

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI

**MOLEKÜL BASKILANMIŞ KATI-FAZ EKSTRAKSİYON TEKNİĞİNİ
KULLANARAK TELMİSARTANIN ÇEŞİTLİ ORTAMLARDAN
FLORİMETRİK YÖNTEMLE TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hüma YILMAZ

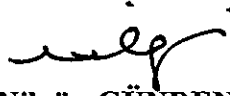
Tez Danışmanı
Prof.Dr. Hasan BASAN

ANKARA
Ocak 2014

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 31/01/2014



**Prof Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**Prof. Dr. Münevver SÖKMEN
Karadeniz Teknik Üniversitesi**



**Prof. Dr. Hasan BASAN
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	VI
Tablolar	IX
Semboller ve Kısaltmalar	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Moleküler Baskılama Tekniği	2
2.2. Moleküler Baskılama Çeşitleri	2
2.2.1. Kovalent Baskılama	3
2.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama	4
2.3. Moleküler Baskılanmış Polimer (MIP) Hazırlama Basamakları	5
2.3.1. Polimerizasyon öncesi	5
2.3.2. Polimerizasyon	6
2.3.3. Kalıp molekülün uzaklaştırılması	6
2.4. MIP sentezinde kullanılan bileşenler	6
2.4.1. Monomer	6
2.4.2. Çapraz Bağlayıcı	7

2.4.3.	Başlatıcı	7
2.4.4.	Kalıp Molekülü	8
2.4.5.	Çözücü	8
2.5.	Moleküler Baskılanmış Katı-Faz Ekstraksiyon (MISPE) Yöntemi	8
2.6.	Beç Çalışmaları	11
2.7.	Telmisartan	11
2.7.1.	Telmisartanın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	11
2.7.2.	Telmisartan Tayin Yöntemleri	12
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
3.2.	Kullanılan Cihazlar	14
3.3.	Çözeltilerin Hazırlanması	15
3.3.1.	Stok Telmisartan Çözeltisinin Hazırlanması	15
3.3.2.	Ekstraksiyon Çözücüsünün Hazırlanması	15
3.3.3.	Yükleme Çözücüsünün Hazırlanması	16
3.3.4.	İdrar Numunesi Hazırlama İşlemi	16
3.3.5.	Kalibrasyon için Standartların Hazırlanması	16
3.4.	Telmisartan Baskılanmış Polimer Sentezi	17

3.4.1.	Telmisartan Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış Polimer (NIP) Sentezi Parametreleri	21
3.5.	Karakterizasyon Çalışması	22
3.6.	Beç (İnkübasyon) Çalışmaları	23
3.7.	Adsorpsiyon İzotermi	25
3.8.	MISPE Çalışmaları	26
3.9.	Değişik Ortamlardan Tel'in Uzaklaştırılması ve Spektroflorimetrik Yöntemle Tayini	28
4.	BULGULAR	30
4.1.	MISPE Sorbentinin Sentez Koşullarının Optimizasyonu	30
4.2.	Karakterizasyon Çalışması	34
4.3.	Beç Çalışma Koşullarının Optimizasyonları	36
4.4.	Adsorpsiyon İzotermi	39
4.5.	MISPE Koşullarının Optimizasyonu	40
4.6.	Değişik Ortamlardan Tel uzaklaştırılması ve Spektroflorimetrik Yöntemle Tayini	46
5.	TARTIŞMA	49
5.1.	MIP/NIP Sentez ve Karakterizasyon Çalışmaları	49
5.2.	Tel Bağlanma Çalışmaları	51
5.3.	MISPE Çalışmaları	53

5.4.	Değişik Ortamlardan Tel uzaklaştırılması ve Spektroflorimetrik Yöntemle Tayini	55
6.	SONUÇ	58
7.	ÖZET	60
8.	SUMMARY	61
9.	KAYNAKLAR	62
10.	TEŞEKKÜR	72
11.	ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER

Şekil 1.	Kovalent baskılama yaklaşımı	4
Şekil 2.	Kovalent olmayan baskılama yaklaşımı	5
Şekil 3.	Moleküler baskılanmış katı-faz ekstraksiyon yöntemi	10
Şekil 4.	Telmisartanın (analit) kimyasal yapısı	19
Şekil 5.	DMAEMA (monomer) kimyasal yapısı	19
Şekil 6.	EGDMA (çapraz bağlayıcı) kimyasal yapısı	19
Şekil 7.	ChI (porojen) kimyasal yapısı	19
Şekil 8.	AIBN (başlatıcı) kimyasal yapısı	20
Şekil 9.	Moleküler baskılanmış polimerin sentez aşamaları	20
Şekil 10.	Sentez ortamının sıcaklığının etkisi (I: Oda sıcaklığında, II: buz kalıpları arasında)	31
Şekil 11.	Çapraz bağlayıcı miktarının MIP ve NIP'nin Tel geri kazanım yüzdesine etkisi	32
Şekil 12.	Monomer miktarının MIP ve NIP'nin tel geri kazanım yüzdesine etkisi	32
Şekil 13.	Porojen hacminin MIP ve NIP'nin tel geri kazanım yüzdesine etkisi	33

Şekil 14.	Tel miktarının MIP ve NIP'nin tel geri kazanım yüzdesine etkisi	34
Şekil 15.	Sorbentin değişik organik çözücülerdeki şişme davranışı	35
Şekil 16.	Sorbentin değişik pH değerlerindeki şişme davranışı	35
Şekil 17.	İnkübasyon ortamının MIP ve NIP'nin Tel bağlama üzerindeki etkisi	36
Şekil 18.	İnkübasyon süresinin bağlanma yüzdesine etkisi	37
Şekil 19.	Sorbent miktarının Tel bağlamaya etkisi	38
Şekil 20.	Telmisartan derişiminin sorbentin bağlama kapasitesine olan etkisi	39
Şekil 21.	Tel İçin Langmuir adsorpsiyon modeli kalibrasyonu	40
Şekil 22.	Yükleme çözücüsünün sorbentin tel bağlamasına etkisi (Yıkama: ACN)	41
Şekil 23.	Tel derişiminin geri kazanım yüzdesine olan etkisi	41
Şekil 24.	Yıkama çözücüsünün sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi	42
Şekil 25.	Yıkama çözücüsü hacminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi. (10 µg/mL Tel)	43
Şekil 26.	Elüsyon çözücüsünün hacminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi	43

Şekil 27.	Sorbent miktarının Tel bağlanmasına etkisi	44
Şekil 28.	Yükleme süresinin sorbentin bağlama yeteneğine etkisi (Yükleme: ACN, I: 3 dakika bekleme yapıldı, II: bekleme yapılmadı)	45
Şekil 29.	Yükleme süresinin sorbentin bağlama yeteneğine etkisi (Yükleme: pH 7,4, I: 3 dakika bekleme yapıldı, II: bekleme yapılmadı)	45
Şekil 30.	Sorbentin farklı pH'lardaki Tel bağlama davranışı	46

TABLULAR

Tablo 1.	Telmisartanın fiziksel ve kimyasal özellikleri	12
Tablo 2.	Baskılanmış polimer bileşenleri ve miktarları	18
Tablo 3.	MIP'nin Tel adsorpsiyonu için parametreler	40
Tablo 4.	Sulu örneklerden Telmisartan geri kazanım çalışması (n=3)	47
Tablo 5.	ACN'li ortamlardan Telmisartan geri kazanım çalışması	47
Tablo 6.	İdrar numunesi ile hazırlanan (matriks uyumlu) kalibrasyon çalışması	48
Tablo 7.	Gün içi ve günler arası çalışmalar	48
Tablo 8.	İdrar örneklerinden Telmisartan geri kazanım çalışması (n=4)	48

Kısaltma Dizini

Sodyum Hidroksit	NaOH
Hidroklorik Asit	HCl
Toluen	Tol
Kloroform	Chl
Asetonitril	ACN
Dikloroetan	DCE
Moleküler Baskılanmış Polimer	MIP
Baskılanmamış Polimer	NIP
Katı-Faz Ekstraksiyonu	SPE
Telmisartan	Tel
Metanol:Asetik Asit	MeOH:AA
Moleküler Baskılanmış Katı-Faz Ekstraksiyonu	MISPE
Dimetil sülfoksit	DMSO
Standart Sapma	SD
Ortalama Değer	X_{ort}
Azobisizobutironitril	AIBN
Etilenglikoldimetakrilat	EGDMA
Dimetilaminoetil metakrilat	DMAEMA

1. GİRİŞ

Hipertansiyon, tedavi edilmediği takdirde öldürücü olabilir. Kalbi zorlayarak kalp yetmezliğine ve damarları zorlayarak damar sertliğine yol açar. Hipertansiyonlu hastalarda beyin kanaması, felç, koroner arter hastalığı, ani ölüm, kalp krizi, ritim bozuklukları, böbrek yetmezliği ve retinopati (görme bozukluğuna yol açan göz bozukluğu) sık görülür. Hipertansiyon tedavisinde telmisartan (Tel) sıklıkla kullanılmaktadır¹.

Tel; türev spektrofotometrisi², sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi³, floresans dedektörlü HPLC⁴ ve elektroforetik yöntemler kullanılarak tayin edilebilmektedir⁵.

Bu çalışmada, Tel'in organik çözücülü ortamlardan ve idrar numunelerinden uzaklaştırılması ve tayini amacıyla bir moleküler baskılanmış katı-faz ekstraksiyonu (MISPE)-spektroflorimetrik yöntem geliştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Moleküler Baskılama Tekniği

Moleküler baskılama, seçici molekül tanıma bölgelerine sahip polimerlerin hazırlanması için son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanılan bir tekniktir⁶⁻¹⁰. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) sentezi için fonksiyonel monomer, kalıp molekülü, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve porojen kullanılmaktadır. Sentez sırasında önce fonksiyonel monomer ve kalıp molekülü birbiri ile etkileşerek kararlı bir kompleks oluştururlar. Sonra, bu kompleks çapraz bağlayıcı varlığında polimerleştirilir. Sentezlenen moleküler baskılanmış bölgelerin üç boyutlu yapısı şekil, büyüklük ve fonksiyonel grupların türleri ve açısal duruşları bakımından hedef molekül (analit) ile birbirinin tamamlayıcısıdır^{11,12}. Yüksek çapraz bağlanma derecesi, kalıp molekülün uzaklaştırılmasından sonra elde edilen baskılanmış kavitelelerin korunmasını sağlar. MIP'ler, düşük maliyet, uzun raf ömrü, yüksek mekanik direnç, ısı ve basınca olan dayanıklılık, yoğun kimyasal ortamlara dahi uygulanabilme gibi birçok özelliğe sahiptir^{13,14}. Bu avantaj ve özelliklerinden dolayı MIP'lerin yapay reseptör olarak^{15,16}, sensör bileşeni olarak¹⁷⁻¹⁹ ve katı-faz ekstraksiyonu (SPE) için sorbent olarak²⁰ birçok alanda uygulamaları mevcuttur.

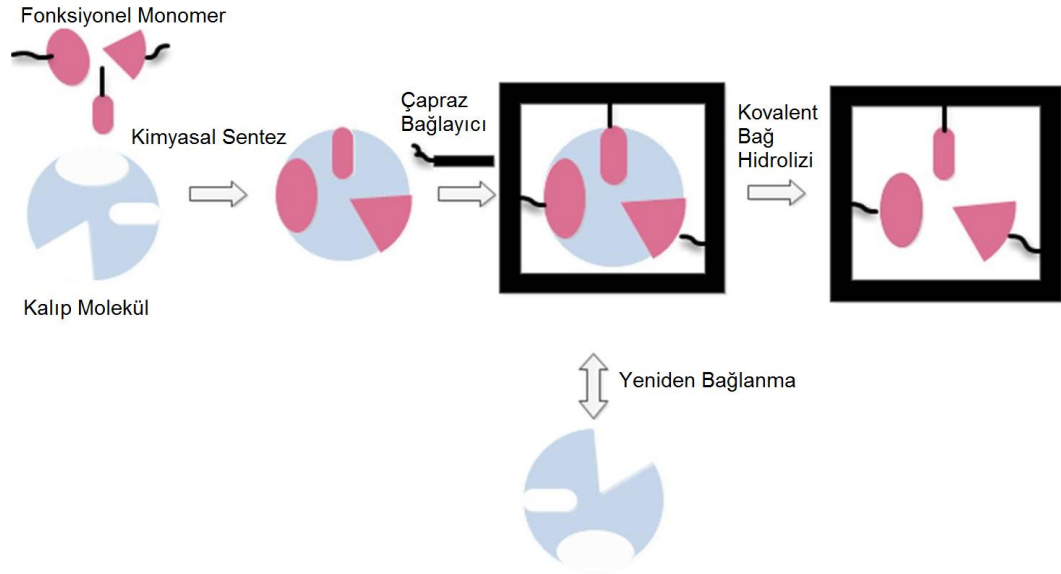
2.2. Moleküler Baskılama Çeşitleri

Moleküler baskılama ile oluşan bağlanma bölgeleri polimerizasyon sırasında kurulan etkileşimlere bağlı olarak farklı karakteristik gösterir. MIP'lerdeki özel bağlanma bölgeleri, kalıp molekül ile monomer arasındaki kovalent ya da, daha yaygın olarak, kovalent olmayan etkileşimler sonucu oluşur^{21,22}.

2.2.1. Kovalent Baskılama

Moleküler baskılama tekniği fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki etkileşimin türüne bağlı olarak iki ana başlık altında toplanabilir. İlk yaklaşım Gunter Wulf tarafından ortaya atılmış olan kovalent yaklaşım ya da diğer bir deyişle Wulf yaklaşımı olarak bilinmektedir. Bu yaklaşımda, polimerizasyondan önce kalıp molekül (analit) ile monomer arasında kuvvetli ve tersinir olan kovalent etkileşimler gözlenir²³.

Kalıp ile fonksiyonel monomer arasındaki kovalent bağ oluşumu, kovalent olmayan yaklaşıma göre daha iyi tanımlanan ve daha homojen olan bağlanma bölgelerinin elde edilmesine olanak tanır. Bu yaklaşımda kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimler kovalent olmayan yaklaşıma göre daha kararlıdır. Kovalent baskılama tekniği ile yapılan sentezden sonra kalıp molekülü uzaklaştırmak için kovalent bağların kırılması gerekir. Bu kırılma işlemi asit hidrolizi ile gerçekleştirilmektedir²⁴.

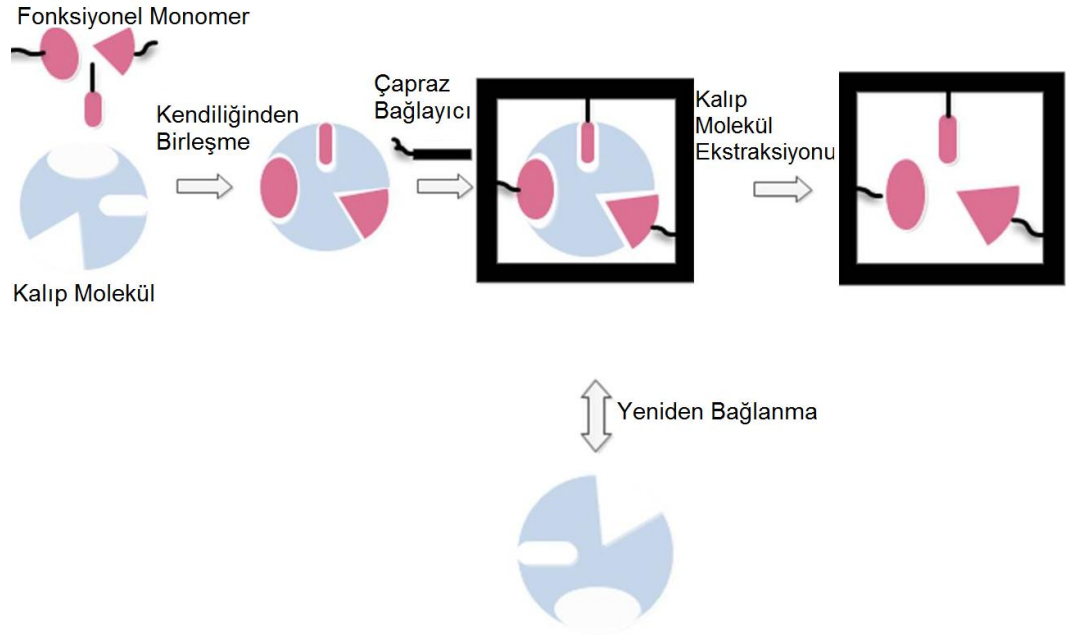


Şekil 1. Kovalent baskılama yaklaşımı.

2.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama

İkinci yaklaşım ise Klaus Mosbach tarafından ortaya atılmış ve Mosbach yaklaşımı olarak bilinmektedir. Bu yaklaşımın temelinde kovalent olmayan etkileşimler söz konusudur²⁵. Kalıp molekülü ve fonksiyonel monomer arasında elektrostatik etkileşimler, hidrojen-bağı, pi-pi etkileşimleri, iyon-iyon, iyon-dipol, dipol-dipol, hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri gibi moleküller-arası etkileşimlerin sonucu olarak bağlanmalar söz konusudur²⁶.

Kovalent olmayan yaklaşım, moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde kullanılan en yaygın tekniktir. Bu teknikte oluşan bağlar, kovalent teknik kullanılarak oluşturulan bağlara göre daha zayıftır. Kovalent olmayan protokol, deneysel ve kompleksleşme aşamasındaki kolaylığından, hedef molekülün bağlanma kinetiğinin hızlı olmasından ve kalıp molekülün kolayca uzaklaştırılabilmesinden dolayı kovalent yaklaşıma göre daha yaygın olarak kullanılan bir tekniktir^{27,28}.



