

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

**FARMASÖTİK PREPARATLARDAN VE GIDALARDAN  
TOBRAMİSİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ  
NANOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**Mehmet Lütfi YOLA**

**Analitik Kimya Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN**

**ANKARA  
2013**

Anabilim Dalı : Analitik Kimya  
Program : Analitik Kimya  
Tez Başlığı : Farmasötik preparatlardan ve gıdalardan tobramisin tayini  
için moleküler baskılanmış nanosensörlerin geliştirilmesi  
Öğrencinin Adı-Soyadı : Mehmet Lütfi YOLA  
Savunma Sınavı Tarihi : 09.10.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ  
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Serdar ABACI  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ  
Dumlupınar Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Lokman UZUN  
Hacettepe Üniversitesi

#### ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU  
Müdür

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde ve biyokimya araştırma grubuna dahil olmama imkan sağlayan değerli ve kıymetli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,  
Yüksek Lisans ve Doktora eğitimimin sırasında her türlü desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Nuran Özeltin'a,  
Teorik bilgi birikiminden pratik uygulamalara dek bütün süreçlerde bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, bana büyük anlayış, sabırla yaklaşan, yardım elini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım ve abilerim Doç. Dr. Zafer Üstündağ, Doç. Dr. Lokman Uzun ve Doç. Dr. Necip Atar'a,  
Bugüne gelmemde çok büyük pay sahibi olan hakkını asla ödeyemeyeceğim kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ali Osman Solak ve Prof. Dr. Zeynel Kılıç'a,  
Destek ve yardımlarını esirgemeyen, manevi desteğiyle her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Mustafa Çelebier'e,  
Çalışmalarım sırasında sorunları ve sıkıntılı süreçleri paylaşan, her zaman yanımda olduklarını bildiğim değerli çalışma arkadaşlarım Öğr. Gör. Arif Emre Şen, Kim. Tanju Eren ve Uzm. Kim. İhsan Aşık'a,  
Her türlü sıkıntılarımınla bıkmadan uğraşan ve her zaman yanımda olan başta canım ablam Meral Çiftçi olmak üzere bütün Sağlık Bilimleri Enstitü çalışanlarına,  
Çalışmalarım boyunca bana hep destek olan bu güzel ortamı paylaştığım Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma grubunun (BİOREG) değerli üyelerine,  
Her türlü desteğiyle hep yanımda olan canım anneme ve ablama,  
En büyük destekçim Araş. Gör. Fatma Kartal'a,  
Sonsuz Teşekkürler...

## ÖZET

**YOLA, M.L. Farmasötik preparatlardan ve gıdalardan tobramisin tayini için moleküler baskılanmış nanosensörlerin geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2013.** Bu tez çalışmasında tobramisin tayini için moleküler baskılanmış camı karbon ve kuvarz kristal mikrobals (QCM) nanosensörleri geliştirilmiştir. QCM nanosensörü için, öncelikle QCM çipinin altın yüzeyinin modifikasyonu çip yüzeyine polimerize çift bağlarının girmesi için alil merkaptanın kendiliğinden oluşan tek tabaka yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çip yüzeyinde tobramisin baskılanmış poli(2-hidroksietil metakrilat-metakriloilamidoglutamik asit) filmi oluşturulmuştur. Elektrokimyasal nanosensör için, elektrot dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak camı karbon elektrot yüzeyinde pirolün elektropolimerizasyonu sırasında tobramisin molekülün katılmasıyla hazırlanmıştır. Baskılanmış ve baskılanmamış sensörlerin performansları QCM ve kare dalga voltametrisi (SWV) teknikleri ile değerlendirilmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış sensörler atomik kuvvet mikroskopu (AFM), Fourier dönüşümlü infrared (FTIR) spektroskopisi, elipsometre, temas açısı ölçümleri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve dönüşümlü voltametri teknikleri kullanarak karakterize edilmiştir. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) QCM yöntemi için sırasıyla 0.00561 nM ve 0.0166 nM ve SWV yöntemi için sırasıyla 0.166 nM ve 0.491 nM olarak bulunmuştur. Tobramisin için doğrusallık aralıkları QCM yöntemi için 0.017-0.150 nM ve SWV yöntemi için 0.5-10.0 nM olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemler “International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use” (ICH)’a göre valide edilmiş ve doğrusal, duyarlı, özgün, doğru, kesin, sağlam ve tutarlı bulunmuştur. Bu yöntemler farmasötik preparatlar ve gıdalardan tobramisin analizine başarıyla uygulanmıştır. Ayrıca bağlanma kinetik analizi ve izoterm modelleri sensör yüzeyinde gerçekleşen adsorpsiyon işlemini açıklamak için datalara uygulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Tobramisin, moleküler baskılama, kuartz kristal mikrobals, kare dalga voltametrisi, validasyon, nanosensör

## ABSTRACT

**YOLA, M.L. Development of molecular imprinted nanosensors for determination of tobramycin in pharmaceuticals and foods, Hacettepe University, Health Sciences Institute, Analytical Chemistry Program, Ph.D. Thesis, Ankara, 2013.** In this thesis study, the molecularly imprinted glassy carbon and quartz crystal microbalance (QCM) nanosensors were developed for the determination of tobramycin. For QCM nanosensor, firstly the modification of gold surface of QCM chip was performed by self-assembling monolayer formation of allyl mercaptane to introduce polymerizable double bonds on the chip surface. Then, TOB imprinted poly(2-hydroxyethyl methacrylate–methacryloylamidoglutamic acid) film was generated on the gold surface. For electrochemical nanosensor, the electrode was prepared by incorporation of tobramycin molecule during the electropolymerization of pyrrole on glassy carbon electrode using cyclic voltammetry method. The performance of the imprinted and non-imprinted sensors was evaluated by QCM and square wave voltammetry (SWV) techniques. The imprinted and non-imprinted sensors were characterized by using atomic force microscopy (AFM), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, ellipsometry, contact angle measurements, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV). Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were found as 0.00561 nM and 0.0166 nM for QCM and 0.166 nM and 0.491 nM for SWV, respectively. The linearity ranges of tobramycin for QCM and SWV were found as 0.017-0.150 nM and 0.5-10.0 nM respectively. The developed methods were validated according to the “International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use” (ICH) guideline and found to be linear, sensitive, specific, accurate, precise, robust and rugged. The methods were applied successfully for the determination of tobramycin in pharmaceuticals and foods. In addition, association kinetic analysis and isotherm models were applied to data to explain adsorption process occurred.

**Key words:** Tobramycin, molecular imprinting, quartz crystal microbalance, square wave voltammetry, validation, nanosensor

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Aminoglikozid Antibiyotikleri	3
2.1.1. Aminoglikozid Antibiyotiklerinin Etki Mekanizmaları	3
2.1.2. Aminoglikozid Antibiyotiklerinin Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri	4
2.1.3. Aminoglikozidlere Karşı Oluşabilen Antibiyotik Direncinin Mekanizmaları	4
2.1.4. Klinik Mikrobiyoloji	5
2.1.5. Klinik İndikasyonları	5
2.2. Tobramisin	7
2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	7
2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri	7
2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri	8
2.2.4. Endikasyonları	8
2.2.5. Kontrendikasyonları	8
2.2.6. Kullanımı	8
2.2.7. Yan Etkileri	8
2.2.8. Kullanım Şekli	9
2.3. TOB'un Analiz Yöntemleri	9
2.3.1. Kromatografik Analiz Yöntemleri	9
2.3.2. Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri	11
2.3.3. Kapiler Elektroforez Analiz Yöntemleri	11

2.3.4. Elektroanalitik Analiz Yöntemleri	12
2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi	12
2.4.1. Moleküler Baskılama Tekniği	14
2.4.1.1. Kalıp Molekül	16
2.4.1.2. Fonksiyonel Monomerler	16
2.4.1.3. Çapraz Bağlayıcılar	18
2.4.1.4. Çözücü	19
2.4.1.5. Başlatıcılar	19
2.4.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri	19
2.4.2.1. Kovalent Baskılama	20
2.4.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama	20
2.4.3. Baskılama İşleminin Kontrolü	21
2.4.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları	22
2.5. Sensörler	23
2.5.1. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM) Sensörler	24
2.5.2. Elektrokimyasal Sensörler	32
2.6. Voltametri	33
2.6.1. Dönüşümlü Voltametri	35
2.6.2. Kare Dalga Voltametrisi	41
2.7. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	43
2.8. Elipsometri	45
2.9. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)	46
3. GEREÇ ve YÖNTEM	48
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	48
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	48
3.1.3. Kullanılan Cam Malzemeler	49
3.1.4. Analizi Yapılan Numuneler	49
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması	49
3.3. Kullanılan Malzeme ve Maddelerin Temizliği	50
3.3.1. Cam Malzemelerin Temizlenmesi	50

3.3.2. QCM Çipinin Temizlenmesi	50
3.3.3. Elektrokimyasal Hücrenin Temizlenmesi	50
3.4. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi	50
3.4.1. QCM Hücre Düzenegi	50
3.4.2. Elektrokimyasal Hücre Düzenegi	51
3.4.3. QCM Deneilerinin Yapılışı	51
3.4.3.1. QCM Çipinin Allil Merkaptan ile Modifikasyonu	51
3.4.3.2. QCM Çip Yüzeyinde Polimer Hazırlanması	51
3.4.3.3. QCM Çip Yüzeyinden Hedef Molekülün Uzaklaştırılması	52
3.4.3.4. QCM Sensörler Kinetik Analizler	52
3.4.4. Elektrokimyasal Deneilerinin Yapılışı	53
3.4.4.1. Camsı Karbon Elektrotlarının Temizlenmesi	53
3.4.4.2. Camsı Karbon Yüzeyinde Polimer Hazırlanması	53
3.4.4.3. Camsı Karbon Elektrot Yüzeyinden Hedef Molekülün Uzaklaştırılması	53
3.4.4.4. Elektrokimyasal Sensörle Kinetik Analizler	54
3.5. Geliştirilen Sensörlerin Baskılama Seçiciliğinin Belirlemesi	54
3.6. Geliştirilen Sensörlerin Karakterizasyonu	54
3.6.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi	54
3.6.2. Atomik Kuvvet Mikroskopisi	55
3.6.3. Elipsometre	55
3.6.4. Temas Açısı Ölçümleri	55
3.6.5. Dönüşümlü Voltametri Ölçümleri	56
3.6.6. Elektrokimyasal İmpedans Ölçümleri	56
3.7. Yöntemlerin Optimizasyonu	56
3.8. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu	56
3.9. Geri kazanım	59
3.10. Yöntemlerin Gerçek Numunelere Uygulanması	60
4. BULGULAR	61
4.1. Geliştirilen QCM Sensörünün Yüzey Karakterizasyonu	61
4.1.1. FTIR Analizi	61
4.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi	61



4.1.3. Elipsometre Analizi	63
4.1.4. Temas Açısı Analizleri	63
4.2. Geliştirilen Voltametrik Sensörünün Yüzey Karakterizasyonu	65
4.2.1. FTIR Analizi	65
4.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi	65
4.2.3. Dönüşümlü Voltametri Analizi	67
4.2.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopik Analizi	68
4.3. Geliştirilen QCM ve Elektroanalitik Yöntemlerine Ait Analiz Bulguları	69
4.3.1. QCM Yöntemin Optimizasyonu	69
4.3.2. Elektroanalitik Yöntemin Optimizasyonu	71
4.4. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu	76
4.4.1. Kararlılık	76
4.4.2. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları	78
4.4.3. Duyarlılık	81
4.4.4. Kesinlik ve Doğruluk	85
4.4.5. Tekrarlanabilirlik	85
4.4.6. Sağlamlık ve Tutarlılık	86
4.4.7. Özgüllük (Seçicilik)	88
4.5. Geliştirilen Nanosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi	94
4.6. Geri Kazanım	96
4.7. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları	101
4.8. Denge İzoterm Modelleri	104
5. TARTIŞMA	109
5.1. Geliştirilen QCM Sensörünün Karakterizasyon Çalışmaları	109
5.1.1. FTIR Analizi	109
5.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi	109
5.1.3. Elipsometre Analizi	110
5.1.4. Temas Açısı Analizleri	110
5.2. Geliştirilen Elektroanalitik Sensörünün Karakterizasyon Çalışmaları	110
5.2.1. FTIR Analizi	110
5.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi	110
5.2.3. Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	111

5.2.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopik Çalışmalar	111
5.3. QCM Yönteminde pH Optimizasyonu	111
5.4. Elektroanalitik Yöntemin Optimizasyonu	112
5.5. Moleküler Baskılanmış Polipirolün Elektropolimerizasyonu	112
5.6. Yöntemlerin Validasyonu	113
5.7. Geliştirilen Nanosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi	117
5.8. Geri Kazanım	118
5.9. Farmasötik Preparatlara Uygulanması	118
5.10. Denge İzoterm Modelleri	118
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	120
KAYNAKLAR	122
EKLER	135
ÖZGEÇMİŞ	143

## SİMGELER ve KISALTMALAR

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopu
AG	Amino Glikozit
BH	% Bağıl Hata
BSS	Bağıl Standart Sapma
CV	Dönüşümlü Voltametri
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
FTIR	Fourier Dönüşümlü İnfrared
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
LC-ESI-MS	Sıvı Kromatografisi-Elektronsprey İyonlaşma-Kütle Spektrometrisi
LOD	Gözlenebilme Sınırı
LOQ	Alt tayin Sınırı
M	Molar
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ms	Milisaniye
ng	Nanogram
NIP	Moleküler Baskılanmamış Polimer
QCM	Kuartz Kristal Mikrobalans
r	Korelasyon Katsayısı
$R^2, r^2$	Tanımlayıcılık Katsayısı
RP-HPLC	Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
SWV	Kare Dalga Voltametrisi
UV	Ultraviyole
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\bar{X}$	Aritmetik Ortalama

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1. TOB molekülünün kimyasal yapısı .....	7
Şekil 2.2. Moleküler baskılanmış polimer için hazırlama ve tanıma süreci .....	15
Şekil 2.3. Moleküler baskılamada sık kullanılan fonksiyonel monomerler .....	17
Şekil 2.4. Moleküler baskılamada sık kullanılan çapraz bağlayıcılar .....	19
Şekil 2.5. Bir biyosensörün bileşenleri ve çalışma mekanizması .....	24
Şekil 2.6. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi .....	26
Şekil 2.7. Kuvars kristal .....	26
Şekil 2.8. QCM sensör yüzeyinin görüntüsü .....	27
Şekil 2.9. AT-BT kesim kuvars kristal düzlemi .....	28
Şekil 2.10. Kayma deformasyonu (Yüzey hareketi) .....	28
Şekil 2.11. Akustik dalga yayılma modu .....	28
Şekil 2.12. Doğru akım polarogramları (a) Elektroaktif maddenin polarogramı, (b) destek elektrolit polarogramı .....	34
Şekil 2.13. Doğrusal taramalı (a) ve dönüşümlü voltametri tekniklerinde (b) potansiyel taramasının zamanla değişimi .....	35
Şekil 2.14. Tersinir bir sisteme ait CV voltamogramı .....	37
Şekil 2.15. Katodik ve anodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması. v; (a) 0.13 V/s; (b)1.3 V/s; (c) 4.0 V/s; (d) 13.0 V/s .....	39
Şekil 2.16. Dönüşümlü voltametri de pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi .....	40
Şekil 2.17. Kare dalga voltametrisi için potansiyel-zaman dalga şekli ve akım ölçümü; $\Delta E_s$ : adım yüksekliği, $E_{sw}$ : puls genliği, $\tau$ : periyot .....	41
Şekil 2.18. Tersinir bir reaksiyon için uyarma sinyaline akım cevabı, A, ( $i_1$ ) ileri akım; B, ( $i_2$ ) ters akım; C, ( $i_1 - i_2$ ) akım farkı .....	42
Şekil 2.19. Fazör diyagramı ve sinüs eğrisi .....	44
Şekil 2.20. Elipsometreyi meydana getiren bileşenler .....	46
Şekil 4.1. TOB baskılanmış QCM sensörünün FTIR spektrumu .....	61
Şekil 4.2. (A) modifiye edilmemiş; (B) Allil merkaptan ile modifiye edilmiş; (C) TOB baskılanmış QCM sensörlerinin AFM görüntüleri .....	62
Şekil 4.3. TOB baskılanmış QCM sensörünün 3B elipsometre görüntüsü .....	63

Şekil 4.4. (A) modifiye edilmemiş; (B) Allil merkaptan ile modifiye edilmiş; (C) TOB baskılanmış QCM sensörlerinin temas açısı ölçümleri .....	64
Şekil 4.5. TOB baskılanmış polipirol elektrokimyasal sensörünün FTIR spektrumu .....	65
Şekil 4.6. (A) modifiye edilmemiş; (B) TOB baskılanmış polipirol camısı karbon yüzeylerinin AFM görüntüleri .....	66
Şekil 4.7. (A) 1.0 mM potasyum ferrisiyanür vs. Ag/AgCl/KCl <sub>(doy)</sub> ; (B) 1.0 mM ferrosenin vs. Ag/Ag <sup>+</sup> (0.01M) dönüşümlü voltammogramları .....	67
Şekil 4.8. 1.0 mM ferrosiyandır/1.0 mM ferrisiyanür redoks çiftinin farklı elektrotlarda alınmış elektrokimyasal impedans verileri .....	68
Şekil 4.9. TOB baskılanmış nanosensörün QCM cevabı üzerine pH'nın etkisi ....	69
Şekil. 4.10. Değişik derişimlerdeki TOB ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (a) zamana karşı $\Delta f$ değerini gösteren sensorgram; (b) zamana karşı $\Delta m$ değerini gösteren sensorgram .....	70
Şekil 4.11. TOB baskılanmış ve baskılanmamış camısı karbon üzerine destek elektrolit pH'nın etkisi (10.0 nm TOB varlığında) .....	71
Şekil 4.12. SWV yönteminde TOB pik akımına monomer derişiminin etkisi (TOB derişimi: 10.0 nM) .....	72
Şekil 4.13. SWV yönteminde TOB pik akımına tarama sayısının etkisi (TOB derişimi: 10.0 nM) .....	72
Şekil 4.14. SWV yönteminde TOB pik akımına hedef molekül (TOB) derişiminin etkisi (TOB derişimi: 10.0 nM) .....	73
Şekil 4.15. 0.1 M, pH 7.0 fosfat tamponu sisteminde camısı karbon elektrotu üzerinde 25 mM TOB varlığında 60 mM pirol monomerinin elektropolimerizasyonu (Deneysel Koşullar: Tarama hızı 50 mV s <sup>-1</sup> , Tarama sayısı 5) .....	74
Şekil 4.16. $1.0 \times 10^{-8}$ M TOB'in farklı elektrotlarda alınmış kare dalga voltamogramları .....	75
Şekil 4.17. TOB'un TOB baskılanmış camısı karbon elektrotu kullanılarak alınan kare dalga voltamogramları .....	76
Şekil 4.18. TOB'un QCM yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (n = 7) .....	78
Şekil 4.19. TOB'un SWV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (n = 7) .....	78

Şekil 4.20. TOB'un QCM yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği .....	81
Şekil 4.21. TOB'un SWV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği .....	81
Şekil 4.22. 0.054 nM derişiminde TOB çözeltilerinin ard arda birlikte verildiği TOB baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı $\Delta m$ değerlerini gösteren sensorgram. (A) adsorpsiyon, (B) desorpsiyon ....	86
Şekil 4.23. 0.054 nM TOB derişimin de standart, göz damlası ve sentetik numune çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı $\Delta m$ değerlerini gösteren sensorgramlar (TOBRADEX <sup>®</sup> için) .....	89
Şekil 4.24. 0.054 nM TOB derişimin de standart, göz damlası ve sentetik numune çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı $\Delta m$ değerlerini gösteren sensorgramlar (TOBİ <sup>®</sup> için) .....	89
Şekil 4.25. 2.0 nM TOB derişiminde (a) standart, (b) göz damlası ve (c) sentetik numune çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış voltametrik sensör arasındaki etkileşimlere ait kare dalga voltammogramları (TOBRADEX <sup>®</sup> için) .....	90
Şekil 4.26. 2.0 nM TOB derişiminde (a) standart, (b) göz damlası ve (c) sentetik numune çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış voltametrik sensör arasındaki etkileşimlere ait kare dalga voltammogramları (TOBİ <sup>®</sup> için) .....	90
Şekil 4.27. TOB, GEN, AMIK, KAN-A çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı $\Delta m$ değerlerini gösteren sensorgramlar. (1) adsorpsiyon, (2) desorpsiyon, (3) rejenerasyon .....	92
Şekil 4.28. TOB, GEN, AMIK, KAN-A çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış elektokimyasal sensör arasındaki etkileşimlere ait dönüşümlü voltamogramları .....	92
Şekil 4.29. 0.054 nM derişiminde TOB, GEN, AMIK ve KAN-A çözeltilerinin birlikte verildiği TOB baskılanmamış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı $\Delta m$ değerlerini gösteren sensorgramlar. (1) adsorpsiyon, (2) desorpsiyon, (3) rejenerasyon .....	95

Şekil 4.30. 10.0 nM TOB, GEN, AMIK, KAN-A çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmamış elektokimyasal sensör arasındaki etkileşimlere ait dönüşümlü voltamogramları .....	95
Şekil 4.31. QCM yöntemi için adsorpsiyon modelleri: (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir- Freundlich .....	106
Şekil 4.32. SWV yöntemi için adsorpsiyon modelleri: (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir- Freundlich .....	107

## TABLOLAR

Tablo 2.1. Tedavide aminoglikozid antibiyotiklerin kullanıldığı bazı mikroorganizmalar .....	6
Tablo 4.1. TOB için uzun dönem kararlılık bulguları (Eklenen TOB derişimi QCM yöntemi için 0.054 nM) .....	77
Tablo 4.2. TOB için kısa dönem kararlılık bulguları (Eklenen TOB derişimi QCM yöntemi için 0.054 nM) .....	77
Tablo 4.3. TOB'un QCM yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar .....	79
Tablo 4.4. TOB'un SWV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar .....	80
Tablo 4.5. Önerilen QCM ve SWV yöntemlerine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri (n = 7) .....	81
Tablo 4.6. QCM yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları (n = 6) .....	83
Tablo 4.7. SWV yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları (n = 6) .....	84
Tablo 4.8. Sensör tekrarlanabilirliği bulguları (Eklenen TOB derişimi QCM yöntemi için 0.054 nM ve SWV yöntemi için 2.0 nM ) (n = 6) .....	85
Tablo 4.9. QCM yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7) .....	86
Tablo 4.10. SWV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7) .....	87
Tablo 4.11. QCM yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları .....	87
Tablo 4.12. SWV yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları .....	88
Tablo 4.13. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri .....	91
Tablo 4.14. TOB'a göre GEN, AMIK ve KAN-A için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları (QCM sensörü için)94	
Tablo 4.15. TOB'a göre GEN, AMIK ve KAN-A için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları (Elektrokimyasal sensörü için) .....	94



Tablo 4.16. QCM sensörü için sentetik preparatların analiz bulguları (TOBRADEX®) (Eklenen TOB miktarı 3.0 mg) (n = 7) .....	96
Tablo 4.17. QCM sensörü için sentetik preparatların analiz bulguları (TOBI®) (Eklenen TOB miktarı 60.0 mg) (n = 7) .....	97
Tablo 4.18. QCM sensörü için TOB'un süt ve yumurtadan özütlenmesi sonucu hesaplanan geri kazanım değerleri (n=7) .....	98
Tablo 4.19. Elektrokimyasal sensör için sentetik preparatların analiz bulguları (TOBRADEX®) (Eklenen TOB miktarı 3.0 mg) (n = 7) .....	99
Tablo 4.20. Elektrokimyasal sensör için sentetik preparatların analiz bulguları (TOBI®) (Eklenen TOB miktarı 60.0 mg) (n = 7) .....	100
Tablo 4.21. Elektrokimyasal sensör için TOB'un süt ve yumurtadan özütlenmesi sonucu hesaplanan geri kazanım değerleri (n=7) .....	101
Tablo 4.22. TOBRADEX® göz damlasına ait kalibrasyon grafiği yöntemi ile elde edilen analiz bulguları (3 mg TOB/mL) (n = 7) .....	102
Tablo 4.23. TOBI® göz damlasına ait kalibrasyon grafiği yöntemi ile elde edilen analiz bulguları (60 mg TOB/mL) (n = 7) .....	103
Tablo 4.24. QCM yöntemi için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich Parametreleri .....	108
Tablo 4.25. SWV yöntemi için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich Parametreleri .....	108

## 1. GİRİŞ

Aminoglikozit (AG) antibiyotikleri öncelikle aerobik gram-negatif ve bazı gram-pozitif mikroorganizmalar tarafından neden olunan enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan insan ve hayvansal kaynaklı ilaçlardır. Fakat bu antibiyotiklerin fazla kullanımı ototoksisite ve nefrotoksisitenin yan etkilerine neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra bu ilaçların çok uzun süreli kullanımları doku afinitelerinden dolayı yüksek ve dirençli doku kalıntılarına yol açabilir. Özellikle gıda maddelerinde yer alan bu kalıntılar patojenik bakteri zincirlerinin antibiyotik direncine neden olabilir. Bu durumda hem üreticiye hem de tüketiciye olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Böylece gıda güvenliğini sağlamak amacıyla bu ilaçların iyileştirici miktarlarını kontrol altına almak önemlidir.

Moleküler baskılama teknolojisi belirli bir analite seçiciliği ve özgünlüğü olan yapay reseptörlerin tasarlanmasını kapsar. Bu kapsamda istenilen analitin eşleniğini içeren çapraz bağlı polimerik yapılar oluşturma işlemine moleküler baskılama denir. Moleküler baskılanmış polimerler gitgide dikkat çeken ve daha sık kullanılan sensörler haline gelmiştir. Moleküler baskılanmış polimerlerin, proteinler, amino asitler, peptidler ve ilaçlar gibi biyolojik aktif moleküllerin seçici olarak ayrılmaları ve saflaştırılmalarında kullanılmalarına yönelik çalışmalara literatürde son yıllarda sıklıkla rastlanmaktadır.

Bir aminoglikozit ilaç olan tobramisın (TOB), (2S,3R,4S,5S,6R)-4-amino-2-[[[(1S,2S,3R,4S,6R) - 4,6- diamino- 3 - [(2R,3R,5S,6R)-3-amino-6-(aminometil)-5-hidroksioksan]oks - 2 - hidroksisikloheksil]oksi} - 6 - (hidroksimetil)oksan -3,5-diol kimyasal yapısında olup, birçok gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı etkili, oftalmik ve inhalasyon kullanımı olan bir antibiyotiktir.

Kaynaklarda TOB'un kromatografik, spektrofotometrik, kapiler elektroforez ve elektroanalitik yöntemlerle farmasötik preparatlardan ve biyolojik materyallerden tek başına ve/veya karışım halinde analizleri bulunmaktadır. Ancak kaynaklarda adı geçen maddenin moleküler baskılama tekniği kullanılarak yapılmış herhangi bir analizine rastlanmamıştır. Kaynaklardaki bu boşluğu doldurmak amacıyla TOB'un farmasötik preparatlardan ve gıdalardan analizi için moleküler baskılanmış kuartz kristal mikroterazi ve voltametrik sensörlerin geliştirilmesi ve valide edilmesi planlanmıştır.

Bu tez çalışması, TOB miktarının belirlenmesi için moleküler baskılama yöntemiyle QCM ve elektrokimyasal sensörlerin yüzeyinde TOB baskılanmış polimer film tabakasının oluşturulmasını ve TOB'un basit, yüksek hassasiyetli ve seçimli tayininin yapılmasını içermektedir. Geliştirilen bu sensörlerle TOB'un tayini için optimize edilen şartlarda analizlerin gerçekleştirilmesi ve geliştirilen yöntemlerin doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, özgüllük, sağlamlık ve tutarlılık gibi parametreleri değerlendirilerek valide edildikten sonra TOB içeren farmasötik preparatların ve gıdaların (süt ve yumurta) analizine uygulanması ve elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Aminoglikozid Antibiyotikleri

Aminoglikozid (AG) antibiyotikler hızlı bakterisid etkili, klinik etkinlikleri iyi ve yaygın kullanımları ile önemli bir antibiyotik grubudur. Bu özellikleri onların ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilen antibiyotikler grubuna girmelerini sağlamıştır.

AG antibiyotikler birbirlerine glikozid bağları ile bağlanmış iki veya daha fazla amino şekerlerden oluşmuş bir antibiyotik grubudur. Amino şekerler ortada bir heksoz çekirdek olan aminosiklitolle bağlanırlar. pH 6.0-8.0 arasında oldukça kararlıdırlar. pH 7.4'te ise güçlü bir pozitif yüke sahip olurlar (katyonik özellik). Bu güçlü polariteleri nedeniyle, hücrelerdeki anyonik moleküllere bağlanırlar (lipopolisakkarid (LPS) ile hücre içindeki DNA ve fosfolipitlere) (1,2) . Suda çok iyi erirler, organik çözücülerde erimezler. Alkali pH'da etkileri artar, asidik pH'da ise azalır.

#### 2.1.1. Aminoglikozid Antibiyotiklerinin Etki Mekanizmaları

AG antibiyotikler elektrostatik etkiyle hücre duvarına hızla bağlanırlar. Bu faz pasiftir ve enerji gerektirmez (Gram-negatif bakterilerde LPS'ye, fosfolipitlerin polar ucuna ve anyonik dış membranın diğer proteinlerine). AG'ler normal olarak LPS'lere bağlanan  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  iyonları ile rekabete girerek onların yerlerini alır. Sonuç olarak dış membran zedelenir, geçici bir giriş yeri oluşur ve duvarın normal geçirgenlik fonksiyonu bozulur (3) .

Bu iyonik bağlanmadan sonra AG tutulumu iki enerjiye bağımlı faz (EBF) olarak gelişir. Bakterisid etkinin başlangıcı EBF-1 ve 2 arasındaki geçiş sırasında olur. Çoğu bakterilerin EBF-2'nin %25'inin tamamlanmasından önce ölümcül hasara sahip oldukları görülür. Daha yüksek dış AG derişimini daha hızlı bir şekilde EBF-2 tutulumunu tetiklemek için gerekli hücre içi ilaç derişimine ulaşır (4) . Hücre içine giren AG'ler büyük oranda 50S, daha az oranda ise 30S ribozomal altbirimlere bağlanırlar. Buralarda birçok bağlanma yeri gösterilmiştir. Sonuçta mRNA kodunun okunması ile protein sentez oranı azalır ve hatalı protein yapımı olasılığı artar. Ancak AG'lerin sağladığı bakteri ölümü yüksek etkinliğe sahiptir.

### **2.1.2. Aminoglikozid Antibiyotiklerinin Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri**

Aminoglikozid antibiyotiklerinin çeşitli farmakolojik ve farmakokinetik özellikleri aşağı sıralanmıştır.

- Polar yapıları nedeniyle gastroentestinal sistemden absorbe olmazlar.
- Plazma tepe düzeylerine kas içi (intramusküler, İM) verildikten 30-60 dakika, damar içi (intravenöz, İV) verildikten 30 dakika sonra ulaşırlar.
- Streptomisin hariç plazma proteinlerine çok az bağlanırlar.
- Büyük ölçüde hücre dışı sıvıda dağılırlar.
- Dağılım hacmi genç erişkinlerde vücut ağırlığının %25-30'udur.
- Kan-beyin engelini zor geçerler.
- Salgı ve dokuların hücre içlerinde düşük düzeyde bulunurlar.
- Renal korteks, iç kulak endo- ve perilenfide yüksek yoğunluğa ulaşırlar.
- Vücutta metabolize olmazlar ve glomerüler filtrasyonla değişmeden böbreklerden atılırlar. Bu şekilde verilen dozun %80- 90'ı 24 saatte idrarla atılır. İdrarda serumdan 80-100 kat daha yoğun olabilir (kreatinin klirensi 30 ml/dakika üzerinde ise) ve üriner sistem infeksiyonunu tedavi edecek düzeye ulaşırlar.
- Yarılanma ömürleri 2-4 saattir.
- Yaş, obezite, yanlış beslenme, renal fonksiyon bozukluğu gibi parametrelerle ilişkili olarak dağılım hacmi, eliminasyon yarı ömürleri değişir.

### **2.1.3. Aminoglikozidlere Karşı Oluşabilen Antibiyotik Direncinin**

#### **Mekanizmaları**

AG'lere direnç mekanizmaları özetle üç başlık altında toplanabilir. İlki enzimatik dönüşümlerdir: [a] amino grubunun asetiltransferaz enzimi ile asetilasyonu, [b] hidroksil grubunun nükleotidil transferaz enzimi ile adenilasyonu ya da [c] hidroksil grubunun fosfotransferaz enzimi ile fosforilasyonu ile AG inaktive olur. Sonuçta ribozomlara bağlanma zayıflar, azalır ve yüksek oranda direnç oluşur. Bu özellikler bakteriden bakteriye plazmid aracılığı ile geçer ve sık karşılaşılan bir direnç mekanizmasıdır.

İkinci olarak ribozomlardaki tek bir mutasyon ile AG'nin ribozoma bağlanma yerinin (reseptörünün) değişimi ile direnç oluşabilir ki bu nadirdir ve sadece bir AG'ye karşı oluşur. Son zamanlarda infektif endokardit etkenlerinde karşılaşılan streptomisin direncinin bu mekanizmayla oluştuğu bildirilmiştir.

Üçüncü mekanizma antibiyotikler arasındaki çapraz direncin nedenidir. Direnç düzeyi enzimatik modifikasyondakinden daha azdır.

#### 2.1.4. Klinik Mikrobiyoloji

Gram-negatif aerob veya fakültatif anaerob bakterilere bakterisid etkilidir. Etki spektrumuna giren bakteriler, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Haemophilus* spp., *M. tuberculosis*, atipik mikobakteriler, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis* ve *Brucella* spp.'dir. Etkisiz olduğu mikroorganizmalar ise pnömokoklar ve A grubu  $\beta$ -hemolitik streptokoklar, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacterioides fragilis*, *Clostridium* spp. ve diğer anaerob bakteriler, *Rickettsia* spp. ve *Mycoplasma* spp.'dir.

Antimikrobik sinerji, hücre duvar sentezini bozan antibiyotiklerle kombine edildiğinde sağlanır. Bu antibiyotikler; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve glikopeptidlerdir. Bu antibiyotiklerle kombinasyonu ayrı ayrı veya tek tek kullanımlarına göre daha yüksek ve güçlü bakterisid etki gösterir. Bakteriostatik antibiyotiklerle kombine edildiğinde ise antagonist etki gösterirler (tetrasiklin ve kloramfenikol).

#### 2.1.5. Klinik İndikasyonları

Ampirik tedavide, aerob gram negatif bakteri ve gram pozitif kokların meydana getirmesi olası kimi durumlarda kombine olarak kullanılırlar. Bunlar arasında sebebi belli olmayan ateş, yanık yarası enfeksiyonları, enfektif endokardit, intraabdominal enfeksiyonlar, febril nötropenie, osteomyelit ve septik artrit, diyabetik hastalardaki eksternal otit, ventilatör ile ilişkili pnömoniler, piyelonefrit, pelvik inflamatuvar hastalık, infekte diyabetik ayak sayılabilir.

Spesifik tedavide ise aerob veya fakültatif anaerob gram negatif basil enfeksiyonlarında kullanılırlar (Tablo 2.1). Cerrahi profilakside, kalp kapak hastalığı olupta *Enterococcus* spp. bakteriyemi riski olanlara uygulanacak genitoüriner ve

gastrointestinal cerrahide ampisilin veya ampisiline alerji varsa vankomisin ile kombine olarak gentamisin verilebilir.

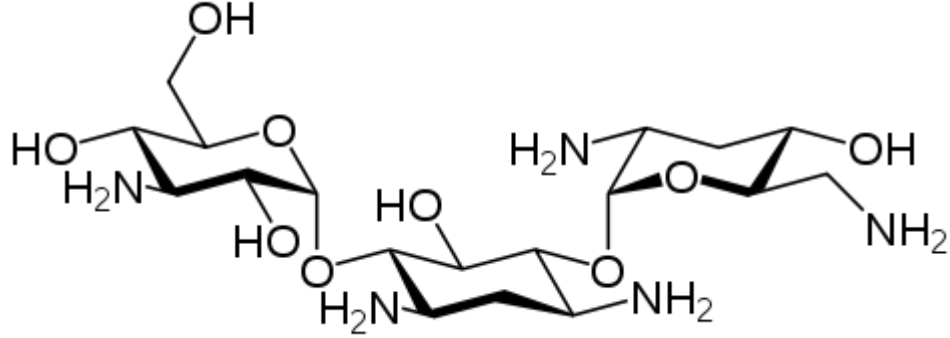
**Tablo 2.1.** Tedavide aminoglikozid antibiyotiklerin kullanıldığı bazı mikroorganizmalar

<b>Bakteri</b>	<b>Aminoglikozidler</b>	<b>Kombine edilen ajanlar</b>
<i>Klebsiella</i> spp.	A, G, T, N	GSS
<i>E. aerogenes</i>	A, G, T, N	GSS
<i>S. marcescens</i>	G	APP, GSS
<i>P. aeruginosa</i>	T	APP, APS
<i>F. tularensis</i>	S,G	-
<i>Brucella</i> spp.	S,G	Tetrasiklin
<i>Y. pestis</i>	S,G	-
Viridans streptokoklar	G	Pen G
<i>E.faecalis</i>	G	Pen G
MSSA	G	Nafsilin
<i>S. epidermidis</i>	G	Vankomisin + Rifampisin
<i>M. avium-intracellulare</i>	A	Diğer tüberküloz ilaçları
<i>M. tuberculosis</i>	S	Diğer tüberküloz ilaçları
<i>Cryptosporidium</i> spp.	P	-

A: amikasin, G: gentamisin, T: tobramisin, N: netilmisin, S: streptomisin, P: paromomisin, Pen G: penisilin G, GSS: Geniş spektrumlu sefalosporin, APS: anti-*Pseudomonas* sefalosporin, APP: anti-*Pseudomonas* penisilin

## 2.2. Tobramisin

### 2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2.1. TOB molekülünün kimyasal yapısı

TOB'un (Şekil 2.1) molekül formülü  $C_{18}H_{37}N_5O_9$  ve molekül ağırlığı 467.515 g/mol'dür. Kimyasal adı (2S,3R,4S,5S,6R)-4-amino-2-[[[(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-[[[(2R,3R,5S,6R) - 3 - amino - 6 - (aminometil) - 5 - hidroksioksan]oks-2-hidroksisikloheksil] oks]-6-(hidroksimetil)oksan-3,5-diol'dür. TOB'un erime noktası 168-178 °C aralığında olup oda sıcaklığında karardır. Beyaz renkte kristalimsi bir tozudur. Suda iyi çözünürken, metanol ve etanolde kısmen çözünür. TOB'un pKa değeri 13.07'dir (5) .

### 2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri

Yapılan *in vitro* çalışmalarda *S. aureus* ve *S. epidermidis* (Koagulaz-pozitif ve koagulaz-negatif) dahil olmak üzere, penisiline dirençli stafilokoklara, bazı A grubu beta hemolitik türler de dahil olmak üzere streptokoklara, bazı nonhemolitik türlerine ve bazı *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* (indol negatif ve indol pozitif ), *Morganella morganii*, *H. influenzae*, *H. aegyptius*, *Moraxella lacunata* ve *Acinetobacter calcoaceticus* ve bazı *Neisseria* türlerine etkili olduğu ortaya konmuştur (6) .



### 2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri

Yapılan hayvan çalışmalarında 3.0 mg/mL TOB içeren topikal solüsyonun uygulanmasından 1-2 saat sonra kornea ve aköz hümör pik derişimlerine ulaşıldığı gösterilmiştir. Uygulamadan 1-2 saat sonra kornea derişimi 4.5 µg/g kornea ve aköz hümörde 0.28 µg/mL'dir (7) .

### 2.2.4. Endikasyonları

TOB duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu gözün ve komşu dokuların dış kaynaklı enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Klinik çalışmalar TOB'un çocuklarda kullanılmasının etkili ve güvenli olduğunu göstermiştir.

### 2.2.5. Kontrendikasyonları

Bileşimindeki maddelerden herhangi birine karşı duyarlı olanlarda kullanılmamalıdır.

### 2.2.6. Kullanımı

#### *Gebelikte Kullanımı*

B gebelik kategorisindedir. Üç farklı deney hayvanı türünde normal insan sistemik dozunun 33 katına kadar dozlarla yapılan çalışmalarda yumurtlama ve fetüs üzerine TOB'la herhangi bir olumsuz etki saptanmamıştır. Fakat öte yandan hamile kadınlar üzerinde TOB'un etkilerini izleyen kontrollü bir çalışma yoktur. Bu nedenle hamilelerde ancak kesin endikasyon varsa kullanılmalıdır.

#### *Süt Veren Annelerde Kullanımı*

Süt emen bebeklerde annenin TOB kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilecek olası yan etkiler nedeniyle durum değerlendirilerek bebek süten kesilmeli veya ilaç kullanılmamalıdır.

### 2.2.7. Yan Etkileri

TOB tedavisinde sırasında en sık karşılaşılan yan etki göz kapaklarında kaşınma, şişme ve aşırı duyarlılıktır. Bu reaksiyonlar tedavi edilen her 100 hastanın

3'ünde ortaya çıkmaktadır. Benzeri reaksiyonlar diğer aminoglikozid antibiyotiklerin oftalmik preparatlarının kullanılmasıyla da ortaya çıkabilmektedir. TOB tedavisi ile başka bir yan etki bildirilmemiştir. Fakat sistemik aminoglikozid tedavisi yapılırken TOB kullanılması halinde total serum aminoglikozid düzeyleri dikkatle takip edilmelidir.

### **2.2.8. Kullanım Şekli**

Hafif ve orta şiddetli vakalarda hastalıktan etkilenmiş göz veya her iki göze dört saatte bir 1-2 damla damlatılır. Şiddetli enfeksiyonlarda ise iyileşme görülünceye dek tedaviye devam edilir. Tedavi doz azaltılarak kesilmelidir.

