaktadır. Ek olarak, biyomakromoleküller, proteinler, virüsler ve hücreler gibi MIP'ler için büyük yapılandırılmış türler de rapor edilmiştir. Bununla birlikte, proteinlerin ve diğer biyomakromoleküllerin baskılanması zorlayıcıdır (52).

Çoklu kalıp molekül baskılama tekniği ile birden fazla analiti eş zamanlı analiz edebilmek mümkündür, ancak seçicilik azalır ve MIP'lerin tanıma yeteneği etkilenir. Diğer taraftan, sahte baskılama stratejisi polimerizasyona uygun olmayan ve pahalı hedef moleküller için geliştirilmekte olan bir yöntemdir. Hedef molekül yerine yapı olarak ona benzeyen türevleri kullanılır (50).

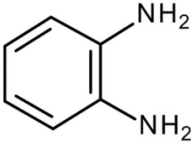
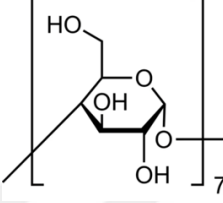
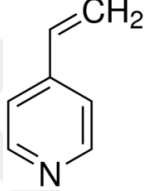
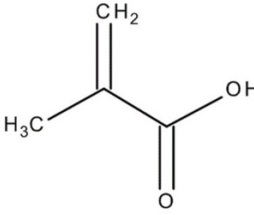
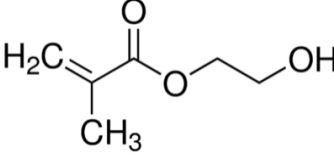
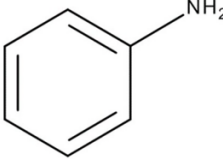
2.4.1.2. Fonksiyonel Monomer

Fonksiyonel monomerin rolü, fonksiyonel gruplar sağlayarak kalıpla bir ön polimerizasyon kompleksi oluşturmaktır. Bu nedenle, polimerizasyondan önce kalıpla güçlü bir şekilde etkileşime girebilen ve hedef moleküle özgü kompleksleri oluşturabilen uygun bir fonksiyonel monomerin seçilmesi oldukça önemlidir. Seçilen monomerin hangi oranda kullanılacağı önemli olan diğer bir noktadır. Monomerin fazlası, kalıp moleküle spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşturabilir (53).

Moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerlerin sayısı sınırlıdır, bu da MIP'lerin oluşumunu ve seçiciliğini etkiler. Hedef moleküle güçlü etkileşimler oluşturabilen yeni fonksiyonel monomerler tasarlamak ve sentezlemek gereklidir. Genel olarak, fonksiyonel bir monomerin iki özelliği bulunmalıdır. Biri tanıma kısmı, diğeri ise sırasıyla vinil çift bağ ve silikon hidroksil gibi polimerize olabilen kısımdır (54, 55).

Akrilik bazlı monomerler (yani akrilik asit ve metakrilik asit), çok çeşitli şablonlara yüksek afinite sağladıkları için MIP'lerin sentezinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu tür monomerlerin tatlı su ve deniz organizmaları için toksik olduğu düşünülmektedir (49, 56). En çok kullanılan monomerler Tablo 2.4'de verilmiştir (50, 57).

Tablo 2.4. MIP’lerde kullanılan fonksiyonel monomerler.

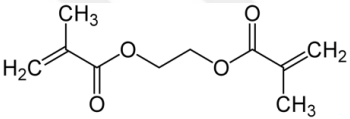
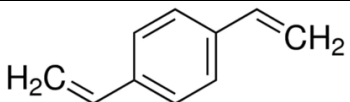
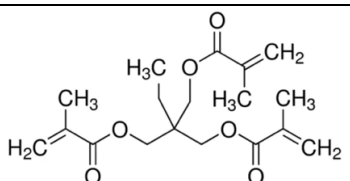
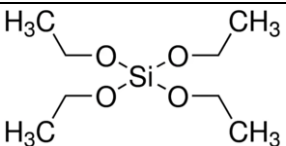
Fonksiyonel monomer	Molekül yapısı
Orto-fenilendiamin	
β-siklodekstrin	
4-vinil piridin	
Metakrilik asit	
Hidroksietilmetakrilat	
Anilin	

2.4.1.3. Çapraz Bağlayıcı

Polimerizasyon oluşumunda zorunlu olmasa da fonksiyonel monomerleri kalıp moleküllerinin etrafına sabitlemek için bir çapraz bağlayıcı kullanılır, böylece hedef molekülün çıkarılmasından sonra bile yüksek düzeyde çapraz bağlı sert, sağlam, kararlı bir polimer oluşur. Çapraz bağlayıcının türü ve miktarının MIP'lerin seçiciliği ve bağlama kapasitesi üzerinde önemli etkileri vardır. Genellikle, çok düşük miktarda çapraz bağlayıcı, düşük çapraz bağlama derecesi nedeniyle kararsız polimer oluştururken, aşırı yüksek miktarda çapraz bağlayıcı, MIP'lerin tanıma alanlarının sayısını azaltabilir (57, 58).

En sık kullanılan çapraz bağlayıcılar Tablo 2.5'de verilmiştir.

Tablo 2.5. MIP'lerde kullanılan çapraz bağlayıcılar.

Çapraz bağlayıcı	Molekül yapısı
Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)	
Divinil benzen (DVB)	
Trimetilolpropan trimetakrilat (TMPTMA)	
Tetraetoksisilan (TEOS)	

2.4.1.4. Çözücü

Çözücüler polimerizasyonda da önemli rol oynarlar. Polimerizasyon sürecinde çözücüler, polimerizasyon reaksiyon ortamı ve gözenek oluşturucu ajanlar olarak kullanılır (50). Çözücünün polaritesi, kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim ve kalıp molekülün uzaklaştırılması üzerinde etkilidir.

Kovalent olmayan baskılamada kloroform, asetonitril, benzen, metilen klorür ve toluen gibi düşük polaritede ya da polar olmayan çözücüler kullanılırken, kovalent baskılama için metanol ve dimetilformamit gibi polar çözücüler tercih edilir. Polar çözücüler hedef molekül monomer dengesini bozarak MIP'in seçiciliğini düşürebilir. İyi baskılama verimliliği elde etmek için düşük polaritede ya da polar olmayan çözücüler sıklıkla seçilir. Son yıllarda, teorik hesaplamalar ile çözücü seçilebilen yaklaşımlar geliştirilmektedir (59).

2.4.1.5. Başlatıcı

Polimerizasyonun başlatılmasında peroksi ve azo bileşikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak MIP'ler oluşturulurken başlatıcı kullanmak zorunlu değildir (50).

En sık kullanılan başlatıcılar; azobisisobütironitril (AIBN), azobis dimetilvaleronitril (ADV), azo(4-siyanovalerik asit) (ACID), benzoilperoksit (BPO), benzil dimetil asetal (BDK), potasyum persülfat (KPS)'dir (60, 61).

2.4.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri

MIP'ler kovalent, kovalent olmayan ve yarı kovalent baskılama yöntemleri kullanılarak oluşturulabilir (Şekil 2.8) (62).

2.4.2.1. Kovalent Baskılama

Kovalent baskılamada, hedef molekül, fonksiyonel monomere kompleks oluşturarak bağlanır. MIP'lerin oluşumu kovalent bağlara dayanır. Çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyondan sonra hedef molekül, yüksek düzeyde çapraz bağlı polimerden kovalent bağlar açılarak ayrılır (63).

Kovalent baskılama için, hedef molekül:fonksiyonel monomer oranı önemli değildir. Çünkü, hedef molekül, kovalent olarak bağlanabilen fonksiyonel monomerlerin sayısını belirler; ayrıca fonksiyonel monomerler, stokiometrik bir şekilde eklenir. Kovalent baskılama yöntemi ile hedef molekül:fonksiyonel monomer arasında oluşan bağlar stabil ve polimerizasyona dayanıklıdır. Bunun yanında, çok kararlı bir yapı olduğu için kalıp molekülü uzaklaştırmak zorlaşır. Ayrıca, tersinir olmayan kovalent bağlar hedef molekül ile fonksiyonel monomer etkileşimi zorlaştırabilir.

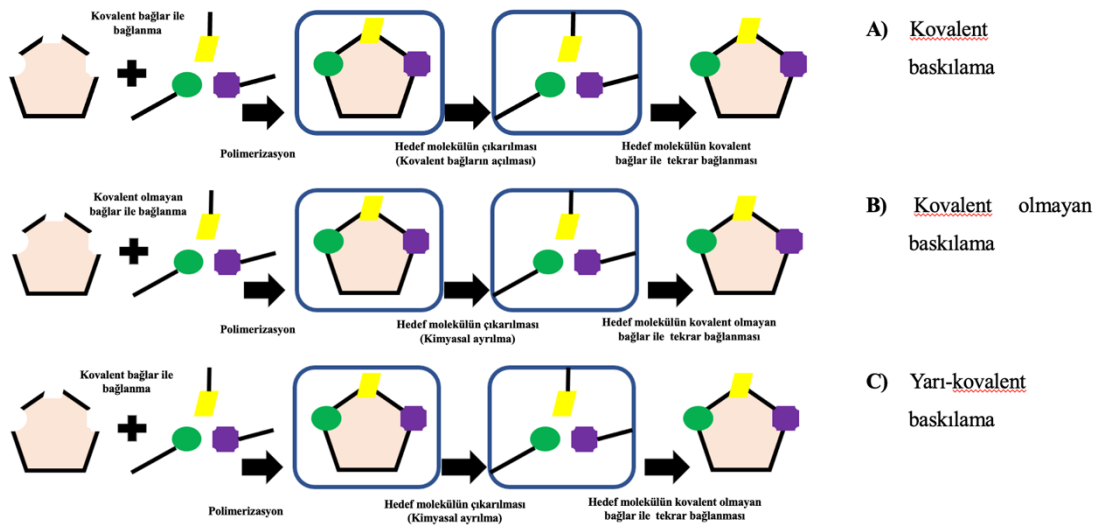
2.4.1.1.Kovalent Olmayan Baskılama

Kovalent olmayan yaklaşım, basitliği nedeniyle MIP hazırlamak için en sık kullanılan yöntemdir. Kovalent olmayan yaklaşım sırasında, hedef molekül ve fonksiyonel monomer arasında kendiliğinden bir araya gelme ve ardından çapraz bağlı bir kopolimerizasyon ile özel bağlanma bölgeleri oluşturulur. Hedef molekül ve fonksiyonel monomer, baskılama sürecinde ve hedef molekülün inkübasyonu sırasında kovalent olmayan etkileşim ile bağlanır. Bu etkileşimlere, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri, iyonik veya hidrofobik etkileşimler örnek olarak verilebilir (63).

Kovalent olmayan baskılama hedef molekülün bağlanması ve uzaklaştırılması, kovalent baskılamaya göre çok kolaydır ve daha yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri üretir. Yüksek afiniteli bağlanma seçiciliği arttırır. Diğer yandan, oluşan polimer daha kararsız olabilir ve hedef moleküle özgü olmayan bağlanma bölgeleri bulunabilir.

2.4.1.1.Yarı-Kovalent Baskılama

Kovalent ve kovalent olmayan baskılama yöntemlerinin birleştirilmesiyle oluşturulur. Hedef molekül:fonksiyonel monomer kompleksi oluştururken kovalent baskılama, kalıp molekülün uzaklaştırılması ve yeniden bağlanması süreçlerinde ise kovalent olmayan baskılama gerçekleşir. Böylece, kovalent ve kovalent olmayan baskılama yöntemlerinin dezavantajları giderilmiş olur (64).



Şekil 2.8. A) Kovalent, B) Kovalent olmayan ve C) Yarı kovalent baskılama yöntemleri.

2.4.2. MIP'lerin Analitik Uygulamaları

MIP'lerin analitik uygulamaları üç başlıkta incelenir; analize hazırlık basamağında ekstraksiyon, sensör ve kromatografi uygulamaları (61).

2.4.2.1. MIP'lerin Ekstraksiyon Yöntemlerinde Uygulanması

Analitin çok düşük derişimlerinde çalışılması veya analitin saflaştırılması isteniyorsa analize başlamadan önce örneği analize hazırlamak gereklidir. Nicel analizler için donanımlı analitik cihazlar olmasına rağmen örnek hazırlama aşaması hala önemli bir zorluktur ve her analitik prosedürün dar boğazı olarak tanımlanır. En çok kullanılan teknik ise ekstraksiyon yöntemleridir (65). MIP'ler organik çözücülerle mükemmel uyumluluğa sahiptir ve diğer analitik tekniklerle birlikte daha iyi uygulanır (61). MIP malzemeleri, SPE, katı faz mikro ekstraksiyon (SPME); karıştırma çubuğu emici ekstraksiyon (SBSE); matriks katı faz dağılımı (MSPD); paketlenmiş sorbent (MEPS) veya destekli sıvı membranlar (SLM) ile mikro ekstraksiyon (66, 67) gibi ekstraksiyon ve çözücüsüz tekniklerde seçici sorpsiyon ortamları olarak kullanılır. MIP'lerin saflaştırılması ve/veya ön deriştirme aşamasında en popüler SPE ve SPME teknikleri ile birleştirilmiş bir sorpsiyon ortamı olarak kullanılması, ekstraksiyon işleminin seçiciliğini ve verimliliğini önemli ölçüde artırabilir ve organik çözücü tüketimini minimuma indirme imkanı verir. Moleküler baskılı SPE (MI-SPE), MIP malzemelerinin en gelişmiş ve halen gelişmekte olan uygulaması olarak kabul edilir. Böylece incelenen örneklerde bulunan safsızlıkların sonuç üzerindeki etkisini tamamen ortadan kaldırmak mümkündür (68-70).

2.4.2.2. MIP'lerin Kromatografik Ayırma Yöntemlerinde Uygulanması

Moleküler parmak izi ile materyallerin uygulanmasının bir diğer önemli alanı, yeni tasarlanan ve geliştirilen ilaç ve pestisitlerin saflığı ile ilgili çalışmalardır. MIP malzemeleri, elde edilen biyolojik olarak aktif bileşikleri saflaştırmak, tanımlanan enantiyomerleri izomerik karışımlardan etkili bir şekilde ayırmak ve sentezlenmiş

kimyasal bileşiklerin optik saflığını değerlendirmek için kullanılır. HPLC ve kapiler elektroforez (CE), özellikle kiral ayırma için kullanılan en sık kullanılan ayırma teknikleridir. Temel olarak, seçilen enantiyomerin rasemik karışımdan ayrılması maddeye özgü kiral sabit faz (CSP) ile sağlanır. MIP'ler sayesinde rasematların ayrılması için yeni tip spesifik kromatografik kolon dolguları tasarlanır ve geliştirilir. MIP'lerin sabit fazlar olarak uygulanması (moleküler olarak baskılanmış kiral durağan fazlar-MICSP), yapılarında belirli bağlanma bölgelerinin varlığından dolayı kiral moleküllerin seçici olarak tanınmasına ve ayrılmasına olanak tanır. Ayrıca MIP sorpsiyon malzemelerinin kolay hazırlama süreci, tasarım ve hazırlama prosesindeki esneklik ve çok çeşitli organik çözücüler, tuzlar, asit ve alkali ortamlara karşı iyi tolerans ve zaman verimliliği gibi avantajlı özellikleri geleneksel ve ticari olarak temin edilebilen kolonlar için onları çok iyi bir alternatif çözüm haline getirmektedir (71-73).

MIP'nin LC tekniğinde sabit faz olarak uygulanmasının yanı sıra, uygun geliştirilmiş MIP ince filmler kapiler elektroforez (CE) yönteminde enantiyomerlerin ayrılması için kullanılır. Ancak kılcal boruya MIP uygulamak kolona uygulamaktan oldukça zordur (74).

2.4.2.3. MIP'lerin Elektrokimyasal Sensörlerde Uygulanması

Elektrokimyasal sensörleri ve biyosensörleri içeren elektrokimyasal teknikler, belirli bir kimyasal bileşiğe karşı doğruluk ve hassasiyet, düşük hazırlama maliyetleri, nanomateriyaller, kompozitler gibi çok kullanılan başka elektrot modifikasyon materyalleriyle birleştirilebilmesi ve kullanım kolaylığı gibi çeşitli avantajlar sağlar. Bununla birlikte, elektrokimyasal sensörler, çevresel veya kişisel faktörlerin neden olduğu hazırlama ve uygulama süreçlerinde düşük stabilite, tekrar üretilebilirlik ve sağlamlık gibi dezavantajlara sahiptir.

MIP'lerin çok kararlı ve yüksek seçicilikleri sayesinde sensörün performansı artırılabilir. Optik sensörlerde MIP'ler tanıma bölgesi ve dönüştürücü bölgesi

olarak kullanılmaktadır. Optik temelli yöntemlerden yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi, floresans, kalorimetri, elektrokemilüminesans, kemilüminesans ve yüzey plazmon rezonans spektroskopisi tekniklerinde MIP uygulamaları kullanılmaktadır (75).

MIP'lere dayalı elektrokimyasal biyosensörlerde, MIP malzemeleri özel bir biyomimetik sentetik reseptör türü olarak kabul edilebilir, çünkü bu tür baskılanmış polimerin seçici olarak tanınmasında belirli bir boşlukla karakterize edilme olasılığı vardır. Ayrıca MIP malzemeleri uygulaması, hazırlanan bir elektrokimyasal biyosensörün kimyasal, mekanik, termal ve pH kararlılığını ve yeniden kullanılabilirliğini artırır. Ayrıca, bir elektrokimyasal sensörde kullanılan MIP materyalleri, doğal reseptörlerden çok daha etkili olan yüksek afinite ile hedef analitleri (doğal antikorlar) tanımlayabilir ve yeniden bağlayabilir (65).

2.5. Elektrokimya

Elektrokimya, kimya biliminin alt dallarından biridir. İlk öncü çalışmalar 18. yüzyılın sonlarına doğru yapılmış olup 19. yüzyılda Volta, Faraday ve Arrhenius gibi bilim insanları elektrokimyanın kilometre taşlarını oluşturmuştur. Daha sonra Nernst ve arkadaşlarının uluslararası alanda elektrokimya üzerinde yoğunlaşan çalışmalarını takiben 1896'da Wilhelm Ostwald elektrokimya alanındaki ilk ders kitabını yayınladı. Elektrokimya, geçen yüzyıldan beri, analitik kimya, inorganik ve organik kimya, malzeme bilimi ve tıp gibi farklı dallara hızla gelişmiştir (76, 77).

Maddeler, iletkenler, yarı iletkenler ve yalıtkanlar (dielektrikler) olarak sınıflandırılır. İletkenler serbest elektrik yüküne sahiptir. Elektrik alan içinde serbest yükler göç eder ve elektrik akımı oluşur. İyonlar göç ediyorsa iyonik iletkenlik, elektronlar göç ediyorsa elektronik iletkenlik adını alır. Metaller, organik maddeler, tungsten karbür gibi inorganik bileşikler, oksitler, karbon siyahı, grafit gibi karbon materyalleri iletkenlerdir. Elektrokimya kavramı, iyonik iletkenlerin özelliklerinin

tanımlanması veya araştırılmasıyla ilgilenir. Asit, baz ve tuzların sulu çözeltileri, yaygın olarak kullanılan ve üzerinde en çok çalışılan iyonik iletkenlerdir (78).

Elektroanalitik teknikler, elektrik ile kimya arasındaki etkileşim, yani akım, potansiyel veya yük gibi elektriksel büyüklüklerin ölçümleri ve bunların kimyasal parametrelerle ilişkilerini inceler. Analitik amaçlar için elektriksel ölçümlerin bu şekilde kullanılması, çevresel izleme, endüstriyel kalite kontrol veya biyomedikal analiz dahil olmak üzere çok geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir (77).

Elektrokimyasal tepkimeler, elektrokimyasal hücrelerde gerçekleşir. Elektroanalitik ölçümlerde, hücreyi oluşturan en az iki elektrot (iletken) ve temas eden bir örnek (elektrolit) çözeltisinin bulunması gerekmektedir. Elektrokimyasal işlemler elektrot-çözelti ara yüzeyinde gerçekleşir. Elektrot yüzeyi bu nedenle iyonik bir iletken ile bir elektronik iletken arasında bir bağlantıdır. Elektrokimyasal hücreler elektrolitik veya galvanik olarak sınıflandırılabilir (77). Kimyasal tepkime kendiliğinden gerçekleşiyor ve elektrik enerjisine dönüşüyorsa galvanik hücre, dış kaynaktan uygulanan elektriksel enerjiyi kullanarak kimyasal tepkime oluşuyorsa elektrolitik hücre adını alır.

2.5.1. Elektrokimyasal Hücre Çeşitleri

En sık kullanılan elektrokimyasal hücreler iki veya üç elektrotlu hücrelerdir. İki elektrotlu hücreler çalışma ve referans elektrodundan oluşur. Bu hücrelerde çalışma ve referans elektrot arasındaki akım ölçülür. Ancak, direnci yüksek çözeltilerde ohmik direnç (I_R) nedeniyle tam olarak doğru cevap alınamadığından, akımın daha güvenilir ölçülmesi için üçüncü bir elektroda ihtiyaç duyulur. Üçüncü elektrot olarak karşıt elektrot kullanılır. Üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücrede, referans elektrot ile çalışma elektrodu çözelti direncini azaltmak için yakın yerleştirilir, çalışma ve karşıt elektrot arasındaki akım ölçülür (77, 79).

Elektrokimyasal analizlerde kullanılan hücre çeşitleri; sıvı ile etkileşmesine göre sıvı temaslı veya temassız hücreler; iki ayrı hücrenin tuz köprüsü ile bağlanması

ile oluşan tuz köprölü hücreler; tepkimenin kendiliğinden ya da bir potansiyel uygulanarak gerçekteştiğı galvanik veya elektrolitik hücreler; aynı tür elektrotlar ile farklı elektrolit derişimlerinin bulunduğı derişim hücreleri; tepkimelerin geri dönüşümlü olup olmamasına göre tersinir veya tersinmez hücrelerdir. Elektrokimyada kullanılan hücre çeşitleri ve özellikleri Tablo 2.6’da verilmiştir.



Tablo 2.6. Elektrokimyasal hücre çeşitleri.

Hücrenin adı	Hücrenin özellikleri	
Sıvı temassız hücreler	Elektrotlar aynı hücre içerisinde bulunurlar.	
Sıvı temaslı (poröz cam diskli) hücreler	Aynı hücre yerine iki yarı hücrenin gözenekli cam disk ile bağlanarak tepkimenin gerçekleştiği analizlerde kullanılırlar.	
Tuz köprüsü hücreler	İki yarı hücredeki elektrotları birbirinden ayırmak için tuz köprüsü kullanılır. Tuz köprüsü doymuş potasyum nitrat ile doludur.	
Galvanik hücreler	Dışarıdan herhangi bir potansiyel uygulanmadan hücre içerisindeki reaksiyon gerçekleşir.	
Elektrolitik hücreler	Hücreye, bir dış kaynaktan yeterli miktarda potansiyel uygulanması halinde hücre içerisindeki reaksiyon gerçekleşir.	
Derişim hücreleri	İki yarı hücrede de aynı tür elektrotlar bulunur ama elektrolit derişimleri birbirinden farklıdır.	

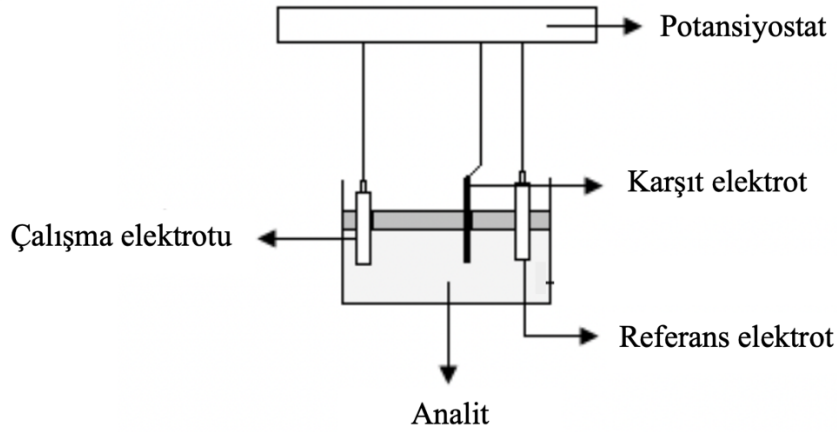
Tablo 2.6. (Devam) Elektrokimyasal hücre çeşitleri.

Hücresinin adı	Hücresinin özellikleri
Tersinir hücreler	Galvanik bir hücreye, bir dış kaynaktan yeterli potansiyel uygulaması halinde hücre, elektrolitik hücre şeklinde çalışır; elektron akımı ters yöne döner.
Tersinmez hücreler	Ortama bir reaktif ilavesi ile reaksiyon tersinmezliğe yaklaşır.

2.5.2. Elektrokimyasal Hücresinin Bileşenleri

Bir elektrokimyasal hücre üç ana bölüme sahiptir (80) (Şekil 2.9).

- 1) Elektrolitik çözelti.
- 2) Kimyasal tepkimenin gerçekleştiği elektrotlar (çalışma ve referans elektrot) ve üçlü sistemlerde karşıt elektrot.
- 3) Elektrotları birbirine bağlayan dış devre.

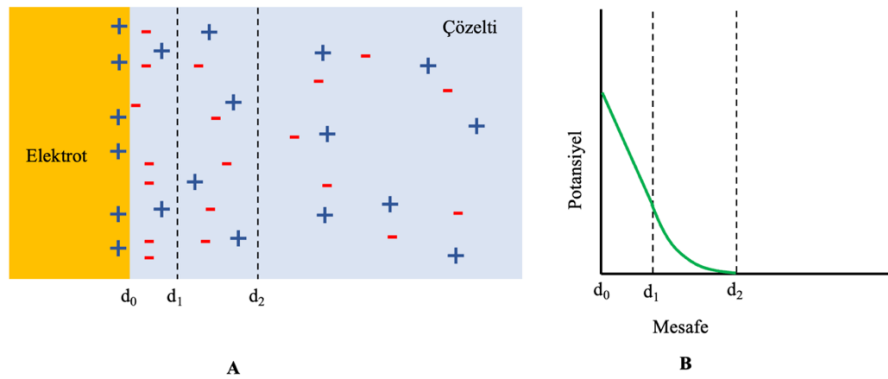
**Şekil 2.9.** Elektrokimyasal hücre şeması.

Bir elektrokimyasal hücrede, katot indirgenmenin olduğu elektrot, anot ise yükseltgenmenin olduğu elektrottur. Bir maddenin elektron kaybetmesi yükseltgenmesi, elektron alması ise indirgenmesidir. Elektrik alanının varlığında iyonlar katoda veya anoda hareket edebilir. Katoda doğru göç edebilen pozitif yüklü

iyonlara katyon, anoda doğru göç edebilen negatif yüklü iyonlara ise anyon adı verilir. Katot, negatif yüke sahiptir ve indirgenme meydana gelir Anot, pozitif yüke sahiptir ve yükseltgenme olur. Elektrik yükü, elektrotları birbirine bağlayan dış devrede elektronlar ile, çözeltide ise iyonlar tarafından taşınır. Elektrik yükünün akışı elektrik akımını oluşturur. Bir hücrede iki elektrot arasında elektrik akımının olması için bu iki elektrot arasında bir elektriksel potansiyel olmalıdır (77).

2.5.3. Elektrokimyasal Çift Tabaka

Elektrokimyasal bir hücrede ölçümler yapılırken elektrot kendisine bitişik çözelti tabakasındaki bir türe elektron verir ya da alırsa heterojen bir sistem oluşur. Bu elektron alışverişi bu tabakanın bileşimi ile çözeltinin diğer kısımlarının bileşimi arasında önemli derecede fark oluşturur. Elektrodun yüzeyinde tepkime verecek aktif bir tür bulunmuyorsa, elektroda pozitif (+) bir potansiyel uygulandıktan hemen sonra yüzeyinde sıfıra düşen anlık bir akım dalgası oluşur. Bu akım ile her iki elektrot yüzeyinde negatif yük eksikliği ya da fazlalığı oluşur. Ancak, iyonik hareketlilikten dolayı elektrotlara bitişik olan çözelti tabakalarında hızlı bir şekilde zıt yüklenme oluşur (81) (Şekil 2.10). Bu oluşuma elektriksel çift tabaka denir.



Şekil 2.10. A) Çözelti ile elektrot yüzeyi arasında oluşan elektriksel çift tabaka, B) Mesafeye karşı potansiyel grafiği.

d_0 — d_1 : Yoğun iç tabaka

d_1 — d_2 : Difüze tabaka

2.5.4. Elektrokimyasal Akımlar

Elektrokimyasal hücreye potansiyel uygulandığı zaman iki çeşit akım oluşur; kapasitif akım ve faradayik akım.

Kapasitif (faradayik olmayan) akım (I_k): Elektrolit çözeltisine daldırılan elektrot negatif yükle yüklenir ve çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru hareket eder. Ara yüzeyde potansiyel farkı oluşmuş olur. Ara yüzeyin iki yanında negatif ve pozitif yüklerin birikmesi kapasitör gibi davranan elektriksel çift tabaka oluşturur. Ortamda yükseltgen ya da indirgen bir madde olmasa bile kapasitörü yüklemek için akım oluşur. Herhangi bir tepkimeye bağlı olmayan, tamamen sistemden kaynaklı bu akıma kapasitif akım denilir. Kapasitif akımın düşük olması istenir.

Faradayik akım (I_f): Elektrokimyasal hücrede elektrot tepkimesi sonucu oluşan akımdır. Elektrot ile elektrolit ara yüzeyinde yük aktarımıyla yükseltgenme indirgenme oluşur. Analit miktarının elektrolitin içinden geçen elektrik miktarı ile doğru orantılı olduğunu açıklayan Faraday yasalarıyla uyumlu olduğu için faradayik akım adını alır. İstenen akım türüdür.

2.5.5. Elektrokimyasal Kütle Aktarım Yolları

Bir maddenin çözelti içinde bir yerden bir yere hareketi kütle aktarımı olarak tanımlanır. Eğer bölgeler arasında kimyasal veya elektriksel potansiyel farkı varsa kütle aktarımı hızlanır.

Elektrokimyasal bir hücrede maddeler aşağıda belirtilen üç yolla taşınır:

1. Migrasyon (göç):

Elektriksel alanın oluşturduğu elektriksel kuvvetin (f_m) etkisi ile anyonların anoda, katyonların katodo doğru hareket etmesi sonucu oluşur. Elektroaktif madde yüklü olduğu için derişimden bağımsız olarak zıt yüklü elektrot tarafından çekilir. Bu aktarımı en aza indirmek için ortama destek elektrolit eklenir. Destek elektrolitte bulunan iyonlar iyonik göçü gerçekleştirir ve böylece migrasyonla taşınan analit miktarı azalır. Analitin zıt yüklü elektroda göç etme hızı uygulanan potansiyelden etkilenmez, dolayısıyla çözeltide bulunan yükler iyonlar tarafından taşınabilir. Bu amaçla, saf, çalışılan potansiyelde indirgenmeyen ve iyonik şiddeti yüksek bir tuz, asit veya tampon çözeltisi destek elektrolit olarak kullanılabilir.

2. Konveksiyon:

Bir elektrokimyasal hücrede sıcaklık veya yoğunluk farkından kaynaklanan kütle aktarımı konveksiyon olarak adlandırılır. Elektrodun döndürülmesi, çözeltinin karıştırılması veya aktarılması için uygulanan mekanik kuvvet (f_k) etkisiyle oluşur.

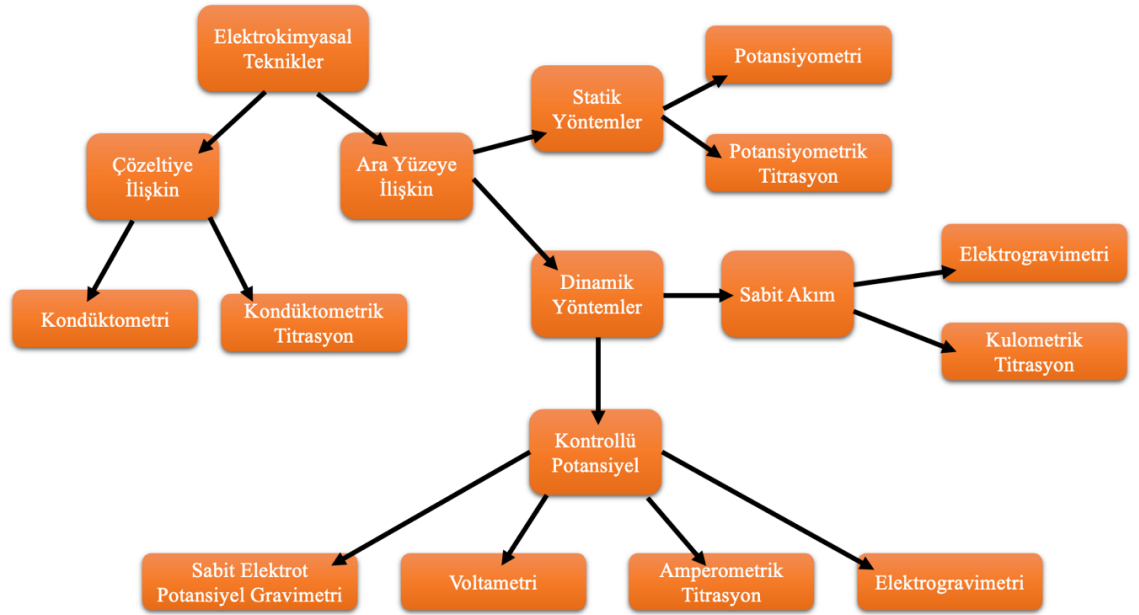
3. Difüzyon:

Difüzyon kontrollü kütle aktarımında madde kendiliğinden derişimi çok olan bölgeden az olan bölgeye doğru hareket eder. Elektrot yüzeyi ile elektrolit çözeltisi arasında derişim farkı kalmayıncaya kadar kütle aktarımı devam eder. Maddelerin kütle aktarımının difüzyon kontrollü olması istenir.

2.5.6. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimyasal yöntemler, bir maddenin nicel veya nitel analizini yük, akım, potansiyel gibi elektriksel özelliklerine dayanarak gerçekleştirilmesi esasına dayanır. Başka bir ifade ile elektrokimyasal yöntemler, çözelti ortamında homojen ya da elektrot yüzeyinde heterojen olarak aktarılan madde miktarı ile ilgilenildiği analitik yöntemlerdir. Çok düşük derişimlerde ölçüm yapılabilme, ayrıntılı karakterizasyon imkanı sunma ve ucuz olma avantajları ile çok geniş bir alanda sıklıkla kullanılmaktadır (81).

Elektrokimyasal yöntemler, ara yüzeye ilişkin yöntemler ve ana çözeltiye ilişkin yöntemler olarak iki temel başlık altında sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması.

Tez kapsamında voltametrik yöntemler ile çalışılmıştır.

