



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK
LİSANS
TEZİ

**RİVASTİGMİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER
BASKILANMIŞ KATI FAZ EKSTRAKSİYON
ADSORBANININ GELİŞTİRİLMESİ**

MERVE YILDIZ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

OCAK 2023



**RİVASTİGMİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KATI FAZ
EKSTRAKSİYON ADSORBANININ GELİŞTİRİLMESİ**

Merve YILDIZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Merve YILDIZ

20/01/2023

RİVASTİGMİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KATI FAZ
EKSTRAKSİYON ADSORBANININ GELİŞTİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Merve YILDIZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2023

ÖZET

Bu tez çalışmasında, rivastigmin (RİV)'in farklı ortamlardan tayini için yeni, hassas, seçici, hızlı ve ucuz olan bir moleküler baskılanmış katı-faz ekstraksiyon (MISPE)-spektrofotometrik yöntemi geliştirilmiştir. Fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), başlatıcı olarak azobisisizo bütironitril (AIBN) ve porojen olarak dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Geliştirilen MISPE spektrofotometrik yöntemle RİV, organik, sulu ve insan serumu ortamlarında başarılı bir şekilde tayin edilmiştir. İnsan serumunda, moleküler baskılanmış polimer (MIP) ve moleküler baskılanmamış polimer (NIP) kullanılarak sırasıyla %72,64 ± 1,16 ve %17,16 ± 3,92 geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Gözlenebilme sınırı (LOD) 0,63 µg/mL, tayin sınırı (LOQ) 1,92 µg/mL, doğrusal aralık ise 2,0-100,0 µg/mL olarak bulunmuştur.

Bilim Kodu : 10103.09
Anahtar Kelimeler : Moleküler Baskılanmış Polimer, Katı-Faz Ekstraksiyonu, Spektrofotometre, Rivastigmin
Sayfa Adedi : 51
Danışman : Prof. Dr. Hasan BASAN

DEVELOPMENT OF MOLECULARLY IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION
ADSORBANT FOR DETERMINATION OF RIVASTIGMIN

(M. Sc. Thesis)

Merve YILDIZ

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2023

ABSTRACT

In this thesis, a new, sensitive, selective, fast and inexpensive molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE)-spectrophotometric method has been developed for the determination of rivastigmine (RIV) in different media. Methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), azobisisobutyronitrile (AIBN), and dimethylsulfoxide (DMSO) were used as functional monomer, crosslinker, initiator and porogen, respectively. RIV has been successfully determined from organic, aqueous and human serum media by using the developed MISPE spectrophotometric method. $72.64\% \pm 1.16$ and $17.16\% \pm 3.92$ recovery values have been achieved for the molecularly imprinted polymer (MIP) and non-imprinted polymer (NIP), respectively. The limit of detection, limit of quantification values and linearity range were found to be $0.63 \mu\text{g/mL}$, $1.92 \mu\text{g/mL}$, $2.0\text{-}100.0 \mu\text{g/mL}$, respectively.

Science Code : 10103.09

Key Words : Molecularly Imprinted Polymer, Solid Phase Extraction,
Spectrophotometer, Rivastigmine

Page Number : 51

Supervisor : Prof. Dr. Hasan BASAN

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması ve yürütülmesi sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp, her konuda desteğini esirgemeyen değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Hasan BASAN’a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında karşılaştığım tüm zorluklarda yanımda olan, bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, her konuda beni destekleyen ve bilgisiyle ufku aydınlatan değerli hocam Arş. Gör. Sayın Hüma YILMAZ’a,

Laboratuvarlarda çalışmamı sağlayan Analitik Kimya bölüm başkanlığına ve değerli öğretim üyelerine,

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen ve yanımda olan sevgili aileme,

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, karşılaştığım her zorluğun üstesinden geleceğime beni inandıran sevgili eşim Ulaş’a ve bu tezi yazarken hayatımıza girip dünyamızı aydınlatan oğlum Deniz Aras’a teşekkürü bir borç biliyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Rivastigmin Hidrojen Tartarat	3
2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	3
2.1.2. Farmakolojisi	3
2.1.3. Rivastigmin tayin yöntemleri.....	3
2.2. Moleküler Baskılama Tekniği.....	4
2.2.1. Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) hazırlanması	4
2.2.2. Moleküler baskılama çeşitleri	5
2.3. Moleküler Baskılanmış Polimer (MIP) Hazırlarken Kullanılan Bileşenler	7
2.3.1. Kalıp molekül.....	7
2.3.2. Fonksiyonel monomer.....	7
2.3.3. Çapraz bağlayıcı.....	8
2.3.4. Çözücü	8
2.3.5. Başlatıcı.....	8
2.4. Katı-Faz Ekstraksiyon (KFE) Metodu	8
2.5. Moleküler Baskılanmış Katı-Faz Ekstraksiyon (MISPE) Yöntemi	11

	Sayfa
2.6. Beç (İnkübasyon) Çalışmaları	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
3.2. Kullanılan Cihazlar	13
3.3. Çözücülerin ve Çözeltilerin Hazırlanması	14
3.3.1. Stok rivastigmin çözeltisinin hazırlanması	14
3.3.2. Tampon çözeltilerin hazırlanışı	14
3.3.2. Kalibrasyon için standartların hazırlanması	15
3.3.3. Ekstraksiyon çözücüsünün hazırlanması	16
3.3.4. Yükleme çözeltilerinin hazırlanması	16
3.3.5. Yıkama çözeltisinin hazırlanması	16
3.3.6. Elüsyon çözeltisinin hazırlanması	16
3.4. RİV Baskılanmış Polimer Sentezi	16
3.4.1. RİV baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış polimer (NIP) sentez parametreleri	19
3.5. Karakterizasyon Çalışması	20
3.6. RİV Yeniden Bağlanma (Beç) Çalışmaları	20
3.7. MISPE Koşullarının Optimizasyonu ve Seçicilik	22
3.8. Değişik Ortamlardan RİV'in Uzaklaştırılması ve Spektrofotometrik Yöntemle Tayini	24
4. BULGULAR	25
4.1. Sorbentin Sentez Koşullarının Optimizasyonu ve Karakterizasyonu	25
4.2. MISPE Koşullarının Optimizasyonu ve Seçicilik Çalışması	34
4.3. Geliştirilen MISPE-Spektroflorimetrik Yönteme Ait Analitik Parametreler	38
5. TARTIŞMA	41
5.1. MIP/NIP Sentez Çalışmaları	41
5.2. Karakterizasyon	42

	Sayfa
5.3. Beç Ortamda RİV Bağlanma Çalışmaları	43
5.4. MISPE Çalışmaları.....	44
5.5. Geliştirilen MISPE-Spektroflorimetrik Yönteme Ait Analitik Parametreler.....	46
6. SONUÇ	47
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	51

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. RİV baskılanmış polimer sentez bileşenleri ve miktarları.....	17
Çizelge 4.1. Kalibrasyon çalışması.....	38
Çizelge 4.2. Gün-içi çalışmalar.....	39
Çizelge 4.3. Günler arası çalışmalar	39
Çizelge 4.4. Serum örneklerinden RİV geri kazanım çalışması	39

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Rivastigmin Hidrojen Tartarat'ın kimyasal yapısı	3
Şekil 2.2. Moleküler baskılanmış polimerin hazırlanma basamakları	5
Şekil 2.3. KFE kolonunun yapısı	9
Şekil 2.4. KFE mikrolakaları	9
Şekil 2.5. Çeşitli ticari KFE kartuş ve diskleri.....	9
Şekil 2.6. Vakum manifoldu	10
Şekil 2.7. KFE yöntemi ile maddelerin ayrılma şekilleri.....	10
Şekil 2.8. KFE yöntemi ile maddelerin ayrılma şekilleri.....	10
Şekil 2.9. Moleküler baskılanmış katı-faz ekstraksiyon işlemi	11
Şekil 3.1. RİV'in (Analit) kimyasal yapısı	17
Şekil 3.2. MAA (Monomer) kimyasal yapısı.....	18
Şekil 3.3. EGDMA (çapraz bağlayıcı) kimyasal yapısı	18
Şekil 3.4. DMSO (porojen) kimyasal yapısı	18
Şekil 3.5. AIBN (başlatıcı) kimyasal yapısı.....	18
Şekil 3.6. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) sentez aşamaları	19
Şekil 4.1. pH 8 Tampon ortamında çapraz bağlayıcı miktarının MIP ve NIP'in RİV bağlama yüzdesine etkisi	26
Şekil 4.2. DMSO ortamında çapraz bağlayıcı miktarının MIP ve NIP'in RİV bağlama yüzdesine etkisi	26
Şekil 4.3. pH 8 Tampon ortamında monomer miktarının MIP ve NIP'in RİV geri kazanım yüzdesine etkisi	27
Şekil 4.4. DMSO ortamında monomer miktarının MIP ve NIP'in RİV geri kazanım yüzdesine etkisi.....	27
Şekil 4.5. pH 8 tampon ortamında RİV miktarının MIP ve NIP'in analiti yeniden bağlama yüzdesine etkisi	28
Şekil 4.6. DMSO ortamında RİV miktarının MIP ve NIP'in analiti yeniden bağlama yüzdesine etkisi.....	28

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. Sorbentin yükleme, yıkama ve elüsyon basamağı şişme davranışı	29
Şekil 4.8. Sorbentin yükleme, yıkama ve elüsyon basamağı şişme davranışı	29
Şekil 4.9. İnkübasyon ortamının MIP ve NIP'nin RİV bağlama üzerindeki etkisi	30
Şekil 4.10. pH 8 tampon ortamında inkübasyon süresinin bağlanma yüzdesine etkisi.....	30
Şekil 4.11. DMSO ortamında inkübasyon süresinin bağlanma yüzdesine etkisi	31
Şekil 4.12. pH 7 tampon ortamında sorbent miktarının RİV bağlamaya etkisi.....	31
Şekil 4.13. pH 8 tampon ortamında sorbent miktarının RİV bağlamaya etkisi.....	32
Şekil 4.14. DMSO ortamında sorbent miktarının RİV bağlamaya etkisi	32
Şekil 4.15. ACN ortamında sorbent miktarının RİV bağlamaya etkisi	32
Şekil 4.16. pH 8 tampon ortamında RİV derişiminin sorbentin bağlama kapasitesine olan etkisi.....	33
Şekil 4.17. DMSO ortamında RİV derişiminin sorbentin bağlama kapasitesine olan etkisi	33
Şekil 4.18. Seçicilik çalışmasında yükleme çözücüsü içinde kullanılan Donepezil HCl ve ATOL geri kazanım yüzdeleri.....	34
Şekil 4.19. Yükleme çözücü türünün sorbentin RİV bağlamasına etkisi	35
Şekil 4.20. Yükleme çözücüsü hacminin sorbentin RİV bağlamasına etkisi.	35
Şekil 4.21. Yıkama çözücüsünün sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi.....	36
Şekil 4.22. Yıkama çözücüsü hacminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi.....	36
Şekil 4.23.. Elüsyon çözücüsünün bileşenlerinin oranının sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi.....	37
Şekil 4.24. Elüsyon çözücüsünün hacminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi	37
Şekil 4.25. Kartuşa doldurulan sorbent miktarının RİV'in bağlanma yeteneğine olan etkisi	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
----------	-------------

-	-
---	---

Kısaltmalar	Açıklamalar
-------------	-------------

AA	Asetik Asit
ACN	Asetonitril
AIBN	Azobizizobütiro nitril
ATOL	Atenolol
BF	Baskılama Faktörü
CHL	Kloroform
DCE	Dikloetan
DMSO	Dimetil sülfat
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
KFE	Katı-Faz ekstraksiyonu
MAA	Metakrilik Asit
MeOH	Metanol
MIP	Baskılanmış Polimer
MISPE	Moleküler Baskılanmış Katı-Faz Ekstraksiyonu
NaOH	Sodyum Hidroksit
NIP	Baskılanmamış Polimer
SD	Standart Sapma
SPE	Katı-Faz Ekstraksiyonu
TOL	Toluen
X_{ort}	Ortalama Değer

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı, genel olarak yavaş başlayıp zamanla artan, nöronların yapı veya fonksiyon kaybına sebep olan bir hastalık çeşididir. Hastalığın en yaygın görülen erken belirtisi son olayların hatırlanmasında güçlük yaşanmasıdır. Hastalığın ilerleyen süreçlerinde konuşmada bozukluklar, ruh hali değişimleri ve davranış sorunları görülebilir [1]. Rivastigmin (RİV), Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan bir ilaç etken maddesidir. Fenil karbamat yapısında bulunan asetilkolin esterase inhibitörüdür [2]. Alzheimer hastalığının birinci basamak tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmış üç etken maddeden biridir. Piyasada hem oral hem de transdermal yama farmasötik formları bulunmaktadır [3].

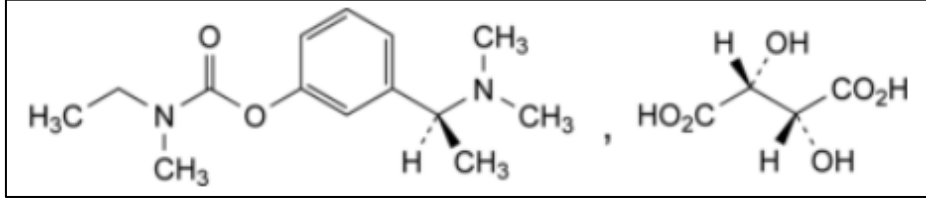
RİV tayini amacıyla literatürde voltametrik [4], HPLC [5] ve GC-MS [6] yöntemleri kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, RİV'in sulu ortamlardan ve serum numunelerinden seçici olarak uzaklaştırılması ve tayini amacıyla bir moleküler baskılanmış katı-faz ekstraksiyonu (MISPE)-Spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Rivastigmin Hidrojen Tartarat

2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri



Şekil 2.1. Rivastigmin Hidrojen Tartarat'ın kimyasal yapısı

Kimyasal adı “3-[(1S)-1-(Dimethylamino)ethyl]phenyl N-ethyl-N-methylcarbamate hydrogen (2R,3R)-2,3-dihydroxybutanedioate” şeklindedir. Kimyasal yapısı Şekil 2.1’de gösterilmekte olan ve kapalı formülü $C_{18}H_{28}N_2O_8$ olan RİV’in molar ağırlığı 400,4 g/mol dür.

Beyaz veya hemen hemen beyaz, nem çekici, kristal veya ince kristal formunda bir tozdur. Metanol içerisinde çözünen bu kimyasal, suda çok iyi çözünürken, etil asetat içerisinde yavaş çözünür. 123°C-125°C aralığında ise erir.

2.1.2. Farmakolojisi

RİV hafif ve orta dereceli Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan bir kolinesteraz inhibitörüdür . İlk basamak tedavi için FDA tarafından onaylanmış bir ilaç etken maddesidir. Bu ilaç etken maddesi hem oral hem de transdermal yama formülasyonlarında bulunmaktadır [3]. Alzheimer hastalığına sahip bireylerin beyinde AChE’nin G1 enzimatik formu bulunur. Rivastigmin, beyinde yer alan bu enzimatik formu inhibe ederek tedavi sağlar [7].

2.1.3. Rivastigmin tayin yöntemleri

Majid Arvand ve Parisa Fallahi serum ve idrar numunlerinde moleküler baskılanmış polimerleri kullanarak voltametrik olarak rivastigmin tayin etmiştir [4]. Ayrıca Hossein Amini ve Abolhassan Ahmadiani insan plazmasında rivastigmin tayini için yüksek

performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirmiştir [5]. Ayrıca Yunfei Sha ve arkadaşları rivastigmin tayini için hızlı ve duyarlı bir metod geliştirerek HS-SPME ve GC-MS tekniklerini kullanmıştır [6].

2.2. Moleküler Baskılama Tekniği

Moleküler baskılama yöntemi, farklı matrislerden iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin seçiciliği yüksek şekilde ayrılması için akıllı polimer elde edilmesini sağlayan ve bunun farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir malzeme geliştirme yöntemidir. Moleküler baskılama tekniği, çapraz bağlı polimer ağı içinde boşluklar oluşturulması temeline dayanmaktadır. Bu oyuklar, kalıp molekülün boyutunu ve şeklini tanıma özelliğine sahiptir. Kalıp molekülün herhangi bir desorpsiyon yöntemiyle uzaklaştırılması, sabit pozisyonlarda monomer fonksiyonel gruplarını açığa çıkarmakta ve kalıp molekülüne özgü bir yapı oluşmaktadır. Bu şekilde hazırlanan polimer, kalıp molekülün boyutunu, yapısını, uzaydaki yönelişini tanır. Herhangi bir ortamda bu kalıba karşı seçici ve etkin olarak davranarak kalıp molekülü tanır. Moleküler baskılanmış polimerler kalıp molekül için eşsiz bir seçiciliğe sahip olmakla birlikte mekanik baskıya, ısıya, aside, baza, suya ve organik çözücülere karşı dirençlidirler.

2.2.1. Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) hazırlanması

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır.

Ön-polimerizasyon

Uygun fonksiyonel gruplar içeren ve polimerleşebilen monomerler, kalıp moleküle kovalent olan veya olmayan etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluşturur. Bu basamakta kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu gözlenir. Kalıp molekülün yapısı ve moleküle özgü kimyasal özellikler bu aşamada oldukça önemlidir.

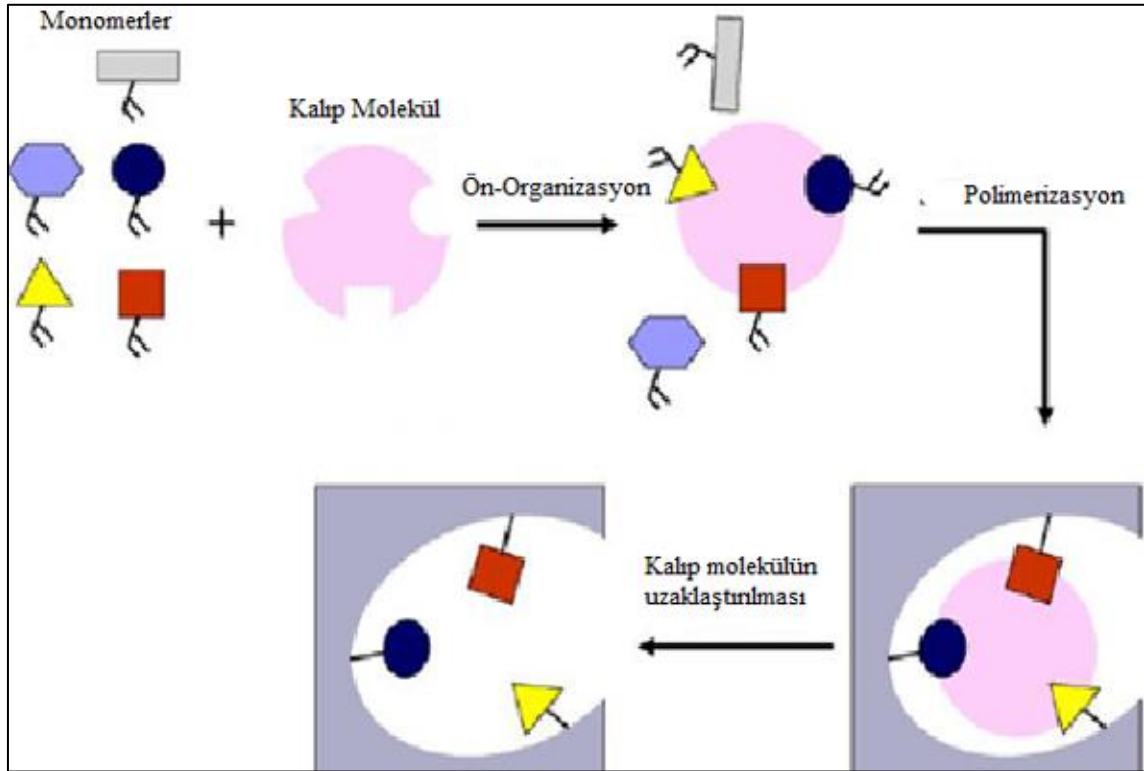
Polimerizasyon

Monomer-kalıp molekül kompleksi; uygun bir çapraz bağlayıcı, çözücü (porojen) ve başlatıcı kullanılarak polimerleştirilir. Polimerleşme fonksiyonel monomer üzerinden

gerçekleştirilir. Polimerizasyonlarda fotokimyasal ve termal bozunum ile serbest radikal oluşturan azobisisobutironitril (AIBN) çoğunlukla tercih edilen azo-başlatıcıdır.