## **2.3. TOB'un Analiz Yöntemleri**

### **2.3.1. Kromatografik Analiz Yöntemleri**

Barends ve diğ. (8) , serumdan TOB tayini için 1-floro-2,4-dinitrobenzen ile türevlendirilmiş kolon kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir. Gentamisin iç standart olarak kullanılmış ve hassasiyet 0.5 mg/L olarak tespit edilmiştir. Kesinlik ve varyasyon katsayısı değerleri % 3'ten daha az bulunmuş ve 0.5–16 mg/L doğruluk aralığında çalışılmıştır.

Keevil ve diğ. (9) , serumdan TOB tayini için sıvı kromatografisi-elektronsprey iyonlaşma-kütle spektrometrisi (LC-ESI-MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Kolon olarak C18 kolonu ve iç standart olarak sisomisin kullanılmıştır. Alıkonma zamanları TOB için 1.05 dakika sisomisin için ise 5.60 dakika olarak bulunmuştur. 0.15 mg/L hassasiyetinde TOB tayini gerçekleştirilmiştir.

Megoulas ve Koupparis (10) , farmasötik preparat, plazma ve idrardan TOB tayini için ters faz HPLC (RP-HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir. Kolon olarak ODS-2 C18, buharlaşma sıcaklığı olarak 45 °C, azot basıncı olarak 3.5 bar ve hareketli faz olarak su/asetonitril (55:45, h/h) kullanılmıştır. TOB için alıkonma zamanı ve LOD değerleri sırasıyla 4.03 dakika ve 0.3 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Hanko ve Rohrer (11) , TOB tayini için UV dedektör kullanılarak Kanamisin-B ve neomisin varlığında RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem valide edilmiş ve bağıl hata ve bağıl standart sapma olarak % 2'nin altında bir doğruluk ve kesinlik elde edilmiştir.

Russ ve diğ. (12) , TOB'un oftalmik süspansiyonlarından tayini için HPLC yöntemi geliştirmişler ve valide etmişlerdir. Yöntem için 1-floro-2,4-dinitrobenzen ile türevlendirilmiş ön kolon kullanılmış ve kanamisin ve neamin varlığında analiz yöntemi geliştirilmiştir. Hareketli faz olarak su/asetonitril (55:45, h/h) ve kolon olarak Nova-Pak C18, 3.9 × 150 mm kolonu kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin kesinliğinin bağıl standart sapma değeri % 0.9'dan daha fazla değildir.

Mashat ve diğ. (13) , idrardan TOB tayini için floresein ile türevlendirilmiş kolon kullanılarak HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik koşullar olarak Phenomenex Luna C<sub>18</sub> kolonu, 1 mL/dakika akış hızı ve asetonitril–metilalkol–asetikasit–su (420:60:5:515, h/h/h/h) hareketli faz kullanılmıştır. 0.25-20.0 µg/mL doğrusallık aralığı elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 70 ng/mL and 250 ng/mL olarak bulunmuştur.

Dash ve Suryanarayanan (14) TOB'un polimerik ilaç sistemlerinden tayini sıvı kromatografisi (LC) yöntemi geliştirmişlerdir. İç standart olarak kanamisin-B kullanılmıştır. Kromatografik ayırma UV dedektörü kullanılarak 340 nm değerinde gerçekleştirilmiştir. 0.50–50.0 mg/L doğrusallık aralığı elde edilmiştir.

Kubo ve diğ. (15) , serumdan TOB tayini için hızlı, doğru ve basit HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin hassasiyeti 0.3 pg/mL'dir. İç standart olarak sisomisin kullanılmıştır. TOB analizi için geliştirilen yöntemin bağıl hata değerleri % 2.5'in altındadır.

Feng ve diğ. (16) , insan plazmasından TOB tayini için doğru ve basit HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem TOB'un kimyasal olarak 1-naftil-izotiyosiyanat ile kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Ayırım için Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18 kolonu ve hareketli faz olarak su-asetonitril (50:50, h/h) kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin doğrusallık aralığı ve LOD değeri sırasıyla 0.93-9.34 mg/L ve 0.23 mg/L olarak bulunmuştur.

Clarot ve diğ. (17) , TOB ve kolitsin sülfatın aynı anda ilaçlardan analizi HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma Zorbax SB C18 column (150 mm × 4 mm, 3.5 µm) kolonu ve 1 mL/dakika akış hızında su-asetonitril (50:50, h/h) hareketli faz sisteminde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca geliştirilen yöntem valide edilerek gerçek numunelere uygulanmıştır.

He ve diğ. (18) , TOB'un toprak numunelerinden analizi için katı faz özütleme (solid phase extraction, SPE) yöntemi kullanılarak HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Özütleme ve saflaştırma yöntemleri, türevlendirme ve kromatografik koşullar tamamen incelenmiştir. Ayırma 15 dakika içinde gradient elüsyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrusallık aralığı ve LOD değeri sırasıyla 0.10-100 µg/g ve 0.02 µg/g olarak tespit edilmiştir.

Tao ve diğ. (19) , TOB ve diğer 14 tane aminoglikozid türü ilaçların aynı anda hayvanlardan üretilen yiyeceklerde tayini için LC-ESI-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Hareketli faz olarak trifloroasetik asit ve asetonitril karışımı kullanılmıştır. 20-1000 µg/kg aralığında ve yüksek korelasyon katsayılı kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Ayrıca % 71 ile % 108 aralığında bir geri kazanımda elde edilmiştir.

### 2.3.2. Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri

Gaikwad ve diğ. (20) , TOB'un tayini için kinetik florimetrik bir yöntem geliştirmişlerdir. TOB öncelikle o-ftaldialdehit ile kompleks oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntemin doğrusallık aralığı ve LOD değeri sırasıyla 0.05-30.0 µg/mL ve 0.03 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem başarı bir şekilde farmasötik preparatlara uygulanmıştır.

### 2.3.3. Kapiler Elektropherez Analiz Yöntemleri

Law ve diğ. (21) , serumdan TOB'un analizi için kapiler elektropherez kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem valide edilmiştir. Bu yöntemde 50 µg/L (S/N = 3) hassasiyetine ulaşılmıştır. Kanamisin-B iç standart olarak kullanılmış ve % 96-97 geri kazanım elde edilmiştir.

Yu ve diğ. (22) TOB, amikasin ve kanamisin-B'nin aynı anda süttten analizi için kapiler alan elektropherez yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemin doğrusallık aralığı ve LOD değeri sırasıyla  $2.1 \times 10^{-5}$  -  $5.0 \times 10^{-2}$  g/L ve  $7.0 \times 10^{-6}$  g/L olarak bulunmuştur.

### 2.3.4. Elektroanalitik Analiz Yöntemleri

Sun ve diğ. (23) , TOB'un analizi için adsorptif sıyırma voltametik analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem elektrokimyasal olarak TOB'un izobütiraldehit ile kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu kompleks -1.40 V'da katodik sıyırma piki vermektedir. Kullanılan çalışma elektrotu asılı duran civa elektrotudur. Geliştirilen yöntemin doğrusallık aralığı  $6.87 \times 10^{-9}$  -  $3.44 \times 10^{-7}$  mol/L'dır.

Gonzalez ve diğ. (24) , TOB için manyetik mikropartiküller kullanarak aptamer temelli bir elektrokimyasal analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Elde edilen analitik sinyal 5-500  $\mu$ M derişim aralığında doğrusal olup geliştirilen elektroanalitik yöntemin tekrar kullanılabilirliği % 5.7'dir.

### 2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama teknolojisi belirli bir analite seçiciliği ve özgünlüğü olan yapay reseptörlerin tasarlanmasını kapsar (25) . Bu kapsamda istenilen analitin eşleniğini içeren çapraz bağlı polimerik yapılar oluşturma işlemine moleküler baskılama denir. Canlı organizmaların birbirleriyle etkileşirken sahip oldukları yapısal ayırım yapma yeteneğine ve bu yeteneği polimerik yapılara aktarma yöntemi olarak da düşünülebilen moleküler baskılama mekanizmasının anlaşılması enzim-substrat, antijen-antibadi, hormon-reseptör arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasını sağlar. Bilim insanları bunun altında yatan mekanizmayı anlamaya ve dolayısıyla antijen-antibadi, enzim-substrat, hormon-reseptör, DNA ve RNA arasındaki etkileşimleri ortaya koymaya çalışmaktadır. Dolayısıyla moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), baskılama teknolojisi kullanılarak elde edilen plastik antibadiler, biyolojik reseptörler gibi doğal tanıma elemanlarını taklit yeteneğine sahip yapılardır. Bu sayede biyolojik sıvılardan ve çevre örneklerinden karmaşık numuneler ayrıştırılıp analiz edilebilir (25) . Yani moleküler baskılanmış polimerler hedef molekül tanıma ve bağlanma özelliğine sahip yapay reseptörlerdir.

Moleküler baskılama yöntemi moleküler kalıp (tanınması istenen yapı) ile fonksiyonel monomerler arasında bir kompleks oluşumu ve daha sonra polimerizasyon işlemiyle yapının sabitlenmesine dayalıdır. Kalıbın uzaklaştırılması şekil ve fonksiyonel olarak kalıba uygun "baskılar"ın ortaya çıkmasını sağlar. Kalıp molekül varlığında şekillenen özgül tanıma bölgeleriyle oluşturulan MIP'ler hedef

molekölü birçok bileşen içeren bir karışımdan ayırma özelliğine sahiptir (26,27) . Doğal sistemlerin tanıma özelliği ile karşılaştırılabilir derece tanıma özelliğine sahip bu yapay reseptörlerin dizaynı ile moleküler baskılama son yıllarda önemli bir araştırma konusu olmuştur. Moleküler baskılama teknolojisi birçok biyolojik ve kimyasal molekülün tanınmasını mümkün kılmıştır. Bunların başında amino asitler (28) ve proteinler (29) , nükleotit türevleri, kirleticiler, ilaçlar ve gıda gelmektedir.

MIP'lerin çalışma konusu olarak seçilmesini sağlayan birçok avantajı mevcuttur. En önemli avantajı doğal kaynakla karşılaştırılabilecek kadar hedef moleküle gösterdikleri yüksek afiniteleri ve seçicilikleridir. Bu sayede kısa sürede hedef molekülü alıkoyar, kolayca rejenere edilebilir. Çevresel faktörlere, yüksek sıcaklık, basınç, yüksek pH ve organik çözücülere dayanıklıdır. Ayrıca düşük maliyetle kolayca hazırlanabilen yapılardır. Fiziksel ve kimyasal dayanıklılığı vardır ve birçok farklı şekillerde hazırlanabilir (30) . Protein ve nükleik asit gibi biyolojik sistemlerle karşılaştırıldığında daha yüksek fiziksel kararlılığa sahiptir. Artan sıcaklığa, basınca, asit, baz, metal iyon etkilerine ve organik çözücülere daha dayanıklıdır. Ayrıca yine biyolojik sistemlerle karşılaştırıldığında sentezlenmeleri daha ucuzdur. Bir diğer önemli özellikleri ise moleküler tanıma özelliklerini kaybetmeden uzun süre hatta oda sıcaklığında yıllarca saklanabilirler (25) .

Tüm bu avantajlarına rağmen moleküler baskılanmış polimerlerin sentezlenmesinde zorlayıcı noktalar mevcuttur. Birçok madde için MIP'ler uygulansa da proteinler gibi büyük yapılar için MIP yapımı zordur. Çünkü protein ve nükleik asit yapıların ligand seçiciliği özellikleri yanında denatürasyon ve proteinlerin konformasyonel değişim eğilimleri, kararlılık problemleri, abiyotik çevrelerde kullanımlarını kısıtlamaktadır. Proteinlerin yüzeylerinde sahip oldukları birçok bağlanma bölgesi nedeniyle spesifik olmayan etkileşim sayısı artar (31) . Ayrıca büyük moleküller çapraz bağlı yapılar içerisinde daha düşük hareket yeteneğine sahiptirler ve tekrar bağlanmaları da zordur (26) . Bu problemler baskılama sürecinde proteinlerin baskılanması zorlaştırmıştır. Ancak doğal eşlenikleriyle aynı seçiciliğe ve etkinliğe sahip yapay tanıma sistemlerinin geliştirilmesini tetiklemiştir. Büyük moleküllerin baskılanması zor olsa da proteinlerin baskılanmasıyla ilgili başarılı çalışmalar mevcuttur. Uzun ve ark. yüzey plazmon rezonans yüzeye Hepatit B antibadi (HBsAb) baskılanmış nanofilm

hazırlayarak insan serumundan HBsAb teşhisini gerçekleştirmiştir (32) .

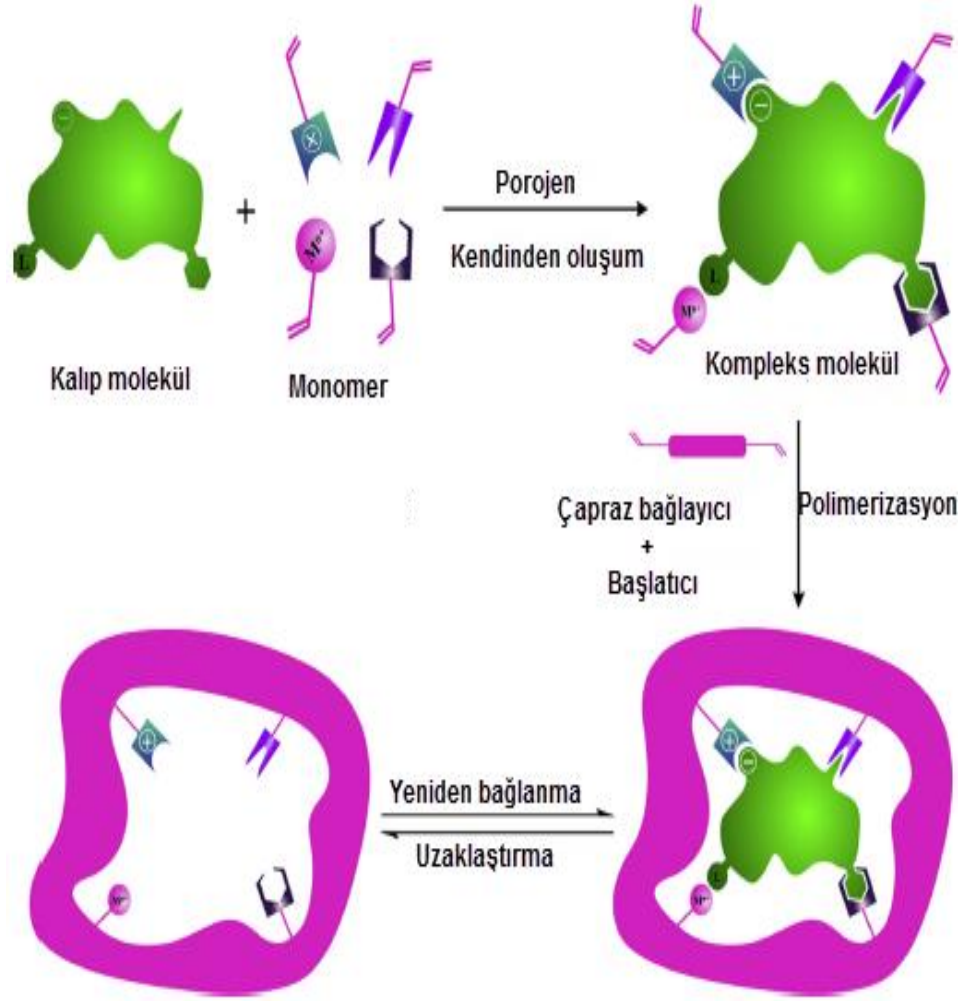
MIP'ler kararlılıkları, kolay hazırlanışları ve düşük maliyetleri ile antibadilerin, enzimlerin yerine kimyasal sensörlerde kullanım potansiyeline sahiptirler. Ayrıca küçük analitlere, bakterilere, virüslere, peptit ve proteinlere gösterdikleri yüksek seçicilik sayesinde biyoayırma işlemlerinde de sıkça kullanılmaktadırlar (27) . Ayrıca katalizde, ayırma teknikleri ve saflaştırmada, ilaç taşınımında ve biyolojik antibadi ve reseptör sistemlerinde kullanılırlar (33) . MIP sensörler yüksek seçicilik ve afiniteleriyle anahtar-kilit modeli gibi çalıştılarından kiral kimyasal sensörler olarak da kullanılabilirler. Ayrıca kolayca rejenere olabilmeleri ve analit tayini sağladıklarından elektrokimyasal sensör olarak da kullanılmaktadır (34) . Baskılanmış polimerlerin birçok yapısal avantajı ile farmasötikten çevre bilimlerine kadar çok geniş bir yelpazede tanıma ve ayırma amaçlı kullanılması moleküler baskılama teknolojisini gitgide daha cazip hale getirmektedir.

#### **2.4.1. Moleküler Baskılama Tekniği**

Moleküler baskılama klasik olarak kalıp molekül (analit) ve ona şekil ve büyüklük olarak benzer bir fonksiyonel monomerle kompleks oluşturarak polimerizasyon yapma işlemidir (Şekil 2.2) (35) . Polimerizasyon işlemi, kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ajan ve başlatıcının uygun çözücüde çözünmesiyle başlar.

Genel olarak bu işlem üç adımda gerçekleşir.

1. Fonksiyonel monomerle kalıp molekül arasında *ön kompleksleşme*,
2. Aşırı çapraz bağlayıcı varlığında üç boyutlu polimer ağ oluşumu,
3. Polimerizasyon sonrasında kalıp molekül özgül boşluklar oluşturacak şekilde polimerden uzaklaştırılır. Oluşan bu boşluklar kalıp molekülü şekil, büyüklük ve kimyasal uygunluk açısından tamamlayıcıdır (36) .



Şekil 2.2. Moleküler baskılanmış polimer için hazırlama ve tanıma süreci

### Ön-kompleksleşme

Fonksiyonel monomer kalıp molekülle etkileşecek şekilde seçilir. Çünkü kararlı bir kalıp monomer kompleksi, moleküler tanımanın başarıyla gerçekleşmesi için olmazsa olmazdır. Bu adımda kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir iskelet yapı oluşur. Hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özelliklerinin benzer olması önemlidir.

### Polimerizasyon

Monomerler kalıp molekülün etrafında üç boyutlu düzlemde yer alırlar. Çapraz bağlayıcı varlığında da fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilerek



sabit hale getirilirler. Elde edilen yapıyla kalıp molekülün üç boyutlu yapısına eşlenik özgül mikroboşluklar içeren polimer matriks oluşmuştur.

#### ***Kalıp (hedef) molekülün uzaklaştırılması***

Kalıp molekülün uygun çözücü ile yıkanarak polimerden uzaklaştırılmasıyla bağlanma bölgeleri kalıp molekülü tamamlayan boşluklar oluşur. Oluşan bu boşluklar kalıp molekülün şeklini, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıyarak seçici ve etkin olarak kalıp molekülü bağlar.

Genel olarak polimer yapı içerisinde kalıp molekül ve fonksiyonel gruplar arasında oluşan hidrojen bağları, dipol-dipol, hidrofobik ve iyonik etkileşimler moleküler tanımadan sorumludur (37) . Polimerizasyon işleminde kullanılan kalıp molekülün, fonksiyonel monomerin, çapraz bağlayıcının, polimerizasyon için çözücünün ve başlatıcının kimyasal uygunluğu, bu nedenle de dikkatli seçimi başarılı bir moleküler baskılama süreci için önemlidir.

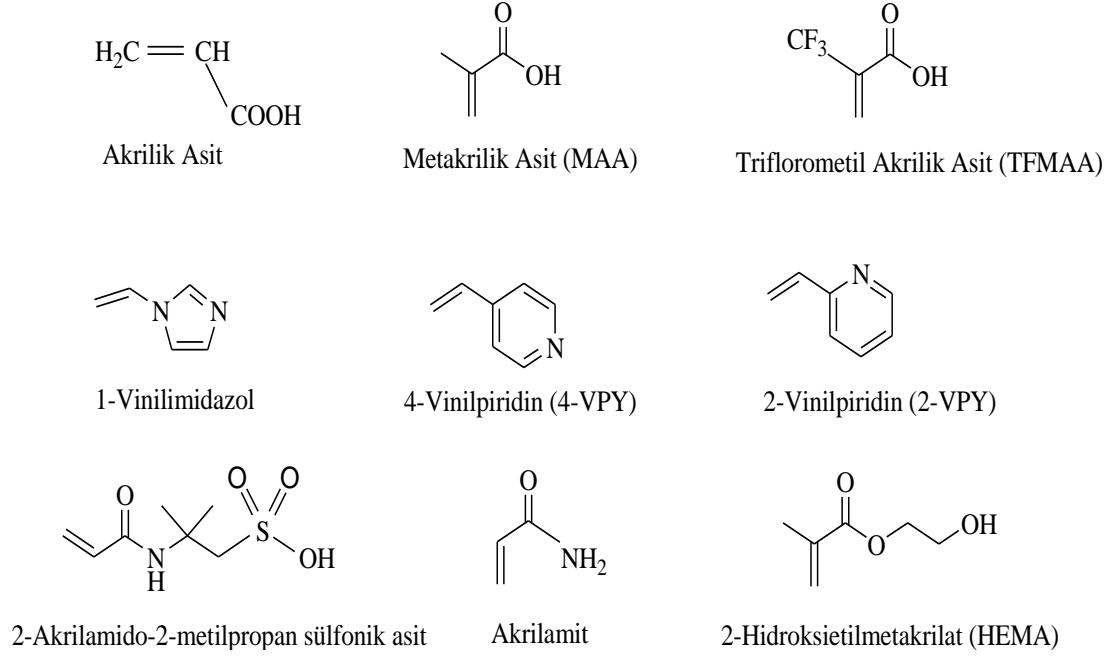
#### **2.4.1.1. Kalıp (Hedef) Molekül**

Kalıp molekülün fonksiyonel monomerle kompleks yapabilmesi için buna eşlenik fonksiyonel gruplar içermelidir. Moleküler tanımanın gerçekleşmesi için kalıp molekül ve fonksiyonel gruplar arasında hidrojen bağları, dipol-dipol, hidrofobik, iyonik ve hatta bazı yaklaşımlarda kovalent bağ etkileşimleri oluşmalıdır. Bu nedenle kalıp molekülün bu etkileşimleri yapabilecek karboksil, amino, hidroksil ve amit grupları bölgeleri kompleks oluşumu için gereklidir. Kalıp molekülün konformasyonunda veya kararlılığında kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği koşullar altında değişiklik olmamalıdır. Baskılanacak molekül olarak ilaçlar, aminoasitler, karbohidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler ve koenzimler kullanılmıştır (38) .

#### **2.4.1.2. Fonksiyonel Monomerler**

Monomerin seçimi kalıp moleküle uygun boşluklar oluşturması açısından önemlidir. Bir fonksiyonel monomerin kalıp moleküle etkileşebilmesi için hem seçici etkileşime girebilecek fonksiyonel gruplara hem de polimerleşebilecek

doymamış bağlara sahip olması gerekir. Şekil 2.3'te moleküler baskılamada sık kullanılan fonksiyonel monomerler görülmektedir.



**Şekil 2.3.** Moleküler baskılamada sık kullanılan fonksiyonel monomerler

Tipik fonksiyonel monomerler üç kısımda incelenebilir (39) .

#### 1. Asidik karakterli monomerler

- akrilik asit (AA), metakrilik asit (MAA), p-vinilbenzoik asit, 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA), akriloamido-(2-metil)-propan, 2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit (AMPSA)

#### 2. Bazik karakterli monomerler

- 4-vinil piridin (4-VP), 2-vinil piridin (2-VP), 4-(5)-vinylimidazol, 1-vinil imidazol, allilamin, N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM)

#### 3. Nötral monomerler

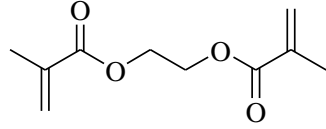
- akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren

### 2.4.1.3. Çapraz Bağlayıcılar

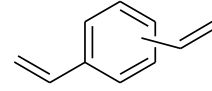
Baskılanmış polimerlerde polimer matriksin kararlı bir şekilde oluşabilmesi için çapraz bağlayıcı önemlidir. Çapraz bağlayıcı polimer matriksin morfolojisinin kontrol edilmesinde kullanılır. Ayrıca baskılanmış kalıp moleküle özgü bağlanma bölgelerini kararlı hale getirerek, polimer matriksin moleküler tanıma özelliğini korumasını sağlar. Bunun için birçok farklı çapraz bağlayıcı kullanılır. Çapraz bağlayıcı polimerin fiziksel yapısının oluşumunda önemli etkiye sahip olduğundan kullanılan çapraz bağlayıcı-monomer oranı da başarılı bir sentez için önemlidir.

Çapraz bağlayıcı-monomer mol oranı düşük olduğunda kalıp moleküllerin bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşır. Bu yüzden hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır. Aralarındaki oran yüksek olduğunda da, çapraz bağlayıcı monomerle ya da kalıp moleküle non-kovalent etkileşimler gösterir. Her iki durumda da baskılamanın etkinliği azalır (40) . Yüksek çapraz bağlayıcı oranı genellikle yeterli mekanik kararlılığa sahip makrogözenekli yapılar elde etmek için kullanılır.

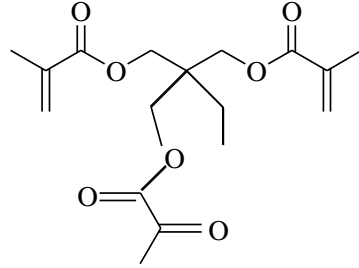
Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM) sık kullanılan çapraz bağlayıcılardandır. Çapraz bağlayıcı polimerin fiziksel yapısının oluşumunda önemli etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki çapraz bağlayıcı polimerin büyüklüğünü önemli derece etkilemektedir (41) . Şekil 2.4'te moleküler baskılamada sık kullanılan çapraz bağlayıcılar görülmektedir.



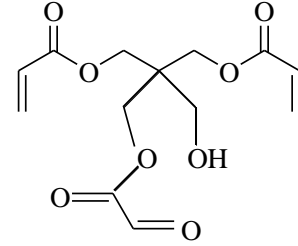
Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA)



Divinilbenzen (DVB)



Trimetilopropan Trimetakrilat (TRIM)



Pentaeritritol Triakrilat (PETRA)

**Şekil 2.4.** Moleküler baskılamada sık kullanılan çapraz bağlayıcılar

#### 2.4.1.4. Çözücü

Çözücü de baskılama sürecinde önemli rolü olan diğer bir etkidir. Polimerizasyonda kullanılan kimyasalların tek bir fazda, homojen olmasını sağlar. Ayrıca makrogözenekli polimerlerde gözenek oluşumundan sorumludur. Bu nedenle çözücü gözenek oluşturucu (porojen) olarak da adlandırılır. Çözücü oluşan baskılanmış polimerde gözenek oluşumu ve daha iyi akıştan sorumludur. Bu yüzden çözücü hacminin artması oluşacak gözeneklerin hacminin artmasına neden olur (40) .

#### 2.4.1.5. Başlatıcılar

Radikal polimerizasyon, radikal başlatıcıların ısı bozunmasıyla başlatılabilir. Monomer ile kalıp molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin çok zayıf olduğu durumlarda çok yüksek sıcaklıklara çıkılmaz. Düşük sıcaklıklarda etkili olan fotokimyasal başlatıcılar tercih edilir. Genellikle 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN) ve 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADVN) kullanılır. Bu koşullarda, ısı bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir.

#### 2.4.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak, fonksiyonel monomer ile kalıp

molekül arasında oluşan bağın çeşidine göre ikiye ayrılır: Kovalent ve kovalent olmayan baskılama.

#### **2.4.2.1. Kovalent Baskılama**

Ön organizasyonlu moleküler baskılama yaklaşımında, polimerizasyondan önce baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasında kuvvetli, tersinir bir kovalent düzenleme oluşur. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül, baskılanmış polimerlerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yine oluşur (42,43) .

##### Avantajları:

Monomer-kalıp molekül kompleksi oldukça kararlıdır ve sitokiyometrik oranlarda gerçekleşir. Polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar çözücüler) istenildiği gibi uygulanabilir, çünkü konjugantlar kovalent bağlarla oluşturulmuştur ve oldukça kararlıdır (44) .

##### Dezavantajları:

Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezinde sık sık sorunlar çıkabilir ve sentez yöntemi ekonomik değildir. Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır. Kovalent bağ oluşumu nedeniyle bağlanma kinetiği yavaştır (45) .

#### **2.4.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama**

Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması non-kovalent (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve koordinasyon bağ oluşumu gibi) etkileşimlerle gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır (46) .

##### Avantajları:

Kovalent monomer-kalıp konjugatının sentezine gerek yoktur. Polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır çünkü non-

kovalent etkileşimler daha zayıftır.

Dezavantajları:

Polimerizasyon koşulları, non-kovalent etkileşimleri arttırmak amacıyla sınırlıdır. Fonksiyonel monomerler bağ oluşum dengesini arttırmak amacıyla fazlaca kullanılır ve non-spesifik bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir (47,48) .

Moleküler etkileşimlerin farklılığı, seçiciliğin ve tersinirliğin derecesini etkiler. Örneğin kovalent bağlarla oluşturulan etkileşimler oldukça spesifiktir ancak geri bağlanma kinetiği yavaştır. Bununla beraber, hidrofobik etkileşimlerin kinetiği daha hızlıdır fakat seçiciliğinde azalma gösterir. Genel olarak non-kovalent etkileşimler, birçok bileşiğe uygulanabilir olmaları, hızlı kinetiği ve daha uygun koşullarda bağ oluşumu ve kırılma özellikleri göstermeleri nedeniyle daha geniş uygulama alanlarına sahiptirlerdir. Dahası  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi belirli non-kovalent etkileşimler yeni moleküler baskılanmış fonksiyonel polimerlerin tasarımı için önemlidir.

### 2.4.3. Baskılama İşleminin Kontrolü

Moleküler baskılanmış polimerlerin yüksek seçicilikte tanınması ve baskılanmış polimerler tarafından bağlanması, malzemenin fiziksel ve kimyasal (esneklik, bağlanma bölgelerin sayısı ve malzemenin yapısı gibi) özelliklerine bağlıdır. Moleküler baskılanmış polimerlerin daha kullanışlı olmaları için substratın seçiciliğinin öneminin yanında, uygun koşullar altında desorpsiyon ve geri bağlanma kinetiğinin de hızlı olması gerekir. Bu yüzden moleküler baskılanmış malzemelerin tasarımı yapılırken uygun bağlanma etkileşimlerinin seçimi oldukça önemlidir. Birden fazla bağlanma bölgesinin olması, monomerin bağlanma bölgeleri ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerinin daha iyi olması dolayısıyla moleküler tanımanın daha seçici olmasını sağlar.

Yapılan çalışmalar baskılanmamış polimer (kontrol polimer) ile karşılaştırmalı olarak yürütülür. Bu polimer kalıp molekülün yokluğunda aynı polimerizasyon işlemi uygulanarak elde edilir. Baskılanmamış polimerler, baskılanmış polimerlerle spesifik boşluklar dışında aynı kimyasal özelliklere sahiptirler. Bu yüzden, baskılanmış polimerlerle kalıp molekül arasındaki

etkileşimlerin doğasıyla aynıdır. Eğer polimerizasyon basamağı esnasında iyi tanımlanmış boşluklar oluşturulmuşsa baskılanmış polimerdeki etkileşimler daha güçlüdür. Etkileşimdeki bu hassasiyet kalıp molekülün üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır. Boşlukların varlıkları bağlanma deneyleri ve kromatografik ölçümler gibi çeşitli yöntemlerle incelenebilir. Polimerlerin seçicilikleri baskılanmış/baskılanmamış polimerlerle etkileştirilmesi; baskılanmış ve baskılanmamış polimerlere ait dağılım katsayısının (k) hesaplanması ve baskılama faktörü olarak değerlendirilen bağıl dağılım katsayısının (k') belirlenmesiyle gösterilir. Bu yaklaşım sıvı kromatografisi (LC) ve katı faz özütleme uygulamalarında baskılanmış polimerlerin karakterizasyonu için de kullanılır (39,49)

#### **2.4.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları**

Moleküler baskılanmış polimerler farmakolojik, analitik ve biyolojik moleküler tanıma alanları, kontrollü salınım sistemleri, sensörlerde tanıma elemanı olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar (50) . Sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi ve katı faz özütleme gibi analitik tekniklerde MIP'lerin kullanımına yönelik çalışmalar sürekli artmaktadır (51,52) .

Kimya ve ilaç endüstrisindeki artan pazar fırsatlarına bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerlerin su saflaştırma ve atık malzeme değerlendirme işlemleri gibi ayırma alanındaki uygulamaları giderek artmaktadır. Sadece kromatografi kolonlarının satışının yılda 500 milyon ABD dolarına yaklaştığı ve membran ayırma teknolojisi pazarında yıllık 1 milyar ABD doları civarında büyüme olduğu tahmin edilmektedir. Moleküler baskılanmış malzemelerin afinite ayırma, katı faz özütleme ve sert şartlar altında (organik ve toksik ortamlar, düşük ya da yüksek pH'lar, yüksek sıcaklıklar ve basınç gibi) ayırma alanında bu pazarda % 1-3 oranında yer alması beklenmektedir (53) .

MIP adsorbentler, ilaçların katı faz özütlenmesinde, proteinlerin, amino asitlerin, DNA ve RNA'nın, peptidlerin, hormonların ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır (54) . MIP'lerin diğer bir kullanım alanı olan bazı temel araştırmalar, ilaç tasarımı, optik gibi alanlarda önemli olan kiral bileşiklerin ayrılmasıdır (55-57) .

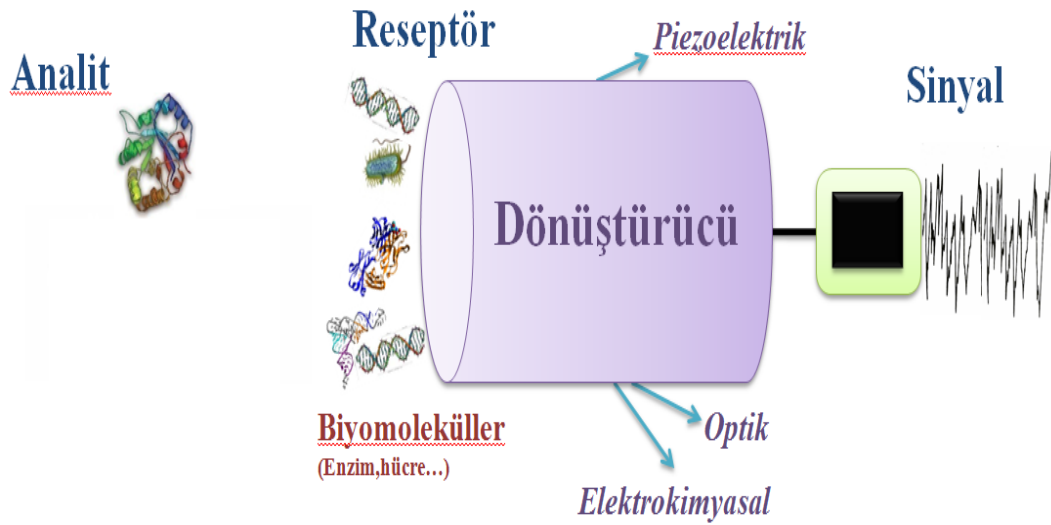
Bir diğ er uygulama alanı ise sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanımlarıdır. Bir kimyasal veya biyosensör, bir tanıma elementi ve onunla bağlantılı bir dönüştürücü içerir ve bu transduserin görevi, analitin bağlanmasıyla oluşan de ğ işimi, ölçülebilir bir dış sinyale dönüştürmektedir. Bu sensörlerde kullanılan biyomoleküller ço ğ unlukla zayıf fiziksel ve kimyasal kararlılık gösterirler. Bu nedenle yapay reseptörlere duyulan ilgi artmaktadır. Özellikle MIP'ler zorlayıcı şartlarda gösterdikleri dayanıklılık ve yüksek seçicilikte tanıma bölgelerine sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. MIP temelli ilk sensör baskılı-polimer membran ince filmi içeren bir alan etki kapasitörüdür ve analitin bağlanmasıyla kapasitansta meydana gelen de ğ işim ölçülmüştür (58) . Daha sonra ise elektrokimyasal (59,60) ve optik (61,62) transduserlere dayalı başka sensörler geliştirilmiştir.

Moleküler baskılamayla hazırlanan polimerle amino asit türevleri, ilaçlar ve şeker türevlerinin kiral ayırımı için antibadi reseptör benzeri olarak steroidler, proteinler ve protein analogları için organik reaksiyonlarda enzim benzeri olarak ve iyon seçici absorbanlar olarak başarıyla kullanılmaktadır (63) . Son yıllarda moleküler baskılama temelli elektrokimyasal ve optik sensörler hakkındaki yayınların sayısı hızla artmaktadır (64-66) .

## 2.5. Sensörler

Sensörler, pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanıp moleküllerin veya sistemlerin seçimlilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin birleştirilmesiyle geliştirilen analitik cihazlar olarak tanımlanabilir (67) . Klinik teşhis, tıbbi uygulamalar, gıda, çevresel analizlerden; kalite kontrol, tarım, gıda ve ilaç endüstrisine, çevresel analizlere, madencilik, savunma sanayine çok geniş ölçekte kullanım alanı mevcuttur. Ancak en geniş ölçe ğ i diyabetli hastalarda glikoz sensörü kullanımının yaygınlığıyla tıbbi uygulamalar alır. Bu bağlamda biyosensörler kişiselleştirilmiş tıpta önemli yer tutmaktadır (68) . Biyosensörler temelde iki kısımdan oluşurlar (Şekil 2.5.). İlk kısım analit ile seçimli etkileşime girecek biyolojik duyurgaç, ikinci kısım ise bu etkileşimi anlamlı sinyale çevirecek dönüştürücüdür (69,70) .





**Şekil 2.5.** Bir biyosensörün bileşenleri ve çalışma mekanizması

Sensörlerde kullanılan dönüştürücüler farklı olabilir. Bunlar arasında piezoelektrik, termometrik, manyetik ve mikromekanik dönüştürücüler yer almaktadır. Buna bağlı olarak sensörler ısı, mekanik, kimyasal, akustik, radyoaktif sensörler olabilir. Biyolojik algılayıcı elemanlar varlığında çalışan analitik cihazlar olan biyosensör alanında gelişmeler artan bir hızla devam etmektedir.

Çoğunlukla kullanım alanları klinik amaçlı olsa da sensörler çok farklı amaçlar için kullanılabilir. Bunlara örnek olarak fermentasyon işlem kontrolünde kullanılan biyosensörler (71) , gıda analizlerinde patojen, pestisit, mikroorganizma ve toksin tespitinde kullanılan biyosensörler (72) verilebilir. Tüm bu amaçlar için sensörlerde tanıma elemanı olarak enzimler, antiadiler, biyoreseptörler veya aptamerler gibi biyolojik tanıma elemanları kullanılabilir. Geniş kullanım alanına rağmen biyosensörlerin bir takım sınırlılıkları mevcuttur. Bunların uzun süreli dayanıklılığı (raf ömrü) ve tekrar kullanılabilirlikleri sınırlıdır. Belirlenmiş optimum çalışma pH ve sıcaklık değerleri korunmalıdır. Moleküler tanıma elemanı olarak kullanılan biyolojik bileşenlerin temini zor, bazen de fiyatları yüksektir (30) .

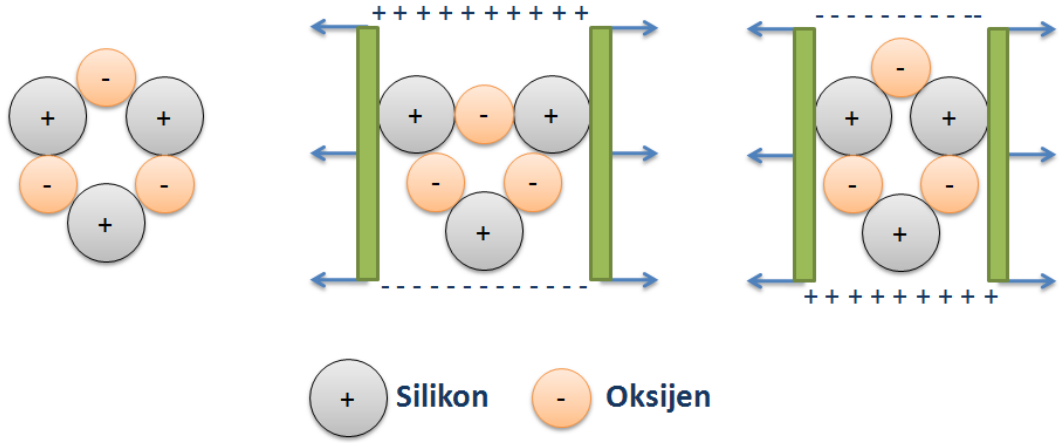
### 2.5.1. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM) Biyosensörler

İletken olmayan mineral kristallerinden yontulmuş bir levhaya belli bir doğrultuda uygulanan bir baskı (çekme ya da sıkıştırma) sonunda, levhanın iki yüzünde ters işaretli yüklerin (+q ve -q) ortaya çıkmasıyla nitelendirilen olaydır.