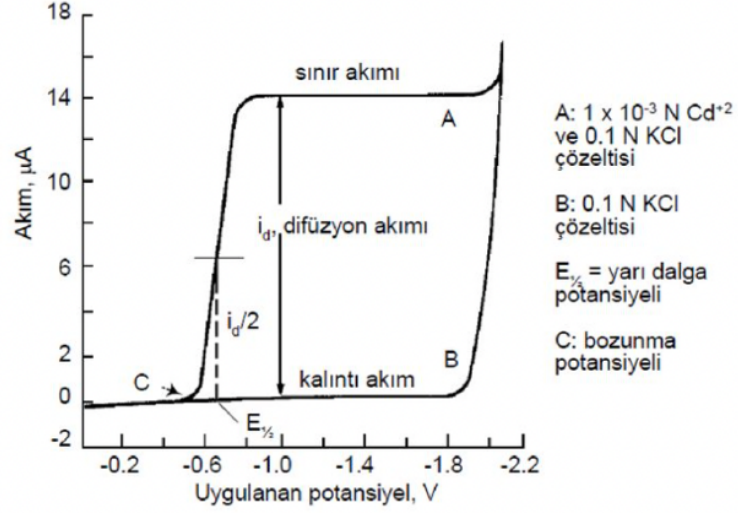
2.5.7. Polarografi

Polarografi, çalışma elektrodu olarak bir damlayan cıva elektrotunun kullanıldığı voltametrik yöntemdir. Potansiyele karşı akımın grafiğe geçirilerek elde edilen eğriye polarogram denilir. Bir elektroliz hücresindeki bir elektrotun potansiyelinin, içinden geçen akım üzerindeki etkisiyle ilgilenen elektroanalitik tekniktir. Polarografinin en önemli avantajlarından biri, iki veya daha fazla maddenin tek bir akım potansiyel eğrisi ile belirlenebilmesidir. Polarografik analiz, polinükleer aromatik halka sistemleri dahil olmak üzere konjuge çift veya üçlü bağlar içeren katı, sıvı veya gaz halindeki organik bileşiklerin yanı sıra oksimler, iminler, ketonlar, aldehitler nitro diazo bileşikleri ve halo ikameli bileşikler gibi bileşiklerin doğrudan belirlenmesi için kullanılabilir (82).

Polarografi, biyokimya ve farmasötik kimya gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hatta hidroliz, çözünürlük, kompleks oluşumu, absorpsiyon, kimyasal reaksiyon kinetiği ve elektrot reaksiyonlarının mekanizması gibi çok çeşitli konuları incelemek için kullanılmaktadır. Ancak, çalışma elektrotlarının ve kullanılan yöntemlerin çeşitliliği geliştirildikçe polarografinin kullanımı azalmaktadır (81) .

Şekil 2.12’de örnek bir polarogram verilmiştir. Polarografide çalışma elektrodunda maddelerin indirgenmesi ya da yükseltgenmesi ile akım oluşur. Eğer akım indirgenmeden oluşursa katodik akım, yükseltgenmeden oluşursa anodik akım denilir. Ortamda analit yokken bile hücrede bulunan safsızlıkların indirgenmesi, distile sudan gelen ağır metaller ve destek elektrolitteki safsızlıklar artık (kalıntı) akım adı verilen küçük bir akımın oluşmasına neden olur. Akımın büyüklüğü analitin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı ise sınır akım oluşur. Sınır akım, uygulanan belirli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı plato bölgesindeki akımdır. Sınır akım ile artık akım arasındaki farka kütle aktarımı difüzyon kontrollü olduğu difüzyon akımı denilir ve i_d ile gösterilir. Polarografide, difüzyon akımı ile analit derişimi doğru orantılı olduğu için nicel analizlerde kullanılır. Akımın, sınır akımının yarısına eşit olduğu potansiyele yarı dalga potansiyeli denilir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir. $E_{1/2}$, derişimden

bağımsız ve standart yarı hücre potansiyeli ile bağlantılıdır. Polarografide, $E_{1/2}$ maddeye özgü bir değer olduğu için nitel analizlerde kullanılır (83, 84).



Şekil 2.12. Örnek bir polarogram gösterimi (84).

İlkoviç denklemi, difüzyon akımı (i_d) ve polarize olmayan elektrotun derişimi ile ilgili polarografide kullanılan bir bağıntıdır (Eşitlik 2.1).

$$i_d = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C \quad (\text{Eşitlik 2.1})$$

i_d = Difüzyon akımı (μA)

607 = Faraday sabiti (Π), Hg yoğunluğu, vb. değerleri içeren çeşitli sayısal faktörlerin sabiti

n = Aktarılan elektronların sayısı (eq/mol)

D = Difüzyon katsayısı ($cm^2.sn^{-1}$)

m = Hg'nin akış hızı ($mg.sn^{-1}$) cinsinden ağırlığı

t = Damla ömrü (sn)

C = Derişim (M)

Polarografik bir analizde civa sütunun yüksekliği (h) sabit ise civanın akış hızı (m) ve damla ömründe (t) sabittir. Deney ortamının sıcaklığı da sabit ise difüzyon katsayısı da sabit olur (Eşitlik 2.2). Bu şartlar altında İlkoviç eşitliği;

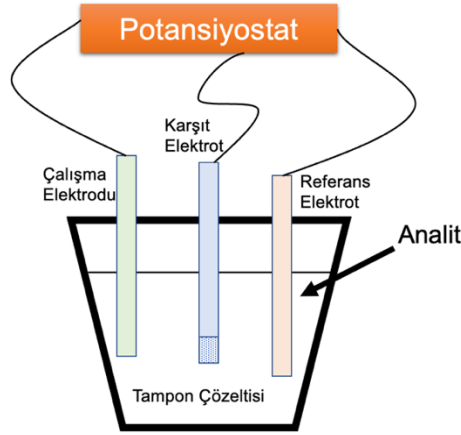
$$i_d = kC \quad (\text{Eşitlik 2.2})$$

şeklinde yazılabilir. Bu eşitlikte kullanılan C, analitin derişimi olup difüzyon akımı ile doğru orantılıdır. Bu eşitlik, polarografinin nicel analizlerde kullanılabilmesini sağlar.

2.5.8. Voltametrik Yöntemler

Voltametri, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın incelenmesidir. Analitik kimyada ve çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılan elektroanalitik yöntemler kategorisindedir (85).

Voltametrik yöntemler, potansiyel uygulanması sonucunda oluşan indirgenme ve yükseltgenme tepkimelerini, elektrot yüzeyindeki adsorpsiyon olaylarını ve elektron aktarım mekanizmalarını inceler. Yüksek hassasiyete sahip ve oldukça güvenilir yöntemlerdir. Voltametri, polarize olabilen bir çalışma, referans ve karşıt elektrot olmak üzere üç elektrotlu elektrokimyasal hücrelerden oluşur. Polarize olabilen bir çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına uygulanan potansiyelin çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasında ölçülmesi esasına dayanır. Şekil 2.13’de voltametricde kullanılan elektrokimyasal bir hücre ve bileşenleri bulunmaktadır (86, 87).



Şekil 2.13. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre.

Voltametrde uygulanan potansiyele karşı ölçülen akımın grafiğe geçirilmesiyle elde edilen grafiklere voltamogram denilir. Voltamogramlar kullanılarak tepkime mekanizmalarının kinetik, termodinamik ve analitik parametreleri açıklanabilir (81, 88).

Voltametik yöntemlerde elektrokimyasal tepkimelerin hepsinde olduğu gibi indirgenen (R) ve yükseltgenen (O) maddelerin derişimi ile elektrot potansiyeli arasında bir denge vardır. Bütün elektrokimyasal tepkimeler gibi voltametik analizlerde de Walther Nernst'in bulduğu eşitlik kullanılır (Eşitlik 2.3).



$$E = E^{\circ} + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{C_0}{C_R} \quad (\text{Eşitlik 2.3})$$

E° : İndirgenme / yükseltgenme tepkimeleri için standart potansiyel

R: Gaz sabiti ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T: Sıcaklık ($298,15 \text{ K}$, kelvin cinsinden)

n: Tepkimede transfer edilen elektron sayısı

F: Faraday sabiti (96487 coulomb)

C_0 : Yükseltgenen maddenin derişimi

C_R : İndirgenen maddenin derişimi

Değerler yerine konulduğunda Eşitlik 2.4 elde edilir.

$$E = E^{\circ} + \frac{0,059}{n} \log \frac{C_0}{C_R} \quad (\text{Eşitlik 2.4})$$

Voltametrik Yöntemlerde Kullanılan Elektrotlar

Bir elektrokimyasal hücrede çalışma, referans ve karşıt elektrot olmak üzere üç çeşit elektrot bulunabilir.

1) Çalışma (indikatör) Elektrodu:

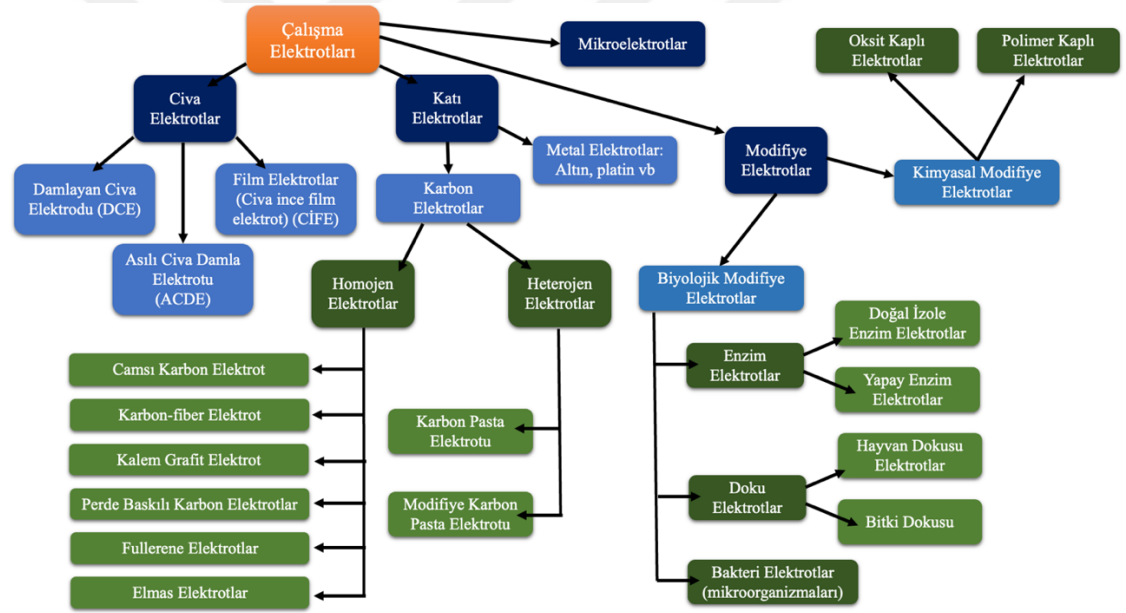
Üzerinde analitin yükseltgenme veya indirgenme tepkimelerinin gerçekleştiği ve potansiyeli zamanla değişen elektrottur. Potansiyelin değişimi potansiyostat cihazı ile ölçülür (79). Çalışma elektrodunun yüzeyinin kimyasal ve fiziksel özellikleri voltametrik yöntemlerin performansını belirler. Bu nedenle çalışma elektrotları sürekli geliştirilmektedir.

Çalışma elektrodu aşağıda listelenen özelliklere sahip olmalıdır.

- ✓ Analitin indirgenme yükseltgenme değişimlerine hızlı cevap vermeli,
- ✓ Tekrarlanabilirliği yüksek,
- ✓ Potansiyel aralığı geniş,
- ✓ Ohmik direnci düşük,
- ✓ Elektrot yüzeyi kolay temizlenir,
- ✓ Sinyal/gürültü oranı yüksek,

- ✓ Yüzey alanı küçük olmalı (birim yüzeye düşen akım şiddeti büyük olmalı),
- ✓ Tepkimeye girmemeli,
- ✓ Artık akımı küçük,
- ✓ Az maliyetli,
- ✓ Yeşil kimyaya uygun olmalıdır.

Bir çalışma elektrodu olarak iletken bir metal (platin veya altın gibi), civa film ile kaplanmış metal, yarı iletken bir metal (kalay oksit veya indiyum oksit), camı karbon, pirolitik grafit kullanılabilir. En sık kullanılan çalışma elektrotlarına örnek olarak civa, karbon ve soy metaller (özellikle platin ve altın) elektrotlar verilebilir (88, 89). Voltametrde kullanılan çalışma elektrotları Şekil 2.14’de verilmiştir. Ayrıca çalışma elektrotları ile biyosensörler de tasarlanabilmektedir (90, 91).



Şekil 2.14. Çalışma elektrotları.

Tez çalışmasında çalışma elektrodu olarak modifiye camı karbon elektrot (CKE) kullanıldığından bu elektrot ayrıntılı olarak incelenecektir.

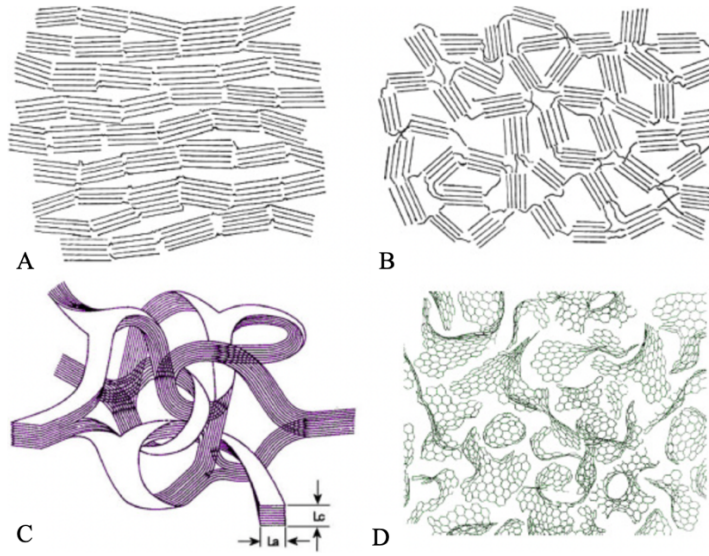
Camsı Karbon Elektrot

Karbon elektrotlar arasında en çok kullanılan çalışma elektrotu camsı karbon elektrottur (CKE). CKE yüzeyindeki gözenekler çok küçük olduğu için diğer karbon türlerinden daha çok tercih edilir.

CKE, Yamada ve Sato tarafından 1962 yılında ilk defa geliştirilmiştir. İçerisinde inert bir gaz bulunan fenol formaldehit reçinesini 300-1200 °C’de ısıtarak içine karbon yerleştirmişlerdir. Ayrıca, poliakrilonitrilin basınç altında 1000-3000°C’de ısıtılarak karbonizasyona uğratılması ile de elde edilebilir. CKE, inert malzemedan yapılmış elektrot gövdesi içine mikrometre boyutunda grafit tozu partiküllerinin sert bir yapıştırıcı madde ile sıkıştırılmasıyla oluşturulur (Şekil 2.15). Geliştirilen CKE, kimyasal tepkimeye girmez, fiziksel olarak dayanıklıdır, potansiyel aralığı geniştir, tekrarlanabilir, düzgün ve pürüzsüz yüzeyler elde edilir (83). CKE yüzeyi, grafitleşen (Şekil 2.16.A), grafitleşmeyen amorf karbonlar (Şekil 2.16.B), daha fazla kristalografik ayrıntı sağlamak için, grafen düzlemlerinin tercihen istiflendiği tek tek bireysel şeritler (Şekil 2.16.C), ve beşgenler, altıgenler ve yedigenler içeren kavisli karbon levha parçaları (Şekil 2.16.D) şeklinde gözlemlenir.



Şekil 2.15. Ticari olarak üretilen CKE.



Şekil 2.16. CKE'un yapısı; A) Grafitleşen amorf, B) Grafitleşmeyen amorf, C) Grafen şeritler ve D) Karbon levha parçaları. La: Düzlem içi mikro kristal uzunluk ve Lc: Düzlemler arası mikro kristal uzunluk (92).

CKE'da tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek ve aktivasyonu sağlamak için parlatma pedi yüzeyinde alümina yardımıyla mekanik cilalama yoluyla ön işlem uygulanır. Parlatma, yüzeyde kalmış safsızlıkları temizler. Kimyasal, elektrokimyasal, ısısal veya lazer uygulamaları ile de ön işlem yapılabilir. Analizi yapılacak maddeye ve kullanılan çözeltiye göre uygulanan ön işlem değişmektedir (77).

Aktivasyonun amacı, yüzeyde kalmış safsızlıkları temizlemek, yüzey alanını arttırmak, yüzeyde fonksiyonel grupları ve difüzyonla taşınmanın başladığı serbest keskin uçları sağlamak, mikro partikül oluşturmaktır. Yüzeydeki fonksiyonel gruplar, oksitlenme az olursa hidroksil, çok olursa karboksil veya kinolik yapıları oluşturur. Yani fonksiyonel gruplar yükseltgenme seviyesine göre değişir (93).

2) Referans Elektrot:

Referans elektrot, polarize olmayan davranışa sahip, analitin derişiminden bağımsız, kararlı, sabit ve bilinen bir potansiyele sahip olup çalışma elektrodunun potansiyelinin karşılaştırıldığı elektrottur.

Referans elektrot; tersinir, sabit potansiyele sahip, Nernst eşitliğine uyan, sıcaklıktan etkilenmeyen ve kolay hazırlanabilir olmalıdır.

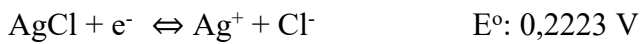
Referans elektrotlara örnek olarak aşağıdaki elektrotlar verilebilir (77, 88).

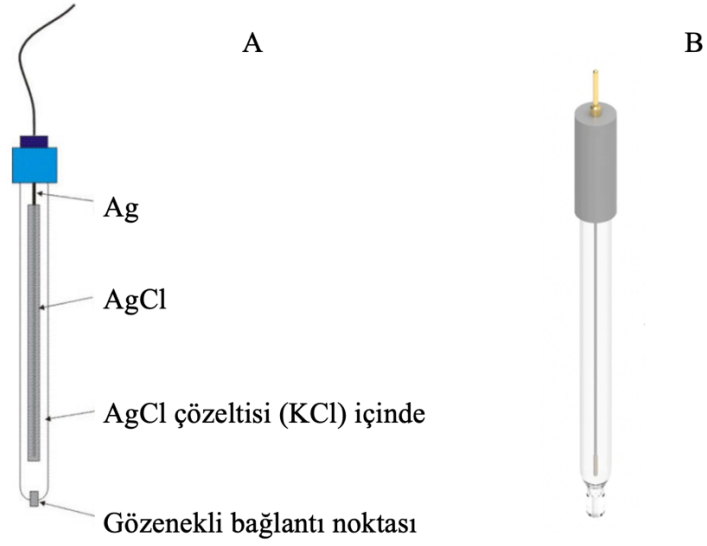
- Standart hidrojen elektrot (SHE)
- Gümüş/gümüş klorür elektrot (Ag/AgCl)
- Doygun kalomel elektrot (Hg/Hg₂Cl₂)
- Civa/Civa (I) sülfat elektrot

Tez çalışmasında gümüş/gümüş klorür elektrot (Ag/AgCl) referans elektrot olarak kullanıldığından ayrıntılı olarak incelenecektir.

Gümüş/gümüş klorür elektrot (Ag/AgCl)

Ag bir telin, AgCl ile doyurulmuş potasyum klorür (KCl) çözeltisine daldırılmasıyla oluşturulur (Şekil 2.17). Tepkime denklemi ve 25°C’ da standart hidrojen elektroda göre potansiyeli aşağıda verilmiştir.





Şekil 2.17. A) Ag/AgCl elektrodun yapısı, B) Ticari olarak üretilen Ag/AgCl elektrot.

Ag/AgCl elektrotlar, geniş sıcaklık aralığına sahip ve yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır. Ayrıca, susuz ortamlarda kullanılabilir. Analit ile tepkimeye girmezler. Böylece, elektrotla analit çözeltisi arasındaki kılcal boru tıkanmaz.

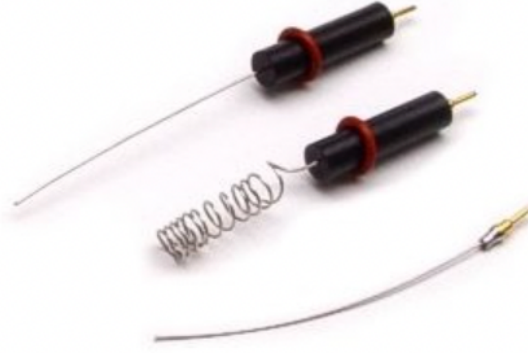
3) Karşıt (yardımcı) Elektrot:

Gerekli akımın çözelti içerisinde geçerek çalışma elektroduna ulaşmasını sağlar. Bu özelliği ile akım taşıyıcı elektrot olarak da adlandırılır. Tepkimeye girmeyen, iletken ve inert özellikte metallerdir.

Karşıt elektrotlara örnek olarak aşağıdaki elektrotlar verilebilir (94-96).

- Platin tel
- Titanyum tel
- Tungsten tel
- Grafit tel
- Civa havuzu

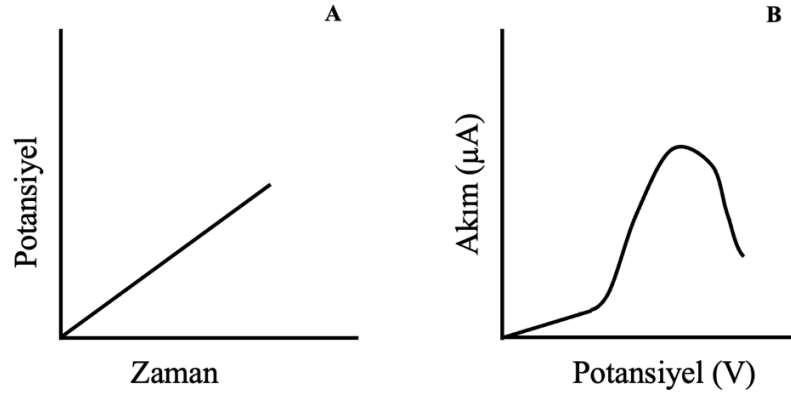
Tez çalışmasında platin tel karşıt elektrot olarak kullanılmıştır (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Ticari olarak üretilen platin tel.

2.5.8.1. Doğrusal Taramalı Voltametri

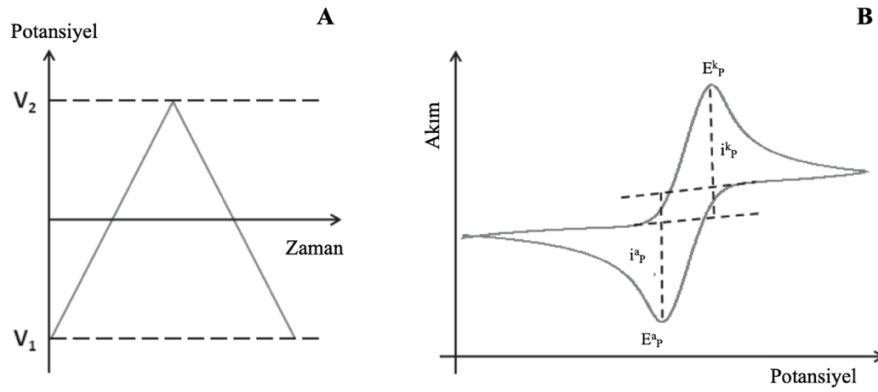
Doğrusal taramalı voltametri (DTV), belirlenen bir potansiyel aralığında ve tarama hızında tek yönlü olarak yapılan potansiyel taraması ile gerçekleştirilen yöntemdir. İndirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinin mekanizmasını aydınlatmada kullanılır. Zamana karşı potansiyel doğrusal olarak değişir (83, 88, 94). DTV için örnek bir dalga formu ve voltamogram Şekil 2.19’da gösterilir.



Şekil 2.19. A) DTV için potansiyel dalga formu, B) Genel bir DT voltamogramı (97).

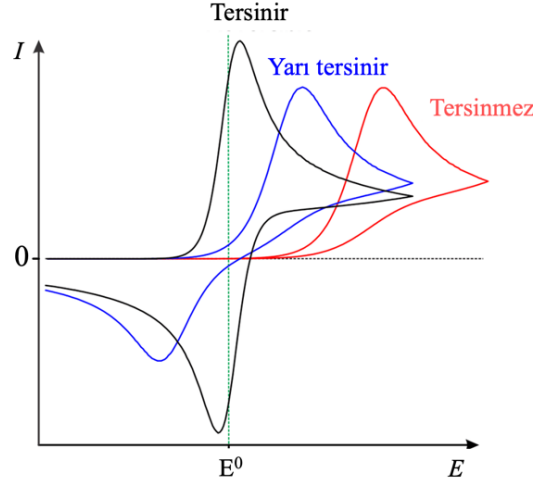
2.5.8.2.Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri (CV), nicel analiz için nadiren kullanılan ancak nitel analizler, elektrot reaksiyon mekanizmalarının ve elektron transfer kinetiklerinin belirlenmesi gibi çalışmalarda yaygın olarak kullanılan voltametri yöntemidir (98). Ayrıca, elektrot yüzeyinde oluşan olayların adsorpsiyon ya da difüzyon kontrollü olup olmadığı tarama hızı değiştirildiğinde pik yüksekliklerinin tarama hızına verdiği cevaplar dikkate alınarak CV ile belirlenir. Tarama aralığı boyunca potansiyel yükseltgenme yönünde önce artırılır ve aynı koşullar altında indirgenme yönünde azaltılır. Potansiyel zaman ile doğrusal olarak değişir (Şekil 2.20.A). Potansiyel taraması (Şekil 2.20.B) bir ya da birden çok döngü halinde gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.20. A) CV’de potansiyel dalga formu ve B) Genel bir CV voltamogramı (99).

Potansiyel $E_{1/2}$ 'den sonra artırıldığında, akım sürekli olarak izlenir. Potansiyel tarama daha sonra tersine çevrilir ve eşit oranda başlangıç noktasına geri döndürülür. Değişen potansiyel değerleri akımdaki değişikliklere karşı grafiğe geçirilerek dönüşümlü voltamogramlar oluşturulur. Elektrot reaksiyonu tersine çevrilebilirse, görülen oksidasyon akımı, indirgeme ürününün geri oksitlenecek elektrot yüzeyinde hala mevcuttur. Tersinir değilse, yani elektrot reaksiyonunun ürünü başka bir tür oluşturmak üzere reaksiyona girmişse, sonuç Şekil 2.21'de gösterilmektedir (100, 101).



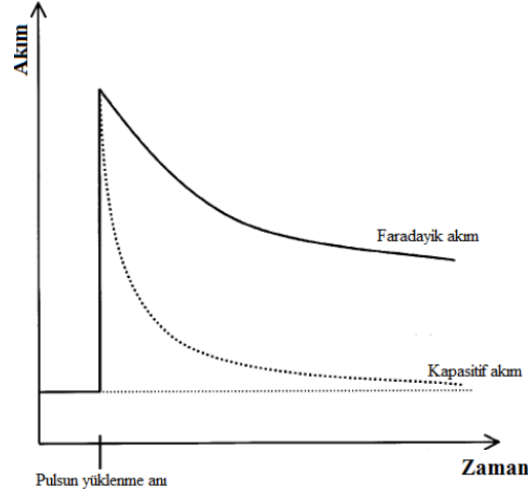
Şekil 2.21. CV’de tersinir, yarı tersinir ve tersinmez dönüşümlü voltamogramlar (101).

Voltamogramın pozitif alanında uygulanan potansiyel anodik potansiyel, ölçülen akım anodik akım ve elde edilen pikler anodik piklerdir olarak tanımlanır. Negatif kısımda uygulanan potansiyel katodik potansiyel, ölçülen akım katodik akım ve elde edilen pikler katodik pikler olarak adlandırılır (102).

2.5.8.3. Puls Voltametrisi

Puls voltametri yöntemleri, CV’nin duyarlılığını, hızını ve analiz sonucu elde edilen bilgileri arttırmak amacıyla geliştirilmiştir. Potansiyel darbeler şeklinde uygulanır. Pulsların uygulanma şekli ve akımın ölçüldüğü zamanların farklılaşması ile alt dallara ayrılır (88, 94).

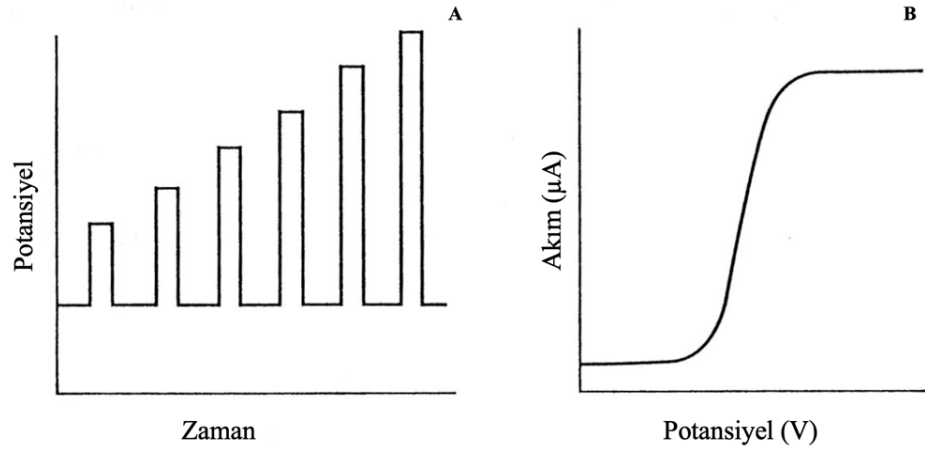
Elektrokimyasal çalışmalarda, faradayik olmayan (kapasitif) akımın en düşük, faradayik akımın en yüksek olması beklenir. Puls voltametrisinde, çalışma elektroduna pulslar belirli aralıklar ile uygulanır ve öncesi ya da sonrasında akım ölçüldüğü için faradayik akımın kapasitif akıma oranı artar (Şekil 2.22) (77, 84, 103).



Şekil 2.22. Çalışma elektroduna potansiyel pulslar uygulandığında zamana karşı faradayik ve kapasitif akımın değişimi (84).

2.5.8.3.1. Normal Puls Voltametrisi

Normal puls voltametrisinde (NPV), pulslar potansiyel tarama boyunca sabit bir frekansla uygulanır ve akım uygulanan puls bitiminden hemen önce ölçülür (Şekil 2.23.A). Akım-potansiyel eğrileri sigmoidaldır (Şekil 2.23.B) (97, 104).



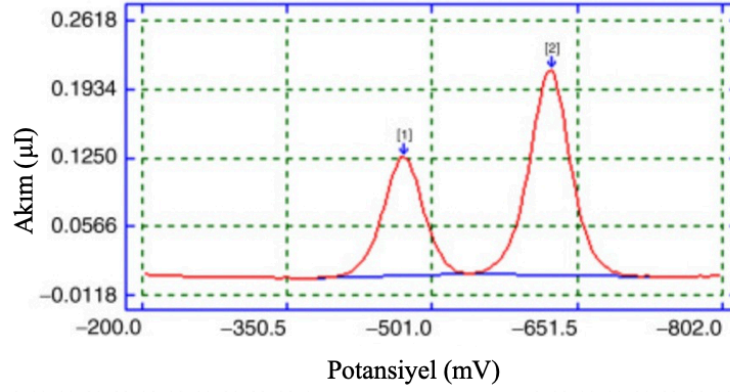
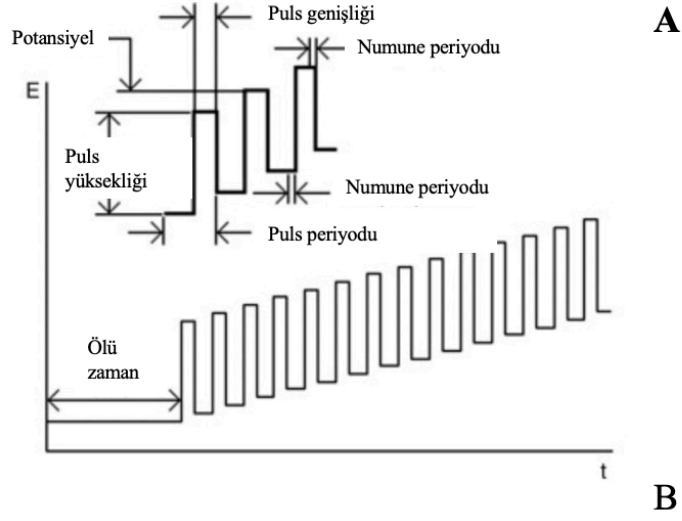
Şekil 2.23. A) NPV için potansiyel dalga formu, B) Genel bir NP voltamogramı (104).

2.5.8.3.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisi (DPV), doğrusal olarak artan potansiyelin pulslar şeklinde uygulanması sonucu akımın uygulamadan önce ve sonra ölçülerek aradaki farkın kaydedilmesi ile elde edilir (Şekil 2.24.A) (105). Analiz edilecek maddenin derişimi pik alanı ile doğru orantılıdır. Hassasiyeti yüksek ve gözlenebilme sınırı düşük olduğundan çok sık tercih edilen yöntemdir (88).

Aynı puls değeri için iki farklı akımın ölçülerek farkının alınması voltametri yöntemlerinde istenildiği gibi kapasitif akımı azaltır (77). Bu sayede, nano molar ve mikro molar derişimde çalışılması sağlanır. Ayrıca, iki farklı pik potansiyeline sahip karışımdaki maddelerin eş zamanlı analizi de yapılabilir.

DPV, belirli bir indirgenme yükseltgenme tepkimesi için bir pik oluşumunun gözlemlendiği doğrusal bir voltamogramın birinci türevine benzer bir diferansiyel tekniktir. DPV'de pik potansiyeli, E_p , yaklaşık olarak $E_{1/2}$ ile tanımlanabilir. E_p , pikin tabanı genişledikçe ve yüksekliği azaldıkça $E_{1/2}$ 'den sapar. Bu nedenle DPV, ölçülen akımlar ve uygulanan potansiyeller arasındaki farkların bir grafiğidir ve pik şeklindedir (Şekil 2.24.B) (104, 105).



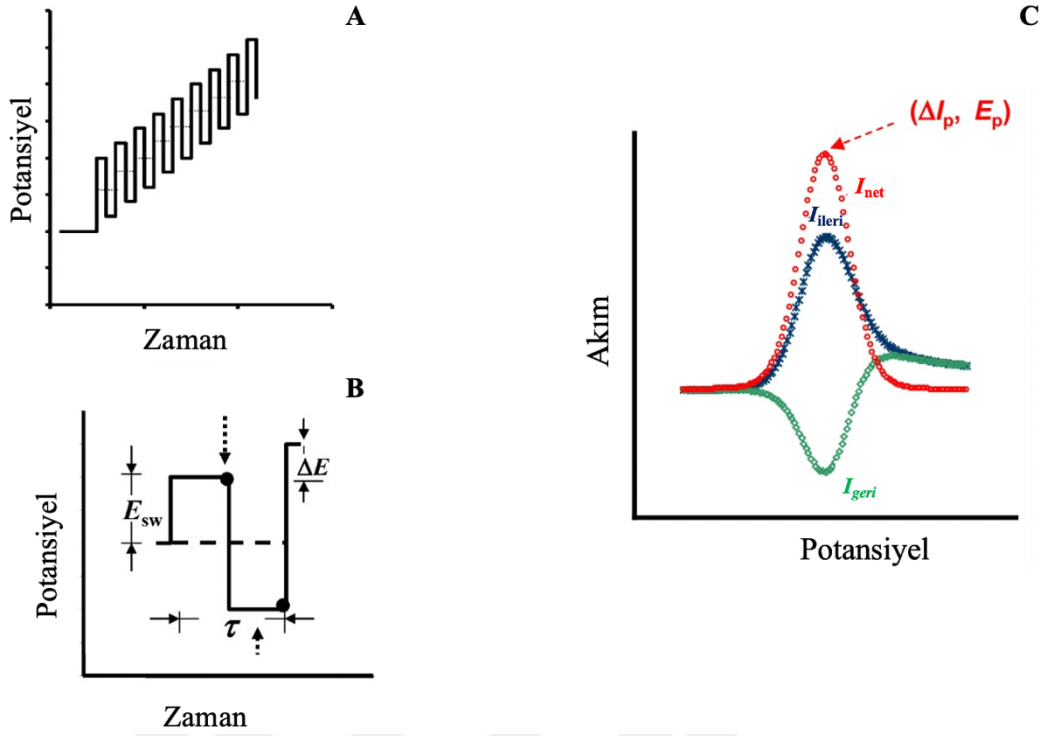
Şekil 2.24. A) DPV için potansiyel dalga formu, B) Genel bir DP voltamogramı (104).