Şekil 2. Kovalent olmayan baskılama yaklaşımı.

2.3. Moleküler Baskılanmış Polimer (MIP) hazırlama basamakları

Moleküler baskılanmış polimerin sentezi üç aşamadan oluşmaktadır.

2.3.1. Polimerizasyon öncesi

Fonksiyonel monomer ve baskı molekülü arasındaki kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimler ile monomer-baskı molekülü kompleksi oluşturulur.

2.3.2. Polimerizasyon

Monomer-baskı molekülü kompleksi bir çapraz bağlayıcı yardımı ile polimerleştirilir ve bunun sonucu olarak baskı molekülü polimerik yapı içerisine hapsedilir.

2.3.3. Kalıp molekülün uzaklaştırılması

Polimerdeki kalıp moleküle özgü seçici bağlanma bölgelerini oluşturmak amacı ile, baskı molekülü ya basit bir ekstraksiyon işlemi ile veya hidroliz yoluyla polimerik yapıdan uzaklaştırılır. Böylece, elde edilen kalıp moleküle özgü bağlanma bölgeleri hedef molekülü (analit) bağlamaya hazır hale getirilmiş olur.

2.4. MIP Sentezinde Kullanılan Bileşenler

Moleküler baskılanmış polimer sentezi sırasında gerek duyulan kimyasal bileşenler; fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı, kalıp molekül ve porojen olarak da bilinen polimerizasyon çözücüsüdür.

2.4.1. Monomer

Fonksiyonel monomerler, baskılanmış bağlanma bölgelerinde hedef molekül ile bağlanma etkileşimlerinden sorumludurlar. Genellikle, kovalent olmayan baskılamada monomer kalıp moleküle göre daha fazla miktarda kullanılır²⁹. Bunun nedeni daha fazla sayıda kompleks

oluşturmak ve baskılanmış b6lgelerin sayını arttırmaktır. Kalıp molekul6n fonksiyonel grupları ile monomerin fonksiyonel gruplarını etkileştirmek olduk6a b6y6k 6nem taşır. Temel olarak fonksiyonel monomerler, asidik, bazik ve n6tral monomerler olmak 6zere 6ç gruba ayrılır. Metakrilik asit genelde en fazla kullanılan ve bir6ok 6alışma grubu tarafından kullanılan asidik monomerlere verilebilecek en 6ok bilinen bir 6rnektir³⁰.

2.4.2. 6apraz Bağlayıcı

Bir 6apraz bağlayıcı baskılama işleminde iki 6nemli fonksiyonu yerine getirmek amacıyla kullanılmaktadır. Birinci fonksiyonu, polimer matriksinin morfolojisini kontrol etmek ve d6zenlemektir. İkincisi ise baskılanmış bağlanma b6lgelerinin yapısının korunmasını sağlamak ve mekanik dayanıklılık vermektir³¹. 6apraz bağlayıcının, bağlanma b6lgelerinin b6t6nl6ę6n6 korumak i6in y6ksek oranda kullanılması gerekir²⁹.

2.4.3. Başlatıcı

Başlatıcı, sistemde serbest radikal polimerizasyonunu başlatmak i6in eklenir. UV lamba, ısı veya bir kimyasal ile tetiklendiğinde karbon merkezli serbest radikaller oluşur ve eşleşmemiş elektronlar monomer ve 6apraz bağlayıcının yapısında bulunan 6ift bağlarla etkileşerek polimerizasyonu başlatırlar. Polimerizasyon işlemi iki radikal birbiri ile reaksiyona girdiğinde sonlanır³¹. Eklenen başlatıcı miktarı monomer ile karşılaştırıldığında daha d6ř6k seviyededir.

Azobisizobütironitril gibi azo başlatıcıları fotoliz veya termoliz işlemi ile kolayca bozulurlar.

2.4.4. Kalıp Molekülü

Baskılama işlemindeki diğer bir önemli bileşen de baskılanmış bölgelerin elde edilmesini sağlayan kalıp molekülüdür. Kalıp molekülünün çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklerinin önemi yanında monomer ile uygun etkileşimlerde bulunması, kullanılan çapraz bağlayıcı ile uyumlu olması, baskılama işlemi için kullanılan çözücünde çözünmesi ve polimerizasyon koşulları altında kararlı olması büyük önem taşımaktadır²⁹.

2.4.5. Çözücü

Polimerizasyon çözücüsünün (porojen) fonksiyonu, bütün bileşenlerin reaksiyon ortamında çözünmesini sağlamasıdır³⁰. Porojen aynı zamanda, polimerin yüzey morfolojisini kontrol eder. Porojen baskılanacak molekülün türüne ve baskılama çeşidine göre seçilmelidir. En yaygın olarak kullanılan baskılama çözücüleri toluen (Tol), kloroform (Chl) ve asetonitrildir (ACN).

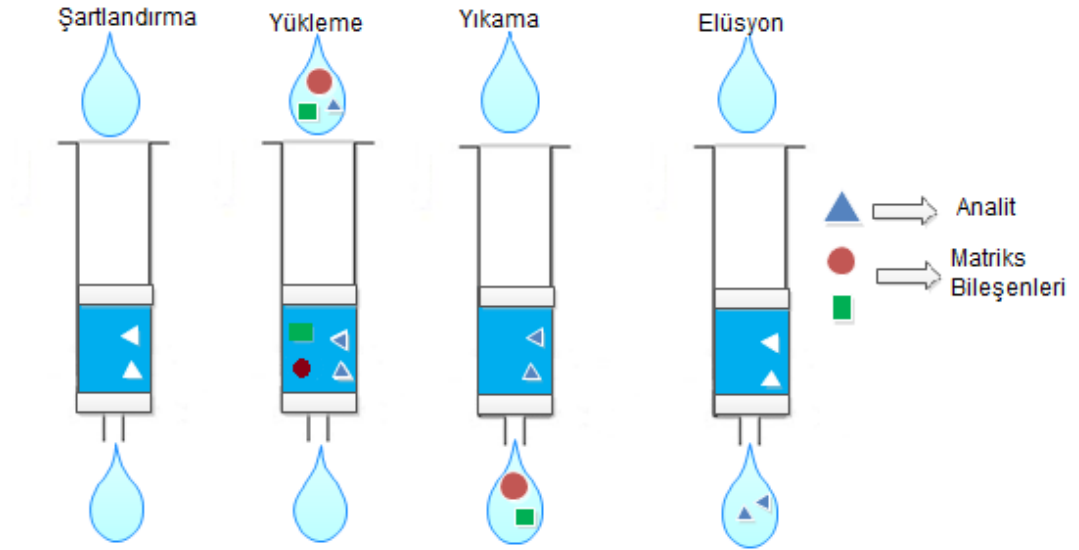
2.5. Moleküler Baskılanmış Katı-Faz Ekstraksiyon (MISPE) Yöntemi

Katı-faz ekstraksiyonunun seçiciliğini arttırmak için çeşitli sorbentler kullanılmıştır. Klasik SPE sorbentleriyle karşılaştırıldığında, MISPE yönteminin en önemli avantajı yüksek seçicilik özelliğine sahip olmasıdır. Ayrıca, termal ve kimyasal kararlılıkları, neredeyse aktivite kaybı

olmaksızın tekrarlanabilir sonuçlar vermeleri, yüksek mekanik dayanıklılıkları gibi özelliklerinden dolayı da klasik sorbentlere göre daha üstün özelliklere sahiptir. MISPE yöntemi, farmasötik, biyolojik ve çevresel örneklerle yaygın bir şekilde uygulanmaktadır³².

Son zamanlarda MIP'ler katı-faz ekstraksiyonu (SPE) için yeni seçici sorbentler olarak ortaya çıkmıştır³³⁻³⁷. Bu polimerlerin sorbent olarak kullanımı yalnızca örneğin ön zenginleştirilmesi ve temizlenmesi ile sınırlı değildir. Bunun yanında, hedef molekülün kompleks matrislerden (biyolojik sıvılar ve çevreye ait örnekler) başarılı bir şekilde uzaklaştırılmasına da olanak sağlamaktadır. Moleküler baskılanmış polimerlerin, ön zenginleştirme ve saflaştırma işlemlerinde kullanımı onların sulu ve organik ortamlardaki yüksek seçicilik ve kararlılık özelliklerinden dolayı oldukça ilgi çekmektedir³⁸. Bu yöntem herbisitlere ve ilaçlara, sığır ciğeri, kan ve idrarda örneklerinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır³⁹⁻⁴⁷. Plastik antibadiler olarak da adlandırılan MIP'ler, antibadilerden farklı olarak organik ortamlarda başarılı bir şekilde uygulanabilmektedirler. Sulu ortamlardaki performansları da antibadiler kadar olmasa da sentez koşullarının iyi bir şekilde optimize edilmesiyle başarılı olmaktadır.

Bu yöntemde, geleneksel SPE işleminde olduğu gibi, önce baskılanmış polimerin belirli bir miktarı (genellikle 50-200 mg) SPE kartuşuna doldurulur. Daha sonra, sırasıyla şartlandırma, yükleme, yıkama ve elüsyon aşamaları uygulanır. MISPE yöntemi şematik olarak Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Moleküler baskılanmış katı-faz ekstraksiyon yöntemi.

Şartlandırma basamağında, MIP'nin kaviteleri (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 sağlanır⁴⁸. Çoğunlukla sorbente hem analit hem de örnek matriksinde bulunan diğer girişim yapıcı bileşenler bağlanır. Seçici bir ekstraksiyon işlemi başarabilmek için elüsyon adımından önce uygun bir organik çözücü ile yıkama basamağı gerekmektedir⁴⁹⁻⁵¹. Yıkama basamağında girişim yapıcı bileşenler sorbentten uzaklaştırılırken analitin sorbente bağlı kalması sağlanır. MISPE metodunun yüksek seçiciliğinin ortaya çıkabilmesi için yıkama basamağı önemli bir aşamadır. Bu basamakta MIP'nin, analiti seçici olarak tanıma kabiliyetinin ortaya çıkabilmesi için yıkama çözücüsünün pH'ı, türü ve miktarı optimize edilmelidir. Yıkama çözücüsü olarak diklorometan (DCE), toluen (Tol) veya kloroform (Chl) yaygın olarak kullanılan çözücülerdir⁵²⁻⁵⁴. Bununla beraber asetonitril (ACN) ya da

metanol (MeOH) gibi yüksek polaritede olan bazı çözücülerle de iyi sonuçların alınabileceği gözlenmiştir⁵⁵⁻⁶⁰. Girişime neden olan bileşenler sorbentten uzaklaştırıldıktan sonra analit uygun bir çözücü veya çözücü karışımı ile kartuştan elüe edilir. Daha sonra da, uygun bir analitik yöntemle (HPLC, spektrofotometri, UV-Vis spektrofotometri vb.) analit miktarı tayin edilir.

2.6. Beç (İnkübasyon) Çalışmaları

MISPE çalışmasından önce genellikle, MIP ve NIP'nin analiti tanıma davranışlarını belirlemek, bağlanma kapasiteleri ile bilgi edinmek ve yeniden bağlanma özelliklerini incelemek amacıyla çoğunlukla bir beher içerisinde beç çalışmaları gerçekleştirilir. Baskılamanın başarısı, analitin hem MIP'e hemde NIP'e bağlanma ilgisi belirlenerek baskılama faktörü (IF) ile tespit edilir⁶¹. Ayrıca, beç bağlanma çalışmaları ile analitin sorbente bağlanma davranışını karakterize etmek amacıyla adsorpsiyon izotermeleri elde edilir.

2.7. Telmisartan

2.7.1. Telmisartanın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan telmisartan, [4'-((1,4'-dimetil-2'-propil (2,6'-bi-1H-benzimidazol)-1'-il) metil-(1,1'-bifenil)-2-karboksilikasit], mide-bağırsak kanalındaki emilimi yüksektir⁶².

Telmisartan dimetil sülfoksit (DMSO) içinde (13 mg/mL, 25 °C), kloroform içinde (~1.6 mg/mL) ve etanol içinde (<1 mg/mL 25 °C) çözünür fakat suda çözünmez^{63,64}.

Tablo 1. Telmisartanın fiziksel ve kimyasal özellikleri.

pKa	3.65
Molekül Ağırlığı	514.617 g/mol
Erime Noktası	261-263 °C
Kaynama Noktası	771°C

2.7.2. Telmisartan Tayin Yöntemleri

Mudiam ve ark. Tel tayininde, MISPE ve sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemlerini kullanmışlardır. Tel fare idrarında, kanda ve çeşitli farmasötik formülasyonlarda HPLC ile tayin edilmiştir⁶⁵. Hempmen ve ark. insan kanından Tel tayini için hızlı ve yeni bir yöntem olan ELISA yöntemini önermişlerdir⁶⁶. Jing ve arkadaşları Tel'i fare dokularından tayin etmek için katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi ile floresans dedektörlü HPLC'yi kullanmışlardır⁶⁷.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Azobisisobutironitril (AIBN)	Aldrich
Etilenglikoldimetakrilat (EDMA)	Aldrich
Dimetilaminoetil metakrilat (DMAEMA)	Aldrich
Telmisartan	Nuvomed ve Mustafa Nevzat
Sodyum Hidroksit	Sigma
Hidroklorik Asit	Sigma
Asetonitril	Merck
Dikloroetan	Merck
Metanol	Sigma
Asetik Asit	Sigma
Toluen	Sigma
Kloroform	Sigma

3.2. Kullanılan Cihazlar

Spektroflorimetre	Cary Eclipse Varian
UV-Vis Spektrofotometresi	Shimadzu 160 A
Deiyonize Su Cihazı	Millipore
Ultrasonik Banyo Cihazı	Selecta
Hassas Terazı	Shimadzu
Mikropipet	Socorex
pH Metre	Thermo
Soxhlet Ekstaksiyon Sistemi	İldam
Vakum Filtrasyon Sistemi	İldam
Santrifüj Cihazı	Selecta
Tüp Karıştırıcı	Fırlabo
Manyetik Karıştırıcı	Nüve
İnkübatör (Etüv) Cihazı	Nüve
Mantolu Isıtıcı	Topo
Naylon Membran	Alltech
Katı Faz Ekstraksiyon Kartuşu	Alltech
Frit	Alltech

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Çözeltiler çeşitli çözücüler ve deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Kullanılan saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

3.3.1. Stok Telmisartan Çözeltisinin Hazırlanması

Telmisartan hassas olarak 6.25 mg tartılarak 25.0 mL'lik balon jojeye konuldu ve bir miktar ACN ile ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanıp 25.0 mL'ye ACN ile tamamlandı. Kullanıma kadar 4°C'de buzdolabında saklandı.

3.3.2. Ekstraksiyon Çözücüsünün Hazırlanması

Baskı molekülü olarak kullanılan Tel'in MIP'ten uzaklaştırılması amacıyla ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol:asetik asit (MeOH:AA) (9:1) kullanıldı. 90.0 mL metanol (MeOH) ve 10.0 mL asetik asit (AA) çözeltisi 100 mL'lik balon jojede karıştırıldıktan sonra +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.3.3. Yükleme Çözücüsünün Hazırlanması

Telmisartan stok çözeltisinden 200 µL alınıp 5.0 mL'ye asetonitril ile tamamlandı. Sulu ortam yükleme çözeltisi için stok çözeltiden aynı miktar alınıp 5 mL'ye su ile tamamlandı. Çözeltinin pH'ı 1.0 M sodyum hidroksit (NaOH) kullanılarak 7.4'e ayarlandı.

3.3.4. İdrar Numunesi Hazırlama İşlemi

Telmisartan kullanmayan sağlıklı bir gönüllüden alınan idrar numunesi 30 dakika 2500 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası vakum ile süzme sistemi kullanılarak 15 mmHg basınç altında süzüldü. Süzüntüler deneylerde kullanılmak üzere 1.0 M NaOH kullanılarak pH=7.4'e pH metre ile ayarlandı.

3.3.5. Kalibrasyon için Standartların Hazırlanması

0.25 mg/mL Tel stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0 µg/mL derişimlerde standartlar ACN ile 5.0 mL'ye seyreltilerek hazırlandı (λ_{Uyarma} : 290 nm $\lambda_{Emisyon}$: 368 nm, slit aralıkları: 5 nm.).

0.25 mg/mL Tel stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0 µg/mL derişimlerde standartlar DCE ile 5.0 mL'ye seyreltilerek hazırlandı (λ_{Uyarma} : 287 nm $\lambda_{Emisyon}$: 335 nm, slit aralıkları: 5 nm.).

0.25 mg/mL Tel stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 µg/mL derişimlerde standartlar Chl ile 5.0 mL'ye seyreltilerek hazırlandı (λ_{Uyarma} : 295 nm, λ_{Emisyon} : 372 nm, slit aralıkları: 5 nm).

0.25 mg/mL Tel stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0 µg/mL derişimlerde standartlar Tol ile 5.0 mL'ye seyreltilerek hazırlandı (λ_{Uyarma} : 298 nm, λ_{Emisyon} : 360 nm, slit aralıkları: 10 nm).

0.25 mg/mL Tel stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 µg/mL derişimlerde standartlar MeOH:AA (9:1) ile 5.0 mL'ye seyreltilerek hazırlandı (λ_{Uyarma} : 396 nm, λ_{Emisyon} : 362 nm, slit aralıkları: 5 nm).