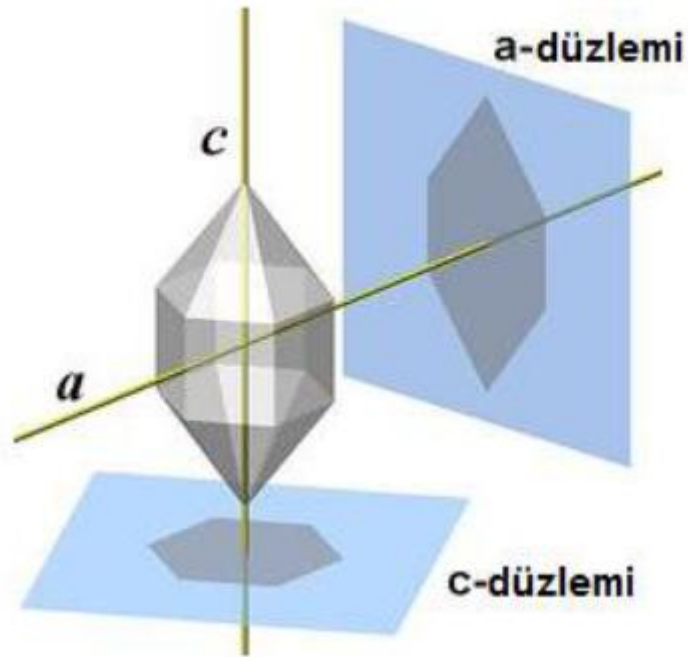
Pierre ve Jacques Curie kardeşler 1880'de Fransa'da kristalleri çeşitli yönlerden sıkıştırarak gerilim ürettiklerini keşfettiler ve buna piezoelektrik etki adını verdiler. Daha sonra bu olayın tersinir olduğu kanıtlandı. İki yüz üstünde elektrik yüklerinin bulunmasından dolayı bu yüzler üstüne yerleştirilen iki elektrot arasında bir U potansiyel farkı ölçülebilir. Ortaya çıkan elektrik yüklerinin yüzeysel yoğunluğu, uygulanan basınçla doğru orantılıdır. Bu olayın tersinir bir niteliği vardır. Söz konusu iki yüzün her biri üstüne +q ve -q yükleri uygulanırsa ya da bu yüzler arasında bir U potansiyel farkı uygulanırsa, levhanın belirli bir doğrultuda genleştiği ya da kasıldığı gözlenir. Sonuç olarak piezoelektrik etki ve bunun tersi, bir F mekanik kuvvetin bir elektriksel potansiyel farkına doğrudan dönüşüm elde edilmesini sağlar. Bu özelliğe sahip bir kristal uygun bir elektrik devresine bağlanırsa kristalin kütlesine ve şekline bağlı olan sabit bir frekansta titreşim yapar (73) . Kütle duyarlı bu sensörlerin çalışma prensibinin temeli asimetrik kristallerin sahip oldukları “piezoelektrik etki” özelliğine dayanmaktadır (74) .

Şekil 2.6'da piezoelektrik etkiye sahip kuvars kristalinin x-ekseni doğrultusunda uygulanan itme veya çekme kuvvetleri ile deformasyonu ve y-ekseni doğrultusunda oluşan yük değişimi gösterilmiştir. Kuvars kristallerin bu özelliğinden pek çok doğru ve duyarlı analitik cihaz yapılmasında yararlanılmaktadır. Piezoelektrik sensörlerin en önemli uygulaması ise “Kuvars Kristal Mikroterazi” (QCM) dir.

Kuvars kristali, silikon ve oksijenden elde edilir ve  $\text{SiO}_2$  kimyasal formülüne sahiptir. Ticari olarak kullanılan başlıca piezoelektrik maddesi kristalin kuvarsdır (silikon oksit). Üç boyutlu simetrik bir eksene sahiptir ve merkezi bir simetriye sahip değildir. Gerilimden yoksun olması oksijen ve silikon atomlarının hareketine neden olur. Bu deformasyon, şarj merkezlerinin ve elektrik polarizasyonunun ayrılması ile sonuçlanır. Kuvars kristal elektriksel, mekanik ve kimyasal özellikleri nedeni ile ticari piezoelektrik malzemelerin en kullanışlısıdır (75) .



Şekil 2.6. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi



Şekil 2.7. Kuvars kristal

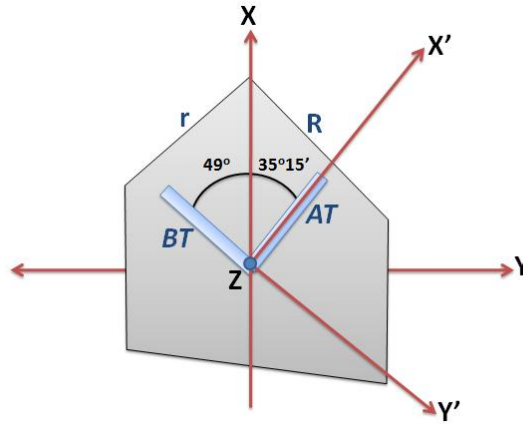
Kuvars kristal (Şekil 2.7), kimyasal doğasına, şekline, boyutuna ve kütlesine bağlı olan doğal bir titreşim frekansına sahiptir. Kristalin kırılmasının rezonans frekansı üzerinde bir etkisi vardır (76) . Kuvars kristali, karşılıklı olarak mekanik enerjiyi elektrik enerjisine dönüştürme yeteneğine sahiptir. Bir piezoelektrik kuvars kristal rezona törü, kuvarsin tek kristalinden kesilmiş bir parçadır. Kuvars kristal birimine periyodik bir voltaj uygulandığında kuvars kristal var olan voltajın

frekansında titreşim yaratabilir. QCM temel olarak bir frekans sayacı, gerilim kaynağı ve bir osilatör devreden oluşur. Temel rezonans frekansları ağırlıklı olarak 5-30 MHz aralığındaki kuvars plakalar QCM'in temel bileşenidir (77) . İki metal elektrot arasına sandviç edilmiş bu kuvars plakalar ters yönde sıyırma modu (TSM) rezonatörler olarak adlandırılır (78) . Metal elektrotlar altın, gümüş, alüminyum veya nikel olabilir. Piezoelektrik uygulamalarında kullanılan kristaller genellikle 10-16 mm boyutlarında, yaklaşık 0.15 mm kalınlığında disk, kare veya dikdörtgen şeklindedir. Rezonans frekansları 5, 9 veya 10 MHz olan kuvars kristaller tercih edilir (Şekil 2.8) (79) .



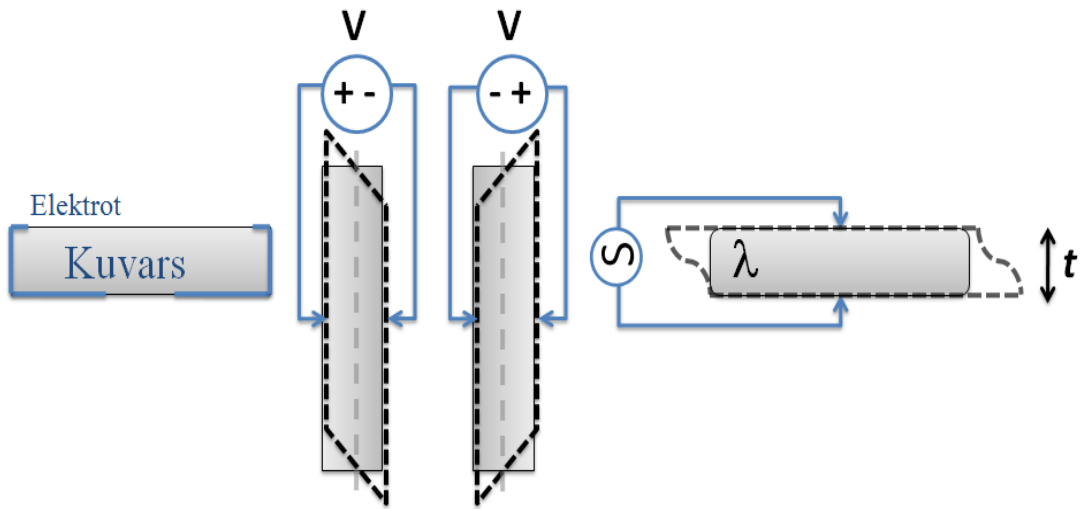
**Şekil 2.8.** QCM sensör yüzeyinin görüntüsü

Piezoelektrik dedektör özelliğinin sağlanması için kuvars kristaller belli bir açıyla kesilir (Şekil 2.9). Kristal yapının karakteristik düzlemi ile kesme tabakasının arasındaki açı AT ve BT kesmelerde sırasıyla  $35^{\circ}15'$  ve  $-49^{\circ}00'$  dir (80) . Kristallografik eksene bağlı olan kuvars kristal düzleminin yönelimindeki küçük bir değişiklik, rezonans türünü değiştirmez. Bununla birlikte kristallografik yönelim ve rezonans frekansı ısı ve gerilimin etkisine karşı aşırı duyarlıdır (81) . Bundan dolayı bu oryantasyonda kesilirler. Piezoelektrik uygulamalarında genellikle AT-kesme kristaller kullanılır. Standart AT-kesimli kuvars kristalinin avantajı oda sıcaklığı civarındaki sıcaklıklarda neredeyse sıfır frekans değişimine sahip olmasıdır. Bu oda sıcaklığında işlem yapılabilmesi için rezonatör gerektiren uygulamalar için oldukça fazla tercih edilen bir özelliktir.

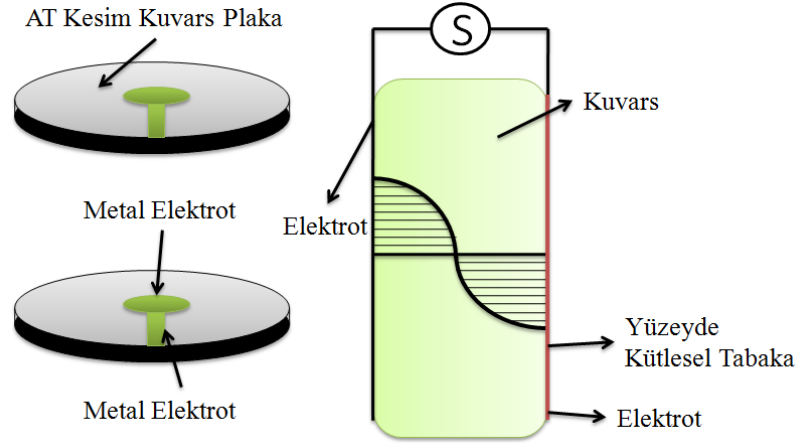


**Şekil 2.9.** AT-BT kesim kuvars kristal düzlemi

Kuvars kristal mikroterazi piezoelektrik etkiye sahip özel biçimde kesilmiş kristal rezonatörler (doğal ya da sentetik kuvars kristalden belli açıyla kesilmiş parça) içerir (Şekil 2.10). Alternatif bir elektrik alan uygulaması kristal yığın yapısında mekanik strese yol açar ve kuvars kristalin iki yüzeyi birbirine paralel yönlere hareket eder. Salınan elektrik alan kristal boyunca yayılan akustik bir dalga oluşturur ve rezonatörün kalınlığının akustik dalga boyunun yarım katları olması halinde minimum dirençle karşılaşırlar. Oluşan akustik dalga kristal yüzeyine dik yönde yayılır (Şekil 2.11) (82,83) .



**Şekil 2.10.** Kayma deformasyonu (Yüzey hareketi)



**Şekil 2.11.** Akustik dalga yayılma modu

QCM özel bir biçimde kesilmiş kuvars kristaller içerir. Bu kuvars kristal piezoelektrik etkiye sahiptir. QCM aparatları genellikle kuvars elektrot, osilatör ve PC yüzeyler arası frekans sayıcıdır. Alternatif, yüksek akımlı bir elektrik alan uygulanmasıyla, QCM mekanik rezonans modunda salınım yapar. Kütle hassasiyeti kristalin toplam kütlesi üzerindeki osilasyon frekansına bağlı olarak ortaya çıkar. Çözelti ile temas eden rezonatör (bu genellikle kuvars kristaldir) oldukça kararlı sinyal veren bir elektronik devreye bağlıdır. Rezonatör üzerindeki herhangi bir değişiklik osilasyon frekansında ani bir değişime neden olur. Elektrot üzerindeki kütle birikiminin neden olduğu frekans değişimi Sauerbrey eşitliğinden elde edilir.

$$\Delta f_m = - \frac{f_o^2}{F_q \rho_q} m_s = - \frac{f_o^2}{F_q \rho_q} \frac{\Delta m_s}{A_{el}} \quad (2.1)$$

Eşitlik 2.1 sadece rezonatör üzerinde biriken ince katı tabakalar için geçerlidir. Başlangıçta, QCM ölçümleri katı faz ölçümler için kullanılmıştır. Fakat uygun salınım (osilatör) devrelerinin geliştirilmesiyle sıvı fazda da ölçümler yapmak mümkün hale gelmiştir (84) . Sıvının yoğunluğu ( $\rho_1$ ), viskozitesi ( $\eta_1$ ) ve kuvars kristal rezonatörün frekansı arasındaki ilişkiyi açıklayan eşitlik (2.2) Kanazawa ve Gordon tarafından türetilmiştir (85) .

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{P_1 \eta_1}{\pi P q \mu q}} \quad (2.2)$$

İki tabakalı bir sistemde frekans değişimi, tüm değişimlerin toplanması ile eşitlik 2.3 yardımıyla hesaplanır.

$$\Delta f = \Delta f_m + \Delta f_1 = -f_0^2 \left( \frac{\Delta m_s}{F_q \rho_q A_{el}} + \sqrt{\frac{P_1 \eta_1}{f_0 \pi P q \mu q}} \right) \quad (2.3)$$

$f_0$  (Hz), rezonans frekansı;

$F_q$ , ( $F_q = 1/4 f_0 d_q$ ) (Hz cm<sup>2</sup>/ng), kristalin frekans sabiti;

$\rho_q$  (g/cm<sup>3</sup>), yoğunluğu;

$A_{el}$  (mm<sup>2</sup>), kristal rezonatörün elektrot boyutu;

$q_1$  (g/cm<sup>3</sup>), sıvının yoğunluğu;

$\eta_1$  (kg/m/s), sıvının viskozitesini ifade etmektedir.

QCM'in kimyadaki uygulamaları oldukça geniştir. Örneğin toksik gaz sensörü olarak, modifiye metal yüzeylerinde, antijen/antibadi etkileşimleriyle spesifik molekül tayinlerinde kullanımı son zamanlarda oldukça popüler hale gelmiştir. QCM uygulamaları içinde kütlelerin yanı sıra yoğunluk, elastiklik, viskozite ve kiralite tayinleri de yer alır. Genellikle sıvı ortamda gerçekleştirilen QCM sensör uygulamalarında, analiz edilecek sıvının yoğunluğu ve viskozitesi titreşen kristalin rezonant davranışını etkiler ve böylelikle sensör tarafından ölçüm gerçekleştirilmiş olur (86) . Cihazların en önemli özelliği çalışmalarda bir elektrokimyasal reaksiyon süresince yüksek kütle hassasiyeti göstermesidir. Elektrokimyasal kuvars kristal mikroterazi türleri, araştırmacılara metal elektrodun üst kısmına potansiyel uygulamasına izin verir. Böylelikle bir elektrokimyasal hücre oluşturulur ve elektrokimyasal reaksiyonların incelenmesi ve elektron transfer süreçlerinin

incelenmesi mümkün olur. Bu tekniğin kullanımının oldukça kolay olması ve temel ekipmanlarının pahalı olmaması diğer avantajlarından (87) . Piezoelektrik kristallerin analitik alanda ilk uygulaması 1964 yılında King tarafından geliştirilen ticari piezoelektrik dedektörü olmuştur (88) . King'in piezoelektrik dedektörü ile 0.1 ppm'e kadar nem tayin edilebilmiştir. Sonraki yıllarda birçok benzer sensör sistemleri geliştirilmiştir. Enzimler ve antibadiler gibi biyolojik kaplamaların kullanımı ilk piezoelektrik (Pz) sensör gelişimden sonra ortaya çıkmıştır. İlk Pz immüno-sensör 1972 yılında Shons ve diğ. tarafından geliştirilmiştir (89) . Sensör yüzeyine immobilize edilmiş 29 antibadilerin kullanıldığı QCM immüno-sensörler, HIV virüsünün de dahil olduğu pek çok analitin tayini için kullanılmıştır (90-95) . Antibadi immobilizasyonu yanında Protein-A kaplı kristal yüzeylerde pestisitlerin, bakterilerin, virüslerin ve diğer pek çok analitin tayininde kullanılmıştır (80) . Metakrilat temelli polimerlerin kaplanması ile geliştirilen sensörler insan IgM ve  $\alpha$ -fetoprotein tayininde kullanılmıştır (96) . Hibridizasyon sonucunda kütle artışını algılayan piezoelektrik DNA sensörü ilk olarak Fawcett ve diğ. tarafından geliştirilmiştir (97) . Bu bağlamda, ilk rapor edilmesini takip eden 50 yıllık zaman sürecinde QCM temelli sensörler araştırmacıların gözde konularından biri olmuştur. Bu kapsamda; çok sayıda analit için farklı yaklaşımlar uygulanarak sensörler geliştirilmiş ve konuyla ilgili çalışmalar artarak devam etmektedir. Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) sahip olduğu yüksek seçicilik, kimyasal ve mekanik kararlılıkların yanında kolay üretilmeleri MIP temelli QCM sensörleri klinik teşhis (98,99) , çevresel izleme (100) ve enantiyomerik ayırma uygulamalarında (101) yaygın olarak kullanılmalarına neden olmaktadır. Şener ve diğ. lizozimin eş zamanlı tayini için MIP temelli QCM nanosensörler hazırlamışlardır. Vucutta lizozim derişiminin artması bazı hastalıkların (menenjit, lösemi ve bazı böbrek hastalıkları) teşhisine olanak sağlamaktadır. Tayin limiti 1.2 ng/mL olarak bulunmuştur. Aynı zamanda sensörün etkinliği birçok proteini barındıran yumurta akıyla test edilmiştir (31) . DNA sekansındaki tek bazın değişiminin pek çok kanser türünün çıkış noktası olduğu rapor edilmiştir. Bu bağlamda, Say ve diğ. timin tayini için MIP temelli QCM sensörler hazırlamışlardır (102) . Benzen, mineral tozlar gibi çevresel kirleticiler veya sigara kullanımının, kanser ve kemoterapinin insanlarda 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşumuna sebep olduğu rapor edilmiştir. 8-OHdG gibi



yükseltgenmiş bazlar oksidatif DNA hasarları için biyoişaret olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla Say ve diğ. 8-OHdG tayini için MIP temelli QCM sensörler hazırlamışlardır (102) .

### 2.5.2. Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal dönüştürücülerden oluşmuş biyomimetik sensörler ve moleküler baskılanmış polimerler gitgide dikkat çeken ve daha sık kullanılan sensörler haline gelmiştir (103) . Elektrokimyasal sensörlerle çevresel, klinik, biyolojik birçok analitin yüksek seçicilikle analizi mümkündür. Hassas, ucuz, elektrotların sensör sistemine uygulaması kolay, birçok analitin analiz edilebilir olması gibi nedenlerden ötürü tercih edilen sensörlerdendir. Elektrokimyasal sensörler tıbbi ve klinik, çevresel ve endüstriyel analizlerde önemli rol oynamaktadır. Yapılan elektrokimyasal ölçümler amperometrik, voltametrik, potansiyometrik ve kondüktometrik olabilir (104-109) . Bu çeşitli yollardan birçok farklı uygulamada yararlanıldığından moleküler baskılanmış polimerler kullanılarak sensör üretiminde elektrokimyasal dönüştürücüler önemli hale gelmiştir. Triazin herbisitler, endokrin bozucu kimyasallardan bisfenol A (BPA) gibi önemli toksik bileşiklerin MIP'ler kullanılarak yapılan elektrokimyasal sensörlerle tespiti mümkün hale gelmiştir (103) .

Elektrokimyasal sentezin MIP teknolojisine uygulanması dikkat çeken bir yöntemdir. Bu yöntemden ilk defa 1995 yılında nitrat seçici potansiyometrik sensör yapımında faydalanılmıştır (103) . Pirolün,  $\text{NaNO}_3$  varlığında polimerizasyonu ile nitrat iyonlarına özgül boşluklar içeren polimer film oluşturulmuştur. Bu moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensörün nitrata, perklorat ve iyodüre göre dört kat daha fazla seçici olduğu tespit edilmiştir (110) . Yapılan bir çalışmayla atrazin tayini için elektrokimyasal sensör yapılmıştır. Atrazin sensör çipi, altın yüzeyde metakrilik asit ve EDMA varlığında doğrudan polimerizasyonla sağlanmıştır. MIP yapımında LiCl elektrolit olarak kullanılarak atrazinin elektrokimyasal indirgenmesi sağlanmıştır. Tayin aralığının 1 ila 10  $\mu\text{M}$  arası atrazin olduğu tesbit edilmiştir (103) . Atrazinle ilgili yapılan başka bir çalışmada ise atrazin baskılanmış ince polimer filmleri hazırlanmış ve 50 nM' a kadar düşük miktarda atrazin tespit edilebildiği bildirilmiştir (111) .

Elektrokimyasal sensörlerde kullanılan iletken polimerlerin elektrokimyasal tekniklerle elde edilmesi kolay olmasına rağmen polimerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri polimerizasyonda kullanılan çözücü, destek elektrolit, elektrot malzemesi ve elektropolimerizasyon potansiyeline bağlı olarak değişir.

## 2.6. Voltametri

Elektroanalitik yöntemlerde, elektrot-çözelti sistemine bir elektriksel etki yapılır. Yapılan bu elektriksel etkiye sistemin verdiği cevap ölçülür. Elektroanalitik yöntemler elektrot tepkimelerinin mekanizmalarının belirlenmesi, elektrokimyasal ve kimyasal tepkimelerin kinetiklerinin ve adsorpsiyon olaylarının incelenmesi, denge sabitlerinin ve difüzyon katsayısının bulunması, nicel ve nitel analizler gibi kimyanın pek çok alanında kullanılmaktadır.

Elektroanalitik yöntemler genel olarak ikiye ayrılır. İlki net akımın sıfır olduğu denge durumundaki durağan yöntemler; ikincisi ise denge durumundan uzakta net akımın gözlemlendiği dinamik yöntemlerdir. Elektroanalitik tekniklerin büyük bir kısmını net akımın sıfır olmadığı dinamik yöntemler oluşturur. Bunlar da potansiyel kontrollü, akım kontrollü ya da yük kontrollü yöntemlerdir.

Voltametri potansiyel kontrollü bir teknik olup çalışma (indikatör) elektrodunun polarize olduğu şartlarda potansiyel ve akım parametreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen tekniktir. Burada oluşan akım potansiyelin bir fonksiyonudur ve analitle ilgili bilgi verir. Voltametricde üçlü elektrot sisteminden faydalanılır.

**Referans elektrot;** potansiyeli deney süresince sabittir. Genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrotlar kullanılır.

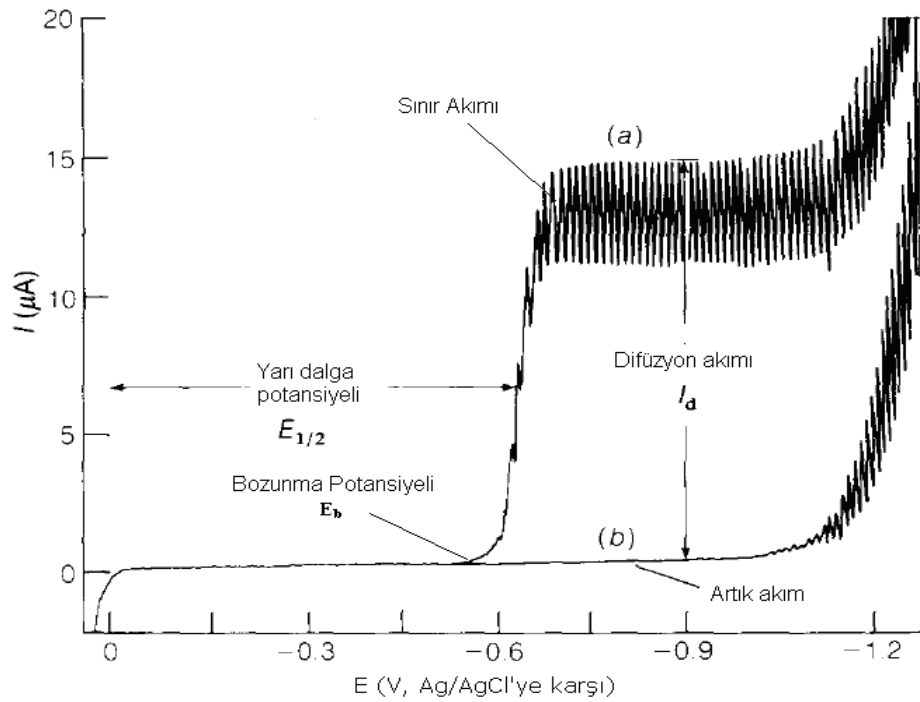
**Çalışma (indikatör) elektrot;** polarize edilebilen, zamanla potansiyeli değiştirilen elektrotlardır. Civa, platin, altın, paladyum, karbon elektrot (grafit, karbon pasta elektrot, camsı karbon, karbon elektrot) gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır.

**Karşı (yardımcı) elektrot;** elektriğin güç kaynağından çözeltinin içinden geçerek çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan elektrotlardır. Karşı elektrot olarak ise genellikle Pt tel kullanılır.

Bu sistemde, potansiyel, çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına uygulanır ve çalışma elektrodu ile karşı elektrot arasındaki akım ölçülür. Akım,

çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşur. Katodik ve anodik olmak üzere iki tür akım oluşur. Katodik akım indirgenmeden dolayı oluşan akıma, anodik akım ise yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma denir.

Bir voltametrik yöntemde çalışma elektrodu damlayan civa elektrodu (DCE) ise yöntem polarografi adını alır. Damlayan civa elektrodu 0,05 - 0,08 mm iç çaplı bir kılcal cam borudan damlayan civadan oluşur. Şekil 2.12'de normal polarografide gözlenen akım –potansiyel eğrisi gösterilmiştir.

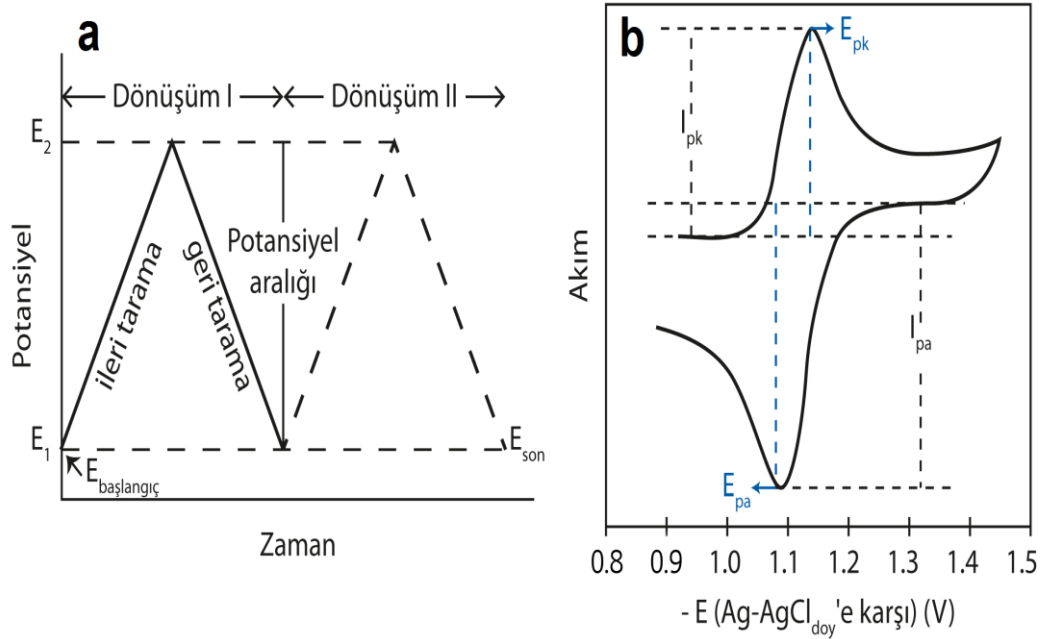


**Şekil 2.12.** Doğru akım polarogramları (a) Elektroaktif maddenin polarogramı, (b) destek elektrolit polarogramı

Yukarıdaki polaragramda görülen **sınır akımı** belli bir potansiyel değerinden sonra akımın sabit kaldığı bir değere ulaştığı akımdır. Elektrot üzerinde henüz reaksiyon olmadığı zaman küçük de olsa gözlenen akıma **artık akım** denir. Sınır akımı ile artık akım arasındaki yükseklik ise dalga yüksekliğidir. Elektroaktif maddenin derişimi arttıkça dalga yüksekliği de doğrusal olarak arttığından polarografi kantitatif tayinlerde kullanılabilir.

### 2.6.1. Dönüşümlü Voltametri

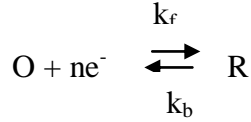
Bu teknik elektrokimyasal teknikler içinde en yaygın kullanılan tekniktir. Dönüşümlü voltametri (CV) yönteminde çalışma elektroduna uygulanan potansiyel kontrol edilir ve hücreden küçük bir akım geçer. Bu nedenle CV, potansiyel kontrollü sabit elektrot voltametri yöntemidir. Dönüşümlü voltametri  $E_p$  akımın maksimum olduğu noktadaki pik potansiyelidir. Bu teknikte *tarama hızı* ( $v$ ) olarak adlandırılan potansiyelin zamanla doğrusal olarak değişimi uygulanır. Belli bir potansiyelden sonra ilk tarama yönünde tarama yapılır. Elektrot mekanizmalarının incelenmesinde, adsorpsiyon olayının araştırılmasında, maddelerin miktar tayinlerinin yapılmasında ve kinetik çalışmalarda kare dalga voltametri ve polarografisi, sıyırma voltametri, kronoamperometri teknikleri gibi CV tekniği de sıklıkla kullanılır. Uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği Şekil 2.13' de görülmektedir. Potansiyel taraması bir  $E_1$  başlangıç potansiyeli ve  $E_2$  potansiyeli arasında yapılırsa yöntem *doğrusal taramalı voltametri* (LSV) adını alır. LSV analitik çalışmalar için uygun bir metottur.  $E_2$  potansiyeline ulaşıldıktan sonra aynı tarama hızıyla ilk tarama yönüne göre ters yönde tarama yapılırsa yöntemin adı dönüşümlü voltametri olur.



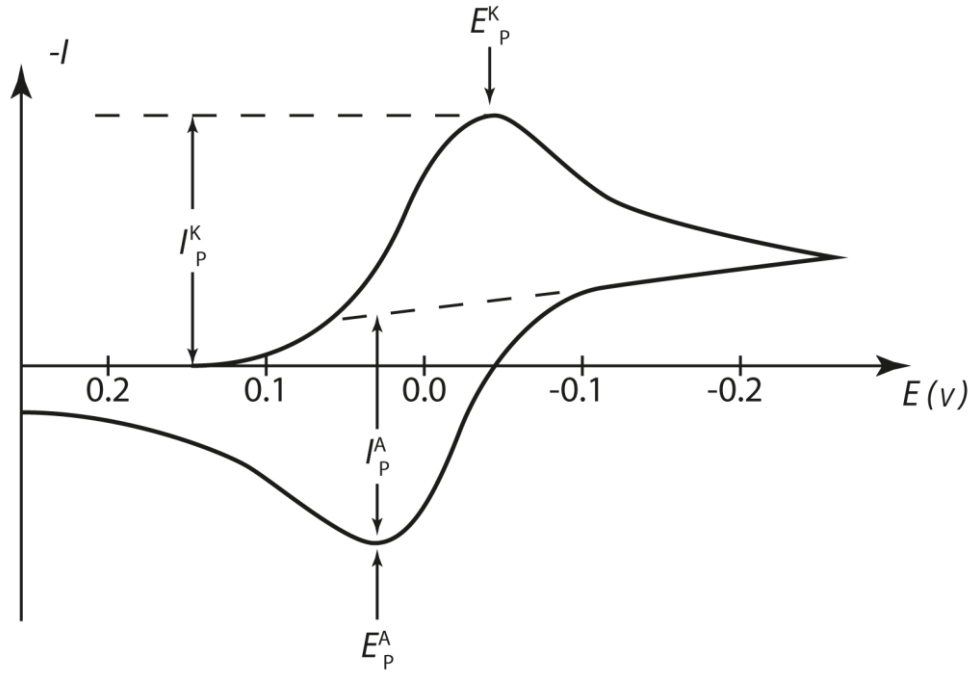
**Şekil 2.13.** Doğrusal taramalı (a) ve dönüşümlü voltametri tekniklerinde (b) potansiyel taramasının zamanla değişimi

Tersinir Reaksiyonların Dönüştürücü Voltamogramı

Elektrot reaksiyonu,



şeklinde olduğu durumlarda başlangıçta çözeltide yalnızca O maddesi bulunduğu varsayılır. Eğer gerçekleşen tek kimyasal reaksiyon, elektron aktarımı iseve elektrot yüzeyinde adsorpsiyon olayı meydana gelmiyor ise  $i - E$  grafiği pik şeklinde gözlenir. Pik yüksekliği tarama hızı arttıkça artar. Potansiyel taraması geriye doğru yapıldığında tarama hızlı ise elektrot yüzeyinde yeteri kadar R bulunduğundan,  $E^\circ$  değerinden itibaren daha pozitif potansiyellerde R yükseltgenmeye başlayacaktır. R yükseltgenmeye başlayıp ters taramada anodik pik oluşacaktır. Bu sırada  $E^\circ$  değerine kadar O indirgenmeye yani R oluşmaya devam edecektir. Ters taramada potansiyel pozitifleştikçe Nernst eşitliğine göre R yüzey derişimi azalacak ve yeteri kadar pozitif değerlerde sıfıra gidecektir. Ters taramada potansiyel pozitifleştikçe Nernst eşitliğine göre R yüzey derişimi azalır ve yeteri kadar pozitif değerlerde sıfıra gider. Deney sırasında yüzeyde oluşan R çözeltiliye doğru difüzlenir. Bu yüzden ters tarama akımı katodik akımdan biraz daha düşük olur. Bundan dolayı ters pik akımı (anodik akım) katodik akımdan biraz daha düşük olur.



Şekil 2.14. Tersinir bir sisteme ait CV voltamogramı

Şekil 2.14'de verilen tersinir bir  $O + ne^- \leftrightarrow R$  reaksiyonunun dönüştümlü voltamogramı aşağıdaki gibidir. Tersinir sistemlerde bütün potansiyellerde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyük olduğu için elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerlidir.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[R]}{[O]} \quad (2.4)$$

Tersinir bir elektrot reaksiyonunun pik akımı ise 25°C sıcaklıkta Randles – Sevcik eşitliği ile gösterilir.

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.5)$$

$i_p$ : Pik akımı, Amper

$D_0$ : O türünün difüzyon katsayısı,  $cm^2/s$

$v$ : Tarama hızı, V/s

$C_0$ : O türünün ana çözelti derişimi,  $mol/cm^3$

n: Aktarılan elektron sayısı

CV verileri ile bir reaksiyonun tersinirlik testi yapılabilir. Eğer  $i_p - v^{1/2}$  grafiği doğrusal ise ve orjinden geçerse sistem tersinirdir. Buna ilaveten bir sistemin tersinir olup olmadığı şu özelliklerin bulunmasıyla tespit edilir.

1.  $i_p - v^{1/2}$  grafiği doğrusal olmalıdır.
2.  $E_p^k - E_p^a = 59/n$  mV veya  $E_p - E_{p/2} = 57/n$  mV olmalıdır.
3.  $E_p$ , tarama hızı ile değişmemelidir.
4.  $i_p^a/i_p^k = 1$  olmalıdır.
5.  $E_p$ 'ten daha negatif potansiyellerde  $i^2$ , t ile orantılı olmalıdır (112) .

$i_p$  : Akım, Amper

v: Tarama hızı, V/s

$E_p^k$ : Katodik pik potansiyeli, mV

$E_p^a$ : Anodik pik potansiyeli, mV

$i_p^a$ : Anodik pik akımı, Amper

$i_p^k$ : Katodik pik akımı, Amper

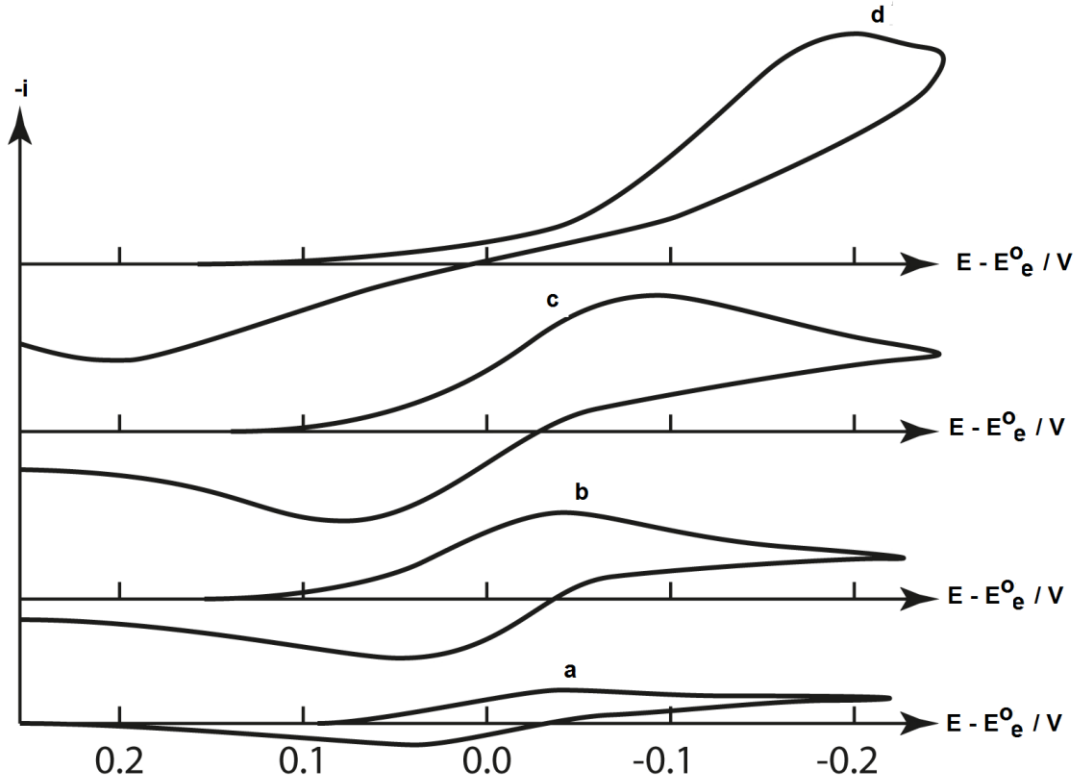
t: Zaman

### Tersinmez Reaksiyonların Dönüşümlü Voltamogramı

Tersinmez sistemlerde elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerli değildir. Bu durumda CV voltamogramı tersinir durumdan farklıdır. Tamamen tersinmez bir sistemde genellikle ters tarama piki (anodik pik) gözlenmez. Ancak dikkat edilmesi gereken bir husus vardır ki o da; anodik pikin gözlenmeyişi mutlaka elektron aktarım basamağının tersinmez olduğunu göstermez. Şöyle ki elektron basamağını takip eden çok hızlı bir kimyasal reaksiyonda oluşan ürün hızlı bir şekilde başka maddeye dönüşür. Bu da ters taramada yükseltgenme gözlenmemesine neden olabilir.

Tersinmez durumlarda tarama hızı çok düşük olduğunda elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından daha yüksek olur. Bu da sistemin tersinir gibi gözlenmesine neden olur. Tarama hızı arttıkça kütle aktarım hızı elektron aktarım hızı ile aynı

seviyeye gelir. Bu durumda tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik potansiyelleri birbirinden uzaklaşır (Şekil 2.15). Tersinir durumda  $E_p^k$ , tarama hızının bir fonksiyonu değildir. Ancak tersinmez durumda  $E_p^k$ ,  $v$  ile değişir. Tersinmez elektron aktarım reaksiyonlarında standart hız sabiti, tersinir reaksiyonlardakine göre daha küçüktür.



**Şekil 2.15.** Katodik ve anodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması.  $v$ ; (a) 0.13 V/s (b) 1.3 V/s; (c) 4.0 V/s; (d) 13.0 V/s

Dönüşümlü voltametri ile bir reaksiyonun tersinmez olduğunu tespit etmek için şu özelliklerden faydalanılır (113) .

1. Anodik pik gözlenmez.
2.  $i_p^k$ , tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olarak değişir.
3.  $E_p^k$  kayması tarama hızındaki 10 kat artmada  $30/\alpha_c n_\alpha$  kadardır.
4.  $|E_p - E_{p/2}| = 48/(\alpha_c n_\alpha)$  mV

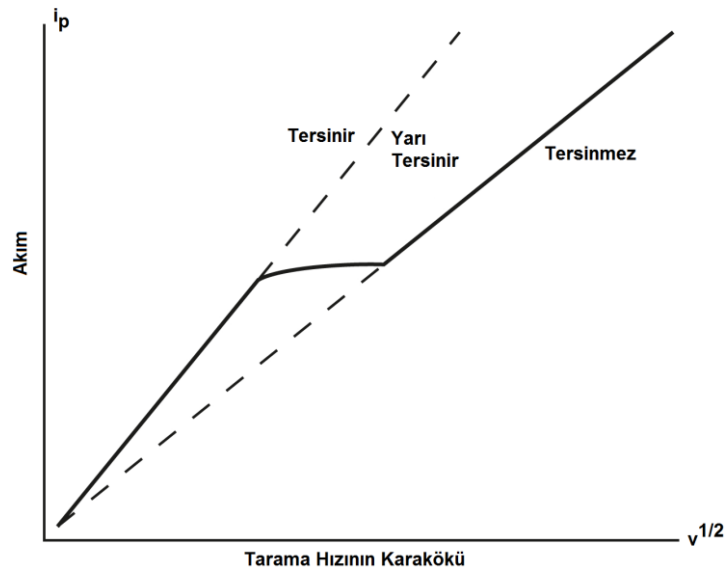
$\alpha_c$ : Elektron transfer katsayısı



$n_a$ : Aktarılan elektron sayısı

### Yarı Tersinir Reaksiyonların Dönüşümlü Voltamogramı

Yarı tersinir reaksiyonlarda akım hem difüzyon hızı hem de elektron aktarım hızı ile birlikte kontrol edilir. Tersinir, yarı tersinir ve tersinmez durumlar için akım, tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirilirse Şekil 2.16'daki gibi bir grafik elde edilir.