2.5.8.3.3. Kare Dalga Voltametrisi

Kare dalga voltametrisi (KDV), sinyal-gürültü oranının tarama hızının karekökü kadar artması ilkesine dayalı olarak kullanılan çok hassas bir voltametrik yöntemdir. Sinyaldeki bu artış, puls uygulaması ile mevcut ölçüm arasındaki zamanın bir fonksiyonudur. Daha özel olarak, KDV için zaman potansiyele bağlıdır, bu nedenle potansiyel arttığında, zaman azalır ve ölçülen faradaik akım artar, voltamogramda daha keskin ve tanımlanmış pikler oluşur (106). KDV'de yöntemin tarama hızının çok yüksek olması analiz süresini kısaltırken, ölçülen akımın oldukça yüksek olması düşük miktarlardaki analitlerin analizine olanak sağlar.

KDV, kapasitif akımı ve gürültüyü izole etmek için küçük genlikli pulslar ile uyarma potansiyelindeki değişiklikleri, bir temel potansiyel etrafındaki küçük darbeler ile sınırlar. KDV'de uygulanan potansiyel, kare şeklindeki potansiyel pulslarla modifiye edilmiş bir merdiven rampasından oluşur (Şekil 2.24.A ve 2.24.B). Her bir potansiyel uygulanmasından sonra oluşan faradayik akım, her bir voltaj değişikliğinin sonunda ölçülür ve potansiyel pulslar arasındaki akımdaki değişikliği, Δi , uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Pozitif ve negatif potansiyel adımları sırasında akan faradayik akımların polaritesi zıt iken, çoğunlukla artan voltajdan kaynaklanan akımın polaritesi değişmez. Böylece, faradayik sinyalden kaynaklanan ileri akımın bileşeni yükseltilirken, geri akımından kaynaklanan bileşen azaltılır. Δi , elektroaktif türlerin yüzey derişimlerdeki değişiklikle doğru orantılıdır ve her elektroaktif analit için maksimum akım farkı E^0 yakınında meydana gelir (107).

KDV'de uygulanan potansiyel, kare şeklindeki potansiyel pulslarla modifiye edilmiş bir merdiven rampasından oluşur (Şekil 2.25.A ve 2.25.B). Merdiven rampasının her adımında, iki eşit yükseklikte ve zıt yönlü potansiyel puls uygulanır. Son iki potansiyel pulsu, KDV'de tek bir potansiyel çevrimini tamamlar (Şekil 2.25.C). KDV, birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkına basamaklı adım yüksekliği denilir ve ΔE_s olarak adlandırılır. Kare dalgaının genliği (E_{sw}), her dalgaının üst ve alt noktaları arasındaki farkın yarısıdır. Tek bir potansiyel uygulaması sırasında, elektrot tepkimesi hem anodik hem de katodik olabilir, böylece elektrot mekanizması hakkında bilgi sahibi olunur. Puls genişliği, $t_p = \tau/2$ 'dir. Potansiyelin frekansı ise $f = 1/\tau$ ile temsil edilir. Frekans arttıkça periyod azalır, hassasiyet ile kare dalga pik akımı artar (108, 109).



Şekil 2.25. A) ve B) KDV için potansiyel zaman dalga formu, C) Genel bir KD voltamogramı (108, 109).

2.5.8.4. Sıyırma Voltametrisi

Sıyırma voltametrisi (SV), belirlenen potansiyel ve süre aralığında, ön deriştirme basamağında analitin karıştırılarak ya da elektrolitik olarak elektrot yüzeyinde biriktirilmesi ve voltametrik tekniklerden biriyle sıyırılması (çözeltiye tekrar geçmesi) ile ölçülmesidir. Sinyal/gürültü oranını artırır, gözlenebilme sınırını düşürür ve böylece duyarlılığı artırır. Potansiyel kontrollü bir yöntemdir (81).

SV'de optimize edilmesi gereken önemli parametreler; biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi ve analitin derişimidir. Sıyırma teknikleri üç aşamadan oluşur: Biriktirme, durulma ve sıyırma. Elektrot potansiyeli, biriktirme süresi ve karıştırma hızı analiz sonuçlarını etkilemektedir. Biriktirme basamağı ve sıyırma işlemlerinde çalışılacak potansiyel aralığı ile hangi sıyırma tekniğinin kullanılacağı belirlenmektedir. Dört çeşit SV vardır (76, 95, 103, 110).

- 1) **Anodik sıyırma voltametrisi:** Anodik sıyırma voltametrisi (ASV), en sık kullanılan sıyırma tekniğidir. Biriktirme basamağında analit elektrot üzerinde indirgenir ve amalgam verecek şekilde elektrolizlenir. Daha sonra, yükseltgenerek çözeltiye geri difüzenir. Potansiyel taraması anodik bölgede yapılır. Aynı anda birden çok maddenin analizine olanak sağlar, elde edilen pikler simetrik ve keskindir.
- 2) **Katodik sıyırma voltametrisi:** Katodik sıyırma voltametrisi (KSV), potansiyel taraması katodik bölgede yapılan sıyırma tekniğidir. Biriktirme basamağında analit elektrot üzerinde yükseltgenir ve çözünmeyen bir film oluşturur. Daha sonra, analit negatif bölgede indirgenerek çözeltiye karışır.
- 3) **Adsorptif sıyırma voltametrisi:** Analitin biriktirme işlemi seçilen potansiyelin indirgenme veya yükseltgenme potansiyellerinden çok daha küçük bir potansiyelde yapılıyorsa, yani biriktirme elektron aktarımı yolu ile yapılmıyorsa adsorptif sıyırma voltametri (AdSV) adını alır. Eğer sıyırma işlemi katodik bölgede yapılırsa katodik adsorptif sıyırma voltametrisi (KAdSV), anodik bölgede yapılırsa anodik adsorptif sıyırma voltametri (AAdSV) denilir.

2.5.9. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (111, 112)

Empedans, bir devrenin elektrik akımı akışına direnme yeteneğidir ve empedansın frekansa karşı çizildiği tekniğe elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) (83). EIS kavramı 100 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır (113). Empedans spektroskopisinin temeli, 19. yüzyılın sonlarında Oliver Heaviside tarafından atılmıştır (114). Bu kadar uzun bir geçmişe sahip olmasına rağmen, potansiyostatları ve frekans tepki analizörlerini birleştiren aletlerin geliştirilmesine atfedilen elektrokimyasal ölçüm için bir araç olarak keşfedilmesi 1970'leri bulmuştur. O zamandan beri, EIS sürekli olarak geliştirilmiştir.

Empedans kavramı, Ohm yasası tarafından potansiyel (V) ve akım (I) oranı olarak tanımlanan dirençten (R) türetilmiştir. Ohm yasası, sinüzoidal akım ve potansiyel arasındaki frekansa ve zamana bağlı faz kaymasını hariç tutan basit bir direnç kavramıdır.

Son on yılda, EIS karbonhidrat-protein, protein-protein ve protein-DNA özellikle tekniğin basitliği, maliyet etkinliği ve duyarlılığı nedeniyle farklı türdeki biyomoleküler etkileşimleri incelemek için yoğun bir şekilde kullanılmıştır (115-117). Bu aynı zamanda çeşitli hastalık biyobelirteçlerinin, bakterilerin ve virüslerin tespitinde bir biyosensör yöntemi olarak kullanılmasına yol açmıştır (118). Biyosensör için kritik konulardan biri, serum örneğindeki hedeflenmemiş proteinler, lipidler, elektrolitler vb. gibi orijinal örnekteki arka plan gürültüsüdür. Bu zorluğun üstesinden gelmek için örnek ya saflaştırılmalı ya da seyreltilmelidir. Seyreltme tekniği, arka plan gürültüsünü azaltmak için iyi bir yoldur; ne yazık ki, ilgilenilen analit de seyrelecektir. EIS ile nanomolardan atomolar aralığa kadar çok küçük örnek derişimleri analiz edilebilmektedir (119).

2.6. Analitik Yöntem Validasyonu (96, 120-122)

Analitik yöntem validasyonu, bir analizin bilimsel olarak bütünlüğünün ve uygunluğunun kanıtlanması için yöntemin kesinliğinin, güvenilirliğinin, tutarlılığının ve kalitesinin belirlenen analiz koşullarında uygun olduğunu gösterir. Yöntem validasyonu için validasyon parametreleri olarak Uluslararası Uyum Konferansı (ICH), Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Uygulamaları Kurumu (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi uluslararası otoritelerce hazırlanan kılavuzlarda ya da farmakopelerde belirtilen çeşitli test ve ölçümler kullanılır. Bir analitik yöntem geliştirildiğinde, yöntem rutin analizlere uygulanmadan önce, farklı valide edilmiş yöntemin optimizasyon şartlarında herhangi bir değişiklik olduğu zaman ve orijinal yöntem değiştirildiğinde geliştirilen yöntem valide edilir ya da tekrar validasyonu yapılır.

Yöntem validasyonu parametreleri FDA tarafından; kararlılık, özgünlük (seçicilik), doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık (gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LLOQ)), sağlamlık, tutarlılık ve geri kazanım olarak sıralanmaktadır (123).

Bu tez çalışmasında, incelenen validasyon parametreleri aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Özgünlük

Sadece belirli bir analiz maddesi için geliştirilen yöntemin, analiz ortamında bulunan diğer bileşenler varlığında girişim olmadan tayin edebilme özelliğidir. Bir biyolojik matriste, endojen bileşikler, metabolitler, ayrışma ve bozunma ürünleri, safsızlıklar, yardımcı maddeler ve ilaçların birlikte uygulanması girişim yapabilir. Sayısal olarak bir değeri bulunmaz. Ayrıca, eğer geliştirilen yöntem birden çok maddeyi analiz etmek için kullanılırsa tayin edilecek maddelerin de birbirleri ile girişim yapmaması istenir. Yöntemin özgünlüğü, analiz ortamındaki sonuçlar ile girişim etkisi yapabilecek herhangi bir maddenin olmadığı ortamdan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak değerlendirilir.

Doğrusallık

Doğrusallık, analitin belirli bir aralıktaki farklı derişimlerinde ölçülen sinyalin doğru orantılı olmasıdır. En düşük alt tayin sınırı (LLOQ) dahil en az beş farklı derişimde üç tekrarlı alınan sonuçların ortalaması grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Kalibrasyon eğrisinin doğru denklemi ($y=ax+b$) oluşturulur ve doğru denkleminde ait eğim (a), kesişim (b), tanımlayıcılık katsayısı (r) ve regresyon katsayısı (r^2) hesaplanarak regresyon analizi yapılır. Doğrusallık, r^2 değerinin 1'e ne kadar yakın olduğu ile değerlendirilir. Ayrıca, a ve b değerlerine ait standart hatalar hesaplanır.

Kalibrasyon eğrisini oluşturan derişim aralığı doğrusallık aralığı olarak adlandırılır ve yöntemin geçerli olduğu en düşük ve en yüksek derişimleri kapsar.

Doğruluk

Doğruluk, geliştirilen yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek değere veya referans olarak kabul edilen değere ne kadar yakın olduğunu belirtir. Doğruluk sonuçları üç farklı yol ile değerlendirilebilir.

1. Bağıl hata (BH) hesaplanır. Düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı derişimde en az beş tekrarlı gün içi (intra-day) ve arka arkaya en az beş gün tekrarlı günler arası (inter-day) analizler yapılır. Hesaplanan sonuçlar ile gerçek değerler karşılaştırılır (Eşitlik 2.5).

$$\%BH = \frac{\text{Hesaplanan değer ortalaması} - \text{Gerçek değer}}{\text{Gerçek değer}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.5})$$

2. Geliştirilen yöntem sonuçları kaynaklardaki geçerliliği otoriteler tarafından kabul edilmiş yöntem sonuçları ile karşılaştırılır.
3. Standart maddenin eklenmesi ile hazırlanan çözeltilerin % geri kazanım değerleri hesaplanır.

Kesinlik

Yöntemin kesinliği, analiz sonuçlarının birbirine olan yakınlıklarını (dağılım derecesi) yani sonuçların tekrarlanabilirliğini gösterir. Optimize edilen koşullar altında doğrusal aralıkta bulunan üç farklı derişimde hazırlanan örneklerin gün içi ve günler arası tekrarlı analizleri yapılır ve bağıl standart sapmaları (BSS) hesaplanır. Ayrıca ortalamaya göre standart sapmanın % kaçlık değişime uğradığı belirlenir.

Ayrıca, doğrusal aralığa giren belirli bir derişimde hazırlanan örnekten arka arkaya 10 tekrarlı ölçüm alınıp BSS hesaplanarak sistem tekrarlanabilirliği de kontrol edilir (Eşitlik 2.6).

$$\%BSS = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Hesaplanan değer ortalaması}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.6})$$

Duyarlılık

Gözlenebilme sınırı (LOD), analitik bir yöntemle analitin nitel olarak tayin edilebilen ama nicel olarak bir anlam ifade etmeyen derişimdir. LOD üç farklı yaklaşım ile belirlenebilir.

1. **Sinyal/gürültü (S/G) oranı:** Zemin gürültüsünün hesaplanabildiği analitik yöntemlerde tercih edilir. Bilinen düşük derişimli örneklerden ölçülen değer ile kör çözeltiye ait değerler karşılaştırılarak tayin edilebilecek en düşük derişim bulunur. LOD değeri, S/G'nün 3 olduğu derişim değeri olarak kabul edilir. S/G değeri, cihaza, analiz ortamına vb. bağlı olarak değişir.
2. **Gözleme dayalı:** Düşük derişimli analit çözeltileri hazırlanır, ölçülür ve tayin edilip edilmemesi değerlendirilir.
3. **Standart sapmaya dayalı:** Alınan sinyalin standart sapması (s) ve kalibrasyon eğrisinin eğimi (m) ile hesaplanır (Eşitlik 2.7).

$$LOD = \frac{3 \times \text{Standart sapma}}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.7})$$

En düşük alt tayin sınırı (LLOQ), analitik bir yöntemle örnekteki analitin kabul edilebilir nicel değerler verebilen optimize edilen koşullar altında tayin edilebilecek en düşük derişimidir. LLOQ üç farklı yaklaşım ile belirlenebilir.

1. **Sinyal/gürültü (S/G) oranı:** Zemin gürültüsünün bulunduğu analitik yöntemlerde S/G oranı bilinen düşük derişimli örneklerden ölçülen analit sinyalinin kör çözeltiye ait sinyal ile karşılaştırılması ile bulunur. LLOQ değeri, S/G'nün 10 olduğu derişim değeri olarak kabul edilir.
2. **Gözleme dayalı:** Bilinen derişimdeki analitten uygun kesinlik ve doğrulukta en düşük derişiminin bulunmasıdır.

- 4. Standart sapmaya dayalı:** Alınan sinyalin standart sapması (s) ve kalibrasyon eğrisinin eğimi (m) ile hesaplanır (Eşitlik 2.8).

$$LLOQ = \frac{10 \times \text{Standart sapma}}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.8})$$

Tutarlılık

Yöntemin tutarlılığı, geliştirilen yöntemin farklı analizci, farklı cihaz veya farklı laboratuvar koşullarında yeniden uygulanabilirliğinin derecesidir. Her bir analizden elde edilen sonuçlar arasında fark olup olmadığı istatistiksel olarak hesaplanır.

Geri Kazanım

Geri kazanım, biyolojik matrikse (plazma, idrar gibi) eklenen ve çeşitli tüketme tekniklerinden sonra analitin analizi sonucunda elde edilen sinyal ile analitin saf standart çözeltisinin analizinden elde edilen sinyalin karşılaştırılmasıdır. Geri kazanım sonucu kesin, doğru ve verimli olmalıdır. Geri kazanım çalışması için düşük, orta ve yüksek üç farklı derişimde hazırlanan örnekler, tüketme işleminden sonra elde edilen sinyal ile tüketilmeyen standart maddenin sinyali karşılaştırılır.

Stabilite

Çözeltilerin, belirlenen koşullar ve sürede bekletilip analiz edilmesinden sonra alınan sinyal değerlerinin başlangıç değerleri ile karşılaştırılması sonucunda stabilite belirlenir.

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Cam hücre BASi® - MR 1208
- Çalışma elektrodu (CKE, çap: 3 mm) BASi® - MF 2012
- Damla şekil analizörü KRUSS DSA100 (Hamburg, Germany)
- Derin donduruculu buzdolabı Bosch
- Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrofotometre Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10 (Waltham, MA, USA)
- Hassas terazi Ohaus Instruments (Shanghai, China)
- İnkübatör EN 055/120 – Nüve (Ankara, Turkey)
- Parlatma – cilalama seti BASi® - MF 2060
- pH metre Mettler-Toledo pH/ion S220 pH meter (Switzerland)
- Potansiyostat – galvanostat sistemi Ivium Compactstat potentiostat (Netherlands)
- Raman spektrometre JASCO NRS-4500 Confocal Raman Microscope
- Referans elektrot (Ag/AgCl) BASi® - MF 2052
- Santrifüj cihazı Nüve NF-200 (Ankara, Turkey)
- Taramalı elektron mikroskobu SEM, TESCAN GAIA 3, (Brno – Kohoutovice, Czech Republic)
- Termal çalkalayıcı Thermo-Shaker (Biosan TS-100)
- Ultrasonik banyo J.P. Selecta (Barcelona, Spain)
- UV lamba UVP-B 100 AP – Analytik Jena US LLC (Canada)

- Vorteks karıştırıcı ISOLAB Laborgeräte GmbH (Eschau, Germany)
- Yardımcı elektrot (Pt tel, 7.5 cm) BASi® - MW 1032

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıktadır ve herhangi bir ön saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanılmıştır.

- 1H-benzotriazol Sigma-Aldrich
- 2-hidroksi-2-metil propisfenon Sigma-Aldrich
- 2-hidroksietil metakrilat Sigma-Aldrich
- 3-(trimetoksisilil) propil metakrilat Sigma-Aldrich
- Amonyak Merck
- Anilin Sigma-Aldrich
- Asetik asit Sigma-Aldrich
- Asetonitril Merck
- Dimetil sülfoksit Merck
- Etanol Sigma-Aldrich
- Etilen glikol Merck
- Etilen glikol dimetakrilat Sigma-Aldrich
- Hidroklorik asit Merck
- Lanreotid Sigma-Aldrich
- Metakriloil klorür Sigma-Aldrich
- Metanol Sigma-Aldrich
- N-metakriloil-L-aspartik asit Sigma-Aldrich
- Oktreotid Sigma-Aldrich
- Polivinil alkol Sigma-Aldrich
- Potasyum ferrisiyanür Merck
- Potasyum ferrosiyanür Merck
- Potasyum klorür Sigma-Aldrich

• N-metakriloil-L-glutamik asit	Sigma-Aldrich
• Sodyum asetat trihidrat	Sigma-Aldrich
• Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich
• Somatostatin	Sigma-Aldrich
• Setiltrimetilamonyum bromür	Merck
• Tetraetoksisilan	Merck
• Ticari insan serumu	Sigma-Aldrich
• Trietilamin	Sigma-Aldrich

3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler

• Balon joje	5-50 L pyreks®
• Eppendorf tüp	Polipropilen, 1,5 - 2 mL
• Mikropipet ucu	Isolab
• Otomatik mikropipet	Eppendorf AG (Germany)

3.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Sertifikalarında belirtildiği gibi -20 °C’de saklanan SOM, OC ve LAN etkin maddelerinden hazırlanan stok çözeltilerinin ve MAAsp, ANI ve MAGA monomer çözeltilerinin buzdolabında 1 ay boyunca kararlı olduğu bulunmuştur. Bu nedenle hazırlanan stok çözeltiler buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

SOM stok çözeltisi (1,0 mM): 8,0 mg standart SOM tartılıp 5 mL’lik balon jojeye alınmış üzerine yaklaşık 2 mL distile su eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra hacim distile su ile 5 mL’ye tamamlanmıştır. Tüm seyreltmeler distile su ile yapılmış ve günlük olarak hazırlanmıştır.

OC stok çözeltisi (1,0 mM): 5,1mg standart OC tartılıp 5 mL’lik balon jojeye alınmış üzerine yaklaşık 2 mL distile su eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra hacim distile su ile 5 mL’ye tamamlanmıştır. OC çözeltileri 20:80 (h:h) metanol:0,1M pH 5,2 asetat tampon (destek elektrolit) çözeltisi ile seyreltilerek günlük olarak hazırlanmıştır.

LAN stok çözeltisi (1,0 mM): 5,5 mg standart LAN tartılıp 5 mL’lik balon jojeye alınmış üzerine yaklaşık 2 mL distile su eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra hacim distile su ile 5 mL’ye tamamlanmıştır. Tüm seyreltmeler distile su ile yapılmış ve günlük olarak hazırlanmıştır.

N-metakriloil-L-aspartik asit (MAAsp) (1,0 mM): 4,0 mg MAAsp tartılıp 5 mL’lik balon jodede distile su ile çözülerek hazırlanmıştır.

Anilin (ANI) (0,1 mM): 1,0 M derişik anilin çözeltisinden 0,9 mL alınıp distile su ile 100 mL’ye tamamlanarak hazırlanmıştır ve koyu renkli şişede buzdolabında saklanmıştır.

N-metakriloil-L-glutamik asit (MAGA) (1,0 mM): 10,80 mg MAGA tartılıp 5 mL'lik balon jode distile su ile çözölerek hazırlanmıştır.

3.4.2. Girişim Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Plazmada bulunan dopamin (DOP), askorbik asit (AA), KCl ve Na₂SO₄'ın 10,0 mM'lık stok çözeltileri saf suda hazırlanıp girişim çalışmaları için kullanılmıştır.

3.4.3. Destek Elektrolit Çözeltisinin Hazırlanması

Elektrokimyasal analizlerde 0,1 M pH 5,2 asetat tampon çözeltisi destek elektrolit olarak kullanılmıştır. 21,8 g CH₃COONa tartılmış 1 L balon jodeye alınıp bir miktar distile suda çözölmüştür. Daha sonra üzerine 2,85 mL CH₃COOH ilave edilmiş ve distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Asetat tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra pH'sı 1,0 M HCl veya 1,0 M NaOH kullanılarak 5,2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon çözelti buzdolabında saklanmıştır.

3.4.4. Potasyum Ferrisiyanür/Ferrosiyanür Çözeltisinin Hazırlanması

Elektrokimyasal ölçümlerde 5,0 mM potasyum ferrisiyanür/ferrosiyanür ([Fe(CN)₆]^{3-/4-}) çözeltisi redoks probu olarak kullanılmıştır. 5,0 mM'lık potasyum ferrisiyanür çözeltisi için, 1,6463 g K₃[Fe(CN)₆] tartılır, 0,1 M KCl çözeltisinde çözölür ve 50 mL'ye tamamlanmıştır. 5,0 mM'lık potasyum ferrosiyanür çözeltisi ise 2,1120 g K₄[Fe(CN)₆] tartılmış, 0,1 M KCl çözeltisinde çözölmüş ve 50 mL'ye tamamlanmıştır. Ayrı ayrı hazırlanan 5'er mM'lık potasyum ferrisiyanür ve potasyum ferrosiyanür çözeltilerinden 5'er mL alınmış 100 mM KCl ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan ferrisiyanür/ferrosiyanür çözeltisinin buzdolabında 1 hafta süreyle dayanıklı olduğu görölmüştür.

3.4.5 Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması ve Analizleri

SOM içeren Somatosan® ampul ve OC içeren Sandostatin® ampul Ankara'daki serbest eczanelerden, LAN içeren Somatuline® Autogel® enjektör ise Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri San. ve Tic. A.Ş. firması tarafından temin edilmiştir.

Somatosan® ampul içinde liyofilize toz halinde bulunan 3,0 mg SOM tartılmış 10 mL distile su içinde çözünmüş ve distile su kullanılarak istenilen derişimlere seyreltilmiştir.

Sandostatin® ampul içinde çözelti halinde bulunan 0,1 mg/mL OC'den 500 µL alınmış ve ve distile su kullanılarak istenilen derişimlere seyreltilmiştir.

Somatuline® Autogel®, tek kullanımlık enjektör içinde jel halinde bulunan 29,52 mg/mL LAN'dan 185 µL alınmış ve distile su kullanılarak istenilen derişimlere seyreltilmiştir.

Geliştirilen MIP tabanlı sensörler kullanılarak DPV ile farmasötik preparatların analizleri yapılmış; preparatların içindeki SOM, OC veya LAN miktarları her biri için oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.6 Plazma Örneklerinin Hazırlanması

Ticari insan serumu:

Ticari insan serumu, analize kadar -20 °C'de saklanmıştır. Analiz öncesi oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. 0,1 mM serum örneği, bir test tüpüne 1,0 mL 1,0 mM SOM, 3,6 mL serum ve 5,4 mL asetronitril eklenerek hazırlanmıştır. Serum proteinlerini çöktürmek için 5 dakika vortekslenmiş, daha sonra 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Gerekli seyreltmeler destek elektrolit çözeltisi ile yapıldıktan sonra analizleri gerçekleştirilmiştir. OC ve LAN analizlerinde kullanılan 0,1 mM serum örneği de aynı şekilde hazırlanmıştır.

Gerçek plazma örneği:

Plazma örnekleri nöroendokrin kanser hastalığı tedavisinde Sandostatin® ampul kullanan hastalardan alınmıştır. Plazma örnekleri Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Medikal Onkoloji Bölümü tarafından kanser tanısı konulan hastalardan Sandostatin® kullanımından sonra 1 ay içinde alınmıştır. Hastalardan EDTA'lı tübe 5 mL tam kan alınmıştır. Kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma örnekleri hazırlanmış ve analiz edilinceye kadar Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda -20°C'de saklanmıştır.

Analiz öncesi örnekler dondurucudan çıkarılmış, oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş, daha sonra örnekten 900 µL alınmış ve proteinlerin çöktürülmesi için üzerine 1350 µL asetronitril ve 250 µL pH 5,2 asetat tamponu ilave edilmiştir. Karışım 1 dakika hafifçe vortekslelendikten sonra 20 dakika 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen 1000 µL süpernatanttan alınan 500 µL örnek gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra analiz edilmiştir.

3.4.7 Polimerizasyonda Kullanılan Diğer Çözeltilerin Hazırlanması

Polivinil alkol (25 mg/mL) distile suda, 2-hidroksi-2-metil propisfenon (2mg/mL) dimetil sülfoksitte, %1'lik 3-(trimetoksisilil)propil metakrilat etanolde, setiltrimetilamonyum bromür (5 mM) distile suda ve L-triptofan (10 mM) metanolde hazırlanmıştır.

3.4.8 Etik Kurul İzni

Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu'ndan "Somatostatin ve Bazı Analoglarının Miktar Tayini için Elektroanalitik Yöntemler Geliştirilmesi" isimli proje için alınan etik kurul izni 04.01.2022 tarihli ve 2022/01-36 numaralı etik kurul kararıyla uygun bulunmuştur (Ek 1).

3.5. Elektrokimyasal Analiz Yöntemi

3.5.1. Fonksiyonel Monomerlerin Sentezi

MAAsp: 1H-benzotriazol (40 mmol) içeren diklorometan (CH_2Cl_2 , 50 mL) içerisine tionil klorür (SOCl_2 , 10 mmol) 30 dakika içinde yavaş yavaş ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışıma oda sıcaklığında karıştırılarak 1H-pirol-3-karboksilik asit (10 mmol) ilave edilip 2 saat karıştırılmaya devam edilmiştir. Çökelti (MA-Bt; (1H-benzo[d][1,2,3] triazol-1-il)(1H-pirol-3-il)metanon) süzülüp, CH_2Cl_2 (2x50 mL) ile yıkanmıştır. Daha sonra 1,4-dioksan (25 mL) içindeki MA-Bt (5.52 mmol) sulu bir L-aspartik asit çözeltisine (1.0 M NaOH içinde 5.52 mmol) damla damla ilave edilip karıştırmaya 25 °C'de 20 dakika devam edilmiştir. Çözücü, 1,4-dioksan, döner buharlaştırıcıda buharlaştırılmıştır. Tortu, suyla seyreltilip karışım, 1H-benzotriazolü ayırmak için etil asetat (3x50 mL) ile elüe edilmiştir. Daha sonra sulu karışım çözeltisi %10 HCl ile nötralize edilmiş ve vakumla buharlaştırılmıştır. Kalan katı, amino asit bazlı iletken fonksiyonel monomer MAAsp verecek şekilde kristalleştirilmiştir.

MAGA: N-Metakriloil-L-glutamik asit (MAGA), 5,52 mmol, 1,0 g glutamik asit deney tüpü içinde 1,0 M NaOH sulu çözeltisinde dağıtılmıştır. 5,52 mmol, 1,033 g metakriloil amido-benzotriazol (MA-Bt) çözeltisinde bulunan 25 mL 1,4-dioksan aminoasit çözeltisi içine yavaş yavaş eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10-20 dakikada reaksiyon tamamlanmıştır. Reaksiyon bittikten sonra 1,4-dioksan vakum altında buharlaştırılmıştır. Çökelti su ile seyreltildikten sonra çözeltide bulunan 1H-benzotriazol, etil asetat (3 x 50 mL) ile alınmıştır. Çözeltinin pH'sı %10'luk HCl ile pH:6,0-7,0 (metakriloil grubu asidik ortamda polimerleşir) arasına ayarlanmıştır. MAGA monomeri, döner buharlaştırıcı ile sulu fazın uzaklaştırılması ile elde edilmiştir.

Sentezlenen MAAsp ve MAGA monomerlerinin -20°C'de buzdolabında 1 yıl süreyle stabil olduğu görülmüştür.

3.5.2. MIP ve NIP Tabanlı Elektrokimyasal Sensörlerin Hazırlanması

Analize başlamadan önce CKE, metanol:distile su (1:1, v/v) karışımında 15 dakika süresince ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Daha sonra elektrot yüzeyi parlatma pedi üzerine damlatılan alümina bulamacı ile temizlenip, alümina bulamacı distile su ile uzaklaştırılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. FP ya da EP'den önce CKE, CV yöntemi kullanılarak 50 mV/s tarama hızında 15 döngü ile pH 5,2 asetat tampon çözeltisi içinde -0.2 V ile 0.8 V arasındaki potansiyel uygulanarak ön işleme tabi tutulmuştur.

Üretilen MIP tabanlı sensörlerin analitik performansı ve doğrulaması, NIP tabanlı sensörler kullanılarak kontrol edilmiştir. Tüm ölçümler, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinin elektrokimyasal cevabı ile dolaylı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.1. SOM için MIP ve NIP Tabanlı Elektrokimyasal Sensörlerin Hazırlanması

SOM için sensörler FP ile hazırlanmıştır. Polimerizasyon çözeltisi, MAAsp ve SOM 4:1 oranında karıştırılarak distile suda hazırlanmıştır. Daha sonra 0,1 mL polimerizasyon çözeltisi, 0,5 mL HEMA ve 0,1 mL EGDMA, oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılarak homojen bir çözelti elde edilmiştir. Gözenek oluşturuç olarak PVA çözeltisi (distile suda 25 mg/mL) ve başlatıcı olarak 2-hidroksi-2-metil propisfenon (2 mg/mL) eklendikten sonra, CKE yüzeyine 1 µL polimer karışımı damlatılmıştır. Polimerizasyon, bir UV lambası (365 nm, 100 W) altında 15 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra polimerik yapıda oluşan gözenekleri açığa çıkarmak için eklenen PVA distile su ile oda sıcaklığında yıkanarak polimerize elektrottan uzaklaştırılmıştır. Oluşturulan şablon molekül, CKE'nin bir çalkalayıcıda (650 rpm, 25°C) 5M asetik asit çözeltisine 15 dakika daldırılmasıyla uzaklaştırılmıştır. Son olarak, hedef molekülü yeniden bağlamak için belirli bir SOM derişimine maruz bırakılan CKE, optimize edilmiş koşullar altında ve çalkalayıcıda 12 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Modifiye elektrot, P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE'nin her ölçümden önce 30 saniye distile su ile yıkanarak temiz bir sensör olarak yeniden

kullanılabilmesini sağlanmıştır. NIP elektrotu, MIP tabanlı sensörle aynı fotopolimerizasyon adımları uygulanarak SOM kullanılmadan hazırlanmıştır.

3.5.2.2. OC için MIP ve NIP Tabanlı Elektrokimyasal Sensörlerin Hazırlanması

OC için sensörler EP ile hazırlanmıştır. EP işlemi, 2,0 mM ANI, 0,1 mM OC ve 0,1 M pH 5,2 asetat tamponu içeren bir EP çözeltisi ile CV yöntemi kullanılarak 0,2 V ile 0,8 V potansiyel aralığı arasında 50 mV/s tarama hızında 10 döngü ile gerçekleştirilmiştir. Şablon molekül OC'ye özel boşlukların oluşması için baskılı CKE 15 M HAc içeren bir çözeltiye 45 dakika boyunca 650 rpm'de ve 25°C'de çalkalayıcıda bekletilerek sağlanmıştır. Daha sonra, P(ANI)@MIP/CKE, 650 rpm ve 25°C'de çalkalayıcıda 3 dakika boyunca farklı OC derişimlerinde inkübe edilerek yeniden bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Her farklı derişimin inkübasyonundan önce elektrot, 30 saniye süreyle distile su ile yıkanmıştır. NIP tabanlı CKE için EP çözeltisine OC eklenmeden yukarıda anlatılan aynı deneysel işlemler uygulanmıştır.

OC için MIP tabanlı elektrokimyasal sensör dönüşümlü voltametri (CV) kullanılarak oluşturulmuştur. EP, CV tekniği kullanılarak -0,2V ile 0,8V potansiyel aralığı arasında 50 mV/s tarama hızında 10 döngü ile gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.3. LAN için MIP ve NIP Tabanlı Elektrokimyasal Sensörlerin Hazırlanması

LAN için sensörler FP ile hazırlanmıştır. FP çözeltisi MAGA kompleksi MAGA ve LAN 3:1 oranında karıştırılarak distile suda hazırlanmıştır. MAGA kompleksi (0,1 mL), HEMA (0,5 mL) ve EGDMA'nın (0,1 mL) homojen bir çözeltisi, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Gözenek oluşturucu olarak PVA çözeltisi (distile suda 25 mg/mL) ve başlatıcı olarak ise 2-hidroksi-2-metil propisfenon (2 mg/mL) eklendikten sonra, CKE yüzeyine 1 µL polimer karışımı damlatılmıştır. UV lambası (365 nm, 100 W) altında 15 dakika süreyle polimerizasyon

gerçekleştirilmiştir. Eklenen PVA polimerik yapıda oluşan gözenekleri açığa çıkarmak için distile su yıkanarak elektrot yüzeyinden çıkarılmıştır. Oluşturulan şablon molekül, CKE'nin 5M asetik asit çözeltisine daldırılıp 15 dakika çalkalayıcıda (650 rpm, 25 °C) bekletilerek çıkarılmıştır. Daha sonra, hedef molekülün LAN'ın farklı derişimlerini yeniden bağlamak için CKE, optimize edilmiş koşullar altında ve çalkalayıcıda 12 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Modifiye elektrot, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE'nin her ölçümden önce 30 saniye distile su ile yıkanarak temiz bir sensör olarak yeniden kullanılabilmesini sağlamıştır.

3.5.3. MIP Tabanlı Elektrokimyasal Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu

SOM, OC ve LAN için geliştirilen MIP tabanlı elektrokimyasal sensörlerin karakterizasyonu EIS yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler için 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmıştır.

Hazırlanan polimerik yapıların, yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca, sentezlenen polimerik yapıların kimyasal yapı analizi için FTIR spektroskopisi yöntemi uygulanmıştır.

3.5.4. Uygulanan Voltametrik Çalışma Koşulları

Tüm voltametrik tekniklerde çalışma elektrodu olarak modifiye CKE, referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır.