0.25 mg/mL Tel stok çözeltisinden mikropipet ile belli miktarlarda alınıp 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0 µg/mL derişimlerde standartlar su (pH=3.5, 5.0, 7.4, 8.5) ile 5.0 mL'ye seyreltilerek hazırlandı (λ_{Uyarma} : 309 nm, λ_{Emisyon} : 380 nm, slit aralıkları: 5 nm).

3.4. Telmisartan Baskılanmış Polimer Sentezi

21 µL dimetilaminoetil metakrilat ve 30 mg Tel 1.0 mL kloroformun bulunduğu borsilika cam tüp içine sırasıyla eklendi. Tüp içerisindeki karışım çözüldükten sonra, 15 dakika boyunca buz kalıplarının arasında bekletildi. Ön polimerizasyon işleminden sonra 240.5 µL etilen glikol dimetakrilat eklenip 5 dakika buz kalıplar arasında bekletildikten sonra 5.0 mg azobisizobütironitril başlatıcısı eklenip buz kalıpları arasında 300 watt UV lamba ($\lambda=365$ nm) ile UV polimerizasyonuna tabii tutuldu.

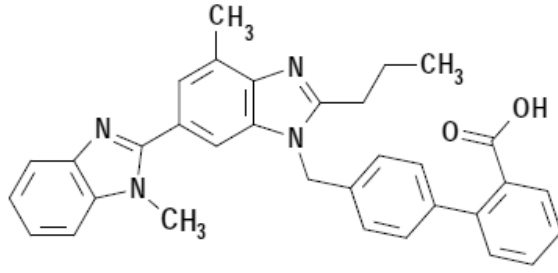
Polimerizasyon işlemi 5 saat boyunca devam etti. Baskılanmamış polimerler (NIP), aynı şartlar altında sadece kalıp molekül olarak kullanılan telmisartan yokluğunda hazırlandı.

Oluşan polimerler havanda tamamen toz haline gelene kadar ezildi, partikül boyutu 20-63 µm aralığında olacak şekilde elekler kullanılarak ıslak eleme metodu ile elendi.

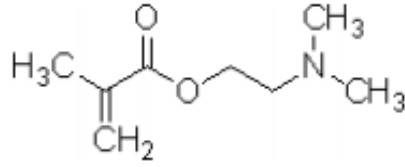
Telmisartan baskılanmış polimerden kalıp molekülü telmisartanı uzaklaştırmak için Soxhlet ekstraksiyon sistemi kullanıldı. Ekstraksiyon, 3 saat aralıklarla spektrofotometre ile ekstraksiyon çözücüsünde telmisartan sinyali kaybolana kadar toplamda 48 saat boyunca sürdürüldü. Ekstraksiyon işlemi, metanol:asetik asit (MeOH:AA) (9:1) çözücüsü ile gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonunda elde edilen baskılanmış polimerler 2 saat süre ile 50°C'de inkübatör içinde kurutuldu. Aynı işlemler NIP için de uygulandı.

Tablo 2. Baskılanmış polimer bileşenleri ve miktarları.

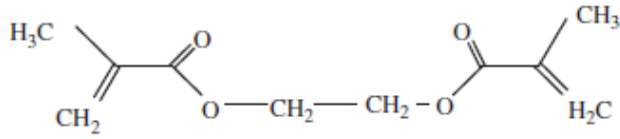
Kalıp Molekülü	Fonksiyonel Monomer	Çapraz Bağlayıcı	Başlatıcı	Porojen
Telmisartan (Tel)	2-(dimetilamino)etil metakrilat (DMAEMA)	Etilenglikol dimetakrilat (EGDMA)	Azobisisobütiro nitril (AIBN)	Kloroform (Chl)
0.063 mmol	0.186 mmol	1.27 mmol	5.0 mg	1.0 mL



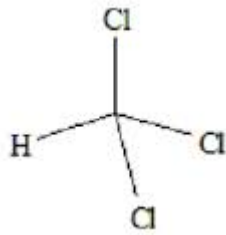
Şekil 4. Telmisartan (Analit) kimyasal yapısı.



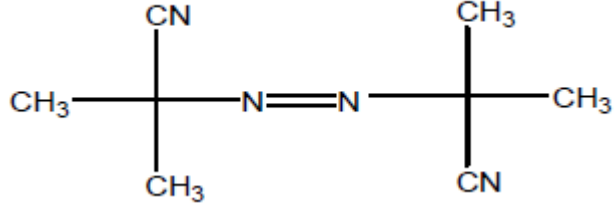
Şekil 5. DMAEMA (Monomer) kimyasal yapısı.



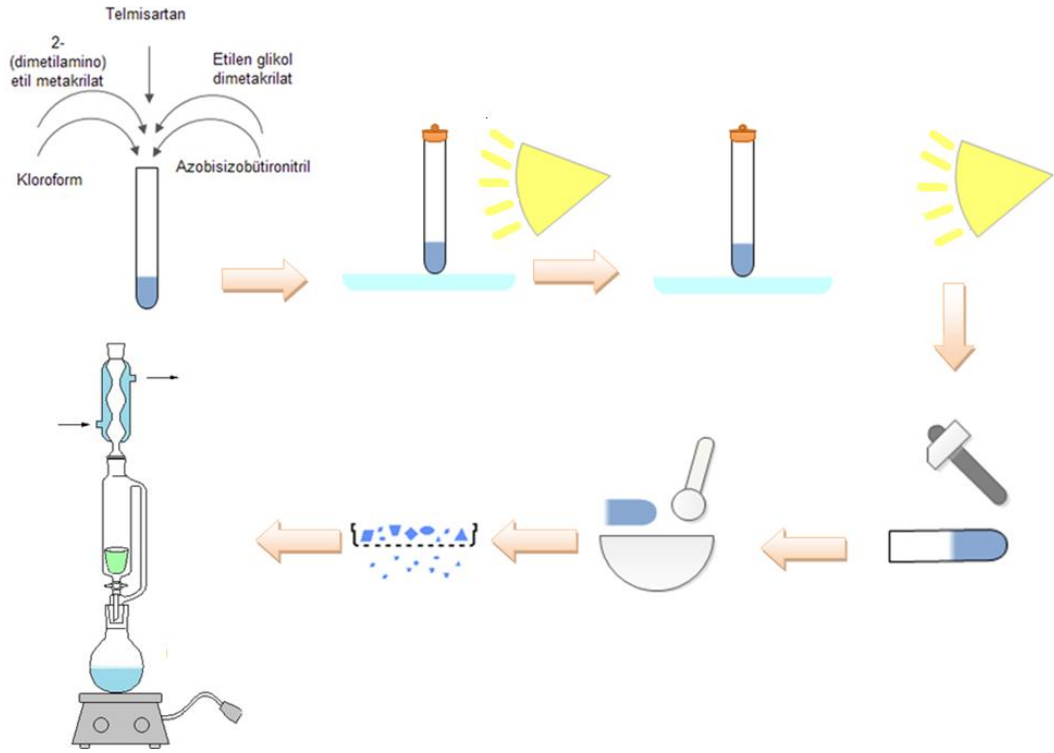
Şekil 6. EGDMA (Çapraz Bağlayıcı) kimyasal yapısı.



Şekil 7. CHI (Porojen) kimyasal yapısı.



Şekil 8. AIBN (Başlatıcı) kimyasal yapısı.



Şekil 9. Moleküler baskılanmış polimerin sentez aşamaları.

3.4.1. Telmisartan Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış Polimer (NIP) Sentez Parametreleri

İlk olarak sentez sıcaklığının Tel baskılanmasına olan etkisini belirlemek amacıyla MIP ve NIP hem oda sıcaklığında hem de buz kalıplarının arasında UV lamba ($\lambda = 365 \text{ nm}$) kullanılarak sentezlendi. Sorbent hazırlanırken çapraz bağlayıcı 1.27 mmol, monomer 0.186 mmol, porojen olarak 1.0 mL Chl ve Tel miktarı 0.063 mmol olarak seçildi. Sentez sıcaklığının etkisini tespit etmek amacıyla MISPE-spektroflorimetrik yöntem kullanılarak geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında, ACN (2 x 0.5 mL); yükleme basamağında, ACN içerisinde hazırlanan 10 $\mu\text{g/mL}$ Tel çözeltisi (4 x 0.5 mL); yıkama basamağında, ACN (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı.

Çapraz bağlayıcı miktarının, sorbentin Tel'i tutma üzerindeki eğilimi MISPE-Spektroflorimetrik yöntem kullanılarak incelendi. MIP ve NIP, sırasıyla 0.98; 1.17; 1.27; 1.37; 1.47 mmol miktarlarda çapraz bağlayıcı kullanılarak sentezlendi. Sentez yapılırken monomer 0.186 mmol, porojen olarak 1.0 mL Chl ve 0.063 mmol Tel kullanıldı. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu ve yukarıda bahsedilen SPE basamakları uygulanarak geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi.

Monomer miktarının etkisi sırasıyla 0.062; 0.124; 0.155; 0.186 mmol monomer kullanılarak çalışıldı. Sentez yapılırken çapraz bağlayıcı 1.27 mmol, porojen olarak 1.0 mL Chl ve Tel miktarı 0.063 mmol sabit tutuldu.

Porojen hacminin etkisi sırasıyla 0.5; 1.0; 1.5 mL hacimlerde ChI kullanılarak incelendi. Sentez yapılırken çapraz bağlayıcı 1.27 mmol, monomer 0.186 mmol ve Tel miktarı 0.063 mmol olarak seçildi.

Tel miktarının, sorbentin geri kazanımına olan etkisi 0.034; 0.048; 0.063 mmol Tel kullanılarak incelendi. Sentez yapılırken çapraz bağlayıcı 1.27 mmol, monomer 0.186 mmol ve porojen olarak 1.0 mL ChI olarak seçildi.

3.5. Karakterizasyon Çalışması

Hazırlanan sorbentin çeşitli ortamlardaki şişme davranışını incelemek amacıyla şişme deneyleri yapıldı. MIP ve NIP'nin şişme davranışı, deiyonize su ve çeşitli organik çözücüler kullanılarak incelendi. Şişme çalışmaları SPE kartuşu içinde gerçekleştirildi. Bu işlemde, öncelikle 50 mg kuru MIP/NIP, boş kartuş ve fritler tartıldı sonrasında sorbentler kartuşlara dolduruldu. Deiyonize su, ChI, ACN, Tol ve DCE çözücüleri kullanılarak şişme davranışları incelendi. Sorbent sabit tartıma gelene kadar her 60 dakikada bir ölçümler alındı. Şişme deneyleri 9 saat boyunca devam ettirildi. Sulu ve organik çözücülerin bulunduğu ortamlardaki şişme yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

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

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

H_{kuru} : Kuru polimerin ağırlığı.

3.6. Beç (İnkübasyon) Çalışmaları

Beç çalışmalarında, MIP ve NIP'in Tel bağlama yüzdelerinin bulunmasında bağlanma öncesi ve bağlanma sonrasında ortamdaki Tel derişimleri spektrofiorimetre ile ölçümler yapılarak belirlendi ve buradan da Eşitlik 3.2 kullanılarak % bağlanma değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ Bağlanma} = \frac{(C_0 - C_e) (V)}{C_0 V} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

C_0 : Analitin başlangıç derişimi, $\mu\text{g/mL}$

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

V : Analit çözeltisinin hacmi, mL

Benzer temele dayanarak sorbentin baskılama faktörü (IF) bulundu. IF, MIP'e bağlanan Tel miktarının, NIP'e bağlanan Tel miktarına oranı olarak Eşitlik 3.3'de gösterilen formül yardımıyla hesaplandı.

$$IF = \frac{W_{MIP}}{W_{NIP}} \quad (\text{Eşitlik 3.3})$$

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

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

Beç çalışmalarında ilk olarak, yükleme çözücüsünün, sorbentin Tel bağlamasına olan etkisi incelendi. Bu amaçla, DCE, ACN,

Chl ve Tol çözücülerinde hazırlanan, 5.0 µg/mL derişime sahip Tel çözeltilerinden 5.0'er mL alınarak her birinin içerisinde 20.0 mg sorbent eklendi. Karışımlar manyetik karıştırıcıda 90 dakika boyunca karıştırıldı. Deney sonunda karışım 30 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi. Sıvı faz katı fazdan ayrılarak, spektrofloretride floresans sinyali ölçüldü ve buradan da kalibrasyon eğrisinden ortamda kalan Tel derişimi tespit edildi. Benzer yaklaşımla, başlangıçta bağlanma ortamında bulunan Tel miktarı da yine spektrofloretride floresans sinyali ölçülerek tespit edildi. Bu değerler Eşitlik 3.2' de yerine konarak % bağlanma değerleri hesaplandı.

Maksimum bağlanmaya ne kadar süre sonra ulaşılacağını incelemek için bağlanma süresi çalışmaları yapıldı. 4.0 mL 5.0 µg/mL Tel çözeltilisine 20.0 mg sorbent (MIP ve NIP) eklendi. İnkübasyon çalışmaları, sırasıyla 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 ve 180 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi.

Sorbent miktarının Tel bağlama yüzdesine olan etkisini incelemek için farklı miktarlarda sorbent kullanıldı. Her bir deneyde, 4.0 mL 5.0 µg/mL Tel çözeltilisine sırasıyla 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40 mg MIP ve NIP eklendi. Deney 90 dakika boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde sürdürüldü.

Tel derişiminin, sorbentin Tel bağlama kapasitesine olan etkisini incelemek amacıyla 20.0 mg sorbent, 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 50 µg/mL derişimlerinde Tel çözeltilerine eklendi. İnkübasyon 90 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda sürdürüldü.

3.7. Adsorpsiyon İzotermi

Tel'in sorbent'e bağlanma eğilimini karakterize etmek amacıyla Langmuir ve Freundlich modelleri kullanılarak adsorpsiyon izotermi çizildi.

Langmuir izotermi⁶⁸ için Eşitlik 3.4' kullanıldı.

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{bQ_0} + \frac{1}{Q_0} C_e \quad (\text{Eşitlik 3.4})$$

F Freundlich izotermi⁶⁹ için aşağıdaki Eşitlik 3.5 kullanıldı.

$$\text{Log } Q_e = \text{Log } K_F + (1/n) \text{Log } C_e \quad (\text{Eşitlik 3.5})$$

C_e : Tel'in dengedeki derişimi (mg/L)

Q_e : Sorbente bağlanan Tel miktarı (mg/g)

Q_0 : Adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)

b : Langmuir sabiti (L/mg)

K_F : Freundlich izoterm sabiti

n : Freundlich izoterm üstel sabiti

3.8. MISPE Çalışmaları

MISPE çalışmalarında çalışma koşullarının optimize edilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapıldı ve yapılan bu çalışmalar aşağıda sunuldu.

Yükleme çözücüsünün Tel geri kazanımına etkisi yükleme çözücüleri ACN ve Tol kullanılarak çalışıldı. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında, yükleme çözelti solvanı kullanıldı (2 x 0.5 mL), yükleme basamağında sırasıyla 10 µg/mL Tel çözeltisi ACN çözücüsü içinde ve Tol çözücüsü içinde (4 x 0.5 mL), yıkama basamağında ACN (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı.

Tel derişiminin geri kazanıma olan etkisi, yükleme çözeltisi olarak 5, 10 ve 20 µg/mL Tel çözeltileri kullanılarak incelendi. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında ACN (2 x 0.5 mL), yükleme basamağında 5, 10, 20 µg/mL Tel çözeltisi ACN çözücüsü içinde (4 x 0.5 mL), yıkama basamağında ACN (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı.

Yıkama çözücüsünün sorbentin geri kazanımına olan etkisi yıkama çözücüsü olarak ACN ve Tol kullanılarak incelendi. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında ACN (2 x 0.5 mL), yükleme basamağında 10 µg/mL Tel çözeltisi, ACN çözücüsü içinde, (4 x 0.5 mL), yıkama basamağında sırasıyla ACN ve Tol (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı.

Yıkama çözücüsünün hacminin sorbentin geri kazanımına olan etkisi 1.0; 2.0; 3.0 ve 4.0 mL ACN kullanılarak incelendi. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında ACN (2 x 0.5 mL), yükleme basamağında 10 µg/mL Tel çözeltisi ACN çözücüsü 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 MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı.

Elüsyon çözücüsünün hacminin sorbentin geri kazanımına olan etkisi sırasıyla 2.0; 3.0; 4.0 ve 5.0 mL MeOH:AA (9:1) kullanılarak incelendi. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında, ACN (2 x 0.5 mL), yükleme basamağında 10 µg/mL Tel çözeltisi, ACN çözücüsü içinde (4 x 0.5 mL), yıkama basamağında, ACN (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (4 x 0.5 mL), (6 x 0.5 mL), (8 x 0.5 mL) ve (10 x 0.5 mL) kullanıldı.

Yükleme süresinin sorbentin geri kazanımına olan etkisini incelemek amacıyla iki farklı çalışma yapıldı. Birinci çalışmada, Tel çözeltisi kartuşa yüklendikten sonra hemen yıkama basamağına geçildi. İkinci çalışmada ise yükleme yapıldıktan sonra 3 dakika beklendi ve sonra yıkama aşamasına geçildi. Bu çalışmalarda, SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında ACN (2 x 0.5 mL), yükleme basamağında 10 µg/mL Tel çözeltisi ACN çözücüsü içinde (4 x 0.5 mL), yıkama basamağında ACN (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı.

Sorbentin farklı pH değerlerindeki geri kazanım çalışmaları için yükleme çözeltisi sırasıyla pH 3.5; 5.0; 7.4 ve 8.5 değerlerinde hazırlandı. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında çeşitli pH değerlerine ayarlanmış deiyonize su (2 x 0.5 mL),

yükleme basamağında 10 µg/mL Tel'in çeşitli pH değerlerinde hazırlanmış çözeltisi (4 x 0.5 mL), yıkama basamağında ACN (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı.