Kalıp molekülün uzaklaştırılması

Polimer yapısında bulunan kalıp molekül, uygun çözücü veya çözücü karışımları kullanılarak yapıdan uzaklaştırılır. Kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması ile polimerik yapı üzerinde hedef moleküle özgü boşluklar oluşur. Uygun koşullar altında bu boşluklar kalıp molekülün boyutunu, şeklini ve fonksiyonel gruplarının açıl duruşlarını tanır. Hedef molekül, oluşan bu boşluklara seçici ve etkin bir şekilde bağlanır. Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanma basamakları Şekil 2.2’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Moleküler baskılanmış polimerin hazırlanma basamakları [8]

2.2.2. Moleküler baskılama çeşitleri

Kalıp molekül ve fonksiyonel monomerlerin arasındaki etkileşime göre moleküler baskılanmış polimer hazırlanması için kullanılan iki farklı yaklaşım bulunmaktadır. 1977 yılında Wulff ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan kovalent baskılama ve 1981 yılında

Mosbach ve arkadaşları tarafından geliştirilen kovalent olmayan baskılama yaklaşımları bulunmaktadır [9].

Kovalent baskılama

Kovalent baskılama tekniğinde fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında kuvvetli bir kovalent etkileşim gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan kovalent bağlar ekstraksiyon işlemi ile kırılarak kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül baskılanmış polimer ile etkileştiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşmaktadır.

Kovalent olmayan baskılama

Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması hidrojen bağı, iyon-iyon, iyon-dipol, Van der Waals gibi moleküller arası etkileşimlerle gerçekleşir. Kalıp molekül polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle polimerden uzaklaştırılır. Yöntemin basitçe uygulanabilmesi ve kullanılan fonksiyonel monomerlerin kolaylıkla bulunabilmesi sebebiyle moleküler baskılanmış polimer sentezinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir.

Kovalent moleküler baskılamanın avantajları

- Kovalent moleküler baskılamada monomer ile kalıp molekül arasında kararlı bağlar oluşur. Oluşan kompleks stokiyometrik orandadır ve bunun sonucu olarak moleküler baskılama prosesi ve polimer üzerindeki bağlanma bölgelerinin yapısı daha kesindir. Bunların bir sonucu olarak Kovalent baskılamada daha yüksek afiniteye sahip bağlanma bölgeleri oluşmaktadır.

Kovalent moleküler baskılamanın dezavantajları

- Bu yöntemde kullanılan kimyasallar sınırlıdır. Monomer-kalıp molekülünün sentezi maliyetli bir işlemdir. Kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması sırasında kovalent bağların kırılması gerekmektedir. Bu işlem ise asit hidrolizi ile gerçekleşir. Bu nedenle oluşan kovalent bağların yapıdan uzaklaştırılması ve tekrar bağlanması prosesleri yavaştır.

Kovalent olmayan moleküler baskılamanın avantajları

- Bu yaklaşımda ön polimerizasyon sırasında fonksiyonel monomerler kovalent olmayan etkileşimlerle kalıp molekülle kompleks oluştururlar. Kovalent olmayan bağlanma kinetiği enzim substrat bağlanmasına benzer. Kovalent olmayan etkileşimlerin daha zayıf olmasından dolayı polimerizasyon sonrası kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır. Hedef molekülün yapıya bağlanma kinetiği hızlıdır.

Kovalent olmayan moleküler baskılamanın dezavantajları

- Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülü arasında meydana gelen kompleks oluşumunu arttırmak amacıyla fazla miktarda fonksiyonel monomer kullanılır. Bu durum seçici olmayan bağlanma bölgeleri oluşmasına neden olabilir. Bağlanma bölgeleri dağılımı heterojendir.

2.3. Moleküler Baskılanmış Polimer (MIP) Hazırlarken Kullanılan Bileşenler

Moleküler baskılanmış polimer sentezi; kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, porojen (çözücü) ve başlatıcı ile gerçekleştirilir.

2.3.1. Kalıp molekül

Kalıp molekül, baskılama işleminde baskılanmış bölgeler oluşturur. Bu nedenle fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra monomer ile uygun etkileşimde bulunması, polimerizasyonda kullanılan diğer bileşenler ile uyumlu olması ve porojen içerisinde çözünmesi oldukça önemlidir. Kalıp molekülün polimerizasyon koşullarında kararlı olması da gereklidir [10].

2.3.2. Fonksiyonel monomer

Fonksiyonel monomer, yüksek seçiciliğe sahip bağlanma bölgelerinde kalıp molekül ile etkileşimlerden sorumludur. Fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşim birbirini tamamlamalıdır. Bu etkileşimin birbirini tamamlaması sayesinde etkin bir baskılama gerçekleşir. Kovalent olmayan moleküler baskılama tekniğinde baskılanmış

bölge sayısının çok olması için fonksiyonel monomer kalıp molekülden daha fazla kullanılır. Kalıp molekül/fonksiyonel monomer oranı 1:4 veya üzerinde olabilir. Bu oranın daha düşük olması yeterli bağlanma bölgelerinin oluşumunu olumsuz etkilerken, çok yüksek olması da seçici olmayan (non-spesifik) bağlanma bölgeleri oluşturur [11, 12].

2.3.3. Çapraz bağlayıcı

Moleküler baskılanmış polimer hazırlığında kullanılan çapraz bağlayıcılar baskılanmış bağlanma bölgelerini kararlı kılarak matrikse mekanik dayanıklılık kazandırır. Ayrıca polimer matriksinin yapısal formunu kontrol edip düzenler. Kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırıldıktan sonra yeterli kararlılığa sahip olması ve seçici bağlanma bölgelerinin oluşması çapraz bağlayıcı oranının yüksek olmasına bağlıdır. Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) en çok kullanılan çaprazbağlayıcıdır [12,13].

2.3.4. Çözücü (Porojen)

Çözücüler, polimerizasyon sırasında kalıp molekül, fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcı ve başlatıcıyı aynı fazda tutmak amacıyla kullanılır. Ayrıca polimerin gözenekli yapısının oluşmasını sağlar. Hazırlanan polimerin analite seçici olması için oluşan gözenekli yapının uygun boyutta olması çözücü seçimi ile ilişkilidir [12].

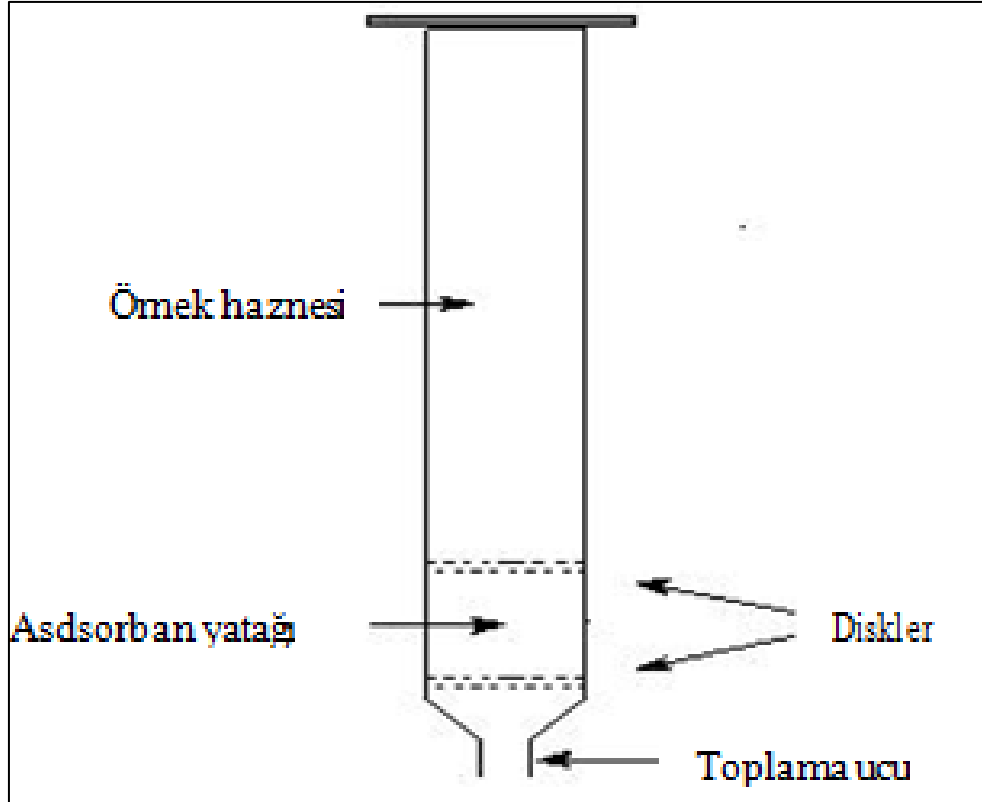
2.3.5. Başlatıcı

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde genellikle serbest radikal polimerizasyonu yöntemi tercih edilir. Azo başlatıcılar bu amaçla en çok tercih edilen maddelerdir. Başlatıcılar fotokimyasal veya termal bozunma ile serbest radikaller oluşturur ve eşleşmemiş elektronlar çift bağlarla etkileşerek polimerizasyonu başlatırlar. İki radikal birbiri ile etkileştiğinde polimerizasyon sonlanır.

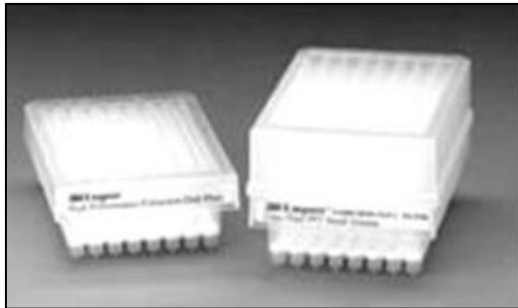
2.4. Katı-Faz Ekstraksiyon (KFE) Metodu

Katı faz ekstraksiyonu (KFE) yöntemi temel olarak küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kartuş veya disklerine çeşitli tutucu maddelerin doldurulması ve sıvı örneklerini istenmeyen bileşenlerden ayırma, ön-zenginleştirme ve ileriki analiz aşamaları için örnek matriks yapısının değiştirilmesi amaçlarıyla hazırlanmış kartuş ve disklerden geçirilmesi temeline

dayanır. Sıvı örnekler kartuştan doğrudan geçirilebilir. Burada yer çekimi kuvveti yardımıyla ayırım gerçekleşir. Fakat bu yöntem ayırım süresinin uzun olmasına neden olur. Zamandan tasarruf sağlanması amacıyla vakum manifoldları da kullanılmaktadır [14,15]. Şekil 2.3, 2.4, 2.5 ve 2.6’da klasik bir KFE kartuş yapısının yanı sıra çeşitli ticari KFE kartuş, disk ve plakaları ile KFE manifoldu görülmektedir.



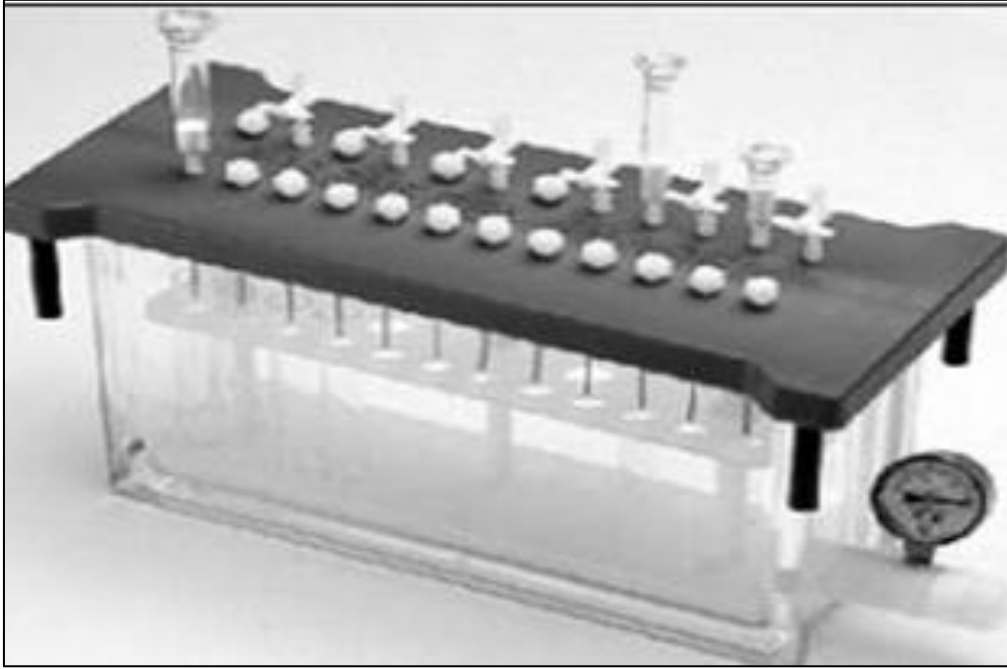
Şekil 2.3. KFE kolonunun yapısı



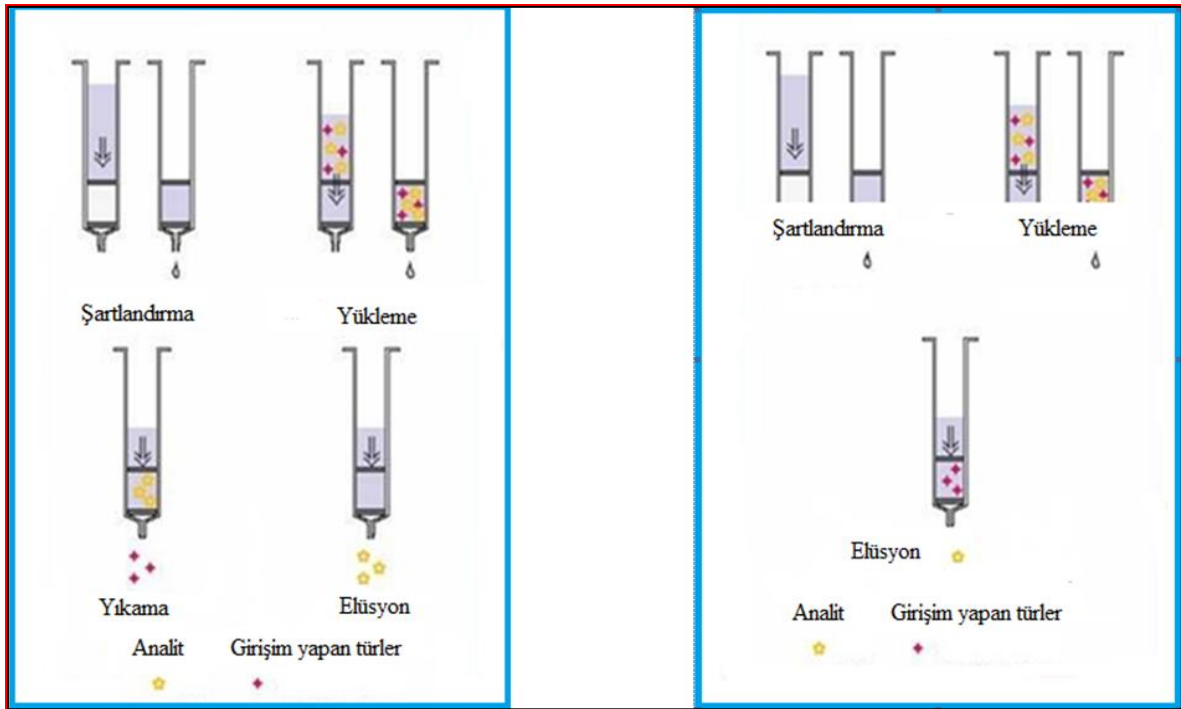
Şekil 2.4. KFE mikrolakaları



Şekil 2.5. Çeşitli ticari KFE kartuş ve diskleri



Şekil 2.6. Vakum manifoldu



Şekil 2.7. KFE yöntemi ile maddelerin ayrılma şekilleri

Şekil 2.8. KFE yöntemi ile maddelerin ayrılma şekilleri

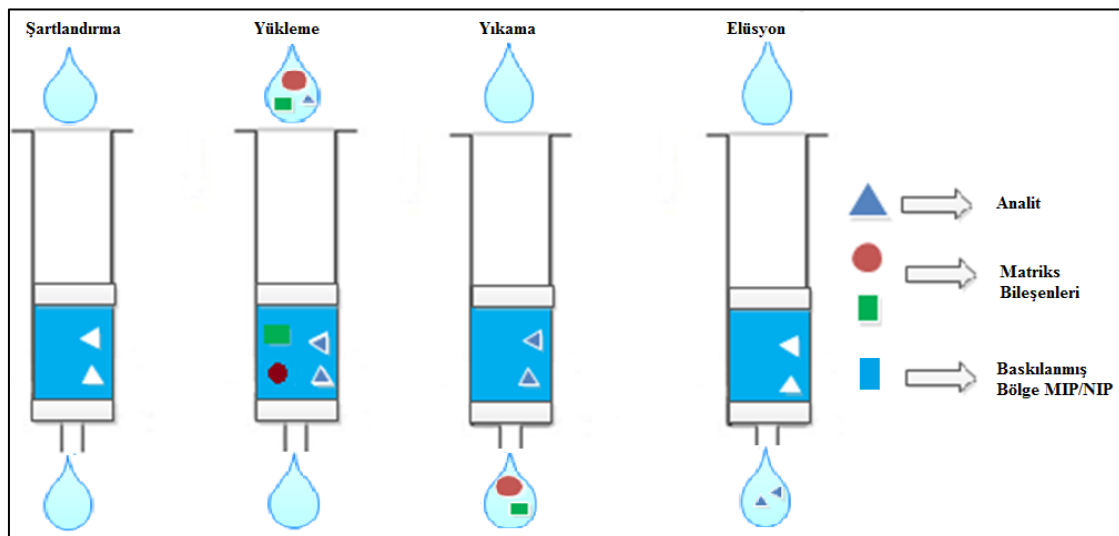
KFE metodunda kartuştan geçirilme sırasında örnek moleküller ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim oluşur. Bu etkileşimler sayesinde maddelerin birbirinden ayrılması iki yolla gerçekleştirilir. Birinci yöntemde ilk aşamada, analiz edilecek bileşik sorbente bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi

bir etkileşime girmezler. Daha sonra istenmeyen bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır ve analiz edilecek bileşen sorbentten uygun bir çözücü ile yıkanarak alınır (Şekil 2.7). Daha az tercih edilen ikinci yöntemde ise istenmeyen bileşenlerin tutucu madde ile etkileşimi söz konusudur. Özellikle atık yağlar gibi matriksten ayrılması zor olan maddelerin analizinde kullanılan bu yöntemde, matrikstekki istenmeyen bileşenler sorbent tarafından sıkı şekilde bağlanırlar. Analit ise tutucu madde ile etkileşime girmez ve uygun bir çözücü yardımıyla yıkanarak toplanır (Şekil 2.8). Bu yöntemde, kartuş içerisindeki tutucu maddenin oluşturduğu katı faz, filtre işlevi görmektedir [15-17].

2.5. Moleküler Baskılanmış Katı-Faz Ekstraksiyon (MISPE) Yöntemi

Katı-faz ekstraksiyonunda seçiciliği arttırabilmek için çeşitli sorbentler kullanılmaktadır. Klasik KFE sorbentine kıyasla MISPE yöntemi yüksek seçiciliğe sahiptir. Termal ve kimyasal kararlılıkları sayesinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilir. MISPE yöntemi farmasotik, biyolojik ve çevresel örneklerle yaygın olarak uygulanmaktadır [18].