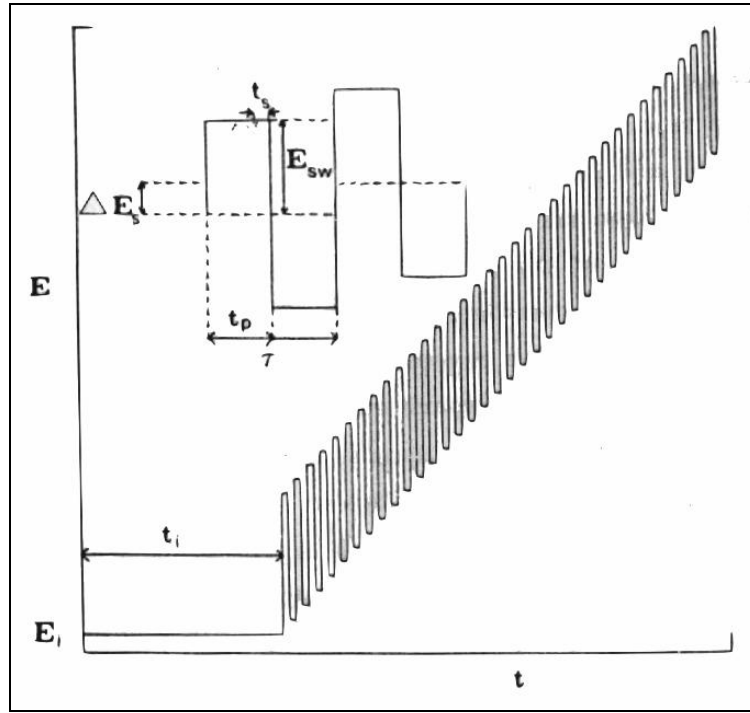
**Şekil 2.16.** Dönüşümlü voltametriye ait pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi

Tarama hızındaki artış ile sistemin tersinir durumdan tersinmez duruma geçişi görülmektedir. Dönüşümlü voltametriye ait bir sistemin yarı tersinir olup olmadığı şu özelliklerin bulunmasıyla tespit edilir (113) .

1.  $i_p$ ,  $v^{1/2}$  ile artar ancak doğrusal değildir.
2.  $E_p^k$ , tarama hızı ile değişir bu değişim genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.
3.  $i_p^a/i_p^k = 1$  olmalıdır. ( $\alpha = 0.5$  ise)
4.  $E_p^k - E_p^a$  farkı düşük tarama hızlarında  $59/n$ 'e yaklaşmalıdır.

### 2.6.2. Kare Dalga Voltametrisi

SWV hem teorik hem de cihaz bakımından Barker tarafından geliştirilmiştir. Hızlı ve duyarlı bir yöntem olan kare dalga voltametrisinin sabit elektrotlarda potansiyel-zaman dalga şekli Şekil 2.17’de görülmektedir (114,115) .

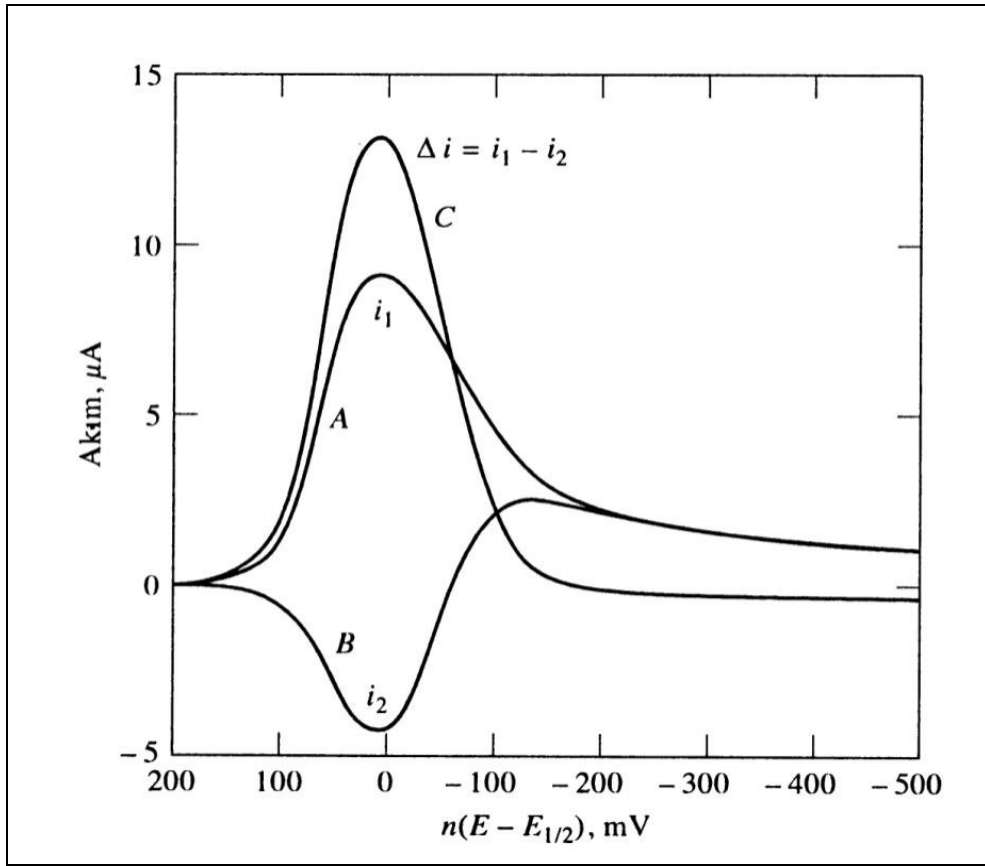


**Şekil 2.17.** Kare dalga voltametrisi için potansiyel-zaman dalga şekli ve akım ölçümü;  $\Delta E_s$  : adım yüksekliği,  $E_{sw}$  : puls genişliği,  $\tau$  : periyot

Şekilden de görüldüğü üzere dalga şekli, simetrik kare dalgalardan oluşan merdiven görünüşündedir. Potansiyel-zaman dalga şeklini oluşturan bu simetrik kare dalgalardan, bir kare dalganın tamamlanma süresi olan periyot,  $\tau$  ile gösterilir ve yaklaşık 5 ms civarındadır. Birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkı *basamaklı adım yüksekliği (sinyalin potansiyel basamağı)* dir ve  $\Delta E_s$  ile gösterilir. Bu da genelde  $\Delta E_s$  10 mV'dur. Herbir dalganın alt ve üst noktaları arasındaki farkın yarısına *kare dalga genişliği* ( $E_{sw}$ ) denir. Puls genişliği ( $t_p$ ) ise  $\tau/2$ 'ye eşittir. Genellikle periyot yerine  $1/\tau$ 'a eşit olan frekans ( $f$ ) kullanılır. Frekansın artması ve buna bağlı olarak periyodun azalması ile kare dalga pik akımı ve hassasiyet artar. Kare dalga voltametrisinde deneysel parametrelerin genellikle seçildiği aralıklar; frekans  $10 \leq f \leq 1000$  Hz ve periyod  $1 \leq \tau \leq 100$  ms şeklindedir.

Basamaklı adım yüksekliği ise aktarılan elektron sayısına ( $n$ ) bağlı olarak  $\Delta E_s = 10/n$  mV eşitliğinden bulunarak kullanılır.  $E_{sw}$  ise genelde  $50/n$  mV'dur.

Kare dalga voltametrisinde akım ölçümleri ileri ve geri pulsların sonuna doğru  $t_s$  kadar bir zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım  $i_1$ , geri puls için ölçülen akım  $i_2$  olmak üzere her bir kare dalganın net akımı  $\Delta i = i_1 - i_2$ 'ye eşittir. Bu net akım ( $\Delta i$ ) *ileri fark akımı* olarak adlandırılır.  $\Delta i$  farkı potansiyele karşı grafiğe geçirildiğinde voltamogram tek pik şeklinde elde edilir (Şekil 2.18).



**Şekil 2.18.** Tersinir bir reaksiyon için uyarma sinyaline akım cevabı, A, ( $i_1$ ) ileri akım; B, ( $i_2$ ) ters akım; C, ( $i_1 - i_2$ ) akım farkı

Oluşan pik potansiyeli de polarografik yarı dalga potansiyeline karşılık gelir. Kare dalga voltametrisinde ölçüm son derece hızlı yapılır. Tarama hızı, frekans ve periyot ile adım yüksekliğine bağlı olarak aşağıdaki gibi belirlenir. Belirlenen bu tarama hızına etkin tarama hızı (ETH) denir.

$$ETH = f \times \Delta E_s = 1/\tau \times \Delta E_s \quad (2.6)$$

$\Delta E_r$  kadar bir potansiyel aralığında tarama yapmak için sadece  $\tau$  ( $\Delta E_r/\Delta E_s$ ) kadar bir zaman gereklidir. Uygun frekansların seçimi ile deney süreleri çok azaltılabilir. Örneğin  $n = 1$  iken  $\Delta E_s = 10$  mV ve  $f = 200$  Hz ( $\tau = 1/200$ ) ise,  $ETH = 2$  V/s'dir. 500 mV'luk ( $\Delta E_s$ ) bir potansiyel aralığını tarayabilmek için gerekli olan süre sadece 0.25 s'dir. Bu da birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğinin artırılmasını mümkün kılar. Bu yöntemin tayin sınırları  $10^{-7}$  ile  $10^{-8}$  M arasındadır. Bu nedenle bu teknik en hassas ve hızlı elektroanalitik teknikler arasındadır. Bundan dolayı SWV hızlı taramalı teknik olarak tanımlanır.

## 2.7. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal impedans ölçümleri, frekans değişimlerine bağlı olarak yapıldığı için elektrokimyasal impedans spektroskopisi adını almıştır. Bu teknik, elektrokimyasal sistemlerin incelenmesinde çok kullanılan güçlü bir tekniktir. Hassas bir teknik olmasının yanı sıra, modifiye yüzeydeki moleküllerin zarar görmeden karakterize edilmesini sağlar. Çünkü uygulanan potansiyelin genliği oldukça düşüktür. CV tekniğinde oldukça büyük bir potansiyel aralığı kullanıldığı için yüzeyin hasar görme riski vardır. Kullanım alanları;

- Korozyon çalışmaları
- Film yüzeylerin karakterizasyonu
- Piller
- Yarı iletken elektrotlar
- Sensörler
- Biyolojik sistemlerin incelenmesi

şeklinde sıralanabilir. Bu tekniğin en önemli avantajı, elektrokimyasal sistemlerin denge halinde incelenmesidir. Voltametrik tekniklerin çoğunda sistemin denge durumu bozulur. Çünkü elektrokimyasal sistemlere bir sinyal gönderilir ve cevabı ölçülür. Ancak EIS'de sisteme gönderilen sinyal düşük genlikli bir potansiyelidir. Uygulanan potansiyel genellikle  $E_0 = 5$  mV civarındadır. Sistemin denge durumu bozulmaz. Uygulanan potansiyel sinüs dalgasıdır. Bu potansiyelde frekans değişimi ile impedans ölçümü yapılır (116) .

$E$ ;  $t$  anındaki potansiyeldir ve  $E_0$  genlik,  $\omega$  açısal frakans (rad/s) ve  $t$  zamanı ifade etmek üzere;

$$E = E_0 \sin \omega t \quad (2.7)$$

şeklinde ifade edilir. Açısal frekans ise;

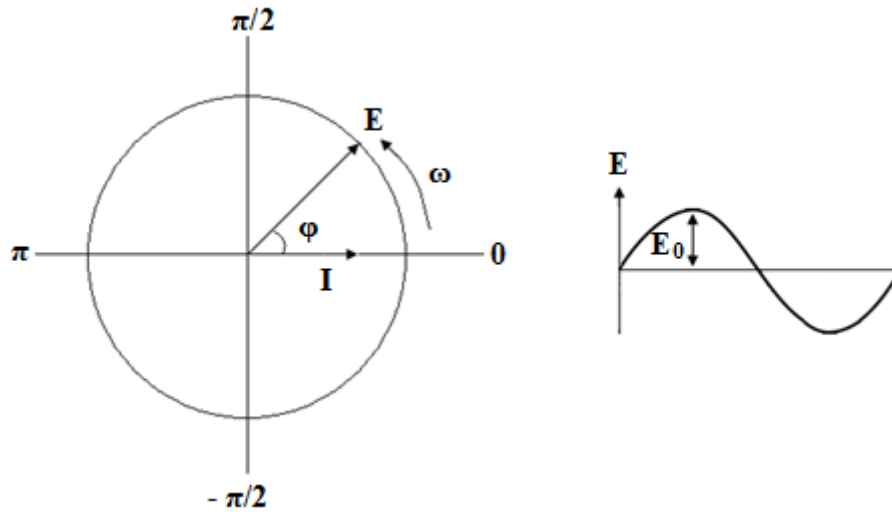
$$\omega = 2\pi f \quad (2.8)$$

şeklinde ifade edilir. Burada  $f$ , frekanstır (Hz). Sinüzoidal potansiyele sistemin verdiği akımın cevabı da sinüs dalgasıdır. Bu dalga potansiyel dalgası ile aynı frekanslıdır. Ancak aralarında  $\varphi$  faz farkı vardır.

$$I = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (2.9)$$

Burada,

$I$ :  $t$  anındaki akım (A);  $I_0$ : akım genliği (A) ve  $\varphi$ : faz kaymasıdır. Sinüs eğrisi ve fazör diyagramı Şekil 2.19'da gösterilmiştir.



Şekil 2.19. Fazör diyagramı ve sinüs eğrisi

E ve I aynı frekanslarda dönen iki ayrı fazördür. Aralarında  $\phi$  kadar açı vardır. I, E'yi  $\phi$  kadar faz farkıyla geriden takip eder. DC devrelerinde Ohm kanunu'na benzer şekilde E/I oranı impedans (Z) olarak adlandırılır. DC devrelerinde bu oran dirençtir. Normal bir direnç (R) için Ohm kanunu ( $R = E/I$ ) geçerlidir. Direnç değeri, uygulanan potansiyel frekansına bağlı değildir. Uygulanan potansiyel ile oluşan akım aynı fazdadır. İmpedans dirençten daha genel bir ifadedir ve frekansa bağlıdır.

## 2.8. Elipsometri

Elipsometri yöntemi, çok hassas optik ölçümlere dayanan, yüzeyi tahrip etmeyen bir yöntemdir. Yüzeyin optik özellikleri hakkında bilgi edinmek için yaklaşık yüz yıldır kullanılmaktadır. Elipsometri genel itibariyle polarize bir dalga vektörünün polarizasyon halinin ölçülmesine dayanan bir tekniktir. Yüzeye polarize bir ışık gönderilir ve ışık demetinin yüzeyden yansması sağlanır. Yüzey ince bir filmle kaplanırsa, film ve substrattan yansıyan ışığın polarizasyonu değişir. Bu özelliği ile elipsometri tekniği, film kalınlığı ve filmin optik özelliklerini incelemede sıkça kullanılır. Elipsometre adı elipsten gelir. Elips polarizasyonu, elektrik alan vektörünün elips yörüngesi boyunca hareketinden kaynaklanır. Elipsometrenin temel bileşenleri, ışık kaynağı, polarizasyonu belirleyen bazı optik bileşenler ve dedektörden oluşur. Son yıllarda görüntüleme tekniği kullanılarak klasik elipsometrelere oranla daha hassas ölçümler almak mümkün olmaktadır. Ölçüm yapılacak bölge, bilgisayar monitöründen çoklu bölgeler halinde seçilerek işaretlenir ve ortalama ölçüm değerleri elde edilebilir.

Gelme düzlemine paralel polarize olan yansıma genliğinin ( $R_p$ ) dik polarize yansıma genliğine ( $R_s$ ) oranlanması ile elipsometrik  $\Psi$  parametresi ifadesi elde edilir.

$$\tan\Psi = R_p/R_s \quad (2.10)$$

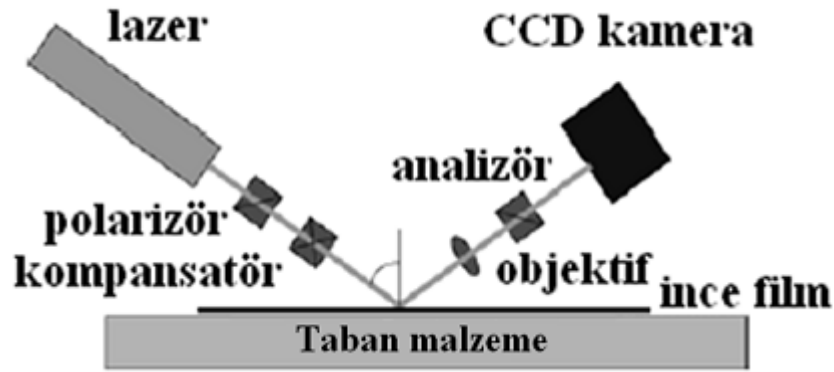
İkinci elipsometrik parametre olan  $\Delta$ ,  $R_p$  ile  $R_s$  arasındaki faz farkı olmak üzere;

$$\Delta = \Delta R_p - \Delta R_s \quad (2.11)$$

$\Delta_p$  ve  $\Delta_s$ ,  $R_p$  ve  $R_s$ 'nin fazlarıdır. Bu parametrelerden yararlanarak elipsometrik oran aşağıdaki şekilde ifade edilir;

$$\rho = (R_p/R_s) e^{i(\Delta_p - \Delta_s)} = \tan\Psi e^{i\Delta} \quad (2.12)$$

Bu denklem filmin optik sabitleri arasındaki ilişkiyi gösterir. Şekil 2.20'de bir elipsometrede bulunan bileşenler görülmektedir.



Şekil 2.20. Elipsometreyi meydana getiren bileşenler

## 2.9. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

AFM katı yüzeylerin atomik boyutta incelenmesini sağlar. Numune raster düzeyinde ince ve hassas bir uç (tip) ile taranır. Tip ile yüzey raster şeklinde taranırken, kuvvete duyarlı ucun bağlı olduğu denge çubuğu ile yüzey arasındaki küçük kuvvet değişimleri, denge çubuğunda küçük oynamalara sebep olur ve bu durum optik sistemlerle algılanır. Bu şekilde yüzeyden topografik bilgiler alınır. AFM'de kullanılan uçlar ve denge sistemi genellikle silisyum veya silisyum oksitten yapılmaktadır.

AFM yüzeylerin birkaç nanometreye kadar görüntülenmesini sağlayabilir. Fakat iyi bir görüntü alabilmek için, yüzey substratının oldukça temiz ve pürüzsüz olması gerekir. Aksi halde substrattan gelen pürüzlülük de film görüntüsü gibi görünür. Filmin görüntüsü iki boyutludur. Bu görüntü üç boyutlu görüntü haline de getirilebilir. Bu şekilde yüzeyin pürüzlülüğü, film tabakasının homojenliği, katmanlı olup olmadığı ve kalınlığı rahatlıkla görülebilir. Bu görüntüyü daha belirgin sağlayabilmek için grid adı verilen mikro-eleklerle gözenekli şekiller oluşturulabilir.

Gözeneğin iç kısmı modifiye edilirken dış kısımları modifiye olmaz. Bu şekilde filmin AFM görüntüsü hakkında bilgiler edinilebilir.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tobramisin (TOB, Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enst)
- Kanamisin-A (KAN-A, Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enst)
- Amikasin (AMIK, Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enst)
- Gentamisin (GEN, Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enst)
- Allil merkaptan ( $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$ , Sigma-Aldrich)
- 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA, Sigma-Aldrich)
- Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, Sigma-Aldrich)
- N,N'-Azobisisobutironitril (AIBN, Sigma-Aldrich)
- Metakriloilamidoglutamik asit (MAGA, Nanoreg Ltd. Şti., Ankara)
- PiroI (Pyr, Sigma-Aldrich)
- Trikloroasetik asit (TCA, Sigma-Aldrich)
- Sodyum klorür (NaCl, Sigma-Aldrich)
- Tetrabütülamonyumtetrafloroborat (TBATFB, Fluka)
- Potasyum ferrisiyanür ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , Sigma-Aldrich)
- Potasyum ferrosiyanür ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , Sigma-Aldrich)
- Ferrosen ( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$ , Sigma-Aldrich)
- Potasyum klorür (KCl, Sigma-Aldrich)
- Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Sigma-Aldrich)
- Amonyum hidroksit ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , Sigma-Aldrich)
- Asetonitril (MeCN, Sigma-Aldrich)
- İzopropil alkol (IPA, Sigma-Aldrich)
- Nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ , Sigma-Aldrich)
- Milli-Q su (Bütün analizlerde bu su kullanılmıştır)

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Voltametik analiz cihazı (BAS 100B/W, ABD)
- QCM cihazı (RQCM, INFICON Acquires Maxtek, ABD)

- FTIR Spektrofometre (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD)
- Elipsometre (Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre Göttingen, ALMANYA)
- Atomik Kuvvet Mikroskopisi (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İNGİLTERE)
- Temas Açık Cihazı (Krüss DSA100, Hamburg, Almanya)
- pH metre (Mettler Toledo MA 235, ABD)
- Hassas terazi (Mettler Toledo AG 285, ABD)
- Ultrasonik banyo (Bandelin, Sonorex, RK 514 BH, ABD)
- Vorteks karıştırıcı (Nüve, NM 110, TÜRKİYE)
- Santrifüj (Nüve, NF 1215, TÜRKİYE)
- Otomatik mikropipet (Biohit 10-100  $\mu$ L ve 100-1000  $\mu$ L, FİNLANDİYA)

### 3.1.3. Kullanılan Cam Malzemeler

- Cam pipet (1-10 mL'lik, Pyrex)
- Balon joje (5-1000 mL'lik, Pyrex)
- Beher (Çeşitli hacimlerde, Pyrex)
- Santrifüj tüpü (Borosilikat cam)
- Havan (Agat)
- Eppendof tüp (Plastik)

### 3.1.4. Analizi Yapılan Numuneler

Bu çalışmada piyasadan temin edilen TOBRADEX<sup>®</sup> ve TOBİ<sup>®</sup> adlı farmasötik preparatlar, gıda numuneleri olarak süt ve yumurta özütlerinin analizleri yapılmıştır.

## 3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

*Stok TOB Çözeltisi (0.001 M):* 9.648 mg standart TOB tartılıp 5 mL su ile çözüldükten sonra yine aynı çözücü ile 10 mL'ye tamamlanmış ve 4°C'da

buzdolabında saklanmıştır. Standart TOB çözeltileri, bu stok çözeltinin istenen derişime fosfat tamponu ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

*0.1 M Fosfat Tamponu:* 9.08 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ayrı ayrı tartılıp su ile çözüldükten sonra bir litreye tamamlanmış ve uygun miktarlarda karıştırılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır.

*1.0 M NaOH Çözeltisi:* 40.0 g NaOH tartılarak su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır. Daha seyreltik NaOH çözeltileri 1.0 M NaOH çözeltisinin su seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

*0.1 M HCl çözeltisi:* Balon joje içerisine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 8.44 mL HCl çözeltisi eklenmiş ve su ile bir litreye tamamlanmıştır.

### **3.3. Kullanılan Malzeme ve Maddelerin Temizliği**

#### **3.3.1. Cam Malzemelerin Temizlenmesi**

Kullanılan cam malzemeler deterjanlı su ile yıkandıktan sonra çeşme suyu ile durulanmıştır. Daha sonra 2 M  $\text{HNO}_3$  çözeltisi içinde en az bir gece bekletilmiş ve tekrar distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

#### **3.3.2. QCM Çipinin Temizlenmesi**

QCM çipinin altın yüzeyi alkali pirana çözeltisi (3:1  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2$ , h/h) ile temizlenmiştir. Alkali pirana çözeltisi altın yüzeyde 20 saniye bekletilmiştir. Sensör, deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutulmuştur.

#### **3.3.3. Elektrokimyasal Hücrenin Temizlenmesi**

Elektrokimyasal hücre de cam malzemeler gibi temizlenmiştir. Analizler arasında ise sırasıyla etanol ve distile su ile yıkamalar yapılmıştır.

### **3.4. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi**

#### **3.4.1. QCM Hücre Düzenegi**

Kristal mikrobalsan miktoterazi sensör çalışmaları RQCM (Maxtek) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Deneyler akış hücresi, bağlantı kanalı, çözeltilerin geçirildiği peristaltik pompa ve yalıtım kabininden oluşan bir sistemde yapılmıştır.

### 3.4.2. Elektrokimyasal Hücre Düzenegi

Voltametrik çalışmalar BAS 100B/W Model cihaz ile yapılmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrodu (GCE), karşıt elektrot olarak platin elektrot kullanılmıştır.

Voltametrik deneylerde hücre içindeki çözünmüş oksijenin çalışma elektrodu üzerinde indirgeneceğinden ortamdaki oksijenin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle hücreye ince, uzun, küçük bir teflon boru daldırılıp hücreden azot gazı geçirilmiştir. Nicel analizlerde hücre içerisindeki çözeltinin buharlaşmasını önlemek için azot gazının hücreye gelmeden önce içerisindeki destek elektrolit çözeltisi bulunan yıkama şişesinden geçirilerek oksijenin yeniden çözelti içerisinde çözünmesi engellenmiştir.

### 3.4.3. QCM Deneylerinin Yapılışı

#### 3.4.3.1. QCM Çipinin Allil Merkaptan ile Modifikasyonu

QCM çipinin altın yüzeyini alil merkaptan ile modifiye etmek için öncelikle çip bölüm 3.3.2'de anlatıldığı gibi temizlenmiştir. Sonra altın yüzeyine vinil gruplarının girmesi için çip 3.0 M allil merkaptan içeren etil alkol/su (4:1, v/v) karışımına daldırılmıştır. Çipin üzerinde kendiliğinden oluşan tek tabaka oluşumu için çip bu çözelti içinde 24 saat bekletilmiştir. Sonrasında çip etil alkol ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur.

#### 3.4.3.2. QCM Çip Yüzeyinde Polimer Hazırlanması

Allil merkaptan ile modifiye edilmiş QCM çipinin üzerinde TOB baskılanmış polimerik filminin oluşumu şu şekilde hazırlanmıştır: Öncelikle 500 µL fosfat tamponunda hazırlanmış  $2.33 \times 10^{-6}$  mol TOB ve  $4.65 \times 10^{-6}$  mol MAGA 2 saat boyunca kompleks (2:1) oluşturmak üzere karıştırılmıştır. 5.0 mg AIBN 1250 µL HEMA içinde çözüldükten sonra ve stok monomer çözeltisi hazırlamak için 500 µL EGDMA ve 200 µL MAGA-TOB kompleksi bu çözeltiliye eklenmiştir. Çözeltiler 15 dakika azot gazından geçirildikten sonra stok monomer çözeltisinden alınan 20 µL çözelti *döner kaplama (spin coating)* tekniği kullanılarak QCM çip yüzeyine damlatılmıştır. QCM çipi döner kaplayıcı'dan alındıktan sonra polimerizasyon UV

ışıyla (100 W, 365 nm) başlatılmıştır. 1 saat sonra polimer kaplı QCM çipi üç kere etil alkolle yıkandıktan sonra azot gazı geçirilerek kurutulmuştur.

#### **3.4.3.3. QCM Çip Yüzeyinden Hedef Molekülün Uzaklaştırılması**

Hedef molekülün polar grupları ve MAGA monomerinin karboksilik asit grupları arasında hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimler bulunmaktadır. Bu etkileşimleri kırmak için desorpsiyon ajanı olarak 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. İlk önce hedef molekülün uzaklaştırılması ısı kontrollü çalkamalı banyo sisteminde gerçekleştirilmiştir. TOB baskılanmış QCM çipi 25 mL desorpsiyon ajanına yerleştirilmiştir. QCM çipi inkübatörde 200 rpm hızında oda sıcaklığında 10 dakika çalkalandıktan sonra QCM çipi ultra saf su ile yıkanmıştır. TOB uzaklaştırılmış QCM çipi azot gazı ile kurutulmuştur.

#### **3.4.3.4. QCM Sensörle Kinetik Analizler**

TOB baskılanmış QCM sensörü hazırlandıktan sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerdeki TOB çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler pH: 7.5 fosfat tamponuyla 0.017 –0.150 nM arasında hazırlanarak QCM sistemine verilmiştir. Yüzeyine TOB baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) polimerik film oluşturulan QCM sensörler, kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. NIP QCM sensörler yukarıda anlatıldığı gibi sentezlenmiş olup kalıp molekül (TOB) ilave edilmemiştir. Bu başlık altında uygulanan deneysel işlem şu şekildedir: QCM sensör yüzeyi deiyonize su (50 mL) ile yıkanmıştır. Daha sonra TOB baskılanmış sensör, fosfat tamponuyla (pH: 7.5) oda sıcaklığında dengelenmiş ve rezonans frekansı ( $f_0$ ) belirlenmiştir. Rezonans frekansının belirlenmesinden sonra QCM sisteminden üç dakika süreyle fosfat tamponu (pH: 7.5) geçirilmiştir. Bu dengeleme basamağının ardından farklı derişimlerdeki TOB çözeltileri teker teker (5 mL, 1.0 mL/dakika akış hızı) sisteme verilmiştir. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 3 saat) sisteme 1.0 M sodyum klorür çözeltisi (5 mL, 1.0 mL/dakika akış hızı) verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, QCM sensör su ve dengeleme tamponu (0.1 M, pH: 7.5 fosfat tamponu) ile tekrar yıkanarak dengelenmiştir. Farklı derişimlerdeki TOB çözeltileri

sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlanmıştır.

### **3.4.4. Elektrokimyasal Deneylerinin Yapılışı**

#### **3.4.4.1. Camsı Karbon Elektrotlarının Temizlenmesi**

Deneyler sırasında kullanılan camsı karbon elektrotlar sırasıyla ince petler üzerine dökülen 0.1  $\mu\text{m}$  and 0.05  $\mu\text{m}$  alumina çözeltileri kullanılarak yüzeyleri temizlenmiştir. Alümina çözeltileriyle muamele edilmiş elektrotlar önce saf su ile iki kez sonra da izopropil alkol/asetonitril 50:50 (h/h) karışımıyla iki kez sonike edilmiştir. Yüzeyde kalmış alumina kalıntıları uzaklaştırıldıktan sonra elektrotlar asetonitril ile son kez yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur.

#### **3.4.4.2. Camsı Karbon Yüzeyinde Polimer Hazırlanması**

Temizlenmiş camsı karbon elektrotlar 60 mM pirol ve 25 mM TOB içeren pH 7.0 fosfat destek elektrolitine daldırıldıktan sonra baskılama işlemi -0.6/+1.8 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında ve 5 tarama sayısında dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak başlatılmıştır. TOB baskılanmış polipirol ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrotu, elektrot yüzeyinde herhangi polimerleşmemiş pirol kalıntılarını uzaklaştırmak için pH 7.0 fosfat destek elektrolitinde 3 dakika sonike edilmiştir.

#### **3.4.4.3. Camsı Karbon Elektrot Yüzeyinden Hedef Molekülün Uzaklaştırılması**

Hedef molekülün polar grupları ve pirol monomerinin azot grupları arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. Bu etkileşimleri kırmak için desorpsiyon ajanı olarak 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. İlk önce hedef molekülün uzaklaşması ısı kontrollü çalkamalı banyo sisteminde gerçekleştirilmiştir. TOB baskılanmış polipirol ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrotu 25 mL desorpsiyon ajanına yerleştirilmiştir. Camsı karbon elektrodu inkübatörde 200 rpm hızında oda sıcaklığında 10 dakika çalkalandıktan sonra elektrot yüzeyi ultra saf su ile yıkanmıştır.

#### **3.4.4.4. Elektrokimyasal Sensörle Kinetik Analizler**

TOB baskılanmış elektrokimyasal sensörün hazırlanmasından sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerdeki TOB çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler pH: 7.0 fosfat tamponuyla 0.5 - 10.0 nM derişimleri arasında hazırlanarak elektrokimyasal sensör sistemine verilmiştir. Elektrokimyasal sensör sistemi; çalışma, karşıt, referans elektrotlardan oluşan hücre sistemi ve hücre sisteminin bağlı olduğu, verilerin okunduğu potansiyostat cihazından oluşmaktadır. Destek elektrolit olarak seçilen pH 7.0, 0.1 M fosfat tamponundan 3.0 mL alınarak elektrokimyasal hücreye konulmuş ve 10 dakika azot gazı geçirilmiştir. Daha sonra belirlenen potansiyelde SWV tekniği kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Hücreye mikropipet yardımıyla  $\mu\text{L}$  düzeyinde standart TOB çözeltisinden eklenmiş ve bir dakika azot gazı geçirildikten sonra artan derişimlerde TOB eklenerek deney tekrarlanmış ve voltamogramlar kaydedilmiştir.

#### **3.5. Geliştirilen Sensörlerin Baskılama Seçiciliğinin Belirlemesi**

TOB baskılanmış QCM ve elektrokimyasal sensörlerin seçiciliğini göstermek için TOB baskılanmamış sensörler de hazırlanmıştır. KAN-A, AMIK ve GEN'den oluşturulan çözeltiler QCM ve elektrokimyasal sensör sistemleri ile etkileştirilmiştir. Çözeltilerin QCM ve elektrokimyasal sensörlerle etkileşimleri yukarıda anlatıldığı gibi incelenmiş ve kinetik veriler alınarak analiz edilmiştir.

#### **3.6. Geliştirilen Sensörlerin Karakterizasyonu**

##### **3.6.1. FTIR Spektrofotometre Analizi**

Geliştirilen sensörlerin karakterizasyonu için FTIR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Ölçüm yapılan örnek haznesinden 10 dk azot gazı geçirilerek havadan kaynaklanan nem ve karbondioksit uzaklaştırılmıştır. Geliştirilen sensörler cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülerek spektrumları alınmıştır.

### 3.6.2. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

Sensörlerin karakterizasyonu için yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile  $4096 \times 4096$  piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Geliştirilen sensörler çift yüzölü karbon bant ile örnek tutucuya yerleştirilmiştir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı değen modda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 kHz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği,  $1 V_{RMS}$  ve boş titreşim genliği ise  $2 V_{RMS}$ 'dir. Örnekler  $2 \mu\text{m/s}$  tarama hızında,  $256 \times 256$  piksel çözünürlükte,  $2 \times 2 \mu\text{m}$ 'lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır.

### 3.6.3. Elipsometre

Hazırlanan QCM sensörlerinin yüzeyindeki kalınlık ölçümleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda,  $62^\circ$ 'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen QCM sensörler lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiştir. Yüzey kalınlığı hesaplama program için 50 nm altın + 50 nm polimer katmanı veri olarak öngörölmüştür. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir.

### 3.6.4. Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı ölçümleri için KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılmıştır. QCM sensörünün yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla (Sessile Drop) yöntemiyle temas açısı belirlenmiştir. Çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatmak suretiyle 10 ayrı fotoğraf çekilmiş ve her biri için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Belirlenen temas açısı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki noktanın ortalaması olan ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş ve edilmiş sensör yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan 10 ölçümün ortalama değerleri hesaplanmıştır.



### 3.6.5. Dönüşümlü Voltametri Ölçümleri

Dönüşümlü voltametri ölçümleri için Gamry Referans 600 donanımlı PCI4/300 potansiyostat cihazı (New York/ABD) kullanılmıştır. Dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak baskılanmış ve baskılanmamış camsı karbon elektrotları redoks problemleri olarak 0.1 M KCl çözeltisinde hazırlanmış 1.0 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  ve 0.1 M TBATFB çözeltisinde hazırlanmış 1.0 mM ferrosen kullanılarak karakterize edilmiştir. Her iki redoks probu için -500 mV/+500 mV potansiyel taraması kullanılmıştır.

### 3.6.6. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopik Ölçümleri

Elektrokimyasal impedans spektroskopik ölçümleri Gamry Referans 600 donanımlı PCI4/300 potansiyostat cihazı ile yapılmıştır. EIS 300 yazılımı kullanılarak alınan ölçümler değerlendirilmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış camsı karbon elektrotları 1.0 mM ferrosiyanyür/1.0 mM ferrisiyanyür redoks çifti kullanılarak karakterize edilmiştir. İmpedans ölçümleri 100 kHz dalga genliği ve 0.030 V elektrot potansiyelinde alınmıştır.

### 3.7. Yöntemlerin Optimizasyonu

TOB'un QCM ve elektroanalitik yöntemlerle analizi için deneysel ve cihaza ait parametreler değiştirilerek uygun şartlar araştırılmıştır. Bu amaçla geliştirilen QCM yöntemi için ilk önce homojen bir stok monomer çözeltisi hazırlamak için kullanılan HEMA, EGDMA ve hazırlanan TOB-MAGA kompleksinin oranları optimize edilmiştir. Daha sonra uygun miktarlar belirlendikten sonra uygun tampon pH'sı denenmiştir. Geliştirilen elektroanalitik yöntem için sırasıyla kullanılan destek elektrolitin pH'sı, monomer derişimi, tarama sayısı ve hedef molekül derişimi optimize edilmiştir. Cihaza ait optimum parametreler araştırılırken TOB derişimi  $1.0 \times 10^{-8}$  M olarak alınmıştır.

### 3.8. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu

Yöntemlerin validasyonu için kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, sağlamlık, tutarlılık, tekrarlanabilirlik, özgüllük ve geri kazanım parametreleri değerlendirilmiştir.

### ***Kararlılık***

TOB'un sudaki çözeltisinin kararlılık çalışması yapılmıştır. Bunun için buzdolabında ve oda sıcaklığında saklanan TOB çözeltilerinden 0.054 nM standart TOB çözeltileri hazırlanmıştır. Uzun dönem kararlılık çalışması için buzdolabında saklanan standart TOB çözeltisinin 1 ay boyunca QCM sensorgramları ve kare dalga voltamogramları alınmıştır. Kısa dönem kararlılık çalışması için oda sıcaklığında saklanan standart TOB çözeltisinin 12 saat boyunca QCM sensorgramları ve kare dalga voltamogramları alınmıştır.

### ***Doğrusallık***

QCM ve SWV yöntemleri için sırasıyla 0.017 – 0.150 nM ve 0.5 – 10.0 nM aralığında olacak şekilde standart TOB çözeltileri, stok çözeltilerden (0.001 M) uygun miktarlarda alınıp 0.1 M fosfat tamponu ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Derişime karşı kütle değişimleri ve pik akımları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri günlük hazırlanmış ve analiz sırasında 7 ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğruların doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılmıştır (Bkz. Ek 1).

Geliştirilen her bir yöntemin doğrusallığı; nominal (olması gereken) derişimlere karşı, kalibrasyon verileri kullanılarak bulunan derişimlerin grafiğe geçirilmesiyle ve ayrıca istatistiksel olarak korelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü yapılarak kontrol edilmiştir. (Bkz.Ek 2).

### ***Duyarlılık***

LOD değerinin hesaplanması için aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Eşitlik 3.1) (117) .

$$\text{LOD} = 3.3 \left( \frac{SS}{S} \right) \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte, SS, oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin y eksenini kestiği noktanın standart sapması, S ise oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin ortalamasıdır. LOQ değerinin hesaplanması için ise aşağıdaki verilen formül kullanılmıştır (Eşitlik 3.2).

$$LOQ = 10 \left( \frac{SS}{S} \right) \quad (3.2)$$

### ***Kesinlik ve Doğruluk***

Kesinlik ve doğruluk çalışmaları için gün içi ve günler arası olmak üzere ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu amaçla doğrusallık aralığına giren üç farklı derişim seviyesinde (alt tayin sınırına yakın, orta ve üst tayin sınırına yakın) TOB'un tekrarlı analizleri yapılmıştır. QCM yönteminde 0.022, 0.070, 0.120 nM ve SWV yönteminde ise 2.0, 4.0, 8.0 nM derişiminde çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda; üç derişim seviyesinde ve her derişim için altı ayrı çözeltili hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda; ard arda altı ayrı günde ve üç derişimde yeni hazırlanan çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Kesinlik, bulunan değerlerin ortalaması, standart hatası (SH), standart sapması (SS) ve % bağıl standart sapması (BSS) ile verilmiştir. Doğruluk ise, eklenen TOB miktarı ile bulunan TOB miktarının karşılaştırılması ve bulunan % bağıl hatası ile verilmiştir (Bkz. Ek 2).

### ***QCM Sensörünün Tekrarlanabilirliği***

Hazırlanan TOB baskılanmış QCM sensörün tekrarlanabilirliği, altı kez ard arda verildiği 0.054 nM derişiminde TOB çözeltilerinin arasındaki etkileşimlere ait denge-adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü ile gerçekleştirilmiştir.

### ***Elektrokimyasal Sensörünün Tekrarlanabilirliği***

TOB'un elektroanalitik yöntemle analizinde sensör tekrarlanabilirliği, SWV için 2.0 nM TOB içeren çözeltilerin altı ayrı voltamogramlarının kaydedilmesiyle elde edilen TOB'ye ait pik akımlarının ortalama değerleri hesaplanarak bulunmuştur.

### ***Sağlamlık ve Tutarlılık***

Yöntemlerin sağlamlık çalışmaları için belirlenen optimum deney koşullarında küçük değişiklikler yapılarak analizler tekrarlanmıştır. Bu amaçla QCM yönteminde tampon çözeltinin pH'sı, SWV yönteminde destek elektrolitin pH'sı ve ilk potansiyelinde küçük değişiklikler yapılmıştır. Tutarlılık çalışmasında ise farklı analizci tarafından çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Farklı iki analizcinin sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bunun için geliştirilen yöntemlerde doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (QCM için 0.054 nM ve SWV için 2.0 nM) yedi ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde farklı iki analizci tarafından analizleri yapılmıştır.

### ***Özgüllük (Seçicilik)***

Yöntemlerin özgünlüğünü belirlemek amacıyla aynı derişimde TOB içeren sentetik preparat, göz damlası ve standart çözeltileri hazırlanarak sensorgramları ve voltamogramları kaydedilmiştir. Ayrıca her iki yöntem için yöntemin özgünlüğü, standart ekleme yönteminin ilaç çözeltilerine ve gıda numunelerine (süt ve yumurta) uygulanmasıyla da gösterilmiştir.

### **3.9. Geri Kazanım**

Geri kazanım çalışmaları ilaçlar için sentetik preparat çözeltileri hazırlanarak yapılmıştır. Analizi yapılan farmasötik preparatlar: TOBRADEX® (3.0 mg/mL TOB, 1.0 mg/mL deksamethason ve koruyucu olarak %0.01 benzalalkonyum klorür içeriyor) ve TOBİ® (60 mg/mL TOB ve 11.25 mg NaCl içeriyor).