CV ve DPV yöntemlerinde aşağıda belirtilen koşullar uygulanmıştır:

Potansiyel aralığı : -0,2 V - 0,8 V

Tarama hızı : 50 mV/s

Puls genliği : 100 mV

Puls süresi : 70 ms

3.5.5. MIP Tabanlı Elektrokimyasal Sensörlerin Analitik Performanslarının Değerlendirilmesi

3.5.5.1. Doğrusallık

Geliştirilen sensörlerin analitik performansı bir kalibrasyon eğrisi ile değerlendirilmiştir. SOM ve LAN için altı ve OC için ise beş farklı derişimde hedef molekülün yeniden bağlanmasından sonra 0,26 V'da elde edilen anodik pik akımı değerleri ile kalibrasyon eğrileri oluşturmuştur. NIP temelli sensörler için de aynı aralıkta kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

Elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısı önem kontrol testleri yapılmıştır. Ayrıca, geliştirilen sensörlerin doğrusallığının kontrolü için olması gereken derişime karşı regresyon denklemi kullanılarak bulunan derişimler grafiğe geçirilmiş ve oluşan eğrinin doğrusallığı incelenmiştir.

3.5.5.2. Kesinlik

Geliştirilen sensörlerin kesinliği, gün içi ve günler arası çalışmalarla değerlendirilmiştir. SOM, OC ve LAN çözeltilerinin belirli bir derişimde bir günde beş farklı zamanda analiz edilerek gün içi kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Günler arası

kesinlik çalışmaları ise beş farklı gün aynı derişimde çözeltinin analiz edilmesi ile gerçekleşmiştir. MIP tabanlı sensörlerin kesinliği % BSS ile değerlendirilmiştir.

3.5.5.3. Doğruluk

Geliştirilen sensörlerin doğrusallığı, gün içi ve günler arası çalışmalarla değerlendirilmiştir. SOM, OC ve LAN çözeltilerinin belirli bir derişimde bir günde beş farklı zamanda analiz edilerek gün içi doğrusallık çalışmaları yapılmıştır. Günler arası doğrusallık çalışmaları ise beş farklı gün aynı derişimde çözeltinin analiz edilmesi ile gerçekleşmiştir. MIP tabanlı sensörlerin kesinliği % BH ile değerlendirilmiştir

3.5.5.4. Duyarlılık

Geliştirilen sensörlerin duyarlılığı gözlenebilme sınırı (LOD) ve en düşük alt tayin sınırı (LLOQ) ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar standart sapmaya dayalı hesaplama yöntemi ile bulunmuştur. Kalibrasyon doğrusunun eğimi (m) ve sonuçların standart sapması kullanılarak LOD için 3 katı ve LLOQ için ise 10 katı olacak şekilde hesaplanmıştır (Eşitlik 2.9 ve Eşitlik 2.10).

$$LOD = \frac{3 \times \text{standart sapma}}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.9})$$

$$LLOQ = \frac{10 \times \text{standart sapma}}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.10})$$

3.5.5.5. Seçicilik

Geliştirilen sensörün seçiciliği, benzer moleküler yapılara sahip olan SOM, OC ve LAN'ın sinyallerinin (ΔI) karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, MIP ve NIP sensörlerin baskılama faktörleri (IF) ayrı ayrı hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Tüm ölçümler SOM ve LAN için $6,0 \times 10^{-14}$ M, OC için $4,0 \times 10^{-14}$ M derişimde gerçekleştirilmiştir.

3.5.5.6. Tutarlılık

Tutarlılık çalışması, iki farklı analizci tarafından aynı anda hazırlanan çözeltilere aynı koşullar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. SOM ve LAN için $6,0 \times 10^{-14}$ M, OC için $4,0 \times 10^{-14}$ M derişimde analizler yapılmış ve sonuçlar Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır.

3.5.5.7. Girişim Etkisi

Biyolojik örneklerde bulunan AA, DOP, K^+ , Cl^- , Na^+ ve SO_4^{2-} 'nin girişim etkisi geliştirilen sensörler üzerinde incelenmiştir. Girişim etkisini gösteren geri kazanım (%) ve BSS (%) değerleri SOM, OC, LAN'ın her bir bileşenle 1:10 oranında karıştırılması ile hesaplanmıştır.

3.5.5.8. Stabilité

Geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin stabilitesi 1, 3, 8, 10 ve 15 gün boyunca test edilmiştir. 1. gün performansı %100 kabul edilmiş, günlere göre sensörün performansının düşüşü takip edilmiştir.

3.5.6. Uygulamalar

Geliştirilen MIP tabanlı sensörler kullanılarak farmasötik preparat ve ticari insan serumundan SOM, OC ve LAN'ın elektrokimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir.

Farmasötik preparatlarda, madde miktarını tayin etmek için, SOM, LAN için sırasıyla Somatosan[®] ampul, Somatuline[®] Autogel[®] enjektörden $6,0 \times 10^{-14}$ M derişimde, OC için Sandostatin[®] ampulden $4,0 \times 10^{-14}$ M derişimde çözeltiler hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. BSS (%) değerleri hesaplanmıştır.

Ticari serum örneklerinden geri kazanım çalışmaları için ise, $6,0 \times 10^{-14}$ M derişimde SOM ve LAN, $4,0 \times 10^{-14}$ M derişimde OC içeren serum örnekleri hazırlanmıştır. Analizler ticari seruma standart madde eklenerek gerçekleştirilmiştir. BSS (%) değerleri hesaplanmıştır.

3.5.7. Hasta Plazma Örneklerinin Analizi

Nöroendokrin kanser hastası olan, tedavisinde Sandostatin® ampul kullanılan 5 hasta ve kontrol amacıyla 3 sağlıklı gönüllüden oluşturulan protokol gereği alınan plazma örnekleri Bölüm 3.4.6’da anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra optimize edilen koşullar altında analiz edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri kullanılarak gerekli hesaplamalar yapılmış; hasta ve kontrol grubu arasındaki sonuçlar t-testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmalarımız sırasında, CV yönteminde -0,2 V ile 0,8 V potansiyel aralığı ve 50 mV/s tarama hızı; DPV yönteminde ise -0,2 V ile 0,8 V potansiyel aralığı, 50 mV/s tarama hızı, 100 mV puls genliği ve 70 ms puls süresi uygulanmıştır. Tüm ölçümler 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir.

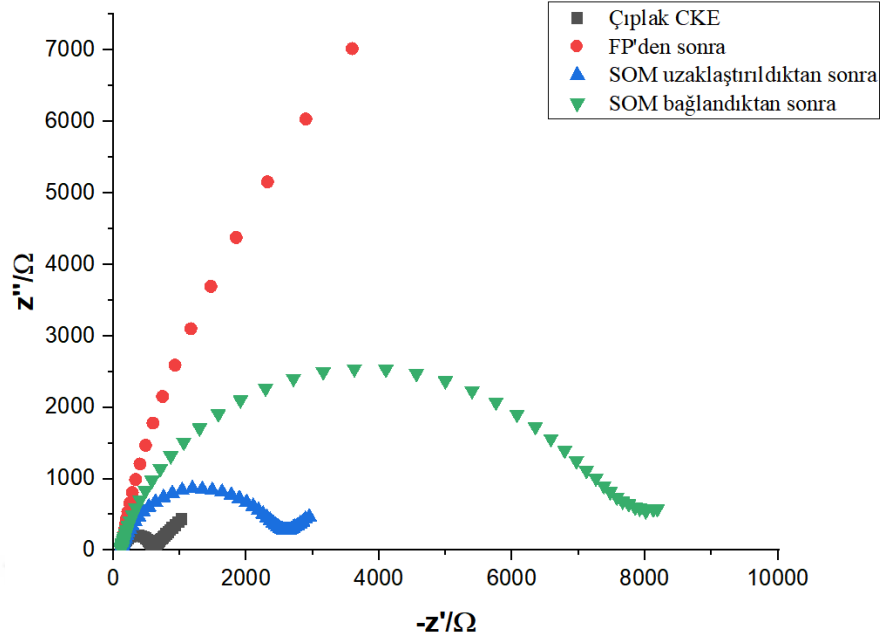
4.1. MIP Tabanlı P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE Sensörü ile SOM'un Elektrokimyasal Analizi

SOM için geliştirilen MIP tabanlı P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensör; fonksiyonel monomer olarak MAA_{sp} varlığında, temel monomer olarak HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak EGDMA, başlatıcı olarak 2-hidroksi-2-metil propisfenon kullanılarak FP yöntemi ile Bölüm 3.5.2.1'de anlatıldığı şekilde oluşturulmuştur.

4.1.1. P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE Sensörün Karakterizasyonu

4.1.1.1. Elektrokimyasal Karakterizasyon

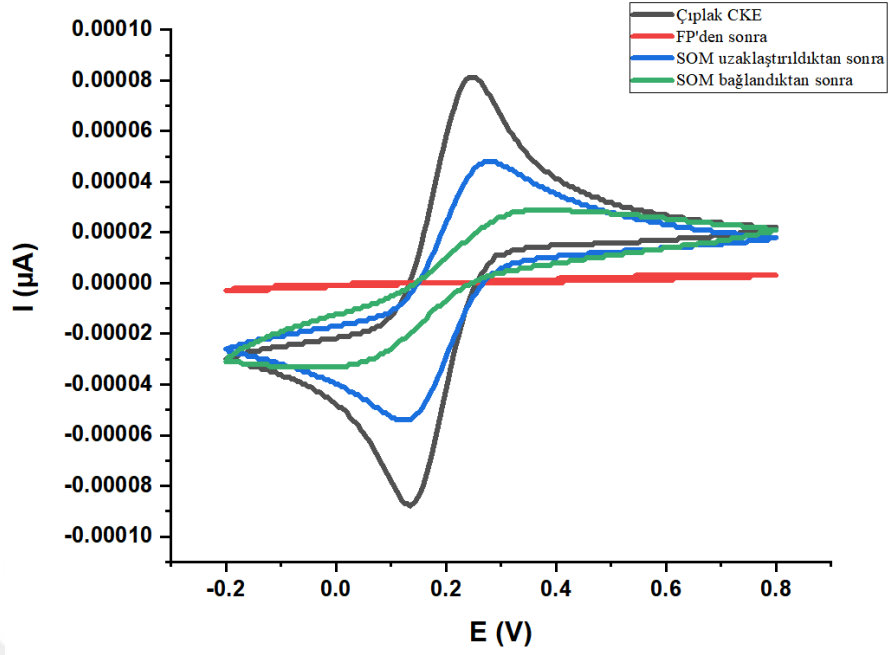
P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensörün elektrokimyasal karakterizasyonu, FP'den önce, FP'den sonra, SOM çıkarıldıktan sonra ve yeniden bağlandıktan sonra 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde alınan ölçümlerin sonuçları ile değerlendirilmiştir. Empedans spektrum değişiklikleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamakları için empedans spektrumları.

P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensör için, çıplak CKE 427 Ω , FP'den sonra 77710 Ω , SOM'un çıkarılmasından sonra 1950 Ω ve SOM'un yeniden bağlanması sonucu 5450 Ω R_{ct} değerleri elde edilmiştir.

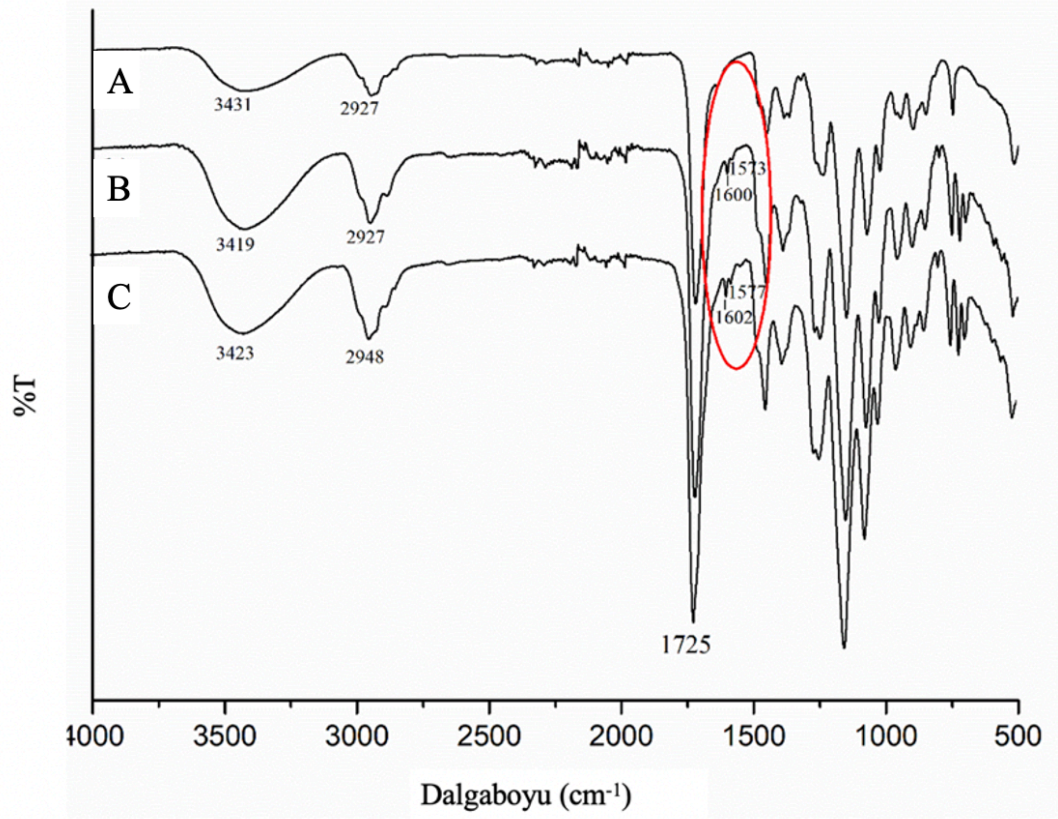
Ayrıca, P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu varlığında FP'den önce, FP'den sonra, SOM'un uzaklaştırılmasından sonra ve SOM'un yeniden bağlanması sonucu CV yöntemi kullanılarak da değerlendirilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamaklarında elde edilen CV voltamogramları.

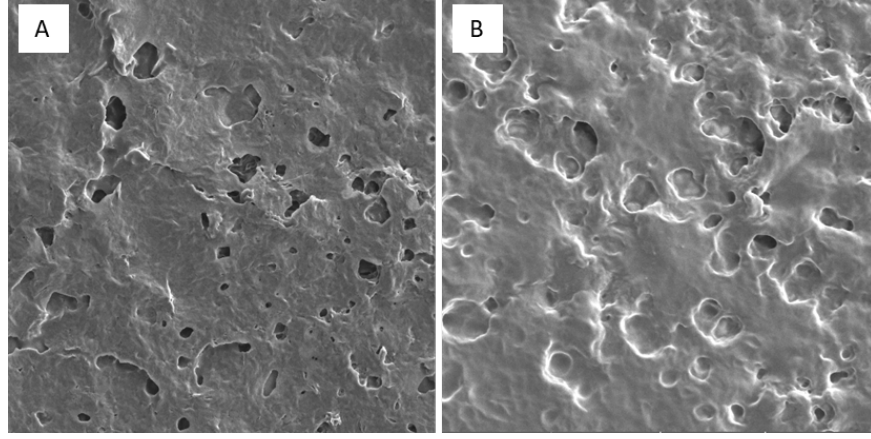
4.1.1.2. Yüzey Karakterizasyonu

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi sonucu sentezlenen polimerlerin moleküler yapısı Şekil 4.3’de gösterilmiştir. HEMA fonksiyonel grupları nedeniyle tüm polimerler için görülen O-H, C-H ve C=O gerilmesine ait 3400 cm^{-1} ’de O-H, 2940 cm^{-1} ’de C-H ve 1700 cm^{-1} ’de C=O gerilmesine ait pikler görülmüştür. 1570 cm^{-1} ve 1600 cm^{-1} ’de gözlenen bantlar, sırasıyla amid I ve amid II’nin asimetrik titreşimlerinden kaynaklanmıştır.



Şekil 4.3. A) P(HEMA), B) P(HEMA-MAAAsp)@MIP/CKE ve C)P(HEMA-MAAAsp)@NIP/CKE'nin FTIR spektrumları.

Ayrıca, P(HEMA-MAAAsp)@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonu taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile de incelenmiştir (Şekil 4.4). Distile su ile yıkandıktan sonra, NIP film için polimerik filmdeki polimer yüzeyi üzerinde farklı gözenekler rastgele dağılmıştır. Diğer taraftan, distile su ile yıkandıktan sonra desorbe edici ajan kullanımı nedeniyle MIP için daha fazla çökmüş gözenekli yapılar oluşmuştur.



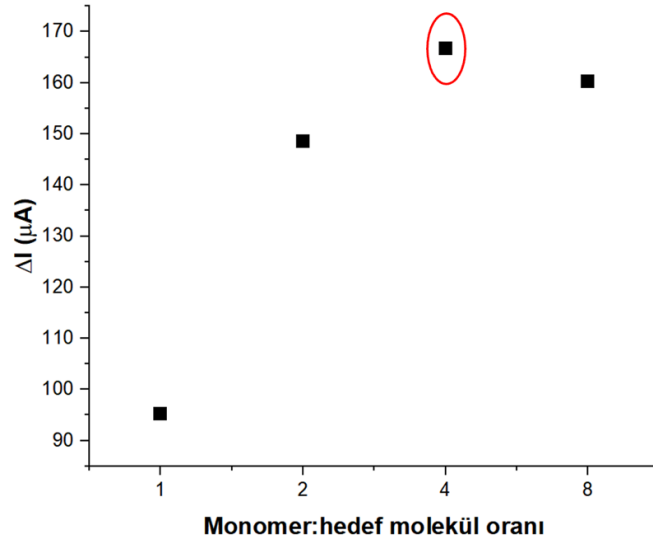
Şekil 4.4. A) P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE ve B) P(HEMA-MAAsp)@NIP/CKE için polimerik yapıların SEM görüntüleri.

4.1.2. P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE Sensörün Optimizasyon Koşulları

Geliştirilen sensörün optimizasyonu; monomer:hedef molekül oranı, FP çözelti hacmi, hedef molekülün uzaklaştırılması ve hedef molekülün bağlanması denenerek yapılmıştır. Optimizasyon koşulları belirlenirken P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörüne $6,0 \times 10^{-14}$ M SOM bağlanmıştır. Tüm ölçümler 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.1. Monomer:Hedef Molekül Oranı

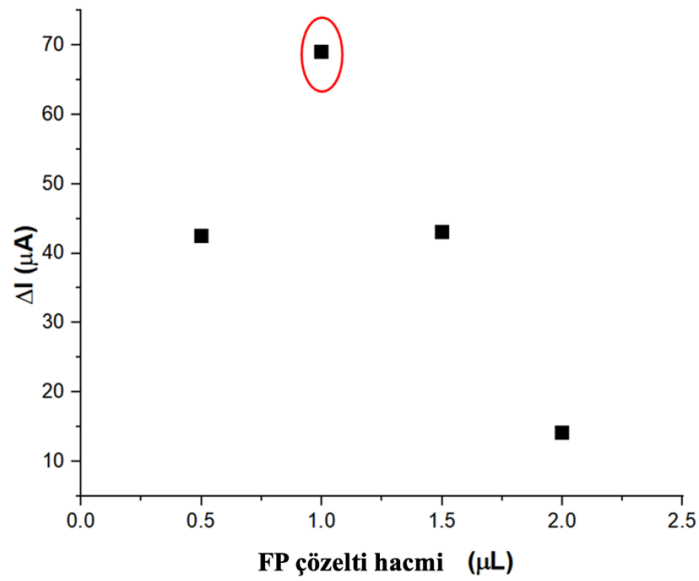
Monomerin hedef moleküle oranı optimizasyon çalışmaları için 8:1, 4:1, 2:1 ve 1:1 (h:h) monomer:hedef molekül oranları ile denenmiştir (Şekil 4.5). P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensör için en uygun monomer:hedef molekül (MAAsp:SOM) oranının 4:1 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Monomer:hedef molekül oranı optimizasyonu.

4.1.2.2. FP Çözelti Hacmi

FP çözeltisinin hacmini optimize etmek için fotopolimerizasyon çözeltisinden elektrot yüzeyine 0,5 μL , 1,0 μL , 1,5 μL , ve 2,0 μL damlatılmıştır. FP sonrası ve kalıp molekül çıkarıldıktan sonra elde edilen pik akımları arasındaki farkın en yüksek olduğu FP çözelti hacminin 1,0 μL olduğu görülmüştür (Şekil 4.6).

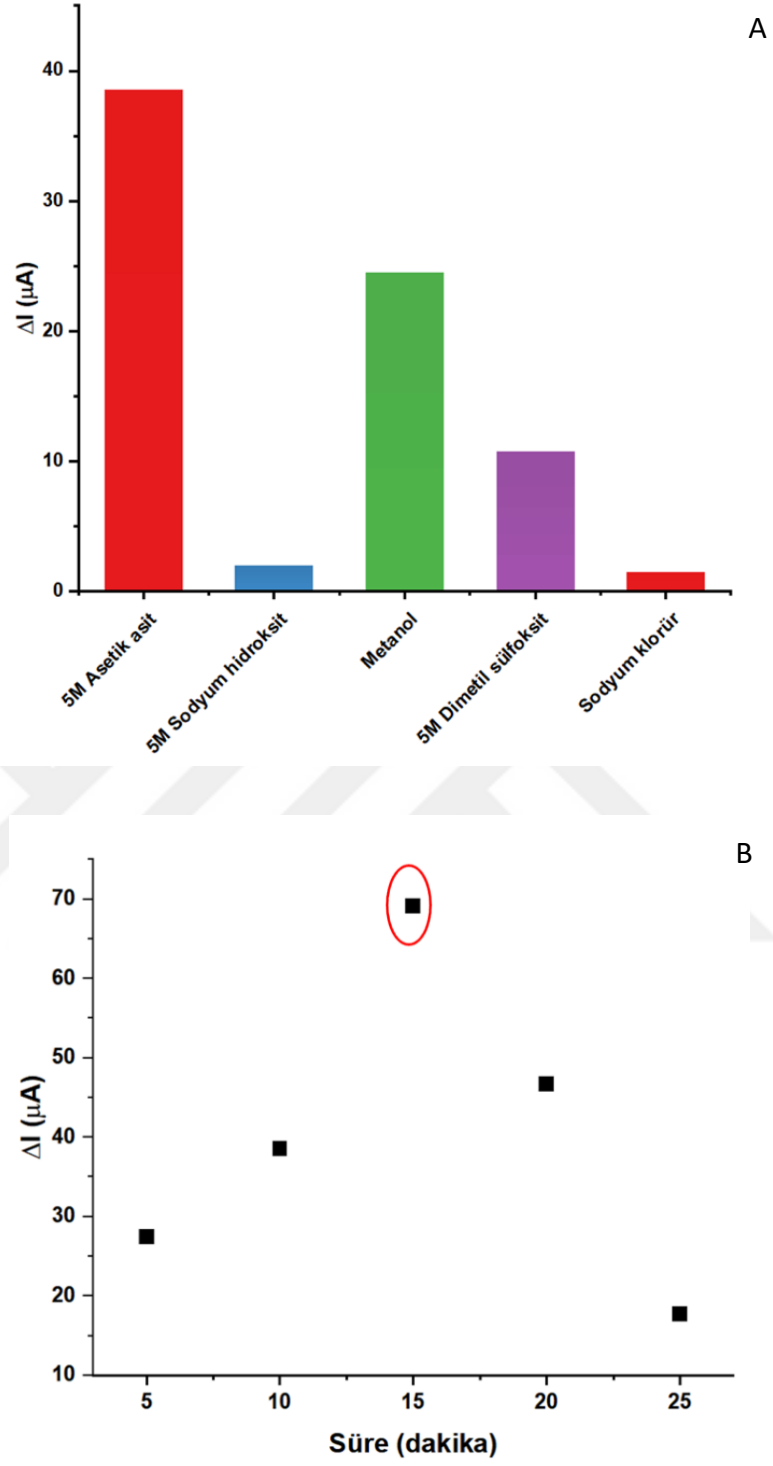


Şekil 4.6. FP çözelti hacmi optimizasyonu.

4.1.2.3. Hedef Molekölün Uzaklaştırılması

Hedef molekölü uzaklaştırmak için P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE'nin bir çalkalayıcıda 650 rpm ve 25°C'de 15 dakika boyunca HAc (5 M), MeOH, NaOH (5 M), NaCl ve DMSO (5 M) çözeltileri ile bekletilmiştir. En etkili kalıp molekölü çıkarma sonuçları 5 M HAc çözeltisi ile elde edilmiştir (Şekil 4.7.A). Hedef molekölün çıkarılması ile FP sonrası pik akımları karşılaştırıldığında 5 M HAc çözeltisinin kalıp molekölün en etkili ve düzgün bir şekilde çıkarılmasını sağladığı gözlemlenmiştir.

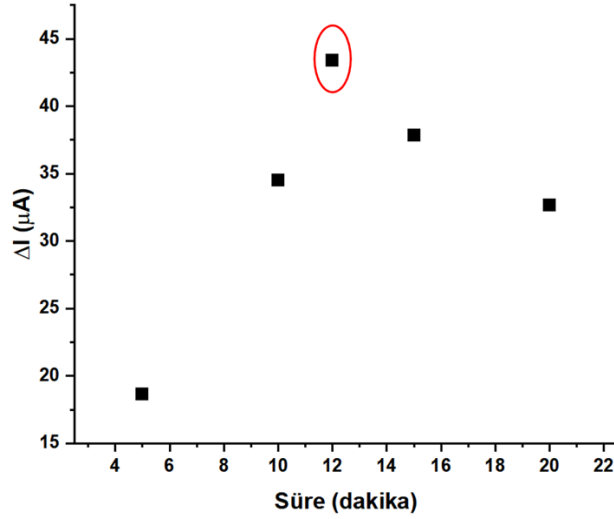
Hedef molekölü uzaklaştırma süresini belirlemek için 5 M HAc çözeltisine daldırılan P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE çalkalayıcıda 5, 10, 15, 20 ve 25 dakika bekletilmiştir. En yüksek pik akımı değişimi 15. dakikada gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.B). SOM için en iyi kalıp moleköl çıkarma çözeltisi 5 M HAc ve çözeltide bekletme süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. A) Uzaklaştırma çözeltileri, B) 5 M HAc çözeltisi için uzaklaştırma sürelerinin grafiği.

4.1.2.4. Hedef Molekölün Bağlanması

P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE'nin inkübasyon süresi $6,0 \times 10^{-14}$ M SOM'un bir çalkalayıcıda 650 rpm'de ve 25°C'de 5, 10, 12, 15 ve 20 dakika boyunca incelenmiştir. Maksimum pik akımı değişimi 12. dakikada elde edilmiştir (Şekil 4.8).

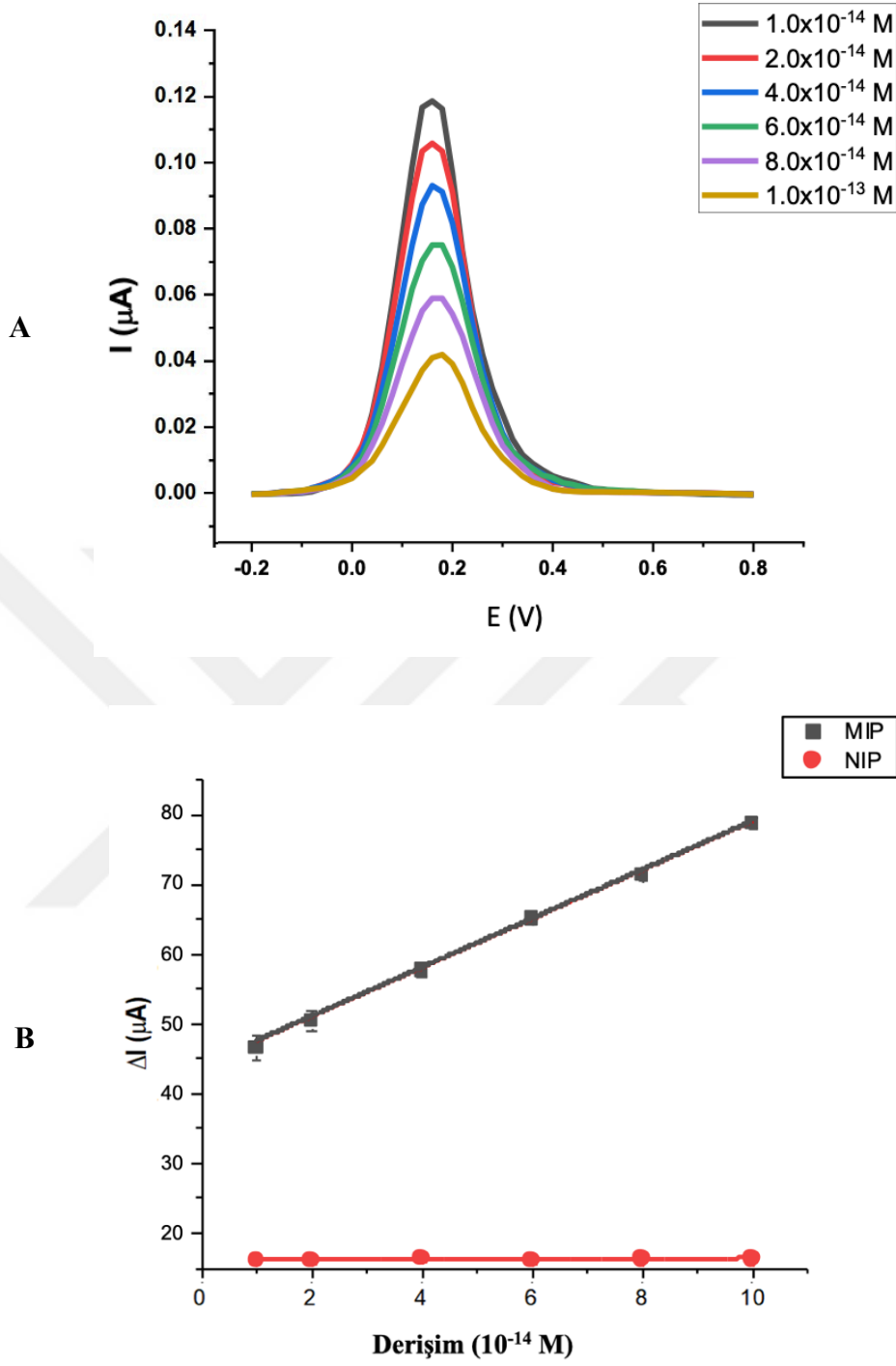


Şekil 4.8. SOM'un polimerik matriksteki boşluklara inkübasyon süresi.

4.1.3. Yöntemin Analitik Performansı

4.1.3.1. Doğrusallık

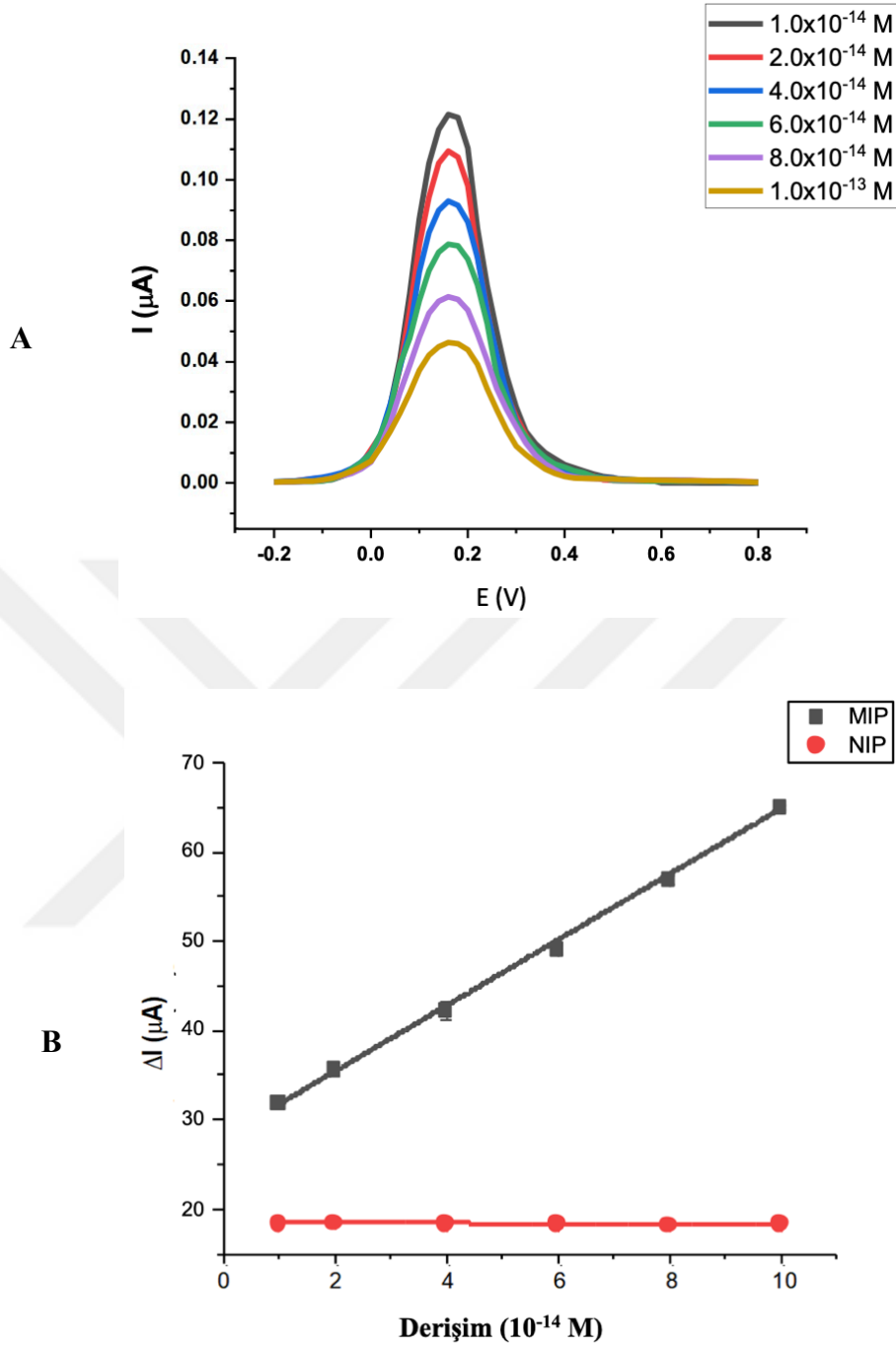
Standart çözelti ile yapılan çalışmalar: P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE'nin analitik performansı kalibrasyon eğrisi çizilerek değerlendirilmiştir. Altı farklı derişimde SOM'un yeniden bağlanmasından sonra 0,26 V'da anodik pik akımında elde edilen ΔI değerleri ile kalibrasyon eğrisini oluşturmuştur. Doğrusallık aralık $1,0 \times 10^{-14}$ M - $1,0 \times 10^{-13}$ M (10,0-100,0 fM) olarak belirlenmiştir. Doğrusal regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı sırasıyla $y(\Delta I) = 3,5 \times 10^{+14}x$ (SOM derişimi, M) + 43,31 ve $R^2 = 0,999$ olarak bulunmuştur. Artan SOM derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla azalan akım değerlerini gösteren P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE'nin DP voltamogramları Şekil 4.9.A'da gösterilmiştir. MIP sensörü için elde edilen verilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve karşılaştırma amacıyla aynı koşullarda hazırlanan NIP sensörüne ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.9.B'de verilmiştir. P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensörü ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.