Sorbent miktarının optimize edilmesi amacıyla, 1.5 mL'lik SPE kartuşlara sırasıyla 25, 50, 75 mg MIP ve NIP dolduruldu ve ekstraksiyon çalışmasından sonra geri kazanım değerleri tespit edildi.

3.9. Değişik Ortamlardan Tel'in Uzaklaştırılması ve Spektroflorimetrik Yöntemle Tayini

İlk olarak sulu ortamda geri kazanım çalışması MISPE-spektroflorimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında pH 7.4'e ayarlanmış deiyonize su (2 x 0.5 mL), yükleme basamağında 5, 10 ve 20 µg/mL Tel çözeltisi pH 7.4'e ayarlanmış deiyonize su içinde (4 x 0.5 mL), yıkama basamağında ACN (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı. İşlem MIP ve NIP için 3 defa tekrarlandı. Her bir deney için ortalama geri kazanım yüzdesi ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı. Ortalama değer ve bağıl standart sapma değerleri aşağıdaki Eşitlik 3.6 ve Eşitlik 3.7 yardımıyla hesaplandı.

$$\% \text{RSD} = \frac{\text{SD}}{X_{\text{ort}}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.6})$$

$$X_{\text{ort}} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} \quad (\text{Eşitlik 3.7})$$

Organik ortamdaki geri kazanım çalışması MISPE-spektroflorimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında ACN (2 x 0.5 mL), yükleme basamağında 5, 10 ve 20 µg/mL Tel çözeltisi ACN içinde (4 x 0.5 mL), yıkama basamağında ACN (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı. İşlem MIP ve NIP için 3 defa tekrarlandı. Her bir deney için ortalama geri kazanım yüzdesi ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı.

İdrar numunesinden geri kazanım çalışmaları MISPE-spektroflorimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. SPE kartuşlarına 50 mg kuru sorbent dolduruldu. Şartlandırma basamağında idrar (2 x 0.5 mL), yükleme basamağında 5, 10 ve 20 µg/mL Tel çözeltisi idrar içinde (4 x 0.5 mL), yıkama basamağında ACN (6 x 0.5 mL) ve elüsyon basamağında MeOH:AA (9:1) (8 x 0.5 mL) kullanıldı. İşlem MIP ve NIP için 3 defa tekrarlandı. Her bir deney için geri kazanım miktarları matriks uyumlu kalibrasyon eğrileri kullanılarak floresans şiddetleri ölçülerek tespit edildi. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası çalışmalar yapılarak tespit edildi.

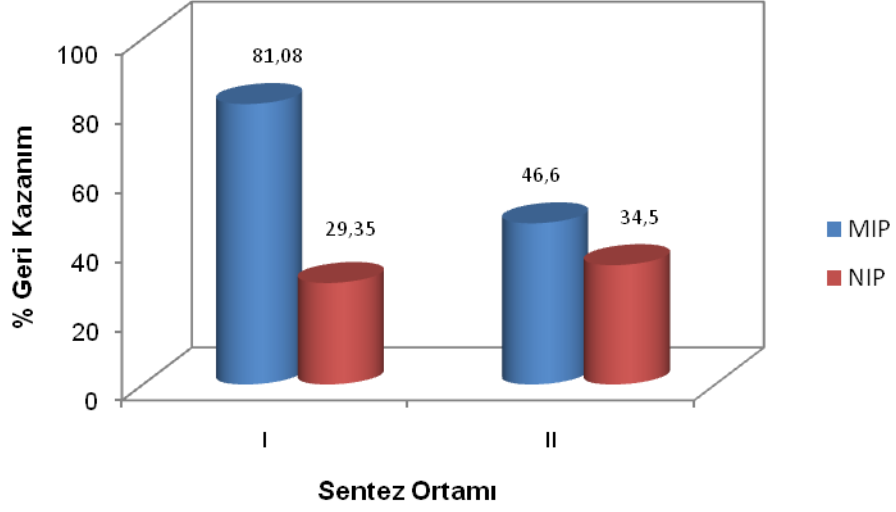
4. BULGULAR

Tez çalışmasında ilk olarak sorbentin sentez ortamının sıcaklığı belirlendi. Daha sonra sentez bileşenleri olan çapraz bağlayıcı, fonksiyonel monomer, kalıp molekül ve porojen miktarlarının optimizasyonları yapıldı. Tel'in bağlanma yüzdesini incelemek için Beç çalışmaları uygulandı. Bu çalışmalardaki bağlanma yüzdelerini iyileştirmek için çeşitli optimizasyonlar yapıldı. Bu optimizasyonlar sırasıyla, inkübasyon çözücüsü, bağlanma süresi, inkübasyonda kullanılacak polimer miktarı ve Tel çözelti derişimidir. MISPE tekniği kullanılarak yapılan geri kazanım çalışmaları ise yükleme derişimi ve hacmi, yıkama ortamı ve hacmi, elüsyon hacmi, kartuşa doldurulacak sorbent miktarı ve yükleme işlemi sırasında bekleme süresi gibi parametreler optimize edildi. Son olarak geliştirilen yöntem idrar numunesine uygulandı ve sorbentin analitik performansı incelendi.

4.1. MISPE Sorbentinin Sentez Koşullarının Optimizasyonu

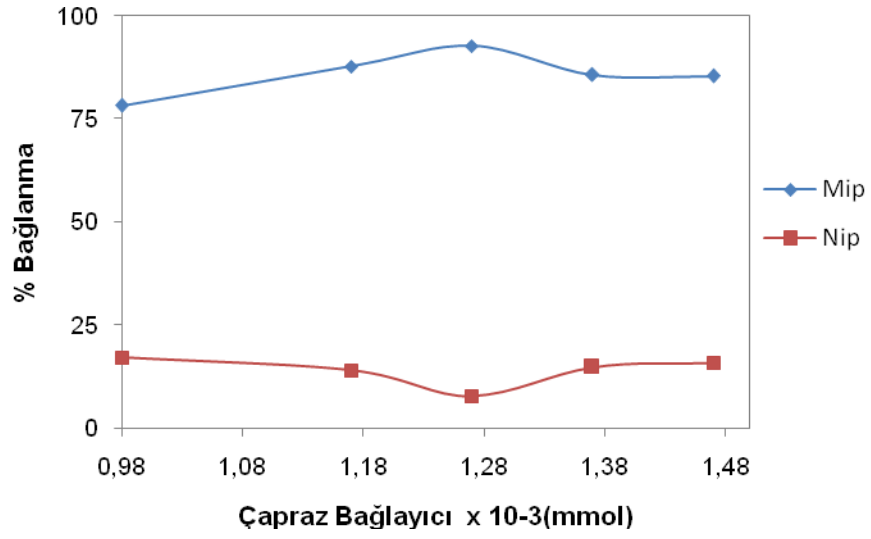
Bu kısımda hazırlanan MIP/NIP'nin sentez sıcaklığı, çapraz bağlayıcı, fonksiyonel monomer, porojen ve telmisartan miktarları incelendi. Bu parametrelerin sorbentin Tel bağlamasına olan etkisi ile ilgili deneysel sonuçlar sunulmaktadır.

Sentez sıcaklığının sorbente olan etkisini incelemek için MIP ve NIP UV lamba altında (365 nm) hem oda sıcaklığında hem de buz kalıplarının arasında altında sentezlendi. Şekil 10'da gösterildiği gibi I numaralı çalışma buzlu ortamda, II numaralı çalışma ise oda sıcaklığında sentezlenen sorbentlerden sağlanan geri kazanım yüzdelerini göstermektedir.



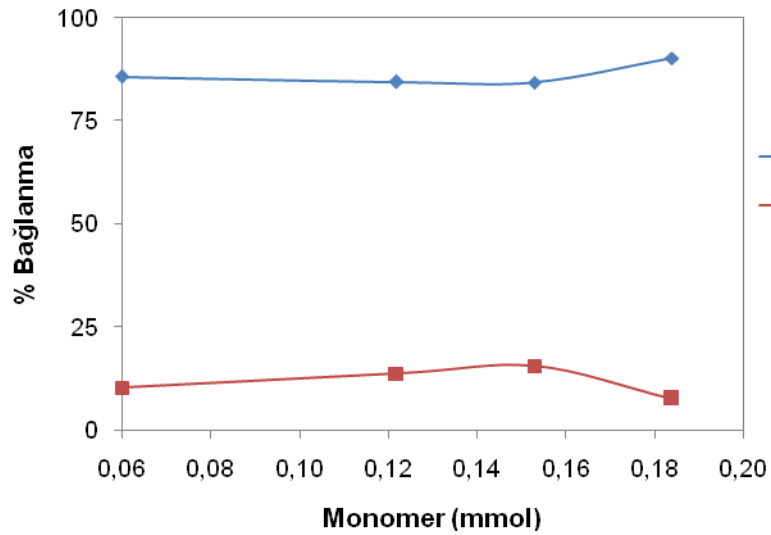
Şekil 10. Sentez ortamının sıcaklığının etkisi (I: Buz kalıpları arasında, II: Oda sıcaklığında).

Çapraz bağlayıcının, sorbentin Tel bağlamasına olan etkisi araştırıldı. Çapraz bağlayıcı miktarı olarak sırasıyla 0.98; 1.17; 1.27; 1.37; 1.47 mmol kullanılarak hazırlanan sorbentler incelendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 11'de gösterildi.



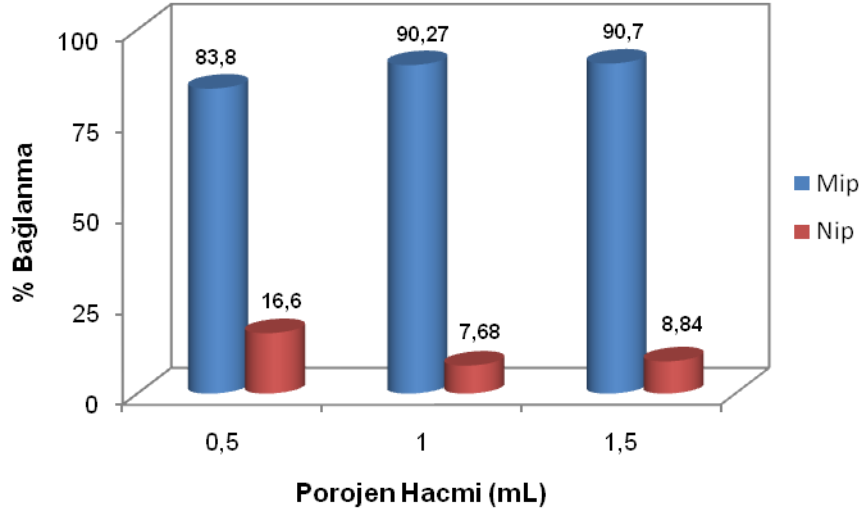
Şekil 11. Çapraz bağlayıcı miktarının MIP ve NIP'nin Tel geri kazanım yüzdesine etkisi.

Monomer miktarının Tel geri kazanımına olan etkisi 0.062; 0.124; 0.155; 0.186 mmol monomer kullanılarak hazırlanan sorbentler ile araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 12'de gösterildi.



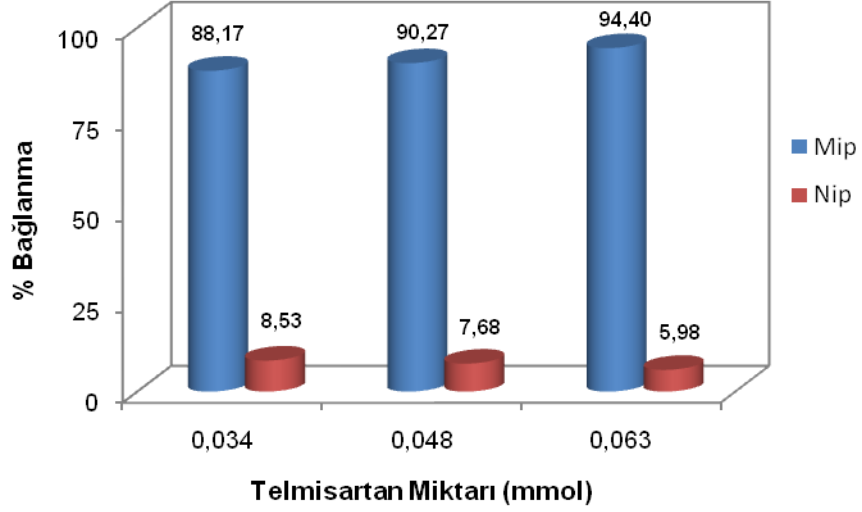
Şekil 12. Monomer miktarının MIP ve NIP'nin tel geri kazanım yüzdesine etkisi.

Sorbentin Tel bağlama yeteneğinin porojen miktarı ile değişimini incelemek amacıyla sentez aşamasında sırasıyla 0.5; 1.0 ve 1.5 mL Chl kullanıldı. Elde edilen bağlanma yüzdeleri Şekil 13'te gösterildi.



Şekil 13. Porojen hacminin MIP ve NIP'nin Tel geri kazanım yüzdesine etkisi.

Polimerizasyon anında kalıp molekül olarak kullanılan Tel derişiminin, sorbentin bağlama kapasitesine olan etkisi, 0.034; 0.048; 0.063 mmol Tel kullanılarak incelendi. Deneysel sonuçlar Şekil 14'te gösterildi.

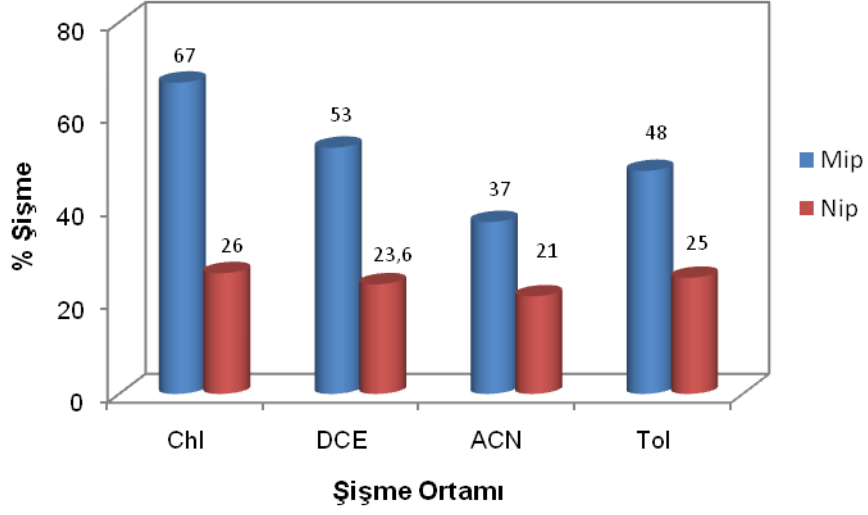


Şekil 14. Tel miktarının MIP ve NIP'nin tel geri kazanım yüzdesine etkisi.

4.2. Karakterizasyon Çalışması

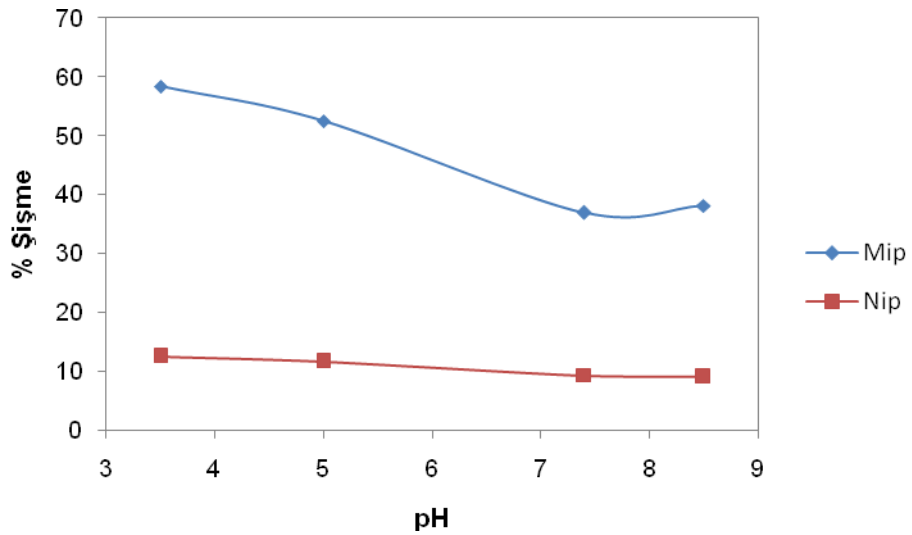
Sorbenti karakterize etmek için şişme çalışmaları farklı ortamlarda MIP ve NIP'e uygulandı.

İlk olarak sorbentin organik ortamdaki %şişme değerleri ChI, DCE, ACN ve Tol kullanılarak incelendi. Bu çalışma MIP ve NIP için ayrı ayrı yapıldı. Sorbentin % şişme değerleri Şekil 15'te verildi.



Şekil 15. Sorbentin değişik organik çözücülerdeki şişme davranışı.