Sentetik preparatlar TOB'un etiketlenmiş miktarları (3.0 mg ve 60 mg) ile eksipientlerin karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan karışımlar 50 mL'lik balon jøjeye alınarak 25 mL su eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlandıktan sonra hacim su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

Gıda numunelerinin (süt ve yumurta) özütleme ve seyreltme işlemleri şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 5.0 mL süt numunesi, 1.0 mL TCA (%10 m/v) ile 25 saniye vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra 15 dakika 4500 rpm hızında santrifüjlenmiştir. Elde edilen santrifüगत başka bir tüpe aktarıldıktan sonra çökeltiye aynı işlem iki kez daha gerçekleştirilmiştir. Daha sonra toplanan santrifüगत tekrar

4500 rpm hızında santrifüjlendikten sonra 0.50- $\mu$ m çaplı filtreden süzölmüştür. Elde edilen süzöntü geliştirilen QCM ve elektroanalitik sensörlerle analizi için 0.1 M fosfat tamponu ile seyreltilmiştir.

-20 °C'da saklanan 1.0 g homojenize yumurta numunesi 10 mL 0.1 M fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Seyreltme işleminden sonra 1 dakika 4500 rpm hızında santrifüjlenmiştir. Elde edilen santrifüगत QCM ve elektroanalitik sensörlerle analizi için 0.1 M fosfat tamponu ile tekrar seyreltilmiştir. Bütün elde edilen santrifüगतlar her analizden önce tekrardan 0.50- $\mu$ m çaplı filtreden süzölmüştür.

### **3.10. Yöntemlerin Gerçek Numunelere Uygulanması**

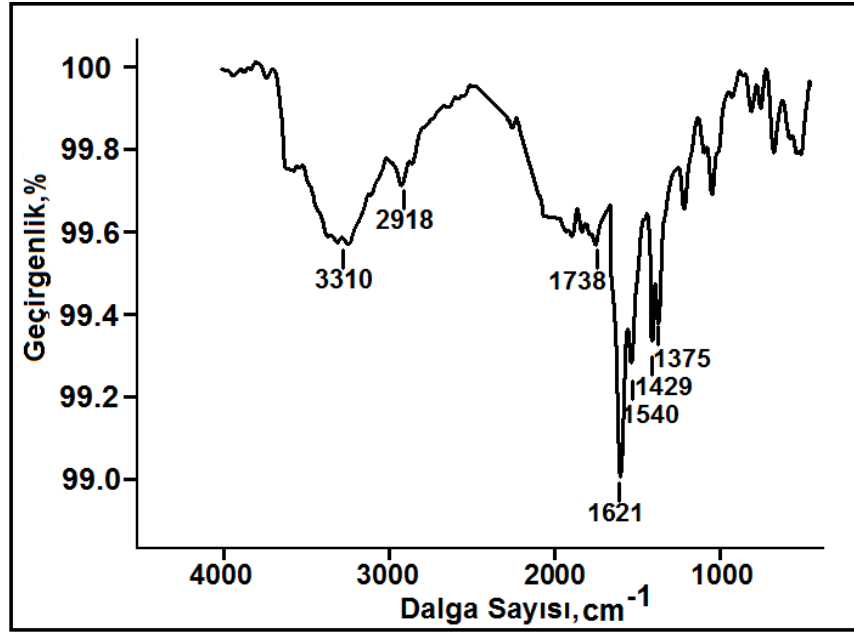
Farmasötik göz damlaları (TOBRADEX<sup>®</sup> ve TOBİ<sup>®</sup>) geliştirilen her iki yöntemin doğrusallık aralıklarına girecek şekilde 0.1 M fosfat tamponuyla seyreltilmiştir. Ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilip çözünmesi sağlandıktan sonra 0.50- $\mu$ m çaplı filtreden süzölmüştür. QCM ve elektrokimyasal hücredeki tampon çözelti üzerine bu çözeltiden doğruluk ve kesinliğin en iyi olduğu derişimi sağlamak üzere  $\mu$ L düzeyinde eklemeler yapılmış ve sensorgramlar ve voltamogramlar kaydedilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Geliştirilen QCM Sensörünün Yüzey Karakterizasyonu

#### 4.1.1. FTIR Analizi

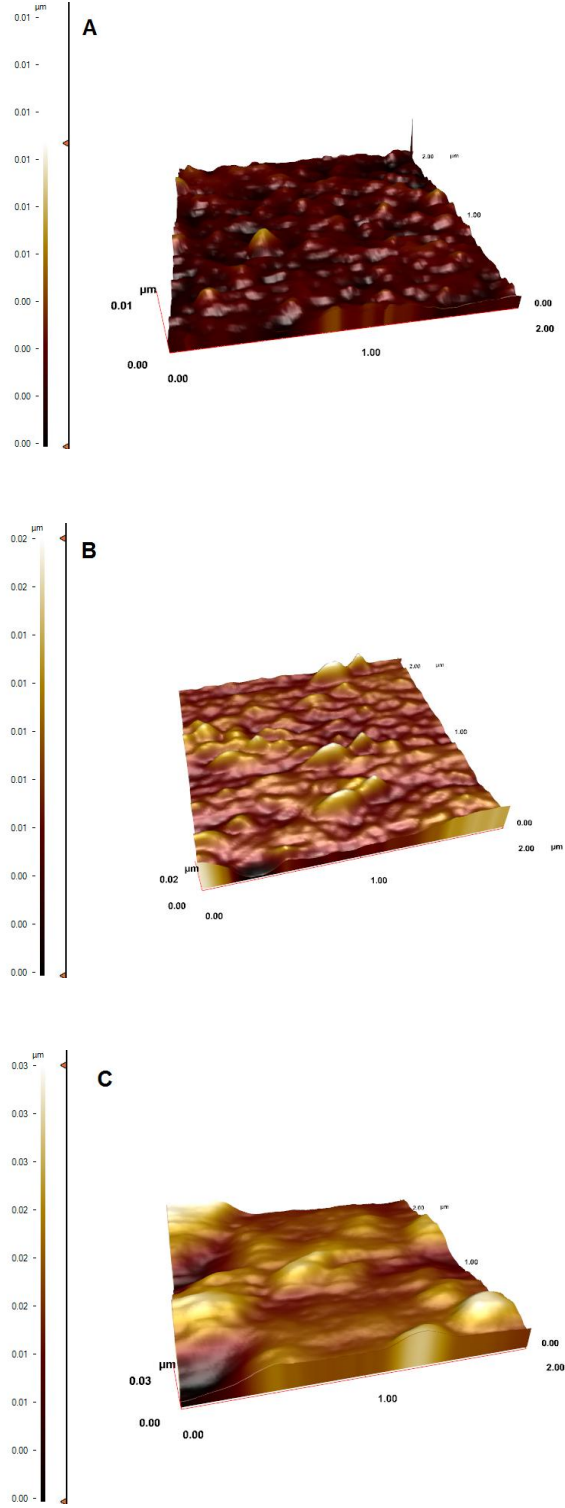
Şekil 4.1'de TOB baskılanmış QCM sensör yüzeyine ait FTIR spektrumu görülmektedir.



Şekil 4.1. TOB baskılanmış QCM sensörünün FTIR spektrumu

#### 4.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi

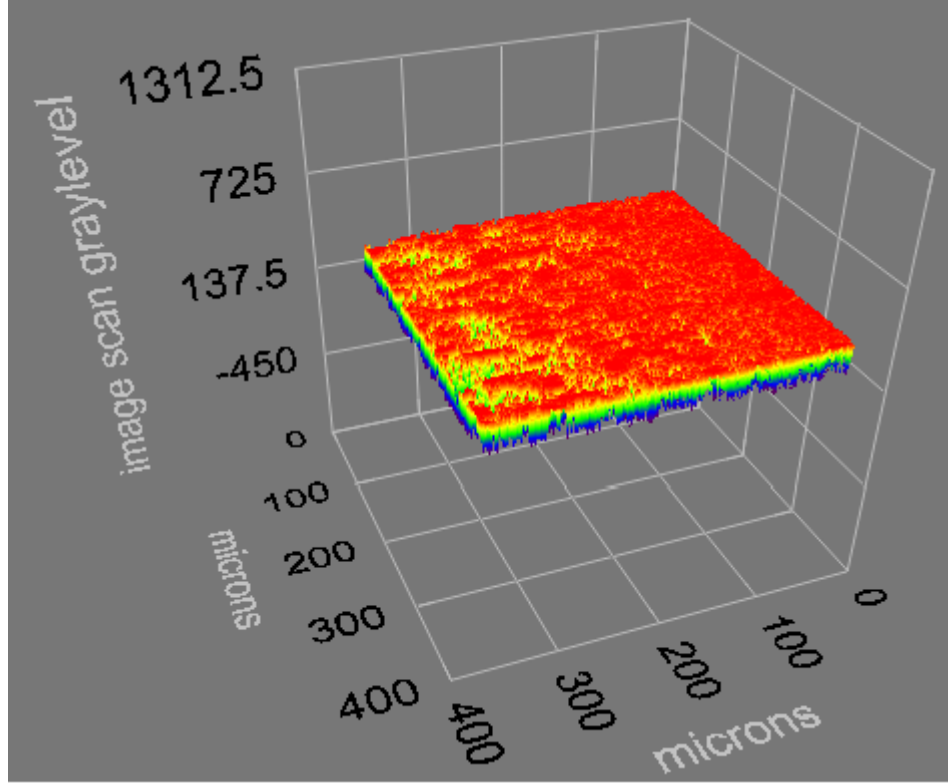
Modifiye edilmemiş, alil merkaptan ile modifiye edilmiş ve TOB baskılanmış QCM sensörlerinin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** (A) modifiye edilmemiş; (B) allil merkaptan ile modifiye edilmiş; (C) TOB baskılanmış QCM sensörlerinin AFM görüntüleri

#### 4.1.3. Elipsometre Analizi

TOB baskılanmış QCM sensörünün üç boyutlu elipsometre görüntüsü Şekil 4.3'te görülmektedir.

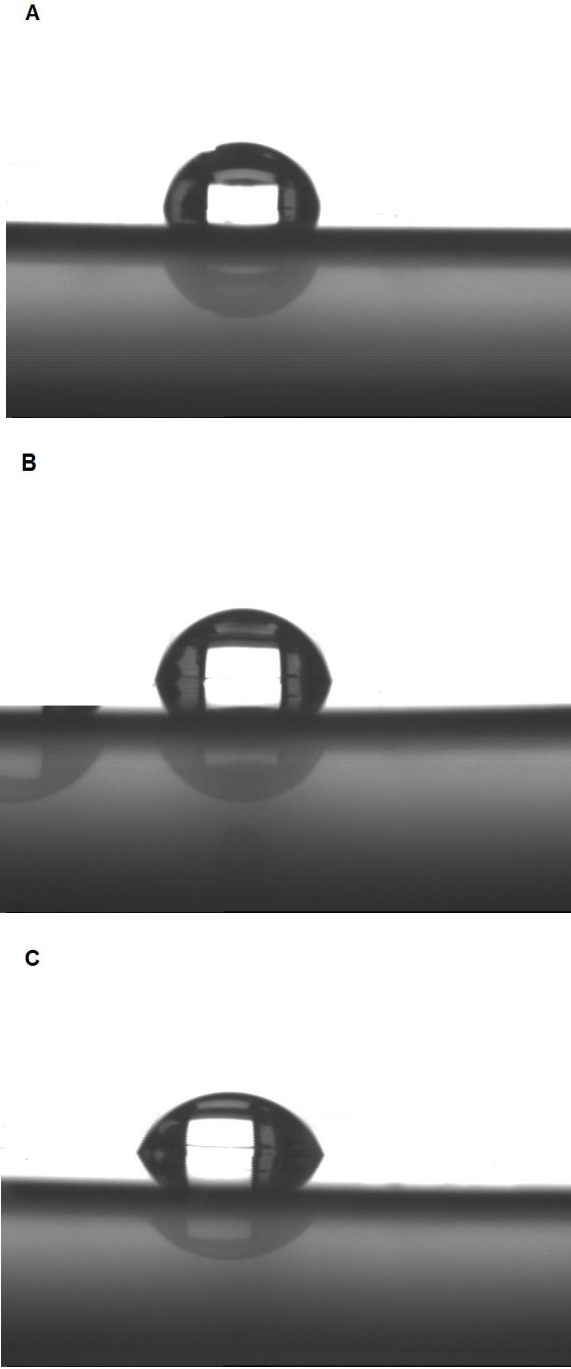


Şekil 4.3. TOB baskılanmış QCM sensörünün 3B elipsometre görüntüsü

#### 4.1.4. Temas Açısı Analizleri

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve TOB baskılanmış QCM sensörlerinin temas açısı ölçümleri Şekil 4.4'te görülmektedir.



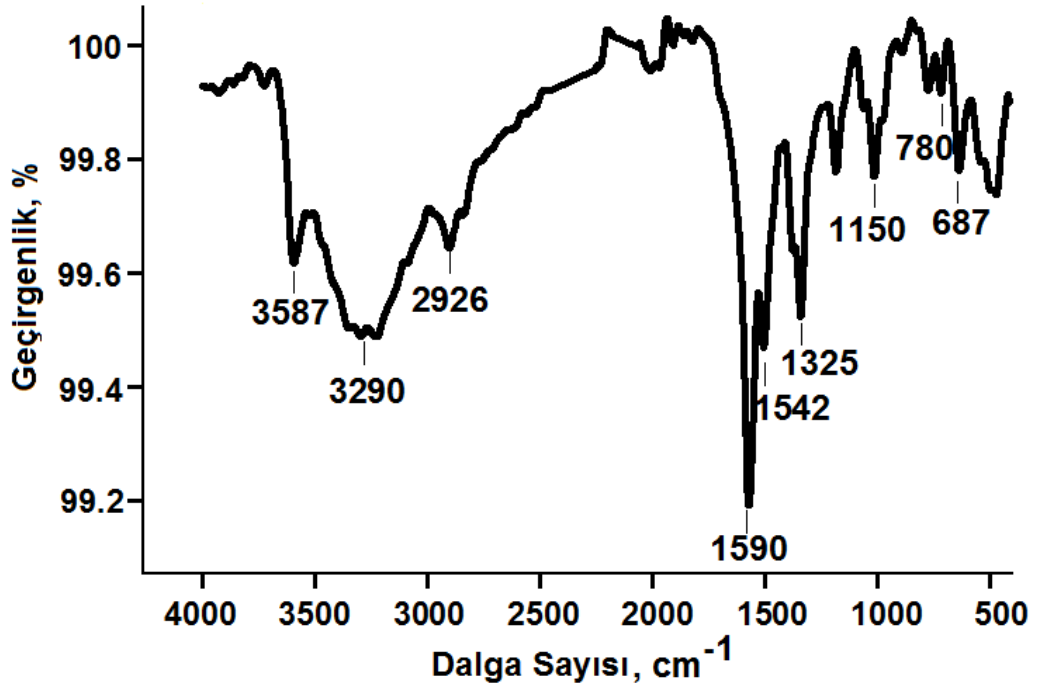


**Şekil 4.4.** (A) modifiye edilmemiş; (B) allil merkaptan ile modifiye edilmiş; (C) TOB baskılanmış QCM sensörlerinin temas açısı ölçümleri

## 4.2. Geliştirilen Elektronalitik Sensörünün Yüzey Karakterizasyonu

### 4.2.1. FTIR Analizi

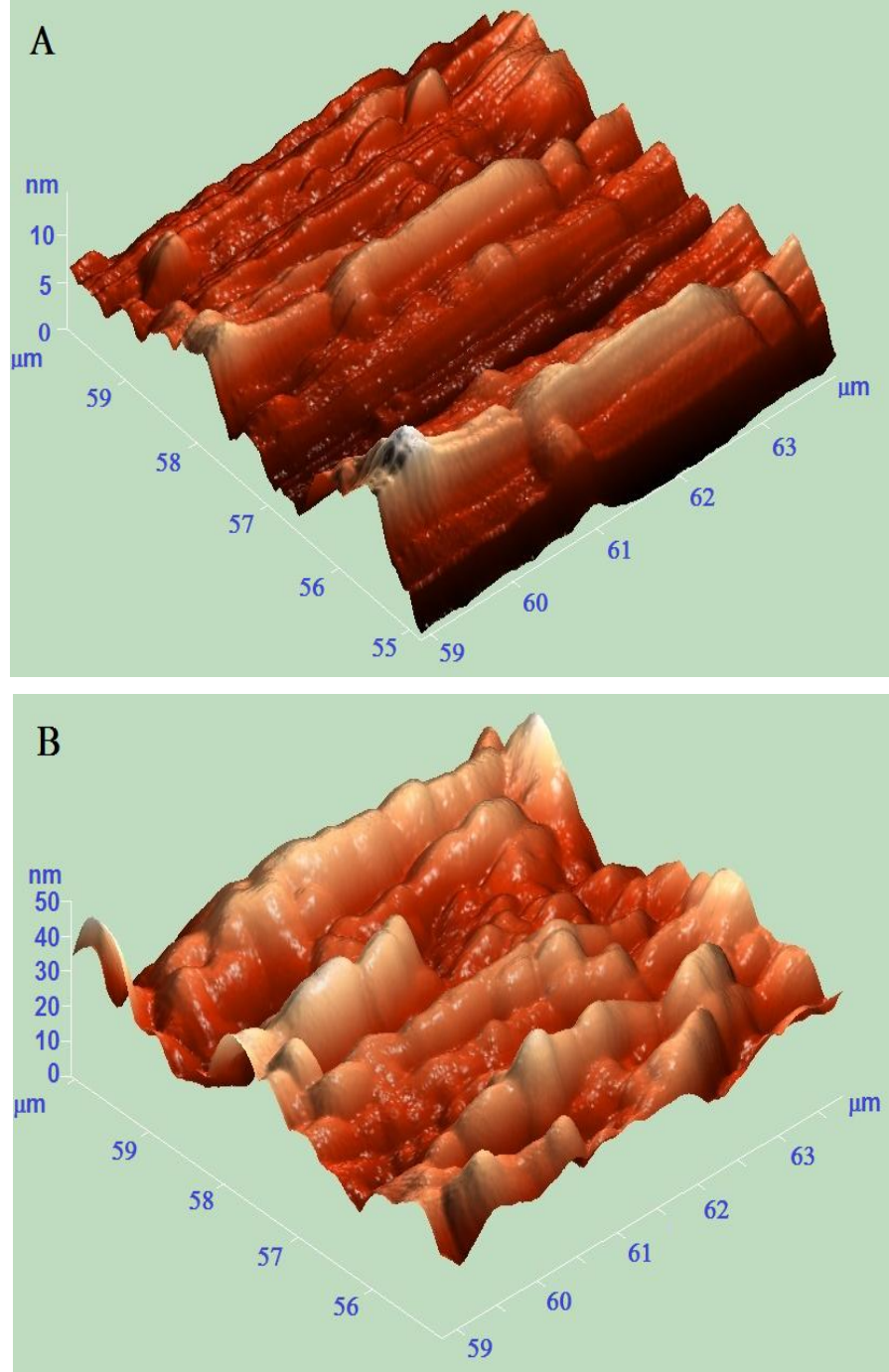
Şekil 4.5'te TOB baskılanmış polipirol ile modifiye edilmiş camı karbon yüzeyine ait FTIR spektrumu görülmektedir.



Şekil 4.5. TOB baskılanmış polipirol elektrokimyasal sensörünün FTIR spektrumu

### 4.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi

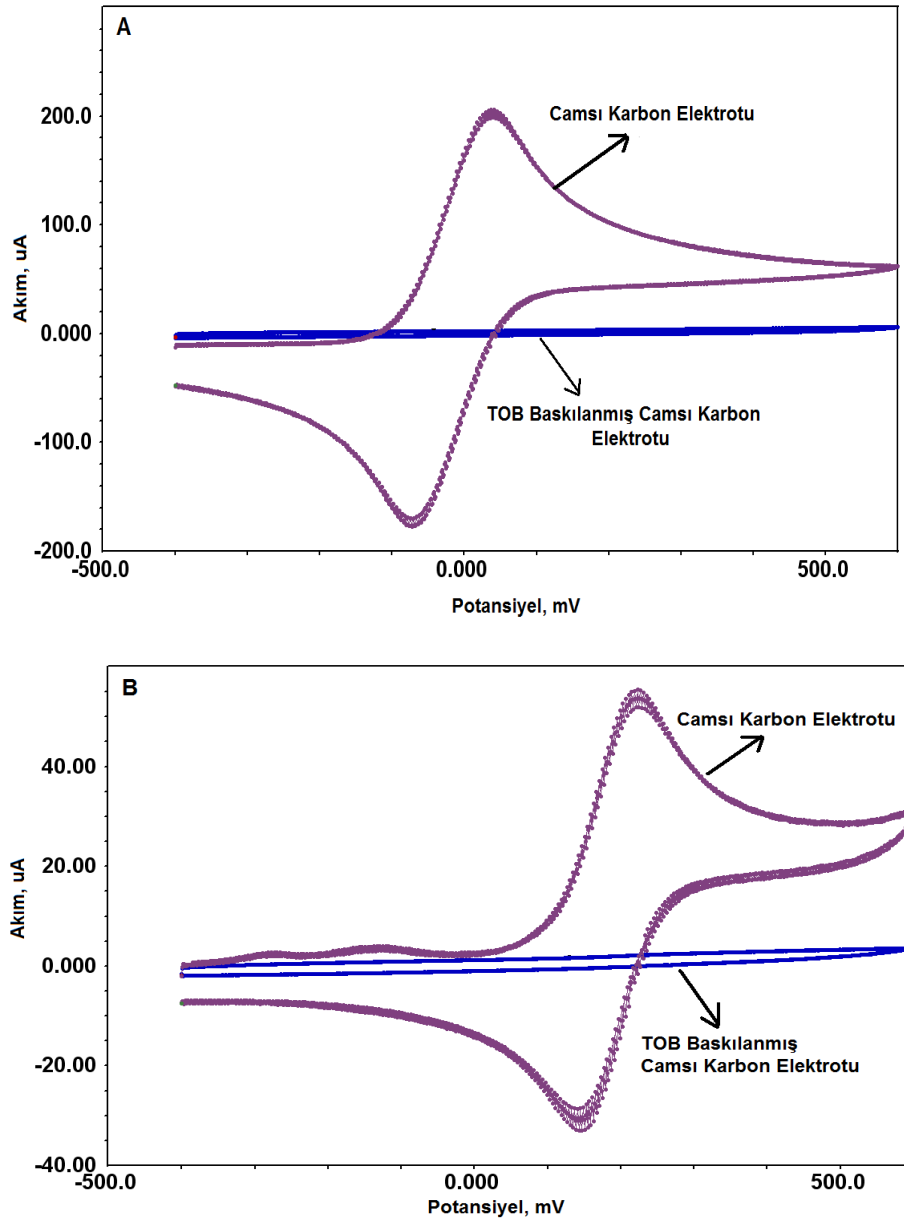
Modifiye edilmemiş ve TOB baskılanmış polipirol camı karbon yüzeyinin yüzey morfolojisi yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** (A) modifiye edilmemiş; (B) TOB baskılanmış polipirol camısı karbon yüzeylerinin AFM görüntüleri

### 4.2.3.Dönüşümlü Voltametri Analizi

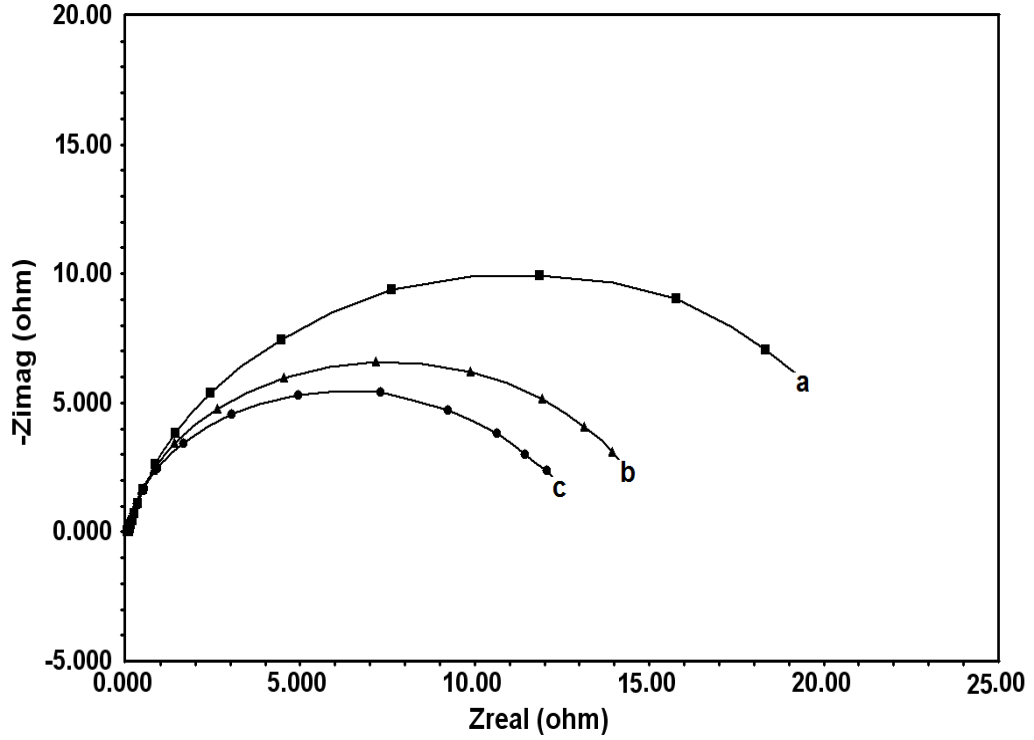
1.0 mM potasyum ferrisiyanür ve 1.0 mM ferrosen redoks çiftlerinin camsı karbon elektrotu ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrotunda alınmış dönüşümlü voltammogramları Şekil 4.7’de görülmektedir.



Şekil 4.7. (A) 1.0 mM potasyum ferrisiyanür vs. Ag/AgCl/KCl<sub>(doy)</sub>; (B) 1.0 mM ferrosenin vs. Ag/Ag<sup>+</sup> (0.01M) dönüşümlü voltammogramları

#### 4.2.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopik Analizi

1.0 mM ferrosiyandır/1.0 mM ferrisiyandır redoks çiftinin farklı elektrotlarda alınmış elektrokimyasal impedans ölçümleri Şekil 4.8'de görülmektedir.



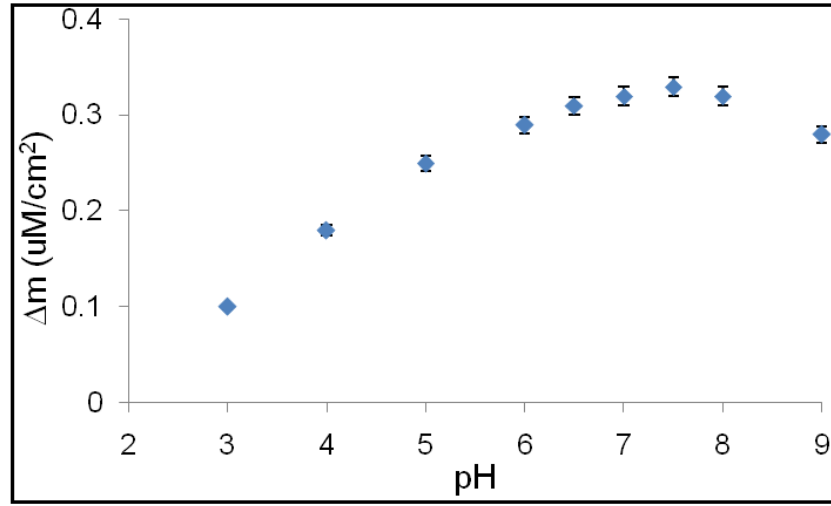
Şekil 4.8. 1.0 mM ferrosiyandır/1.0 mM ferrisiyandır redoks çiftinin farklı elektrotlarda alınmış elektrokimyasal impedans verileri (a) aktif hale getirilmiş camsı karbon elektrotu; (b)  $1.0 \times 10^{-8}$  M TOB inkübasyonundan sonra TOB baskılanmış polipirol camsı karbon elektrotu; (c)  $1.0 \times 10^{-8}$  M TOB uzaklaştırılmasından sonra TOB baskılanmış polipirol camsı karbon elektrotu (1.0 M NaCl varlığında)

### 4.3. Geliştirilen QCM ve Elektroanalitik Yöntemlerine Ait Analiz Bulguları

TOB metanol, asetonitril ve su gibi çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğü incelenmiş ve en uygun çözücü olarak su seçilmiştir. Bu nedenle stok TOB çözeltisi su ile hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler 0.1 M fosfat tamponu ile yapılmıştır.

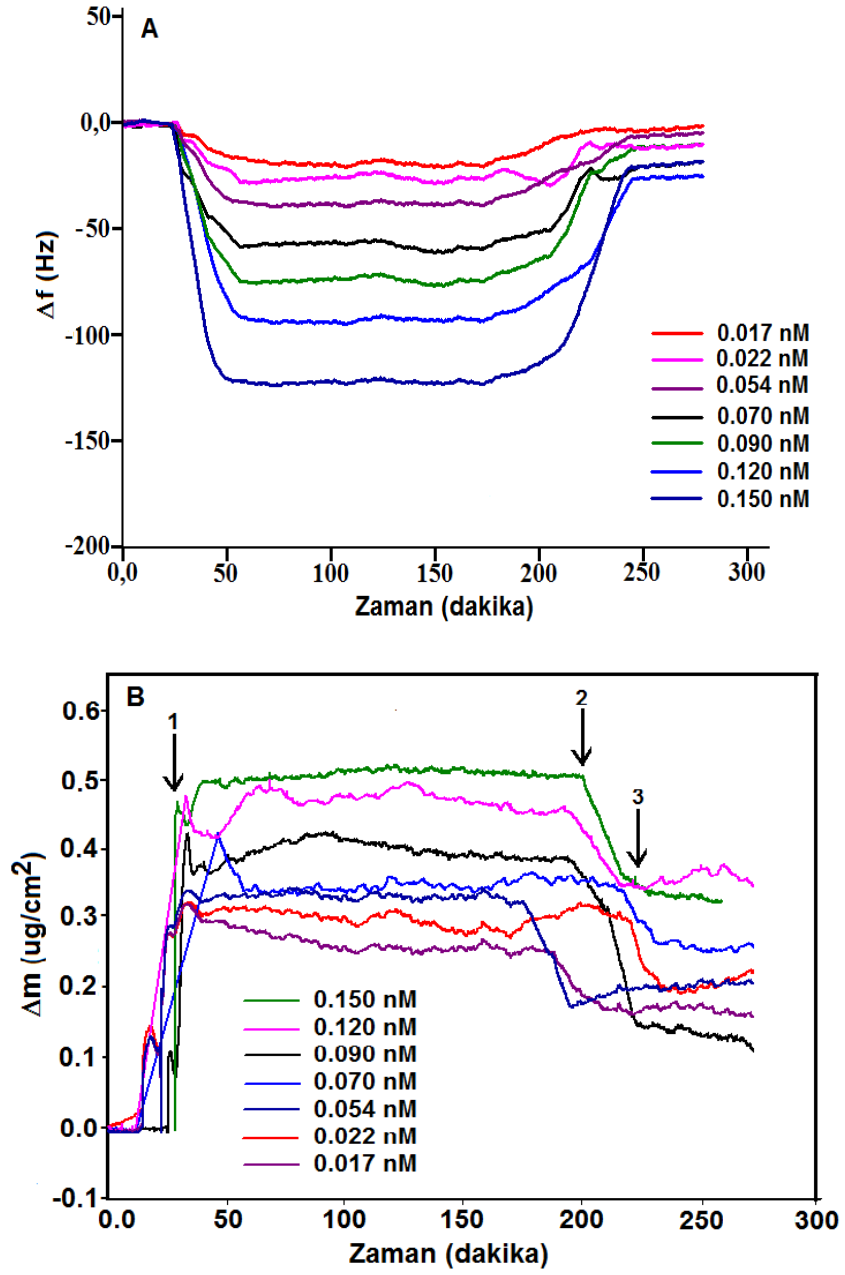
#### 4.3.1. QCM Yöntemin Optimizasyonu

Farklı pH değerlerinde hazırlanan 0.1 M fosfat tamponununun 0.054 nM TOB varlığında QCM cevabı üzerine etkisi incelenmiş ve kütle değişimleri ölçülmüştür (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. TOB baskılanmış nanosensörün QCM cevabı üzerine pH'nın etkisi

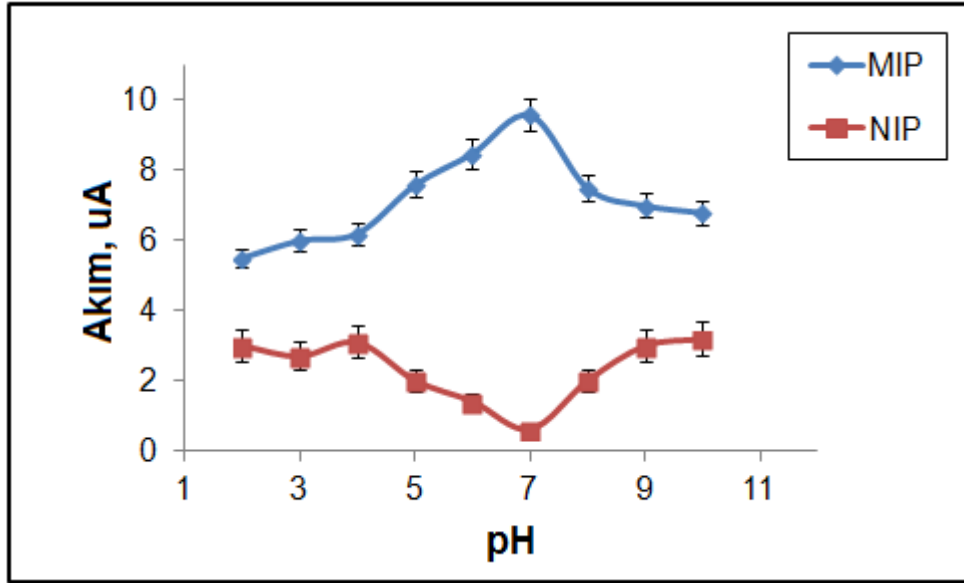
0.1 M, pH 7.5 fosfat tamponu sisteminde değişik derişimlerdeki TOB ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar Şekil. 4.10'da görülmektedir.



**Şekil. 4.10.** Değişik derişimlerdeki TOB ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (A) zamana karşı  $\Delta f$  değerini gösteren sensorgram; (B) zamana karşı  $\Delta m$  değerini gösteren sensorgram. (1) adsorpsiyon, (2) desorpsiyon, (3) rejenerasyon

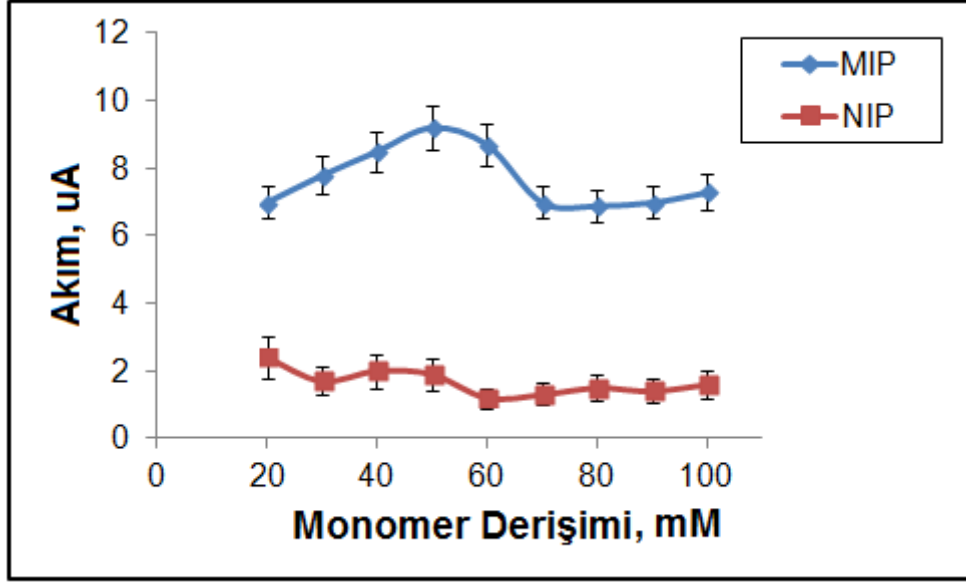
#### 4.3.2. Elektroanalitik Yöntemin Optimizasyonu

Bu yöntemde optimum analiz parametrelerinin bulunması için seçilen destek elektrolitte belirli bir TOB derişiminde destek elektrolit pH'sı, monomer (pirol) derişimi, tarama sayısı ve hedef molekül (TOB) derişimi değişiminin TOB baskılanmış ve baskılanmamış voltametrik sensör üzerine etkileri incelenmiştir (Şekil 4.11 – Şekil 4.14).

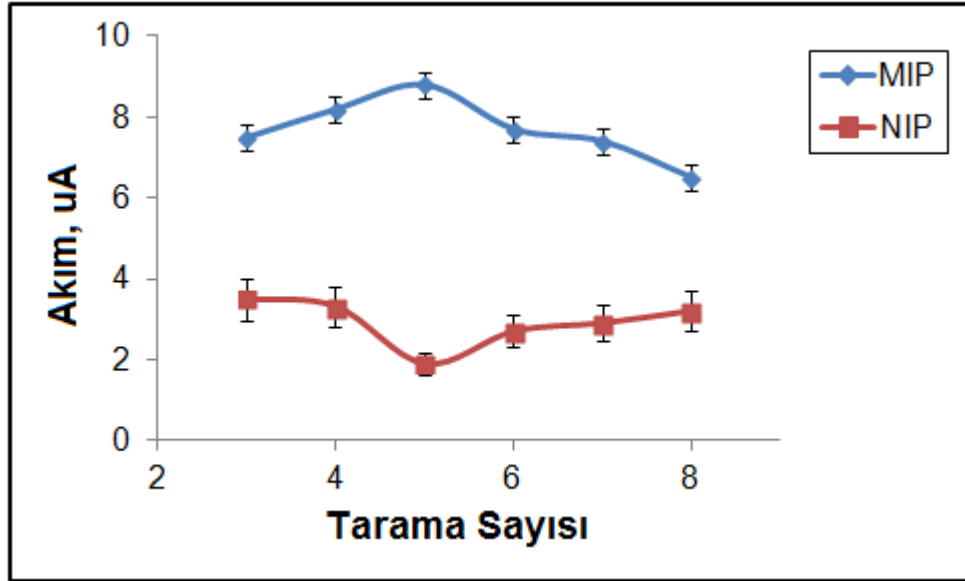


Şekil 4.11. TOB baskılanmış ve baskılanmamış camısı karbon üzerine destek elektrolit pH'nın etkisi (10.0 nm TOB varlığında)

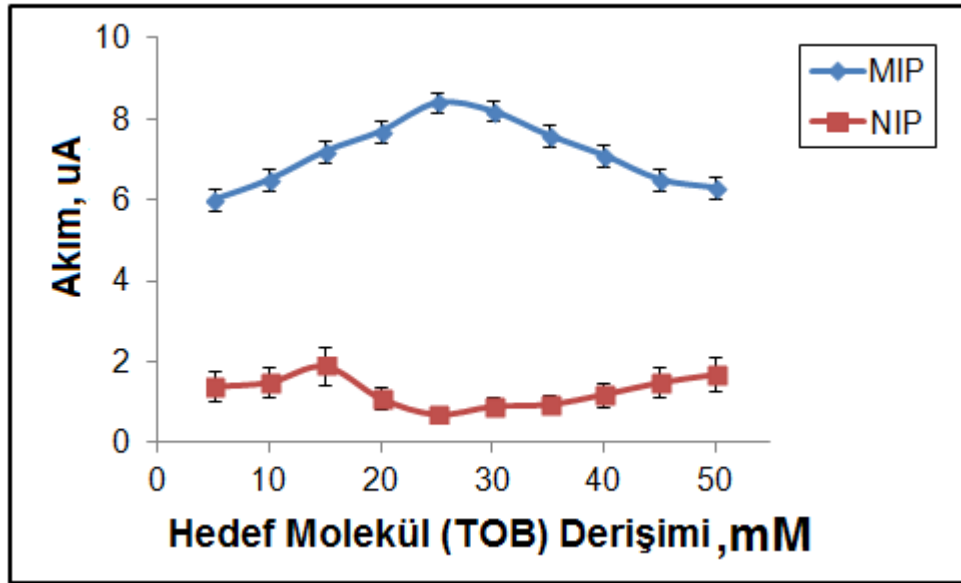




Şekil 4.12. SWV yönteminde TOB pik akımına monomer derişiminin etkisi  
(TOB derişimi: 10.0 nM)

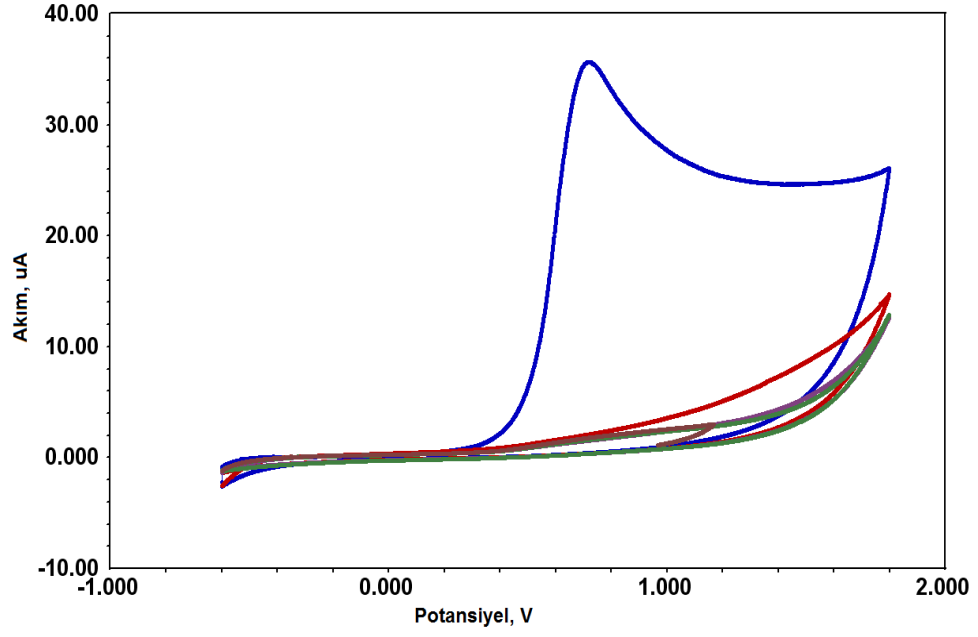


Şekil 4.13. SWV yönteminde TOB pik akımına tarama sayısının etkisi  
(TOB derişimi: 10.0 nM)



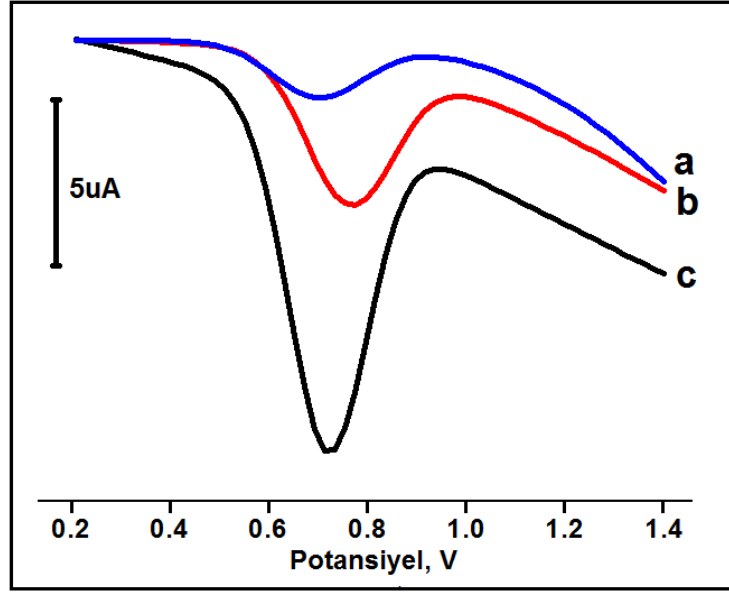
**Şekil 4.14.** SWV yönteminde TOB pik akımına hedef molekül (TOB) derişiminin etkisi (TOB derişimi: 10.0 nM)

Optimize edilmiş şartlar altında 25 mM TOB varlığında 60 mM pirol monomerinin elektropolimerizasyonu Şekil 4.15’de görülmektedir.