Bu yöntemde geleneksel KFE işleminde olduğu gibi, baskılanmış polimerin belirli bir miktarı (50-200 mg) KFE kartuşuna doldurulur. Daha sonra sırasıyla, şartlandırma, yükleme, yıkama ve elüsyon aşamaları uygulanır. MISPE yöntemi şematik olarak Şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Moleküler baskılanmış katı-faz ekstraksiyon işlemi

Şartlandırma basamağında, MIP’in kavimleri (bağlanma bölgeleri) ile örnekteki hedef molekül arasında etkileşimin maksimum düzeye çıkması için sorbentin bağlanma bölgeleri

aktive edilir. Yükleme basamağında örnek, kartuş üzerine çözücü içinde uygulanır. Bu basamakta sadece hedef molekülün sorbente tutunması sağlanır [15]. Çoğunlukla sorbente hem analit hem de örnek matriksinde bulunan diğer girişim yapıcı bileşenler bağlanır. Yıkama basamağında, seçici bir ekstraksiyon gerçekleştirebilmek için uygun organik çözücü ile yıkama işlemi uygulanarak girişim yapıcı bileşenler sorbentten uzaklaştırılır ve analitin sorbentte bağlı kalması sağlanır. MISPE yönteminin yüksek seçiciliğinin ortaya çıkabilmesi için yıkama basamağı önemli bir aşamadır. Bu basamakta MIP'in, analiti seçici olarak tanıma kabiliyetinin ortaya çıkabilmesi için yıkama çözücüsünün pH'ı, türü ve miktarı optimize edilmelidir. Yaygın olarak kullanılan yıkama çözücüleri dikloroetan (DCE), toluen (Tol) ve kloroformdur (CHL). Asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) gibi yüksek polaritede olan bazı çözücülerle de iyi sonuçların alındığı gözlenmiştir [19]. Elüsyon basamağında, uygun bir çözücü veya çözücü karışımı ile girişime neden olan bileşenlerden temizlenmiş, sorbentten ayrılması sağlanan analitin miktarı HPLC, spektrofotometri, UV-Vis spektrofotometri vb. uygun bir analitik yöntemle tayin edilir.

2.6. Beç (İnkübasyon) Çalışmaları

Beç çalışmaları, MISPE çalışmalarından önce MIP ve NIP'in analite karşı davranışlarını belirleyerek bağlanma kapasiteleriyle ilgili bilgi edinmek ve yeniden bağlanma özelliklerini incelemek amacıyla yapılır. Çalışmalar genellikle uygun bir beher içerisinde gerçekleştirilir. Baskılama başarısı, analitin MIP ve NIP'e bağlanma ilgisini belirlemek suretiyle baskılama faktörü (BF) aracılığıyla tespit edilir [20].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Azobisisoütironitril (AIBN)	Aldrich
Etilen glikol dimetakrilat (EDMA)	Aldrich
Metakrilik asit	Aldrich
Sitrik Asit	Sigma
Sodyum Sitrat	Merck
Sodyum Hidroksit	Sigma
Monobazik potasyum fosfat	Sigma
Dipotasyum hidrojen fostat	Sigma
Etanol	Sigma
Dimetilsülfoksit	Merck
Asetonitril	Merck
Rivastigmin	Novartis
Metanol	Sigma
Asetik Asit	Sigma
Donepezil HCl	Megafine
Atenolol	Sigma

3.2. Kullanılan Cihazlar

UV-Vis Spektrofotometresi	Shimadzu 160 A
Deiyonize Su Cihazı	Millipore
Ultrasonik Banyo Cihazı	Selecta
Hassas Terazı	Shimadzu
Mikropipet	Socorex
pH Metre	Mettler Toledo
Vakum Filtrasyon Sistemi	İldam
Santrifüj Cihazı	Selecta
Tüp Karıştırıcı	Fırlabo
Manyetik Karıştırıcı	Wisd
İnkübatör (Etüv) Cihazı	Nüve

Naylon Membran	Alltech
Katı Faz Ekstraksiyon Kartuşu	Alltech
Katı Faz Ekstraksiyon Manifoldu	Alltech

3.3. Çözücülerin ve Çözeltilerin Hazırlanması

Çözeltiler, çeşitli çözücüler ve iletkenliği 18 mega ohm/cm olan deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.3.1. Stok rivastigmin çözeltisinin hazırlanması

10,0 mg RİV hassas olarak tartılmıştır. 10,0 mL'lik balon jojeye konularak bir miktar su ile ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır. 10,0 mL'ye su ile tamamlandı. Hazırlanan 1,0 mg/mL'lik RİV çözeltisi kullanıma kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.3.2. Tampon çözeltilerin hazırlanışı

pH 3,0 sitrat tamponu

93,0 ml 0.1000 M sitrik asit çözeltisi ile 7,0 ml 0.1000 M sodyum sitrat çözeltisi karıştırılmış ve. pH 3,0'e ayarlanmıştır.

pH 5,0 asetat tamponu

14,8 ml 0.2000 M asetik asit çözeltisi ile 35,2 ml 0.2000 M sodyum asetat çözeltisi karıştırılmıştır. Karışım üzerine 50,0 ml su eklenmiştir.

pH 7,0 fosfat tamponu

1,36 g monobazik potasyum fosfat ve 1,74 g dipotasyum hidrojen fosfat tartılarak 100,0 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hacmine su ile tamamlanmıştır.

pH 8,0 fosfat tamponu

1,36 g monobazik potasyum fosfat ve 1,74 g dipotasyum hidrojen fosfat tartılarak 100,0 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hacmine su ile tamamlanmıştır. Karışımın pH'ı 8,0'e 0.1000 M NaOH ile ayarlanmıştır.

3.3.2. Kalibrasyon için standartların hazırlanması

1,0 mg/mL RİV stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp her biri ACN ile 5,0 mL'ye tamamlanarak 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 40,0; 80,0 ve 100,0 µg/mL derişimlerde standartlar hazırlanmıştır.

1,0 mg/mL RİV stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp her biri MeOH ile 5,0 mL'ye tamamlanarak 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 40,0; 80,0 ve 100,0 µg/mL derişimlerde standartlar hazırlanmıştır.

1,0 mg/mL RİV stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp her biri *dimetilsülfoksit (DMSO)* ile 5,0 mL'ye tamamlanarak 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 40,0; 80,0 ve 100,0 µg/mL derişimlerde standartlar hazırlanmıştır.

1,0 mg/mL RİV stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp her biri *su:asetik asit (su:AA) (6:4)* ile 5,0 ml'ye tamamlanarak 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 40,0; 80,0 ve 100,0 µg/mL derişimlerde standartlar hazırlanmıştır.

1,0 mg/mL RİV stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp her biri *su:AA (8:2)* ile 5,0 ml'ye tamamlanarak 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 40,0; 80,0 ve 100,0 µg/mL derişimlerde standartlar hazırlanmıştır.

1,0 mg/ml RİV stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp her biri *pH 3,0 sitrat tamponu, pH 5,0 sitrat tamponu, pH 7,0 fosfat tamponu ve pH 8,0 fosfat tamponu* ile 5,0 mL'ye tamamlanarak 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 40,0; 80,0 ve 100,0 µg/mL derişimlerde standartlar hazırlanmıştır.

3.3.3. Ekstraksiyon çözücüsünün hazırlanması

Kalıp molekül olarak kullanılan RİV'in kartuştan uzaklaştırılması amacı ile ekstraksiyon çözücüsü olarak su:AA (8:2, v/v) kullanılmıştır. 80,0 mL su ve 20,0 mL AA çözeltisi 100,0 mL'lik balon jodede karıştırıldıktan sonra kullanıma kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.3.4. Yükleme çözeltilerinin hazırlanması

RİV stok çözeltisinden 1,125 mL alınıp 10,0 mL'ye pH 8,0 tampon çözeltisi ile tamamlanmıştır.

RİV stok çözeltisinden 1,125 mL alınıp 10,0 mL'ye ACN ile tamamlanmıştır.

RİV stok çözeltisinden 1,125 mL alınıp 10,0 mL'ye DMSO ile tamamlanmıştır.

RİV stok çözeltisinden 1,125 mL alınıp 10,0 mL'ye MeOH ile tamamlanmıştır.

3.3.5. Yıkama çözeltisinin hazırlanması

Yıkama çözeltisi olarak asetonitril kullanılmıştır.

3.3.6. Elüsyon çözeltisinin hazırlanması

60,0 mL su ve 40,0 mL asetik asit karıştırılarak elüsyon çözücüsü olarak kullanılmıştır.

3.4. RİV Baskılanmış Polimer Sentezi

Çizelge 3.1'de detaylı bir şekilde verilen sentez bileşimi kullanılarak polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 34,0 µL metakrilik asit (Şekil 3.2) ve 25,0 mg baskı molekülü (Şekil 3.1) 1,0 ml DMSO (Şekil 3.4) bulunan cam tüp içerisine eklenmiştir. Tüp içerisindeki karışım çözüldükten sonra 15 dakika beklenmiştir. Ön polimerizasyondan sonra 185,0 µL EGDMA (Şekil 3.3) eklenip 5 dakika beklenmiştir. 10,0 mg AIBN (Şekil 3.5) eklenerek 65°C'ye ayarlanmış inkübatör içerisinde 5 saat bekletilmiştir. Baskılanmamış moleküller ise (NIP) RİV eklenmeden aynı şartlar altında sentezlenmiştir. Oluşan polimerler çekiçle kırma

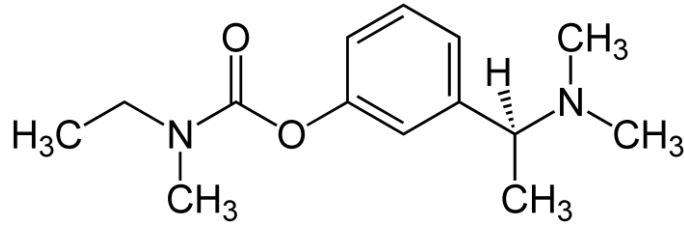
yöntemi ile cam tüp içerisinde çıkarılmıştır. Polimerler havanda toz haline gelene kadar ezilmiş ve partikül boyutu 40-140 µm aralığında olacak şekilde eleklerden geçirilmiştir.

RİV baskılanmış polimerden kalıp molekülün uzaklaştırılması için ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi, su:AA (8:2, v/v) çözücüsünün 15,0 ml'si kullanılarak tamamlanmıştır. 20 saat ekstraksiyon sonunda baskı molekülünün polimerden uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir. Ekstraksiyon 350 rpm'de manyetik karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon süresi sonunda mikrotüpler kullanılarak 15000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında üstte kalan berrak sıvıdan 3,0 ml küvete alınmış ve spektrofotometrede 265 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. Aynı işlemler NIP için de uygulanmıştır.

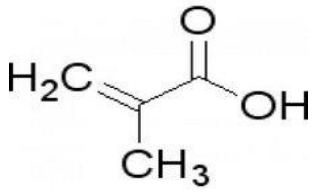
Ekstraksiyon işleminin tamamlanmasının ardından partiküller 65°C'de vakum altında 2 saat kurutulmuştur.

Çizelge 3.1. RİV baskılanmış polimer sentez bileşenleri ve miktarları

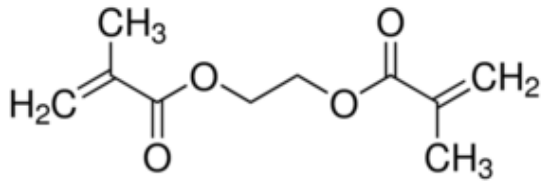
Kalıp Molekülü	Fonksiyonel Monomer	Çapraz Bağlayıcı	Başlatıcı	Porojen
Rivastigmin (RİV)	Metakrilik Asit (MAA)	Etilenglikol dimetakrilat (EGDMA)	Azobizobütiro nitril (AIBN)	Dimetilsülfoksit (DMSO)
0,10 mmol	0,40 mmol	0,980 mmol	10,0 mg	1,0 ml



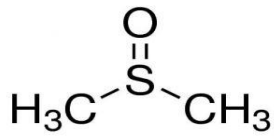
Şekil 3.1. RİV'in (Analit) kimyasal yapısı



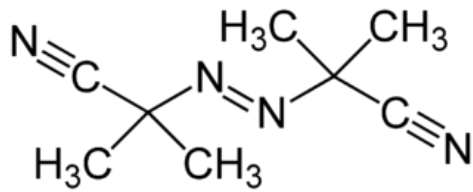
Şekil 3.2. MAA (Monomer) kimyasal yapısı



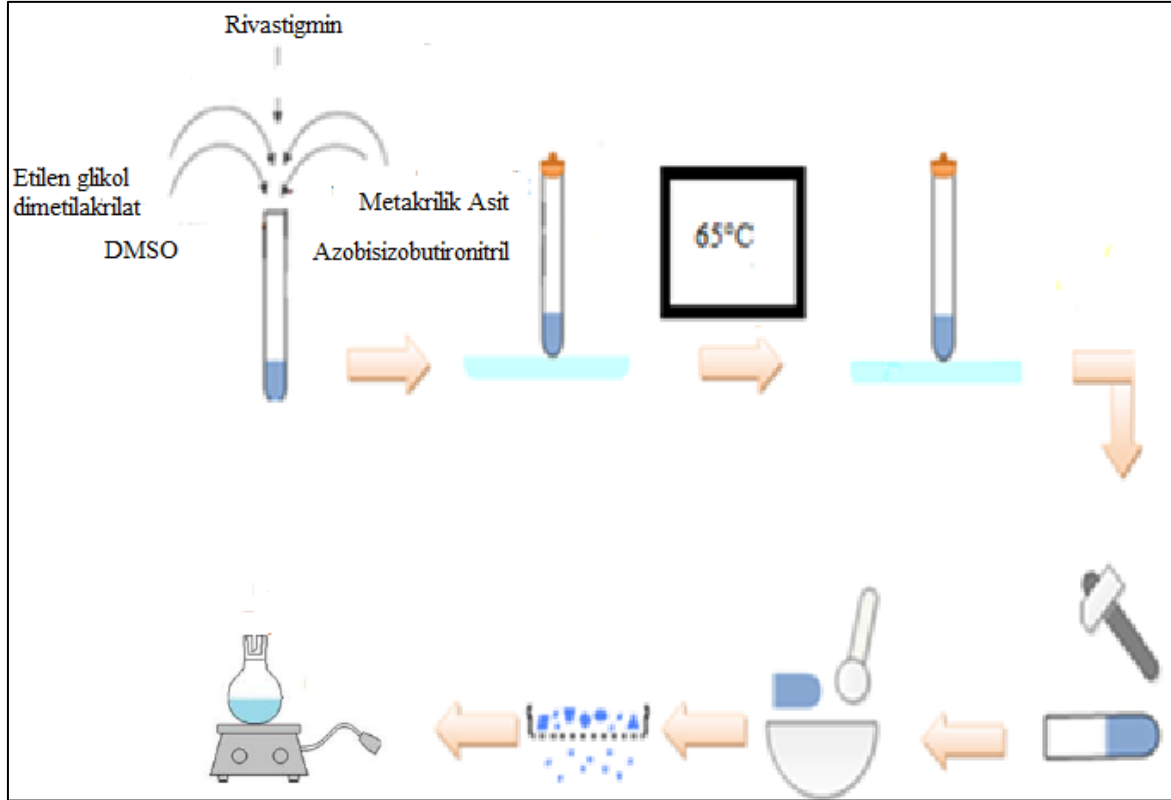
Şekil 3.3. EGDMA (çapraz bağlayıcı) kimyasal yapısı



Şekil 3.4. DMSO (porojen) kimyasal yapısı



Şekil 3.5. AIBN (başlatıcı) kimyasal yapısı



Şekil 3.6. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) sentez aşamaları

3.4.1. RİV baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış polimer (NIP) sentez parametreleri

Monomer miktarının, sorbentin RİV bağlamasına olan etkisi incelenmiştir. Monomer miktarı sırasıyla 0,19; 0,25; 0,31 ve 0,40 mmol kullanılarak hazırlanan sorbentler incelenmiştir. Sentez sırasında 0,980 mmol çapraz bağlayıcı, 0,061 mmol başlatıcı, 0,08 mmol baskı molekülü ve 1,0 ml porojen kullanılmıştır.

Kalıp molekül olarak kullanılan RİV miktarının sorbentin bağlama kapasitesine olan etkisi 0,06; 0,08; 0,10 ve 0,12 mmol RİV kullanılarak incelenmiştir. Sentez sırasında 0,980 mmol çapraz bağlayıcı, 0,061 mmol başlatıcı, 0,40 mmol fonksiyonel monomer ve 1,0 ml porojen kullanılmıştır.

Çapraz bağlayıcı miktarının, sorbentin RİV bağlamasına olan etkisi incelenmiştir. Çapraz bağlayıcı miktarı sırasıyla 0,74; 0,98; 1,23 ve 1,47 mmol kullanılarak hazırlanan sorbentler incelenmiştir. Sentez sırasında 0,40 mmol monomer, 0,061 mmol başlatıcı, 0,10 mmol baskı molekülü ve 1,0 ml porojen kullanılmıştır.

3.5. Karakterizasyon Çalışması

Hazırlanan sorbentin çeşitli ortamlardaki şişme davranışını incelemek amacıyla şişme deneyleri yapılmıştır. Sentezlenen MIP/NIP sorbentlerinin şişme davranışı karakterizasyon çalışmaları, çeşitli organik çözücüler kullanılarak incelenmiştir. Şişme davranışlarını incelemek amacıyla kartuş içerisine 75,0 mg sorbent eklenmiştir. Yükleme basamağında organik ortam için 2,0 ml DMSO ve sulu ortam için 2,0 ml pH 8 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Yükleme basamağı sonunda kartuştaki sorbent tartılarak, sorbentin yükleme basamağı sonunda şişme miktarı incelenmiştir. Yıkama basamağında 3,0 ml ACN kullanılmıştır. Yıkama basamağı sonunda sorbentin şişme miktarı incelenmiştir. Son olarak elüsyon basamağında 3,0 ml su:AA (6:4, h/h) karışımı kullanılmış ve elüsyon basamağı sonunda sorbentin şişme miktarı incelenmiştir. Ortamlardaki şişme yüzdesi aşağıdaki Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Yüzdesi (\%)} = [(H_{\text{şişmiş}} - H_{\text{kuru}}) / H_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (3.1)$$

$H_{\text{şişmiş}}$: Şişmiş polimerin ağırlığı.

H_{kuru} : Kuru polimerin ağırlığı.

3.6. RİV Yeniden Bağlanma (Beç) Çalışmaları

Beç çalışmalarında MIP ve NIP'in RİV bağlama yüzdelерinin bulunmasında, bağlanma öncesi ve bağlanma sonrasında ortamdaki RİV derişimleri spektrofotometre ile 265 nm'de ölçümler yapılarak belirlenmiş, Eşitlik 3.2 aracılığıyla da % bağlanma değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Bağlanma} = \frac{(C_o - C_e) \times (V)}{C_o \times V} \times 100 \quad (3.2)$$

C_o : Analitin başlangıç derişimi, $\mu\text{g/mL}$

C_e : Analitin bağlanma sonrası derişimi, $\mu\text{g/mL}$

V : Analit çözeltisinin hacmi, mL

Benzer bir yaklaşımla, sorbente ait baskılama faktörü (BF) bulunmuştur. BF, MIP'e bağlanan RİV miktarının, NIP'e bağlanan RİV miktarına oranı olarak Eşitlik 3.3'te gösterilen formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$BF = \frac{W_{MIP}}{W_{NIP}} \times 100 \quad (3.3)$$

W_{MIP} : MIP'e bağlanan RİV miktarı, μg

W_{NIP} : NIP'e bağlanan RİV miktarı, μg

20 mg sorbent üzerine saf su içerisinde hazırlanmış 2.5 mL 50 $\mu g/ml$ RİV stok çözeltisi ve 2,5 mL bağlanma ortamı eklenmiştir. Deney, vezin kabında 350 rpm karıştırma hızında yapılmıştır. Süre sonunda, mikrotüpler içerisinde 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan şeffaf kısımdan 3 ml alınarak spektrometrede 265 nm absorbans ölçülmüştür. MIP ve NIP için içerisinde RİV bulunmayan vezin kabı paralel olarak çalışılmıştır. MIP için RİV içermeyen vezin kabından elde edilen supernatant absorbansı, RİV içeren vezin kabından elde edilen supernatant absorbansından çıkarılarak hesaplama yapılmıştır.

MIP ve NIP'e RİV bağlanmasına, bağlanma ortamının etkisini incelemek için çalışmalar pH 3,0 sitrat tamponu, pH 5,0 asetat tamponu, pH 7,0 fosfat tamponu, pH 8,0 fosfat tamponu, ACN ve DMSO ortamlarında yapılmıştır. Bağlanma çalışmaları 60 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir.