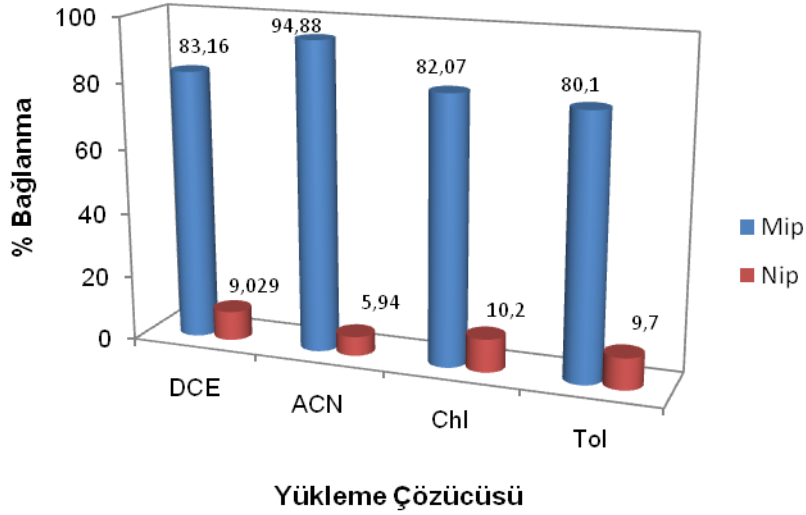
Daha sonra sulu ortamda bulunan sorbentin şişme davranışı, pH 3.5; 5.0; 7.4 ve 8.5 değerleri kullanılarak incelendi. Sorbentin % şişme değerleri Şekil 16'da verildi.



Şekil 16. Sorbentin değişik pH değerlerindeki şişme davranışı.

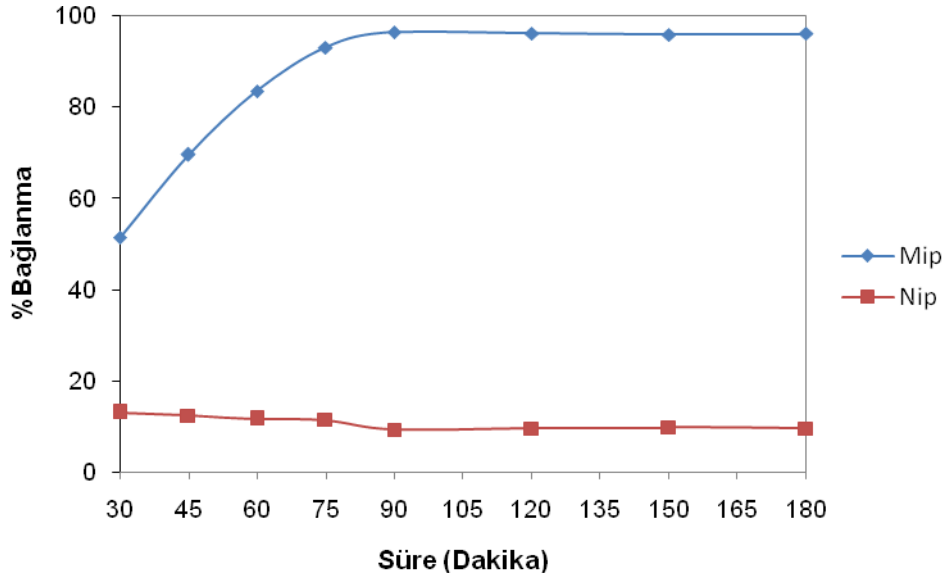
4.3. Beç Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

Beç çalışmalarında, bağlanma ortamında kullanılan çözücü türünün, sorbentin Tel bağlamasına olan etkisi incelendi. Bu nedenle DCE, ACN, Chl ve Tol gibi farklı çözücüler kullanıldı. Sonuçlar, Şekil 17’de gösterildi. (Tel çözelti derişimi 5 µg/mL; sorbent miktarı, 20 mg ve inkübasyon süresi, 90 dakika).



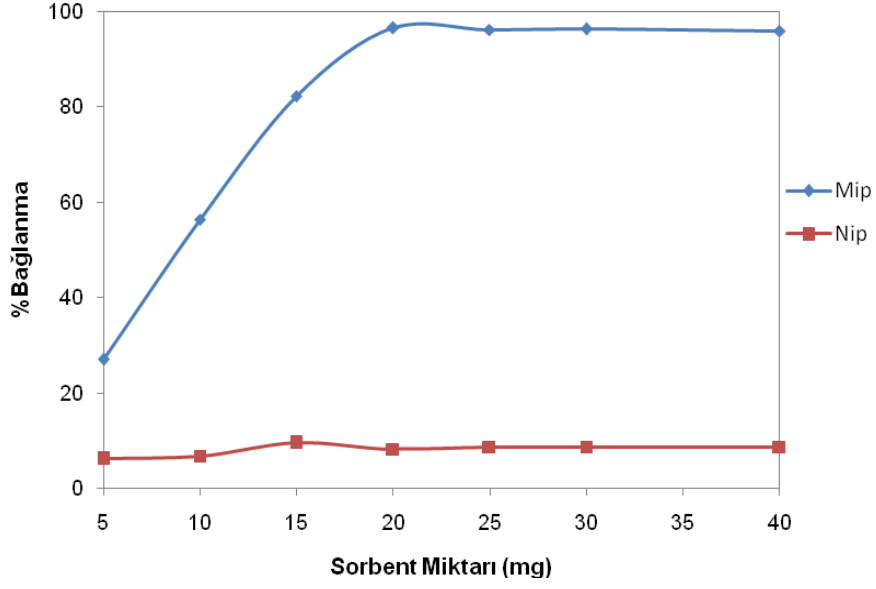
Şekil 17. İnkübasyon ortamının MIP ve NIP'nin Tel bağlama üzerindeki etkisi.

Maksimum bağlanmaya ne zaman ulaşılacağını tespit etmek için inkübasyon farklı süreler kullanılarak (30, 45, 60, 75, 90, 120,150 ve 180 dakika) incelendi. Sonuçlar Şekil 18’de gösterildi (Tel çözelti derişimi, 5 µg/mL; sorbent miktarı, 20 mg).



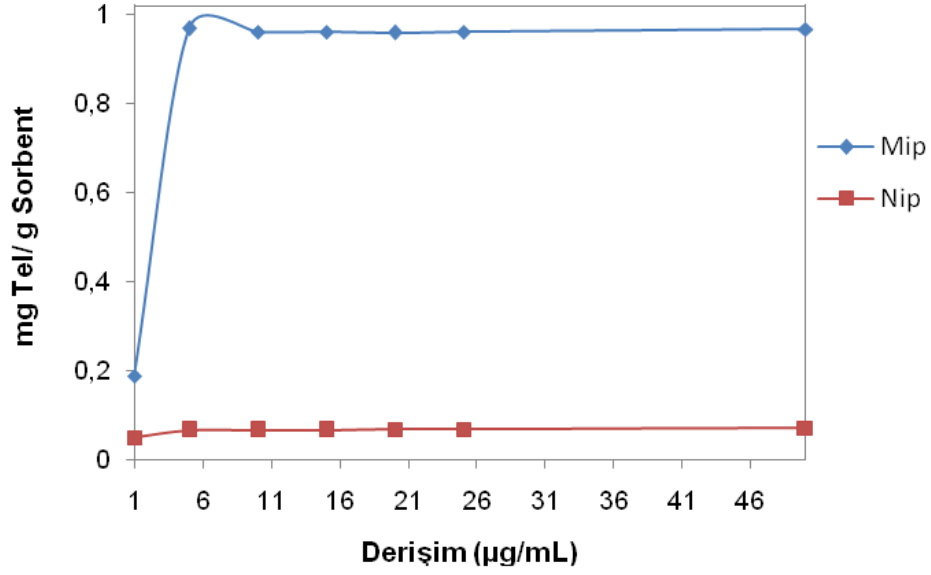
Şekil 18. İnkübasyon süresinin bağlanma yüzdesine etkisi.

Sorbent miktarının bağlanma yüzdesine olan etkisi farklı miktarlarda sorbent kullanılarak incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 19'da gösterildi. (İnkübasyon ortamı ACN, analit çözelti derişimi 5 µg/mL ve inkübasyon süresi 90 dakika olarak seçildi.).



Şekil 19. Sorbent miktarının Tel bağlamaya etkisi.

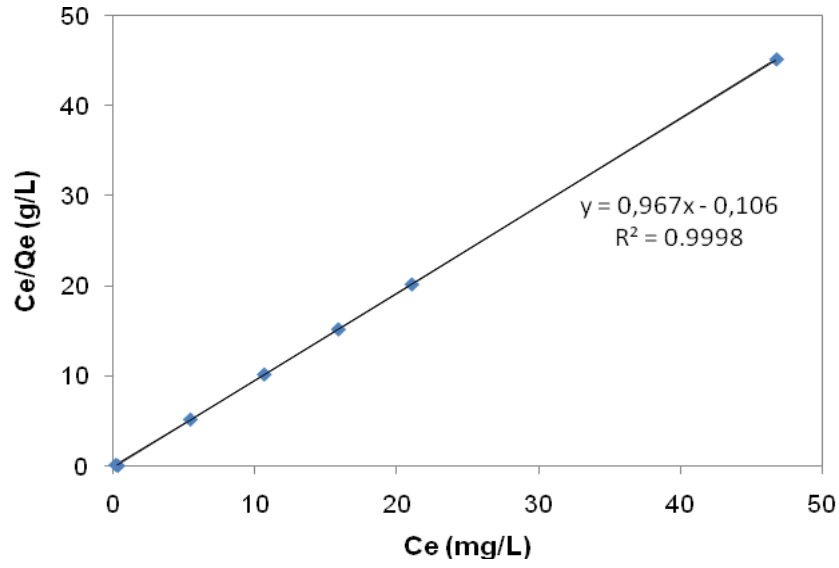
İnkübasyon ortamındaki Tel derişiminin, sorbentin bağlama kapasitesi üzerindeki etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 20'de gösterildi (İnkübasyon ortamı ACN, sorbent miktarı 20 mg ve inkübasyon süresi 90 dakika olarak seçildi.).



Şekil 20. Telmisartan derişiminin sorbentin bağlama kapasitesine olan etkisi.

4.4. Adsorpsiyon İzotermi

Tel moleküllerinin sorbent ile etkileşiminin karakterini belirlemek amacı ile adsorpsiyon izotermi kullanıldı ve analitin sorbent üzerinde denge koşullarında seçici bağlanma yeteneği belirlendi. Bunları gözlemlemek için Langmuir ve Freundlich modelleri kullanıldı. Sonuçlar sırasıyla Şekil 21 ve Tablo 3 'de gösterildi.



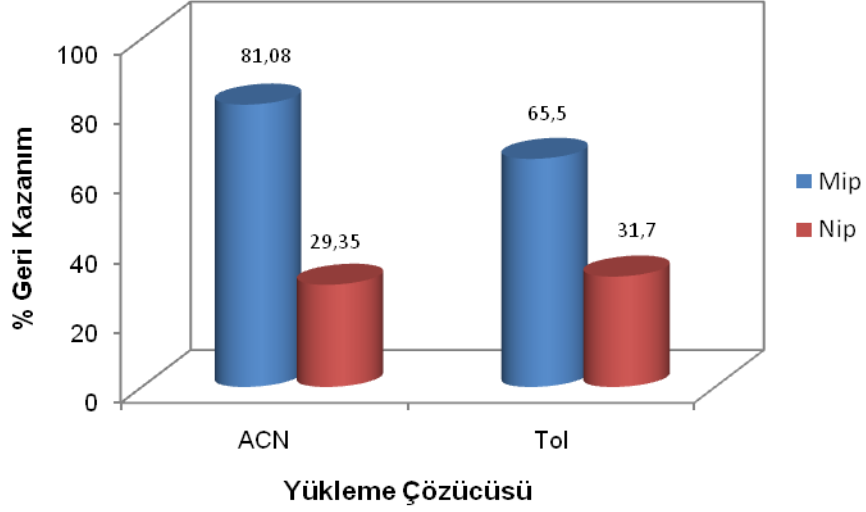
Şekil 21. Tel için Langmuir adsorpsiyon modeli kalibrasyonu.

Tablo 3. MIP'nin Tel adsorpsiyonu için Parametreler.

Langmuir İzotermi			Fruendlich İzotermi		
Q ₀	b (L/mg)	R ²	K _F (L/mg) ^{1/n}	n	R ²
1.034	9.123	0.9998	1.0842	5.95	0.4960

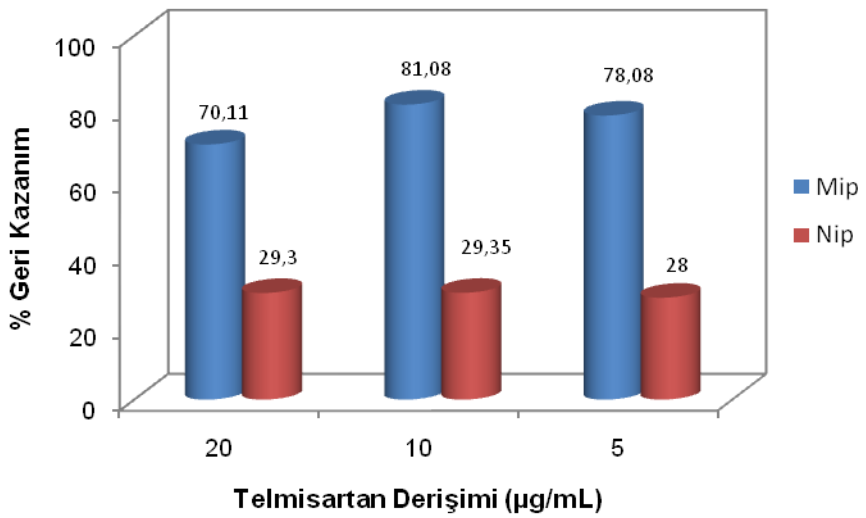
4.5. MISPE Koşullarının Optimizasyonu

Yükleme çözücüsü türünün sorbentin Tel bağlaması üzerindeki etkisi farklı çözücüler kullanılarak çalışıldı. Bu etki asetonitril ve toluen kullanılarak incelendi. Sonuçlar Şekil 22'de gösterildi.



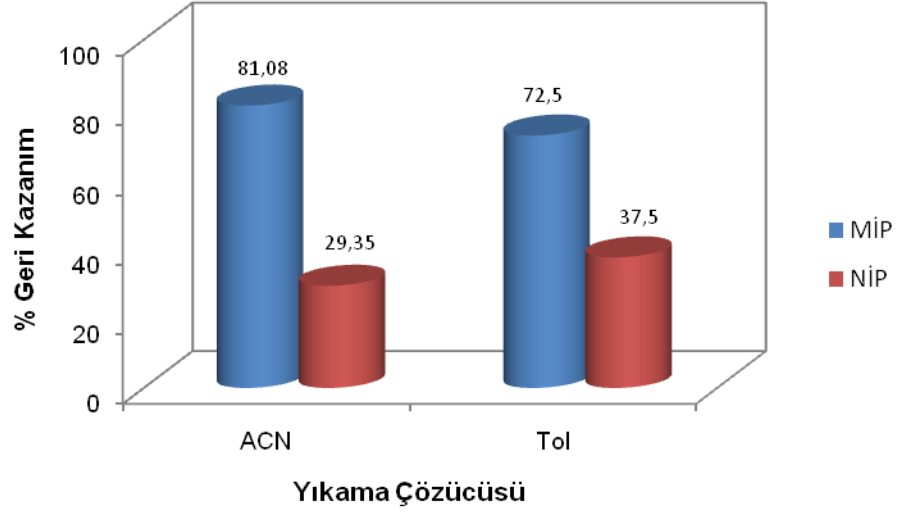
Şekil 22. Yükleme çözücüsünün sorbentin Tel bağlamasına etkisi. (Yıkama: ACN)

MISPE çalışmalarında yükleme basamağında Tel derişimin etkisini gözlemek için artan konsantrasyonlarda yüklemeler yapıp sorbentin geri kazanım yüzdesine etkisi incelendi. Bulunan sonuçlar Şekil 23'te gösterildi.



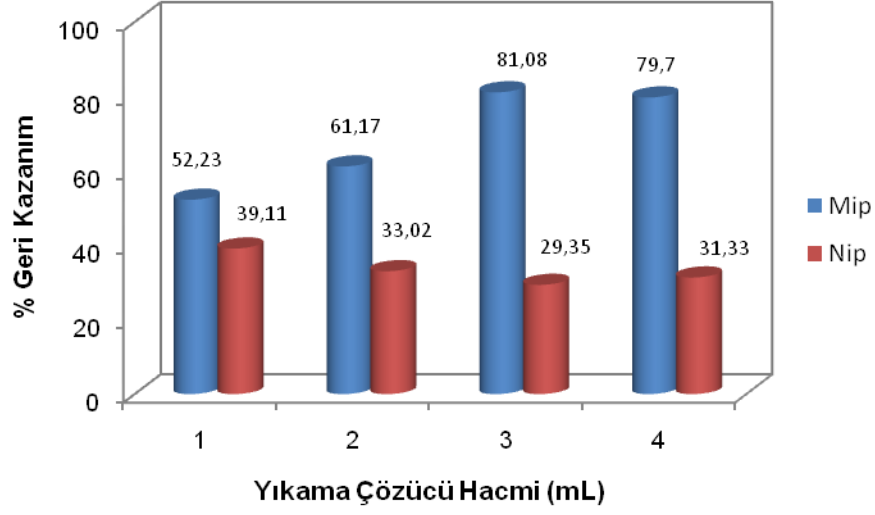
Şekil 23. Tel derişiminin geri kazanım yüzdesine olan etkisi.

Yıkama çözücüsünün sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 24'te verildi.