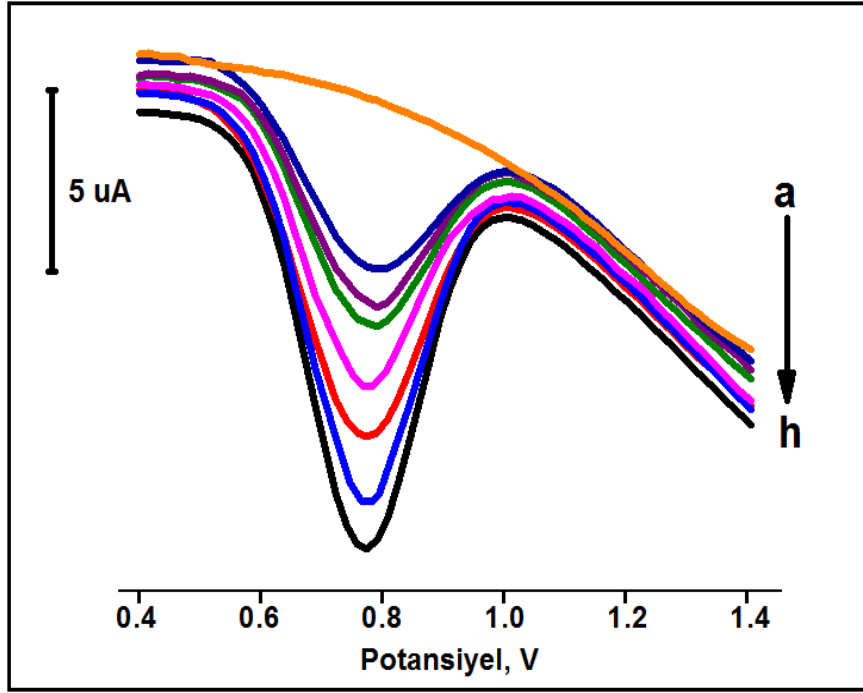
**Şekil 4.15.** 0.1 M, pH 7.0 fosfat tamponu sisteminde camsı karbon elektrotu üzerinde 25 mM TOB varlığında 60 mM pürol monomerinin elektropolimerizasyonu (Deneysel Koşullar: Tarama hızı  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , Tarama sayısı 5)

Şekil 4.16'da  $1.0 \times 10^{-8}$  M TOB'un farklı elektrotlarda alınmış kare dalga voltamogramları görülmektedir.



**Şekil 4.16.**  $1.0 \times 10^{-8}$  M TOB'un farklı elektrotlarda alınmış kare dalga voltamogramları (a) TOB baskılanmamış polipirol camısı karbon elektrotu, (b) aktif hale getirilmiş camısı karbon elektrotu ve (c) TOB baskılanmış polipirol camısı karbon elektrotu (25 mM TOB derişimi, pH 7.0, 0.1 M fosfat destek elektroliti, 60 mM pirol ve 5 tarama sayısı)

Pik şekli ve akım değerleri dikkate alınarak en uygun parametreler; monomer derişimi için 60 mM, tarama sayısı için 5 ve hedef molekül derişimi için 25 mM olarak seçilmiştir. Belirlenen cihaz parametrelerinde ve 0.1 M, pH 7.0 fosfat tamponu sisteminde tobramisine ait kare dalga voltamogramları Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.17.** TOB'un TOB baskılanmış camısı karbon elektrotu kullanılarak alınan kare dalga voltamogramları (a) 0.1M fosfat destek elektroliti; (b) 0.5; (c) 1.0; (d) 2.0; (e) 4.0; (f) 6.0; (g) 8.0; (h)10.0 nM TOB (25 mM TOB derişimi, pH 7.0, 0.1M fosfat destek elektroliti, 60 mM pirol ve 5 tarama sayısı)

#### 4.4. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu

##### 4.4.1. Kararlılık

TOB'un uzun ve kısa dönem kararlılık bulguları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** TOB için uzun dönem kararlılık bulguları (Eklenen TOB derişimi QCM yöntemi için 0.054 nM)

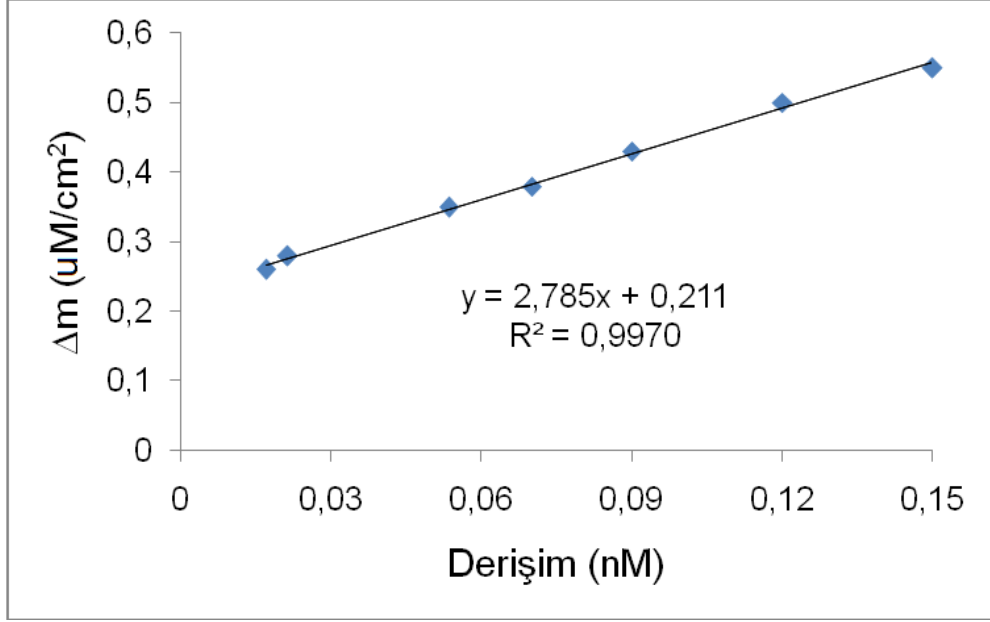
	1 saat	8 saat	24 saat	10 gün	20 gün	30 gün
Kütle Değişimi $\Delta m$ (ug/cm <sup>2</sup> )	0.352	0.354	0.357	0.358	0.355	0.360
Bulunan miktar (nM)	0.051	0.051	0.052	0.053	0.052	0.054
Geri Kazanım (%)	94.44	94.44	96.30	98.15	96.30	100.00

**Tablo 4.2.** TOB için kısa dönem kararlılık bulguları (Eklenen TOB derişimi QCM yöntemi için 0.054 nM)

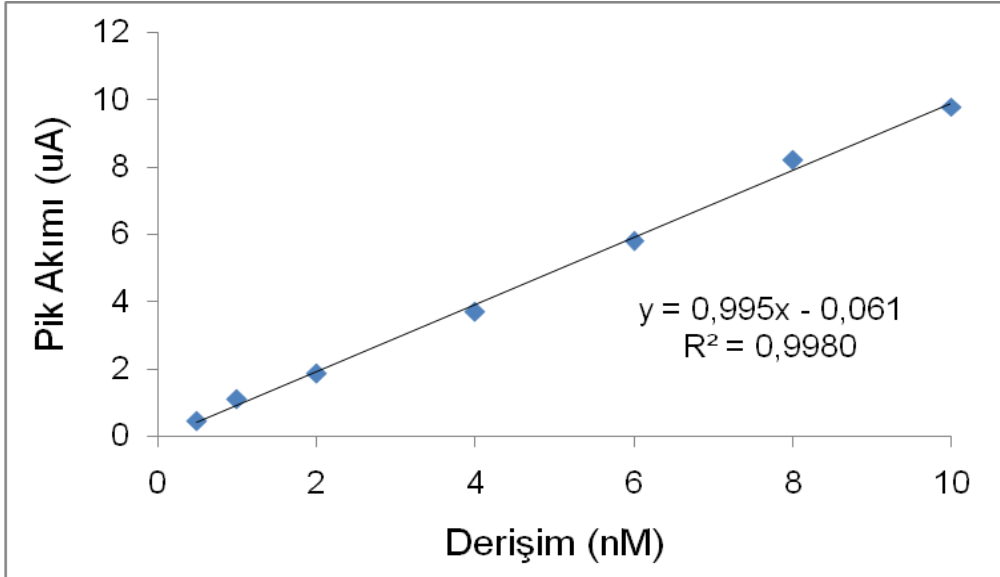
	Kütle Değişimi $\Delta m$ (ug/cm <sup>2</sup> )	Bulunan miktar (nM)	Geri Kazanım (%)
12 saat	0.355	0.052	95.75

#### 4.4.2. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları

Her iki yöntemde TOB derişimine karşı elde edilen sinyaller grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil 4.18 - Şekil 4.19).



Şekil 4.18. TOB'un QCM yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (n = 7)



Şekil 4.19. TOB'un SWV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (n = 7)

Bu eğrilerin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları ise Tablo 4.3 – Tablo 4.4’te gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** TOB’un QCM yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar

Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü						
n	r	Sr	$t_H$	$t_T$		
7	0.9985	$9.74 \times 10^{-4}$	61.78	2.48		
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	$F_H$	$F_T$
47822.31	47884.04	61.73	12.35	47822.31	3872.25	5.59

\* Terimler Ek 1’de açıklanmıştır



**Tablo 4.4.** TOB'un SWV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar

Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü						
n	r	Sr	$t_H$	$t_T$		
7	0.9990	$8.21 \times 10^{-3}$	56.78	2.48		
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	$F_H$	$F_T$
41741.11	41998.37	61.13	10.11	41741.11	3578.32	5.59

\* Terimler Ek 1'de açıklanmıştır

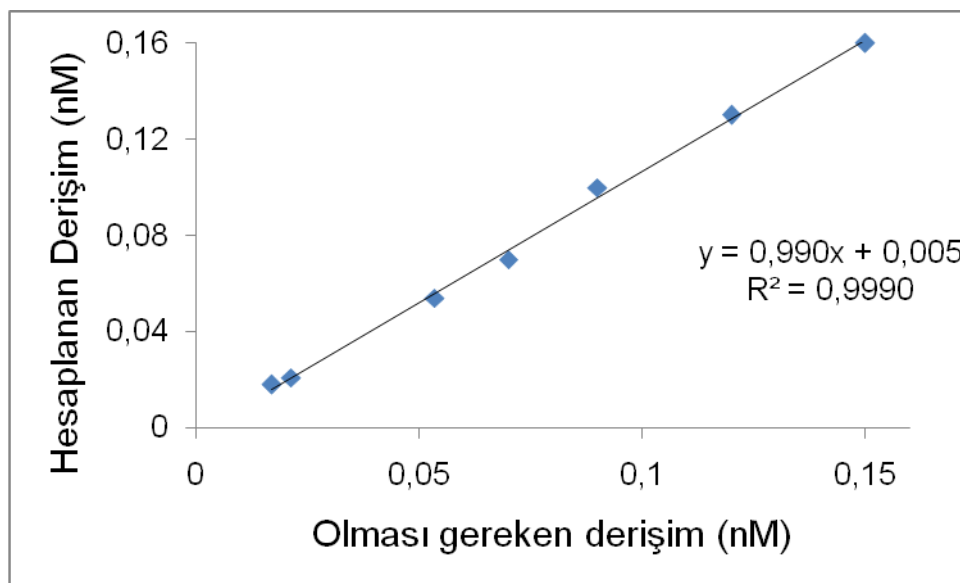
Geliştirilen her iki yöntem için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.5.** Önerilen QCM ve SWV yöntemlerine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri  
(n = 7)

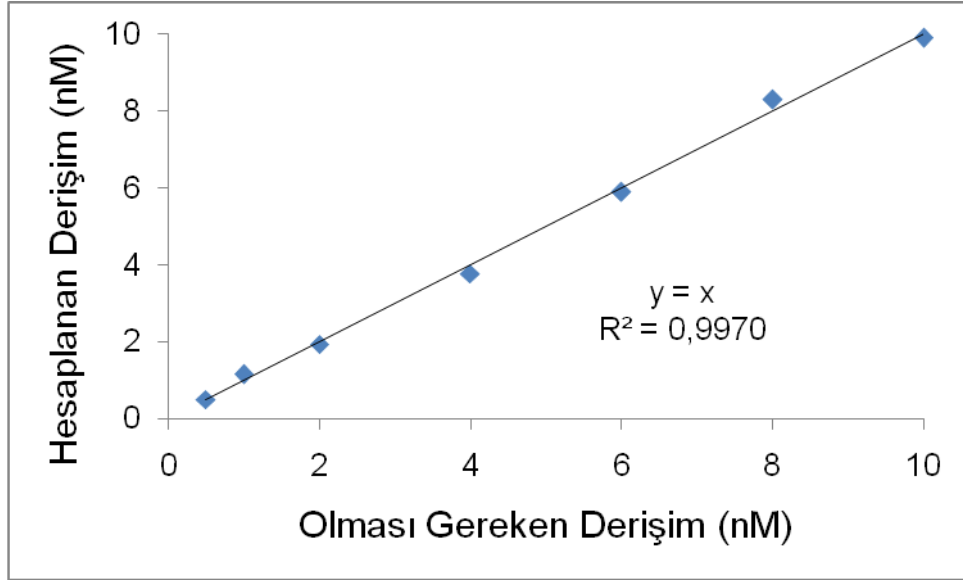
	QCM yöntemi	SWV yöntemi
Regresyon Denklemi	$y^* = 2.785x + 0.211$	$y^* = 0.995x - 0.061$
Eğimin standart hatası	0.54	0.78
Kesişimin standart hatası	0.37	0.54
Korelasyon katsayısı (r)	0.9985	0.9990
Tanımlayıcılık katsayısı ( $R^2$ )	0.9970	0.9980
Doğrusallık aralığı (nM)	0.017 – 0.150	0.5 – 10.0
LOD (nM)	0.00561	0.1667
LOQ (nM)	0.0166	0.491

\* $y = ax + b$ ; x: nM biriminde derişim, y: SWV için pik akımı ( $\mu A$ ), QCM için kütle değişimi ( $\mu g/cm^2$ )  
a: Kesişim, b: Eğim

Yöntemlerin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrilerini oluşturan derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin analizleri yapıp kalibrasyon eğrileri denklemleri ile sonuçlar hesaplanmış ve olması gereken (nominal) derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.20 – Şekil 4.21).



**Şekil 4.20.** TOB'un QCM yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği



Şekil 4.21. TOB'un SWV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği

#### 4.4.3. Duyarlılık

TOB'un QCM ve SWV yöntemlerine ait LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

#### 4.4.4. Kesinlik ve Doğruluk

TOB'un QCM ve SWV yöntemlerle yapılan doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo 4.6 – Tablo 4.7'de verilmiştir.

**Tablo 4.6.** QCM yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları  
(n = 6)

TOB miktarı (nM)	Gün İçi <sup>1</sup>		Günler Arası <sup>2</sup>	
	Bulunan miktar	% Bağlı hata	Bulunan miktar	% Bağlı hata
0.022	0.021	4.54	0.021	4.54
	0.022	0	0.023	-4.54
	0.022	0	0.023	-4.54
	0.022	0	0.022	0
	0.021	4.54	0.022	0
	0.022	0	0.022	0
	$\bar{X}$	0.022 ± 0.0002		0.022 ± 0.0003
SS	0.0005		0.0007	
BSS (%)	2.27		3.18	
0.070	0.068	2.94	0.071	-1.43
	0.070	0	0.072	-2.94
	0.071	-1.43	0.072	-2.94
	0.071	-1.43	0.069	1.43
	0.070	0	0.071	-1.43
	0.071	-1.43	0.070	0
$\bar{X}$	0.070 ± 0.0006		0.071 ± 0.0005	
SS	0.0012		0.0012	
BSS (%)	1.71		1.69	
0.120	0.121	-0.83	0.118	1.67
	0.119	0.83	0.119	0.83
	0.118	1.67	0.121	-0.83
	0.122	-1.67	0.120	0
	0.120	0	0.121	-0.83
	0.121	-0.83	0.122	-1.67
$\bar{X}$	0.120 ± 0.0006		0.120 ± 0.0006	
SS	0.0015		0.0015	
BSS (%)	1.25		1.25	

<sup>1</sup>Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

<sup>2</sup>Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

$\bar{X}$  : Ortalama ± Standart hata, SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

**Tablo 4.7.** SWV yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları  
(n = 6)

TOB miktarı (nM)	Gün İçi <sup>1</sup>		Günler Arası <sup>2</sup>	
	Bulunan miktar	% Bağlı hata	Bulunan miktar	% Bağlı hata
1.00	0.99	1.01	1.04	3.85
	1.02	1.96	0.98	2.04
	1.00	0	1.03	2.91
	1.03	2.91	1.00	0
	1.02	1.96	0.97	3.09
	1.00	0	1	0
	$\bar{X}$	1.01 ± 0.01		1.00 ± 0.02
SS	0.015		0.018	
BSS (%)	1.78		2.10	
4.00	4.00	0	4.04	0.99
	4.03	0.74	4.00	0
	3.96	1.01	3.96	1.01
	4.00	0	4.00	0
	3.98	0.51	4.03	0.74
	4.00	0	4.02	0.50
$\bar{X}$	3.99 ± 0.02		4.01 ± 0.03	
SS	0.017		0.009	
BSS (%)	1.71		2.04	
8.00	7.97	0.38	8.00	0
	8	0	8.03	0.37
	7.99	0.13	8.00	0
	8	0	8.04	0.50
	8	0	8.00	0
	8.03	0.37	8.00	0
$\bar{X}$	7.98 ± 0.05		8.01 ± 0.04	
SS	0.041		0.018	
BSS (%)	1.33		1.89	

<sup>1</sup>Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

<sup>2</sup>Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

$\bar{X}$  : Ortalama ± Standart hata, SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

#### 4.4.5. Tekrarlanabilirlik

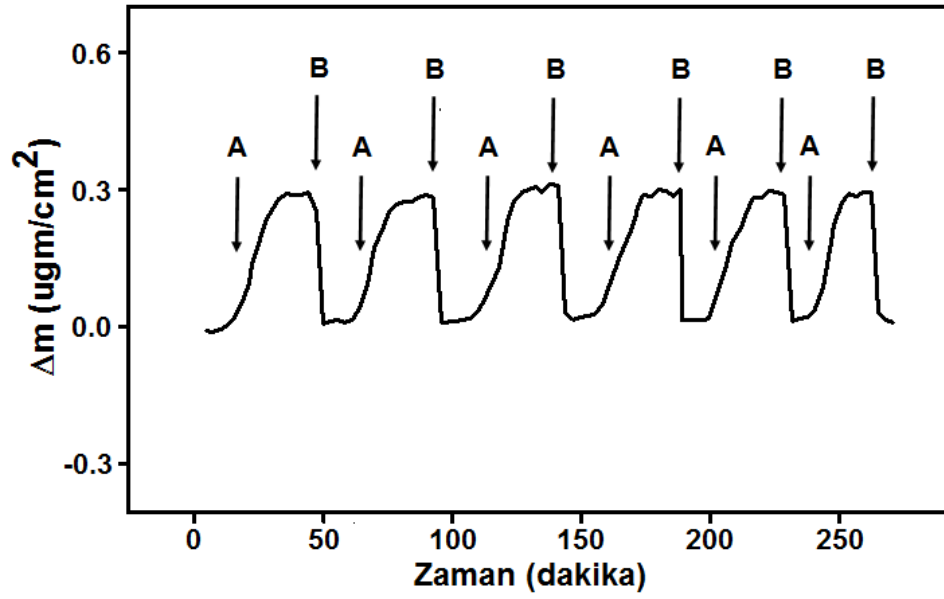
Önerilen her iki yöntem için sensör tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.8' de verilmiştir.

**Tablo 4.8.** Sensör tekrarlanabilirliği bulguları (Eklenen TOB derişimi QCM yöntemi için 0.054 nM ve SWV yöntemi için 2.0 nM ) (n = 6)

QCM Yöntemi	SWV Yöntemi
$\Delta m$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	ip ( $\mu\text{A}$ )
0.352	1.87
0.355	1.86
0.354	1.85
0.355	1.88
0.356	1.87
0.352	1.87
$\bar{X} = 0.354 \pm 0.00060$	$\bar{X} = 1.87 \pm 0.018$
SS = 0.0017	SS = 0.36
BSS = % 0.47	BSS = % 0.87
GA = 0.353 – 0.355	GA = 1.85 – 1.89

$\bar{X}$  : Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı ( $\alpha :0.05$ ) (Bkz. Ek 2)

Şekil 4.22'de 0.054 nM derişiminde TOB çözeltilerinin ard arda birlikte verildiği TOB baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı  $\Delta m$  değerlerini gösteren sensorgram görülmektedir.



**Şekil 4.22.** 0.054 nM derişiminde TOB çözeltilerinin ard arda birlikte verildiği TOB baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı  $\Delta m$  değerlerini gösteren sensorgram. (A) adsorpsiyon, (B) desorpsiyon

#### 4.4.6. Sağlamlık ve Tutarlılık

Sağlamlık ve Tutarlılık çalışmalarına ait sonuçlar ve istatistiksel olarak karşılaştırma sonuçları Tablo 4.9 – Tablo 4.12’de verilmiştir.

**Tablo 4.9.** QCM yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)

	Bulunan (nM)	BSS (%)	Karşılaştırma Sonuçları
pH 7.50 (0.054 nM)	$0.052 \pm 0.025$	1.15	-
pH 7.40	$0.054 \pm 0.036$	1.41	$T_H = 7.5$
pH 7.60	$0.055 \pm 0.042$	0.97	$T_H = 5.0$

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Wilcoxon Testi)

T tablo = 2.0 (p > 0.05) Sonuçlar arasında fark yoktur

**Tablo 4.10.** SWV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)

	Bulunan (nM)	BSS (%)	Karşılaştırma Sonuçları
pH = 7.00 (2.0 nM)	2.0 ± 0.11	1.21	-
pH 6.90	2.02 ± 0.19	1.42	T <sub>H</sub> = 9.0
pH 7.10	2.03 ± 0.25	1.11	T <sub>H</sub> = 7.0
İlk potansiyel ( -0.55 V )	1.97 ± 0.39	0.74	T <sub>H</sub> = 12.0
İlk potansiyel ( -0.65 V )	1.99 ± 0.29	1.08	T <sub>H</sub> = 12.0

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Wilcoxon Testi)

T tablo = 2.0 (p > 0.05) Sonuçlar arasında fark yoktur

**Tablo 4.11.** QCM yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları

SWV yöntemi ( n = 7)		
	1. Analizci	2. Analizci
Eklenen miktar	Bulunan miktar (nM)	Bulunan miktar (nM)
TOB 0.054 nM	0.053	0.052
	0.054	0.054
	0.054	0.054
	0.051	0.053
	0.051	0.053
	0.055	0.053
	0.054	0.052
$\bar{X}$	0.053 ± 0.00059	0.053 ± 0.00031
SS	0.0016	0.00082
BSS	2.96	1.54
GA	0.0524 – 0.0536	0.0527 – 0.0533
T <sub>Hesap</sub> : 7.5 > T <sub>Tablo</sub> : 2.0, p > 0.05 (Wilcoxon Testi)		

$\bar{X}$  : Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı (α :0.05) (Bkz. Ek 2)



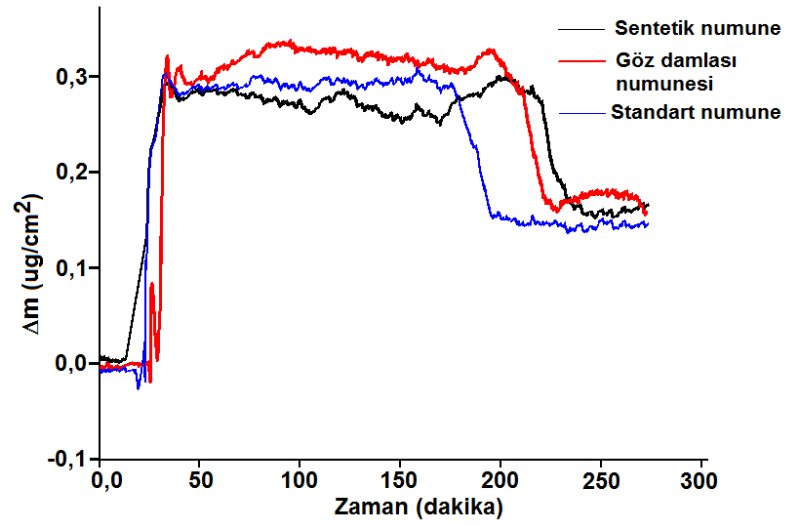
**Tablo 4.12.** SWV yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları

SWV yöntemi (n = 7)		
	1. Analizci	2. Analizci
Eklenen miktar	Bulunan miktar (nM)	Bulunan miktar (nM)
TOB 2.0 nM	2.02	1.97
	2.03	1.98
	1.98	2.01
	2.01	2.03
	2.00	2.00
	2.03	2.01
	1.99	1.98
$\bar{x}$	2.01 ± 0.014	2.00 ± 0.039
SS	0.02	0.02
BSS	0.99	1.00
GA	2.02 – 1.99	2.04 – 1.96
$T_{\text{Hesap}} : 5.0 > T_{\text{Tablo}} : 2.0, p > 0.05$ (Wilcoxon Testi)		

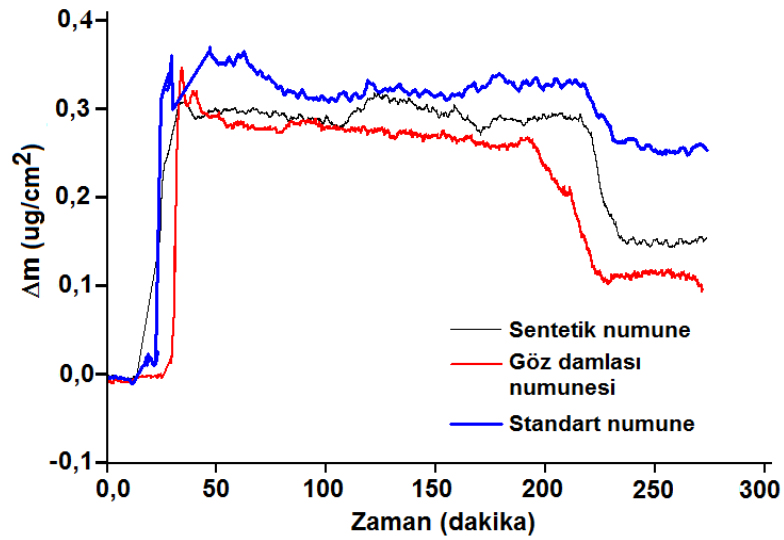
$\bar{x}$  : Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı ( $\alpha :0.05$ ) (Bkz. Ek 2)

#### 4.4.7. Özgüllük (Seçicilik)

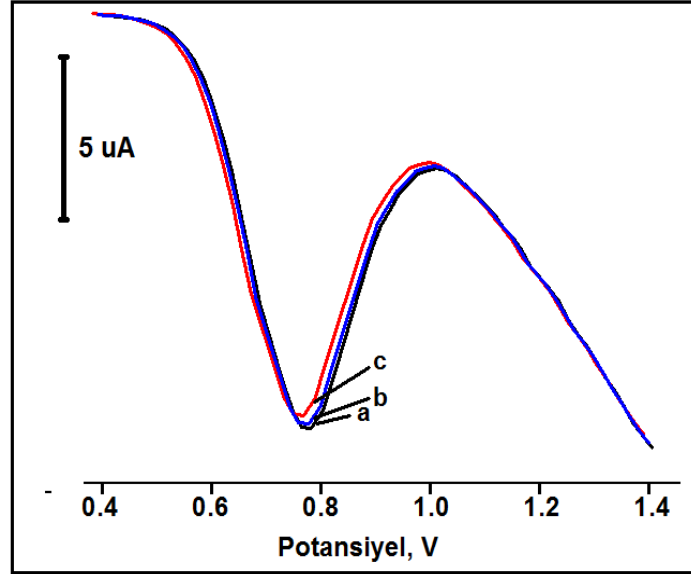
Yöntemlerin her bir ilaç (TOBRADEX<sup>®</sup> ve TOBİ<sup>®</sup>) için özgüllük çalışmalarının QCM ve SWV yöntemleri için sırasıyla 0.054 nM ve 2.0 nM TOB içeren standart, tablet ve sentetik preparat çözeltilerinin kaydedilen sensorgramları ve voltamogramları Şekil 4.23 – Şekil 4.26’da görülmektedir.



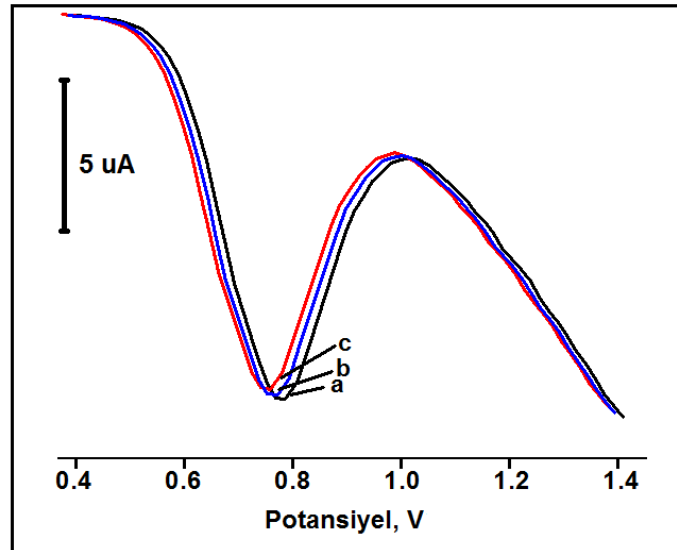
**Şekil 4.23.** 0.054 nM TOB derişiminde standart, göz damlası ve sentetik numune çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı  $\Delta m$  değerlerini gösteren sensorgramlar (TOBRADEX<sup>®</sup> için)



**Şekil 4.24.** 0.054 nM TOB derişiminde standart, göz damlası ve sentetik numune çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı  $\Delta m$  değerlerini gösteren sensorgramlar (TOBİ<sup>®</sup> için)



**Şekil 4.25.** 2.0 nM TOB derişiminde (a) standart, (b) göz damlası ve (c) sentetik numune çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış voltametik sensör arasındaki etkileşimlere ait kare dalga voltammogramları (TOBRADEX<sup>®</sup> için)



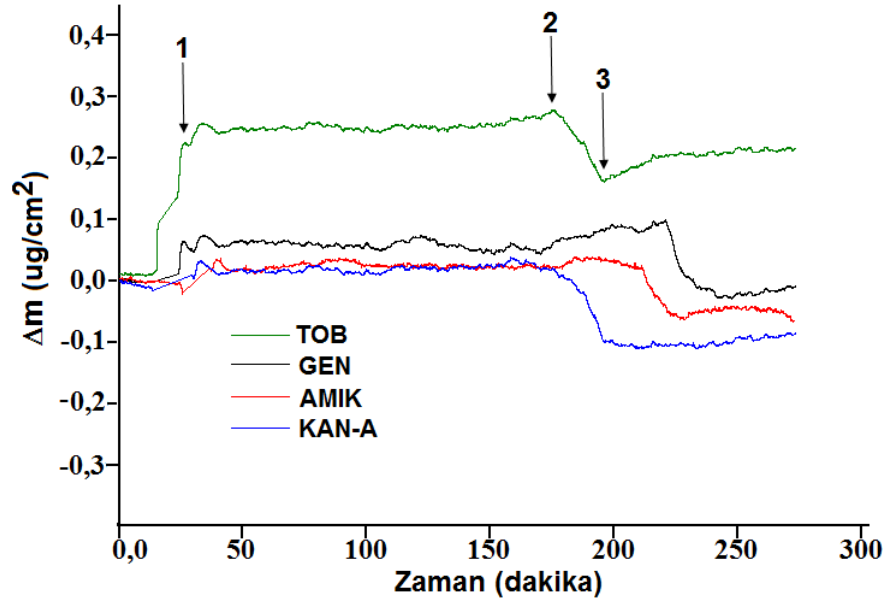
**Şekil 4.26.** 2.0 nM TOB derişiminde (a) standart, (b) göz damlası ve (c) sentetik numune çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış voltametik sensör arasındaki etkileşimlere ait kare dalga voltammogramları (TOBI<sup>®</sup> için)

Geliştirilen her iki yöntem için yöntemin özgünlüğü, standart ekleme yönteminin ilaç çözeltilerine ve gıda numunelerine uygulanmasıyla elde edilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri Tablo 4.13’de verilmiştir.

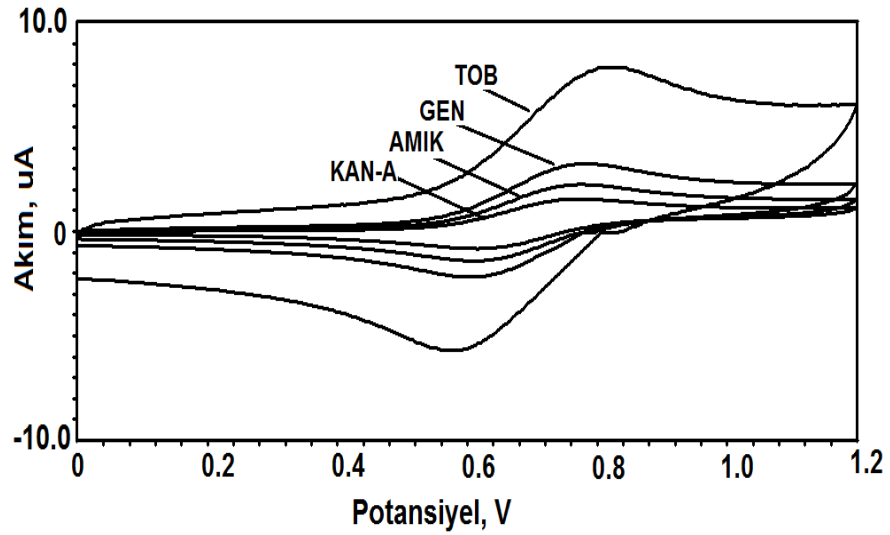
**Tablo 4.13.** Standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri

Numune	Kalibrasyon eğrisi	
	QCM	SWV
TOBRADEX <sup>®</sup>	$y = 2.742x + 7.814$	$y = 1.014x + 4.178$
TOBİ <sup>®</sup>	$y = 2.803x + 8.219$	$y = 0.989x + 5.014$
Süt	$y = 2.703x + 9.477$	$y = 0.987x + 8.258$
Yumurta	$y = 2.821x + 10.841$	$y = 0.980x + 9.256$

TOB, GEN, AMIK, KAN-A çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış QCM ve elektroanalitik sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar ve voltammogramlar Şekil 4.27 – Şekil 4.28’de verilmiştir.



Şekil 4.27. 0.054 nM TOB, GEN, AMIK, KAN-A çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı  $\Delta m$  değerlerini gösteren sensorgramlar. (1) adsorpsiyon, (2) desorpsiyon, (3) rejenerasyon



Şekil 4.28. 10.0 nM TOB, GEN, AMIK, KAN-A çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmış elektokimyasal sensör arasındaki etkileşimlere ait dönüşümlü voltamogramları

GEN, AMIK ve KAN-A için TOB moleküllerine göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğine göre belirlenmiştir.

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (4.1)$$

Eşitlikte  $K_d$  dağılma katsayısını ( $1/nM$ );  $C_i$  ve  $C_f$  analit moleküllerinin başlangıç ve sonuç derişimlerini ( $nM$ );  $V$ , kullanılan çözelti hacmini ( $mL$ ) ve  $m$ , polimerin ağırlığını ( $g$ ) ifade etmektedir. Ancak; sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi ve derişimin  $\Delta m$  (kütle) yada  $\Delta I$  (akım) ile doğrusal ilişkide olmasıdır.

Bu durumda seçicilik katsayısı,

$$k = \Delta m_{\text{kalıp}} / \Delta m_{\text{girişimci}} \text{ veya } \Delta I_{\text{kalıp}} / \Delta I_{\text{girişimci}} \quad (4.2)$$

şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için kullanılan bağıl seçicilik katsayısı ( $k'$ ) ise;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (4.3)$$

şeklinde ifade edilebilir. Hazırlanan TOB baskılanmış sensörlerin TOB'a karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri GEN, AMIK ve KAN-A çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensörlerin bu karışımlara gösterdiği tepki Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de görülmektedir. Geliştirilen sensörler için TOB'a göre GEN, AMIK ve KAN-A için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları Tablo 4.14 – Tablo 4.15'te verilmiştir.

**Tablo 4.14.** TOB'a göre GEN, AMIK ve KAN-A için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları (QCM sensörü için)

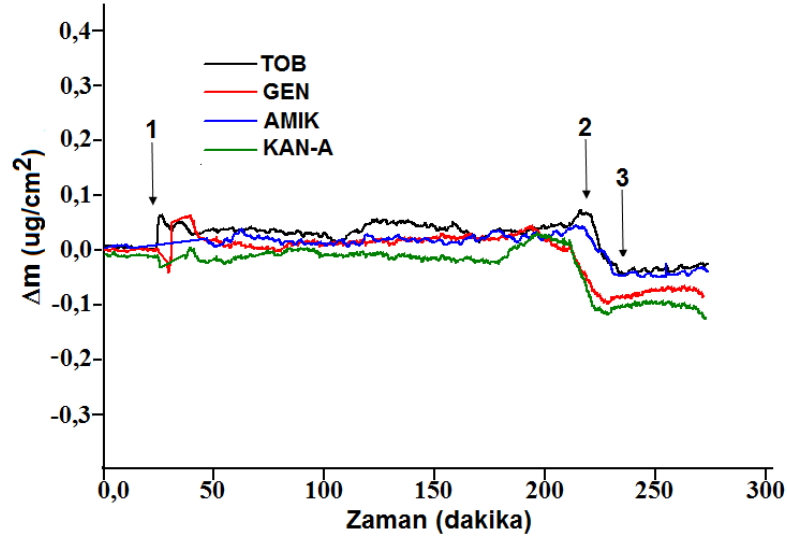
	MIP		NIP		k'
	$\Delta m$	k	$\Delta m$	k	
TOB	0.300	-	0.024	-	-
GEN	0.030	10.00	0.022	1.10	9.10
AMIK	0.025	12.00	0.030	0.80	15.00
KAN-A	0.027	11.11	0.020	1.20	9.30

**Tablo 4.15.** TOB'a göre GEN, AMIK ve KAN-A için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları (Elektrokimyasal sensör için)

	MIP		NIP		k'
	$\Delta I (\mu A)$	k	$\Delta I (\mu A)$	k	
TOB	10.21	-	2.03	-	-
GEN	1.53	6.68	0.75	2.71	2.45
AMIK	1.47	6.95	0.85	2.38	2.92
KAN-A	1.35	7.56	0.91	2.23	3.40

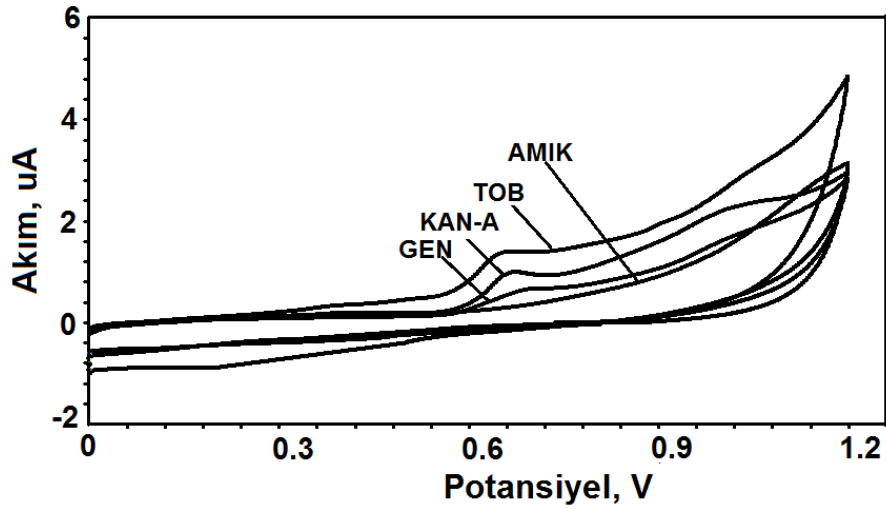
#### 4.5. Geliştirilen Nanosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

TOB baskılanmış sensörlerin baskılama seçiciliğini göstermek için TOB baskılanmamış QCM ve elektrokimyasal sensörlerde de hazırlanmıştır. 0.054 nM derişimdeki TOB, GEN, AMIK ve KAN-A çözeltileri QCM sistemine gönderilmiştir. Baskılanmamış sensörün bu çözeltilere verdiği sinyaller Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.29.** 0.054 nM derişiminde TOB, GEN, AMIK ve KAN-A çözeltilerinin birlikte verildiği TOB baskılanmamış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı  $\Delta m$  değerlerini gösteren sensorgramlar. (1) adsorpsiyon, (2) desorpsiyon, (3) rejenerasyon

Şekil 4.30'da 10.0 nM TOB, GEN, AMIK, KAN-A çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmamış elektokimyasal sensörün verdiği sinyaller görülmektedir.