MIP ve NIP'e RİV bağlanmasına sürenin etkisini incelemek amacıyla 20,0 mg sorbent üzerine (MIP ve NIP) 50,0 $\mu g/mL$ derişimindeki 2,5 mL RİV çözeltisi ve 2,5 mL bağlanma ortamı eklenmiştir. Çalışmalar pH 8,0 tampon ortamı ve DMSO ortamlarında yürütülmüştür. İnkübasyon çalışmaları, sırasıyla 20, 30, 45, 60, 75 ve 95 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırılarak gerçekleştirilmiştir.

Sorbent miktarının RİV bağlama yüzdesine olan etkisini incelemek için farklı miktarlarda sorbent kullanılmıştır. Her bir çalışmada, farklı kaplarda 10, 20, 30, 40 ve 50 mg MIP ve NIP üzerine 50,0 $\mu g/mL$ derişimindeki 2,5 mL RİV ve 2,5 mL bağlanma ortamı eklenerek tamamlanmıştır. Çalışmalar pH 8,0 tampon ortamı, pH 7,0 tampon ortamı, ACN ve DMSO ortamlarında yürütülmüştür. 60 dakikanın sonunda MIP ve NIP'in bağladığı RİV miktarı belirlenmiştir.

Derişimin, sorbentin RİV bağlama davranışına olan etkisini incelemek amacıyla 20,0 mg sorbent 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml, 140 µg/ml, 160 µg/ml, 175 µg/ml, 200 µg/ml ve 250 µg/ml derişimlerindeki RİV çözeltilerine eklenmiştir. İnkübasyon çalışmaları manyetik karıştırıcıda gerçekleştirilmiş ve 60 dakika boyunca devam ettirilmiştir.

3.7. MISPE Koşullarının Optimizasyonu ve Seçicilik

MISPE çalışmalarında, koşulların optimize edilmesi amacıyla yapılan çeşitli çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Yükleme çözücüsünün RİV geri kazanımına etkisi, yükleme çözücüleri olarak pH 8,0 tampon çözeltisi, ACN, DMSO ve metanol kullanılarak incelenmiştir. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent doldurulmuştur. Yükleme çözeltisinin çözücüsü şartlandırma çözücüsü olarak kullanılmıştır (3 x 0,5 mL). Yükleme basamağında, yükleme çözücüsü içinde hazırlanan 75 µg/mL derişimdeki RİV çözeltisinden 3,0 mL (6 x 0,5 mL), yıkama basamağında 3,0 mL ACN (6 x 0,5 mL) ve elüsyon basamağında 4,0 mL su:AA (8:2) (8 x 0.5 mL) kullanılmıştır.

Yükleme çözücüsünün hacminin sorbentin geri kazanımına olan etkisi 1,0, 2,0, 3,0 ve 4,0 mL pH 8,0 tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan RİV çözeltisi kullanılarak incelenmiştir. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent doldurulmuştur. Şartlandırma basamağında pH 8,0 tampon çözelti (3 x 0,5 mL), yıkama basamağında sırasıyla ACN (6 x 0,5 mL) ve elüsyon basamağında su:AA (6:4) (8 x 0,5 mL) kullanılmıştır.

Yıkama çözücüsünün türünün sorbentin geri kazanımına olan etkisi yıkama çözücüsü olarak ACN ve Metanol kullanılarak incelenmiştir. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent doldurulmuştur. pH 8,0 tampon çözeltisi şartlandırma çözücüsü olarak kullanılmıştır (3 x 0,5 mL). Yükleme basamağında, pH 8,0 tampon çözeltisi içinde hazırlanan 75 µg/mL derişimdeki RİV çözeltisinden 3,0 mL (6,0 x 0,5 mL), yıkama basamağında 3,0 mL ACN/Metanol (6 x 0,5 mL) ve elüsyon basamağında 4,0 mL su:AA (8:2) (8 x 0.5 mL) kullanılmıştır.

Yıkama çözücüsünün hacminin sorbentin geri kazanımına olan etkisi 1,0, 2,0, 3,0 ve 4,0 mL ACN kullanılarak incelenmiştir. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent doldurulmuştur. Şartlandırma basamağında pH 8,0 tampon çözelti (3 x 0,5 mL), yükleme basamağında 2,0 ml 112,5 µg/mL RİV çözeltisi (pH 8,0 tampon çözeltisi içinde; 4 x 0,5 mL), yıkama basamağında sırasıyla ACN (2 x 0,5 mL; 4 x 0,5 mL; 6 x 0,5 mL; 8 x 0,5 mL) ve elüsyon basamağında su:AA (6:4) (8 x 0,5 mL) kullanılmıştır.

Elüsyon çözücüsü olarak kullanılan su:AA bileşiminin sorbentin geri kazanımına olan etkisini incelemek amacıyla 6:4, 7:3 ve 8:2 h/h oranlarında, elüsyon çözücü karışımları kullanılmıştır. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent doldurulmuştur. pH 8,0 tampon çözeltisi şartlandırma çözücüsü olarak kullanılmıştır (3 x 0,5 mL). Yükleme basamağında, pH 8,0 tampon çözeltisi içinde hazırlanan 75 µg/mL derişimdeki RİV çözeltisinden 3,0 mL (6,0 x 0,5 mL), yıkama basamağında 3,0 mL ACN (6 x 0,5 mL) ve elüsyon basamağında 4,0 mL su:AA (6:4; 7:3; 8:2) (8 x 0.5 mL) kullanılmıştır.

Elüsyon çözücüsünün hacminin sorbentin geri kazanımına olan etkisi sırasıyla 3,0, 4,0, 5,0 ve 6,0 mL su:AA (6:4, h/h) kullanılarak incelenmiştir. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent doldurulmuştur. Şartlandırma basamağında pH 8,0 tampon çözelti (3 x 0,5 mL), yükleme basamağında 112,5 µg/mL RİV çözeltisi (pH 8,0 tampon çözeltisi içinde; 4 x 0,5 mL), yıkama basamağında ACN (6 x 0,5 mL) ve elüsyon basamağında su:AA (6:4) (6 x 0,5 mL; 8 x 0,5 mL; 10 x 0,5 mL; 12 x 0,5 mL) kullanılmıştır.

Sentezlenen RİV baskılanmış sorbentin seçiciliğinin incelenmesi amacıyla, RİV ile benzer terapötik etkiye sahip Donepezil HCl ve RİV molekül yapısına benzer yapıda olan Atenolol ile MISPE çalışmaları yapılmıştır. SPE kartuşlarına 75 mg kuru sorbent (MIP veya NIP) doldurulmuştur. Sorbentin altına ve üst kısmına cam pamuk yerleştirilerek sorbent sabitlenmiştir. Yükleme çözeltisinin çözücüsü şartlandırma çözücüsü olarak kullanılmıştır (3 x 0,5 mL). Yükleme basamağında, pH 8,0 tampon ortamı içinde hazırlanan 225 µg derişimdeki Donepezil HCl ve Atenolol çözeltisinden 2,0 mL (4 x 0,5 mL), yıkama basamağında 3,0 mL ACN (6x0,5 mL) ve elüsyon basamağında 5,0 mL su:AA (6:4) (10 x 0.5 mL) kullanılmıştır.

Sorbent miktarının optimize edilmesi amacıyla 3,0 mL'lik SPE kartuşlara sırasıyla 25, 75 ve 100 mg MIP ve NIP doldurulmuş ve ekstraksiyon çalışmasından sonra geri kazanım değerleri tespit edilmiştir.

3.8. Değişik Ortamlardan RİV'in Uzaklaştırılması ve Spektrofotometrik Yöntemle Tayini

Serum numunesinden geri kazanım (doğruluk), gün-içi ve günler-arası kesinlik çalışmalarında ticari serum üzerine belli derişimlerde RİV eklenerek hazırlanan çözeltilerle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda 75,0 mg kuru sorbent kullanılmıştır. Şartlandırma basamağında pH 8,0'e ayarlanmış fosfat tamponu (3 x 0,5 mL), yükleme basamağında ticari serum içerisinde hazırlanan 5,0, 25,0 ve 90,0 µg/mL RİV çözeltisi (pH 8,0'e ayarlanmış fosfat tamponu içinde; 4 x 0,5 mL), yıkama basamağında ACN (6 x 0,5 mL) ve elüsyon basamağında su:AAc (6:4) (10 x 0,5 mL) kullanılmıştır. Çalışmalar MIP ve NIP için üç defa tekrarlanarak yürütülmüştür. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası çalışmalar yapılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla doğrusal çalışma aralığının alt, orta ve üst kısmına karşılık gelecek üç farklı konsantrasyonda (5,0, 25,0 ve 90,0 µg/mL) ticari serum üzerine eklenip hazırlanan RİV çözeltileri, aynı gün içinde üç defa ve üç farklı günde analiz edilmiştir. Her bir deney için, ortalama geri kazanım yüzdesi ve bağıl standart sapma değerleri aşağıda verilen Eşitlik 3.4 ve Eşitlik 3.5 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$X_{ort} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} \quad (3.4)$$

$$\% RSD = \frac{SD}{X_{ort}} \times 100 \quad (3.5)$$

Yukarıdaki formüllerde SD, geri kazanım değerlerinin standart sapmasını; X_{ort} , geri kazanım değerlerinin ortalamasını; $X_1 \dots X_n$ ise geri kazanım değerlerini göstermektedir.

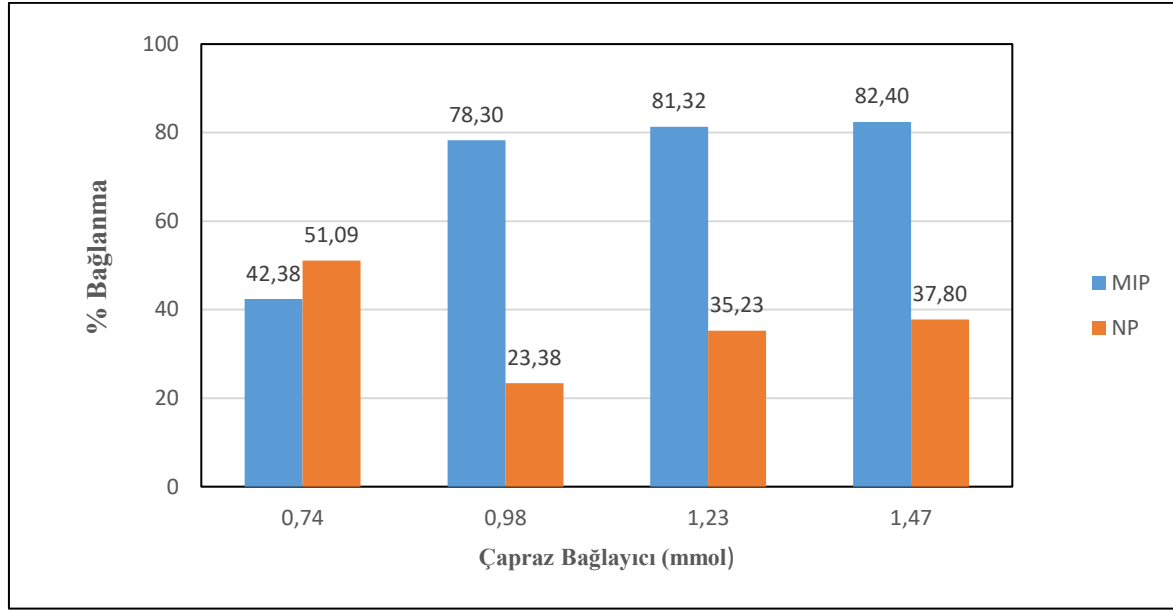
4. BULGULAR

Tez çalışmasında ilk olarak sorbentin sentez bileşenleri olan çapraz bağlayıcı, fonksiyonel monomer ve kalıp molekül miktarları optimize edilmiştir. Sentezlenen MIP/NIP sorbentlerinin RİV bağlama yüzdelерinden hareketle beç türü çalışmalarla optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bağlanma yüzdelерini artırmak amacıyla, çeşitli iyileştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda sırasıyla inkübasyon çözücüsü, bağlanma süresi, inkübasyonda kullanılacak polimer miktarı ve RİV derişimi gibi parametreler test edilmiştir. SPE tekniğı kullanılarak yapılan geri kazanım çalışmalarında ise yükleme çözücüsü türü ve hacmi, yıkama çözücüsü ve hacmi, elüsyon çözücüsü, elüsyon hacmi ve kartuşa doldurulacak sorbent miktarı gibi parametreler de optimize edilmiştir. Son olarak, geliştirilen MISPE-spektrofotometrik metot, ticari serum numunesinden RİV tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

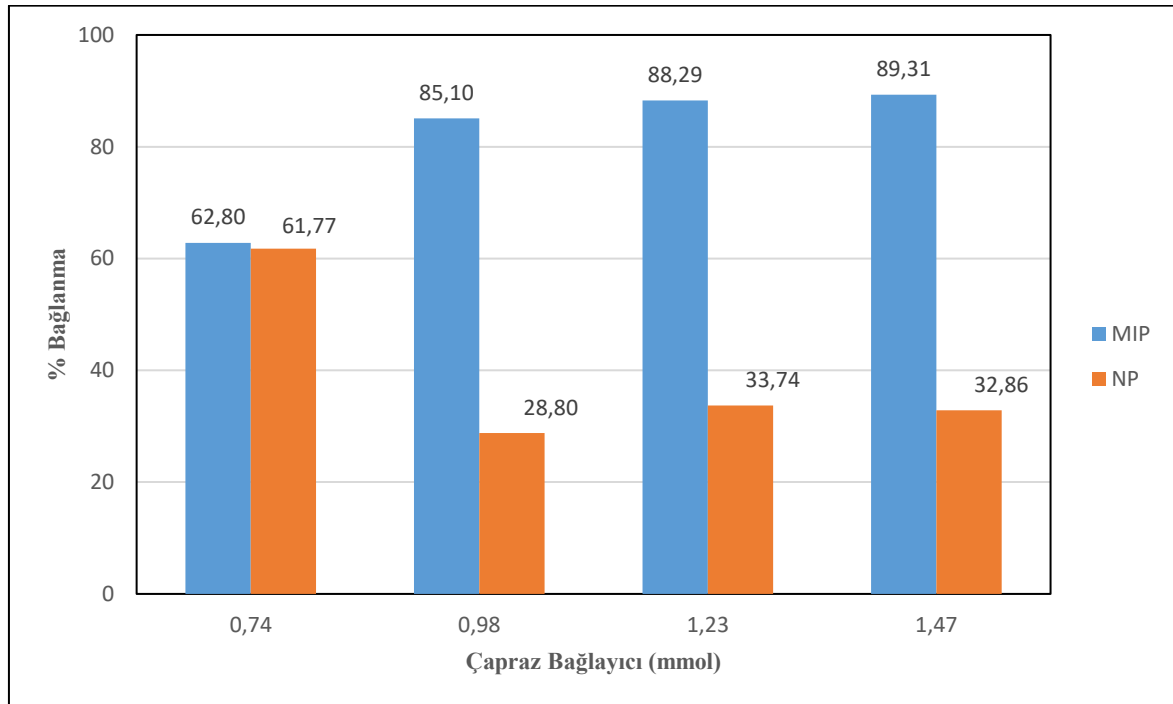
4.1. Sorbentin Sentez Koşullarının Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Bu kısımda, hazırlanan MIP/NIP'in RİV bağlama davranışına; çapraz bağlayıcının, fonksiyonel monomerin ve RİV miktarının etkileri incelenmiştir.

İlk olarak çapraz bağlayıcının (EGDMA), sorbentin RİV bağlamasına olan etkisi araştırılmıştır. Çapraz bağlayıcı miktarı olarak sırasıyla 0,74; 0,98; 1,23 ve 1,47 mmol kullanılarak hazırlanan sorbentler incelenmiş, elde edilen sonuçlar ise Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Çalışma, pH 8,0 tampon ortamı ve DMSO içerisinde gerçekleştirilmiştir.

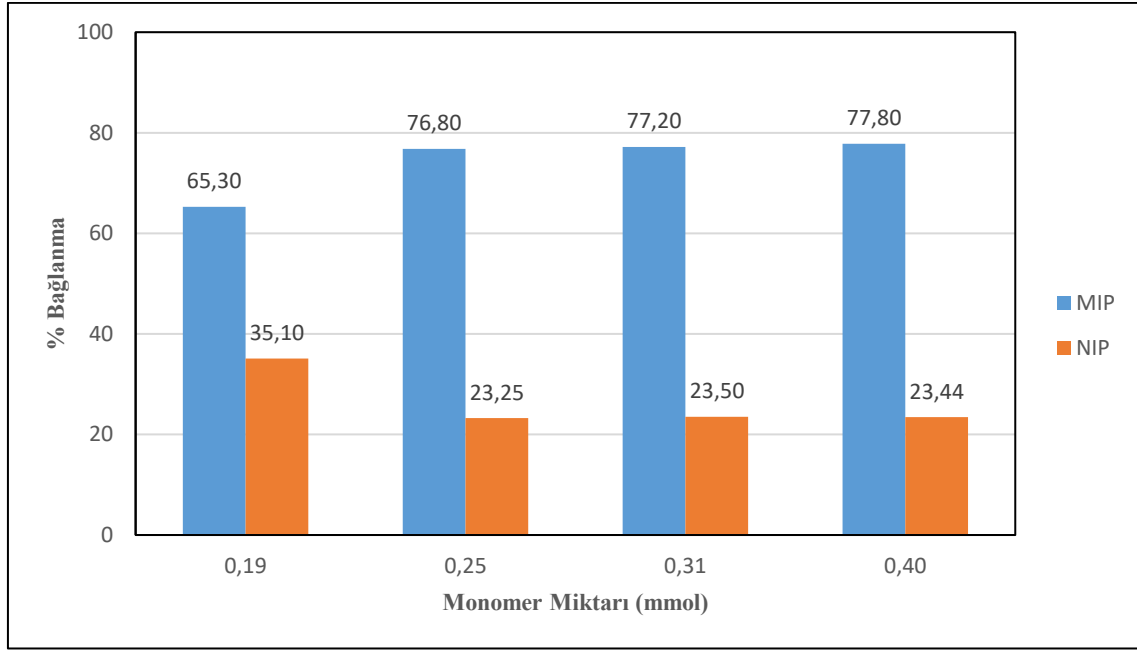


Şekil 4.1. pH 8,0 Tampon ortamında çapraz bağlayıcı miktarının MIP ve NIP'in RİV bağlama yüzdesine etkisi

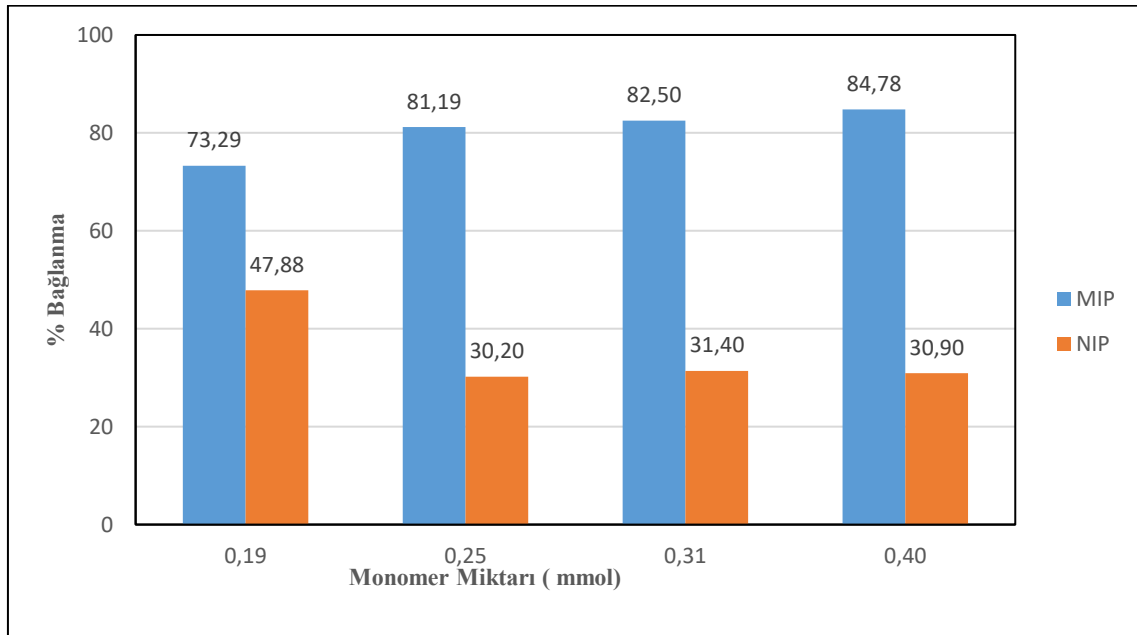


Şekil 4.2. DMSO ortamında çapraz bağlayıcı miktarının MIP ve NIP'in RİV bağlama yüzdesine etkisi

Monomer miktarının, hazırlanan sorbentin RİV bağlamasına olan etkisi 0,19, 0,25, 0,31 ve 0,40 mmol monomer kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen RİV bağlanma sonuçları Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Çalışma, pH 8,0 tampon ortamı ve DMSO içerisinde gerçekleştirilmiştir.