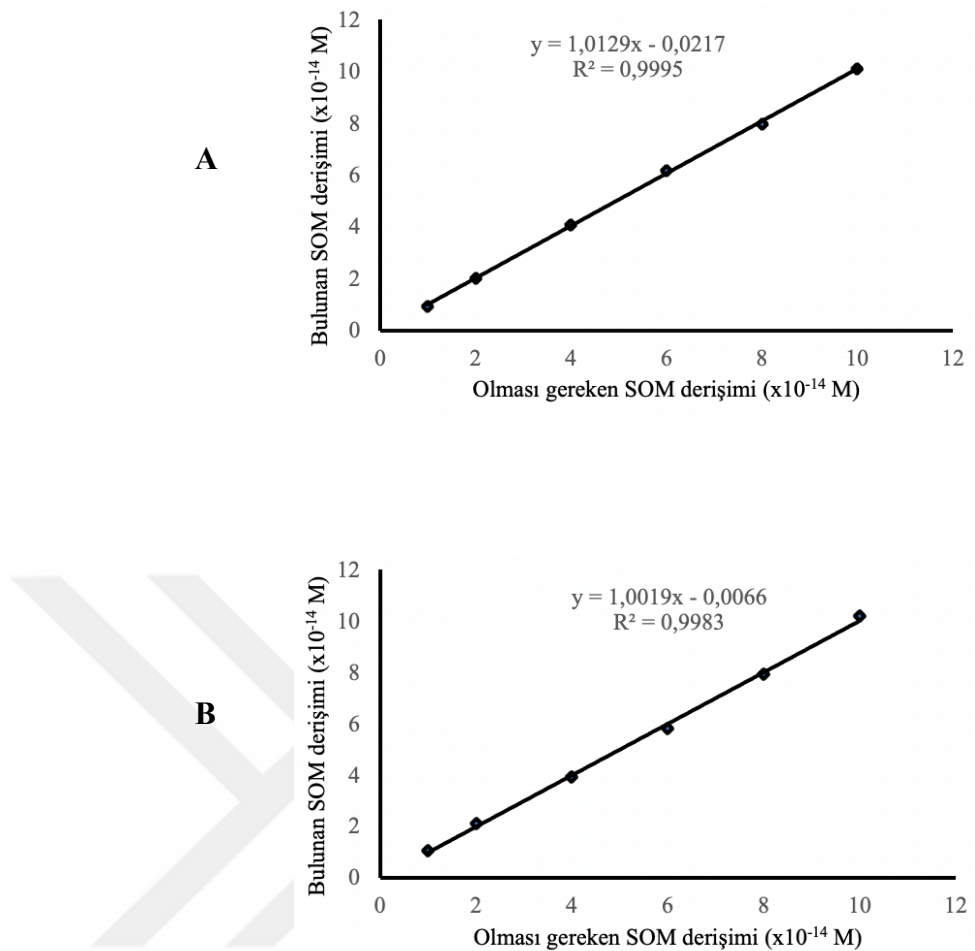
Şekil 4.9. A) Farklı SOM derişimlerinin bağlanmasıyla P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAAsp)@NIP/CKE'deki ΔI ve SOM derişimleri arasında doğrusal ilişki.

Ticari insan serumu ile yapılan çalışmalar: P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE'nin redoks probu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ile elektrokimyasal hücrede $1,0 \times 10^{-14} \text{ M} - 1,0 \times 10^{-13} \text{ M}$ (10,0-100,0 fM) doğrusallık aralığında altı farklı SOM derişimi eklenmiş ticari serum örneklerinde DPV sonuçları Şekil 4.10.A'da gösterilmiştir. Ticari serum örneğinde P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE ve P(HEMA-MAA_{sp})@NIP/CKE sensörleri ile artan OC derişimlerinin yeniden bağlanması sonucu DPV yöntemiyle elde edilen ΔI değerleri ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.10.B). P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensörünün serumdaki kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir.

Ayrıca, geliştirilen P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensörün standart çözelti ve ticari insan serumu ile yapılan çalışmalarında doğrusallığın kontrolü için kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıklarının kontrol grafikleri Şekil 4.11'de verilmiştir. P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensöre ait kalibrasyon doğrusunun ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.1'de, doğrusallık kontrol grafikleri ile oluşan doğruların analiz sonuçları da Tablo 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Ticari serum örneklerinde A) Farklı SOM derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAAsp)@NIP/CKE'deki ΔI ve SOM derişimleri arasında doğrusal ilişki.



Şekil 4.11. P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörün A) Standart çözelti ve B) Ticari insan serumu ile yapılan çalışmalarında elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri.

Tablo 4.1. P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörünün kalibrasyon doğrularının özellikleri.

	a	b	p*	R²	F**
Standart çözelti	$3,5 \times 10^{+14}$	43,31	0,0000	0,999	7503,83
Ticari insan serumu	$3,6 \times 10^{+14}$	28,07	0,0000	0,998	2557,40

$y = ax + b$ (a= eğim; b= kesişim). * p: Kesişimin olasılık değeri, $0,0000 < p$; R^2 : Korelasyon katsayısı; ** F: varyans analizi için hesaplanan değer.

Tablo 4.2. P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörün doğrusallık kontrol grafiklerine ilişkin özellikler.

	a	b	p[*]	R²	F^{**}
Standart çözelti	1,0129	- 0,0217	0,0001	0,9995	1219,86
Ticari insan serumu	1,0019	- 0,0066	0,0001	0,9983	1263,54

y = ax+b (a= eğim; b= kesişim). * p: Kesişimin olasılık değeri, 0,0000 < p; R²: Korelasyon katsayısı; ** F: varyans analizi için hesaplanan değer.

4.1.3.2. Kesinlik

Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörünün kesinliği için $6,0 \times 10^{-14}$ M derişimde SOM çözeltisinin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında elde edilen veriler ile kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve BSS (%) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.3).

4.1.3.3. Doğruluk

Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörünün doğruluğu için $6,0 \times 10^{-14}$ M derişimde SOM çözeltisinin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmalarında elde edilen veriler ile kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve BH (%) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.3).

4.1.3.4. Duyarlılık

Gözlenebilme sınırı (LOD) standart sapma/eğim oranının 3 katı olan derişim değeri ile en düşük alt tayin sınırı (LLOQ) standart sapma/eğim oranının 10 olduğu derişim değeri olarak hesaplanmıştır. SOM için geliştirilen P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörün LOD ve LLOQ değerleri Tablo 4.3’de verilmiştir.

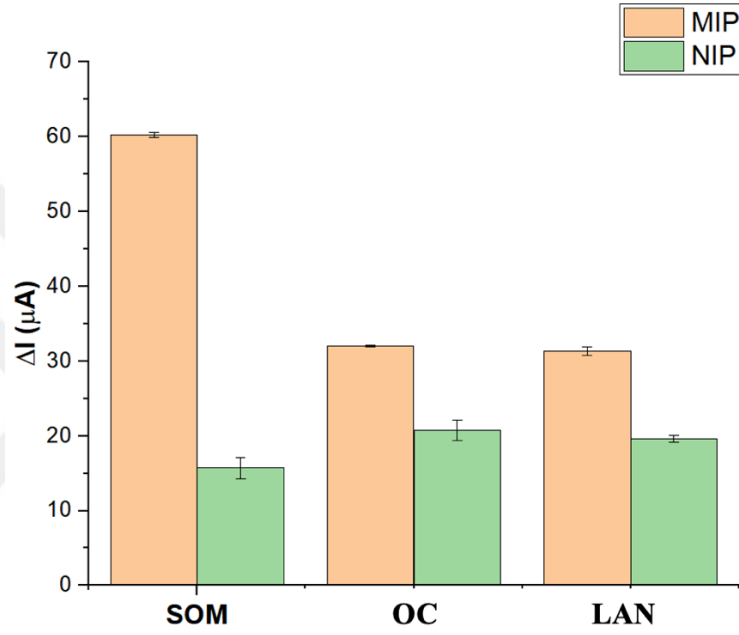
Tablo 4.3. Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörü kullanılan yöntemin analitik performans parametreleri.

	SOM (Standart çözelti)	SOM (Ticari insan serumu)
Doğrusallık aralığı, M (fM)	$1,0 \times 10^{-14} - 1,0 \times 10^{-13}$ (10,0-100,0)	$1,0 \times 10^{-14} - 1,0 \times 10^{-13}$ (10,0-100,0)
Eğim, mA/M	$3,5 \times 10^{+14}$	$3,6 \times 10^{+14}$
Eğimin standart hatası	$7,91 \times 10^{+12}$	$6,46 \times 10^{+12}$
Kesişim, mA	43,31	28,07
Kesişimin standart hatası	0,489	0,508
Korelasyon katsayısı	0,999	0,998
LOD, fM	0,175	1,122
LLOQ, fM	0,584	3,739
Gün içi kesinlik (n=5) (BSS, %)	0,185	0,261
Günler arası kesinlik (n=5) (BSS, %)	0,210	0,270
Gün içi doğruluk (n=5) (BH, %)	0,084	0,356
Günler arası doğruluk (n=5) (BH, %)	0,264	0,415

BSS: Bağlı standart sapma, BH: Bağlı hata.

4.1.3.5. Seçicilik

P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE'nin seçiciliği, SOM'un sentetik analogları olan ve benzer moleküler yapıları sahip OC ve LAN'ın DPV sinyalleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.12). Ayrıca, MIP elektrodunun seçiciliği, P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAAsp)@NIP/CKE için baskılama faktörlerinin (IF) hesaplanması ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.4).



Şekil 4.12. SOM ve benzeri moleküller için ΔI değerleri.

Tablo 4.4. SOM, OC ve LAN için IF değerleri.

	MIP	NIP	IF _(MIP/NIP)
	ΔI (μA)	ΔI (μA)	$\Delta I_{(MIP)}/\Delta I_{(NIP)}$
SOM	60,25	15,73	3,83
OC	32,01	20,80	1,54
LAN	31,34	19,60	1,60

4.1.3.6. Tutarlılık

Tutarlılık çalışması, iki farklı analizci etkisi incelenerek değerlendirilmiştir. Analizciler tarafından $6,0 \times 10^{-14}$ M SOM çözeltisi optimize edilen yöntem koşullarında, P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensör ile analiz edilmiş, veriler Mann-Whitney U Testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. SOM için tutarlılık çalışması sonuçları (n = 6).

	1. Analizci	2. Analizci
$\bar{X}$ (M)	$6,14 \times 10^{-14}$	$6,13 \times 10^{-14}$
SS	$0,15 \times 10^{-14}$	$0,12 \times 10^{-14}$
BSS (%)	0,025	0,019
$U_{\text{Hesap}}=17 < U_{\text{Tablo}}=29$ (p>0.05)		

$\bar{X}$: Ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.
Değerler Ek 2'e göre hesaplanmıştır.

4.1.3.7. Girişim Etkisi

Biyolojik örneklerde bulunan AA, DOP, K^+ , Cl^- , Na^+ ve SO_4^{2-} 'nin girişim etkisi P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörü ile incelenmiştir. Girişim etkisini gösteren geri kazanım (%) ve BSS (%) değerleri, SOM'un her bir bileşenle 1:10 oranında karıştırılmasıyla hesaplanmıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Girişim yapan bileşenlerin varlığında SOM tayin sonuçları (n=3).

Bileşen	Geri kazanım (%)	BSS (%)
DOP	95,97	0,74
AA	95,36	0,65
Na^+	99,79	0,57
SO_4^{2-}	99,79	0,57
K^+	99,92	0,15
Cl^-	99,92	0,15

4.1.3.8. Stabilité

P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensörünün stabilitesi 1, 3, 8, 10 ve 15 gün boyunca test edilmiştir. 1. günün sonunda ölçülen akım değeri %100 olarak kabul edilmiş; akım değerlerinin 3. gün %96,22'ye, 8. gün %81,93'e, 10. gün %76,05'e ve 15. gün %55,46'ya düştüğü görülmüştür.

4.1.4. Yöntemin Uygulamaları

Geliştirilen P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensör ile farmasötik preparattaki (Somatosan[®] ampul) (Tablo 4.7) ve ticari insan serumundaki SOM'un miktar tayini gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.7. Somatosan[®] ampul analiz sonuçları (n=3).

	SOM
Etiketteki miktar (mg/ampul)	3,00
Bulunan miktar (mg/ampul)	3,04
BSS (%)	0,33
BH (%)	-1,25

BSS: Bağıl standart sapma, BH: Bağıl hata.

Tablo 4.8. SOM eklenmiş ticari insan serum örneklerinin analiz sonuçları (n=3).

	SOM
Eklenen miktar (mg)	3,00
Bulunan miktar (mg)	2,98
BSS (%)	0,34
Geri kazanım (%)	99,33

BSS: Bağıl standart sapma.

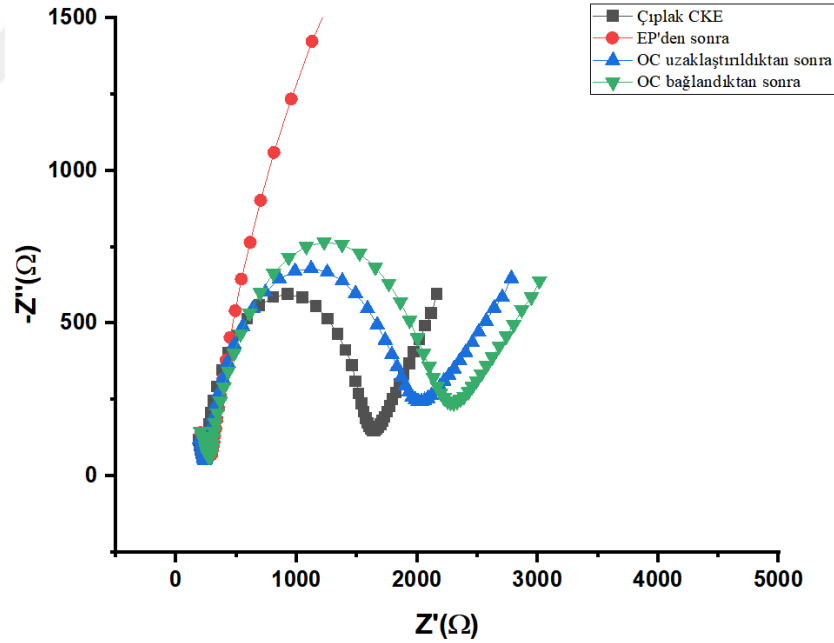
4.2. MIP Tabanlı P(ANI)@MIP/CKE Sensörü ile OC'nin Elektrokimyasal Analizi

OC için geliştirilen MIP tabanlı P(ANI)@MIP/CKE sensör; fonksiyonel monomer olarak ANI varlığında EP yöntemi ile Bölüm 3.5.2.2'de anlatıldığı şekilde oluşturulmuştur.

4.2.1. P(ANI)@MIP/CKE Sensörün Karakterizasyonu

4.2.1.1. Elektrokimyasal Karakterizasyon

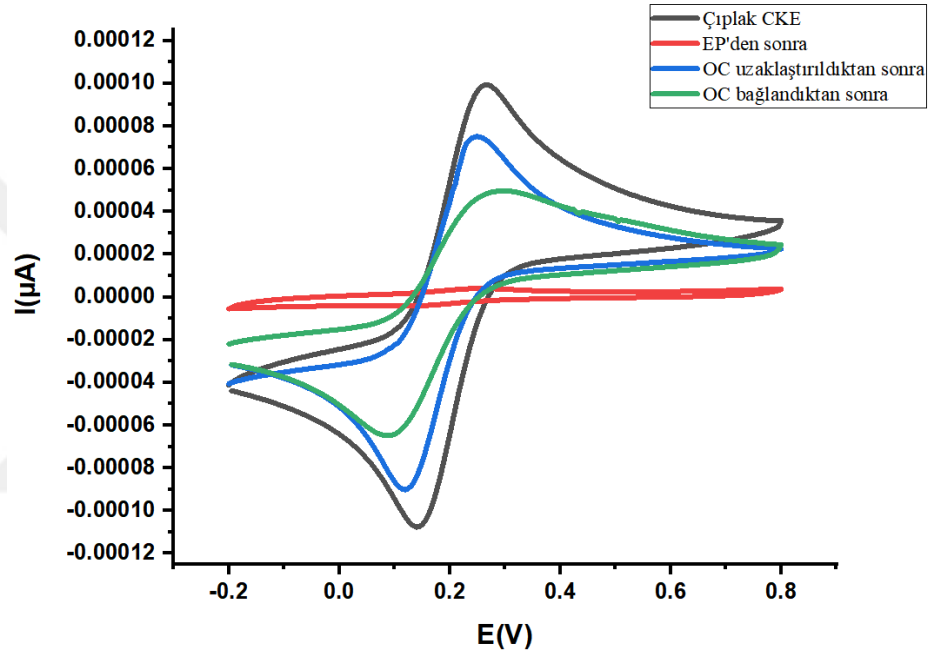
OC'nin elektrokimyasal karakterizasyonu, P(ANI)@MIP/CKE sensörün, EP'den önce, EP'den sonra, OC çıkarıldıktan sonra ve yeniden bağlandıktan sonra 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde alınan ölçüm sonuçları değerlendirilmiştir. Empedans spektrum değişiklikleri Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. P(ANI)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamakları için empedans spektrumları.

P(ANI)@MIP/CKE sensörü için, EP'den önce 295 Ω , EP'den sonra 76379 Ω , OC'nin çıkarılmasından sonra 1111 Ω ve OC'nin yeniden bağlanması sonucu 2126 Ω R_{ct} değerleri elde edilmiştir.

Ayrıca, P(ANI)@MIP/CKE sensörün elektrokimyasal karakterizasyonu 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu varlığında EP'den önce, EP'den sonra, OC'nin çıkarılmasından sonra ve OC'nin yeniden bağlanması sonucu CV yöntemi kullanılarak da değerlendirilmiştir (Şekil 4.14).



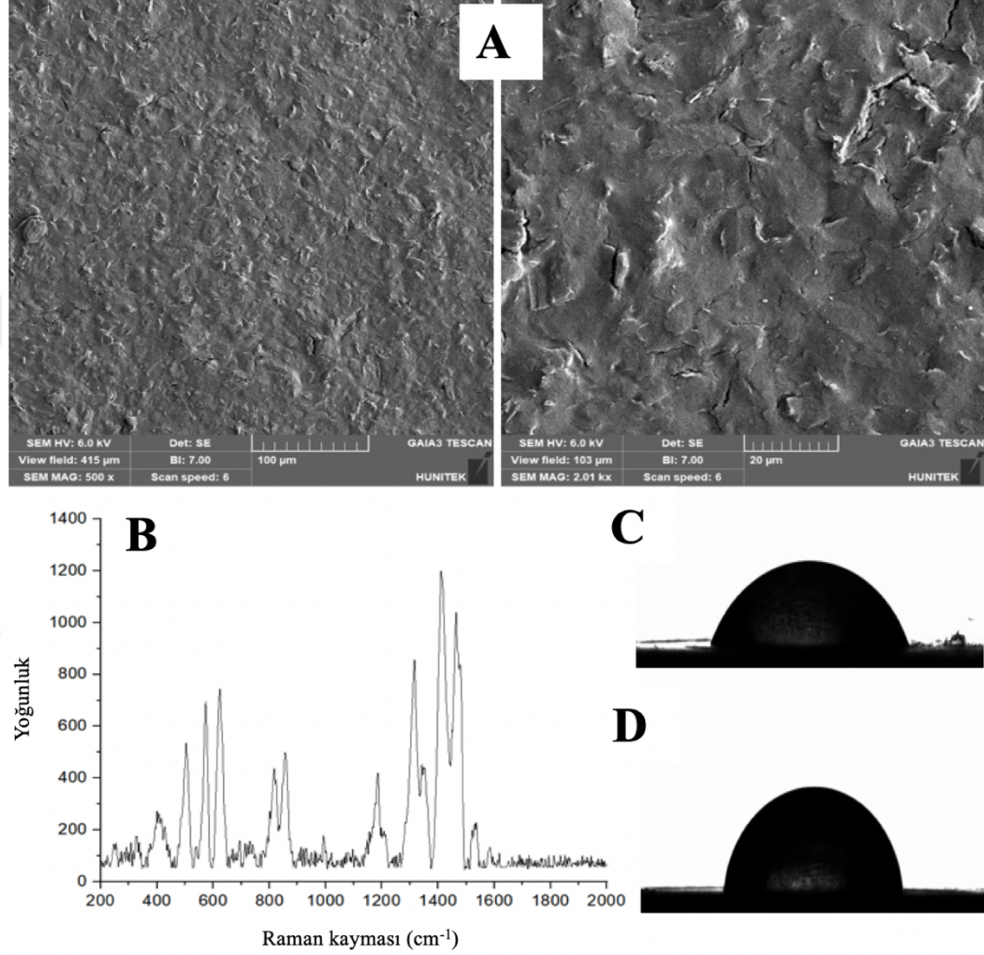
Şekil 4.14. P(ANI)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamaklarında elde edilen CV voltamogramları.

4.2.1.2. Yüzey Karakterizasyonu

Bölüm 3.5.2.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan P(ANI)@MIP/CKE sensöre ait SEM görüntüleri Şekil 4.15.A'da sunulmuştur.

Şekil 4.15.B, 785 nm lazer çizgisi uyarımı kullanan P(ANI)@MIP/CKE polimerinin Raman spektrumlarını göstermiştir. P(ANI)@MIP/CKE spektrumu, 1370 ve 1601 cm^{-1} tepe noktaları, sırasıyla $\text{C}-\text{N}^{+\bullet}$ ve $\text{C}=\text{N}$ benzen gerilme titreşimlerinin tipik Raman kaymalarını göstermiştir. 1502 cm^{-1} , $\text{C}=\text{N}$ gerilme titreşimleridir ve polimer yapısında imin varlığını doğrulamıştır. Polimerik yapının $\text{C}-\text{H}$ ve $\text{C}-\text{NH}_2$

gerilme moduna yanıt olarak 1190 ve 1254 cm^{-1} 'de Raman kayması görülmüştür. Temas açıları, KRUSS DS100 (Hamburg, Almanya) cihazı ile optik temas açısı ölçer ile ölçülmüştür. Çıplak CKE filminin su temas açısı yaklaşık 80,91 iken (Şekil 4.15.C), P(ANI) filminin temas açısı hidrofilik özellikler sergileyen 59,04'e (Şekil 4.15.D) düşürülmüştür.



Şekil 4.15. A) P(ANI)@MIP/CKE ve P(ANI)@NIP/CKE 'nin SEM görüntüleri; B) P(ANI)@MIP/CKE'nin Raman spektrumları; C) Çıplak CKE ve D) P(ANI)@MIP/CKE'nin temas açısı ölçümleri.

4.2.2. P(ANI)@MIP/CKE Sensörün Optimizasyon Koşulları

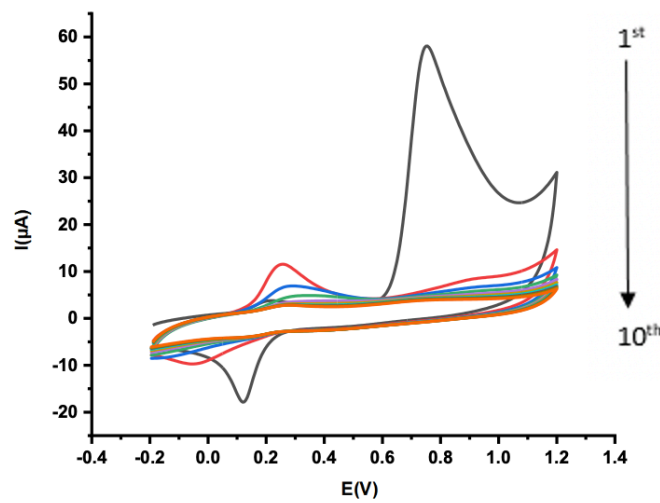
Geliştirilen sensörün optimizasyonu; monomer:hedef molekül oranı, EP için döngü sayısı, hedef molekülün uzaklaştırılması ve hedef molekülün bağlanması denenerek yapılmıştır. Optimizasyon koşulları belirlenirken P(ANI)@MIP/CKE sensörüne $4,0 \times 10^{-14}$ M OC bağlanmıştır. Tüm ölçümler 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.1. Monomer:Hedef Molekül Oranı

Optimizasyon çalışmaları için 400:1, 300:1, 250:1, 200:1, 150:1 ve 100:1 (h:h) monomer:hedef molekül oranları denenmiştir. P(ANI)@MIP/CKE sensör için monomer:hedef molekül (ANI:OC) oranı 200:1 olarak seçilmiştir (Tablo 4.9).

4.2.2.2. Elektropolimerizasyon İçin Döngü Sayısı

EP için 3, 5, 10, 15 ve 20 kez CV döngüsü uygulanmıştır (Tablo 4.6). CV sinyalleri, kalıp molekül çıkarıldıktan sonra ve $4,0 \times 10^{-14}$ M OC yeniden bağlandıktan sonra ölçülen pik akımları (I) arasındaki fark (ΔI) hesaplanarak karşılaştırılmıştır. EP için optimum döngü sayısı 10 döngü olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. 10 döngü ile ANI'nin EP işleminin CV voltamogramları.

4.2.2.3. Hedef Molekölün Uzaklaştırılması

Hedef molekül uzaklaştırma optimizasyonu, P(ANI)@MIP/CKE'nin bir çalkalayıcıda 650 rpm ve 25°C'de 15 dakika boyunca HAc (15 M), NaOH (5 M), MeOH, HCl (5 M), DMSO (5 M) ve HAc:HCl (1:1, h:h) çözeltilerinde bekletilerek gerçekleştirilmiştir. En etkili kalıp molekülü çıkarma sonuçları 15 M HAc çözeltisi ile elde edilmiştir (Tablo 4.9).

Hedef molekülü uzaklaştırma süresini belirlemek için 15 M HAc çözeltisine daldırılan P(ANI)@MIP/CKE çalkalayıcıda 15, 30, 45, 60 ve 75 dakika boyunca bekletilmiştir (Tablo 4.9). En yüksek pik akımı 45. dakikada gözlemlenmiştir (Tablo 4.9).

4.2.2.4. Hedef Molekölün Bağlanması

P(ANI)@MIP/CKE'nin inkübasyon süresi $4,0 \times 10^{-14}$ M OC'nin bir çalkalayıcıda 650 rpm'de ve 25°C'de 1, 2, 3, 5, 10 ve 15 dakika boyunca incelenmiştir. Maksimum pik akımı değişimi 3. dakikada elde edilmiştir (Tablo 4.9)

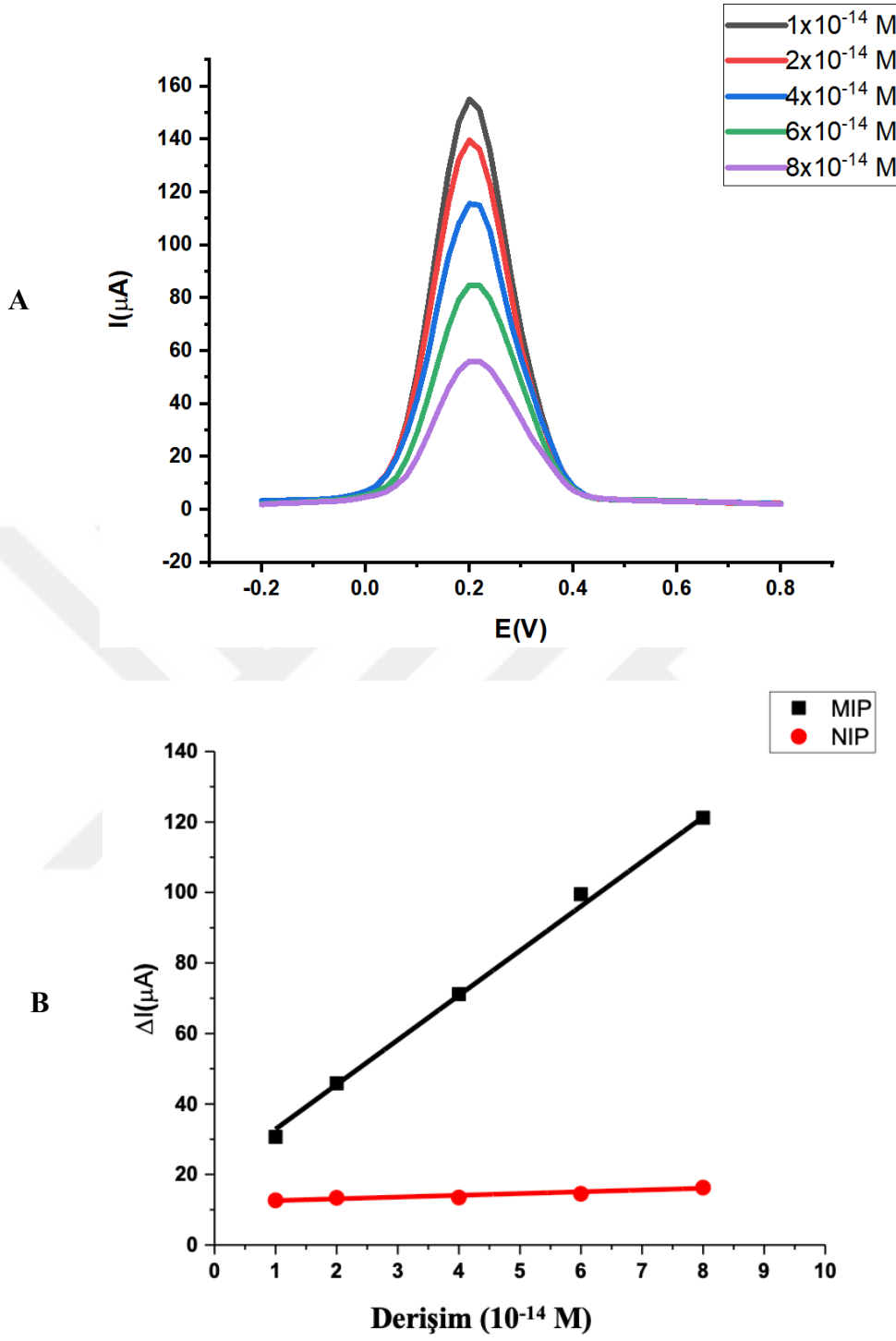
Tablo 4.9. P(ANI)@MIP/CKE sensörünün optimizasyon parametreleri.

ANI:OC Oranı	Derişim oranı	400:1	300:1	250:1	200:1	150:1	100:1
	ΔI (μA)	186,56	195,09	233,45	250,30	239,24	217,18
Döngü Sayısı	Döngü sayısı	3	5	10	15	20	
	ΔI (μA)	218,37	228,04	263,02	236,51	181,26	
OC Uzaklaştırma Çözeltisi	Uzaklaştırma çözeltisi	15 M HAc	5 M NaOH	MeOH	5M HCl	5 M DMSO	HAc:HCl (1:1, h:h)
	ΔI (μA)	78,68	9,96	6,47	56,93	7,07	5,66
OC Uzaklaştırma Süresi	Süre (dakika)	15	30	45	60	75	
	ΔI (μA)	29,69	43,00	107,84	83,30	78,68	
OC Bağlanma Süresi	Süre (dakika)	1	2	3	5	10	15
	ΔI (μA)	27,21	29,38	36,41	30,27	26,01	23,07

4.2.3. Yöntemin Analitik Performansı

4.2.3.1. Doğrusallık

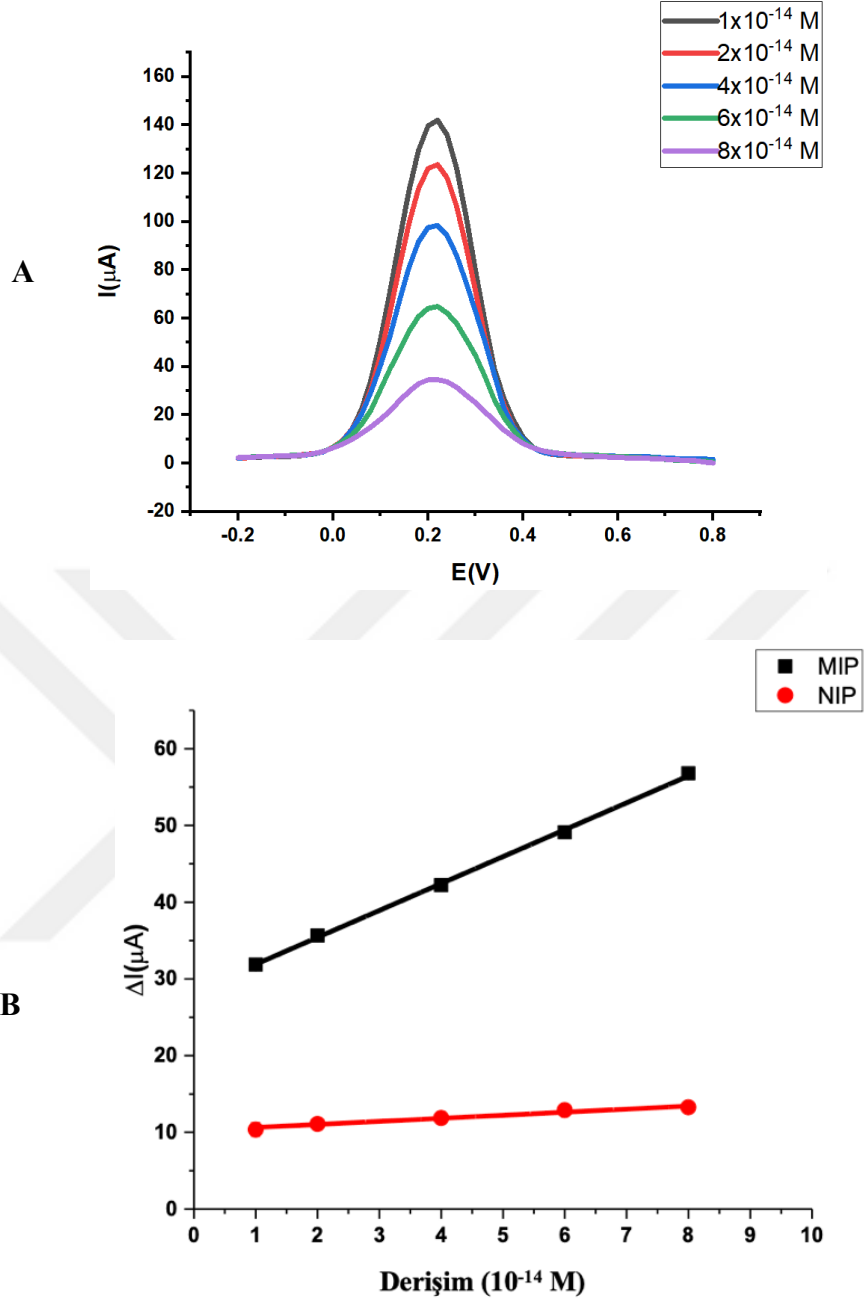
Standart çözelti ile yapılan çalışmalar: P(ANI)@MIP/CKE'nin analitik performansı kalibrasyon eğrisi çizilerek değerlendirilmiştir. Beş farklı derişimde OC'nin yeniden bağlanmasıdan sonra 0,26 V'da anodik pik akımında elde edilen ΔI değerleri ile kalibrasyon eğrisini oluşturmuştur. Doğrusallık aralığı $1,0 \times 10^{-14}$ M - $8,0 \times 10^{-14}$ M (10,0-80,0 fM) olarak belirlenmiştir. Doğrusal regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı sırasıyla $(\Delta I) = 1,3 \times 10^{+15} (\text{OC'nin derişimi, M}) + 19,05$; ($R^2 = 0,998$) olarak bulunmuştur. Artan SOM derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla azalan akım değerlerini gösteren P(ANI)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları Şekil 4.17.A'da gösterilmiştir. MIP sensörü için elde edilen verilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve karşılaştırma amacıyla aynı koşullarda hazırlanan NIP sensörüne ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.17.B'de verilmiştir. P(ANI)@MIP/CKE sensörü ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar Tablo 4.10'da verilmiştir.