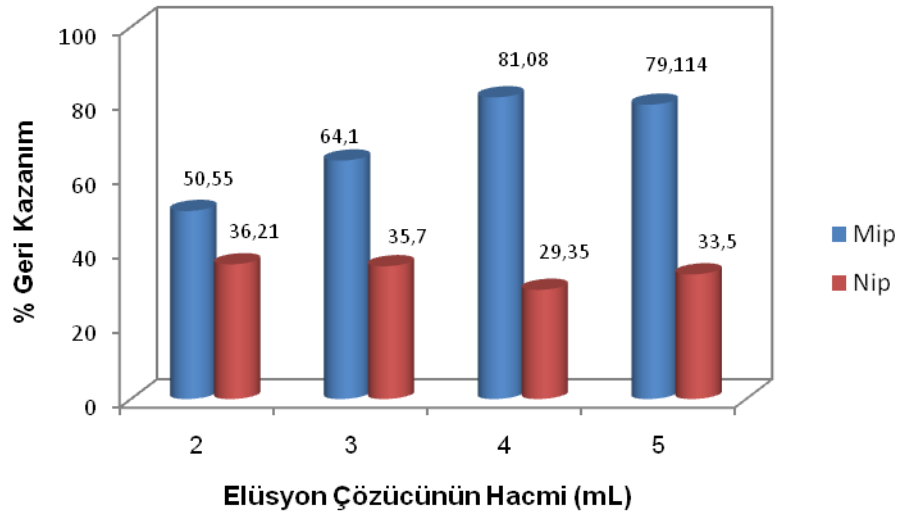
Şekil 24. Yıkama çözücüsünün sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi.

En uygun yıkama çözücüsü ACN olarak tespit edildiğinden, ACN hacminin tel geri kazanım yüzdesine olan etkisi de incelendi. Sonuçlar Şekil 25'te gösterildi.



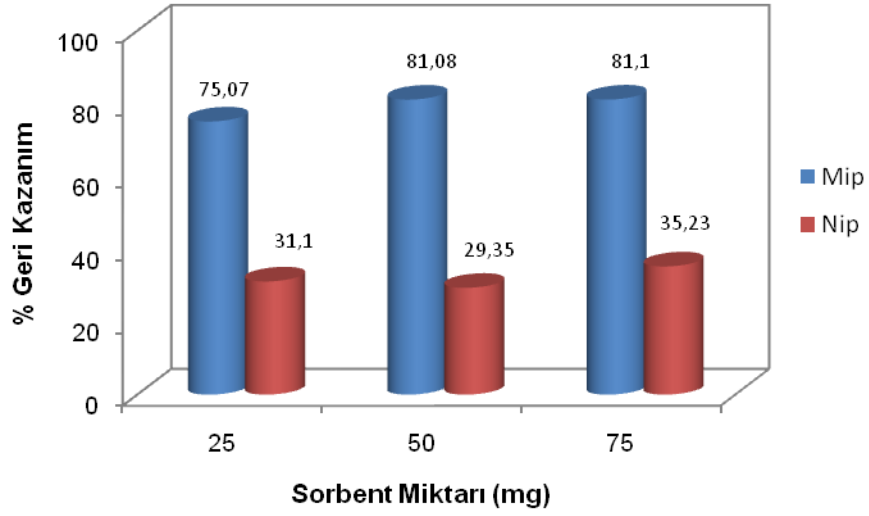
Şekil 25. Yıkama çözücüsü hacminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi (10 µg/mL Tel).

Elüsyon çözücüsünün hacminin sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 26'da gösterildi.



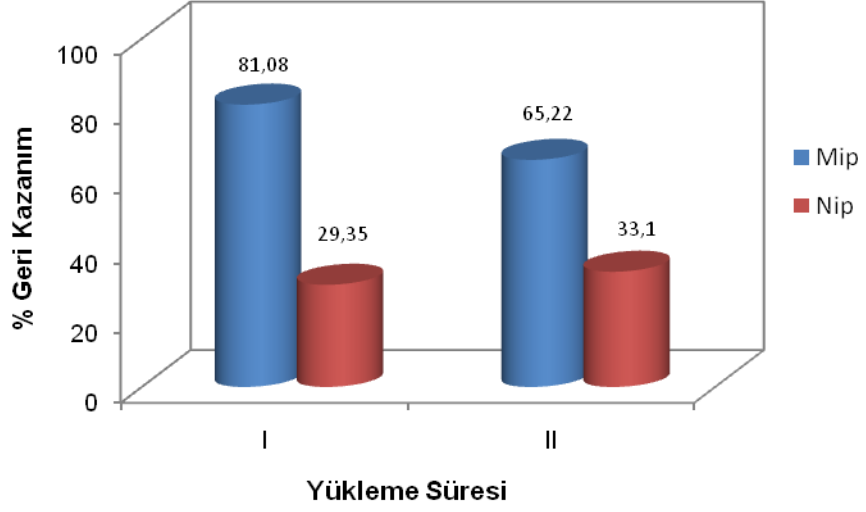
Şekil 26. Elüsyon çözücüsünün hacminin Sorbentin geri kazanım yüzdesine olan etkisi.

SPE kartuşlarına eklenen sorbent miktarının MIP ve NIP'nin geri kazanım yüzdesine olan etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 27'de gösterildi.

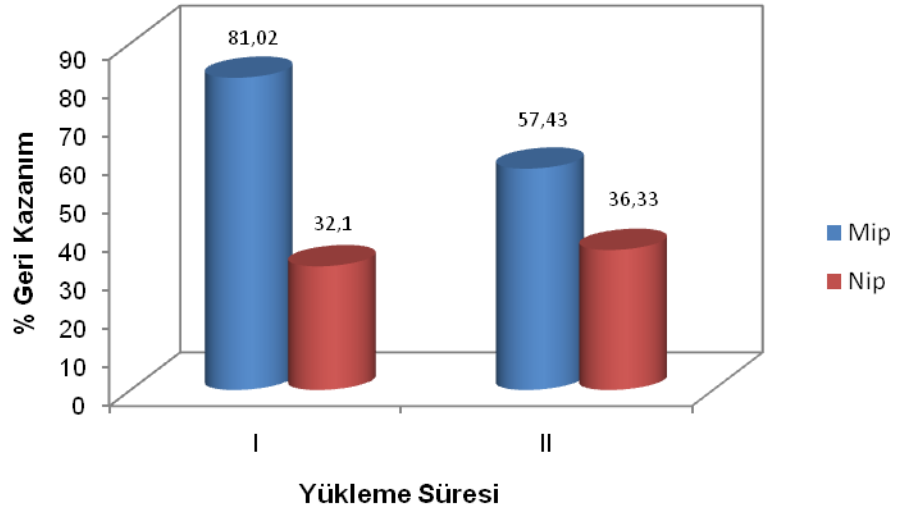


Şekil 27. Sorbent miktarının Tel Bağlanmasına Etkisi.

Sorbentin Tel çözeltisi ile etkileşiminin incelenmesi amacıyla, Tel sisteme yüklendiğinde işlem 3 dakika bekleme yapılarak ve hiç bekleme yapılmadan hem organik hem sulu ortamda çalışmalar yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 28'de ve Şekil 29'da gösterildi.

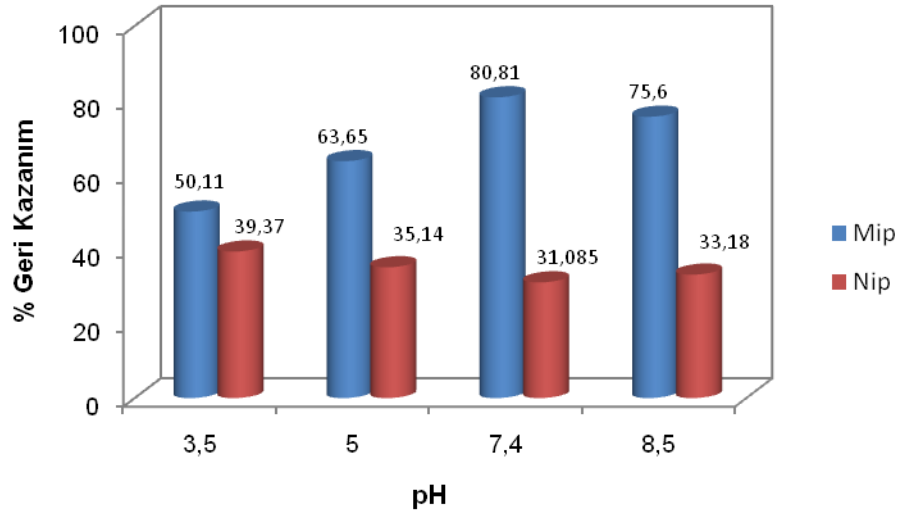


Şekil 28. Yükleme süresinin sorbentin bağlama yeteneğine etkisi. (Yükleme: ACN, I: Üç dakika bekleme yapıldı, II: Bekleme yapılmadı).



Şekil 29. Yükleme süresinin sorbentin bağlama yeteneğine etkisi. (Yükleme: pH 7.4, I: Üç dakika bekleme yapıldı, II: bekleme yapılmadı).

Sorbentin Tel bağlama yeteneğinin farklı pH'lardaki davranışı incelendi. Bu parametrenin incelenmesi için yükleme ortamının pH değerleri sırasıyla 3.5; 5.0; 7.4 ve 8.5'e ayarlandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 30'da gösterildi.



Şekil 30. Sorbentin farklı pH'lardaki Tel bağlama davranışı.

4.6. Değişik Ortamlardan Tel uzaklaştırılması ve Spektroflorimetrik Yöntemle Tayini

Sulu numunelerde en uygun pH 7.4 seçildikten sonra sorbente değişik derişimlerde (5, 10, 20 µg/mL) Tel eklenerek geri kazanım değerleri tespit edildi. Sonuçlar Tablo 4 'de gösterildi.

Tablo 4. Sulu örneklerden Telmisartan geri kazanım çalışması (n=3).

Eklenen Tel Derişimi ($\mu\text{g/mL}$)	% Geri Kazanım \pm RSD (%)	
	MIP	NIP
5.0	71.05 \pm 2.09	33.45 \pm 3.93
10.0	80.81 \pm 1.25	31.08 \pm 4.99
20.0	63.44 \pm 1.98	35.80 \pm 2.95

ACN'li ortamda sorbente değişik derişimlerde (5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$) Tel eklenerek geri kazanım değerleri tespit edildi. Sonuçlar Tablo 5'de gösterildi.

Tablo 5. ACN'li ortamlardan Telmisartan geri kazanım çalışması (n=3).

Eklenen Tel Derişimi ($\mu\text{g/mL}$)	% Geri Kazanım \pm RSD (%)	
	MIP	NIP
5.0	76.72 \pm 1.96	29.33 \pm 5.20
10.0	80.38 \pm 1.31	30.33 \pm 5.03
20.0	69.20 \pm 5.25	30.61 \pm 3.83

Sorbentin idrar numunesinden Tel bağlama eğilimi için çalışmalar yapıldı. Bunun için farklı derişimlerde Tel zeltisi hazırlandı, idrar numunesi üzerine eklendi ve geri kazanım miktarları hesaplandı. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası çalışmalar yapılarak tespit edildi. Sonuçlar Tablo 6'da ve Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 6. İdrar numunesi ile hazırlanan (matriks uyumlu) kalibrasyon çalışması.

Lineer Aralık ($\mu\text{g/mL}$)	Eğim	Kesim Noktası	R^2	LOD ^a ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g/mL}$)
0.1-0.8	1175	14.8	0.9930	0.0282	0.0854

$$a=(3.3 \times \text{SD})/m$$

$$b=(10 \times \text{SD})/m$$

Tablo 7. Gün İçi ve günler arası çalışmalar.

Eklenen Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Gün İçi (n=4)	Günler Arası (n=4)
	% RSD	% RSD
0.1	8.18	17.78
0.4	5.07	4.09
0.6	2.75	2.53

İdrar örneklerinden Tel geri kazanım çalışmaları sonuçları Tablo 8’de verildi.

Tablo 8. İdrar örneklerinden Telmisartan geri kazanım çalışması (n=4).

Eklenen Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	% Geri Kazanım \pm RSD (%)	
	MIP	NIP
5.0	62.27 \pm 2.49	40.73 \pm 17.46
10.0	76.60 \pm 1.46	32.76 \pm 2.95
15.0	74.06 \pm 1.51	33.47 \pm 9.69
20.0	68.65 \pm 5.97	46.67 \pm 3.27

5. TARTIŞMA

Bu kısımda bulgular bölümünde sunulan deneysel veriler değerlendirildi.

5.1. MIP/NIP Sentez ve Karakterizasyon Çalışmaları

Polimer sentez ortamı sıcaklığı, hem buz kalıplarının arasında olarak hem de oda sıcaklığında incelendi. Şekil 10'da oda sıcaklığında yapılan sentezle elde edilen geri kazanım değerleri sırasıyla %46.6 (MIP) ve %34.5 (NIP); buz kalıplarının arasında gerçekleştirilen polimerizasyon sonucu elde edilen geri kazanım değerleri ise sırasıyla %81.08 (MIP) ve %29.35 (NIP) olarak bulundu. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi, buzlu ortamda sentezlenen MIP için elde edilen geri kazanım değeri oda sıcaklığında sentezlenene göre oldukça yüksek bir değerdedir. Ayrıca buzlu ortamda sentezlenen NIP ile elde edilen geri kazanım değeri de daha düşüktür. Bu nedenlerden dolayı, bütün çalışmalarda polimerizasyon buz kalıplarıyla soğutulan ortamda sentezlenerek gerçekleştirildi.

Polimerin sentez sıcaklığı belirlendikten sonra optimizasyon çalışmalarına polimerizasyon bileşenleriyle devam edildi. İlk olarak çapraz bağlayıcı miktarının geri kazanıma olan etkisi incelendi. Sırasıyla 0.98; 1.17; 1.27; 1.37; 1.47 mmol çapraz bağlayıcı kullanılarak hazırlanan MIP ve NIP ile çalışıldı. Elde edilen % bağlanma değerleri Şekil 11'de verildi. Şekilde de görüldüğü gibi en yüksek bağlanma yüzdesine (MIP için) 1.27 mmol EGDMA kullanıldığında ulaşılmaktadır. Buna göre, MIP ile elde edilen bağlanma miktarı %92.79 iken, NIP ile elde edilen değer ise %7.84 olduğu gözlemlendi.

Sentezlenen sorbent için optimum EGDMA miktarı tespit edildikten sonra da fonksiyonel monomer miktarının optimize edilmesi için çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalarda da sırası ile 0.062; 0.124; 0.155; 0.186 mmol monomer kullanılarak sorbentler sentezlendi ve elde edilen bağlanma değerleri Şekil 12’de verildi. MIP için en yüksek ve NIP için en düşük bağlanma yüzdeleri sırasıyla %90.27, %7.68 olarak, 0.186 mmol DMAEMA monomeri kullanıldığında ulaşıldığı tespit edildi.

Polimerizasyon aşamasında, önemli parametrelerinden biri olan porojen miktarı incelendi. Sentez aşamasında sırasıyla 0.5; 1.0; 1.5 mL CHl kullanılarak sorbentler sentezlendi. Şekil 13’te belirlenen sonuçlara göre 1.0 mL ve 1.5 mL porojen kullanıldığında elde edilen sonuçların birbirine oldukça yakın olduğu tespit edildi. Fakat daha az çözücü kullanılmasından dolayı uygun porojen miktarı olarak 1.0 mL seçildi.

Polimerizasyon sentez parametrelerinden sonucusu olan kalıp molekül miktarı incelendi. Sonuçlar Şekil 14’te görüldüğü gibi MIP’nin en yüksek ve NIP’nin ise en düşük bağlanma yüzdesine ulaştığı değer 0.063 mmol Tel kullanılarak hazırlanan sorbentte olduğu görüldü ve bu nedenle en uygun kalıp molekül miktarı 0.063 mmol olarak seçildi.

Sorbent sentez koşullarının optimizasyonundan sonra sorbentin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla, sorbentin farklı pH’larda ve organik ortamdaki farklı çözücülerdeki şişme davranışı incelendi. Sorbentlerin organik ortamdaki şişme davranışları için CHl, DCE, Tol ve ACN sırası ile çalışıldı. Şekil 15’te en az şişmenin ACN içinde, en fazla şişmenin ise CHl çözücüsünün bulunduğu ortamda olduğu tespit edildi. Ayrıca, bütün çözücülerde NIP yaklaşık olarak aynı % şişme değerine sahip olduğu da gözlenmektedir. Elde edilen bu sonuç, baskılanmış bölgelerin şeklinin ve büyüklüğünün Tel bağlanma

çalışmalarında en az ACN'li ortamlarda değişeceğinin de bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Sulu ortamda ise, farklı pH'larda çalışmalar yapıldı. Şekil 16'da gösterildiği gibi en fazla şişmenin pH 3.5'te, en az şişmenin ise pH 7.4'te gerçekleştiği tespit edildi. pH değerindeki yükselme ile birlikte şişme değerinin de azaldığı gözlemlendi. Bu sonuç, bazik özelliğe sahip olan DMAEMA monomerinin asidik pH değerlerinde daha fazla iyonlaşmasından dolayı şişme değerinin de bazik ortama göre daha fazla olmasının doğal bir sonucu olduğu belirlendi.

5.2. Tel Bağlanma Çalışmaları

Beç çalışmalarında bağlanmanın çözücünün türüne göre değişimi incelendi. Bunun için farklı çözücüler kullanıldı ve sonuçlar Şekil 17'deki gibi bulundu. MIP için en yüksek, NIP için ise en düşük bağlanma yüzdeleri ACN'li yükleme ortamında sırasıyla %94.88 ve %5.94 olarak bulundu. MIP'nin Tel bağlama oranının NIP'e göre oldukça yüksek olması baskılamanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin açık bir göstergesi olduğu sonucuna varıldı. Moleküler baskılamanın başarısının bir göstergesi olan baskılama faktörünün de 15.94 gibi oldukça yüksek bir değere ulaşması da bu sonucu doğrulamaktadır. Çalışılan bu dört farklı çözücü arasında en yüksek Tel bağlanmasının ACN'li ortamda olmasının en önemli nedenlerinden birisi de MIP ve NIP'in Bölüm 5.1'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 oranda azalmasına neden olmaktadır.