**Şekil 4.30.** 10.0 nM TOB, GEN, AMIK, KAN-A çözeltilerinin verildiği TOB baskılanmamış elektokimyasal sensör arasındaki etkileşimlere ait dönüşümlü voltamogramları



#### 4.6. Geri Kazanım

3.0 ve 60.0 mg TOB içeren sentetik ilaç çözeltilerine ve süt ve yumurta özütü ile elde edilen geri kazanım değerleri geliştirilen QCM sensörü için Tablo 4.16 – Tablo 4.18’de verilmiştir.

**Tablo 4.16.** QCM sensörü için sentetik preparatların analiz bulguları (TOBRADEX®)  
(Eklenen TOB miktarı 3.0 mg) (n = 7)

Bulunan TOB (mg)	Geri Kazanım (%)
3.08	102.3 ± 0.8
2.93	97.4 ± 1.2
3.01	97.6 ± 1.7
3.09	98.8 ± 2.4
2.96	98.7 ± 1.1
2.95	98.3 ± 0.9
3.03	101.1 ± 1.2

**Tablo 4.17.** QCM sensörü için sentetik preparatların analiz bulguları (TOBI®)  
(Eklenen TOB miktarı 60.0 mg) (n = 7)

Bulunan TOB (mg)	Geri Kazanım (%)
60.03	100.0 ± 0.7
59.87	99.8 ± 1.4
59.48	99.1 ± 1.1
61.05	101.7 ± 1.8
60.78	101.3 ± 0.8
59.14	98.6 ± 2.2
60.04	100.1 ± 2.7

**Tablo 4.18.** QCM sensörü için TOB'un süt ve yumurtadan özütlenmesi sonucu hesaplanan geri kazanım değerleri (n=7)

Numune	Eklenen TOB miktarı (mol L <sup>-1</sup> )	Bulunan TOB miktarı (mol L <sup>-1</sup> )	Geri Kazanım (%)
Süt	-	4.12 (± 0.04) × 10 <sup>-11</sup>	-
	2.14 × 10 <sup>-11</sup>	5.94 (± 0.01) × 10 <sup>-11</sup>	94.9 ± 3.4
	7.00 × 10 <sup>-11</sup>	10.88 (± 0.04) × 10 <sup>-11</sup>	97.8 ± 2.4
	12.00 × 10 <sup>-11</sup>	15.16 (± 0.06) × 10 <sup>-11</sup>	94.0 ± 1.9
Yumurta	-	8.42 (± 0.07) × 10 <sup>-11</sup>	-
	2.14 × 10 <sup>-11</sup>	9.64 (± 0.03) × 10 <sup>-11</sup>	91.3 ± 2.1
	7.00 × 10 <sup>-11</sup>	14.84 (± 0.03) × 10 <sup>-11</sup>	96.2 ± 3.2
	12.00 × 10 <sup>-11</sup>	19.52 (± 0.02) × 10 <sup>-11</sup>	95.6 ± 2.8

3.0 ve 60.0 mg TOB içeren sentetik ilaç çözeltilerine ve süt ve yumurta özütü ile elde edilen geri kazanım değerleri geliştirilen elektrokimyasal sensör için Tablo 4.19 – Tablo 4.21’de verilmiştir.

**Tablo 4.19.** Elektrokimyasal sensör için sentetik preparatların analiz bulguları  
(TOBRADEX<sup>®</sup>) (Eklenen TOB miktarı 3.0 mg) (n = 7)

Bulunan TOB (mg)	Geri Kazanım (%)
2.97	99.0 ± 0.2
3.04	101.3 ± 0.4
3.07	102.3 ± 1.3
2.90	96.7 ± 2.1
3.09	103.00 ± 0.7
3.07	102.3 ± 1.4
2.94	98.0 ± 0.7

**Tablo 4.20.** Elektrokimyasal sensör için sentetik preparatların analiz bulguları  
(TOBI®) (Eklenen TOB miktarı 60.0 mg) (n = 7)

Bulunan TOB (mg)	Geri Kazanım (%)
58.78	97.9 ± 1.1
60.14	100.2 ± 0.7
58.87	98.1 ± 0.9
59.71	99.5 ± 1.3
61.02	101.7 ± 1.7
60.74	101.2 ± 1.7
59.74	99.6 ± 1.7

**Tablo 4.21.** Elektrokimyasal sensör için TOB'un süt ve yumurtadan özütlenmesi sonucu hesaplanan geri kazanım değerleri (n=7)

Numune	Eklenen TOB miktarı (mol L <sup>-1</sup> )	Bulunan TOB miktarı (mol L <sup>-1</sup> )	Geri Kazanım (%)
Süt	-	$1.91 (\pm 0.02) \times 10^{-9}$	-
	$2.0 \times 10^{-9}$	$3.65 (\pm 0.01) \times 10^{-9}$	$93.4 \pm 1.4$
	$4.0 \times 10^{-9}$	$5.74 (\pm 0.03) \times 10^{-9}$	$97.1 \pm 3.1$
	$6.0 \times 10^{-9}$	$7.22 (\pm 0.02) \times 10^{-9}$	$91.3 \pm 2.9$
Yumurta	-	$3.17 (\pm 0.05) \times 10^{-9}$	-
	$2.0 \times 10^{-9}$	$4.94 (\pm 0.01) \times 10^{-9}$	$95.6 \pm 3.1$
	$4.0 \times 10^{-9}$	$7.25 (\pm 0.06) \times 10^{-9}$	$101.1 \pm 2.2$
	$6.0 \times 10^{-9}$	$9.98 (\pm 0.05) \times 10^{-9}$	$91.2 \pm 1.2$

#### 4.7. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları

TOBRADEX<sup>®</sup> ve TOBI<sup>®</sup> analizleri geliştirilen iki yöntem ile yapılmış olup veriler Tablo 4.22 - Tablo 4.23'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.22.** TOBRADEX® göz damlasına ait kalibrasyon grafiği yöntemi ile elde edilen analiz bulguları (3 mg TOB/mL) (n = 7)

QCM Yöntemi	SWV Yöntemi
Bulunan (mg)	Bulunan (mg)
3.07	2.91
2.87	3.08
2.91	3.07
3.08	3.04
3.04	2.91
3.09	2.95
3.04	3.05
$\bar{X} : 3.01 \pm 0.033$	$\bar{X} : 3.00 \pm 0.028$
SS : 0.088	SS : 0.08
BSS : 2.92	BSS : 2.67
GA : 3.04 – 2.98	GA : 3.03 – 2.97
Kruskal Wallis varyans analizi $KW_T = 7.815 > KW_H = 4.13, p < 0.05$	

$\bar{X}$  : Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı ( $\alpha :0.05$ ) (Bkz. Ek 2)

**Tablo 4.23.** TOBI® göz damlasına ait kalibrasyon grafiği yöntemi ile elde edilen analiz bulguları (60 mg TOB/mL) (n = 7)

QCM Yöntemi	SWV Yöntemi
Bulunan (mg)	Bulunan (mg)
59.87	61.74
60.08	60.41
60.17	60.31
59.17	59.45
61.21	61.47
60.71	60.88
61.28	59.70
$\bar{X} : 60.36 \pm 0.29$	$\bar{X} : 60.57 \pm 0.32$
SS : 0.76	SS : 0.85
BSS : 1.26	BSS : 1.40
GA : 60.65 – 60.07	GA : 60.89 – 60.25
Kruskal Wallis varyans analizi $KW_T = 7.815 > KW_H = 5.17, p < 0.05$	

$\bar{X}$  : Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı ( $\alpha :0.05$ ) (Bkz. Ek 2)



#### 4.8. Denge İzoterm Modelleri

TOB baskılanmış sensörler ile TOB arasındaki etkileşimi aydınlatmak amacıyla sensorgram ve voltamogram verilerine üç farklı izoterm modeli uygulanmıştır. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri:

Langmuir  $\Delta m = \{\Delta m_{\text{maks}}[C]/(K_D + [C])\}$  (QCM için)

$$\Delta I = \{\Delta I_{\text{maks}}[C]/(K_D + [C])\} \quad (\text{SWV için})$$

Freundlich  $\Delta m = \Delta m_{\text{maks}} [C]^{1/n}$  (QCM için)

$$\Delta I = \Delta I_{\text{maks}} [C]^{1/n} \quad (\text{SWV için})$$

Langmuir-Freundlich  $\Delta m = \{\Delta m_{\text{maks}}[C]^{1/n}/(K_D + [C]^{1/n})\}$  (QCM için)

$$\Delta I = \{\Delta I_{\text{maks}}[C]^{1/n}/K_D + [C]^{1/n}\} \quad (\text{SWV için})$$

Bu eşitliklerde;

$\Delta m_{\text{maks}}$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) veya  $\Delta I_{\text{maks}}$  ( $\mu\text{A}$ ); maksimum sinyal kaymasını

$\Delta m_{\text{denge}}$  veya  $\Delta I_{\text{denge}}$ ; denge halindeki sinyal kaymasını

$[C]$ ; analit derişimini (nM)

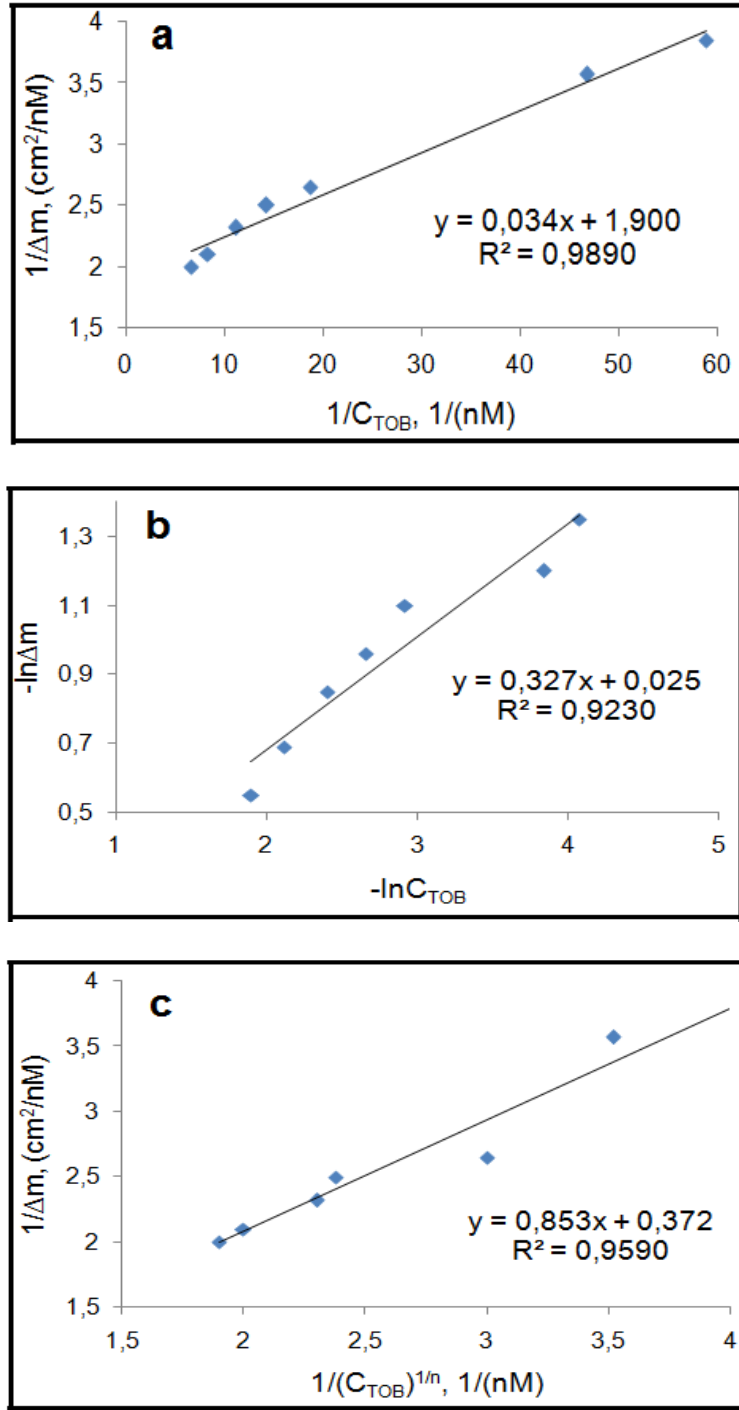
$K_A$  (nM); bağlanma denge sabitini

$K_D$  (1/nM); ayrılma denge sabitini

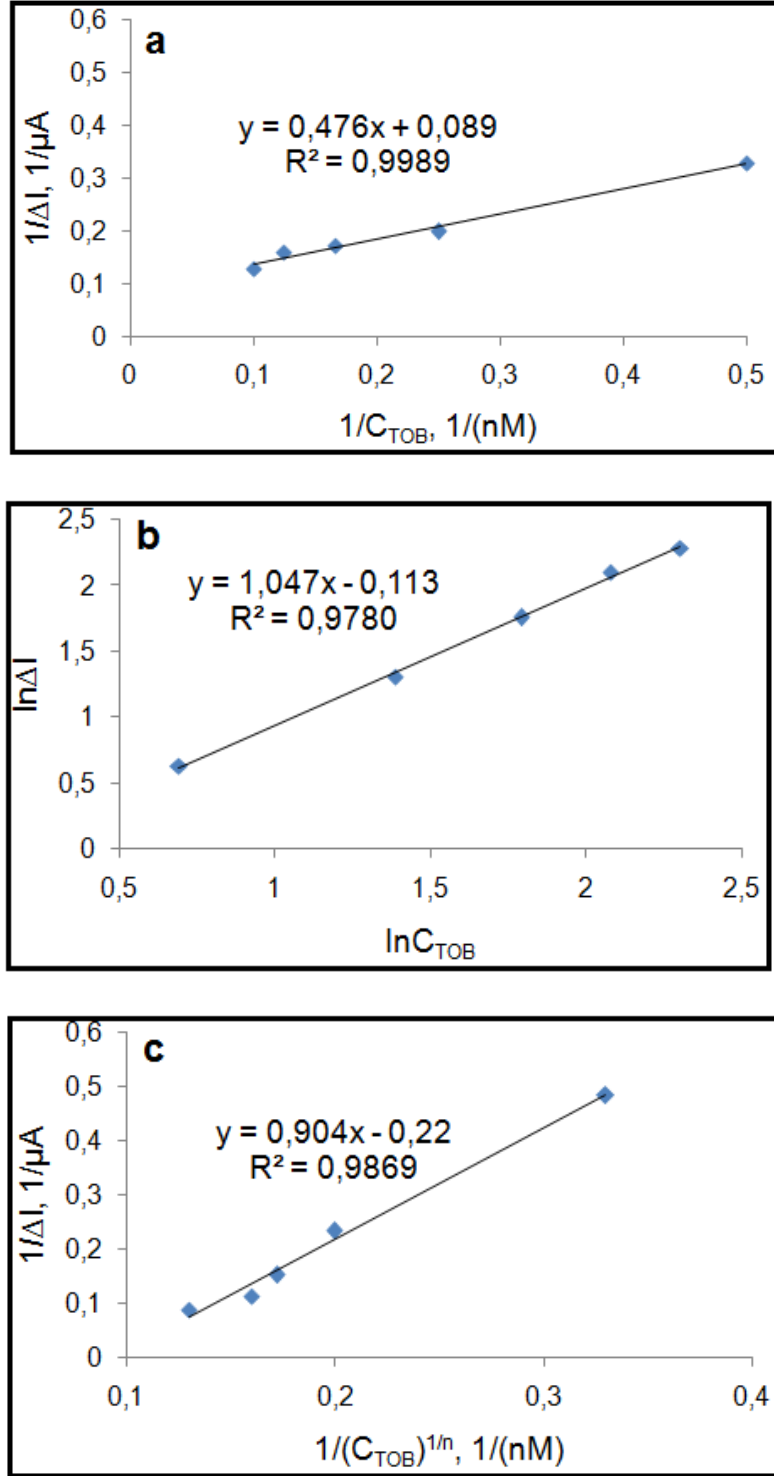
1/n; Freundlich yüzey heterojenite indeksini göstermektedir.

Langmuir adsorpsiyon modeli tek tabakalı homojen, Freundlich adsorpsiyon modeli ise heterojen bağlanma varsayımına dayanır. Langmuir modeli, moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermine yaygın olarak kullanılmıştır. Moleküler baskılanmış polimerlerin heterojen bağlanma bölgeleri de içerdiği son zamanlarda rapor edilmiştir. Freundlich adsorpsiyon modeli özellikle düşük derişimlerde MIP sistemlerine uygunluk göstermektedir (118,119) . Fakat bu model yüksek derişim değerlerinde bazı sapmalar göstermektedir. Bu sapmaları engellemek için Langmuir-Freundlich karma modeli kullanılabilir. Bu model heterojenite olduğu durumda çok düşük derişimlerden doyunluğa kadar MIP

sistemleriyle uygunluk göstermektedir. Şekil 4.31 ve Şekil 4.32’de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich’e ait grafikler verilmiştir.



**Şekil 4.31.** QCM yöntemi için adsorpsiyon modelleri: (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich



Şekil 4.32. SWV yöntemi için adsorpsiyon modelleri: (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich

Ayrıca Tablo 4.24 – Tablo 4.25’de QCM ve SWV yöntemleri için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.24.** QCM yöntemi için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

<b>Langmuir</b>		<b>Freundlich</b>		<b>Langmuir-Freundlich</b>	
$\Delta m_{maks}$	0.5230	$\Delta m_{maks}$	1.030	$\Delta m_{maks}$	2.6860
$K_A$ , nM	55.56	1/n	0.3270	1/n	0.3270
$K_D$ , 1/nM	0.018	$R^2$	0.9230	$K_A$ , nM	0.4360
$R^2$	0.9890			$K_D$ , 1/nM	2.2930
				$R^2$	0.9590

**Tablo 4.25.** SWV yöntemi için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

<b>Langmuir</b>		<b>Freundlich</b>		<b>Langmuir-Freundlich</b>	
$\Delta I_{maks}$	11.23	$\Delta I_{maks}$	1.119	$\Delta I_{maks}$	4.55
$K_A$ , nM	0.187	1/n	1.047	1/n	1.047
$K_D$ , 1/nM	5.34	$R^2$	0.9780	$K_A$ , nM	0.243
$R^2$	0.9989			$K_D$ , 1/nM	4.11
				$R^2$	0.9869

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında aminoglikozid grubu antibiyotiği olan TOB'un gıda numunelerinden (süt ve yumurta) ve farmasötik preparatlardan analizi için QCM ve elektrokimyasal tabanlı nanosensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemlerin validasyon çalışmaları yapıldıktan sonra gerçek numunelere uygulanabilirliği gösterilmiştir. TOB'un metanol, asetonitril ve su gibi çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğü incelenmiş ve en uygun çözücü olarak su seçilmiştir. Bu nedenle stok TOB çözeltisi su ile hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler 0.1 M fosfat tamponu ile yapılmıştır.

### 5.1. Geliştirilen QCM Sensörünün Karakterizasyon Çalışmaları

#### 5.1.1. FTIR Analizi

TOB baskılanmış QCM nanosensörü öncelikle FTIR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. FTIR spektrumundan görüldüğü üzere monomerlerden (HEMA ve MAGA) kaynaklanan –OH bandları  $3310\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmüştür. Ayrıca alkil –CH gerilme bandları  $2918\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmüştür. MAGA monomerinden kaynaklanan –C=O gerilmesi  $1738\text{ cm}^{-1}$ , amit I ve II bandları  $1621\text{ cm}^{-1}$  ve  $1540\text{ cm}^{-1}$ 'de, –COO titreşimleri  $1429\text{ cm}^{-1}$  ve  $1375\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmüştür. FTIR sonuçları QCM sensör yüzeyinde polimerik filminin başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermiştir (Bkz. Şekil 4.1).

#### 5.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi

Modifiye edilmemiş, Allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve TOB baskılanmış QCM filminin yüzey morfolojisi yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. AFM görüntülerinde de görüldüğü üzere modifikasyon ve polimer oluşumu ile birlikte yüzey topolojisi önemli bir oranda değişmektedir. Hazırlanan yüzeylerin sırasıyla yüzey derinlikleri  $2.48 \pm 0.45$ ,  $7.10 \pm 1.17$  ve  $16.90 \pm 2.07$  nm olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlara göre modifiye edilmemiş QCM çipinin allil merkaptan ile başarılı bir şekilde homojen olarak modifiye edildiği görülmektedir. Ayrıca bu sonuçlar allil merkaptan ile modifiye edilmiş QCM çipi üzerinde polimerizasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir (Bkz. Şekil 4.2).

### 5.1.3. Elipsometre Analizi

QCM çipinin yüzey karakterizasyonu için ayrıca elipsometrik ölçümler yapılmıştır. AFM sonuçları ile elipsometrik sonuçlar arasında bir uyumun olduğu Şekil 4.3'te görülmektedir. Elipsometrik sonuçlara göre TOB baskılanmış QCM filminin yüzey kalınlığı  $12.80 \pm 1.40$  nm olarak ölçülmüş ve böylece homojen ve tek tabakalı bir filmin oluşumu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 5.1.4. Temas Açısı Analizleri

Modifiye edilmemiş ve allil merkaptan ile modifiye edilmiş QCM filminin temas açısı değerleri sırasıyla  $79.14 \pm 1.48$  ve  $70.34 \pm 2.04$  olarak bulunmuştur. Yüzey temas açılarındaki azalış yüzeyin hidrofilik karakterinin artmasını göstermektedir. TOB baskılanmış QCM filminin temas açısı değeri ise  $63.22 \pm 3.12$  olarak bulunmuştur. Temas açısındaki bu azalma yüzeye giren  $-OH$  ve  $-COOH$  gruplarının hidrofilik karakterinden kaynaklanmakta olup bu sonuçlar FTIR sonuçlarıyla örtüşmektedir (Bkz. Şekil 4.4).

## 5.2. Geliştirilen Elektroanalitik Sensörünün Karakterizasyon Çalışmaları

### 5.2.1. FTIR Analizi

TOB baskılanmış polipirol camısı karbon yüzeyinin FTIR spektrumu Şekil 4.5'te verilmiştir. FTIR spektrumunda polipirol yapısına ait  $-NH$  gerilme bandı  $3587$   $cm^{-1}$ 'de, eğilme bandı  $1150$   $cm^{-1}$ 'de görülmüştür. Aromatik  $-CH$  gerilme bandı  $3290$   $cm^{-1}$ 'de, alifatik  $-CH$  gerilme bandı  $2926$   $cm^{-1}$ 'de görülmüştür. Ayrıca  $1590$  ve  $1542$   $cm^{-1}$ 'de pirol halkasının  $-C=C$  gerilme titreşimleri,  $1325$   $cm^{-1}$ 'de  $-CN$  gerilme titreşimi,  $780$   $cm^{-1}$ 'de  $-CH$  yüzey dışı eğilme ve  $687$   $cm^{-1}$ 'de  $-CC$  yüzey dışı eğilme absorpsiyon bandları görülmüştür (120) .

### 5.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi

Modifiye edilmemiş ve TOB baskılanmış polipirol camısı karbon yüzeyinin yüzey morfolojisi yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Bu hazırlanan yüzeylerin sırasıyla yüzey derinlikleri  $9.60 \pm 1.81$  ve  $42.80 \pm 1.48$  nm olarak bulunmuştur. AFM görüntüleri incelendiğinde elektrot yüzeyindeki pürüzlülük artışı açıkça görülmektedir (Bkz. Şekil 4.6).

### 5.2.3. Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

TOB baskılanmış polipirol camısı karbon yüzeyinin elektrokimyasal karakterizasyonu iki redoks aktif probu kullanılarak gerçekleştirilmiştir: (i) 0.1 M KCl çözeltisinde hazırlanmış 1.0 mM potasyum ferrisiyanür probu (ii) 0.1 M TBATFB destek elektroliti içeren MeCN çözeltisinde hazırlanmış 1.0 mM ferrosen probu. TOB baskılanmış polipirol camısı karbon elektrotunda bu redoks problemlerinin alınan dönüşümlü voltamogramlarına göre camısı karbon elektrodunda görülen tersinir redoks pikleri baskılanmış elektrotta tamamen ortadan kaybolmuştur. Bu sonuçlar camısı karbon yüzeyinde polimerik bir tabakanın oluşumunun önemli bir belirtisi olarak kabul edilebilir (Bkz. Şekil 4.7).

### 5.2.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopik Çalışmalar

Şekil 4.8'de verilen impedans verilerine göre aktif hale getirilmiş camısı karbon elektrodu negatif yüklü  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  redoks probunu yüzeyden iteeceğinden dolayı yüksek bir yük transfer direnci ( $R_{ct}$ ) göstermektedir. Camısı karbon yüzeyinde hedef molekül (TOB) varlığında pirol monomerinin elektropolimerizasyonundan sonra yük transfer direnci azalmaktadır (Şekil 4.8.b). Modifiye edilmemiş camısı karbon elektrodu ve TOB baskılanmış polipirol camısı karbon elektrodunun yük transfer dirençleri sırasıyla 30 ve 17 ohm olarak ölçülmüştür. Bu azalmanın en büyük nedeni yüzeyde oluşan pozitif yüklü polimerik filminden dolayı elde edilen bu polimerik yüzeyin negatif yüklü  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  redoks probunu yüzeye yaklaştırıp elektron transferini kolaylaştırmasından kaynaklanmaktadır. NaCl çözeltisi kullanılarak TOB molekülü uzaklaştırıldıktan sonra yük transfer direnci polipirol yapıdaki nano boşlukların ortaya çıkması ve dolayısıyla pozitif yüklerin daha da artmasıyla azalmaktadır (Şekil 4.8.c) (121,122) .

### 5.3. QCM Yönteminde pH Optimizasyonu

Farklı pH değerlerinde hazırlanan 0.1 M fosfat tamponunun 0.054 nM TOB varlığında QCM cevabı üzerine etkisi incelenmiş ve kütle değişimleri ölçülmüştür (Bkz. Şekil 4.9). QCM yüzeyine TOB birikimi pH 7.5 değerine kadar aşamalı olarak artmıştır. Bu durum fonksiyonel monomer olarak kullanılan MAGA'nın yapısına bağlıdır. MAGA glutamik asit temelli bir monomer olup 2.10 ve 4.07 olmak üzere



iki tane pKa değerine sahiptir. pH değerindeki artış bu grupların negatif yüklerle yüklenmesine sebep olmuştur. Bu yükler TOB molekülünün yapısındaki –OH gruplarıyla daha iyi etkileşime girerek yüzeyde TOB birikimini (sensör-analit afinitesi) artırmıştır. Daha ileri pH artışları ise TOB yapısındaki –OH gruplarında iyonlaştırdığı için sensör sinyalinde azalmalar görülmeye başlanmıştır. Bundan dolayı optimum pH değeri olarak 7.5 seçilmiştir.

#### **5.4. Elektroanalitik Yöntemin Optimizasyonu**

Dönüşümlü voltametri yönteminde belli bir derişimde (10.0 nM TOB) seçilen destek elektrolitte belirli bir TOB derişiminde destek elektrolit pH'sı (2-10), monomer (pirol) derişimi (20-100 mM), tarama sayısı (3-8) ve hedef molekül (TOB) derişimi (5-50 mM) değişiminin TOB baskılanmış ve baskılanmamış voltametrik sensör üzerine etkileri incelenmiştir. Piklerin şekli, MIP ve NIP sensör arasındaki akım farkları dikkate alınarak en uygun parametreler; destek elektrolit pH'sı için 7.0, monomer derişimi için 60 mM, tarama sayısı için 5 tarama ve hedef molekül derişimi için 25 mM olarak seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.11 - Şekil 4.14).

#### **5.5. Moleküler Baskılanmış Polipirolün Elektropolimerizasyonu**

TOB baskılanmış polipirol camsı karbon elektrodu, 60 mM pirol ve 25 mM TOB içeren 0.1 M, pH 7.0 fosfat tamponu sisteminde 5 tarama sayısında -0.6 V/+1.8 V potansiyel aralığında dönüşümlü voltametri tekniğiyle elektropolimerizasyon yoluyla elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.15). Elektropolimerizasyon süresince TOB molekülleri camsı karbon elektrodunun yüzeyine difüze ederler ve bu moleküllerin pirol monomeri ile etkileşim yeteneğinden dolayı polimer matriksin içine gömülürler. Şekil 4.15'de görüldüğü üzere ilk taramada yaklaşık 0.72 V potansiyelinde bir yükseltgenme piki görülmektedir. Ondan sonra bu pikin şiddeti tarama sayısının artmasıyla azalır ve beşinci taramadan sonra pik akım şiddeti sabit bir değere ulaşır. Bu bulgular camsı karbon elektroduna pirol monomerinin başarılı bir şekilde elektropolimerize olduğunu göstermektedir. Ayrıca tarama sayısının artmasıyla pik akım şiddetinin sabit bir değere almasının nedeni elektrot yüzeyinde sürekli bir polipirol tabakasının oluşmasından dolayı daha az baskılanmış bölge içeren daha kalın bir polimerik tabakanın oluşmasından kaynaklanmaktadır.

Şekil 4.16'da  $1.0 \times 10^{-8}$  M TOB'un farklı elektrotlarda alınmış kare dalga voltamogramları görülmektedir. TOB baskılanmış polipirel camsı karbon elektrodunda ölçülen pik akımı değeri modifiye edilmemiş camsı karbon elektrodunda ölçülen pik akımı değerinden üç kat daha fazladır. Dahası TOB baskılanmamış polipirel camsı karbon elektrodunda çözelti ortamında TOB ilaç molekülü verimli bir şekilde tayin edilememiştir.

## 5.6. Yöntemlerin Validasyonu

Geliştirilen yöntemlerin validasyonu için kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, doğruluk, kesinlik, özgüllük (seçicilik), sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları yapılmıştır.

### ***Kararlılık***

Çalışılan maddenin 0.001 M derişimindeki stok çözeltilerin oda sıcaklığında ve buzdolabındaki kararlılığının belirlenmesi amacıyla QCM sensorgramları incelenmiştir. Bu çözeltilerden 0.054 nM'lık çözeltiler hazırlanarak QCM sensorgramları alınmış ve taze hazırlanmış çözeltilerin sensorgramları ile karşılaştırılmıştır. Sensorgramlarda elde edilen sinyallerde herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Çalışılan maddenin stok çözeltilerinin buzdolabında minimum bir ay kararlı, oda sıcaklığında ise 12 saat olduğu söylenebilir (Bkz. Tablo 4.1 – Tablo 4.2).

### ***Doğrusallık***

Her iki yöntemde de kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması ve doğrusallık aralıklarının belirlenmesi için TOB'un derişimine karşı gözlenen sinyaller grafiğe geçirilmiştir. QCM yöntemi ile 0.017 – 0.150 nM ve SWV yöntemi ile 0.5 – 10 nM aralığında doğrusal olan kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.18 – Şekil 4.19). Her iki yöntem için doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü yapılmıştır (Bkz. Tablo 4.3 - Tablo 4.4). QCM yöntemi için  $F_H = 3872.25 > F_T = 5.59$  ve SWV yöntemi için  $F_H = 3578.32 > F_T = 5.59$  değerleri elde edilmiş ve bu sonuçlara göre doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Ayrıca korelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak bu katsayıların istatistiksel olarak önemli

değerler olduğu bulunmuştur (QCM yöntemi için  $t_H = 61.78 > t_T = 2.48$  ve SWV yöntemi için  $t_H = 56.78 > t_T = 2.48$ ,  $p < 0.05$ ).

Önerilen analiz yöntemlere ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Yöntemlerin doğrusallığı için kontrol grafikleri çizilmiştir. Grafik yönteminde standart çözeltilerin olması gereken derişimlerine karşı kalibrasyon denkleminde bulunan derişimleri grafiğe geçirilmiştir. (Bkz. Şekil 4.20 – Şekil 4.21). Bu grafiklerde tanımlayıcılık katsayıları ( $R^2$ ), QCM ve SWV yöntemleri için sırasıyla 0.9990 ve 0.9970 olarak eğimler sırasıyla 0.990 ve 1.000 olarak bulunmuştur. Eğimlerin ve tanımlayıcılık katsayılarının yaklaşık olarak 1.0000 bulunması çizilen kalibrasyon eğrilerinin bir doğru olduğunu göstermektedir.

### ***Duyarlılık***

LOD ve LOQ Bölüm 3.8'de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Buna göre TOB'un LOD değerleri QCM yönteminde 0.0057 nM ve SWV yönteminde 0.167 nM olarak bulunmuştur ( $n=7$ ). LOQ değerleri QCM yönteminde 0.017 nM ve SWV yönteminde 0.50 nM olarak bulunmuştur ( $n=7$ ) (Bkz. Tablo 4.5). Bulunan LOD ve LOQ değerlerinin düşük olması geliştirilen her iki yönteminin oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir.

### ***Doğruluk ve Kesinlik***

Doğruluk, ölçülen ve doğru kabul edilen değerler arasındaki uyumun bir ölçüsüdür ve % bağıl hata (BH) ile belirlenmektedir. Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için bilinen numunelerde en az 3 farklı derişimde her derişim için en az 3 analiz sonucu bulunmalıdır.

Kesinlik, sonuçların tekrarlanabilirliğinin göstergesidir. Hazırlanan standart numunelerin yapılan tekrarlı analizleri sonucunda saptanan BSS terimi ile tanımlanır. BSS, standart sapmanın ortalamaya göre yüzde kaçlık bir değişim gösterdiğini belirtir.

TOB'un QCM yöntemi ile tayininde 0.022, 0.070 ve 0.120 nM ve SWV yöntemi için 1.0, 4.0 ve 8.0 nM derişimlerde gün içi ve günler arası tekrarlı analizler yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda 3 farklı derişim seviyesinde altı tane hazırlanan

standart çözeltilerin analizleri aynı gün yapılmış, elde edilen bulguların QCM yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 1.25 – 2.27 arasında, % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak 0.0 – 4.54 ve SWV yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 0.0 – 2.91 arasında, % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak % 0.0 – 1.52 arasında bulunmuştur. Günler arası çalışmalar ise; üç farklı derişim seviyesinde ardışık altı ayrı günde hazırlanan çözeltilerin analizi ile yapılmış ve elde edilen bulguların QCM yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 1.25 – 3.18 arasında, % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak 0.0 – 4.54 ve SWV yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 1.89 – 2.10 arasında, % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak % 0.0 – 3.85 arasında bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.6 - Tablo 4.7).

Geliştirilen her iki yöntemde de gün içi ve günler arası için % bağıl hata değerlerinin % 5'den az olması yöntemlerin doğruluğunu göstermektedir. Bağıl standart sapmanın her üç yöntemde de % 5'in altında olması yöntemlerin kesinliğinin oldukça iyi olduğunu belirtir (123) .

### ***Tekrarlanabilirlik***

Sensör tekrarlanabilirliği; QCM yönteminde 0.054 nM ve SWV yönteminde 2.0 nM TOB içeren çözeltilerin tekrarlı analizleri ile gerçekleştirilmiştir. TOB'un QCM ve SWV yöntemleri için kütle değişimleri ve pik akımlarının BSS değerleri sırasıyla % 0.47 ve % 0.87 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.8). Bağıl standart sapmalarının % 1'den düşük olması sensör tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu ve maliyet-fayda ekseninde önemli avantajlar sunduğunu göstermektedir (124) .

### ***Sağlamlık***

Sağlamlık çalışmaları için optimum şartlarda küçük değişiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalar QCM yöntemi için 0.054 nM ve SWV yöntemi için 2.0 nM derişimler de gerçekleştirilmiştir. Her bir değişiklikte yapılan analiz sonuçları optimum şartlarda bulunan analiz sonuçları ile Wilcoxon testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Tüm karşılaştırmalarda  $T_H$  değeri  $T_T$  değerinden büyük olduğu için analizler arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Bkz. Tablo

4.9 – Tablo 4.10). Bu sonuçlar TOB analizi için geliştirilen yöntemlerin sağlam olduğunu göstermektedir.

### ***Tutarlılık***

Tutarlılık çalışmaları için farklı analizci etkisi araştırılmış ve bulunan değerler Wilcoxon testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalar QCM yöntemi için 0.054 nM ve SWV yöntemi için 2.0 nM derişimler de gerçekleştirilmiştir. Farklı iki analizci tarafından elde edilen bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması yöntemlerin tutarlı olduğunu göstermektedir (QCM yöntemi için  $T_H = 7.50 > T_T = 2.00$  ve SWV yöntemi için  $T_H = 5.50 > T_T = 2.00$ ;  $p > 0.05$ ) (Bkz. Tablo 4.11 - Tablo 4.12).

### ***Özgüllük (Seçicilik)***

Özgüllük (Seçicilik), yöntemin diğer maddeler varlığında analizi yapılan maddenin miktarını doğru olarak tayin edebilme yeteneğidir. Geliştirilen yöntemlerin özgünlüğü; sentetik preparat, tablet ve standart çözeltilerin QCM sensorgramları ve voltamogramlarının karşılaştırılması ile gösterilmiştir. QCM sensorgramlarında sentetik preparat ve ilaç çözeltilerindeki tobramisin sensör yüzeyindeki kütle değişimleri standart çözeltilerde bulunan tobramisin kütle değişimine eşit olduğu şekillerde görülmektedir. Aynı durum elde edilen voltamogramlar içinde geçerlidir (Bkz. Şekil 4.23 – Şekil 4.26). Buna göre geliştirilen yöntemlerin özgün olduğu söylenebilir. Ayrıca her iki yöntem için yöntemin özgünlüğü, standart ekleme yönteminin ilaç çözeltilerine ve gıda numunelerine uygulanmasıyla da gösterilmiştir. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri Tablo 4.13'te verilmiştir. Bu denklemlerin eğimlerinin oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerine yakın olması katkı maddelerinin TOB analizinde girişim yapmadığını göstermektedir. Ayrıca geliştirilen sensörlerin süt ve yumurta numunelerindeki tobramisin diğer aminoglikoproteinlerin (AMIK, GEN, KAN-A) varlığında tayini için kullanılabilirliği gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.27 – Şekil 4.28). Böylece geliştirilen yöntemlerin özgün olduğunu söylenebilir.

GEN, AMIK ve KAN-A için TOB moleküllerine göre dağılma ve seçicilik katsayıları eşitlik 4.2'ye göre belirlenmiştir. GEN, AMIK ve KAN-A'nın molekül

yapıları ve ağırlıkları TOB'a oldukça yakındır. TOB baskılanmış QCM sensörünün GEN, AMIK ve KAN-A'ya verdiği sensorgram sinyal değerleri ( $\Delta m$ ) sırasıyla 0.030, 0.025 ve 0.027'tir. Aynı derişimde TOB için elde edilen sinyal değeri ise 0.300'dür. Bu sonuçlara göre baskılanmış QCM sensörü TOB'u, GEN'e göre 10.0 kat, AMIK'a göre 12.0 kat ve KAN-A'ya göre 11.11 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir (Bkz. Tablo 4.14). Etkileşimdeki bu hassasiyet kalıp molekül olan TOB'in üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır.

TOB baskılanmış elektrokimyasal sensörünün GEN, AMIK ve KAN-A'ya verdiği voltammogram sinyal değerleri ( $\Delta I$ ) ise sırasıyla 1.53, 1.47 ve 1.35'dir. Aynı derişimde TOB için elde edilen sinyal değeri ise 10.21'dir. Bu sonuçlara göre TOB baskılanmış elektrokimyasal sensörü TOB'u, GEN'e göre 6.68 kat, AMIK'a göre 6.95 kat ve KAN-A'ya göre 7.56 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir (Bkz. Tablo 4.15).

### **5.7. Geliştirilen Nanosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi**

TOB baskılanmamış QCM sensörün aynı derişimdeki TOB, GEN, AMIK ve KAN-A verdiği sensorgram sinyal değerleri ( $\Delta m$ ) 0.024, 0.022, 0.030 ve 0.020'dir. Şekil 4.27 incelendiğinde TOB baskılanmamış QCM sensörün aynı derişimdeki TOB, GEN, AMIK ve KAN-A çözeltilerine verdiği sinyal artışının oldukça az olduğu görülmektedir. Eşitlik 4.2 ve Eşitlik 4.3 kullanılmasıyla hesaplanan seçicilik katsayıları GEN için 10.0 (baskılanmış), 1.1 (baskılanmamış) olarak ve AMIK için 12.0 (baskılanmış), 0.80 (baskılanmamış) olarak ve KAN-A için 11.11 (baskılanmış), 1.20 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı 9.1 (TOB/GEN), 15.0 (TOB/AMIK) ve 9.3 (TOB/KAN-A) olarak hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.14). Bu sonuçlara göre TOB baskılanmış sensör; TOB'u GEN'e göre 9.1 kat, AMIK'a göre 15.0 ve KAN-A'ya göre 9.3 kat seçicilikle tanımaktadır. Molekül yapılarının ve molekül ağırlıklarının birbirine çok yakın olan bu moleküller arasında 9.1, 15.0 ve 9.3 katlık ayırma faktörünün başarılı bir sonuç olduğu söylenebilir.