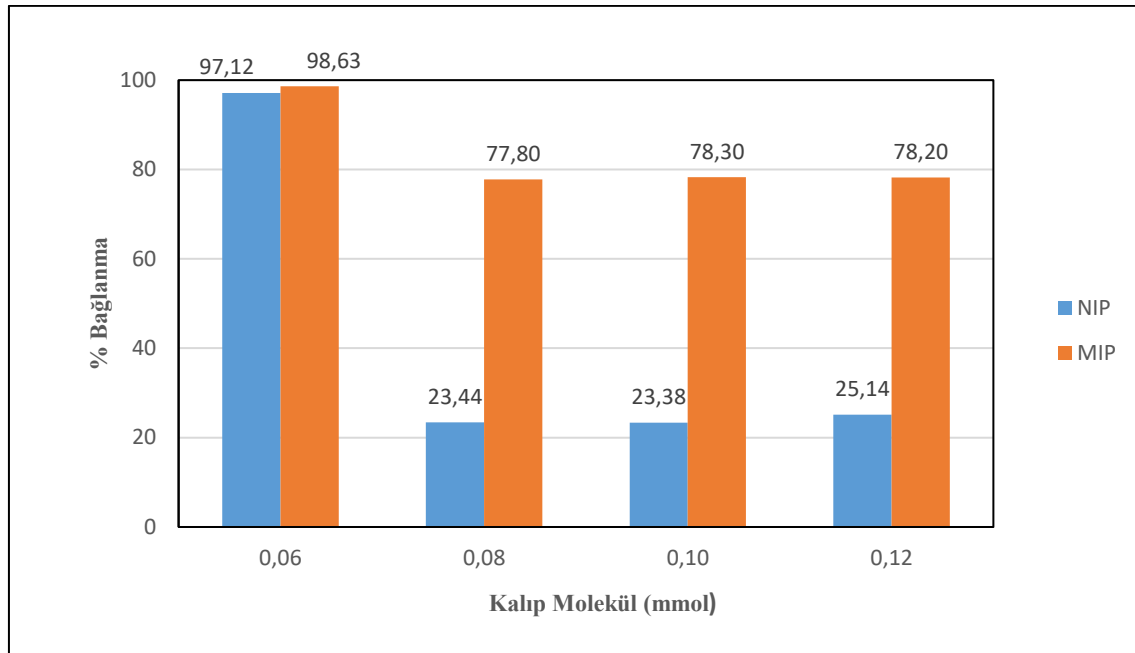


Şekil 4.3. pH 8,0 Tampon ortamında monomer miktarının MIP ve NIP'in RİV geri kazanım yüzdesine etkisi

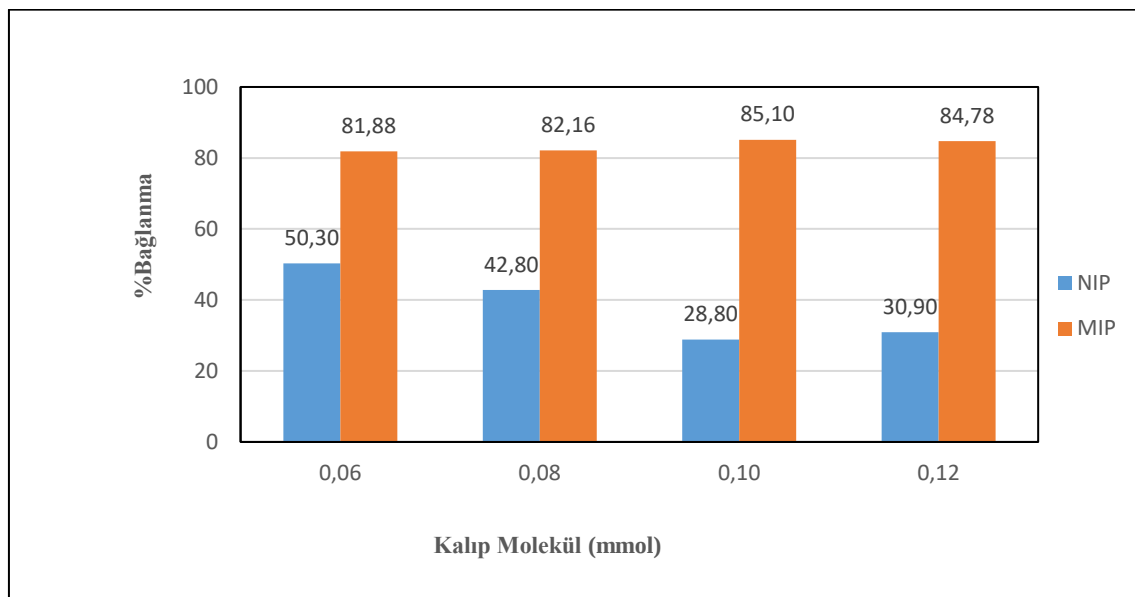


Şekil 4.4. DMSO ortamında monomer miktarının MIP ve NIP'in RİV geri kazanım yüzdesine etkisi

Polimerizasyon sırasında kalıp molekül olarak kullanılan RİV miktarının, sorbentin analiti yeniden bağlama davranışına olan etkisi 0,06; 0,08; 0,10 ve 0,12 mmol RİV kullanılarak kullanılarak incelenmiştir. Çalışma, pH 8,0 tampon ortamı ve DMSO içerisinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel sonuçlar Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da sunulmuştur.

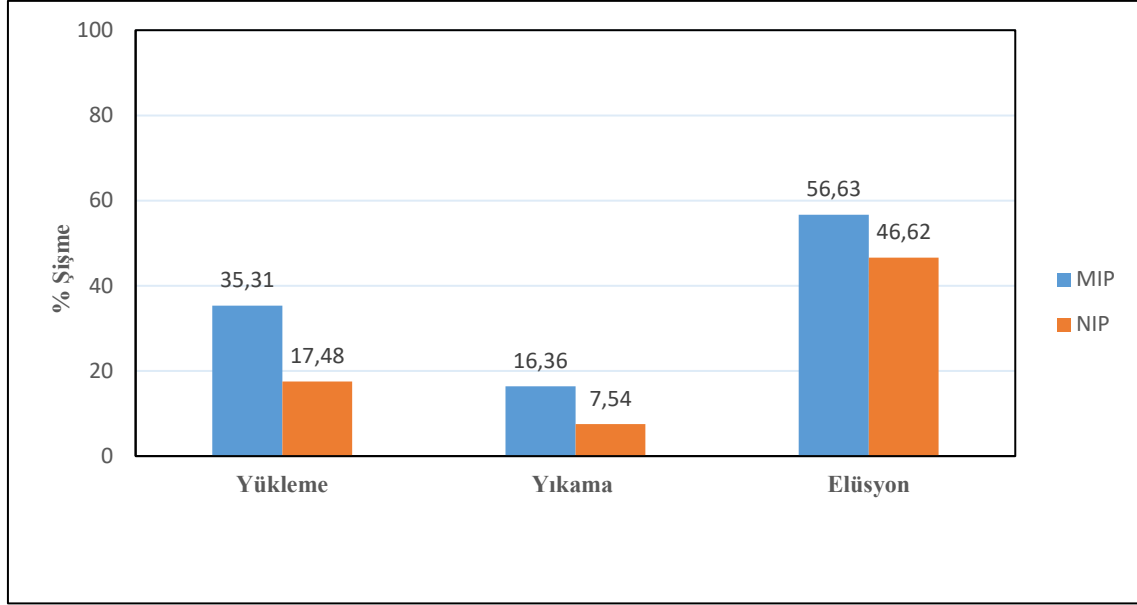


Şekil 4.5. pH 8,0 tampon ortamında RİV miktarının MIP ve NIP'in analiti yeniden bağlama yüzdesine etkisi

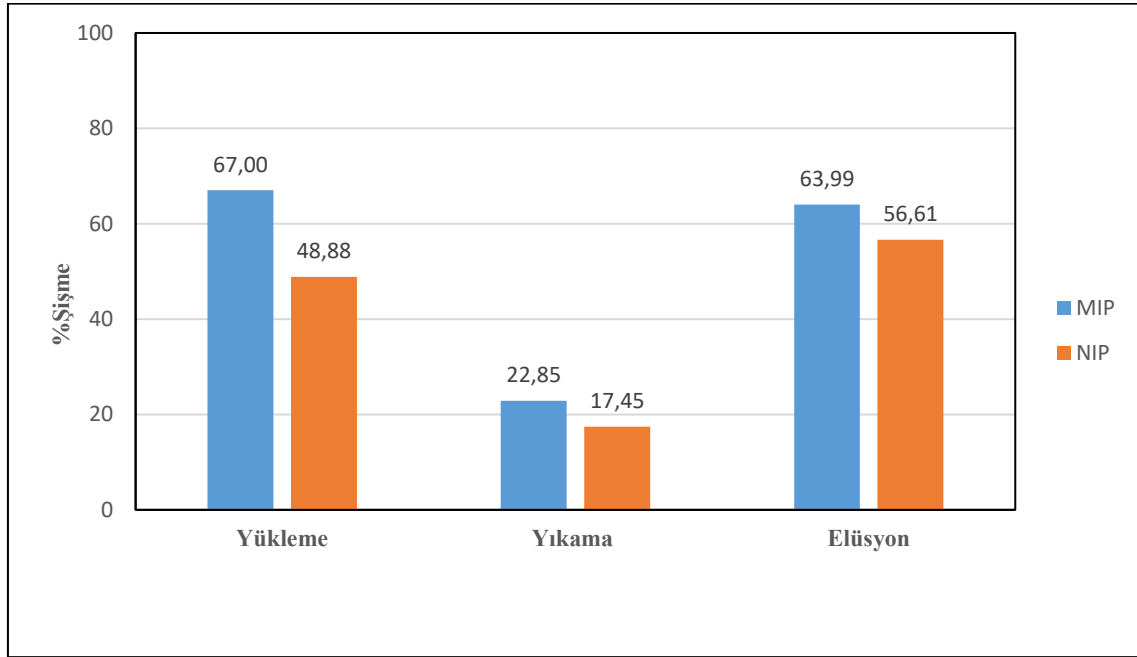


Şekil 4.6. DMSO ortamında RİV miktarının MIP ve NIP'in analiti yeniden bağlama yüzdesine etkisi

Sentezlenen MIP/NIP sorbentlerinin karakterizasyon çalışmaları, şişme davranışlarının incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Şişme davranışları yükleme çözücüsü olarak DMSO ve pH 8,0 tampon çözeltisi kullanılarak yapılmış ve yükleme, yıkama ve elüsyon basamaklarında sorbentin şişme miktarı incelenmiştir. Bu çalışmalara ait deneysel sonuçlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de sunulmuştur. Yıkama basamağında ACN, elüsyon basamağında ise su:AA (8:2) kullanılmıştır.



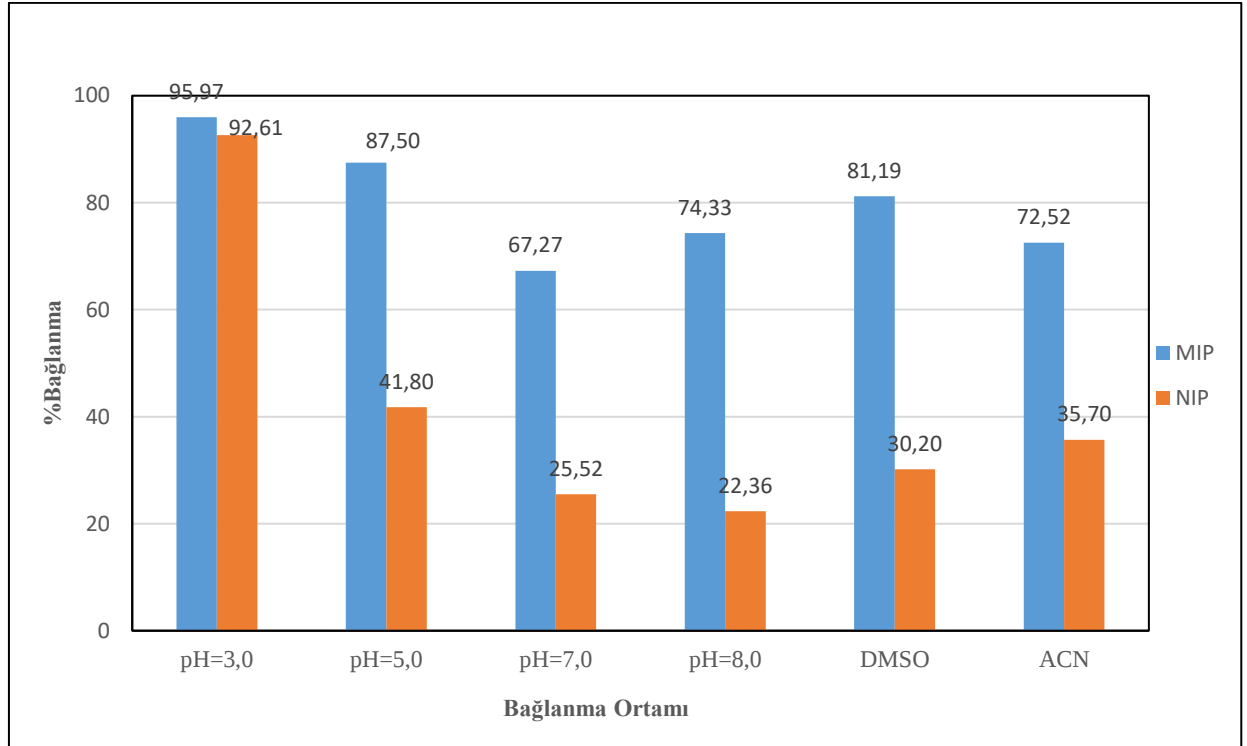
Şekil 4.7. Sorbentin yükleme, yıkama ve elüsyon basamağı şişme davranışı (pH 8,0 tampon ortamı)



Şekil 4.8. Sorbentin yükleme, yıkama ve elüsyon basamağı şişme davranışı (DMSO Ortamı)

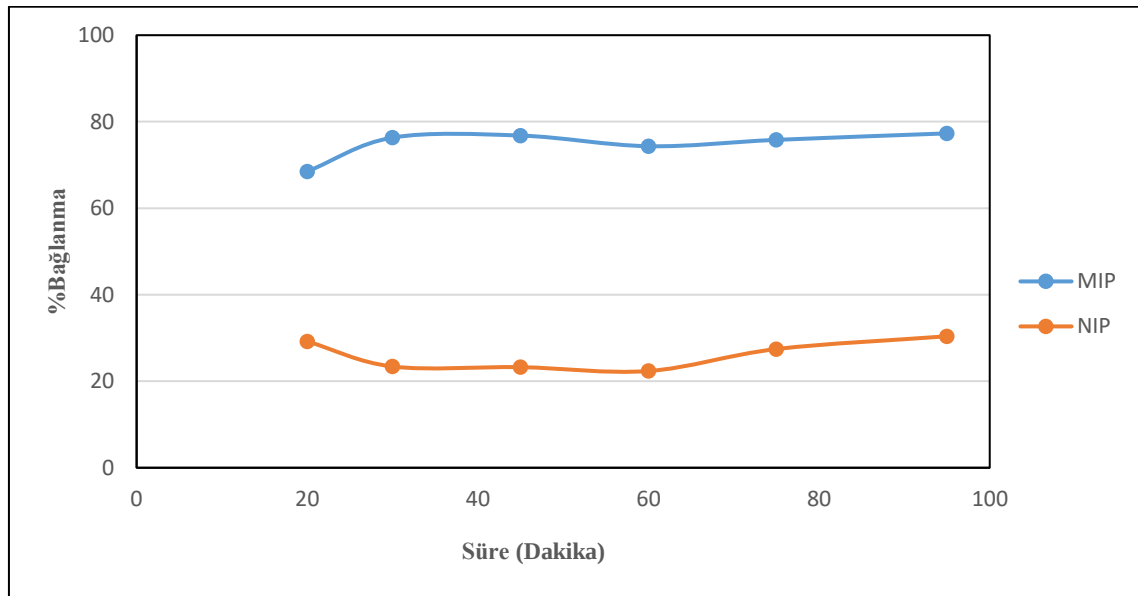
4.2. Beç Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

Beç çalışmalarında, bağlanma ortamında kullanılan çözücü türünün, sorbentin RİV bağlamasına olan etkisi incelenmiştir. Bağlanma çalışmaları pH 3,0 sitrat tamponu, pH 5,0 asetat tamponu, pH 7,0 fosfat tamponu, pH 8,0 fosfat tamponu, ACN ve DMSO ortamları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalara ait deneysel sonuçlar Şekil 4.9’da verilmiştir.

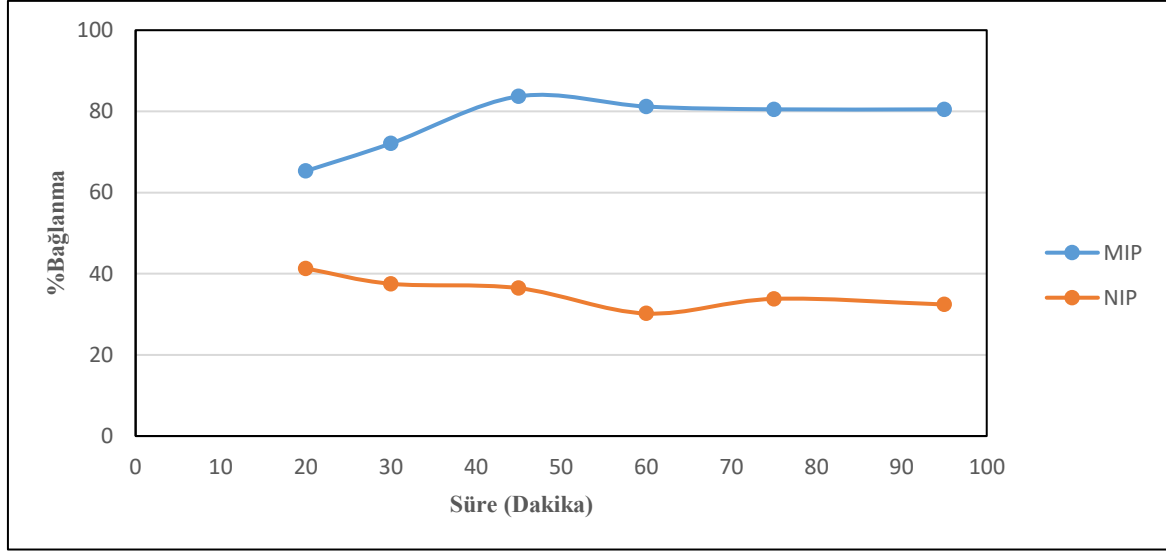


Şekil 4.9. İnkübasyon ortamının MIP ve NIP'nin RİV bağlama üzerindeki etkisi

Bağlanmada dengeye ulaşma süresinin tespiti amacıyla farklı bağlanma süreleri (20, 30, 45, 60, 75 ve 95 dakika) test edilmiş ve yeniden bağlanma yüzdeleri elde edilmiştir. Çalışmalar pH 8,0 tampon ortamı ve DMSO içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu testlere ait sonuçlar Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de sunulmuştur.