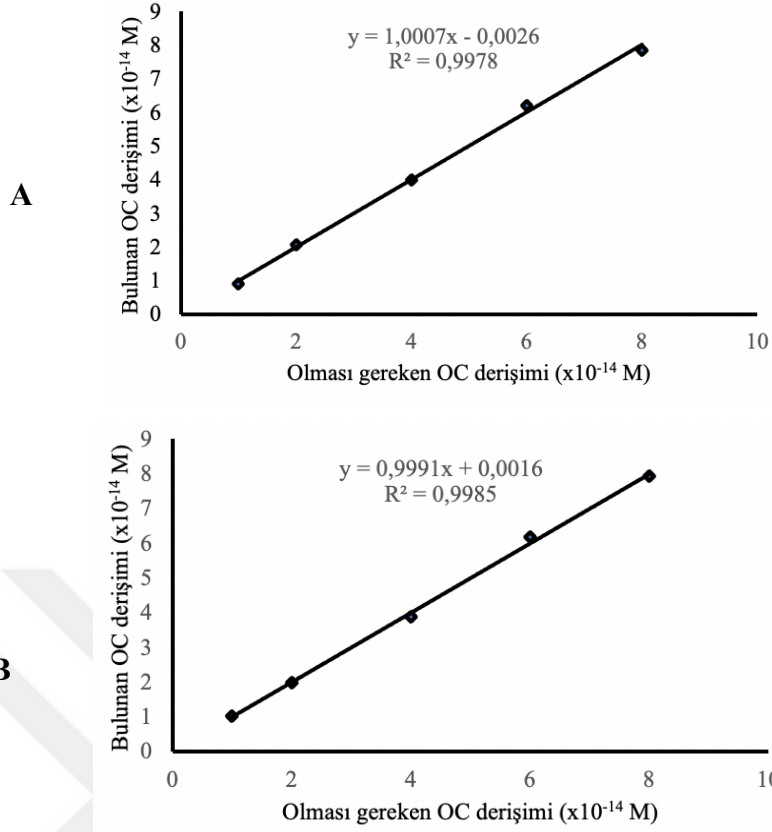
Şekil 4.17. A) Farklı OC derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(ANI)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(ANI)@MIP/CKE ve P(ANI)@NIP/CKE'deki ΔI ve OC derişimleri arasında doğrusal ilişki.

Ticari insan serumu ile yapılan çalışmalar: P(ANI)@MIP/CKE'nin redoks probu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ile elektrokimyasal hücrede $1,0 \times 10^{-14} \text{ M}$ - $8,0 \times 10^{-14} \text{ M}$ (10,0-80,0 fM) doğrusallık aralığında beş farklı OC derişimi eklenmiş ticari serum örneklerinde DPV sonuçları Şekil 4.18.A'da gösterilmiştir. Ticari serum örneğinde P(ANI)@MIP/CKE ve P(ANI)@NIP/CKE sensörleri ile artan OC derişimlerinin yeniden bağlanması sonucu DPV yöntemiyle elde edilen ΔI değerleri ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.18.B.). P(ANI)@MIP/CKE sensörünün serumdaki kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar Tablo 4.12'de verilmiştir.

Ayrıca, geliştirilen P(ANI)@NIP/CKE sensörün standart çözelti ve ticari insan serumu ile yapılan çalışmalarında doğrusallığın kontrolü için kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıklarının kontrol grafikleri Şekil 4.19'da verilmiştir. P(ANI)@NIP/CKE sensöre ait kalibrasyon doğrusunun ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.10'da, doğrusallık kontrol grafikleri ile oluşan doğruların analiz sonuçları da Tablo 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Ticari serum örneklerinde A) Farklı OC derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(ANI)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(ANI)@MIP/CKE ve P(ANI)@NIP/CKE'deki ΔI ve OC derişimleri arasında doğrusal ilişki.



Şekil 4.19. P(ANI)@MIP/CKE sensörün A) Standart çözelti ve B) Ticari insan serumu ile yapılan çalışmalarında elde edilen doğrusalılık kontrol grafikleri.

Tablo 4.10. P(ANI)@MIP/CKE sensörün kalibrasyon doğrularının özellikleri.

	a	b	p*	R²	F**
Standart çözelti	$1,3 \times 10^{+15}$	$1,5 \times 10^{+15}$	0,0001	0,998	1385,93
Ticari insan serumu	19,05	26,88	0,0000	0,998	1996,33

$y = ax + b$ (a= eğim; b= kesişim). * p: Kesişimin olasılık değeri, $0,0000 < p$; R^2 : Korelasyon katsayısı, ** F: varyans analizi için hesaplanan değer.

Tablo 4.11. P(ANI)@MIP/CKE sensörün doğrusallık kontrol grafiklerine ilişkin özellikler.

	a	b	p[*]	R²	F^{**}
Standart çözelti	1,0007	- 0,0026	0,0012	0,998	801,69
Ticari insan serumu	0,9991	0,0016	0,0011	0,999	861,43

$y = ax+b$ (a= eğim; b= kesişim). * p: Kesişimin olasılık değeri, $0,0000 < p$; R²: Korelasyon katsayısı; ** F: varyans analizi için hesaplanan değer.

4.2.3.2. Kesinlik

Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(ANI)@MIP/CKE sensörünün kesinliği $4,0 \times 10^{-14}$ M derişimde OC çözeltisinin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında elde edilen veriler ile kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve BSS (%) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.12).

4.2.3.3. Doğruluk

Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörünün doğruluğu $4,0 \times 10^{-14}$ M derişimde OC çözeltisinin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmalarında elde edilen veriler ile kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve BH (%) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.12).

4.2.3.4. Duyarlılık

Gözlenebilme sınırı (LOD) standart sapma/eğim oranının 3 katı olan derişim değeri ile en düşük alt tayin sınırı (LLOQ) standart sapma/eğim oranının 10 olduğu derişim değeri olarak belirlenmiştir. OC için geliştirilen P(ANI)@MIP/CKE sensörün LOD ve LLOQ değerleri Tablo 4.12’de verilmiştir.

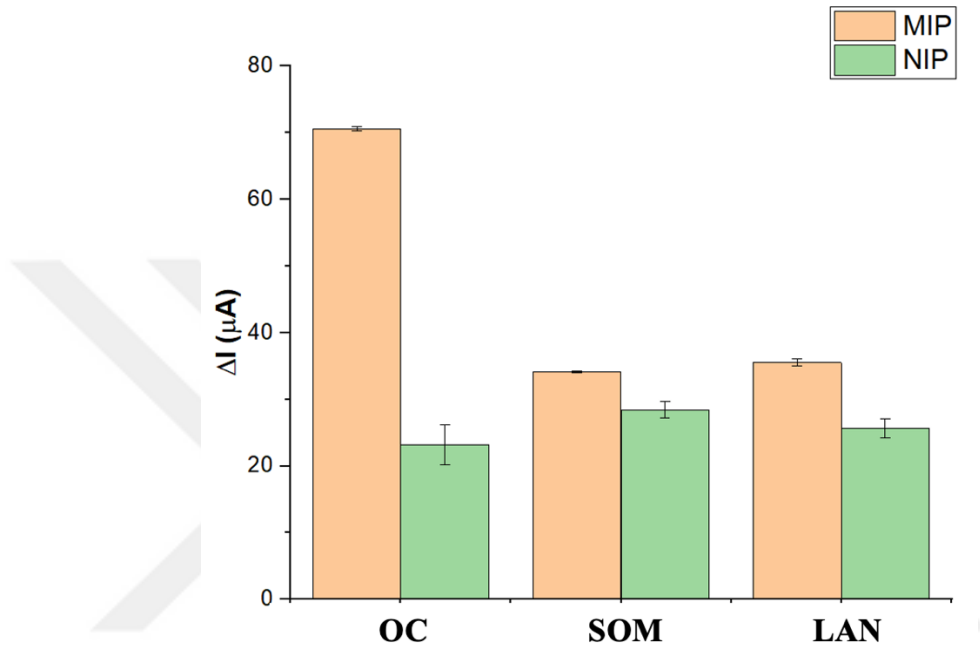
Tablo 4.12. Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(ANI)@MIP/CKE sensörü kullanılan yöntemin analitik performans parametreleri.

	OC (Standart çözelti)	OC (Ticari insan serumu)
Doğrusallık aralığı, M (fM)	$1,0 \times 10^{-14} - 8,0 \times 10^{-14}$ (10,0-80,0)	$1,0 \times 10^{-14} - 8,0 \times 10^{-14}$ (10,0-80,0)
Eğim, mA/M	$1,3 \times 10^{+15}$	19,05
Eğimin standart hatası	0,056	0,062
Kesişim, mA	$1,5 \times 10^{+15}$	26,88
Kesişimin standart hatası	0,362	0,332
Korelasyon katsayısı	0,998	0,998
LOD, fM	0,801	1,026
LLOQ, fM	2,670	3,419
Gün içi kesinlik (n=5) (BSS, %)	0,626	0,265
Günler arası kesinlik (n=5) (BSS, %)	0,779	0,842
Gün içi doğruluk (n=5) (BH, %)	0,213	0,232
Günler arası doğruluk (n=5) (BH, %)	0,467	0,439

BSS: Bağıl standart sapma, BH: Bağıl hata.

4.2.3.5. Seçicilik

P(ANI)@MIP/ CKE'nin seçiciliği, OC'nin sentetik analogu olan SOM ve benzer moleküler yapıya sahip LAN'ın DPV sinyalleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.20.). Ayrıca, MIP elektrodunun seçiciliği, P(ANI)@MIP/CKE ve P(ANI)@NIP/CKE için IF'nin hesaplanması ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.13).



Şekil 4.20. OC ve benzeri moleküller için ΔI değerleri.

Tablo 4.13. OC, SOM ve LAN için IF değerleri.

	MIP	NIP	IF _(MIP/NIP)
	ΔI (μA)	ΔI (μA)	$\Delta I_{(MIP)} / \Delta I_{(NIP)}$
OC	70,60	23,21	3,04
SOM	34,10	28,45	1,20
LAN	35,53	25,66	1,38

4.2.3.6. Tutarlılık

Tutarlılık çalışması, farklı analizci etkisi incelenerek değerlendirilmiştir. Analizciler tarafından $4,0 \times 10^{-14}$ M OC çözeltisi optimize edilen yöntem koşullarında, çözelti P(ANI)@MIP/CKE sensör ile analiz edilmiş, veriler Mann-Whitney U Testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. OC için tutarlılık çalışması sonuçları (n = 6).

	1. Analizci	2. Analizci
$\bar{X}$ (M)	$4,03 \times 10^{-14}$	$3,42 \times 10^{-14}$
SS	$0,03 \times 10^{-14}$	$1,48 \times 10^{-14}$
BSS (%)	0,007	0,431
$U_{\text{Hesap}}=16 < U_{\text{Tablo}}=29$ (p>0,05)		

$\bar{x}$: Ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.
Değerler Ek 2'e göre hesaplanmıştır.

4.2.3.7. Girişim Etkisi

Biyolojik örneklerde bulunan AA, DOP, K^+ , Cl^- , Na^+ ve SO_4^{2-} 'nin girişim etkisi P(ANI)@MIP/CKE sensörü ile incelenmiştir. Girişim etkisini gösteren geri kazanım (%) ve BSS (%) değerleri, OC'nin her bir bileşenle 1:10 (h:h) oranında karıştırılmasıyla hesaplanmıştır (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Girişim yapan bileşenlerin varlığında OC tayin sonuçları (n=3).

Bileşen	Geri kazanım (%)	BSS (%)
DOP	98,33	0,65
AA	98,02	0,51
Na^+	99,80	0,39
SO_4^{2-}	99,80	0,39
K^+	99,54	0,42
Cl^-	99,54	0,42

4.2.3.8. Stabilité

OC için geliştirilen P(ANI)@MIP/CKE sensörünün stabilitesi 1, 3, 8, 10 ve 15 gün boyunca test edilmiştir. 1. günün sonunda ölçülen akım değeri %100 olarak kabul edilmiş; akım değerlerinin 3. gün %89,55'e, 8. gün %83,58'e, 10. gün %58,21'e ve 15. gün %39,55'e düştüğü görülmüştür.

4.2.4. Yöntemin Uygulamaları

Farmasötik preparat: Geliştirilen P(ANI)@MIP/CKE sensör kullanılarak farmasötik preparattaki (Sandostatin® ampul) OC'nin miktar tayini gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.16).

Tablo. 4.16. Sandostatin® ampul analiz sonuçları (n=3).

	OC
Etiketteki miktarı (mg/ampul)	0,10
Bulunan miktar (mg/ampul)	0,09
BSS (%)	0,38
BH (%)	0,63

BSS: Bağlı standart sapma, BH: Bağlı hata.

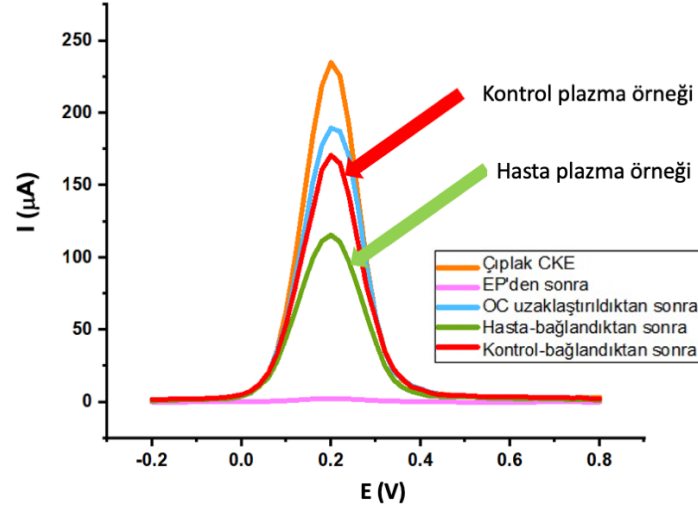
Ticari insan serumu: Geliştirilen P(ANI)@MIP/CKE sensör ile OC eklenen ticari insan serumu örnekleri analiz edilmiştir (Tablo 4.17).

Tablo. 4.17. OC eklenmiş ticari insan serum örneklerinin analiz sonuçları (n=3).

	OC
Eklenen miktarı (mg)	0,10
Bulunan miktar (mg)	0,09
BSS (%)	0,27
Geri kazanım (%)	101,19

BSS: Bağlı standart sapma.

Gerçek insan serumu örneği: Nöroendokrin kanser tedavisinde Sandostatin® ampul kullanan hastaların ve kullanmayan sağlıklı kişilerin (kontrol) plazmasındaki ortalama OC miktarları, geliştirilmiş ve valide edilmiş MIP tabanlı elektrokimyasal P(ANI)@MIP/CKE sensörle analiz edilmiştir. Plazma örneklerine ait DP voltamogramları Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Analiz sonuçları Tablo 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Hasta ve kontrol plazma örneklerine ait DP voltamogramları.

Tablo 4.18. Hasta ve kontrol plazma örneklerinin analiz sonuçları (n=3).

	Plazmadaki OC miktarı* (ng/mL)			
	Hasta Kodu		Kontrol Kodu	
	H1	9,20	K1	0,35
	H2	11,06	K2	0,25
	H3	7,88	K3	0,39
	H4	10,96		
	H5	8,58		
	$\bar{X}$	9,54		0,33
SS	1,42		0,07	
p	1,0x10 ⁻³			

$\bar{x}$: Ortalama, SS: Standart sapma.

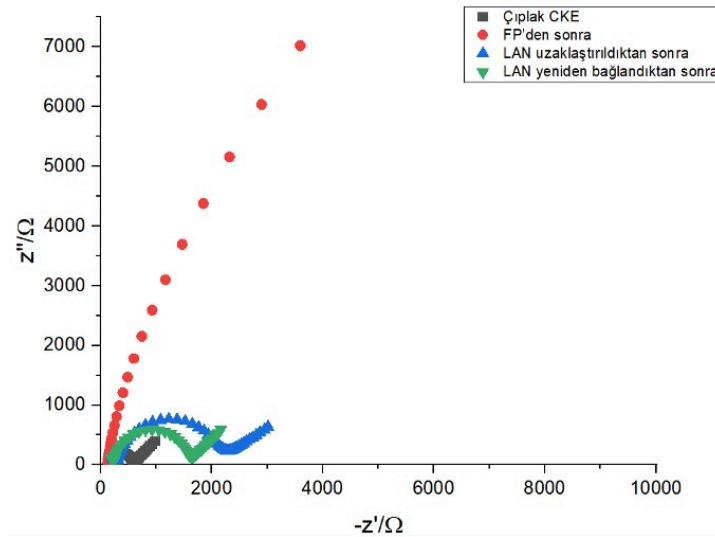
4.3. MIP Tabanlı P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE Sensörü ile LAN'ın Elektrokimyasal Analizi

LAN için geliştirilen MIP tabanlı P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör; fonksiyonel monomer olarak MAGA varlığında, temel monomer olarak HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak EGDMA, başlatıcı olarak 2-hidroksi-2-metil propisfenon kullanılarak FP yöntemi ile Bölüm 3.5.2.3'de anlatıldığı şekilde oluşturulmuştur.

4.3.1. MIP Tabanlı P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE Sensörün Karakterizasyonu

4.3.1.1. Elektrokimyasal Karakterizasyon

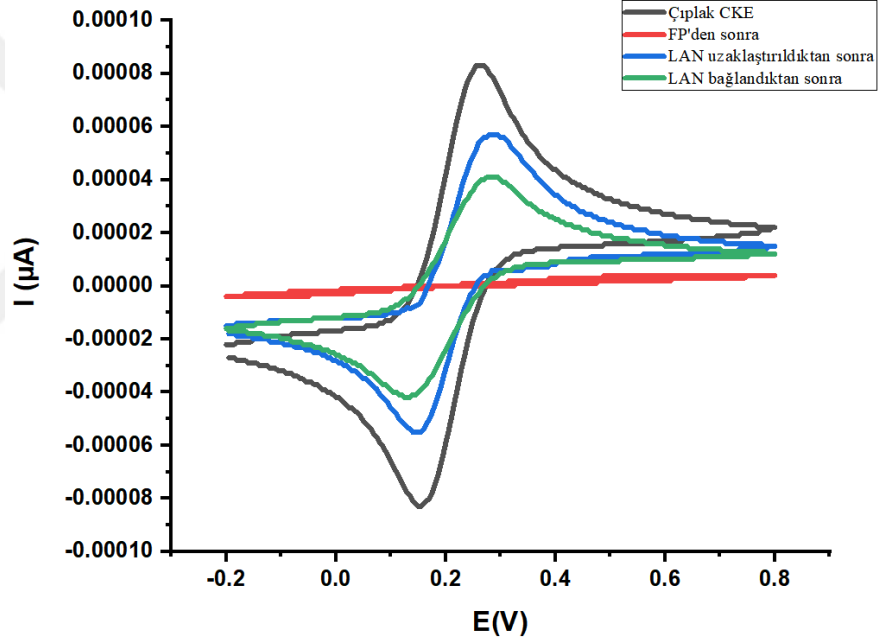
LAN'ın elektrokimyasal karakterizasyonu, P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörün, FP'den önce, FP'den sonra, LAN çıkarıldıktan sonra ve yeniden bağlandıktan sonra 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde alınan ölçüm sonuçları değerlendirilmiştir. Empedans spektrum değişiklikleri Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.22. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamakları için empedans spektrumları.

P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör için, çıplak CKE 627 Ω , FP'den sonra 86284 Ω , LAN'ın çıkarılmasından sonra 1159 Ω ve LAN'ın yeniden bağlanması sonucu 1653 Ω R_{ct} değerleri elde edilmiştir.

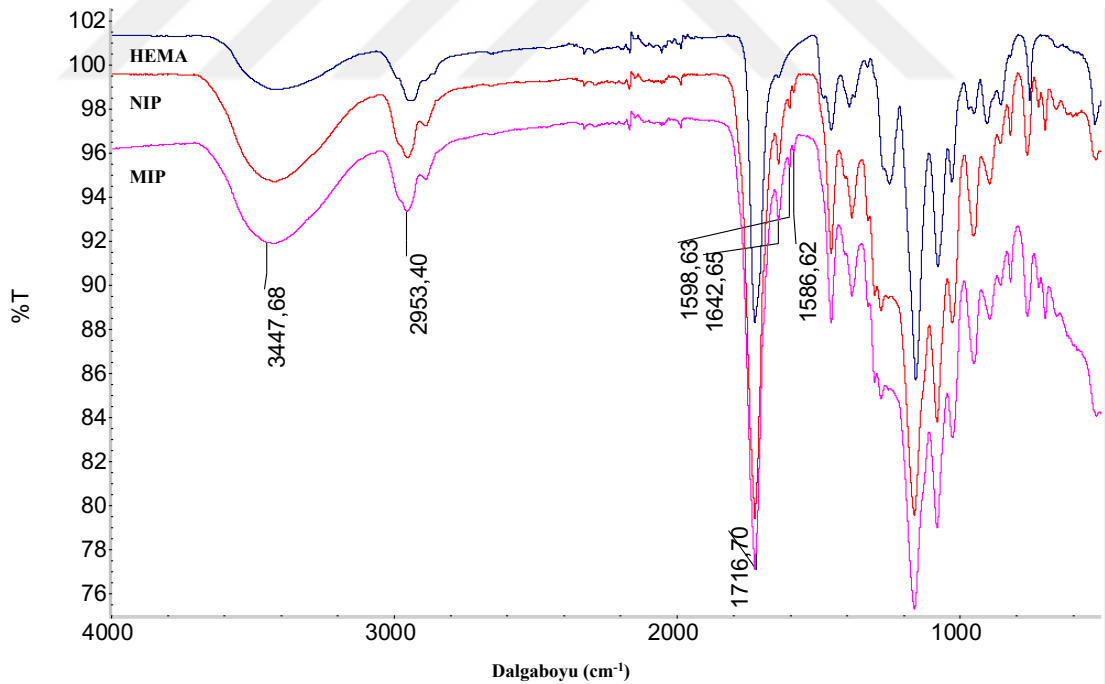
Ayrıca, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu varlığında FP'den önce, FP'den sonra, LAN'ın çıkarılmasından sonra ve LAN'ın yeniden bağlanması sonucu CV yöntemi kullanılarak da değerlendirilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün oluşturulma basamaklarında elde edilen CV voltamogramları.

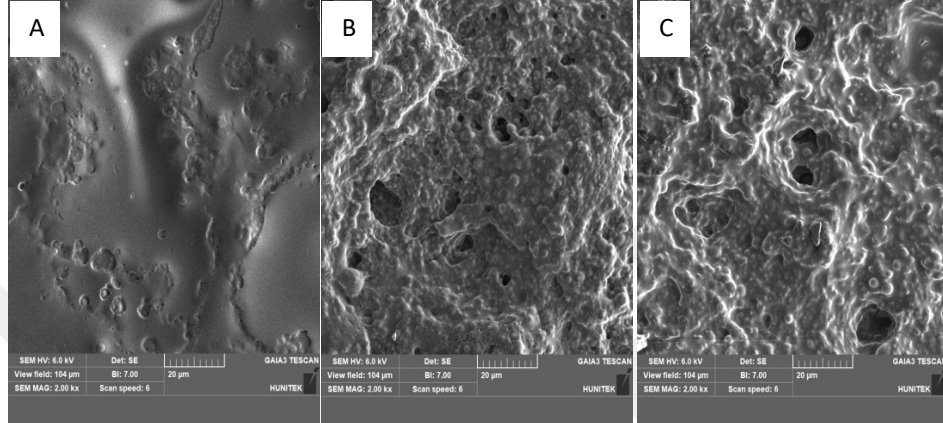
4.3.1.2. Yüzey Karakterizasyonu

Polimerik yapı içerisine MAGA monomerinin katıldığını kanıtlamak amacıyla HEMA, MIP ve NIP filmlerin FTIR spektrumları alınmıştır. Spektrumlarda sırasıyla 3400 cm^{-1} , 2950 cm^{-1} ve 1700 cm^{-1} civarlarında görülen ortak $-\text{OH}$ gerilme bantları, alkil gruplarından kaynaklanan $-\text{CH}$ gerilme bantları ve $-\text{C}=\text{O}$ bükülme bantları, HEMA monomerinden ve fonksiyonel monomerdeki ortak gruplardan kaynaklanmıştır. Şekil 4.24’de görüldüğü gibi MIP ve NIP filmlerde bu piklerin şiddetlerinde artışlar bulunmuştur. Bu bandların şiddetindeki artış, MAGA monomerinin yapısında bulunan ortak fonksiyonel grupların fazlalığından kaynaklanmıştır. Ayrıca MIP ve NIP’lerin FTIR spektrumları da birbirine benzer bulunmuştur. Bu durum; benzer fonksiyonel monomer içermelerinden kaynaklanmıştır. MAGA varlığı ile birlikte amid bandlarının (1642 cm^{-1} ve 1586 cm^{-1}) varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar polimerik yapıya MAGA monomerinin başarılı bir biçimde katıldığını göstermiştir.



Şekil 4.24. HEMA, NIP ve MIP polimerik yapılara ait FTIR spektrumları.

Ayrıca, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün yüzey karakterizasyonu SEM ile de incelenmiştir (Şekil 4.25). Distile su ile yıkandıktan sonra, NIP film için polimerik filmdeki polimer yüzeyi üzerinde farklı gözenekler rastgele dağılmıştır. Diğer taraftan, distile su ile yıkandıktan sonra desorbe edici ajan kullanımı nedeniyle MIP için daha fazla çökmüş gözenekli yapılar oluşmuştur.



Şekil 4.25. Polimerik yapıların SEM görüntüleri: A) HEMA; B) NIP ve C) MIP.

4.3.2. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE Sensörün Optimizasyon Koşulları

Geliştirilen sensörün optimizasyonu; monomer:hedef molekül oranı, HEMA:EDGMA molekül oranı, FP çözelti hacmi, hedef molekülün uzaklaştırılması ve hedef molekülün bağlanması denenerak yapılmıştır. Optimizasyon koşulları belirlenirken P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörüne $6,0 \times 10^{-14}$ M LAN bağlanmıştır. Tüm ölçümler 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.3.2.1. Monomer:Hedef Molekül Oranı

Monomer:hedef molekül derişim oranlarındaki değişikliklerin polimer üzerindeki etkisini incelemek için 1:1, 2:1, 3:1 ve 4:1 (h:h) oranları denenmiştir. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör için en uygun monomer:hedef molekül (MAGA:LAN) oranının 3:1 olduğu görülmüştür (Tablo 4.19).

4.3.2.2. HEMA:EDGMA Molekül Oranı

HEMA:EDGMA oranının optimize etmek için 1:0, 1:1, 5:1, 10:1 ve 0:1 (h:h) oranları denenmiştir. FP sonrası ve kalıp molekül çıkarıldıktan sonra elde edilen pik akımları arasındaki farkın en yüksek olduğu HEMA:EDGMA oranının 5:1 olduğu görülmüştür (Tablo 4.19).

4.3.2.3. FP Çözelti Hacmi

FP çözeltisinin hacmini optimize etmek için fotopolimerizasyon çözeltisinden elektrot yüzeyine 0,5 µL, 1,0 µL, 1,5 µL, ve 2,0 µL damlatılmıştır. FP sonrası ve kalıp molekül çıkarıldıktan sonra elde edilen pik akımları arasındaki farkın en yüksek olduğu FP çözelti hacminin 1,0 µL olduğu görülmüştür (Tablo 4.19).

4.3.2.4. Hedef Molekülün Uzaklaştırılması

Hedef molekülü uzaklaştırmak için P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör bir çalkalayıcıda 650 rpm ve 25°C'de 15 dakika boyunca HAc (15 M), NaOH (1 M), MeOH, DMSO (5 M) ve NaCl çözeltilerine daldırılıp bekletilmiştir. En etkili kalıp molekülü çıkarma sonuçları 15M HAc çözeltisi ile elde edilmiştir (Tablo 4.19).

Hedef molekülü uzaklaştırma süresini belirlemek için 15 M HAc çözeltisine daldırılan P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE çalkalayıcıda 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika boyunca bekletilmiştir. En yüksek pik akımları 15. ve 20. dakikada gözlemlenmiştir (Tablo 4.19).

4.3.2.5. Hedef Molekülün Bağlanması

P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE'nin inkübasyon süresi $6,0 \times 10^{-14}$ M LAN'ın bir çalkalayıcıda 650 rpm'de ve 25°C'de 5, 8, 10, 12 ve 15 dakika boyunca incelenmiştir. Maksimum pik akımı değişimi 10. dakikada elde edilmiştir (Tablo 4.19).

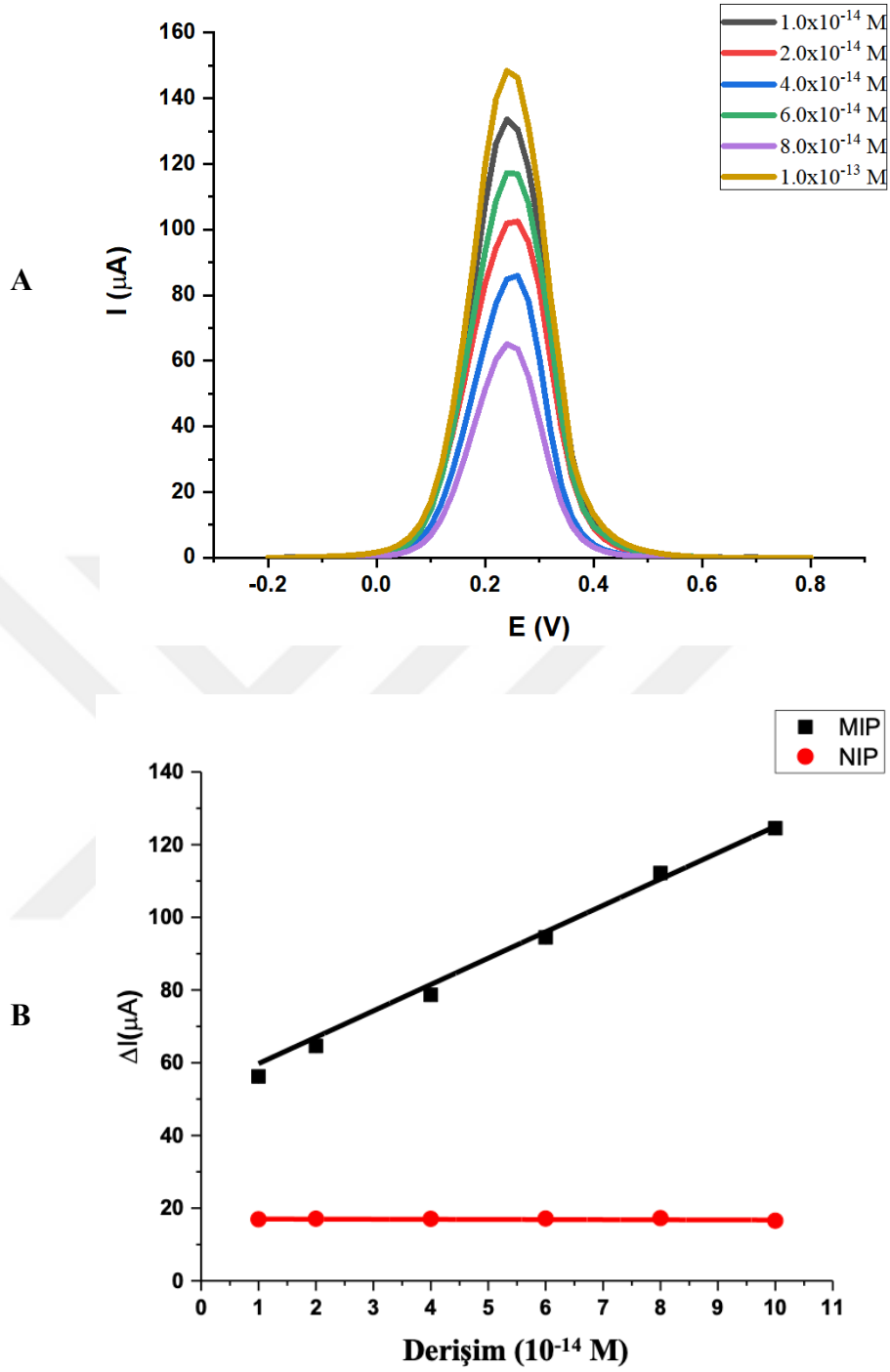
Tablo 4.19. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörünün optimizasyon parametreleri.

MAGA:LAN Oranı	Derişim oranı	1:1	2:1	3:1	4:1	
	ΔI (μA)	145,57	146,81	147,11	147,12	
HEMA:EDGMA Molekül Oranı	Derişim oranı	1:0	1:1	5:1	10:1	0:1
	ΔI (μA)	2,99	25,24	53,02	0,59	31,49
FP Çözelti Hacmi	Damlatma hacmi (μL)	0,5	1,0	1,5	2,0	
	ΔI (μA)	44,13	53,02	36,29	35,57	
LAN Uzaklaştırma Çözeltisi	Uzaklaştırma Çözeltisi	15 M HAc	1 M NaOH	MeOH	5 M DMSO	NaCl
	ΔI (μA)	53,03	11,07	13,58	23,63	10,78
LAN Uzaklaştırma Süresi	Süre (dakika)	10	15	20	25	30
	ΔI (μA)	50,60	52,75	53,02	48,50	43,65
LAN Bağlanma Süresi	Süre (dakika)	5	8	10	12	15
	ΔI (μA)	15,03	40,51	48,23	38,02	38,01

4.3.3. Yöntemin Analitik Performansı

4.3.3.1. Doğrusallık

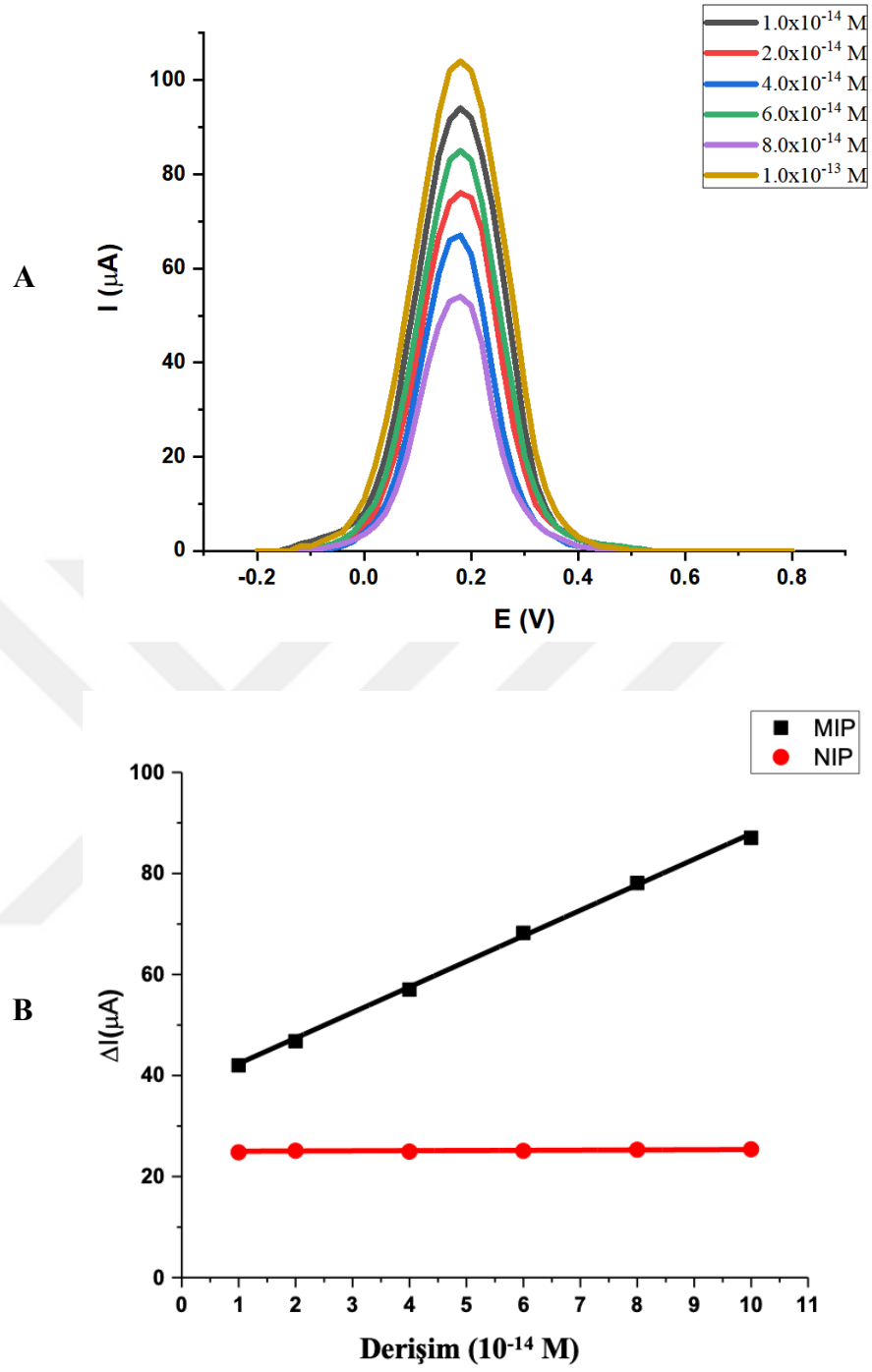
Standart çözelti ile yapılan çalışmalar: P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörünün analitik performansı kalibrasyon eğrisi çizilerek değerlendirilmiştir. Altı farklı derişimde LAN'ın yeniden bağlanmasıyla 0,26 V'da anodik pik akımında elde edilen ΔI değerleri ile kalibrasyon eğrisini oluşturmuştur. Doğrusallık aralığı $1,0 \times 10^{-14}$ M ile $1,0 \times 10^{-13}$ M (10,0 fM – 100,0 fM) olarak belirlenmiştir. Doğrusal regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı sırasıyla $y(\Delta I) = 7,7 \times 10^{+14} (\text{LAN'ın molar derişimi}) + 48,71$, $R^2 = 0,998$ olarak bulunmuştur. Artan LAN derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla azalan akım değerlerini gösteren P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları Şekil 4.26.A'da gösterilmiştir. MIP sensörü için elde edilen verilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve karşılaştırma amacıyla aynı koşullarda hazırlanan NIP sensörüne ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.26.B'de verilmiştir. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörü ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar Tablo 4.20'de verilmiştir.