Sorbentin Tel bağlama eğiliminin dengeye ulaştığı süreyi belirlemek amacıyla yapılan çalışmanın sonucuna göre MIP'e Tel

bağlanma eğiliminin 90. dakikada maksimuma ulaştığı ve bu değerden sonra % Tel bağlanma değerinin sabit kaldığı Şekil 18'de görülmektedir. Doksanıncı dakikada MIP için %96.43 ve NIP için de %9.31 bağlanma oranlarına ulaşıldı. Doksanıncı dakikadan sonra % bağlanmanın sabit bir şekilde devam etmesi basılanmış boşlukların tamamen Tel tarafından doldurulduğu şeklinde yorumlandı.

Bir diğer optimizasyon parametresi olarak sorbent miktarının Tel'in ortamdan uzaklaştırılmasına etkisi incelendi. Şekil 19'da da görüleceği gibi sorbent miktarı arttırıldıkça MIP' e bağlanan Tel miktarı da hızla artıp en yüksek bağlanma oranına 20 mg MIP kullanıldığında ulaşıldı. Bu sonuçlara göre, 20 mg sorbent miktarından sonra Tel bağlanmasında anlamlı bir değişim görülmediğinden optimum sorbent miktarı 20 mg olarak belirlendi.

İnkübasyon ortamındaki Tel derişiminin MIP ve NIP'in Tel bağlama kapasitesine etkisi incelendi. Şekil 20'de verilen deney sonuçlarına göre, en yüksek bağlama kapasitesine 0.968 (mg Tel/g sorbent) 5.0 µg/mL Tel derişiminde ulaşıldı. Bu değerden sonra Tel derişiminin arttırılmasıyla sorbentin Tel bağlama kapasitesinde önemli bir değişimin olmadığı gözlemlendi.

Adsorpsiyon izotermi, sentezlenen MIP sorbentinin Tel adsorpsiyon davranışını değerlendirmek amacıyla kullanıldı. MIP'in Tel bağlama eğilimi Langmuir ve Freundlich modelleri kullanılarak incelendi ve her iki modele ait adsorpsiyon parametreleri deneysel olarak bulunarak Tablo 3'de verildi. Elde edilen regresyon katsayıları değerlendirildiğinde Langmuir modeli kullanılarak elde edilen sonuçların daha lineer olduğu ($R^2= 0.9998$) gözlemlendi. Freundlich modeli uygulandığında elde edilen regresyon katsayısının değerinin 0.4960 olduğu görüldü. Elde edilen bu

değerler bize, sorbentin Tel adsorpsiyon davranışının Langmuir modeline daha uygun olduğunu gösterdi. Buradan da, Tel moleküllerinin homojen bir biçimde MIP yüzeyini kapladığında bağlanma işleminin dengeye ulaştığı sonucuna varılabilmektedir. Tablo 3’de de görüldüğü gibi, maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1.034 mg Tel/g sorbent olarak ve Langmuir sabiti ise 9.123 L/mg olarak hesapladı.

5.3. MISPE Çalışmaları

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

Yükleme çözücüsü türünün sorbentin Tel bağlaması üzerindeki etkisi ACN ve Tol kullanılarak incelendi. Yükleme çözücüsünün belirlenmesi için yıkama işlemi ACN ile yapıldı ve yükleme çözücüsünün performansı değerlendirildi. Şekil 22’de geri kazanım değerleri sırasıyla MIP ve NIP için %81.08 ve %29.35 olarak hesaplandı. NIP’nin düşük ve MIP’nin ise yüksek geri kazanım yüzdeleri göz önüne alındığında en uygun yükleme çözücüsünün ACN olduğu sonucuna varıldı.

Yükleme basamağında Tel derişimin geri kazanıma etkisini gözlemek için artan derişimlerde yüklemeler yapıldı ve elde edilen sonuçlar Şekil 23’te gösterildi. Bu verilere göre 10.0 µg/mL Tel yükleme derişimi kullanılarak yapılan çalışmada seçici (MIP) ve seçici olmayan (NIP) geri kazanım sonuçları sırasıyla %81.08 ve %29.35 bulundu. Diğer derişim değerlerinde elde edilen geri kazanım sonuçlarının MIP için daha düşük NIP için ise daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Yıkama çözücüsü türünün sorbentin Tel bağlama eğilimi üzerindeki etkisi incelendi. Şekil 24'te belirtilen, yüklemenin ACN ile yapıldığı ortamda MIP ve NIP için geri kazanım yüzdeleri sırasıyla %81.08 ve %29.35 olarak hesaplandı. MIP'nin yüksek NIP'nin düşük geri kazanım yüzdeleri ve aralarındaki farkın yüksek olması nedeniyle yıkama çözücüsü ACN olarak seçildi.

Yıkama çözücüsü ACN olarak belirlendikten sonra yıkama hacminin sorbentin Tel bağlama eğilimi üzerindeki etkisi incelendi. Şekil 25'te görüldüğü gibi, 3.0 mL ve 4.0 mL çözücü kullanılarak elde edilen sonuçların birbirlerine oldukça yakın olduğu bulundu. Yıkama çözücüsünün hacmi 3.0 mL olarak kullanıldığında, MIP ve NIP'nin geri kazanım yüzdeleri sırasıyla %81.08 ve %29.35 olduğu gözlemlendi. Ancak 4.0 mL çözücü kullanıldığında seçici olmayan bağlanmadaki artışından dolayı en uygun yıkama hacmi 3.0 mL olarak belirlendi.

Elüsyon çözücüsü hacminin geri kazanım yüzdesine olan etkisini incelendi ve Şekil 26'da sonuçlar verildi. MIP'nin en yüksek NIP'nin en düşük geri kazanıma sahip olduğu ve aradaki farkın yüksekliğinden dolayı 4.0 mL'lik elüsyon hacmi, en uygun hacim olarak seçildi. Elüsyon hacmi olarak 4.0 mL kullanıldığında, MIP ve NIP için geri kazanımlar sırasıyla %81.08 ve %29.35 olarak hesaplandı. Bu hacimde MIP için en yüksek geri kazanım değerine ulaşıldı.

Kartuşlardaki sorbent miktarının Tel geri kazanımına olan etkisi incelendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 27'de verildi. Bu sonuçlara göre, en iyi geri kazanım değerlerine 50 ve 75 mg sorbent kullanılarak ulaşıldı. MIP'in her iki durumda da sağladığı geri kazanım değerleri birbirine oldukça yakın olmasına rağmen en düşük geri kazanım 50 mg NIP kullanıldığında elde edildi. Bu nedenle, spesifik olmayan bağlanmanın

daha düşük düzeyde olduğu (50 mg için %29.35, 75 mg için % 35.23) miktar seçildi. Karşılık gelen MIP için geri kazanım değerinin ise %81.08 gibi yüksek bir değer olduğu tespit edildi.

Yükleme süresinin geri kazanıma olan etkisi hem ACN hem de pH 7.4 ortamlarında incelendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 28 ve Şekil 29'da sunuldu. Yüklemeden sonra 3 dakika bekleyerek elde edilen geri kazanım değerlerinin hem sulu hem de ACN'li ortamlarda daha yüksek olduğu bulundu. 3 dakika bekledikten sonra yıkama aşamasına geçildiği durumda sorbent ile Tel'in bir biri ile etkileştikleri süre arttığı için daha fazla miktarda Tel sorbente bağlandı. Direkt yıkama basamağına geçilen durumda ise Tel sorbente bağlanmak için yeterli zamanı bulamadığı gözlemlendi.

MISPE metodunda geri kazanıma etki eden diğer bir parametre olan ortam pH'sının etkisi incelendi ve elde edilen sonuçlar. Şekil 30'da gösterildi. Buradan da görülebileceği gibi en yüksek geri kazanım değerine pH 7.4'de ulaşıldı. Bu değerden daha düşük pH değerlerinde sorbent'in şişme değerlerinin daha yüksek olmasından dolayı Tel baskılanmış bölgelerde daha zayıf bir kuvvetle tutulduğu için yıkama aşamasında kolaylıkla sorbenti terk etti ve bu davranış daha düşük geri kazanımla sonuçlandı.

5.4. Değişik Ortamlardan Tel Uzaklaştırılması ve Spektroflorimetrik Yöntemle Tayini

Sulu örneklerde geri kazanım çalışmaları 5.0, 10.0 ve 20.0 µg/mL Tel çözeltisinin MISPE yöntemi ile kartuşlara uygulanmasıyla gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Tablo 4'de verildi. MIP için en

yüksek geri kazanım değerine (%80.81±1.25), 10.0 µg/mL derişiminde Tel kullanıldığında ulaşıldı. Bu derişime karşılık gelen NIP ile elde edilen geri kazanım değerinin ise % 31.08±4.99 olduğu belirlendi. MIP için elde edilen bu oldukça yüksek geri kazanım değeri ve NIP için elde edilen düşük geri kazanım değeri, Tel baskılamasının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Ayrıca, MISPE deney koşullarının da başarılı bir şekilde optimize edildiği sonucuna varılabilir. Diğer taraftan, elde edilen düşük bağıl standart sapma değerleri geri kazanım çalışmalarının tekrarlanabilirliğinin yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir. Sulu ortamlardan hedef moleküllerin uzaklaştırılmalarında moleküler baskılama tekniğinin önemli zorlukları olduğu bilindiğinden elde edilen bu sonuçların oldukça tatminkâr düzeyde olduğu söylenebilir.

Sulu ortamda yapılan MISPE çalışmalarının benzeri ACN'li ortamda gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Tablo 5'de sunuldu. 10.0 µg/mL Tel derişiminde Tel yüklemesi yapıldığında en yüksek geri kazanım değerine ulaşıldığı görülmektedir. Geliştirilen MISPE-spektroflorimetrik yöntemin organik ortamlardaki geri kazanım sonuçlarının ve tekrarlanabilirlik düzeyinin oldukça yüksek olduğu sonucuna varılabilir.

Geliştirilen MISPE-spektroflorimetrik yöntem sağlıklı bir gönüllüden temin edilen idrar örneklerinden Tel'in uzaklaştırılması için uygulandı ve yöntem ile elde edilen analitik parametreler Tablo 6'da sunuldu. Matris-uyumlu kalibrasyonla elde edilen yüksek korelasyon katsayısı ($R^2=0.9930$) geliştirilen yöntemin doğrusallığını göstermektedir. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla 0.0282 ve 0.0854 µg/mL dir. Bu değerler yöntemin teşhis ve tayin sınırlarının idrar numunelerinden düşük derişimlerdeki Tel'in tayininin mümkün olduğunu göstermektedir.

İdrar örneklerindeki çalışmaların tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası çalışmalar yapılarak araştırıldı ve elde edilen deneysel sonuçlar Tablo 7'de verildi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışılan üç farklı derişim için (0.1-0.6 µg/mL arasında) bulunan düşük bağıl standart sapma değerleri nedeni ile geliştirilen yöntemin hem gün içi hem de günler arası kesinliğinin oldukça yüksek olduğu söylenebilir.

Sağlıklı bir gönüllüden elde edilen idrar örneklerine Tel eklenerek MISPE-spektroflorimetrik yöntemle geri-kazanım çalışmaları gerçekleştirildi ve sonuçlar Tablo 8'de verildi. MIP için elde edilen geri kazanım değerlerinin % 62.27-76.60 arasında değiştiği bulunmuştur. NIP kullanılarak elde edilen % geri kazanım değerleri ise % 32.76-46.67 arasında değişmektedir. MIP ile elde edilen geri kazanım değerlerinin NIP ile elde edilenlere göre yüksek düzeylerde olması Tel'in başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir. İdrar içerisinde yoğun bir şekilde girişime neden olan bileşenler bulunmasına rağmen Tel tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Bu da Tel baskılanmış sorbentin idrar örneğinden Tel'i seçici bir şekilde tuttuğunu ve analizi girişim yapan bileşenlere rağmen mümkün kıldığını göstermektedir.

6. SONUÇ

Sorbent olarak Tel baskılanmış polimer ve kontrol sorbenti olarak seçici olmayan bağlanmayı tespit etmek için baskılanmamış polimer sentezlendi. Deneysel ölçümler telmisartanın floresans özelliğinden yararlanarak spektrofotometre ile yapıldı. Sorbentin performansının geliştirilmesi için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Öncelikle polimerizasyonun sentez sıcaklığı belirlendi. Buz kalıplarının arasında UV lamba ile elde edilen polimerin daha sağlam yapıda Tel baskı bölgelere sahip olduğu deneysel sonuçlar ile görüldü. Daha sonra polimerizasyon basamağındaki bileşenlere uygulanan optimizasyon çalışmalarında monomer miktarının 0.186 mmol, çapraz bağlayıcı miktarının 1.27 mmol, porojen miktarının 1.0 mL ve Tel miktarının 0.063 mmol olduğu deneysel olarak belirlendi. En uygun polimer bileşen miktarları tespit edildikten sonra, MIP ve NIP'nin analiti tutma yetenekleri beç çalışmaları ile bulundu. Beç çalışmalarının yürütüleceği ortamın ACN, inkübasyon süresinin 90 dakika, inkübasyon ortamına eklenecek polimer miktarının 20 mg olduğu deneysel olarak tespit edildi. MISPE yönteminde geri kazanım yüzdelerini iyileştirmek amacıyla optimizasyon çalışmaları uygulandı. Farklı hacimlerde çözücüler kullanılarak sorbent üzerinde denemeler yapıldı. Bu denemelerin sonuçlarına göre, yükleme çözücüsü olarak 2.0 mL ve yıkama çözücüsü olarak da 4.0 mL ACN optimum değerler olarak belirlendi. Elüsyon çözücüsü olarak ise 4.0 mL MeOH:AA (9:1) karışımı kullanıldı. Sulu ortamda yapılan çalışmalarda ise yükleme çözücü pH'ı 7.4 olarak belirlendi. SPE kartuşlarına yüklenen sorbent miktarı 50 mg olarak seçildi. Optimizasyon çalışmalarında bir parametre incelenirken tüm diğer parametreler sabit tutuldu.

Optimizasyonlar sonucunda hazırlanan polimer idrar çözeltisinden Tel'in ekstraksiyonu için uygulandı. MIP ve NIP için doğrusal

aralık 0.1-0.8 µg/mL, regresyon katsayısı 0.9930, bulunan en yüksek geri kazanım değeri sırasıyla $76.6 \pm 1.46(\%)$ ve $32.76 \pm 2.95(\%)$ olarak hesaplandı. Gözlenebilme sınırı (LOD) 0.0325 µg/mL, tayin sınırı (LOQ) 0.0985 µg/mL olarak bulundu. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları geliştirilen yöntemin yüksek bir kesinliğe sahip olduğunu gösterdi. Sonuç olarak, geliştirilen MISPE-spektroflorimetrik yöntemin yoğun matriks etkiye sahip insan idrarından Tel'in tayinini mümkün hale getirdiği tespit edildi.

7. ÖZET

Molekül Baskılanmış Katı Faz Ekstraksiyon Tekniğini Kullanarak Telmisartanın Çeşitli Ortamlardan Florimetrik Yöntemle Tayini

Bu çalışmada, Tel'in çeşitli ortamlardan tayini için yeni, duyarlı ve seçici olan bir moleküler baskılanmış katı-faz ekstraksiyonu (MISPE)-spektroflorimetrik yöntem geliştirildi. Fonksiyonel monomer olarak DMAEMA, çapraz bağlayıcı olarak EGDMA, başlatıcı olarak AIBN ve porojen olarak ChI seçildi. SPE sorbenti olarak kullanılan MIP ve NIP UV lamba altında buz kalıpları arasında sentezlendi. Biyolojik ortamın girişim yapıcı özelliği MISPE tekniği ile ortadan kaldırıldı ve Tel normalde tayini zor olan bir ortamdan kolaylıkla tayin edildi.

MISPE'nin matriks giderici etkileri ve spektroflorimetrenin duyarlılığı sayesinde Tel, düşük derişimlerde hem organik hem de sulu ortamlarda kantitatif olarak tayin edilebildi. Çalışma idrar üzerine uygulandı. MIP ve NIP için bulunan geri kazanım değeri sırasıyla $76.6 \pm 1.46(\%)$ ve $32.76 \pm 2.95(\%)$ olarak hesaplandı. Gözlenebilme sınırı $0.0282 \mu\text{g/mL}$, tayin sınırı $0.0854 \mu\text{g/mL}$, doğrusal aralık $0.1-0.8 \mu\text{g/mL}$, olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: Moleküler baskılanmış polimer, katı-faz ekstraksiyonu, spektroflorimetri, telmisartan.

8. SUMMARY

Determination of Telmisartan by Using Molecular Imprinting Solid-Phase Extraction Fluorimetric Technique in Different Media

In this study, a sensitive and selective MISPE-spectrofluorimetric method has been developed for the determination of Telmisartan (Tel) in different media (aqueous, organic and human urine). DMAEMA was used as functional monomer, EGDMA as a cross-linker, AIBN as an initiator and ChI as a porogen. MIP and NIP which was used as SPE sorbent have been synthesized using UV lamp in the ice bath. Matrix effect of biological media was removed by MISPE technique and Tel was easily determined in different harsh media.