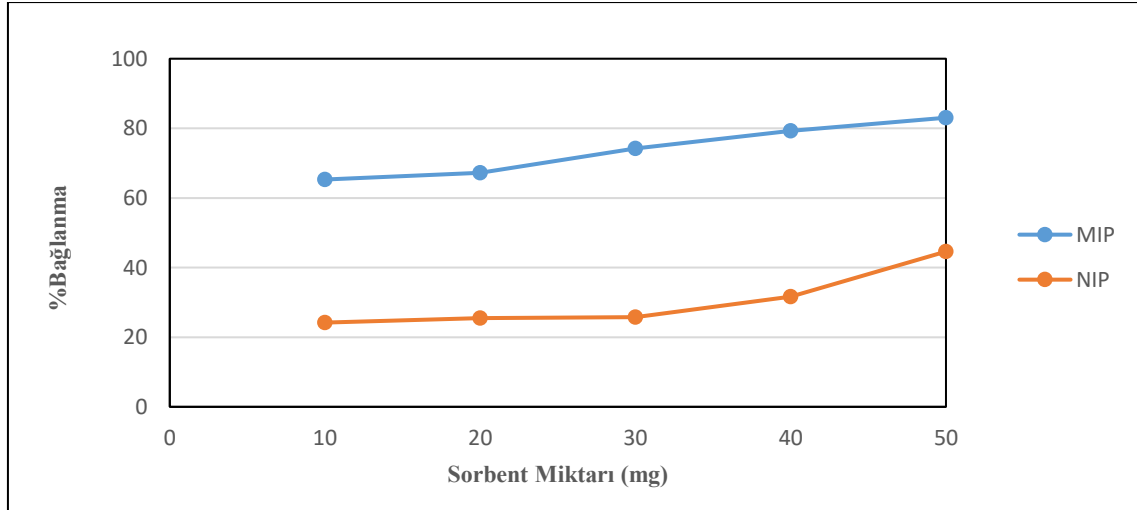


Şekil 4.10. pH 8,0 tampon ortamında inkübasyon süresinin bağlanma yüzdesine etkisi

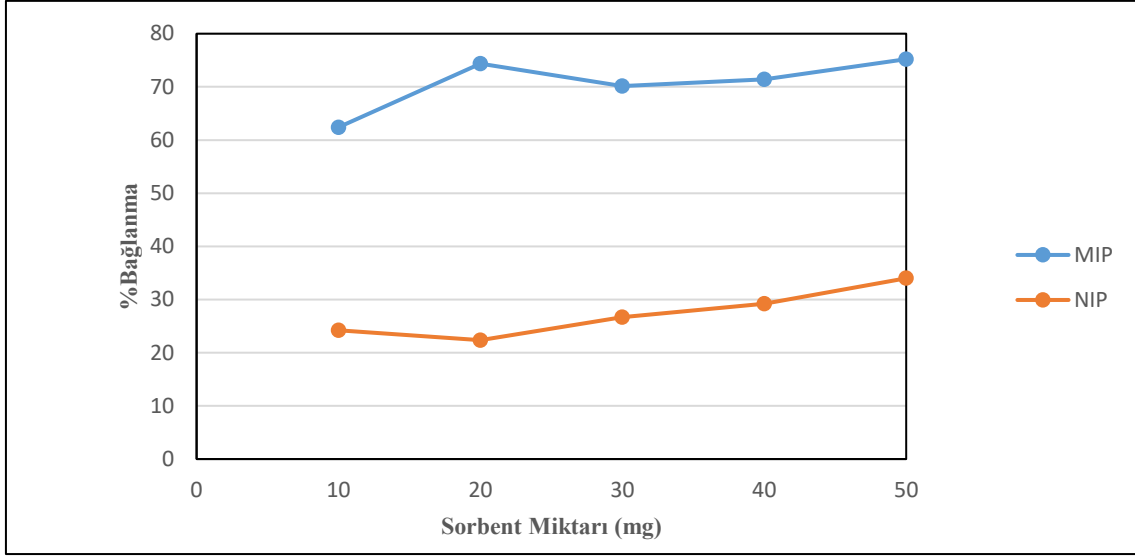


Şekil 4.11. DMSO ortamında inkübasyon süresinin bağlanma yüzdesine etkisi

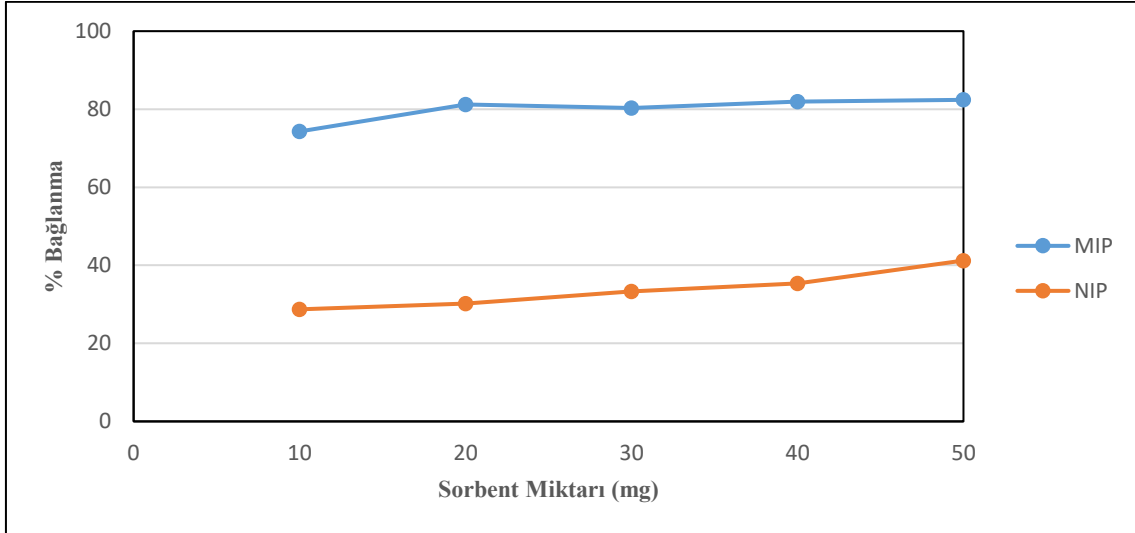
Sorbent miktarının bağlanma yüzdesine olan etkisi farklı miktarlarda sorbent kullanılarak (10,0; 20,0; 30,0; 40,0 ve 50,0 mg) farklı inkübasyon ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar pH 7,0 fosfat tampon ortamı, pH 8,0 fosfat tampon ortamı, DMSO ve ACN ortamlarında yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir (Analit çözelti derişimi 50 µg/mL ve inkübasyon süresi 60 dakika olarak seçilmiştir.)



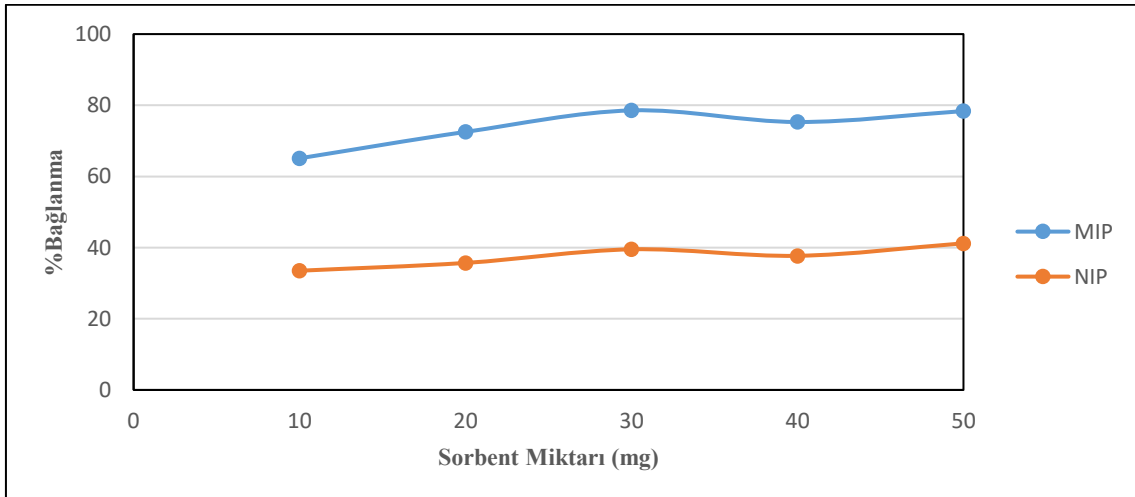
Şekil 4.12. pH 7,0 tampon ortamında sorbent miktarının RİV bağlamaya etkisi



Şekil 4.13. pH 8,0 tampon ortamında sorbent miktarının RİV bağlamaya etkisi

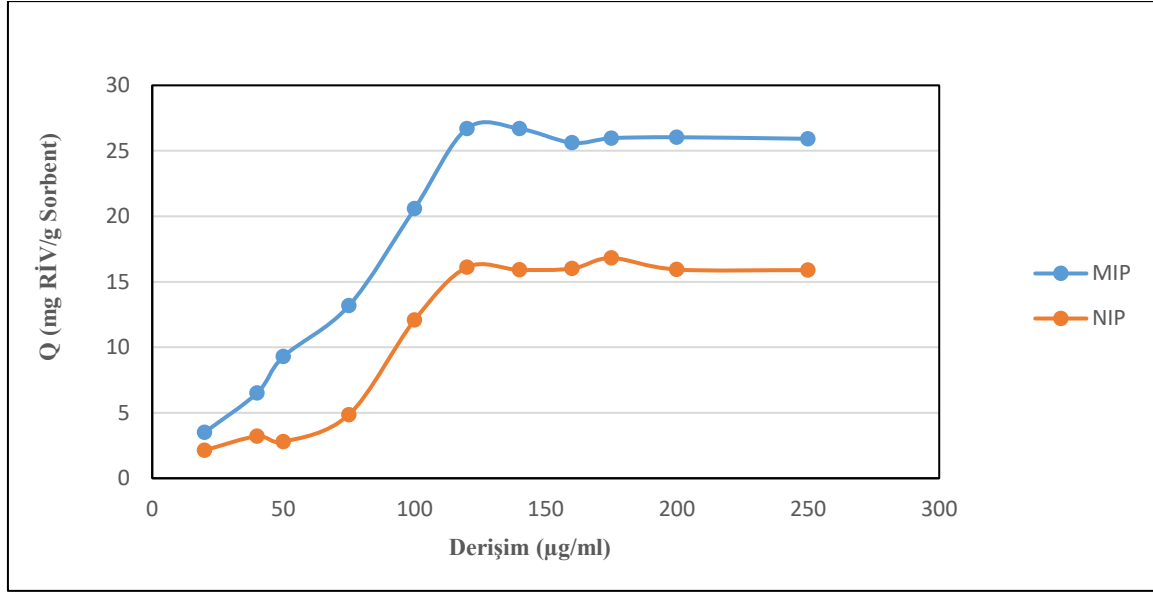


Şekil 4.14. DMSO ortamında sorbent miktarının RİV bağlamaya etkisi

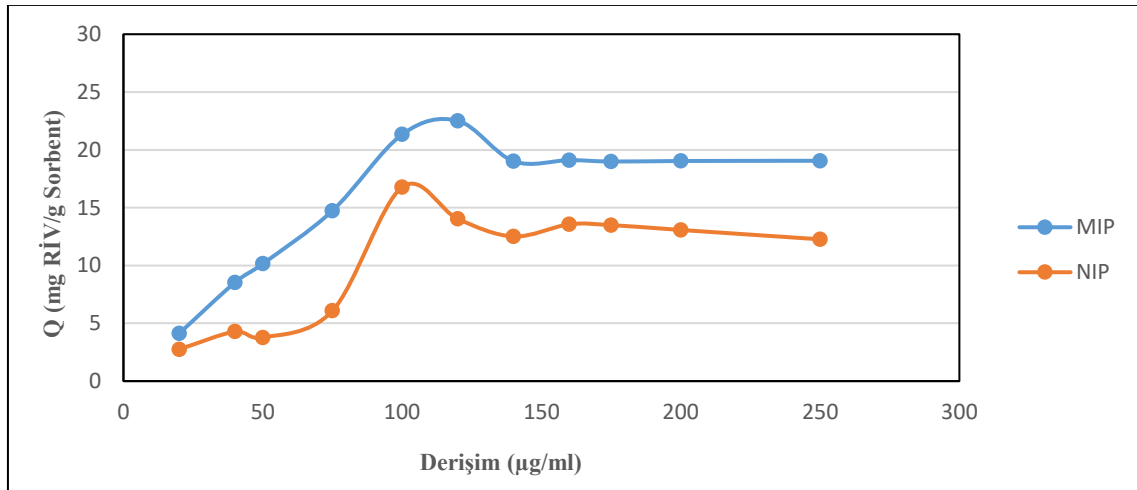


Şekil 4.15. ACN ortamında sorbent miktarının RİV bağlamaya etkisi

İnkübasyon ortamındaki RİV derişiminin, sorbentin bağlama kapasitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml, 140 µg/ml, 160 µg/ml, 175 µg/ml, 200 µg/ml ve 250 µg/ml derişimlerinde RİV çözeltileri kullanılmıştır. Çalışmalar pH 8,0 tampon ortamı ve DMSO ortamında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de gösterilmiştir (Sorbent miktarı 20 mg ve inkübasyon süresi 60 dakika olarak seçilmiştir).



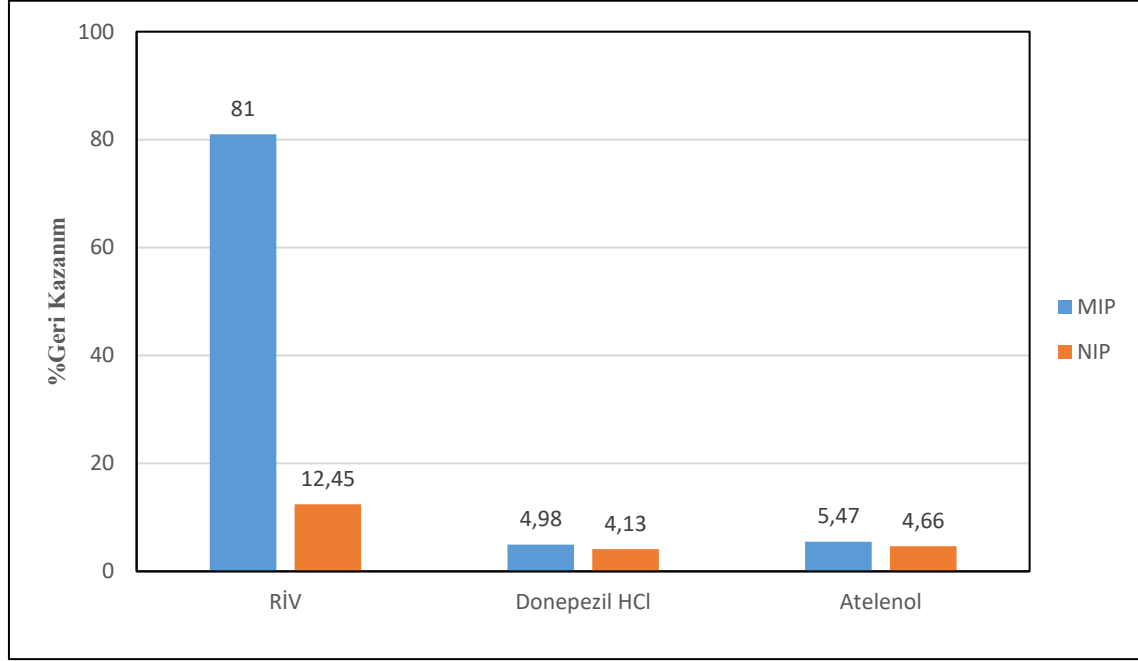
Şekil 4.16. pH 8,0 tampon ortamında RİV derişiminin sorbentin bağlama kapasitesine olan etkisi



Şekil 4.17. DMSO ortamında RİV derişiminin sorbentin bağlama kapasitesine olan etkisi

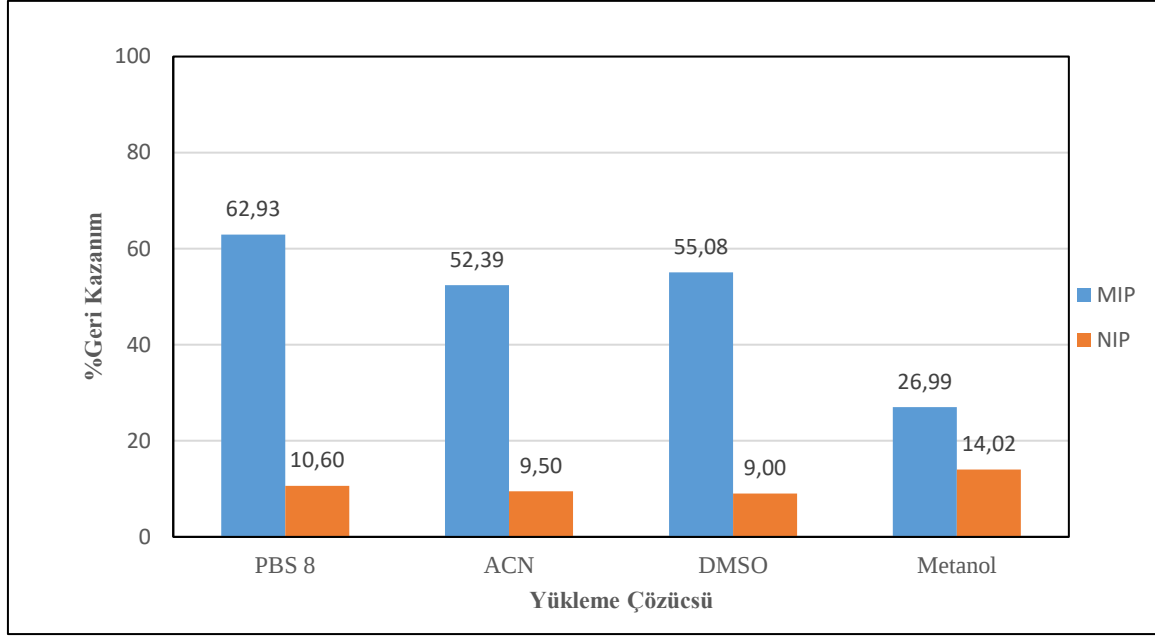
4.2. MISPE Koşullarının Optimizasyonu ve Seçicilik Çalışması

Sentezlenen RİV baskılanmış sorbentin seçiciliğinin incelenmesi amacıyla RİV ile benzer terapötik etkiye sahip Donepezil HCl ve RİV molekül yapısına benzer yapıda olan Atenolol ile MISPE çalışmaları yapılmıştır. Çalışmaların sonuçları Şekil 4.18’de sunulmuştur.



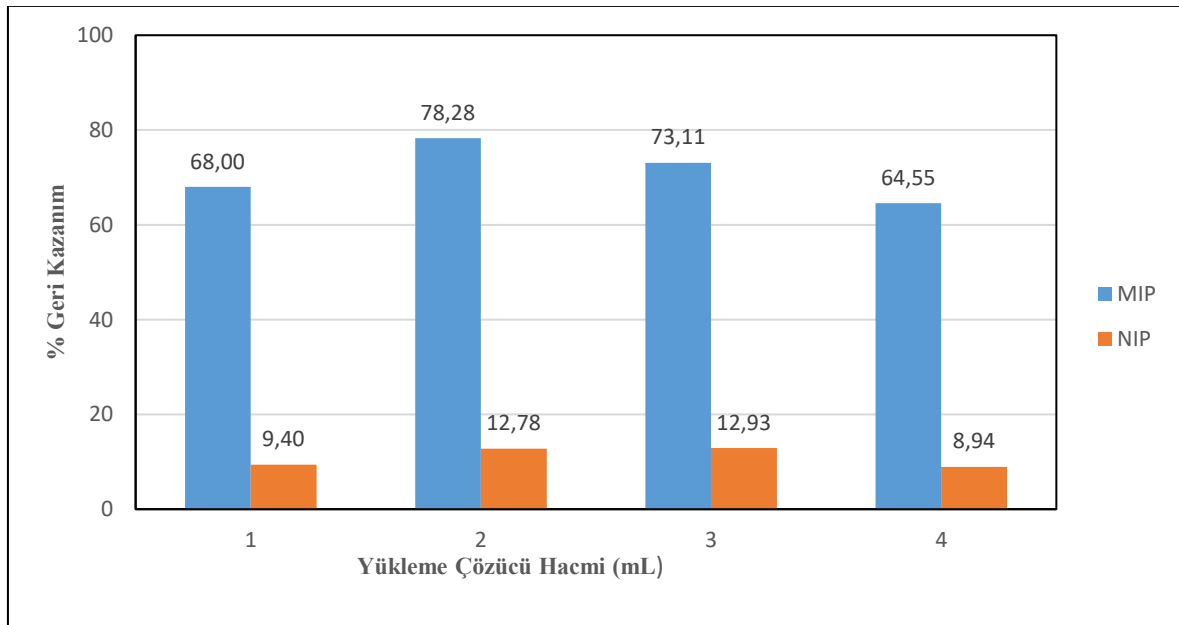
Şekil 4.18. Seçicilik çalışmasında yükleme çözücüsü içinde kullanılan Rivastigmin, Donepezil HCl ve ATOL geri kazanım yüzdeleri

Yükleme çözücüsü türünün sorbentin RİV bağlaması üzerindeki etkisi; pH 8,0 tampon çözeltisi, ACN, DMSO ve MeOH içinde ayrı ayrı hazırlanan 3,0 ml 75 µg/ml RİV içeren çözeltiler kullanılarak araştırılmıştır. 50,0 mg sorbent ile yapılan çalışmalarda yıkama çözücüsü olarak 3,0 ml ACN, elüsyon çözücüsü olarak 4,0 ml su:AA (8:2; v/v) kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.19’da sunulmuştur.