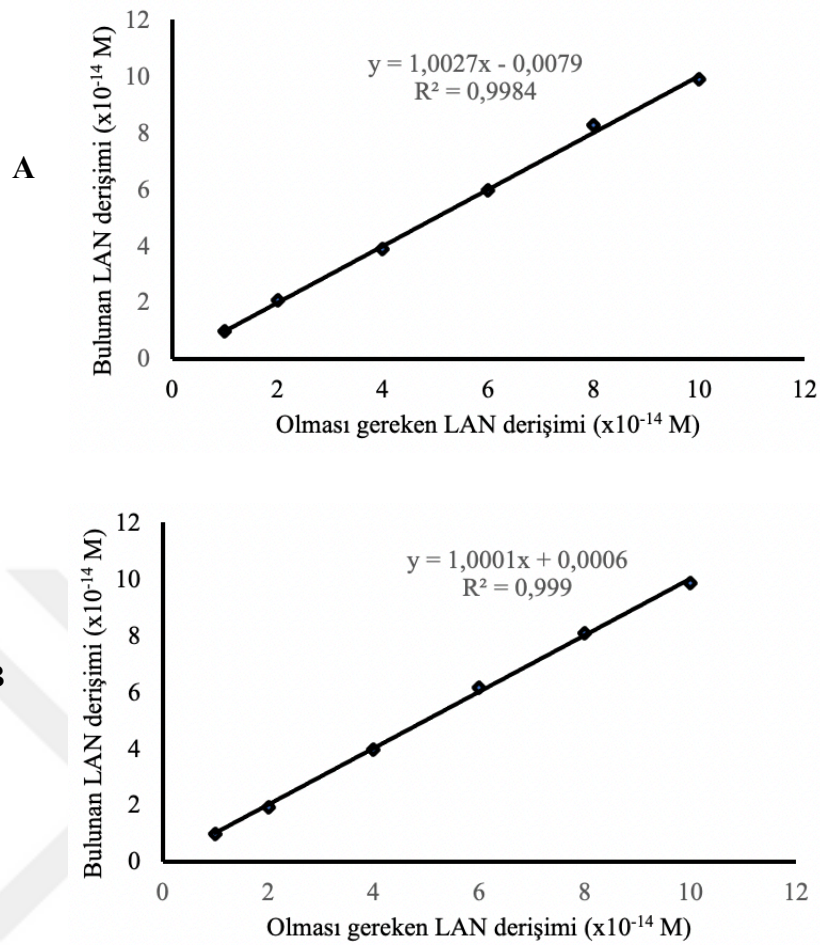
Şekil 4.26. A) Farklı LAN derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@NIP/CKE'deki ΔI ve LAN derişimleri arasında doğrusal ilişki.

Ticari insan serumu ile yapılan çalışmalar: P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE'nin redoks probu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ile elektrokimyasal hücrede $1,0 \times 10^{-14}$ M - $1,0 \times 10^{-13}$ M (10,0-100,0 fM) doğrusallık aralığında altı farklı LAN derişimi eklenmiş ticari serum örneklerinde DPV sonuçları Şekil 4.27.A'da gösterilmiştir. Ticari serum örneğinde P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@NIP/CKE sensörleri ile artan OC derişimlerinin yeniden bağlanması sonucu DPV yöntemiyle elde edilen ΔI değerleri ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.27.B.). P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörünün serumdaki kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar Tablo 4.22'de verilmiştir.

Ayrıca, geliştirilen P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün standart çözelti ve ticari insan serumu ile yapılan çalışmalarında doğrusallığın kontrolü için kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıklarının kontrol grafikleri Şekil 4.28'de verilmiştir. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensöre ait kalibrasyon doğrusunun ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.20'de, doğrusallık kontrol grafikleri ile oluşan doğruların analiz sonuçları da Tablo 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Ticari serum örneklerinde A) Farklı LAN derişimlerinin yeniden bağlanmasıyla P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE'nin DP voltamogramları ve B) P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@NIP/CKE'deki ΔI ve LAN derişimleri arasında doğrusal ilişki.



Şekil 4.28. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün A) Standart çözelti ve B) Ticari insan serumu ile yapılan çalışmalarında elde edilen doğrusallık kontrol grafikleri.

Tablo 4.20. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün kalibrasyon doğrularının özellikleri.

	a	b	p [*]	R ²	F ^{**}
Standart çözelti	$7,7 \times 10^{+14}$	48,71	0,0000	0,998	2309,61
Ticari insan serumu	$5,1 \times 10^{+14}$	36,94	0,0000	0,999	4046,22

$y = ax + b$ (a= eğim; b= kesişim). * p: Kesişimin olasılık değeri, $0,0000 < p$; R²: Korelasyon katsayısı; ** F: varyans analizi için hesaplanan değer.

Tablo 4.21. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün doğrusallık kontrol grafiklerine ilişkin özellikler.

	a	b	p[*]	R²	F^{**}
Standart çözelti	1,0027	- 0,0079	0,0001	0,9984	1219,86
Ticari insan serumu	1,0001	0,0006	0,00003	0,9990	1956,59

y = ax+b (a= eğim; b= kesişim). * p: Kesişimin olasılık değeri, 0,0000 < p; R²: Korelasyon katsayısı,** F: varyans analizi için hesaplanan değer.

4.3.3.2. Kesinlik

Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörünün kesinliği $6,0 \times 10^{-14}$ M derişimde LAN çözeltisinin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında elde edilen veriler ile kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve BSS (%) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.22).

4.3.3.3. Doğruluk

Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörünün doğruluğu $6,0 \times 10^{-14}$ M derişimde LAN çözeltisinin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmalarında elde edilen veriler ile kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve BH (%) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.22).

4.3.3.4. Duyarlılık

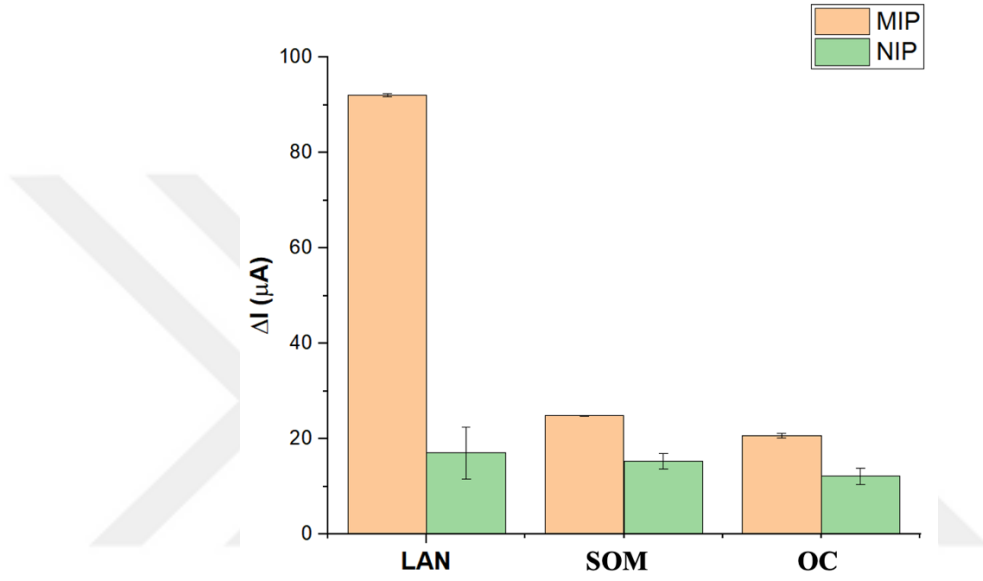
LOD standart sapma/eğim oranının 3 katı olan derişim değeri ile LLOQ standart sapma/eğim oranının 10 olduğu derişim değeri olarak hesaplanmıştır. SOM için geliştirilen P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün LOD ve LLOQ değerleri Tablo 4.22’de verilmiştir.

Tablo 4.22. Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörü kullanılan yöntemin analitik performans parametreleri.

	LAN (Standart çözelti)	LAN (Ticari insan serumu)
Doğrusallık aralığı, M (fM)	$1,0 \times 10^{-14} - 1,0 \times 10^{-13}$ (10,0-100,0)	$1,0 \times 10^{-14} - 1,0 \times 10^{-13}$ (10,0-100,0)
Eğim, mA/M	$7,7 \times 10^{+14}$	$5,1 \times 10^{+14}$
Eğimin standart hatası	0,017	0,094
Kesişim, mA	48,71	36,94
Kesişimin standart hatası	0,152	0,063
Korelasyon katsayısı	0,998	0,999
LOD, fM	1,756	5,852
LLOQ, fM	1,822	6,074
Gün içi kesinlik (n=5) (BSS, %)	0,260	0,223
Günler arası kesinlik (n=5) (BSS, %)	0,580	0,519
Gün içi doğruluk (n=5) (BH, %)	0,189	0,198
Günler arası doğruluk (n=5) (BH, %)	0,441	0,278

4.3.3.5. Seçicilik

P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün LAN'a özgün olduğu, sentetik analogu olduğu SOM ve benzer moleküler yapıya sahip OC'nin DPV sinyalleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.29). Ayrıca, MIP elektrotunun seçiciliği, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@NIP/CKE için baskılama faktörlerinin (IF) hesaplanması ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.23).



Şekil 4.29. LAN ve benzeri moleküller için ΔI değerleri.

Tablo 4.23. LAN, SOM ve OC için IF değerleri.

	MIP	NIP	IF _(MIP/NIP)
	ΔI (μA)	ΔI (μA)	$\Delta I_{(MIP)} / \Delta I_{(NIP)}$
LAN	92,10	17,06	5,40
SOM	24,88	15,40	1,62
OC	20,69	12,21	1,69

4.3.3.6. Tutarlılık

Tutarlılık çalışması, iki farklı analizci etkisi incelenerek değerlendirilmiştir. Analizciler tarafından $6,0 \times 10^{-14}$ M LAN çözeltisi optimize edilen yöntem koşullarında, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör ile analiz edilmiş, veriler Mann-Whitney U Testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.24).

Tablo 4.24. LAN için tutarlılık çalışması sonuçları (n = 6).

	1. Analizci	2. Analizci
$\bar{X}$ (M)	$5,94 \times 10^{-14}$	$5,96 \times 10^{-14}$
SS	$0,03 \times 10^{-14}$	$0,03 \times 10^{-14}$
BSS (%)	0,004	0,005
$U_{\text{Hesap}}=10 < U_{\text{Tablo}}=29$ (p>0.05)		

$\bar{x}$: Ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.
Değerler Ek 2'e göre hesaplanmıştır.

4.3.3.7. Girişim Etkisi

Biyolojik örneklerde bulunan askorbik asit (AA), dopamin (DOP), K^+ , Cl^- , Na^+ ve SO_4^{2-} 'nin girişim etkisi P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörü ile incelenmiştir. Girişim etkisini gösteren geri kazanım (%) ve BSS (%) değerleri, LAN'ın her bir bileşenle 1:10 oranında karıştırılmasıyla hesaplanmıştır (Tablo 4.25).

Tablo 4.25. Girişim yapan bileşenlerin varlığında LAN tayin sonuçları (n=3).

Bileşen	Geri kazanım (%)	BSS (%)
DOP	96,73	0,63
AA	99,21	0,55
Na^+	97,22	0,72
SO_4^{2-}	100,43	0,09
K^+	100,43	0,09
Cl^-	100,39	0,84

4.3.3.8. Stabilité

LAN için geliştirilen P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörünün stabilitesi 1, 3, 8, 10 ve 15 gün boyunca test edilmiştir. 1. günün sonunda ölçülen akım değeri %100 olarak kabul edilmiş; akım değerlerinin 3. gün %95,43'e, 8. gün %92,89'a, 10. gün %80,25'e ve 15. gün %61,17'e düştüğü görülmüştür.

4.3.4. Yöntemin Uygulamaları

Geliştirilen P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör ile farmasötik preparat (Somatuline® Autogel®) (Tablo 4.26) ve ticari insan serumundaki LAN'ın miktar tayini gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.27).

Tablo 4.26. Somatuline® Autogel® tek kullanımlık enjektör analiz sonuçları (n=3).

	LAN
Etiketledeki miktar (mg/şiringa)	29,52
Bulunan miktar (mg/şiringa)	29,37
BSS (%)	0,07
BH (%)	0,508

BSS: Bağıl standart sapma, BH: Bağıl hata.

Tablo 4.27. LAN eklenmiş ticari insan serum örneklerinin analiz sonuçları (n=3).

	LAN
Eklenen miktar (mg)	29,52
Bulunan miktar (mg)	29,28
BSS (%)	0,47
Geri kazanım (%)	99,20

BSS: Bağıl standart sapma.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında kullanılan SOM, OC ve LAN analizi için ayrı ayrı MIP tabanlı sensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen sensörler optimize edildikten sonra analitik performansı değerlendirilmiş ve farmasötik preparat, ticari insan serumu ile hasta ve sağlıklı gönüllü plazma örneklerine uygulanmıştır.

CV, DPV ve EIS elektrokimyasal yöntemlerinde redoks probu olarak 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak dolaylı ölçümler yapılmıştır. Doğrudan hedef moleküle ait pik akımları yerine hedef molekülün uzaklaştırılması ve bağlanmasından sonra elde edilen $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pikleri arasındaki fark değerlendirilmiştir. Bu sayede duyarlılık arttırılarak daha düşük LOD değerlerine ulaşılmıştır.

MIP tabanlı sensörler geliştirilirken fonksiyonel monomer seçimi moleküllerin yapılarına göre gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kaynaklarda en çok rastlanan orto-fenilendiamin (o-PD) OC için denenmiştir. Ancak, çok hızlı bozunduğu ve tekrarlı sonuçlar alınamadığı için sıklıkla kullanılan bir diğer monomer olan ANI denenmiştir. Sonuçlar birbiriyle tutarlı olduğu için analizlere devam edilmiştir. Daha sonra geliştirilen sensörlerde farklı monomerler denenmek istenmiş ve kaynaklarda bulunmayan, sentezlenerek elde edilen MAAsp ile MAGA'nın aniline göre daha sağlam polimerik yapılar oluşturması üzerine SOM ile LAN analizlerinde bu monomerler kullanılmıştır.

SOM için $\text{P}(\text{HEMA-MAAsp})@\text{MIP/CKE}$ ve LAN için $\text{P}(\text{HEMA-MAGA})@\text{MIP/CKE}$ sensörleri fonksiyonel monomer olarak sırasıyla MAAsp ve MAGA kullanılarak FP yöntemi ile hazırlanmıştır. OC için geliştirilen $\text{P}(\text{ANI})@\text{MIP/CKE}$ sensörde ise fonksiyonel monomer olarak ANI ve EP yöntemi kullanılmıştır.

MIP Tabanlı Sensörlerin Elektrokimyasal Karakterizasyonu

$\text{P}(\text{HEMA-MAAsp})@\text{MIP/CKE}$, $\text{P}(\text{ANI})@\text{MIP/CKE}$ ve $\text{P}(\text{HEMA-MAGA})@\text{MIP/CKE}$ sensörlerinin karakterizasyonu amacıyla EIS yöntemi ile elektron transfer kapasiteleri değerlendirilmiştir. Şekil 4.1'de $\text{P}(\text{HEMA-MAAsp})@\text{MIP/CKE}$ sensörün, Şekil 4.13'de $\text{P}(\text{ANI})@\text{MIP/CKE}$ sensörün, Şekil

4.22’de P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörlerin oluşturulma basamaklarında EIS ölçümleriyle elde edilen Nyquist grafikleri gösterilmiştir. Nyquist diyagramının daha yüksek frekanslar için yarım dairesi elektron transfer prosedürüne karşılık gelirken, düşük frekansın doğrusal kısmı difüzyona karşılık gelmektedir. Ölçümlerde devre sisteminde çözelti direnci (R_s), çift katmanlı kapasitans ile ilişkili sabit faz elementi (CPE), yük transfer direnci (R_{ct}) ve sonlu uzunluklu Warburg kısa devre terimi (W) kullanılır. R_{ct} değeri, elektrot yüzeyinde elektrot reaksiyonu sırasında gerçekleşen yük transferini tanımlar ve elektron transferi gerçekleşiyorken düşük, elektron transferini engelleyen bir durum varlığında yüksek bir değer alır (111).

Çıplak CKE (polimerizasyon öncesi)’de hızlı elektron transfer kinetiği ile difüzyonla sınırlı bir süreç gözlemlenebildiği için en düşük direnç değerleri elde edilmiştir. Polimerizasyondan sonra, MIP iletken değildir ve yüzey elektron transferine son derece dirençlidir, bu nedenle en yüksek dirençli empedans spektrumları elde edilmiştir. Hedef molekülün çıkarılmasından sonra boşlukların oluşması nedeniyle empedans değeri düşmüş ve $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ sinyali tekrar gözlemlenmiştir. Yarım daire daha sonra hedef molekülün yeniden bağlanması sonucu elektron transferi engellendiği için tekrar oluşmuştur.

Ayrıca, P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE (Şekil 4.2), P(ANI)@MIP/CKE (Şekil 4.14) ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE (Şekil 4.23) sensörlerinin CV yöntemi ile oluşturulma basamakları incelenerek de elektrokimyasal karakterizasyonları değerlendirilmiştir. Yüzeyinde yük transferini engelleyen bir etken olmadığından çıplak CKE’da (polimerizasyondan önce) en yüksek pik görülmüştür. Polimerizasyondan sonra yüzey kapanmış ve elektron transferi bloke olmuştur ve redoks pikleri kaybolmuştur. Hedef molekülü çıkardıktan sonra, kalıp moleküle özgün boşluklar oluştuğunda elektron transferi artmış, polimerik filmde tutulan hedef moleküllerinin uzaklaştırılmış olduğunu doğrulayan bir çift redoks piki yeniden ortaya çıkmıştır. Yeniden bağlanmadan sonra $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ’ün pik akımı, kalıp molekül boşluğunun yeniden azalması ve böylece yüzeyin kapanması nedeniyle tekrar azalmıştır. Bu veriler ışığında, P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE, P(ANI)@MIP/CKE, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörlerinin başarılı bir şekilde geliştirildiği ispatlanmıştır.

MIP Tabanlı Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu

P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörlerinin yüzey karakterizasyonu FTIR (Şekil 4.3. ve Şekil 4.24) ve SEM yöntemleri kullanılarak (Şekil 4.4. ve Şekil 4.25), P(ANI)@MIP/CKE sensörünün yüzey karakterizasyonu ise Raman spektroskopisi, temas açısı ölçümleri ve SEM yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.15).

Sentezlenen polimerik yapıların kimyasal yapı analizi için FTIR spektroskopisi yöntemi uygulanmıştır. FTIR analizi, fonksiyonel monomerlerinin polimerik ağa dahil edildiğini doğrulamak için uygulanmıştır. FTIR analizinde HEMA fonksiyonel grupları nedeniyle tüm polimerler için görülen O-H, C-H ve C=O gerilmesine ait 3400 cm^{-1} , 2940 cm^{-1} ve 1700 cm^{-1} 'deki şiddetli pikler görülmüştür. Amid I ve amid II'nin asimetrik titreşimlerinin varlığı sırasıyla, 1570 cm^{-1} ve 1600 cm^{-1} 'de gözlenen bantlar ile kanıtlanmıştır. FTIR spektrumlarında gözlemlenen tepe noktaları, CKE üzerinde başarılı bir şekilde sentezlenmiş olan fonksiyonel monomer gruplarının varlığını doğrulamıştır. SEM analizi ile elektrot üzerinde oluşan baskılı filmin yüzey morfolojisi incelenmiştir. Polimerik yapılarda, partikül ve gözenekler açıkça görülmüştür. Gözenekler, hedef moleküllerinin kolaylıkla polimerik yapının yüzeyine ve spesifik boşluklara (moleküler baskılanmış bölgeler) ulaşmasını ve sonuç olarak adsorpsiyon kinetiğinin hızlanmasını sağlamıştır. Polimerik yapıya gömülü olarak bulunan partiküller, polimerin birim partikül kütlesi başına düşen spesifik yüzey alanını artıran faktörlerden biridir. Spesifik yüzey alanının artması ile sensörün hassasiyet de artmıştır. Ayrıca; partiküllerin ve gözenekli yapıların yüzeyde veya yüzeye yakın bölgelerde bulunması sensör kapasitesini ve hızını da arttırmıştır. CKE üzerinde fonksiyonel monomer ile oluşturulan polimerizasyon sırasında hedef molekül varlığında yüzeyde (MIP) pürüzlü yapılar meydana gelmişken kalıp molekül olmadan oluşturulan yüzeyde (NIP) pürüzlü yapılar çok daha az bulunmuştur. Raman spektroskopisinde gözlenen raman kaymaları elde edilen polimerik yapıyı tanımlamada kullanılmıştır. Elektrotların yüzeyinin temas açısı, yüzeylere dikkatlice damlatılan su damlacıkları ile ölçülmüştür. Çıplak CKE filminin su temas açısı polimerik filmin temas açısından yüksek çıkması polimerizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.

MIP Tabanlı Sensörlerin Optimizasyon Koşulları

MIP tabanlı sensörlerin optimizasyon koşulları oluşturulurken monomer:hedef molekül oranı, hedef molekülün uzaklaştırılması ve hedef molekülün bağlanması için çeşitli koşullar denenmiştir. Ayrıca, FP yöntemi için FP çözelti hacmi ve HEMA:EDGMA molekül oranı; EP yöntemi için döngü sayısı incelenmiştir. Monomer:hedef molekül oranı elektrot yüzeyinde oluşan polimerin ve geliştirilen sensörün kararlı olmasını sağlayan önemli bir parametredir. Uygun kalıp molekül boşlukları ve kararlı, homojen polimer oluşumu elde etmek için monomer:hedef molekül oranları optimize edilmiştir. Geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin polimerizasyon öncesi, polimerizasyon sonrası, kalıp molekülü çıkarma ve yeniden bağlanma basamaklarından sonraki CV ve DPV sinyalleri bu farklı oranlar için karşılaştırılmıştır. İlk önce, monomer oranı arttıkça polimer oluşumu hızla artmış, monomer:hedef molekül oranları P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensörü için 4:1, P(ANI)@MIP/CKE sensörü için 200:1, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörü için 3:1 oranlarından sonra ise çok az değişmiştir. Monomer:hedef molekül oranları yüksek stabilite, kolay çıkarma ve düzgün yeniden bağlama işlemleri sağlayan optimum oranlar P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE sensörü için Şekil 4.5’de, P(ANI)@MIP/CKE sensörü için Tablo 4.9’da, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörü için Tablo 4.19’da verilmiştir.

FP yöntemi ile geliştirilen P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörleri için FP çözeltisinin hacmi optimize edilmiştir. FP çözeltisinin elektrot yüzeyine damlatılan miktarı oluşturulan MIP filminin stabilitesi başta olmak üzere sensör oluşturma basamaklarının hepsini etkilemektedir. FP çözeltisinden elektrot yüzeyine 0,5 µL, 1,0 µL, 1,5 µL, ve 2,0 µL damlatılmıştır. P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörler için polimerizasyon çözeltisinden CKE üzerine damlatılan hacim sırası ile Şekil 4.6’da ve Tablo 4.19’da verilmiştir. Elde edilen pik akımı sonuçları değerlendirildiğinde ve her iki sensör için en yüksek ΔI değerine 1,0 µL’de ulaşılmıştır.

FP yönteminde temel monomer olarak kullanılan HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EGDMA oranının 1:0, 1:1, 5:1, 10:1 ve 0:1 (h:h) olduğu beş farklı oranın P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör üzerinde etkisi belirlenmiştir (Tablo

4.19). Elektrot yüzeyinin en iyi kaplandığı ve en yüksek ΔI değerine sahip HEMA:EDGMA oranının 5:1 olduğu görülmüştür.

Geliştirilen MIP tabanlı sensörler için bir diğer önemli parametre ise kalıp molekülün uzaklaştırılma işlemidir. MIP tabanlı sensörün elde edilmesinde kalıp molekülün polimer filme zarar vermeden uzaklaştırılmasında, çıkarılma çözeltisi ve elektrotun bu çözeltiye daldırılma süresi önemlidir. Ayrıca, MIP tabanlı sensörden daha fazla kalıp molekül çıkarıldığında daha fazla baskılı boşluk elde edilir ve pik akımı o kadar yüksek olur. Bağlanma basamağı için uygun baskılı boşlukların açılması ve daha fazla boşluk elde etmek için kalıp molekülün çıkarılma çözeltisi ve bu çözeltiye daldırılma süresi optimize edilmiştir. Denenen hedef molekülü uzaklaştırma çözeltileri bir çalkalayıcıda 650 rpm ve 25°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Hedef molekülün uzaklaştırma çözeltisi olarak, 5 M, 15 M HAc, MeOH, 1 M, 5 M NaOH, NaCl, 5 M DMSO, 5 M HCl, ve HAc:HCl (1:1, h:h) çözeltileri denenmiştir. En iyi kalıp molekül çıkarma çözeltisi olarak P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensör için 5 M HAc (Şekil 4.7.A), P(ANI)@MIP/CKE (Tablo 4.9.) ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE (Tablo 4.19) sensörler için ise 15 M HAc seçilmiştir.

Hedef molekülü uzaklaştırma çözeltileri belirlendikten sonra hedef molekülü uzaklaştırma süresi optimize edilmiştir. Bekleme süresi arttıkça MIP sensörünün mevcut sinyali artmış ve kalıp molekül yavaş yavaş çıkarılmıştır. Belirli bir süreden sonra ise polimerdeki boşluklar tıkanmış için sensörün akım sinyali azalmıştır. Sonuç olarak, hedef molekül için en etkili ve düzgün uzaklaştırma süresi P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörler için 15'er dakika (Şekil 4.7.B ve Tablo 4.19; P(ANI)@MIP/CKE sensör için 45 dakika (Tablo 4.9.) olarak seçilmiştir.

Hedef molekülün yeniden bağlanması ve inkübasyon süresi geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin analiz süresini ve genel analitik performansını doğrudan etkilemektedir. Bağlanma süresi MIP tabanlı sensör yüzeyinde oluşturulan boşluklara kararlı şekilde bağlanabilmesini ve geliştirilen sensörün tekrar edilebilir sonuçlar verebilmesini sağlar. Uzun inkübasyon süreleri sonunda boşluklar aşırı doymuş olur sensörün performansı düşer, çok kısa inkübasyon süreleri ise yeniden bağlanma için yeterli zamana izin vermez. Bu nedenle, P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensör

çalkalayıcıda 5-20 dakika aralığında $6,0 \times 10^{-14}$ M SOM çözeltisine daldırılarak, P(ANI)@MIP/CKE sensör çalkalayıcıda 1-15 dakika aralığında $4,0 \times 10^{-14}$ M OC çözeltisine daldırılarak, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör çalkalayıcıda 5-15 dakika aralığında $6,0 \times 10^{-14}$ M LAN çözeltisine daldırılarak bekletilmiştir. Sonuç olarak, en verimli inkübasyon süresi olarak P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensör için 12 dakika (Şekil 4.8), P(ANI)@MIP/CKE sensör için 3 dakika (Tablo 4.9) ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör için 10 dakika (Tablo 4.19) seçilmiştir.

MIP Tabanlı Sensörlerin Analitik Performanslarının Değerlendirilmesi

SOM ve onun sentetik analogları olan OC ve LAN için geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin analitik performanslarının değerlendirilmesi doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, seçicilik, tutarlılık, girişim etkisi ve stabilite parametreleri incelenerek gerçekleştirilmiştir.

Standart çözelti ve ticari insan serumunda SOM için P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE (Şekil 4.9.A ve 4.10.A) ve LAN için P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE (Şekil 4.26.A ve 4.27.A) sensörler ile geliştirilen yöntemlerin $1,0 \times 10^{-14}$ M - $1,0 \times 10^{-13}$ M; OC için P(ANI)@MIP/CKE (Şekil 4.17.A ve 4.18.A) sensör ile geliştirilen yöntemin ise $1,0 \times 10^{-14}$ M - $8,0 \times 10^{-14}$ M derişim aralığında doğrusal olduğu DP voltamogramları ile gösterilmiştir. Her üç sensör için de ΔI değeri ile derişim arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur. Aynı ayrı geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin düşük derişimli SOM, OC ve LAN'ı algılamak için çok yüksek bir afiniteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. MIP tabanlı sensörünün analitik performansını kontrol etmek için aynı işlemler NIP tabanlı elektrota da uygulanmış ve elde edilen akım değişimleri ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Standart çözelti ve ticari insan serumu için P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE (Şekil 4.9.B ve Şekil 4.10.B), P(ANI)@MIP/CKE (Şekil 4.17.B ve 4.18.B) ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE (Şekil 4.26.B ve 4.27.B) sensörlerinde sırasıyla artan SOM, LAN ve OC derişimleri ile ΔI değerleri artarken, aynı şekillerde P(HEMA-MAAsp)@NIP/CKE, P(ANI)@NIP/CKE ile P(HEMA-MAGA)@NIP/CKE sensörleri üzerinde hedeflenen moleküller tutulmadığından artan SOM, LAN ve OC derişimlerine rağmen ΔI değerlerinin değişmediği oluşturulan kalibrasyon eğrilerinde gözlemlenmiştir. Bu karşılaştırmalar sonucunda, geliştirilen P(HEMA-

MAAsp)@MIP/CKE sensörünün SOM için, P(ANI)@MIP/CKE sensörünün OC için ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörünün LAN için seçici olduğu da kanıtlanmıştır. SOM, OC ve LAN analizlerine ilişkin kalibrasyon eğrilerine ait sonuçlar sırasıyla, Tablo 4.3, Tablo 4.12 ve Tablo 4.22’de verilmiştir.

Ayrıca, standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörünün (Tablo 4.1), P(ANI)@MIP/CKE sensörünün (Tablo 4.10) ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörünün (Tablo 4.20) doğrusallıktan ayrılışın önemsiz ve korelasyon katsayısının önemli bir değer olduğu istatistiksel olarak bulunmuştur. Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde, SOM, OC ve LAN derişimleri ve elde edilen ΔI değerleri arasındaki doğrusal ilişkiden yararlanılarak, bulunan derişimleri olması gereken derişimlerine karşı grafiğe geçirildiğinde aradaki ilişkinin doğrusal olduğu P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörü için Şekil 4.11’de, P(ANI)@MIP/CKE sensörü için Şekil 4.19’da ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörü için Şekil 4.28’de gösterilmiştir. Aralarındaki bu doğrusallık P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörü için Tablo 4.2’de, P(ANI)@MIP/CKE sensörü için Tablo 4.11’de ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörü için Tablo 4.21’de gösterildiği gibi istatistiksel olarak kanıtlanmıştır.

Standart çözelti ve ticari insan serum örneklerinde geliştirilen sensörlerin kesinliği ve doğruluğu SOM, OC ve LAN’ın bağlanması tersine çevrilmesiyle kanıtlanmıştır. Gün içi kesinlik ve doğruluk çalışmaları bir günde beş kez analiz edilerek yapılmıştır. Günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları ise beş farklı gün için aynı derişimde çözeltinin verdiği sinyal ile takip edilmiştir. Standart çözeltiden hazırlanan örneklerin analizlerine ilişkin sonuçların bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri hesaplanmıştır. Geliştirilen sensörlerin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında SOM ve LAN için $6,0 \times 10^{-14}$ M, OC için $4,0 \times 10^{-14}$ M derişimde analizler gerçekleştirilmiştir. Sensörlerin kesinliği, BSS değerlerinin P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE için %0,27’den (Tablo 4.3), P(ANI)@MIP/CKE için %0,84’den (Tablo 4.12), P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE için %0,58’den (Tablo 4.22); doğruluğu ise BH değerlerinin P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE, P(ANI)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE için sırasıyla %0,42 (Tablo 4.3), %0,47 (Tablo 4.12), %0,44’den (Tablo 4.22) düşük bulunması ile kanıtlanmıştır.

Geliştirilen sensörlerin duyarlılığı gözlenebilme sınırı (LOD) ve en düşük alt tayin sınırı (LLOQ) ile incelenmiştir. Standart sapma/eğim oranının 3 katı olan derişim değeri LOD ile standart sapma/eğim oranının 10 katı olan derişim değeri LLOQ olarak belirlenmiştir. Tablo 4.3’de SOM için geliştirilen P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörünün standart çözelti ve ticari insan serumunda sırasıyla LOD ve LLOQ değerleri 0,175 fM - 1,122 fM ve 0,584 fM - 3,739 fM’dır. P(ANI)@MIP/CKE sensörün standart çözeltisi için LOD ve LLOQ değerleri sırasıyla 0,801 fM ve 2,670 fM; ticari insan serum örneklerinde LOD ve LLOQ değerleri ise sırasıyla 1,026 fM ve 3,419 fM’dır (Tablo 4.12). LAN için geliştirilen P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörün standart çözeltisi ve ticari serum örneklerinde LOD değerleri sırasıyla 1,756 fM ve 5,852 fM iken LLOQ değerleri ise sırasıyla 1,822 fM ve 6,074 fM olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.22).

Kaynaklarda, Cartoni ve arkadaşları tarafından SOM’un farmasötik preparattan tayini için CZE yöntemi geliştirildiği ve yöntemin LOD değerinin 10 mg/mL olduğu belirtilmiştir (20). OC’nin farmasötik preparattan tayininin ise Kyaterekera ve arkadaşları tarafından RP-LC yöntemi ile gerçekleştirildiği ve doğrusalılık aralığının 0-100 µg/mL olduğu bulunmuştur (33). LAN’ın farmasötik preparatlardan tayinine ilişkin kaynaklarda bir çalışmaya rastlanmamıştır. P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensör kullanımı ile geliştirilen yöntem LAN miktar tayini için geliştirilen ilk yöntemdir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, geliştirilen MIP tabanlı sensörler ile çok daha düşük derişimlerin analiz edilebildiği ve böylece düşük alt tayin sınırına ulaşıldığı görülmüştür.