TOB baskılanmamış elektrokimyasal sensörün aynı derişimdeki TOB, GEN, AMIK ve KAN-A verdiği voltammogram akım değerleri ( $\Delta I$ ) 2.03, 0.75, 0.85 ve 0.91'dir. Hesaplanan seçicilik katsayıları GEN için 6.68 (baskılanmış), 2.71

(baskılanmamış) olarak ve AMIK için 6.95 (baskılanmış), 2.38 (baskılanmamış) olarak ve KAN-A için 7.56 (baskılanmış), 2.23 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı 2.45 (TOB/GEN), 2.92 (TOB/AMIK) ve 3.40 (TOB/KAN-A) olarak hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.15). Aynı şekilde bu moleküller arasında 2.45, 2.92 ve 3.40 katlık ayırma faktörünün başarılı bir sonuç olduğu söylenebilir.

İki sensör sistemi arasındaki bu fark ise kullanılan fonksiyonel monomeren kaynaklanmaktadır. Hatırlanacağı gibi QCM sensör üretiminde özel olarak sentezlenmiş kalıp molekül TOB ile seçici etkileşime girebilecek glutamik asit temelli bir monomer kullanmıştık.

### 5.8. Geri Kazanım

Geri kazanım sonuçları, 3 ve 60 mg TOB içeren sentetik preparatların ve gıda numunelerinin (süt ve yumurta) geliştirilen her iki yöntemle analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Kaynaklarda geri kazanım sonuçlarının  $100.00 \pm 3$  olması gerektiği belirtilmiştir (125). Tablo 4.16 - Tablo 4.21’de görüldüğü gibi geliştirilen yöntemlerin geri kazanım sonuçları bu aralığa girmektedir, ayrıca sonuçlar arasındaki BSS değerleri düşüktür. Bu sonuçlar, geliştirilen yöntemlerin doğruluğunun diğer bir kanıtıdır.

### 5.9. Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve validasyon parametreleri değerlendirilen yöntemler TOB içeren TOBRADEX<sup>®</sup> ve TOBI<sup>®</sup> farmasötik preparatların analizine başarıyla uygulanmıştır (Bkz. Tablo 4.22 - Tablo 4.23). Kruskal Wallis testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede QCM ve SWV yöntemlerinin bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Böylece geliştirilen yöntemlerin doğruluğu ve farmasötik preparatların analizine uygulanabilirliği gösterilmiştir.

### 5.10. Denge İzoterm Modelleri

Şekil 4.31 ve Şekil 4.32’ye göre deneysel olarak elde edilen veriler Langmiur modeline uyumludur ( $R^2$  değerleri 0.9890 ve 0.9989). Bu sonuçlar hazırlanan TOB baskılanmış QCM ve elektrokimyasal sensörler için tek tabakalı bir adsorpsiyon

olduğu, etkileşim bölgelerinin eş enerjili ve homojen dağıldığını göstermektedir. Ayrıca analit-analit etkileşimlerinin olmadığıda belirlenmiştir.

Tablo 4.24 ve Tablo 4.25'teki izoterm modelleri birlikte değerlendirilip incelendiğinde hazırlanan sensörlere en uygun olanı Langmiur modeli olduğu görülmektedir. Bu denklemlerden hesaplanan  $\Delta m_{maks}$  ve  $\Delta I_{maks}$  değeri deneysel değerlere oldukça yakındır. Langmiur denkleminde hesaplanan  $K_A$  ve  $K_D$  değerleri sırasıyla QCM sensörü için 55.56 nM ve 0.018 1/nM, elektrokimyasal sensör için ise 0.187 nM ve 5.341/nM olarak hesaplanmıştır.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında göz enfeksiyonları tedavisinde kullanılan bir madde olan TOB'un farmasötik preparatlardan ve gıdalardan (süt ve yumurta) analizi için moleküler baskılanmış QCM ve elektroanalitik sensörler geliştirilmiştir.

Geliştirilen moleküler baskılanmış sensörler FTIR spektroskopisi, atomik kuvvet mikroskopu, elipsometre, dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve temas açısı ölçümleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

Geliştirilen elektroanalitik yöntemlerden SWV için optimize edilmiş en uygun koşullar destek elektrolit pH'sı için 7.0, monomer derişimi için 60 mM, tarama sayısı için 5 ve hedef molekül (TOB) derişimi için 25 mM bulunmuştur.

Geliştirilen QCM yöntemi için 0.1 M, pH 7.0 fosfat tamponu sistemi kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

Geliştirilen yöntemlerin doğrusalılık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, tutarlılık ve özgüllük gibi validasyon parametreleri değerlendirilmiş ve geçerlilikleri kanıtlanmıştır.

Valide edilen yöntemler piyasalarda satılmakta olan TOB içeren TOBRADEX® ve TOBI® ticari isimli farmasötik preparatların ve gıda numunelerinin (süt ve yumurta) analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Moleküler baskılama tekniği kullanılarak geliştirilen QCM ve elektroanalitik sensörler farmasötik preparatlardan ve gıdalardan TOB'un analizine dayananan tez çalışmasının literatüre katkı sağlaması açısından önemlidir. Tez kapsamında geliştirilen yöntemler; validasyon parametreleri açısından iyi sonuçlar vermesine ek olarak basit ve ucuz yöntemler olması nedeniyle kaynaklardaki TOB analizi için geliştirilen yöntemlere alternatif olarak sunulmaktadır.

Kromatografik yöntemlerin pahalı ve zaman alıcı olmasının yanı sıra, kaynaklarda TOB'un analizi için yapılan çalışmalarda LOQ değerlerinin geliştirilen QCM ve elektroanalitik yöntemlerden daha büyük olduğu görülmektedir. Ayrıca geliştirilen her iki yöntemin LOQ değerlerinin düşük olması bu yöntemlerin biyolojik materyallerden TOB'un analizlerine uygulanabilmesini mümkün kılmaktadır. Geliştirilen QCM ve SWV yöntemlerinin TOB'un farmasötik preparatlardan ve gıdalardan tayini için doğru, kesin, duyarlı, seçici, tekrarlanabilir yöntemler olması nedeniyle rutin analiz laboratuvarlarında kalite kontrol amacıyla

diğer analitik yöntemlere alternatif yöntemler olarak önerilebileceği düşünölmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Almeida, A.F.d. (1991). Antibiotics in Clinical Practice. Basel: Recom Publisher.
2. D.N.Gilbert. (1995). Mandell, Douglas, Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (4 bs.). New York: Churchill-Livingstone.
3. Kılıçturgay, K. (1992). *Aminoglikozid antibiyotikler. Antimikrobiyal Kemoterapi: Klinik Uygulama ve Yenilikler* (c. 17). İstanbul: : Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları.
4. Willke, A. (1994). Aminoglikozidler. Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal Ajanlar. Ankara: Feryal Matbaası.
5. [http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB7154445\\_EN.htm](http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB7154445_EN.htm). Ağ
6. Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S. (2003) Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (1), 317-323.
7. Wiesemann, H.G., Steinkamp, G., Ratjen, F., Bauernfeind, A., Przyklenk, B., Doring, G. ve diğerleri. (1998) Placebo-controlled, double-blind, randomized study of aerosolized tobramycin for early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 25 (2), 88-92.
8. Barends, D.M., Zwaan, C.L., Hulshoff, A. (1981) Micro-determination of tobramycin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 225 (2), 417-426.
9. Keevil, B.G., Lockhart, S.J., Cooper, D.P. (2003) Determination of tobramycin in serum using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and comparison with a fluorescence polarisation assay. *Journal of Chromatography B*, 794 (2), 329-335.
10. Megoulas, N., Koupparis, M. (2005) Development and validation of a novel HPLC/ELSD method for the direct determination of tobramycin in pharmaceuticals, plasma, and urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2), 290-296.

11. Hanko, V.P., Rohrer, J.S. (2006) Determination of tobramycin and impurities using high-performance anion exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40 (4), 1006-1012.
12. Russ, H., McCleary, D., Katimy, R., Montana, J.L., Miller, R.B., Krishnamoorthy, R. ve diğerleri. (1998) Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Tobramycin and Its Related Substances in an Ophthalmic Suspension. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 21 (14), 2165-2181.
13. Mashat, M., Chrystyn, H., Clark, B.J., Assi, K.H. (2008) Development and validation of HPLC method for the determination of tobramycin in urine samples post-inhalation using pre-column derivatisation with fluorescein isothiocyanate. *Journal of Chromatography B*, 869 (1–2), 59-66.
14. Dash, A.K., Suryanarayanan, R. (1991) A liquid-chromatographic method for the determination of tobramycin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 9 (3), 237-245.
15. Kubo, H., Kinoshita, T., Kobayashi, Y., Tokunaga, K. (1984) Micro-Scale Method for Determination of Tobramycin in Serum Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 7 (11), 2219-2228.
16. Feng, C.-H., Lin, S.-J., Wu, H.-L., Chen, S.-H. (2002) Trace analysis of tobramycin in human plasma by derivatization and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 780 (2), 349-354.
17. Clarot, I., Storme-Paris, I., Chaminade, P., Estevenon, O., Nicolas, A., Rieutord, A. (2009) Simultaneous quantitation of tobramycin and colistin sulphate by HPLC with evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (1), 64-67.
18. He, S., Chen, Q., Sun, Y., Zhu, Y., Luo, L., Li, J. ve diğerleri. (2011) Determination of tobramycin in soil by HPLC with ultrasonic-assisted extraction and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 879 (13–14), 901-907.

19. Tao, Y., Chen, D., Yu, H., Huang, L., Liu, Z., Cao, X. ve diğerleri. (2012) Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 135 (2), 676-683.
20. Gaikwad, A., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D. (1993) Kinetic Fluorimetric Method for the Determination of Tobramycin by Stopped-Flow Mixing Methodology. *Analytical Letters*, 26 (1), 97-107.
21. Law, W.S., Kubáň, P., Yuan, L.L., Zhao, J.H., Li, S.F.Y., Hauser, P.C. (2006) Determination of tobramycin in human serum by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *ELECTROPHORESIS*, 27 (10), 1932-1938.
22. Yu, C.-Z., He, Y.-Z., Fu, G.-N., Xie, H.-Y., Gan, W.-E. (2009) Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 877 (3), 333-338.
23. Sun, N., Mo, W.-M., Shen, Z.-L., Hu, B.-X. (2005) Adsorptive stripping voltammetric technique for the rapid determination of tobramycin on the hanging mercury electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38 (2), 256-262.
24. González-Fernández, E., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P. (2011) Aptamer-Based Inhibition Assay for the Electrochemical Detection of Tobramycin Using Magnetic Microparticles. *Electroanalysis*, 23 (1), 43-49.
25. Vasapollo, G., Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S. ve diğerleri. (2011) Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (9), 5908-5945.
26. Asliyuçe, S., Uzun, L., Rad, A.Y., Unal, S., Say, R., Denizli, A. (2012) Molecular imprinting based composite cryogel membranes for purification of anti-hepatitis B surface antibody by fast protein liquid chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 889, 95-102.

27. Osman, B., Uzun, L., Beşirli, N., Denizli, A. (2013) Microcontact imprinted surface plasmon resonance sensor for myoglobin detection. *Materials Science and Engineering: C*, 33 (7), 3609-3614.
28. Scorrano, S., Mergola, L., Del Sole, R., Vasapollo, G. (2011) Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers for Amino Acid Derivates by Using Different Functional Monomers. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (3), 1735-1743.
29. Bossi, A., Bonini, F., Turner, A.P.F., Piletsky, S.A. (2007) Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art. *Biosensors & Bioelectronics*, 22 (6), 1131-1137.
30. Trojanowicz, M., Kaniewska, M. (2009) Electrochemical Chiral Sensors and Biosensors. *Electroanalysis*, 21 (3-5), 229-238.
31. Sener, G., Ozgur, E., Yilmaz, E., Uzun, L., Say, R., Denizli, A. (2010) Quartz crystal microbalance based nanosensor for lysozyme detection with lysozyme imprinted nanoparticles. *Biosensors & Bioelectronics*, 26 (2), 815-821.
32. Uzun, L., Say, R., Unal, S., Denizli, A. (2009) Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis. *Biosensors & Bioelectronics*, 24 (9), 2878-2884.
33. Spivak, D.A. (2005) Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (12), 1779-1794.
34. Chen, Y., Chen, L., Bi, R.L., Xu, L., Liu, Y. (2012) A potentiometric chiral sensor for L-Phenylalanine based on crosslinked polymethylacrylic acid-polycarbazole hybrid molecularly imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta*, 754, 83-90.
35. Hu, Y., Pan, J., Zhang, K., Lian, H., Li, G. (2013) Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43 (0), 37-52.
36. Hu, Y.L., Pan, J.L., Zhang, K.G., Lian, H.X., Li, G.K. (2013) Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 43, 37-52.

37. Wopschal, R.H., Shain, I. (1967) Effects of Adsorption of Electroactive Species in Stationary Electrode Polarography. *Analytical Chemistry*, 39 (13), 1514-&.
38. Davies, M.P., De Biasi, V., Perrett, D. (2004) Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 504 (1), 7-14.
39. Chen, L.X., Xu, S.F., Li, J.H. (2011) Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40 (5), 2922-2942.
40. Cormack, P.A.G., Elorza, A. Z. (2004) Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 804 (1), 173-182.
41. Dickert, F.L., Hayden, O. (1999) Imprinting with sensor development - On the way to synthetic antibodies. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 364 (6), 506-511.
42. Shea, K.J., Dougherty, T.K. (1986) Molecular Recognition on Synthetic Amorphous Surfaces - the Influence of Functional-Group Positioning on the Effectiveness of Molecular Recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 108 (5), 1091-1093.
43. Saboori, A.M., Gordon, R.K. (2004) Preparation of molecular imprinted polymers against dichlorvos, an organophosphate pesticide. *Faseb Journal*, 18 (8), C169-C169.
44. Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai, H., Takeuchi, T. (2004) Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting. *Analytica Chimica Acta*, 504 (1), 131-135.
45. Steinke, J., Sherrington, D.C., Dunkin, I.R. (1995) Imprinting of synthetic polymers using molecular templates. *Synthesis and Photosynthesis*, 123, 81-125.
46. Ersoz, A., Denizli, A., Ozcan, A., Say, R. (2005) Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance. *Biosensors & Bioelectronics*, 20 (11), 2197-2202.
47. Katz, A., Davis, M.E. (1999) Investigations into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers. *Macromolecules*, 32 (12), 4113-4121.

48. Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Liu, S.X., Wang, N. (2002) Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers - influence of synthetic conditions and mobile phase compositions on the chromatographic performance. *Analyst*, 127 (11), 1427-1432.
49. Pichon, V., Chapuis-Hugon, F. (2008) Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review. *Analytica Chimica Acta*, 622 (1–2), 48-61.
50. Zhong, N., Byun, H.S., Bittman, R. (2001) Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinted polymers. *Tetrahedron Letters*, 42 (10), 1839-1841.
51. Andersson, L.I. (2000) Molecular imprinting for drug bioanalysis - A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *Journal of Chromatography B*, 739 (1), 163-173.
52. Haupt, K., Mosbach, K. (1998) Plastic antibodies : developments and applications. *Trends in Biotechnology*, 16 (11), 468-475.
53. Piletsky, S.A., Alcock, S., Turner, A.P.F. (2001) Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. *Trends in Biotechnology*, 19 (1), 9-12.
54. Odabasi, M., Denizli, A. (2001) Polyhydroxyethylmethacrylate-based magnetic DNA-affinity beads for anti-DNA antibody removal from systemic lupus erythematosus patient plasma. *Journal of Chromatography B*, 760 (1), 137-148.
55. Sellergren, B. (1994) Imprinted Dispersion Polymers - a New Class of Easily Accessible Affinity Stationary Phases. *Journal of Chromatography A*, 673 (1), 133-141.
56. Takeuchi, T., Haginaka, J. (1999) Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, 728 (1), 1-20.
57. Haginaka, J., Kagawa, C. (2004) Retentivity and enantioselectivity of uniformly sized molecularly imprinted polymers for d-chlorpheniramine and - brompheniramine in hydro-organic mobile phases. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 804 (1), 19-24.



58. Hedborg, E., Winqvist, F., Lundstrom, I., Andersson, L.I., Mosbach, K. (1993) Some Studies of Molecularly-Imprinted Polymer Membranes in Combination with Field-Effect Devices. *Sensors and Actuators a-Physical*, 37-8, 796-799.
59. Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Elgersma, A.V., Yano, K., Karube, I., Parhometz, Y.P. ve diğ erleri. (1995) Atrazine Sensing by Molecularly Imprinted Membranes. *Biosensors & Bioelectronics*, 10 (9-10), 959-964.
60. Kriz, D., Mosbach, K. (1995) Competitive Amperometric Morphine Sensor-Based on an Agarose Immobilized Molecularly Imprinted Polymer. *Analytica Chimica Acta*, 300 (1-3), 71-75.
61. Kriz, D., Ramstrom, O., Svensson, A., Mosbach, K. (1995) Introducing Biomimetic Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers as Recognition Elements. *Analytical Chemistry*, 67 (13), 2142-2144.
62. Levi, R., McNiven, S., Piletsky, S.A., Cheong, S.H., Yano, K., Karube, I. (1997) Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Analytical Chemistry*, 69 (11), 2017-2021.
63. Yu, C., Mosbach, K. (1997) Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers. *Journal of Organic Chemistry*, 62 (12), 4057-4064.
64. Riskin, M., Tel-Vered, R., Bourenko, T., Granot, E., Willner, I. (2008) Imprinting of molecular recognition sites through electropolymerization of functionalized au nanoparticles: Development of an electrochemical TNT sensor based on pi-donor-acceptor interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 130 (30), 9726-9733.
65. Kan, X.W., Zhao, Y., Geng, Z.R., Wang, Z.L., Zhu, J.J. (2008) Composites of multiwalled carbon nanotubes and molecularly imprinted polymers for dopamine recognition. *Journal of Physical Chemistry C*, 112 (13), 4849-4854.
66. McDonagh, C., Burke, C.S., MacCraith, B.D. (2008) Optical chemical sensors. *Chemical Reviews*, 108 (2), 400-422.
67. Wang, J. (1997) Remote electrochemical sensors for monitoring inorganic and organic pollutants. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 16 (2), 84-88.
68. Turner, A.P.F. (2013) Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42 (8), 3184-3196.

69. Bunde, R.L., Jarvi, E.J., Rosentreter, J.J. (1998) Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta*, 46 (6), 1223-1236.
70. Uludag, Y., Piletsky, S.A., Turner, A.P.F., Cooper, M.A. (2007) Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes. *Febs Journal*, 274 (21), 5471-5480.
71. Ferreira, L.S., De Souza, M.B., Trierweiler, J.O., Broxtermann, O., Folly, R.O.M., Hitzmann, B. (2003) Aspects concerning the use of biosensors for process control: experimental and simulation investigations. *Computers & Chemical Engineering*, 27 (8-9), 1165-1173.
72. Mello, L.D., Kubota, L.T. (2002) Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77 (2), 237-256.
73. Yao, S.Z. (1997). Piezoelectric Chemistry and Biosensors: Hunan Normal University Press.
74. Lucklum, R., Behling, C., Hauptmann, P. (2000) Gravimetric and non-gravimetric chemical quartz crystal resonators. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 65 (1-3), 277-283.
75. Erdem, U. (1984) Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances - Lu, C, Czanderna, A.W. *Journal of Physics E-Scientific Instruments*, 17 (12), 1100-1101.
76. Heising, R.A. (1946). Quartz crystals for electrical circuits, their design and manufacture. New York: Van Nostrand
77. Janshoff, A., Galla, H.J., Steinem, C. (2000) Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors? *Angewandte Chemie-International Edition*, 39 (22), 4004-4032.
78. Smith, A.L. (2008). Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry, Volume 5: Recent Advances, Techniques and Applications. New York: Elsevier.
79. Taylor, R.F., Schultz, J.S. (1996). Handbook of Chemical and Biological Sensors, Introduction to chemical and biological sensors: Taylor & Francis.
80. O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G. (1999) Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications. *Biosensors & Bioelectronics*, 14 (8-9), 663-670.

81. Gomes, M.T.S.R. (2001) Application of Piezoelectric Quartz Crystals to the Analysis of Trace Metals in Solution: A Review. *Ieee Sensors Journal*, 1 (2), 109-118.
82. Ebersole, R., Miller, J., Moran, J., Ward, M. (1990) PZ quartz sensors for use in clinical analysis. *Journal of the American Chemical Society*, 112, 3239.
83. Ferreira, G.N.M., Da-Silva, A.C., Tome, B. (2009) Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. *Trends in Biotechnology*, 27 (12), 689-697.
84. Nomura, T., Okuhara, M. (1982) Frequency-Shifts of Piezoelectric Quartz Crystals Immersed in Organic Liquids. *Analytica Chimica Acta*, 142 (Oct), 281-284.
85. Kanazawa, K.K. (1997) Mechanical behaviour of films on the quartz microbalance. *Faraday Discussions*, 107, 77-90.
86. Behling, C., Lucklum, R., Hauptmann, P. (1998) Response of quartz-crystal resonators to gas and liquid analyte exposure. *Sensors and Actuators a-Physical*, 68 (1-3), 388-398.
87. Marx, K.A. (2003) Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules*, 4 (5), 1099-1120.
88. King, W.H. (1964) Piezoelectric Sorption Detector. *Analytical Chemistry*, 36 (9), 1735-&.
89. Shons, A., F.Dorman, Najarian, J. (1972) An Immunospecific Microbalance. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 6, 565-570.
90. C.Kösslinger, Aberl, F.D., H.Wolf, S.Koch, P.Woias. (1994) HIV detection with a PZ immunosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 18-19, 271-275.
91. C.Kösslinger, Aberl, F.D., H.Wolf, S.Koch, Woias, P. (1992) PZ immunosensors for HIV viruses. *Biosensors and Bioelectronics*, 7, 397-401.
92. G.Sakai, T.Sakai, T.Uda, N.Miura, N.Yamazoe. (1995) Evaluation of binding of HAS to monoclonal and polyclonal antibody by PZ immunosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 42, 84-89.

93. Yun, K., Kobatake, E., Haruyama, T., Laukkanen, M.L., Keinanen, K., Aizawa, M. (1998) Use of a quartz crystal microbalance to monitor immunoliposome-antigen interaction. *Analytical Chemistry*, 70 (2), 260-264.
94. Carter, R.M., Jacobs, M.B., Lubrano, G.J., Guilbault, G.G. (1995) Piezoelectric Detection of Ricin and Affinity-Purified Goat Anti-Ricin Antibody. *Analytical Letters*, 28 (8), 1379-1386.
95. Harteveld, J.L.N., Nieuwenhuizen, M.S., Wils, E.R.J. (1997) Detection of Staphylococcal Enterotoxin B employing a piezoelectric crystal immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 12 (7), 661-667.
96. Chu, X., Jiang, J.H., Shen, G.L., Yu, R.Q. (1996) Simultaneous immunoassay using piezoelectric immunosensor array and robust method. *Analytica Chimica Acta*, 336 (1-3), 185-193.
97. Fawcett, N.C., Craven, R.D., Zhang, P., Evans, J.A. (1998) QCM response to solvated, tethered macromolecules. *Analytical Chemistry*, 70 (14), 2876-2880.
98. Tan, Y.G., Zhou, Z.L., Wang, P., Nie, L.H., Yao, S.Z. (2001) A study of a biomimetic recognition material for the BAW sensor by molecular imprinting and its application for the determination of paracetamol in the human serum and urine. *Talanta*, 55 (2), 337-347.
99. Hirayama, K., Sakai, Y., Kameoka, K., Noda, K., Naganawa, R. (2002) Preparation of a sensor device with specific recognition sites for acetaldehyde by molecular imprinting technique. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 86 (1), 20-25.
100. Percival, C.J., Stanley, S., Galle, M., Braithwaite, A., Newton, M.I., McHale, G. ve diğeri. (2001) Molecular-imprinted, polymer-coated quartz crystal microbalances for the detection of terpenes. *Analytical Chemistry*, 73 (17), 4225-4228.
101. Liu, F., Liu, X., Ng, S.C., Chan, H.S.O. (2006) Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of L-tryptophan. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 113 (1), 234-240.

102. Say, R., Gultekin, A., Ozcan, A.A., Denizli, A., Ersoz, A. (2009) Preparation of new molecularly imprinted quartz crystal microbalance hybride sensor system for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine determination. *Analytica Chimica Acta*, 640 (1-2), 82-86.
103. Fuchiwaki, Y., Kubo, I. (2010) Electrochemical sensor based on biomimetic recognition utilizing molecularly imprinted polymer receptor. *Biomimetics, Learning from Nature*, 19, 385.
104. Lawal, A.T., Adeloju, S.B. (2013) Polypyrrole based amperometric and potentiometric phosphate biosensors: A comparative study B. *Biosensors & Bioelectronics*, 40 (1), 377-384.
105. Hianik, T., Gajdos, V., Krivanek, R., Oretskaya, T., Metelev, V., Volkov, E. ve diğ erleri. (2001) Amperometric detection of DNA hybridization on a gold surface depends on the orientation of oligonucleotide chains. *Bioelectrochemistry*, 53 (2), 199-204.
106. Yola, M.L., Ozaltin, N. (2011) Square-wave Voltammetric Determination of Ezetimibe. *Revista De Chimie*, 62 (4), 420-426.
107. Yola, M.L., Ozaltin, N. (2011) Adsorptive stripping voltammetric methods for determination of ezetimibe in tablets. *Reviews in Analytical Chemistry*, 30 (1), 29-36.
108. Yola, M.L., Atar, N., Ustundag, Z., Solak, A.O. (2013) A novel voltammetric sensor based on p-aminothiophenol functionalized graphene oxide/gold nanoparticles for determining quercetin in the presence of ascorbic acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 698, 9-16.
109. Yola, M.L., Atar, N., Qureshi, M.S., Ustundag, Z., Solak, A.O. (2012) Electrochemically grafted etodolac film on glassy carbon for Pb(II) determination. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 171, 1207-1215.
110. Hutchins, R.S., Bachas, L.G. (1995) Nitrate-Selective Electrode Developed by Electrochemically Mediated Imprinting Doping of Polypyrrole. *Analytical Chemistry*, 67 (10), 1654-1660.
111. Kubo, I., Shoji, R., Fuchiwaki, Y., Suzuki, H. (2008) Atrazine Sensing Chip Based on Molecularly Imprinted Polymer Layer. *Electrochemistry*, 76, 541-544.

112. Brooksby, P.A., Downard, A.J. (2004) Electrochemical and atomic force microscopy study of carbon surface modification via diazonium reduction in aqueous and acetonitrile solutions. *Langmuir*, 20 (12), 5038-5045.
113. R.Greef, R.Peat, M.L.Peter, Robinson, J. (1990). Instrumental Methods in Electrochemistry. England: Ellis Horwood.
114. Barker, G.C., Jenkins, I.L. (1952) Square-Wave Polarography. *Analytical Chemistry*, 24 (9), 1519-1519.
115. Barker, G.C., Jenkins, I.L. (1952) Square-Wave Polarography. *Analyst*, 77 (920), 685-696.
116. Bard, A.J., Faulkner, L.R. (2001). Electrochemical methods (2 bs.). New York: John Wiley and Sons, Inc.
117. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005).
118. Wei, X.L., Li, X., Husson, S.M. (2005) Surface molecular imprinting by atom transfer radical polymerization. *Biomacromolecules*, 6 (2), 1113-1121.
119. Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen, Y.Z., Shah, R.N., Shimizu, K.D. (2001) Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm. *Analytical Chemistry*, 73 (19), 4584-4591.
120. Eisazadeh, H. (2007) Studying the Characteristics of Polypyrrole and its Composites. *World Journal of Chemistry* (2), 67-74.
121. Sanghavi, B.J., Hirsch, G., Karna, S.P., Srivastava, A.K. (2012) Potentiometric stripping analysis of methyl and ethyl parathion employing carbon nanoparticles and halloysite nanoclay modified carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*, 735, 37-45.
122. Shi, H.J., Zhao, G.H., Liu, M.C., Zhu, Z.L. (2011) A novel photoelectrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer modified TiO<sub>2</sub> nanotubes and its highly selective detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Electrochemistry Communications*, 13 (12), 1404-1407.
123. Green, J.M. (1996) A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, 68 (9), A305-A309.

124. Shabir, G.A., Lough, W.J., Arain, S.A.,Bradshaw, T.K. (2007) Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30 (3), 311-333.
125. Gonzalez, A.G.,Herrador, M.A. (2007) A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26 (3), 227-238.

## EKLER

## Ek 1. Korelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü:

Bulunan korelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayımı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımında işlemler:

1.  $H_0$ : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ( $r = 0$ ).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r}$$

$$S_r = \left[ \frac{1 - r^2}{n - 2} \right]^{1/2} \quad (\text{Korelasyon katsayısının standart hatası})$$

3. Yanılma olasılığı olarak  $\alpha = 0.05$  seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi =  $n - 2$
5.  $\alpha = 0.05$  düzeyinde ve 4. Madde de bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri Tablo t değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: Korelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ( $t =$  Hesapla bulunan değer,  $p < 0.05$ ) veya korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ( $t =$  Hesapla bulunan değer,  $p > 0.05$ ).



Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü:

1. Kareler toplamları bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[ \Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n} \right]^2}{(\Sigma x)^2 - \frac{\Sigma x^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı  $\Rightarrow$  RAKT = YOAKT - RKT

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi  $\Rightarrow$  YOASD = n-1

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi  $\Rightarrow$  RASD = YOASD - RSD

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması  $\Rightarrow$  RKT / RSD

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması  $\Rightarrow$  RAKO = RAKT / RASD

4.  $H_0$  = Derişim ile pik cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı  $\alpha = 0.05$  seçilmiştir.

6.  $F = RKO / RAKO$

7.  $p = 0.05$  düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Derişim ile pik cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır (F = Hesapla bulunan,  $p < 0.05$ ) veya doğrusal değildir (F = Hesapla bulunan,  $p > 0.05$ ).

Kesişimin sıfırdan ayrılışının önem kontrolü:

1.

$$S_{yx} = \frac{\Sigma_y^2 - (\Sigma_x)^2 / n}{n - 1} \left[ \frac{(1 - r)^2 (n-1)}{n - 2} \right]^{1/2}$$

2.  $S_{H(a)} = (S_{yx})^2 [(1/n) + \bar{x} / (\Sigma_x^2 - (\Sigma_x)^2 / n)]$

3.  $H_0 =$  Kesişim değeri (a) sıfıra eşittir.

4. Yanılma olasılığı  $p = 0.05$  seçilmiştir.

5.  $t_H = a / S_{H(a)}$

6.  $\alpha = 0.05$  düzeyinde  $t_T$  değerleri bulunur.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar: Kesişim değeri sıfıra eşittir ( $t_H =$  Hesapla bulunan,  $p > 0.05$ ) veya Kesişim değeri sıfırdan farklıdır ( $t_H =$  Hesapla bulunan,  $p < 0.05$ ).

Ek 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması:

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

SS: Standart Sapma

$\bar{X}$ : Aritmetik ortalama

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

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n: Ölçüm sayısı

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

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması:

$$\mu = \bar{X} \pm S_{\bar{X}} t \quad \text{veya} \quad \bar{X} - S_{\bar{X}} < \mu < \bar{X} + S_{\bar{X}}$$

$\mu$  : Evren ortalaması

$\bar{X}$  : Örneklem ortalaması

$S_{\bar{X}}$  : Standart hata

t : Seçilen yanılma düzeyi ( $\alpha$ ) ve n-1 serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer.

### Ek 3. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi:

Aynı örneklerin değişik iki durumdaki ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde  $n < 25$  ise uygulanan önemlilik testidir.

$H_0$  = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha = 0.05$  yanılma düzeyi seçilmiştir.

Test istatistiğinin hesaplanması:

İki yöntemden elde edilen sonuçlar iki sütun şeklinde yanyana yazılır. Sağda yeni bir sütuna satırlar arasındaki farklar +/- işaretleriyle birlikte yazılır. Ardından farklar küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra no. verilir. Sıra no.ların önüne farklardaki +/- işaretleri yazılır. + ve - işaretli sıra no. grupları arasında işareti sayıca fazla olan grup toplanır. Elde edilen değer, hesapla bulunan T değeridir ( $T_H$ ).

Ölçüm sayısı (n) serbestlik derecesindeki tablo T değerine bakılır.

#### Karar:

- $T_H > T_t$  ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur ( $T_H =$  Hesaplanan T değeri,  $p > 0.05$ )
- $T_H < T_t$  ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır ( $T_H =$  Hesaplanan T değeri,  $p < 0.05$ )

#### EK 4. Kruskal Wallis Varyans Analizi:

Parametrik test varsayımları yerine getirilmediğinde, bir değişken yönünden ikiden fazla bağımsız grup arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde kullanılır.

Test işlemleri:

Bütün gruplardaki değerler küçükten büyüğe doğru tek dizi halinde sıralanır ve her bir değere sıra numarası verilir. Aynı değerler için ortalama sıra numarası hesaplanır aynı olan değerlere verilir.

Test istatistiğinin (KW) hesaplanması:

$$KW = \frac{12}{n(n+1)} \left[ \sum_{j=1}^k \frac{T_j^2}{n_j} \right] - k(n+1)$$

$T_j$ : j. Gruptaki değerlerin sıra numaraları toplamı (her bir grup için);

$n_j$  : j. Gruptaki denek sayısı (her bir grup için);

k: Grup sayısı

n: Toplam denek sayısı

$H_0$  : İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$A = 0.05$  yanılma düzeyi için (grup sayısı – 1) serbestlik derecesindeki tablo değerine ( $KW_T$ ) bakılır.

Karar :  $KW_T > KW$  ise  $H_0$  hipotezi kabul edilir.

$KW_T < KW$  ise  $H_0$  hipotezi kabul edilir.

### EK 5. Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi:

Yöntemlerin karşılaştırılmasında, yöntemler arasında fark bulunup bulunmadığını kontrol etmek için Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analiz testi uygulanır.

#### 1. Kareler toplamları bulunur

##### a) Genel kareler toplamı (GnKT)

$$\text{GnKT} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

##### b) Gruplar arası kareler toplamı (GAKT)

$$\text{GAKT} = \sum \left[ \frac{(\sum x_j)^2}{n_j} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

##### c) Denekler arası kareler toplamı (DAKT)

$$\text{DAKT} = \sum \left[ \frac{(\text{Her bir satır toplamı})^2}{\text{Her bir satırdaki ölçüm sayısı}} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

##### e) Etkileşim (hata) kareler toplamı $\Rightarrow \text{HKT} = \text{GnKT} - \text{GAKT} - \text{DAKT}$

#### 2. Serbestlik derecelerinin bulunması

##### a) Genel serbestlik derecesi $\Rightarrow \text{GnSD} = n_j \times k - 1$

##### b) Gruplar arası serbestlik derecesi $\Rightarrow \text{GASD} = k - 1$

##### c) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow \text{DASD} = n_j - 1$

##### d) Hata serbestlik derecesi $\Rightarrow \text{HSD} = (n_j - 1) \times (k - 1)$

#### 3. Kareler ortalamasının bulunması

##### a) Gruplar arası kareler ortalaması $\Rightarrow \text{GAKO} = \text{GAKT} / \text{GASD}$

##### b) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow \text{DAKO} = \text{DAKT} / \text{DASD}$

##### c) Hata kareler ortalaması $\Rightarrow \text{HKO} = \text{HKT} / \text{HSD}$

4.  $H_0$  = Yöntemler arasında fark yoktur.  
 $H_1$  = En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.
5. Yanılma olasılığı  $p = 0.05$  seçilmiştir.
6.  $F = \text{GAKO} / \text{HKO}$
7.  $\alpha = 0.05$  düzeyinde G ASD ve HSD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.
8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
9. Karar: Yöntemler arasında fark yoktur ( $F = \text{Hesapla bulunan}, p < 0.05$ ) veya yöntemlerden en az biri farklıdır ( $F = \text{Hesapla bulunan}, p > 0.05$ ).

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Mehmet Lütfi YOLA

**Doğum Tarihi ve Yeri:** 23.07.1983 ANKARA

**Askerlik Durumu:** Tamamlanmış (ERZURUM 2009-2010/331.Kısa Dönem)

**E-mail:** mehmetyola@gmail.com

**Öğrenim Durumu:**

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya	Ankara Üniversitesi	2006
Y. Lisans	Eczacılık/Analitik kimya	Hacettepe Üniversitesi	2009
Doktora	Eczacılık/Analitik kimya	Hacettepe Üniversitesi	2013

**Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Danışmanı:** Ezetimib'in Farmasötik Preparatlardan Analizi ve Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi/Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN

**Doktora Tez Başlığı ve Danışmanı:** Farmasötik preparatlardan ve gıdalardan tobramisin tayini için moleküler baskılanmış nanosensörlerin geliştirilmesi /Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN

**Başarıları:** 2006 Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölüm Birinciliği ve Fakülte Üçüncülüğü

**Uzmanlık Alanları:** İlaç analizleri ve validasyon

Gıda analizleri (Elektrokimya ve QCM)

Çevre analizleri (Ağır metal sensörleri)

Yüzey modifikasyonu ve karakterizasyon teknikleri (AFM, XPS, EIS, Elipsometri)

Biyomalzemeler

Moleküler Baskılanmış Polimerler

Biyosensörler ve DNA uygulamaları (SWV, DPV, QCM, SPR)

Nanoteknolojik uygulamalar (Çekirdek-kabuk yapılar)



**Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SCI/SCI Expanded):**

- 1) V. K. Gupta, N. Atar, **M. L. Yola**, C. Darcan, Ö. İdil, Z. Üstündağ, Biosynthesis of silver nanoparticles using chitosan immobilized *Bacillus cereus*: Nanocatalytic studies, *Journal of Molecular Liquids*, (2013) (Accepted)
- 2) V. K. Gupta, **M. L. Yola**, N. Atar, Z. Üstündağ, A. O. Solak, A novel sensitive Cu (II) and Cd(II) nanosensor platform: graphene oxide terminated p-aminophenyl modified glassy carbon surface, *Electrochimica Acta*, 112 (2013) 541-548
- 3) V. K. Gupta, **M. L. Yola**, N. Özaltın, N. Atar, Z. Üstündağ, L. Uzun, Molecular imprinted polypyrrole modified glassy carbon electrode for the determination of tobramycin, *Electrochimica Acta*, 112 (2013) 37-43
- 4) **M. L. Yola**, N. Atar, V. K. Gupta, A. O. Solak, Z. Üstündağ, Electrochemical studies on graphene oxide-supported metallic and bimetallic nanoparticles for fuel cells applications, *Electrochimica Acta*, (2013) (Accepted)
- 5) V. K. Gupta, N. Atar, **M. L. Yola**, Z. Üstündağ, L. Uzun, A novel magnetic Fe@Au core-shell nanoparticles anchored graphene oxide recyclable nanocatalyst for the reduction of nitrophenol compounds, *Water Research*, (2013) (Accepted)
- 6) V. K. Gupta, **M. L. Yola**, M. S. Qureshi, A. O. Solak, N. Atar, Z. Üstündağ, A novel impedimetric biosensor based on graphene oxide/gold nanoplatform for detection of DNA arrays, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 188 (2013) 1201-1211
- 7) Y. Tümer, N. Asmafiliz, Z. Kılıç, T. Hökelek, L. Y. Koç, L. Açıık, **M. L. Yola**, A. O. Solak, Y. Öner, D. Dündar, M. Yavuz, Phosphorus-nitrogen compounds: Part 28. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing vanillinato and pendant ferrocenyl groups, *Journal of Molecular Structure*, 1049 (2013) 112-124
- 8) V. K. Gupta, N. Atar, **M. L. Yola**, M. Eryılmaz, H. Torul, U. Tamer, İ. H. Boyacı, Z. Üstündağ, A novel glucose biosensor platform based on Ag@AuNPs modified graphene oxide nanocomposite and SERS application, *Journal of Colloid and Interface Science*, 406 (2013) 231-237

- 9) V. K. Gupta, **M. L. Yola**, N. Atar, A. O. Solak, L. Uzun, Z. Üstündağ, Electrochemically modified sulfisoxazole nanofilm on glassy carbon for determination of cadmium (II), *Electrochimica Acta*, 105 (2013) 149-156
- 10) H. Yüksek, O. Akyıldırım, **M. L. Yola**, Ö. G. Kol, M. Çelebier, D. Kart, Synthesis, *In Vitro* Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some New 4,5-Dihydro-1H-1,2,4-Triazol-5-One Derivatives, *Archiv der Pharmazie-Chemistry in Life Sciences*, 346 (2013) 470-480
- 11) **M. L. Yola**, N. Atar, Z. Üstündağ, A. O. Solak, A novel voltammetric sensor based on p-aminothiophenol functionalized graphene oxide/gold nanoparticles for determining quercetin in the presence of ascorbic acid, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 698 (2013) 9-16
- 12) N. Asmafiliz, Z. Kılıç, A. Öztürk, Y. Süzen, T. Hökelek, L. Açık, Z. B. Çelik, L. Y. Koç, **M. L. Yola**, Z. Üstündağ, Phosphorus-Nitrogen Compounds: Part 25. Syntheses, Spectroscopic, Structural and Electrochemical Investigations, Antimicrobial Activities, and DNA Interactions of Ferrocenyldiaminocyclotriphosphazenes, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 188(12) (2013) 1723-1742
- 13) **M. L. Yola**, N. Atar, M. S. Qureshi, Z. Üstündağ, A. O. Solak, Electrochemically grafted etodolac film on glassy carbon for Pb(II) determination, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171-172 (2012) 1207-1215
- 14) **M. L. Yola**, N. Özaltın, Adsorptive stripping voltammetric methods for determination of ezetimibe in tablets, *Reviews in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 29-36
- 15) **M. L. Yola**, N. Özaltın, Electrochemical studies on the interaction of an antibacterial drug nitrofurantoin with DNA, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653 (2011) 56-60
- 16) **M. L. Yola**, N. Özaltın, Square-wave voltammetric determination of ezetimibe, *Revista De Chimie*, 62(4) (2011) 420-426

**Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler**

1) **M. L. Yola**, N. Özeltin, Investigation of interaction of simvastatin with human genomic DNA, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 32(1) (2012) 1-16

2) **M. L. Yola**, M. Arıcı, N. Özeltin, Interaction of nonsteroidal anti- inflammatory drug naproxen sodium with DNA by electrochemical and spectroscopic methods, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 31(2) (2011) 109-118