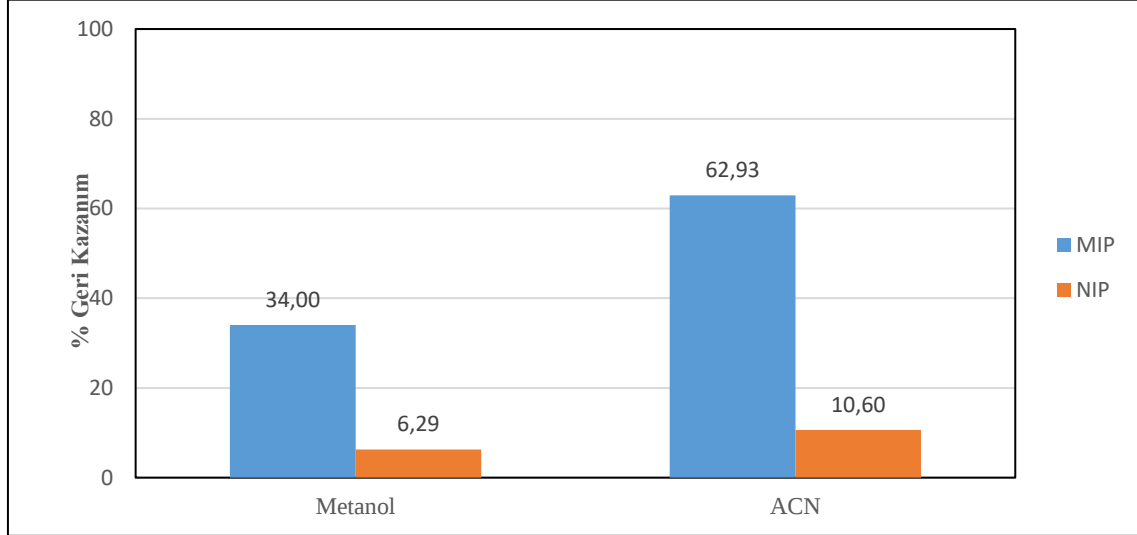
Şekil 4.19. Yükleme çözücü türünün sorbentin RİV bağlamasına etkisi (Yıkama: ACN)

Yükleme çözücüsü hacminin sorbentin RİV bağlaması üzerindeki etkisi sırasıyla 1,0, 2,0, 3,0 ve 4,0 mL tampon (pH 8,0) içinde hazırlanan 225 µg RİV içeren çözelti kullanılarak araştırılmıştır. 50,0 mg sorbent ile yapılan çalışmalarda yıkama çözücüsü olarak 3,0 ml ACN, elüsyon çözücüsü olarak 4,0 ml su:AA (6:4; v/v) kullanıldı. Sonuçlar Şekil 4.20’de sunulmuştur.



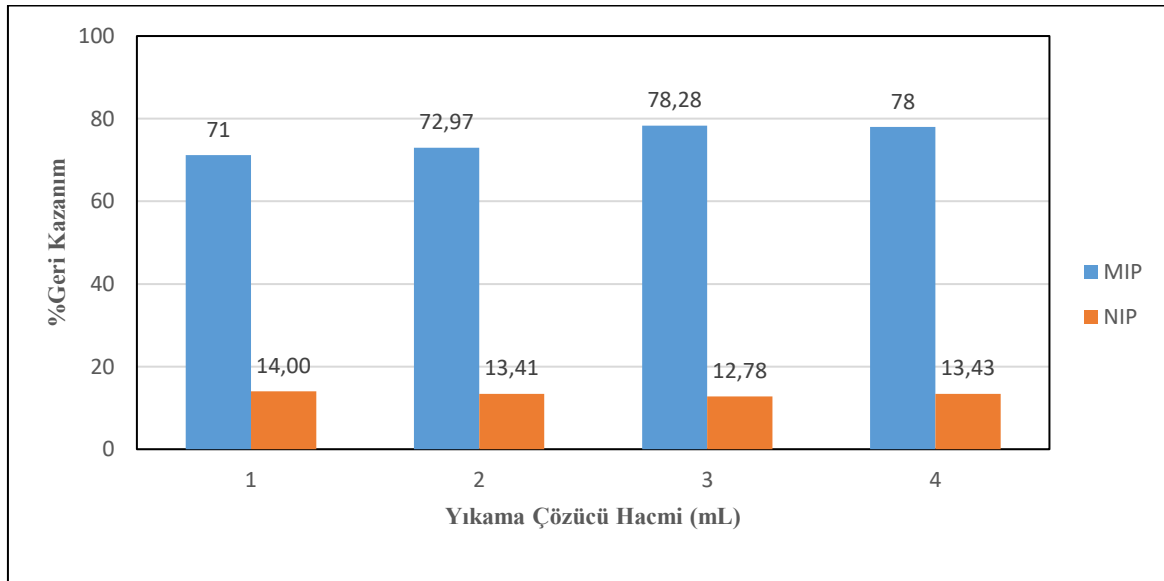
Şekil 4.20. Yükleme çözücüsü hacminin sorbentin RİV bağlamasına etkisi. (Yıkama: ACN)

Yıkama çözücüsünün türünün sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisini incelemek için sırasıyla MeOH ve ACN çözücülerini kullanılmıştır. 50,0 mg sorbent ile yapılan çalışmalarda yükleme çözücüsü olarak 3,0 ml 75 µg/ml RİV, elüsyon çözücüsü olarak 4,0 ml su:AA (8:2; v/v) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21’de verilmiştir.



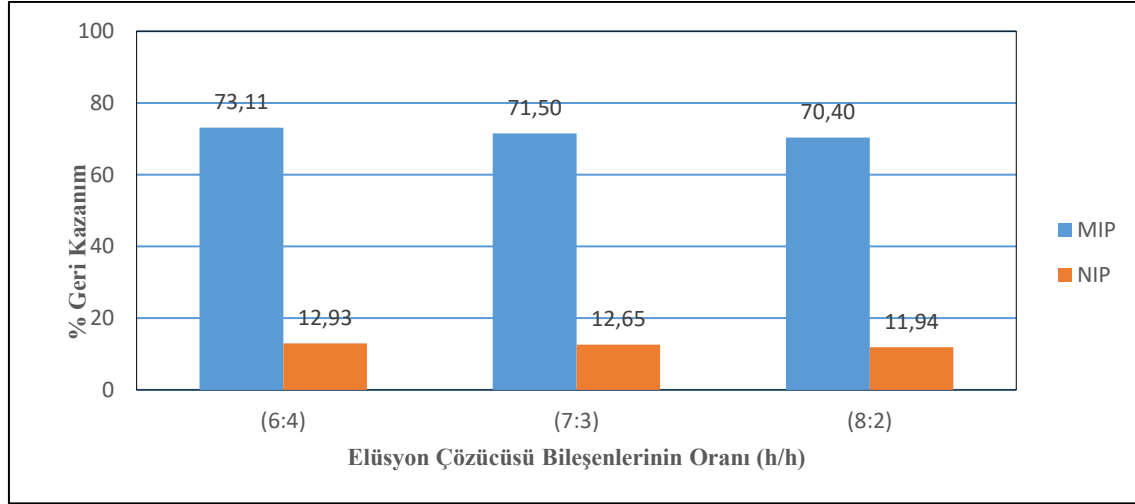
Şekil 4.21. Yıkama çözücüsünün sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi

En uygun yıkama çözücüsü ACN olarak tespit edildiğinden, ACN hacminin RİV geri kazanım yüzdesine olan etkisi de incelenmiştir. 50,0 mg sorbent ile yapılan çalışmalarda yükleme çözücüsü olarak 2,0 ml 112,5 µg/ml RİV, elüsyon çözücüsü olarak 4,0 ml su:AA (6:4; v/v) kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.22’de gösterilmiştir.



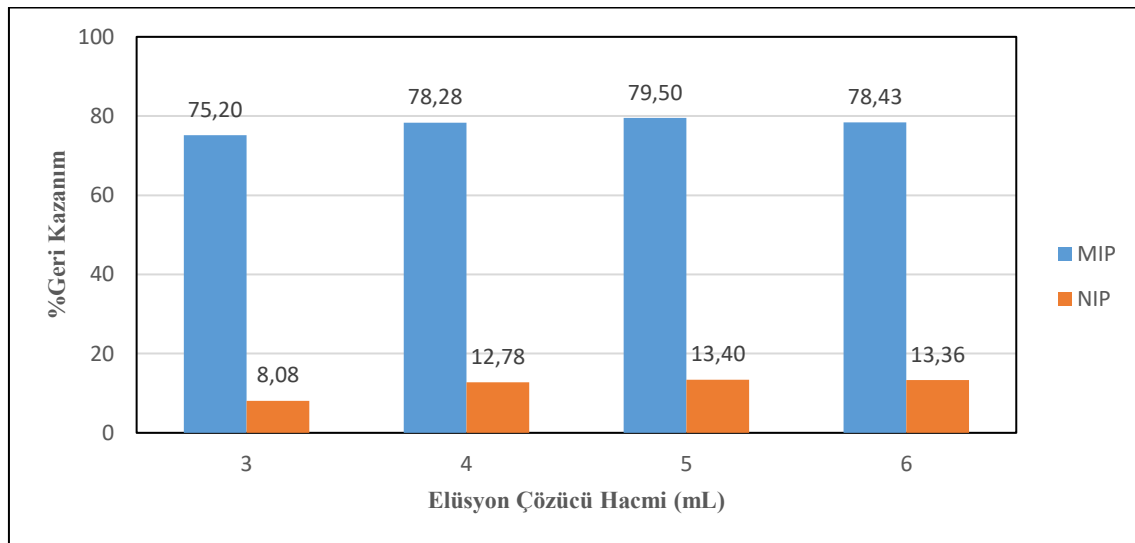
Şekil 4.22. Yıkama çözücüsü hacminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi

Elüsyon çözütüsü olarak kullanılan su:AA bileşiminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisini incelemek için 4,0 ml 6:4, 7:3 ve 8:2 (h/h) oranlarında, elüsyon çözütücü karışımları kullanılmıştır. 50,0 mg sorbent ile yapılan çalışmalarda yükleme çözütüsü olarak 3,0 ml 75 µg/ml RİV, yıkama çözütüsü olarak 3,0 ml ACN kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.23'te gösterilmiştir.



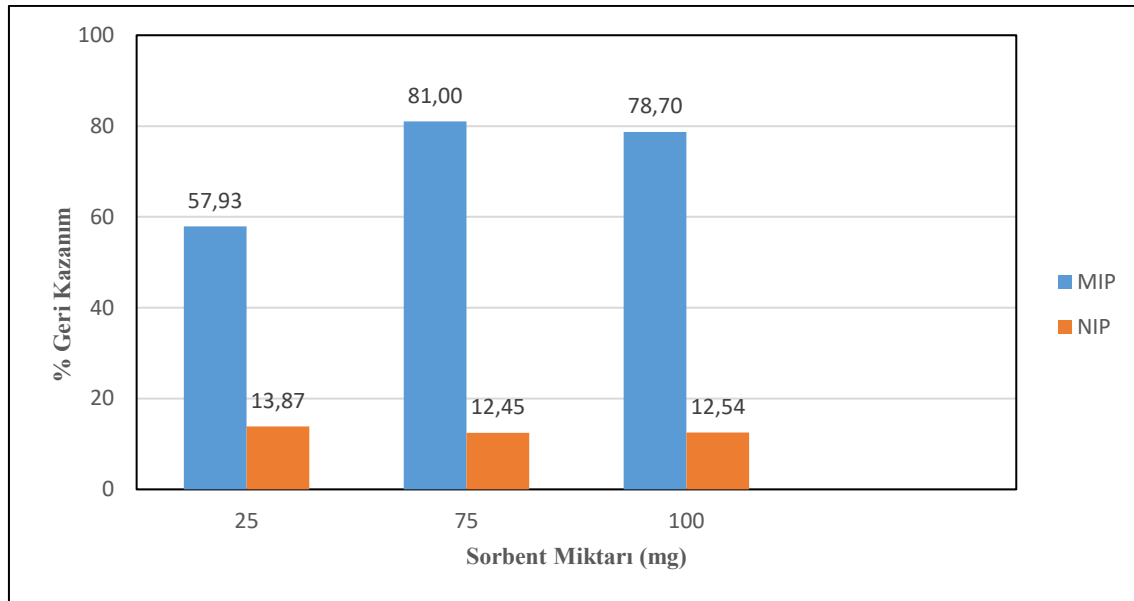
Şekil 4.23. Elüsyon çözütüsünün bileşenlerinin oranının sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi

Elüsyon çözütücü hacminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi incelenmiştir. Elüsyon çözütüsü olarak su:AA (6:4; v/v) kullanılmıştır. 50,0 mg sorbent ile yapılan çalışmalarda yükleme çözütüsü olarak 3,0 ml 75 µg/ml RİV, yıkama çözütüsü olarak 3,0 ml ACN kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Elüsyon çözütüsünün hacminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi

Kartuşlara yüklenen sorbent miktarının RİV'in bağlanmasına olan etkisini araştırmak üzere 3.0 mL hacimli katı faz ekstraksiyon kartuşlarına sırasıyla 25, 75, 100 mg sorbent doldurulmuştur. Yükleme çözücüsü olarak pH 8,0 tampon ortamı içerisinde hazırlanmış 225 µg/ml RİV; yıkama çözücüsü olarak 3,0 ml ACN ve elüsyon çözücüsü olarak 5,0 ml su:AA (6:4 v/v) kullanılmıştır. Hesaplanan geri kazanım değerleri Şekil 4.25'te sunulmuştur.



Şekil 4.25. Kartuşa doldurulan sorbent miktarının RİV'in bağlanma yeteneğine olan etkisi

4.3. Geliştirilen MISPE-Spektroflorimetrik Yönteme Ait Analitik Parametreler

Kalibrasyon grafiğinin alt derişimi olan 2 µg/mL RİV çözeltisi hazırlanmıştır. 265 nm'de on kez ölçüm alınarak hesaplanan analitik parametreler Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Kalibrasyon çalışması (n=10)

Doğrusal Aralık	Eğim	Kesim noktası	r	LOD ^a (µg/mL)	LOQ ^b (µg/mL)
2,0 -100,0 µg /ml	0,0012	-0,0002	0,9989	0,6351	1,9245

^a LOD=(3,3 x SD)/m

^b LOQ= (10 x SD)/m

SD : Standart Sapma

m: Eğim

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği, gün-içi ve günler-arası çalışmalar yapılarak tespit edilmiştir. 75,0 mg sorbent kullanılarak yapılan çalışmalarda yıkama çözücüsü olarak 3,0 ml

ACN, elüsyon çözücüsü olarak 5,0 ml su:AA (6:4; h/h) kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Gün-içi çalışmalar

RİV konsantrasyonu (µg/mL)	Gün-içi (n=3) MIP	Gün-içi (n=3) NIP
	RSD%	RSD%
5,0	0,22	3,2
25,0	1,34	0,71
90,0	1,31	1,46

Çizelge 4.3. Günler arası çalışmalar

RİV konsantrasyonu (µg/mL)	Günler-arası (n=3) MIP	Günler-arası (n=3) NIP
	RSD%	RSD%
5,0	0,43	3,2
25,0	1,46	2,55
90,0	0,92	2,4

Değişik derişimlerde (5,0; 25,0; 90,0 µg/mL) RİV eklenerek hazırlanan sulu numunelerde (pH 8,0) geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Serum örneklerinden RİV geri kazanım çalışması (n=3)

Eklenen RİV derişimi (µg/mL)	% Geri Kazanım±RSD (%)	
	MIP	NIP
5,0	69,57±0,87	20,83±2,27
25,0	71,05±1,09	17,54±1,62
90,0	72,64±1,16	17,16±3,92

5. TARTIŞMA

Bu bölümde, bulgular kısmında sunulan deneysel sonuçlar değerlendirilmiştir.

5.1. MIP/NIP Sentez Çalışmaları

Bu kısımda, polimerin sentez bileşenlerinin optimizasyonu incelenmiştir. İlk olarak çapraz bağlayıcı miktarının sorbentin RİV bağlamasına etkisi hem sulu ortamda hem de organik ortamda incelenmiştir. Elde edilen % bağlanma değerleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi sulu ortamda 0,98 mmol EGDMA kullanılarak sentezlenen sorbentin RİV % bağlanma değerlerinin; 0,74; 1,23 ve 1,47 mmol EGDMA kullanılarak sentezlenen sorbentlerin % bağlanma değerlerine göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. MIP ve NIP’in % bağlanma değerleri arasındaki fark baskılamanın başarısını gösterdiğinden, en başarılı baskılamanın 0,98 mmol EGDMA kullanılarak gerçekleştirildiği sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, MIP’e bağlanan RİV miktarı %78,30 iken, NIP ile elde edilen değer %23,38 olduğu tespit edilmiştir. Organik ortam sonuçları ise Şekil 4.2’de belirtilmiştir. Organik ortamda da sulu ortamda olduğu gibi 0,98 mmol EGDMA kullanılarak sentezlenen sorbentin RİV % bağlanma değerlerinin; 0,74, 1,23 ve 1,47 mmol EGDMA kullanılarak sentezlenen sorbentlerin % bağlanma değerlerine göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Baskılama faktörü 2,95 olarak bulunmuştur. Organik ortamda sonuç olarak, MIP’e bağlanan RİV miktarı %85,10 iken, NIP ile elde edilen değer %28,80 olduğu tespit edilmiştir.

Fonksiyonel monomer miktarının optimizasyonu için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar sulu ortam ve organik ortamda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda da sırası ile 0,19; 0,25; 0,31 ve 0,40 mmol monomer kullanılarak sorbentler sentezlenmiş ve elde edilen bağlanma değerleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’te verilmiştir. Sulu ortamda baskılama başarısı 0,40 mmol monomer ile sentezlenen sorbent ile elde edilmiştir. MIP’e bağlanan RİV miktarı %77,80 iken, NIP ile elde edilen değer %23,44 olmuştur. Organik ortamda da sulu ortamda olduğu gibi 0,40 mmol monomer ile sentezlenen sorbentin baskılama faktörünün daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. MIP’e bağlanan RİV miktarı %84,78 iken, NIP ile elde edilen değer %30,90 olarak tespit edilmiştir.

Polimerizasyon sentez parametrelerinden sonuncusu olan kalıp molekül miktarının, sorbentin analiti yeniden bağlama yüzdesine olan etkisi, sırası ile 0,06; 0,08; 0,10 ve 0,12 mmol analit kullanılarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de sunulmuştur. Çalışmalar sulu ortam ve organik ortamda gerçekleştirilmiştir. Sulu ortamda MIP için en yüksek ve NIP için ise en düşük bağlanma yüzdesinin, 0,10 mmol RİV kullanılarak hazırlanan sorbentle elde edildiği gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, kalıp molekül olarak kullanılan RİV’in miktarının 0,10 mmol’e çıkarıldığında daha fazla baskılanmış bölgenin elde edildiğini göstermektedir. Bunun bir sonucu olarak da bağlanan RİV miktarında artış sağlanmıştır. Organik ortamda ise sulu ortamda olduğu gibi 0,10 mmol RİV kullanılarak hazırlanan sorbentin daha fazla baskılanmış bölge oluşturduğu tespit edilmiştir. MIP’e bağlanan RİV miktarı %85,10 iken, NIP ile elde edilen değer %28,80 olarak tespit edilmiştir.