Elektrokimyasal sensörleri doğrulamak için en önemli parametrelerden biri çapraz reaktivitedir. MIP tabanlı sensörlerin maddeye özgü bağlanması, seçicilik parametreleriyle gösterilir. Geliştirilen sensörlerin hedef moleküle bağlanma ilgisinin diğer benzer yapıli moleküllere göre daha yüksek olduğu ve sensördeki boşlukların maddeye özel olduğu görülmüştür. SOM ve onun sentetik analogları olan OC ve LAN molekül yapısı olarak da birbirlerine oldukça benzemektedirler. Bu nedenle, geliştirilen sensörlerin seçiciliği SOM, OC ve LAN’ın birbirlerine göre DPV sinyalleri ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.12’de P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE’nin SOM’a

seçici olduğu, Şekil 4.20’de P(ANI)@MIP/CKE’nin OC’ye seçici olduğu ve Şekil 4.29’da P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE’nin LAN’a özgün olduğu elde edilen en yüksek ΔI değerleri ile gösterilmiştir. Ayrıca sensörlerin seçiciliği baskılama faktörü (IF) açısından değerlendirilmiş olup, bu faktör MIP ve NIP tabanlı sensörler için bulunan sinyallerin oranlanması ile hesaplanmıştır. IF değerleri, Tablo 4.4’de P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörde SOM için 3,83, OC ve LAN için ise sırasıyla 1,54 ve 1,60, Tablo 4.13’de P(ANI)@MIP/CKE sensörde OC için 3,04, SOM ve LAN için ise sırasıyla 1,20 ve 1,38, Tablo 4.23’de P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörde LAN için 5,40, SOM ve OC için ise sırasıyla 1,62 ve 1,69 olarak hesaplanmıştır. Böylece elektrokimyasal yöntemlerde ortaya çıkan düşük seçicilik, MIP tabanlı sensörler ile yüksek seçicilik avantajına çevrilmiştir.

Geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin tutarlılık çalışması kapsamında, SOM ve LAN için $6,0 \times 10^{-14}$ M, OC için $4,0 \times 10^{-14}$ M derişimde çözeltiler için iki farklı analizci tarafından elde edilen bulgulara Mann- Whitney U testi uygulanmıştır. P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE, P(ANI)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörleri için U_{Hesap} değerleri sırasıyla Tablo 4.5’de 17, Tablo 4.14’de 16 ve Tablo 4.24’de 10 bulunmuştur. $U_{Hesap} < U_{Tablo} = 29$ ve $p > 0,05$ olduğundan iki farklı analizciye ait sonuçlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ve her üç sensörle yapılan çalışmaların tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin performansının biyolojik örneklerde bulunan AA, DOP, K^+ , Cl^- , Na^+ ve SO_4^{2-} ’nin etkilenip etkilenmediği incelenmiştir. SOM, OC ve LAN için her bir bileşenle 1:10 oranında hazırlanan çözeltiler analiz edilmiş, geri kazanım ve BSS değerleri hesaplanmıştır. Geri kazanım değerleri SOM için %95,36’dan (Tablo 4.6), OC için %98,02’dan (Tablo 4.15) ve LAN için %96,73’dan (Tablo 4.25) yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, olası girişim ajanlarının varlığında SOM, OC ve LAN için ayrı ayrı üretilen sensörlerde için elde edilen akım yanıtında önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.

P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE, P(ANI)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörlerinin stabiliteleri 15 gün boyunca, belirli aralıklarla ölçümler alınarak saptanmıştır. 1. gün %100 kabul edilen akım değerinin %25’den az

performans düşüşü göstermiş olduğu süreler belirlenmiştir. FP yöntemi ile SOM ve LAN için geliştirilen sensörler 10'ar gün; EP yöntemi ile OC için geliştirilen sensörün ise 8 gün stabil kaldığı saptanmıştır.

Sonuçta, elektrokimyasal sensörler hazırlanırken kullanılan FP yönteminin EP yöntemine göre, elektrot yüzeyini daha iyi kapladığı, daha kararlı bir polimerik yapı oluşturduğu, bu sayede kalıp molekülün polimeri bozmadan daha kolay çıkarılabildiği; FP ile elde edilen MIP tabanlı sensörün EP ile elde edilen MIP tabanlı sensöre göre daha stabil olduğu görülmüştür. Ancak, FP yöntemi ile polimerleştirme basamakları çok işlem gerektirir ve uzun sürede tamamlanırken EP yöntemi ile polimerleştirme çok kısa sürede az işlem basamağı ile gerçekleşmektedir.

MIP Tabanlı Sensörlerin Farmasötik Preparat ve Serum Örneklerine Uygulanması

Geliştirilen P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE, P(ANI)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörleri kullanılarak sırası ile Somatosan® ampul içinde liyofilize toz, Sandostatin® ampul ve Somatuline® Autogel® enjeksiyon farmasötik preparatların analizleri gerçekleştirilmiştir. P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE sensörü ile Somatosan® ampulden elde edilen sonuçlar Tablo 4.7'de, P(ANI)@MIP/CKE sensörü ile Sandostatin® ampulden elde edilen sonuçlar Tablo 4.16'da, P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörü ile Somatuline® Autogel® enjeksiyondan elde edilen sonuçlar Tablo 4.26'da verilmiştir.

Geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin ticari insan serum örneklerine uygulanmasına ilişkin sonuçlar; SOM, OC ve LAN için sırasıyla Tablo 4.8, Tablo 4.17 ve Tablo 4.27'de gösterilmiştir. SOM, OC ve LAN için geri kazanım değerleri sırası ile %99,33, %101,19 ve %99,20; BSS değerleri sırası ile %0,34, %0,27 ve % 0,47 olarak hesaplanmıştır.

OC'ye seçici olarak geliştirilen ve analitik performansı kontrol edilen MIP tabanlı elektrokimyasal sensör olan P(ANI)@MIP/CKE ile Sandostatin® ampul kullanan 5 nöroendokrin kanser hastası ve 3 sağlıklı kişiden alınan plazma örnekleri

optimize edilen koşullar altında analiz edilmiştir. Plazma örnekleri Sandostatin® ampul ile tedavisi başlanan hastalardan 1 ay içinde alınmıştır. Şekil 4.21’de görüldüğü üzere hedef molekülün bağlanma basamağında, hastadan alınan örnek OC’ye özel boşlukları doldurarak yüzeyi tekrar kapatabilirken, sağlıklı kişiden alınan örnek boşlukları dolduramamaktadır. Tablo 4.18’de hasta ve sağlıklı kişilere ait plazma örneklerindeki OC miktarları verilmiştir. Tüm sonuçlar t-testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. $t_{\text{Tablo}} = 2,45 < t_{\text{Hesap}} = 35,32$ ve $p < 0,05$ olduğundan hasta ve kontrol plazma örnekleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.

Kaynaklarda SOM’un insan plazmasına ilişkin bir çalışma yer almamaktadır. Ancak, insan plazmasından OC tayininin LC-MS/MS yöntemi (14, 15) ve LAN tayinin RIA (24) ile gerçekleştirilmiş olduğu görülmüştür.

P(ANI)@MIP/CKE sensör ile Sandostatin® ampul kullanan nöroendokrin kanser hastalarının plazmalarındaki OC miktarları, 8,58 ng/mL ile 11,06 ng/mL aralığında değişen değerlerde bulunmuştur. Bu değerler, kaynaklardaki hasta plazma örneklerine ait sonuçlar (13 ng/mL ile 51 ng/mL) ile uyumludur (15).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, BH engelleyiciler olan SOM ve onun sentetik analogları OC ve LAN'ın elektrokimyasal analizi için MIP tabanlı sensörler geliştirilmiş ve analitik performansları değerlendirilmiştir. SOM, OC ve LAN için ayrı ayrı geliştirilen MIP tabanlı elektrokimyasal sensörler farmasötik preparat ve ticari serum örneklerine uygulanmıştır. Ayrıca, OC için geliştirilen sensör nöroendokrin kanser hastalarının plazma örneklerine de uygulanmıştır.

SOM, OC ve LAN için geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin tümünde çalışma elektrodu olarak CKE kullanılmıştır. Elektrokimyasal sistemde referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Sensörlerin analitik değerlendirmesi CV ve DPV yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Redoks probu olarak 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi tüm elektrokimyasal ölçümler boyunca kullanılmıştır.

SOM ve LAN için geliştirilen MIP tabanlı sensörler olan P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE ile P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE hazırlanırken sırası ile fonksiyonel monomer olarak tercih edilen MAAsp ve MAGA'nın hedef moleküllerin varlığında polimerleştirilmesi FP yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. OC için geliştirilen P(ANI)@MIP/CKE sensör fonksiyonel monomer ANI varlığında EP CV yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır.

FP ile hazırlanan P(HEMA-MAAsp)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörlerini yüzeyi CV, EIS, FTIR, SEM yöntemleri kullanılarak, EP ile hazırlanan P(ANI)@MIP/CKE sensörün yüzeyi ise CV, EIS, SEM, Raman spektroskopisi ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir.

Geliştirilen sensörlerin optimizasyon koşulları, polimerin başarılı bir şekilde oluşarak yüzeyi kaplaması, hedef moleküle özel boşlukların çok sayıda ve polimeri bozmadan oluşturulması, oluşan boşluklara hedef molekülün yeniden bağlanması incelenerek oluşturulmuştur.

Geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin kullanıldığı elektrokimyasal yöntemlerin analitik performansı değerlendirilmiş SOM, OC ve LAN analizi için doğrusal, kesin,

doğru, duyarlı, seçici, tutarlı ve stabil olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, MIP tabanlı sensörlerin biyolojik örneklerde bulunan girişim ajanlarından etkilenmediği görülmüştür.

SOM, OC ve LAN tayini için LOD değerleri sırası ile 0,175 fM, 0,801 fM ve 1,756 fM bulunmuştur. Geliştirilen MIP tabanlı sensörlerin oldukça hassas, aşırı duyarlı ve yüksek seçiciliğe sahip olduğu görülmüştür.

P(HEMA-MAA_{sp})@MIP/CKE, P(ANI)@MIP/CKE ve P(HEMA-MAGA)@MIP/CKE sensörlerinin farmasötik preparatlara uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Ticari insan serumu örneklerine standart ekleme yöntemi ile gerçekleştirilen analizler sonucunda geri kazanım değerleri sırası ile %99,33, %101,19 ve %99,20 olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen P(ANI)@MIP/CKE sensörü, 2022/01-36 karar nolu “Somatostatin ve Bazı Analoglarının Miktar Tayini için Elektroanalitik Yöntemler Geliştirilmesi” isimli proje için Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu’ndan alınan etik kurul izni ile tedavisinde Sandostatin® kullanan nöroendokrin kanser hastaları ve kullanmayan sağlıklı kişilerden alınan plazma örneklerine uygulandığında $p=0,001<0,05$ olarak hesaplanmıştır. Hasta ve sağlıklı kişilerin plazmalarındaki OC miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

Kaynaklarda SOM, OC ve LAN’ın elektrokimyasal analizlerine ait bir çalışma bulunmaması nedeni ile amaçlanan bu tez çalışmasında, SOM, OC ve LAN için ilk kez geliştirilen MIP tabanlı elektrokimyasal sensörlerin yüksek seçicilik ve çok düşük derişimlere duyarlı, aynı zamanda ön hazırlık gerektirmeyen, ucuz ve düşük toksik etkiye sahip, oldukça avantajlı bir analiz yöntemi olduğu gösterilmiştir.

Geliştirilen sensörler ile çok düşük derişimlerde plazmadan analizlerin gerçekleştirilebilmesi, klinik çalışmalarda kullanımlarının önerilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. OC tayini için P(ANI)@MIP/CKE sensörle yapılan klinik uygulamanın başarılı sonuçlarının, son derece ucuz, kesin, doğru, duyarlı, özgün, tutarlı ve stabil olan MIP tabanlı sensörler ile klinik çalışmaların yapılmasına yol

gösterici olacağı ön görülmektedir. Ayrıca, elde edilen sonuçların kaynaklar ile uyumlu olmasının da söz konusu sensörlerin ticarileştirilmesi yönündeki çalışmaları hızlandırabileceğini düşündürmektedir.



KAYNAKLAR

1. Righi L, Volante M, Tavaglione V, Billè A, Daniele L, Angusti T, et al. Somatostatin receptor tissue distribution in lung neuroendocrine tumours: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 218 'clinically aggressive' cases. *Annals of Oncology*. 2010;21(3):548-55.
2. Akhlaghi Y, Ghaffari S, Attar H, Alamir Hoor A. A rapid hydrolysis method and DABS-Cl derivatization for complete amino acid analysis of octreotide acetate by reversed phase HPLC. *Amino Acids: The Forum for Amino Acid, Peptide and Protein Research*. 2015;47(11):2255-63.
3. Gowda JI, Nandibewoor ST. Electrochemical characterization and determination of paclitaxel drug using graphite pencil electrode. *Electrochimica Acta*. 2014;116:326-33.
4. Han S, Li B, Song Z, Pan S, Zhang Z, Yao H, et al. A kanamycin sensor based on an electrosynthesized molecularly imprinted poly-: O -phenylenediamine film on a single-walled carbon nanohorn modified glassy carbon electrode. *Analyst*. 2017;142(1):218-23.
5. Dudás B. Central Regulation of Growth : Morphological and Functional Considerations. New York: Nova Science Publishers, Inc; 2017.
6. Devesa J, Lima L, Tresguerres JAF. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1992;3(5):175-83.
7. Rennie MJ. Claims for the anabolic effects of growth hormone: a case of the Emperor's new clothes? *British Journal of Sports Medicine*. 2003;37(2):100.
8. Berelowitz M, Dudlak D, Frohman LA. Release of Somatostatin-like Immunoreactivity from Incubated Rat Hypothalamus and Cerebral Cortex: EFFECTS OF GLUCOSE AND GLUCOREGULATORY HORMONES. *The Journal of Clinical Investigation*. 1982;69(6):1293-301.
9. Tannenbaum GS, Guyda HJ, Posner BI. Insulin-Like Growth Factors: A Role in Growth Hormone Negative Feedback and Body Weight Regulation via Brain. *Science*. 1983;220(4592):77-9.
10. Fletcher TP, Thomas GB, Dunshea FR, Moore LG, Clarke IJ. IGF feedback effects on growth hormone secretion in ewes: evidence for action at the pituitary but not the hypothalamic level. *Journal of Endocrinology*. 1995;144(2):323-31.
11. CEDA, GIAN PAOLO, HOFFMAN AR, SILVERBERG GD, WILSON DM, ROSENFELD RG. Regulation of Growth Hormone Release from Cultured Human Pituitary Adenomas by Somatomedins and Insulin*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1985;60(6):1204-9.
12. KATO M, SUZUKI M, KAKEGAWA T. Inhibitory Effect of Hypothalamic Stimulation on Growth Hormone (GH) Release Induced by GH-Releasing Factor in the Rat*. *Endocrinology*. 1985;116(1):382-8.

13. Okada S, Kopchick JJ. Biological effects of growth hormone and its antagonist. *Trends in Molecular Medicine*. 2001;7(3):126-32.
14. Capron A, Destree J, Wallemacq P, Maiter D. Validation of a rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the determination of octreotide plasma concentrations. *Clinical Biochemistry*. 2014;47(1-2):139-41.
15. Ismaiel OA, Zhang T, Jenkins R, Karnes HT. Determination of octreotide and assessment of matrix effects in human plasma using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(22):2081-8.
16. Fürjes G, Lelesz B, Tóth GK, Arday A, Szilvássy Z, Varga A, et al. Comparative distribution of somatostatin and thirteenth bioactive peptides in the central nervous system of rat measured by radioimmunoassay. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry: An International Journal Dealing with All Aspects and Applications of Nuclear Chemistry*. 2017;311(3):1741-9.
17. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, et al. Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. *Science*. 1973;179(4068):77-9.
18. Unger N, Serdiuk I, Sheu SY, Walz MK, Schulz S, Schmid KW, et al. Immunohistochemical Determination of Somatostatin Receptor Subtypes 1, 2A, 3, 4, and 5 in Various Adrenal Tumors. *Endocrine Research*. 2004;30(4):931-4.
19. Nilsson A, Stroth N, Zhang X, Qi H, Fälth M, Sköld K, et al. Neuropeptidomics of mouse hypothalamus after imipramine treatment reveal somatostatin as a potential mediator of antidepressant effects. *Neuropharmacology*. 2012;62(1):347-57.
20. Cartoni GP, Coccioli F, Jasionowska R, Masci M. CZE determination of somatostatin in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000;23(1):143-6.
21. Kumar U, Grant M. Somatostatin and Somatostatin Receptors. In: Rehfeld JF, Bundgaard JR, editors. *Cellular Peptide Hormone Synthesis and Secretory Pathways*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 97-120.
22. Theodore HS, Vijay KA. *Endoscopic Pituitary Surgery : Endocrine, Neuro-Ophthalmologic, and Surgical Management*. New York: Thieme; 2012.
23. Molina-Trinidad EM, de Murphy CA, Jung-Cook H, Stack EM, Pedraza-Lopez M, Morales-Marquez JL, et al. Therapeutic ¹⁸⁸Re-lanreotide: determination of radiopharmacokinetic parameters in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2010;62(4):456-61.
24. Trocóniz IF, Cendrós J-M, Peraire C, Ramis J, Garrido MJ, Boscani PF, et al. Population Pharmacokinetic Analysis of Lanreotide Autogel® in Healthy Subjects. *Clinical Pharmacokinetics*. 2009;48(1):51-62.
25. Rogoza O, Megnis K, Kudrjavceva M, Gerina-Berzina A, Rovite V. Role of Somatostatin Signalling in Neuroendocrine Tumours. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*. 2022;23(3):1447.
26. Jacobson PG, Sambandan TG, Morgan B. Determination of the chirality of cysteines in somatostatin analogs. *Journal of Chromatography A*. 1998;816(1):59-64.

27. Andoh T, Nagasawa H. Purification and structural determination of insulins, glucagons and somatostatin from stone flounder, *Kareius bicoloratus*. *Zoological Science*. 1998;15(6):939-43.
28. Maasz G, Schmidt J, Avar P, Mark L. Automated SPE and nanoLC–MS analysis of somatostatin. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2017;40(8):400-6.
29. Nunn C, Cervia D, Langenegger D, Tenaillon L, Bouhelal R, Hoyer D. Comparison of functional profiles at human recombinant somatostatin sst2 receptor: simultaneous determination of intracellular Ca²⁺ and luciferase expression in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol*. 2004;142(1):150-60.
30. Chen Y, Liang Y, Lv R, Xia N, Xue T, Zhao S. An immunological determination of somatostatin in pharmaceutical by sandwich ELISA based on IgY and polyclonal antibody. *Microchemical Journal*. 2019;145:532-8.
31. Kasajima A, Papotti M, Ito W, Brizzi MP, La Salvia A, Rapa I, et al. High interlaboratory and interobserver agreement of somatostatin receptor immunohistochemical determination and correlation with response to somatostatin analogs. *Human Pathology*. 2018;72:144-52.
32. Romeo S, Baroni MG, Milione M, Corleto V, Gatti A, Fallarino M, et al. Complete clinical remission and disappearance of liver metastases after treatment with somatostatin analogue in a 40-year-old woman with a malignant insulinoma positive for somatostatin receptors type 2. *Hormone Research*. 2006;65(3):120-5.
33. Kyaterekera N, Tettey JNA, Skellern GG, Watson DG, Urie J, McDade JR, et al. LC determination of octreotide acetate in compound formulations of Sandostatin(®) and diamorphine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999;21(2):327-30.
34. Carlucci G, Carlucci M, Ferrone V, Locatelli M, Selvaggi F, Sulpizio S, et al. Combined derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet detection for simultaneous analysis of octreotide and gabexate mesylate metabolite in human pancreatic juice samples. *Biomedical Chromatography*. 2015;29(6):911-7.
35. Yu C, Zhang Q, Xu PY, Bai Y, Di B, Su MX, et al. Quantitative determination and validation of octreotide acetate using ¹H-NMR spectroscopy with internal standard method. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2018;56(1):37-45.
36. Vandemergel X, Blocklet D, Decaux G. Positive octreotide scintigraphy and determination of lanreotide activity in Paget's disease of bone associated with phosphate diabetes: a case report. *Annales d'Endocrinologie*. 2004;65(3):201-4.
37. Quinn T. *Molecularly Imprinted Polymers (MIPS) : Challenges, Uses and Prospects*. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc; 2016.
38. Turiel E, Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2010;668(2):87-99.
39. Kidakova A. *Photo- and Electropolymerization Approaches for Molecular Imprinting of a Neurotrophic Factor Protein*. TalTech Press; 2020.

40. Srinivasan S, Lee MW, Grady MC, Soroush M, Rappe AM. Computational Study of the Self-Initiation Mechanism in Thermal Polymerization of Methyl Acrylate. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2009;113(40):10787-94.
41. Elias H-G. An Introduction to polymer science. Weinheim: VCH; 1997.
42. Broja MM. Fundamentals of Polymerization. WORLD SCIENTIFIC; 2011.
43. Li F, Larock RC. Synthesis, Structure and Properties of New Tung Oil–Styrene–Divinylbenzene Copolymers Prepared by Thermal Polymerization. *Biomacromolecules*. 2003;4(4):1018-25.
44. Steckhan E. Electrochemistry IV. 1990.
45. Pietrzyk A, Kutner W, Chitta R, Zandler ME, D'Souza F, Sannicolò F, et al. Melamine Acoustic Chemosensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Film. *Analytical Chemistry*. 2009;81(24):10061-70.
46. Pietrzyk A, Suriyanarayanan S, Kutner W, Chitta R, D'Souza F. Selective Histamine Piezoelectric Chemosensor Using a Recognition Film of the Molecularly Imprinted Polymer of Bis(bithiophene) Derivatives. *Analytical Chemistry*. 2009;81(7):2633-43.
47. Yagci Y, Jockusch S, Turro NJ. Photoinitiated Polymerization: Advances, Challenges, and Opportunities. *Macromolecules*. 2010;43(15):6245-60.
48. Balta DK, Arsu N. Thioxanthone-ethyl anthracene. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2013;257:54-9.
49. Martin-Esteban A. Green molecularly imprinted polymers for sustainable sample preparation. *JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE*. 2021.
50. Chen L, Wang X, Lu W, Wu X, Li J. Molecular imprinting: perspectives and applications. *CHEMICAL SOCIETY REVIEWS*. 2016;45(8):2137-211.
51. Chen L, Xu S, Li J. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society reviews*. 2011;40(5):2922-42.
52. Zhang W, He X-W, Chen Y, Li W-Y, Zhang Y-K. Composite of CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymer as a sensing material for cytochrome c. *Biosensors & bioelectronics*. 2011;26(5):2553-8.
53. Włoch M, Datta J. Chapter Two - Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers. In: Marć M, editor. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 86: Elsevier; 2019. p. 17-40.
54. Fasihi J, Ammari Alahyari S, Shamsipur M, Sharghi H, Charkhi A. Adsorption of uranyl ion onto an anthraquinone based ion-imprinted copolymer. *Reactive and Functional Polymers*. 2011;71(8):803-8.
55. Shamsipur M, Besharati-Seidani A, Fasihi J, Sharghi H. Synthesis and characterization of novel ion-imprinted polymeric nanoparticles for very fast and highly selective recognition of copper(II) ions. *Talanta*. 2010;83(2):674-81.

56. Sverdrup LE, Källqvist T, Kelley AE, Fürst CS, Hagen SB. Comparative toxicity of acrylic acid to marine and freshwater microalgae and the significance for environmental effects assessments. *Chemosphere*. 2001;45(4):653-8.
57. Turiel E, Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers-based microextraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019;118:574-86.
58. Song Z, Li J, Lu W, Li B, Yang G, Bi Y, et al. Molecularly imprinted polymers based materials and their applications in chromatographic and electrophoretic separations. *Trends in Analytical Chemistry*. 2022;146.
59. Ansell RJ. Characterization of the Binding Properties of Molecularly Imprinted Polymers. In: Mattiasson B, Ye L, editors. *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 51-93.
60. Adumitra chioaie A, Pharmacy PSC-NR. Electrochemical Methods Based on Molecularly Imprinted Polymers for Drug Detection. A Review. *International Journal of Electrochemical Science*. 2018:2556-76.
61. Malik MI, Shaikh H, Mustafa G, Bhanger MI. Recent Applications of Molecularly Imprinted Polymers in Analytical Chemistry. *Separation & Purification Reviews*. 2019;48(3):179-219.
62. Fumes BH, Silva MR, Andrade FN, Nazario CED, Lanças FM. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015;71:9-25.
63. Hongyuan Y, Row K. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2006;7.
64. Jiang X, Jiang N, Zhang H, Liu M. Small organic molecular imprinted materials: their preparation and application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007;389(2):355-68.
65. Maré M, Wiecezorek PP. Chapter One - Introduction to MIP synthesis, characteristics and analytical application. In: Maré M, editor. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 86: Elsevier; 2019. p. 1-15.
66. Martín-Esteban A. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013;45:169-81.
67. Yang L, Said R, Abdel-Rehim M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. *Journal of Chromatography B*. 2017;1043:33-43.
68. Płotka-Wasyłka J, Szczepańska N, de la Guardia M, Namieśnik J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015;73:19-38.
69. He C, Long Y, Pan J, Li K, Liu F. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *J Biochem Biophys Methods*. 2007;70(2):133-50.
70. Płotka-Wasyłka J, Maré M, Szczepańska N, Namieśnik J. New Polymeric Materials for Solid Phase Extraction. *Crit Rev Anal Chem*. 2017;47(5):373-83.

71. Balamurugan K, Gokulakrishnan K, Prakasam T. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer liquid chromatography column for the separation of Cathine enantiomers. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012;20(1):53-61.
72. Yang S, Wang Y, Jiang Y, Li S, Liu W. Molecularly Imprinted Polymers for the Identification and Separation of Chiral Drugs and Biomolecules. *Polymers*. 2016;8(6):216.
73. Iacob B-C, Bodoki E, Oprean R. Recent advances in capillary electrochromatography using molecularly imprinted polymers. *ELECTROPHORESIS*. 2014;35(19):2722-32.
74. Maier NM, Lindner W. Chiral recognition applications of molecularly imprinted polymers: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007;389(2):377-97.
75. Fang L, Jia M, Zhao H, Kang L, Shi L, Zhou L, et al. Molecularly imprinted polymer-based optical sensors for pesticides in foods: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;116:387-404.
76. Cynthia GZ. *Handbook of Electrochemistry*. Amsterdam: Elsevier Science; 2007.
77. Wang J. *Fundamental Concepts. Analytical Electrochemistry, Third Edition*. 2006:1-28.
78. Jurex Cuenca G. *Electrochemistry*. [Place of publication not identified]: Arcler Press; 2019.
79. Chen S. 2 - Practical Electrochemical Cells. In: Zoski CG, editor. *Handbook of Electrochemistry*. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 33-56.
80. Yalçın G, Söğüt Ö. Bazı kimyasal maddelerin DNA ile etkileşmesinin biyosensörler ile algılanması. İzmir: Ege Üniversitesi; 2007.
81. Douglas AS, Holler FJ, Stanley RC. *Principles of Instrumental Analysis*. Australia: Cengage Learning; 2018.
82. Zutshi K. *Introduction to Polarography and Allied Techniques*. New Delhi: New Age International; 2006.
83. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical methods : fundamentals and applications*. 2nd ed: Wiley; 2001.
84. Özkan SA, Bakırhan NK. Antineoplastik ilaç etken maddelerinin modifiye katı elektrotlar ile elektroanalitik incelenmesi ve nanosensör tasarımı: A.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri; 2015.
85. Kikuchi T, Saito Y. *Voltammetry : Theory, Types and Applications*. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc; 2013.
86. Bond AM, Braun RD. Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry. *Journal of The Electrochemical Society*. 1980;127(12):528C-C.
87. Yıldız A, Genç Ö. *Enstrümantal analiz: Hacettepe Üniv.; 1993*.

88. Sibel AO, Jean-Michel K, Petr Z. *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences : Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*. Heidelberg: Springer; 2015.
89. Özkan SA, Uslu B, Aboul-Enein HY. Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2003;33(3):155-81.
90. Matter IA, Darwesh OM, Matter HAB. Chapter 11 - Nanosensors for herbicides monitoring in soil. In: Amrane A, Mohan D, Nguyen TA, Assadi AA, Yasin G, editors. *Nanomaterials for Soil Remediation*: Elsevier; 2021. p. 221-37.
91. Akolpoglu MB, Bozuyuk U, Erkoc P, Kizilel S. Chapter 9 - Biosensing–Drug Delivery Systems for In Vivo Applications. In: Inamuddin, Khan R, Mohammad A, Asiri AM, editors. *Advanced Biosensors for Health Care Applications*: Elsevier; 2019. p. 249-62.
92. Uskoković V. A historical review of glassy carbon: Synthesis, structure, properties and applications. *Carbon Trends*. 2021;5:100116.
93. Hu I-F, Karweik DH, Kuwana T. Activation and deactivation of glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1985;188(1):59-72.
94. Pletcher D, Greff R, Peat R, Peter LM, Robinson J. *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Cambridge [England]: Woodhead Publishing; 2011.
95. Mandler D. Fritz Scholz (Ed.): *Electroanalytical methods. Guide to experiments and applications*, 2 ed. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010;398(7/8):2771-2.
96. Ozkan SA, Kauffmann J-M, Zuman P. Electroanalytical Method Validation method validation in Pharmaceutical Analysis and Their Applications. In: Ozkan SA, Kauffmann J-M, Zuman P, editors. *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 235-66.
97. Bontempelli G, Dossi N, Toniolo R. Voltammetry | Polarography. In: Worsfold P, Poole C, Townshend A, Miró M, editors. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. Oxford: Academic Press; 2019. p. 218-29.
98. Kim T, Choi W, Shin H-C, Choi J-Y, Kim JM, Park M-S, et al. Applications of Voltammetry in Lithium Ion Battery Research. *J Electrochem Sci Technol*. 2020;11(1):14-25.
99. Andrade C, Oliveira M, Faulin T, Hering V. Biosensors for detection of Low-Density Lipoprotein and its modified forms. 2011.
100. John K. *Analytical Chemistry Refresher Manual*. Boca Raton: CRC Press; 2020.
101. Lee J. *Electrochemical Sensing of Oxygen Gas in Ionic Liquids on Screen Printed Electrodes* 2014.
102. Richard Guy C, Eduardo L, Kristopher RW. *Understanding Voltammetry: Simulation Of Electrode Processes*. [London?]: Imperial College Press; 2013.

103. Scholz F. *Electroanalytical Methods*. [electronic resource] : Guide to Experiments and Applications: Springer Berlin Heidelberg; 2010.
104. Kurbanoglu S, Uslu B, Ozkan SA. Chapter 28 - Carbon-based nanostructures for electrochemical analysis of oral medicines. In: Andronescu E, Grumezescu AM, editors. *Nanostructures for Oral Medicine*: Elsevier; 2017. p. 885-938.
105. Simões FR, Xavier MG. 6 - Electrochemical Sensors. In: Da Róz AL, Ferreira M, de Lima Leite F, Oliveira ON, editors. *Nanoscience and its Applications*: William Andrew Publishing; 2017. p. 155-78.
106. Batista Deroco P, Giarola JdF, Wachholz Júnior D, Arantes Lorga G, Tatsuo Kubota L. Chapter Four - Paper-based electrochemical sensing devices. In: Merkoçi A, editor. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 89: Elsevier; 2020. p. 91-137.
107. Franklin RK, Martin SM, Strong TD, Brown RB. *Chemical and Biological Systems: Chemical Sensing Systems for Liquids*. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering: Elsevier; 2016.
108. Mirceski V, Gulaboski R, Lovric M, Bogeski I, Kappl R, Hoth M. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. *Electroanalysis*. 2013;25(11):2411-22.
109. Mirceski V, Skrzypek S, Stojanov L. Square-wave voltammetry. *ChemTexts*. 2018;4(4):17.
110. Barek J, Peckova K, Vyskocil V. Adsorptive Stripping Voltammetry of Environmental Carcinogens. *Current Analytical Chemistry*. 2008;4(3):242-9.
111. Brock J. *Electrochemical Impedance Spectroscopy : Methods, Analysis, and Research*. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc; 2017.
112. Orazem ME, Tribollet B. *Electrochemical impedance spectroscopy*. [electronic resource]: Wiley; 2008.
113. Macdonald DD. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*. 2006;51(8):1376-88.
114. Macdonald JR. Impedance spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering*. 1992;20(3):289-305.
115. Xu D, Xu D, Yu X, Liu Z, He W, Ma Z. Label-Free Electrochemical Detection for Aptamer-Based Array Electrodes. *Analytical Chemistry*. 2005;77(16):5107-13.
116. Chen X, Wang Y, Zhou J, Yan W, Li X, Zhu J-J. Electrochemical Impedance Immunosensor Based on Three-Dimensionally Ordered Macroporous Gold Film. *Analytical Chemistry*. 2008;80(6):2133-40.
117. Guo X, Kulkarni A, Doepke A, Halsall HB, Iyer S, Heineman WR. Carbohydrate-Based Label-Free Detection of Escherichia coli ORN 178 Using Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2012;84(1):241-6.
118. Wang S, Li L, Jin H, Yang T, Bao W, Huang S, et al. Electrochemical detection of hepatitis B and papilloma virus DNAs using SWCNT array coated with gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;41:205-10.

119. Bertok T, Sediva A, Katrlík J, Gemeiner P, Mikula M, Nosko M, et al. Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles. *Talanta*. 2013;108:11-8.
120. Michael ES, Ira SK. *Handbook of Analytical Validation*. Hoboken: CRC Press; 2012.
121. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*. 2003;987(1):57-66.
122. Guideline IHT. *Validation of analytical procedures: text and methodology*. Q2 (R1). 2005;1(20):05.
123. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. 2020-08-01; 2020.



8. EKLER

EK 1. Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969/557 327

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 04 OCAK 2022 SALI
Toplantı No : 2022/01
Proje No : GÖ 22/21 (Değerlendirme Tarihi: 04.01.2022)
Karar No : 2022/01-36

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sedef KIR'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Sercan AKSOY, Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU ile birlikte çalışacakları ve Uzm. Ece ÖZKAN'ın doktora tezi olan, GÖ 22/21 kayıt numaralı **"Somatostatin ve Bazı Analoglarının Miktar Tayini İçin Elektroanalitik Yöntemler Geliştirilmesi"** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 05 Ocak 2022 – 05 Ocak 2023 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. G. Burçay AYDIN	(Başkan)	8. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	(Üye)
2. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	9. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM	(Üye)
3. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	10. Doç. Dr. Merve BATUK	(Üye)
4. Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN	(Üye)	11. Doç. Dr. Gülten KÖÇ	(Üye)
5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN	(Üye)	12. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
6. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAĞCI	(Üye)	13. Av. Buket ÇINAR	(Üye)
7. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK	(Üye)		

EK 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Aritmetik ortalama}} \times 100$$

Bağıl Hata Hesaplanması

$$\text{Bağıl Hata (BH)} = \frac{(\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{\text{Standart sapma}}{\sqrt{\text{Ölçüm sayısı}}}$$

% Geri Kazanım Hesaplaması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

EK 3. Tez Çalışması Orjinallik Raporu

Ece Tez final

ORIGINALITY REPORT

10%	9%	2%	2%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	5%
2	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	2%
3	Ece Ozkan, Mehmet Emin Çorman, Emirhan Nemutlu, Sibel A. Ozkan, Sedef Kır. "Development of an Electrochemical Sensor Based on Porous Molecularly Imprinted Polymer via Photopolymerization for Detection of Somatostatin in Pharmaceuticals and Human Serum", Journal of Electroanalytical Chemistry, 2022 Publication	1%
4	acikarsiv.ankara.edu.tr Internet Source	<1%
5	Submitted to Hacettepe University Student Paper	<1%
6	Submitted to Ankara University Student Paper	<1%

docplayer.biz.tr

EK 4. Dijital Makbuz**Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Ece Özkan
Assignment title: Ece tez
Submission title: Ece Tez final
File name: TEZ-Turnitin.docx
File size: 14.99M
Page count: 151
Word count: 22,845
Character count: 161,061
Submission date: 31-Jul-2022 11:37PM (UTC+0300)
Submission ID: 1877300927



ÖZGEÇMİŞ