5.2. Karakterizasyon

Sentezlenen MIP/NIP sorbentlerinin şişme davranışlarının incelenmesi amacıyla karakterizasyon çalışmaları, yükleme çözücüsü olarak pH 8,0 tampon çözeltisi ile DMSO çözücülerini kullanılarak yapılmıştır. Yükleme, yıkama ve elüsyon basamağında sorbentlerin şişme miktarları incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de sunulmuştur.

Yükleme çözücüsü olarak pH 8,0 tampon çözeltisinin kullanıldığı durumda en az şişmenin yıkama basamağında, en yüksek şişme değerinin ise elüsyon basamağında gerçekleştiği görülmüştür. Elüsyon basamağında şişmenin daha yüksek olması analitin ayrılmasını kolaylaştırmaktadır.

Yükleme çözücüsü olarak DMSO’nun kullanıldığı çalışmada yükleme basamağında şişme oranı daha yüksektir. Bu durum geri kazanım için negatif avantaj sağlamaktadır. Şişme değerinin yükleme basamağında daha yüksek olması, yıkama basamağında analitin kaybedilmesine sebep olmaktadır.

İdeal bir çalışmada yükleme ve yıkama basamaklarında şişmenin az, elüsyon basamağında şişmenin daha yüksek olması beklenir. Elüsyon basamağında şişmenin yüksek olması analitin bu basamakta kolayca ayrılmasını sağlayacaktır. Yükleme basamağında pH 8,0 tampon çözeltisi kullanılan karakterizasyon çalışması bu duruma örnektir.

5.3. Beç Ortamda RİV Bağlanma Çalışmaları

Beç çalışmalarında, inkübasyon çözücüsünün sorbentin RİV bağlama davranışına olan etkisinin incelenmesi amacıyla pH 3,0 sitrat tamponu, pH 5,0 asetat tamponu, pH 7,0 fosfat tamponu, pH 8,0 fosfat tamponu, ACN ve DMSO kullanılmış; elde edilen sonuçlar ise Şekil 4.9'da sunulmuştur. Sulu ortamlar için en yüksek baskılama faktörü pH 8,0 tampon ortamında elde edilmiştir. Baskılama faktörü 3,32 olarak bulunmuştur. En yüksek RİV bağlanmasının pH 8,0 fosfat tamponu ortamında olmasının en önemli nedenlerinden birisi de MIP ve NIP'in Bölüm 4'de de ifade edildiği gibi en az şişme davranışını bu çözücüde göstermesidir. Çünkü, şişme derecesi arttıkça baskılanmış bölgenin şekil ve büyüklüğü değişmekte bu da seçici bağlanmanın önemli miktarda düşmesine sebep olmaktadır. pH 8,0 tampon ortamında MIP'e bağlanan RİV miktarı % 74,33 iken, NIP'e bağlanan RİV miktarı %22,36 olarak bulunmuştur. Organik ortamlarda yapılan çalışmalarda ise DMSO kullanıldığında, ACN'ye göre daha yüksek MIP (%81,19) ve daha düşük NIP (%30,20) bağlanma yüzdeleri elde edilmiştir. DMSO ortamında baskılama faktörü 2,69 iken ACN ortamında baskılama faktörü 2,03'tür.

Sorbentin RİV bağlama eğiliminin dengeye ulaştığı süreyi belirlemek amacıyla pH 8,0 tampon ortamında ve DMSO ortamında çalışmalar yapılmıştır. pH 8,0 tampon ortamında yapılan çalışmalara göre MIP'e RİV bağlanma eğiliminin 45. dakikada maksimuma ulaştığı ve bu değerden sonra %RİV bağlanma değerinin sabit kaldığı Şekil 4.10'da görülmektedir. 45.dakikada MIP için %76,80 ve NIP için de %23,25 bağlanma oranlarına ulaşılmıştır. DMSO ortamında yapılan çalışmalarda ise MIP'e RİV bağlanma eğiliminin 45. dakikada maksimuma ulaştığı ve bu değerden sonra %RİV bağlanma değerinin sabit kaldığı Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Ayrıca 60.dakikada NIP'e bağlanan RİV miktarı en düşük değerdedir. 60.dakikada MIP için %81,19 ve NIP için %30,20 bağlanma oranlarına ulaşılmıştır.

Bir diğer optimizasyon parametresi olarak sorbent miktarının RİV'in ortamdaki uzaklaştırılmasına etkisi incelenmiştir. Bu çalışma pH 7,0 tamponu, pH 8,0 tamponu, ACN ve DMSO ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te sunulmuştur. En yüksek bağlanma oranına pH 8,0 tampon ortamında 20 mg MIP kullanıldığında ulaşıldığı tespit edilmiştir. Bu sorbent miktarı aynı zamanda, en az

RİV'in NIP'e bağlandığı miktar olması açısından da önemlidir. Bu nedenle, optimum sorbent miktarı 20 mg olarak belirlenmiştir.

İnkübasyon ortamındaki RİV derişiminin, MIP ve NIP'in analiti bağlama kapasitesine etkisi sulu ortamda ve DMSO ortamında incelenmiştir. pH 8,0 tampon ortamında, Şekil 4.16'da verilen deney sonuçlarına göre, MIP için en yüksek bağlanma kapasitesine 26,7 (mg RİV/g sorbent) 120,0 µg/mL RİV derişiminde ulaşılmıştır. Bu değerden sonra RİV derişiminin arttırılmasıyla, MIP ve NIP'in kapasite değerindeki düşüş ve sonrasında sabit kalma eğilimde olduğu tespit edilmiştir. DMSO ortamında bulunan sonuçlar ise Şekil 4.17'de sunulmuştur. MIP için en yüksek bağlanma kapasitesine 22,5 (mg RİV/g sorbent) 120,0 µg/mL RİV derişiminde ulaşılmıştır. Bu değerden sonra RİV derişiminin arttırılmasıyla, MIP ve NIP'in kapasite değerinde önce düşüş ve sonrasında sabit kalma eğilimi olduğu gözlenmiştir.

5.4. MISPE Çalışmaları

Bu bölümde MISPE koşullarının optimizasyonu ile ilgili elde edilen deneysel sonuçlar değerlendirilmiştir.

Yükleme çözücüsü türünün (pH 8,0 tampon çözeltisi, asetonitril, DMSO ve metanol), sorbentin RİV bağlaması üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.19'da sunulmuştur. Buradan da anlaşılacağı üzere en yüksek bağlanma yüzdesi, yükleme çözücüsü olarak pH 8 tampon çözeltisinin kullanıldığı durumda elde edilmiştir.

Yükleme çözücüsü hacminin sorbentin RİV bağlaması üzerindeki etkisi, farklı hacimlerde pH 8,0 tampon çözeltisi içinde hazırlanan ve 225 µg analit içeren çözeltiler kullanılarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar ise Şekil 4.20'de sunulmuştur. Buna göre 2 mL yükleme çözücüsü kullanılarak yapılan sonuçlarda MIP için daha yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. MIP ve NIP'in geri kazanım değerlerinin sırasıyla %78,29 ve %12,78 olduğu gözlenmiştir.

Yıkama çözücüsü türünün (MeOH, ACN) sorbentin RİV bağlama eğilimi üzerindeki etkisi incelenerek elde edilen deneysel sonuçlar Şekil 4.21'de sunulmuştur. Buradan da anlaşılacağı üzere en yüksek bağlanma yüzdesi, yıkama çözücüsü olarak ACN kullanıldığında elde edilmiştir. Daha sonra da ACN hacminin optimize edilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.22'de sunulmuştur. Buna göre, yıkama

çözücüsü olarak 3,0 mL ACN kullanıldığında, MIP ve NIP'in geri kazanım yüzdelерinin sırasıyla %78,28 ve %12,78 olduğu gözlenmiştir.

Elüsyon çözücüsü olarak kullanılan su:AA bileşen oranının geri kazanım yüzdesine olan etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.23'te sunulmuştur. Yapılan çalışmada 6:4 oranında hazırlanan su:AA ile yapılan çalışmalarda MIP için en yüksek geri kazanım sonucu elde edilmiştir. Bu çözelti bileşimi için pH 8 tampon ortamında sırasıyla MIP ve NIP geri kazanım değeri %73,11 ve %12,93 olarak bulunmuştur.

Elüsyon çözücüsü hacminin geri kazanım yüzdesine olan etkisi incelenmiş ve Şekil 4.24'teki sonuçlar elde edilmiştir. 5,0 mL elüsyon hacminden düşük hacimlerde geri kazanım değeri daha az, 5,0 mL'den yüksek hacimde çözücü kullanıldığında ise MIP geri kazanım değeri daha düşük olduğu ve NIP'in geri kazanım değeri sabit kaldığı gözlenmiştir. Buna göre, MIP ve NIP'e ait geri kazanım değeri (MIP ve NIP için geri kazanımlar sırasıyla %79,50 ve %13,40 olarak hesaplanmıştır) arasındaki farkın en fazla olduğu 5,0 mL elüsyon çözücüsü hacmi, optimum değeri olarak kabul edilmiştir.

Kartuşlardaki sorbent miktarının RİV geri kazanımına olan etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.25'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre, en iyi geri kazanım değeri (MIP için en yüksek değeri, NIP için ise en düşük değeri olacak şekilde) 75 mg sorbent kullanılarak ulaşılmıştır.

RİV baskılanmış MIP'in ve baskılanmamış NIP'in seçicilik özelliğinin incelenmesi amacıyla, RİV ile benzer farmasötik etkiye sahip başka bir kolinesteraz inhibitörü olan Donepezil HCl ve RİV molekül yapısına benzer yapıda olan Atenolol ilaç etkin maddeleri kullanılarak MISPE çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen geri kazanım sonuçları Şekil 4.18'de sunulmuştur. Yükleme basamağında sulu ortamda Donepezil HCl ile hazırlanmış çözelti kullanılmış, MIP ve NIP'in geri kazanım değeri (MIP için %4,98 ve NIP için %4,13) oldukça düşük olduğu görülmüştür. Yükleme basamağında sulu ortamda Atenolol ile hazırlanmış çözelti kullanılarak yapılan çalışmalarda da Donepezil HCl'de olduğu gibi düşük geri kazanım değeri (MIP için %5,47 ve NIP için %4,66) elde edilmiştir. Bu sonuçlara bakılarak RİV'in başarılı bir şekilde baskılanmış olduğu sonucuna rahatlıkla varılabilir. Özellikle atenololün kimyasal yapısının RİV'in kimyasal yapısına olan benzerliği dikkate alındığında baskılamanın başarısı ve sorbentin seçiciliği net bir şekilde ortaya çıkmaktadır.

5.5. Geliştirilen MISPE-Spektrofotometrik Yönteme Ait Analitik Parametreler

Geliştirilen MISPE-spektrofotometrik yöntemin ticari serum numunesinden RİV tayini için uygunluğunun tespiti amacıyla doğrusalılık, LOD, LOQ, gün-içi ve günler-arası kesinlik ile doğruluk gibi parametreler belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemin doğrusal aralığının tespiti amacıyla kalibrasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen kalibrasyon verileri Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Elde edilen regresyon katsayısı ($r:0,9989$) kalibrasyon grafiğinin doğrusallığını ispatlamaktadır. LOD ve LOQ değerleri en küçük derişime sahip standart çözelti ($2,0 \mu\text{g/mL}$) kullanılarak sırasıyla $0,6351$ ve $1,9245 \mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Bu değerler, yöntemin teşhis ve tayin sınırlarının, ticari serum numunelerinden düşük derişimlerdeki RİV’in tayininin mümkün olduğunu göstermektedir.

Sunulan yöntemin tekrarlanabilirliği gün-içi çalışmalar yapılarak incelenmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ticari serum numuneleri üzerine eklenerek hazırlanan üç farklı derişimde RİV içeren ($5,0$; $25,0$ ve $90,0 \mu\text{g/mL}$) numuneler için bulunan düşük bağıl standart sapma ($\%0,71$ - $\%3,20$) değerlerinden hareketle, geliştirilen yöntemin kesinliğinin oldukça yüksek olduğu söylenebilir. Gün-içi çalışmalara paralel olarak günler-arası çalışmalar da yürütülmüştür. Gün-içi çalışmalarda olduğu gibi, ticari serum üzerine eklenerek hazırlanan üç farklı derişimde RİV içeren ($5,0$; $25,0$ ve $90,0 \mu\text{g/mL}$) numuneler için düşük bağıl standart sapma değerleri ($\%2,40$ - $\%3,20$) elde edilmiştir. Gün-içi ve günler-arası çalışmalarda elde edilen bu sonuçlar yöntemin kesinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen yöntemin doğruluğunun belirlenmesi amacıyla serum numunelerinden RİV geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar Çizelge 4.4’te sunulmuştur. Geri kazanım çalışmaları $5,0$ - $90,0 \mu\text{g/mL}$ RİV derişim aralığında gerçekleştirilmiş ve MIP için $\%69,57$ – $72,64$ arasında, NIP için ise $\%17,16$ – $20,83$ arasında geri kazanım değerlerine ulaşılmıştır. Bu çalışmalarda $0,87$ – $3,92$ aralığında bağıl standart sapma değerleri elde edilmiştir. Geliştirilen MISPE-spektrofotometrik yöntemle düşük derişimlerdeki RİV’in, potansiyel girişim yapıcılara rağmen insan serumundan yüksek kesinlik ve doğrulukla tayin edilebileceği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, Alzheimer tedavisinde kullanılan RİV'in farklı ortamlardan tayini için (MISPE)-spektrofotometrik yöntemi geliştirildi. Sorbent olarak RİV baskılanmış polimer ve seçici olmayan bağlanmaları tespit etmek amacıyla baskılanmamış polimer sentezlendi. Ölçümler spektrofotometre ile yapıldı. Sentezlenen sorbentin optimizasyon çalışmaları yapıldı. Polimerizasyon basamağında kullanılan bileşenler ile yapılan optimizasyon çalışmalarında monomer miktarının 0,40 mmol, çapraz bağlayıcı miktarının 0,98 mmol ve RİV miktarının 0,10 mmol olduğu deneysel çalışmalar ile belirlendi. Sentez koşullarının optimizasyonundan sonra ise MIP ve NIP'in analiti tutma yetenekleri beç çalışmaları ile belirlendi. Beç çalışmalarının yapılacağı ortamın pH 8,0 fosfat tamponu, inkübasyon süresinin 45 dakika, inkübasyon ortamına eklenen polimer miktarının 20 mg olduğu yapılan deneysel çalışmalar ile tespit edildi.

Sentez ve beç optimizasyonları tamamlanarak MISPE çalışmaları yürütüldü. Bu yöntemde geri kazanım yüzdelerini iyileştirmek amacıyla farklı hacimler ve farklı çözücüler kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda yükleme çözücüsü olarak 2,0 ml pH 8,0 fosfat tamponu, yıkama çözücüsü olarak 3,0 ml ACN ve elüsyon çözücüsü olarak 5,0 ml su:AA (6:4 h/h) optimum değerler olarak belirlendi. Kartuşa yüklenen sorbent miktarı da optimize edilerek optimum sorbent miktarının 75 mg olduğu tespit edildi.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda hazırlanan polimer ticari serum numunesinden RİV'in tayini için kullanıldı. MIP ve NIP için doğrusal aralık 2,0 -100,0 µg /ml, regresyon katsayısı 0,9989 olarak belirlendi. 5,0-90,0 µg/mL RİV derişim aralığında gerçekleştirilen çalışmalarda geri kazanım değerleri ve MIP için %69,57–72,64 arasında, NIP için ise %17,16–20,83 arasında bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı (LOD) 0,63 µg/mL, tayin sınırı (LOQ) 1,92 µg/mL olarak bulundu. Sonuç olarak MISPE spektrofotometrik yöntemin ticari serumdan RİV tayinini mümkün hale getirdiği tespit edildi.

KAYNAKLAR

1. İnternet: Wikipedia. (2022). Alzheimer's disease. Web: https://en.wikipedia.org/wiki/Alzheimer%27s_disease#cite_note-BMJ2009-12 adresinden 15 Mart 2022'de alınmıştır.
2. Yüksel, N. (2000). Psychopharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Turkish Journal of Clinical Psychiatry*, 3(2), 137-141.
3. Khoury, R., Rajamanickam, J., and Grossberg, G.T. (2018). An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 9(3), 171-178.
4. Arvand, M., and Fallahi, P. (2013). Voltammetric determination of rivastigmine in pharmaceutical and biological samples using molecularly imprinted polymer modified carbon paste electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 188, 797-805.
5. Amini, H., and Ahmadiani, A. (2010). High-performance liquid chromatographic determination of rivastigmine in human plasma for application in pharmacokinetic studies *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9(2), 115-121.
6. Sha, Y., Deng, C., Liu, Z., Huang, T., Yang, B., and Duan, G. (2004). Headspace SPME and capillary GC-MS determination of rivastigmine in canine plasma samples. *Journal of Chromatography B*, 806(2), 271-276.
7. Polinsky, R.J. (1998). Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of alzheimer's disease. *Clinical Therapeutics*, 20(4), 634-647.
8. Bereli, N., Baydemir, G. ve Denizli, A. (2010). Yeni nesil plimerik sistemler II: kriyojeller. İçinde Denizli, A. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (Eds.), *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*. Ankara: Pozitif Matbaacılık, 118-119.
9. Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R., and Mosbach, K. (1993). Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*, 361, 645-647.
10. Wulff, G., and Knorr, K. (2002). Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting. *Bioseparation*, 10(6), 257-276.
11. Pichon, V., and Haupt, K. (2006). Affinity separations on molecularly imprinted polymers with special emphasis on solid-phase extraction. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29(7-8), 989-1023.
12. Cormack, P.A.G., and 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.
13. Lanza, F. and Sellergren, B. (1999). Method for synthesis and screening of large groups of molecularly imprinted polymers. *Analytical Chemistry*, 71(11), 2092-2096.

14. Hennion, M.C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856(1-2), 3-54.
15. Macherey-Nagel. (2004). Sample preparation, solid phase extraction. In *Macherey-Nagel Catalogue*. 184-241.
16. Zief, M. (2005). *Solid Phase Extraction for Sample Preparation*. Phillipsburg: JT Baker,
17. Haginaka, J. (2005). Selectivity of affinity media in solid phase extraction of analytes. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 407-415.
18. Andac, A.M., Say, R., and Denizli, A. (2004). Molecular recognition based cadmium removal from human plasma. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 811(2), 119-126.
19. Pap, T., Horvath, V., Tolokan, A., Horvai, G., and Sellerger, B. (2002). Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 973(1-2), 1-12.
20. Caro, E., Marce, R.M., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., and Borrull, F. (2004). Molecularly imprinted solid-phase extraction of naphthalene sulfonates from water. *Journal Chromatogr A*, 1047(2), 175-180.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YILDIZ, Merve
Uyruğu : T.C.
Doğum yeri ve yılı :
Medeni hali :
Telefon :
e-posta :

Eğitim Derecesi

Eğitim Birimi

Mezuniyet tarihi

Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2015
Lise	Ankara Ayrancı Aysel Yücetürk Lisesi	2011

İş Deneyimi

Yıl

Yer

Görev

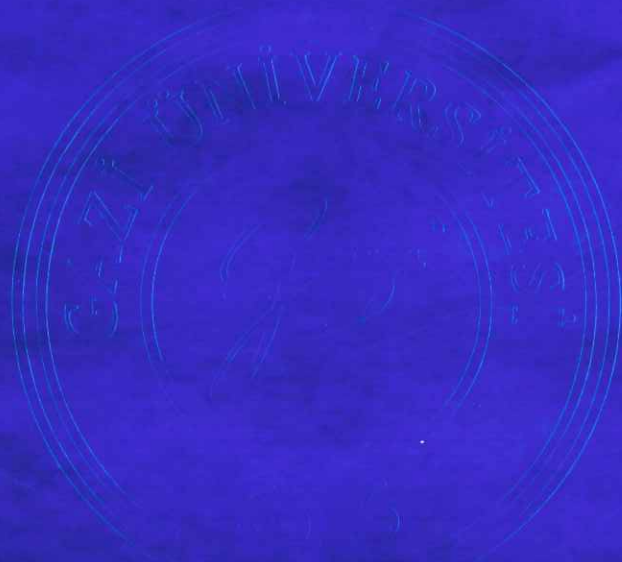
2015-Devam ediyor	Drogsan İlaçları	Kalite Kontrol Kıdemli Uzmanı
-------------------	------------------	----------------------------------

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR



GAZİTİ ORNATK AMERİCANI KİTAP.