Owing to selectivity of MISPE technique and sensitivity of spectrofluorimetry, Tel has been successfully analysed quantitatively in both organic and aqueous media at low concentrations. High mean recovery (for MIP, $76.6\% \pm 1.46$ and for NIP, $32.76\% \pm 2.95$) and low %RDS values were obtained for spiked Tel in human urine samples. Relatively high intra-day and inter-day precision results were also obtained. The linear range of the calibration curve was in the range 0.1 to 0.8 $\mu\text{g/mL}$ for developed method. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were 0.0282 and 0.0854 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Keywords: Molecularly Imprinted Polymer, Solid Phase Extraction, Spectrofluorimetry, telmisartan.

9. KAYNAKLAR

1. Çomu M. Hipertansiyon [online]. 2014 [cited 2014 Jan 8].

Available from: URL:

<http://www.mediko.boun.edu.tr/files/Hipertansiyon.htm>

2. Bebawy LI, Abbas SS, Fattah LA, Refaat HH et al. Application of First Derivative Spectrometry, TLC-Densitometry and Spectrofluorimetry for the Simultaneous Determination of Telmisartan and Hydrochlorothiazide Inpharmaceutical Dosage Forms and Human Plasma. *Farmaco* 2005; 60: 859-67.

3. Chen BM, Liang YZ, Wang YL, Deng FL, Zhou P, Guo FQ, Huang LF et al. Development and Validation of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Determination of Telmisartan in Human Plasma. *Anal. Chim. Acta* 2005; 540: 367-373.

4. Torrealday N, Gonzales L, Alonso RM, Jimenez RM, Lastra EO et al. Experimental Design Approach for the Optimisation of a HPLC-Fluorimetric Method for the Quantitation of the Angiotensin II Receptor Antagonist Telmisartan in Urine. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 32: 847-857.

5. Gonzalez L, Akesolo U, Jimenez RM, Alonso RM et al. Application of Capillary Zone Electrophoresis to the Screening of Some Angiotensin II Receptor Antagonists. *Electrophr* 2002; 23: 223-9.

6. Whitcombe MJ, Martin L, Vulfson EN et al. Predicting the Selectivity of Imprinted Polymers. *Chromatogr* 1998; 47: 457-464.

7. Dickert FL, Lieberzeit P, Tortschanoff M et al. Molecular Imprints as Artificial Antibodies — A New Generation of Chemical Sensors. *Sens Actuators B* 2000; 65: 186-189.
8. Busi E, Basosi R, Ponticelli F, Olivucci M et al. An Innovative Approach to the Design of Plastic Antibodies: Molecular Imprinting via a Non-Polar Transition State Analogue. *J Mol Catal A Chem* 2004; 217: 31-36.
9. Bolisay LD, Culver JN, Kofinas P et al. Molecularly Imprinted Polymers for Tobacco Mosaic Virus Recognition. *Biomaterials* 2006; 27: 4165-4168.
10. Wei HS, Tsai YL, Wu JY, Chen H et al. Preparation of Inorganic Molecularly Imprinted Polymers with Higher Adsorption and Selectivity by Sol–Gel Method. *J Chromatogr B* 2006; 836: 57-62.
11. Shea KJ, Sasaki DY et al. On the Control of Microenvironment Shape of Functionalized Network Polymers Prepared by Template Polymerization. *J Am Chem Soc* 1989; 111: 3442-3444.
12. Daniel S, Mary Gladis J, Prasada Rao T et al. Synthesis of Imprinted Polymer Material with Palladium Ion Nanopores and Its Analytical Application. *Anal Chim Acta* 2003; 488:173–182.
13. Lavignac N, Allender CJ, Brain KR et al. Current Status of Molecularly Imprinted Polymers as Alternatives to Antibodies in Sorbent Assays. *Anal Chim Acta* 2004; 510: 139-145.
14. Vlatakis G, Andesson LI, Miller R, Mochbach K et al. Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting. *Nature* 1993; 361: 645-647.

15. Ye L, Mosbach K et al. Molecularly Imprinted Microspheres as Antibody Binding Mimics. *React Funct Polym* 2001; 48: 149-157.

16. Dirion B, Cobb Z, Schillinger E, Andersson LI, Sellergren B et al. Water-Compatible Molecularly Imprinted Polymers Obtained via High-Throughput Synthesis and Experimental Design. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 15101–15109.

17. Ansell RJ, Kriz D, Mosbach K et al. Molecularly Imprinted Polymers for Bioanalysis Chromatography, Binding Assays and Biomimetic Sensors. *Curr Opin Biotechnol* 1996; 7: 89-94.

18. Hirayama K, Sakai Y, Kameoka K, Noda K Naganawa R et al. Preparation of a Sensor Device with Specific Recognition Sites for Acetaldehyde by Molecular Imprinting Technique. *Sens Actuator B* 2002; 86: 20-25.

-
19. Kriz O, Ramstrom O, Mosbach K et al. Molecular Imprinting: New Possibilities for Sensor Technology. *Anal Chem* 1997; 69: 345-349.

20. Bereczki A, Tolookan A, Horvai G, Horvath V, Lanza F, Hall AJ, Sellergren B et al. Determination of Phenytoin in Plasma by Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction. *J Chromatogr A* 2001; 930: 31-38.

-
21. Takeda K, Kobayashi T, et al. Bisphenol A Imprinted Polymer Adsorbents with Selective Recognition and Binding Characteristics. *Sci Tech Adv Mater* 2005; 6: 165-171.

-

22. Mayes AG, Whitcombe MJ et al. Synthetic Strategies for the Generation of Molecularly Imprinted Organic Polymers. *Adv Drug Deliver Rev* 2005; 57: 1742-1778.
23. Mena ML, Martinez-Ruiz P, Reviejo AJ, Pingarrón JM et al. Molecularly Imprinted Polymers for Online Preconcentration by Solid Phase Extraction of Pirimicarb in Water Samples. *Anal Chim Acta* 2002; 451: 297-304.
24. Han DM, Fang GZ, Yan XP et al. Preparation and Evaluation of a Molecularly Imprinted Sol-Gel Material for On-Line Solid-Phase Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Trace Pentachlorophenol in Water Samples. *J Chromatogr A* 2005; 1100: 131-136.
25. Stevenson D. Molecular Imprinted Polymers for Solid-Phase Extraction. *TrAc Trends in Analytical Chemistry* 1999; 18: 154-158.
- .
26. Ersöz A, Say R, Denizli A et al. Ni(II) Ion-Imprinted Solid-Phase Extraction and Preconcentration in Aqueous Solutions by Packed-Bed Columns. *Anal Chim Acta* 2004; 502: 91-97.
27. Sellergen B, Shea KJ et al. Influence of Polymer Morphology on the Ability of Imprinted Network Polymers to Resolve Enantiomers. *J Chromatogr* 1993; 635: 31-49.
28. Michael J, Whitecome M, Rodrigue E, Villar P et al. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol *J Am Chem Soc* 1995; 117: 7105-7111.

29. Pichon V, Haupt K et al. Affinity Separations on Molecularly Imprinted Polymers with Special Emphasis on Solid-Phase Extraction. *J Liq Chromatogr* 2006; 29: 989-1023.
30. Moring SE, Wong OS, Stobaugh JF et al. Target Specific Sample Preparation from Aqueous Extracts with Molecular Imprinted Polymers. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 27: 719–728.
31. Lee L. Synthesis and Application of Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction for The Determination of Terbutataline in Biological Matrices. *Yüksek Lisans. Malaysia: Universiti Sans Malaysia; 2006.*
32. Andac M, Say R, Denizli A et al. Molecular Recognition Based Cadmium Removal from Human Plasma. *J Chromatography B* 2004; 811: 119-126.
33. Jodlbauer J, Maier NM, Lindner W J et al. Towards Ochratoxin A Selective Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Extraction. *Chromatogr A* 2002; 945: 45–63.
34. Suedee R, Seechamnaturakit V, Canyuk B, Ovatlarnporn C, Martin GP et al. Temperature Sensitive Dopamine-Imprinted (N,N-methylene-bis-acrylamide cross-linked) Polymer and Its Potential Application to the Selective Extraction of Adrenergic Drugs from Urine. *J Chromatogr A* 2006; 1114: 239–249.
35. Li H, Liu Y, Zhang Z, Liao H, Nie L, Yao S et al. Separation and Purification of Chlorogenic Acid by Molecularly Imprinted Polymer Monolithic Stationary Phase. *J Chromatogr A* 2005; 1098: 66–74.

36. Lin L, Zhang J, Fu Q, He L, Li Y et al. Concentration and Extraction of Sinomenine from Herb and Plasma Using a Molecularly Imprinted Polymer as the Stationary Phase. *Anal Chim Acta* 2006; 561: 178–182.
37. Breton F, Euzet P, Piletsky SA, Giardi MT, Rouillon R et al. Integration of Photosynthetic Biosensor with Molecularly Imprinted Polymer-Based Solid Phase Extraction Cartridge. *Anal Chim Acta* 2006; 569: 50–57.
38. Nicholls C, Karim K, Piletsky P, Saini S, Setford S et al. Displacement Imprinted Polymer Receptor Analysis (DIPRA) for Chlorophenolic Contaminants in Drinking Water and Packaging Materials. *Biosens and Bioelectr* 2006; 21: 1171-1177.
39. Courtois J, Fischer G, Sellergren B, Irgum K et al. Molecularly Imprinted Polymers Grafted to Flow Through Poly(trimethylolpropane trimethacrylate) Monoliths for Capillary-Based Solid-Phase Extraction. *J Chromatogr A* 2006; 1109: 92–99.
40. Caro E, Marce RM, Cormack PAG, Sherrington DC, Borrull F et al. Novel Enrofloxacin Imprinted Polymer Applied to the Solid-Phase Extraction of Fluorinated Quinolones from Urine and Tissue Samples. *Anal Chim Acta* 2006; 562: 145–151.
41. Moullec SL, Begos A, Pichon V, Bellier B et al. Selective Extraction of Organophosphorus Nerve Agent Degradation Products by Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction. *J Chromatogr A* 2006; 1108: 7–13.
42. Caro E, Marce RM, Borrull F, Cormack PAG, Sherrington DC et al. Application of Molecularly Imprinted Polymers to Solid-Phase Extraction of

Compounds from Environmental and Biological Samples. Trends Anal Chem 2006; 25: 143–154.

43. Bjarnason B, Chimuka L, Ramstrom O et al. On-Line Solid-Phase Extraction of Triazine Herbicides Using a Molecularly Imprinted Polymer for Selective Sample Enrichment. Anal Chem 1999; 71: 2152–2156.

44. Caro E, Masque N, Marce RM, Borrull F, Cormack PAG, Sherrington DC et al. Non-covalent and Semi-Covalent Molecularly Imprinted Polymers for Selective On-Line Solid-Phase Extraction of 4-Nitrophenol from Water Samples J Chromatogr A 2002; 963:169–178.

45. Haginaka J. Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Extraction. Anal Bioanal Chem 2004; 379:332–334.

46. Berggren C, Bayouth S, Sherrington D, Ensing K et al. Use of Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction for the Selective Clean-Up of Clenbuterol from Calf Urine. J Chromatogr A 2000; 889: 105–110.

47. Sellergren B. Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer. Anal Chem 1994; 66: 1578–1582.

48 Pap T, Horvath V, Tolokan A, Horvai B, Sellergren B et al. Effect of Solvents on the Selectivity of Terbutylazine Imprinted Polymer Sorbents Used in Solid-Phase Extraction. J Chromatogr A 2002; 973: 1-12.

49. Muldoon MT, Stanker LH et al. Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction of Atrazine from Beef Liver Extracts. Anal Chem 1997; 69: 803-808.

50. Chapius F, Pichon V, Lanza F, Sellergren B, Hennion MC et al. Optimization of the Class-Selective Extraction of Triazines from Aqueous Samples Using a Molecularly Imprinted Polymer by a Comprehensive Approach of the Retention Mechanism. *J Chromatogr A* 2003; 999: 23-23.
51. Caro E, Marcé RM, Cormack P, Sherrington DC, Borrull F. Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of Naphthalene Sulfonates from Water. *J Chromatogr A* 2004; 1047: 175-180.
52. Caro E, Marcé RM, Cormack P, Sherrington DC, Borrull et al. Online Solid-Phase Extraction with Molecularly Imprinted Polymers to Selectively Extract Substituted 4-Chlorophenols and 4-Nitrophenol from water. *J Chromatogr A* 2003; 995: 233-238.
53. Chapuis F, Pichon V, Lanza F, Sellergren B, Hennion MC et al. Retention Mechanism of Analytes in the Solid-Phase Extraction Process Using Molecularly Imprinted Polymers. Application to the Extraction of Triazines from Complex Matrices. *J Chromatogr B* 2004; 804: 93-101.
54. Zhang M, Xie J, Zhou Q, Chen G, Liu Z et al. Online Solid-Phase Extraction of Ceramides from Yeast with Ceramide III Imprinted Monolith. *J Chromatogr A* 2003; 984: 173-183.
55. Chassaing C, Stokes J, Venn RF, Lanza F, Sellergren B, Holmberg A, Berggren C et al. Molecularly imprinted polymers for the Determination of a Pharmaceutical Development Compound in Plasma Using 96-well MISPE technology. *J Chromatogr B* 2004; 804: 71-81.

56. Lasáková M, Thiébaud D, Jandera P, Pichon V et al. Molecularly Imprinted Polymer for Solid-Phase Extraction of Ephedrine and Analogs from Human Plasma. *J Sep Sci* 2009; 32: 1036-1042.

57. Möller K, Nilsson U, Crescenzi C et al. Investigation of Matrix Effects of Urine on a Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction. *J Chromatogr B* 2004; 811: 171-176.

58. Caro E, Marce RM, Cormack PAG, Sherrington DC, Borrull F et al. A New Molecularly Imprinted Polymer for the Selective Extraction of Naproxen from Urine Samples by Solid-Phase Extraction. *J Chromatogr B* 2004; 813: 137-143.

59. Theodoridis G, Zacharis CK, Tzanavaras PD, Themelis DG, Economou A et al. Automated Sample Preparation Based on the equential Injection Principle: Solid-Phase Extraction on a Molecularly Imprinted Polymer Coupled Online to High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr A* 2004; 1030: 69–76.

60. Lai JP, Niessner R, Knopp D et al. Benzo[a]pyrene Imprinted Polymers: Synthesis, Characterization and SPE Application in Water and Coffee Samples. *Anal Chim Acta* 2004; 522: 137-144.

61. Cormack PAG, Mehamod FS et al. Molecularly Imprinted Polymer Synthesis Using RAFT Polymerisation. *Sains Malays* 2013; 42: 529-535.

62. Kalp Yetmezliğinde Kullanılan İlaçlar [online]. 2014 [cited 2014 Jan 8].

Available from: URL:

<http://home.anadolu.edu.tr/~yozkay/Farmasotik%20Kimya%20II/Ders%20Notu.pdf>

63. Telmisartan [online]. 2014 [cited 2014 Jan 8]. Available from: URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00966>

64. Micardis [online]. 2014 [cited 2014 Jan 8]. Available from: URL: <http://www.rxlist.com/micardis-drug.htm>

65. Mudiam MKR, Chauhan A, Singh AK, Sharma VP, Saxena PN et al. Molecularly Imprinted SPE Combined with Dispersive Liquid Liquid Microextraction for Selective Analysis of Telmisartan in Biological and Formulation Samples. *Bioanalysis* 2013; 5: 847-858.

66. Hemen C, Schwarz LG, Kunz U, Karst U et al. Determination of Telmisartan in Human Blood Plasma Part I: Immunoassay Development. *Anal Chim Acta* 2006; 560: 35-40.

67. Nie J, Zhao Q, Huang J, Xiang B, Feng YQ et al. Determination of Telmisartan in rat Tissues by In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High Performance Liquid Chromatography. *J Sep Sci* 2006; 29: 650-655.

68. Muhanna FJ, Dari KA, Mubarak MS et al. Chelation Properties of Chitosan Functionalized with 1-Hydroxy-2-Pyridinethione-4-Carboxylic Acid Toward Some Heavy Metal Ions in Aqueous Solutions. *J Macro Sci A* 2012; 49: 15-29.

69. Zalloum HM, Qodah ZA, Mubarak MS et al. Copper Adsorption on Chitosan-Derived Schiff Bases *J Macro Sci A* 2009; 56: 46-57.

10. TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve uygulanmasında, teorik ve pratik bilgi birikiminden yararlandığım, hoşgörü ve sabır ile tüm süreçte bilgi ve tecrübesinden faydalanmamı sağlayan, yol göstericiliği, moral ve desteği ile tüm katkılarından dolayı kıymetli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Hasan Basan'a

Çalışma sürecimde değerli bilgisini esirgemeyen değerli hocam Sn. Prof. Dr. Nusret Ertaş'a

Tez sürecimde ilgisi ve yardımlarıyla bana destek veren Sn. Doç. Dr. Eda Şatana Kara'ya

Eğitimimde ve iş hayatımda bana örnek olan, yol gösteren bütün Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine

Yüksek lisans eğitimim boyunca hep yanımda olan değerli çalışma arkadaşlarım Hilal Torul, Arda Öztürk, Aykut Önay, Merve Eryılmaz ve Adem Zengin'e

Lisans eğitimimden bugüne kadar bana hep inanan, yol gösteren ve örnek olan kıymetli hocam Sn. Prof. Dr. Münevver Sökmen'e

Eğitimim boyunca yanımda olan desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Sena Atal ve Melek Koç'a

Varlıklarıyla maddi-manevi beni destekleyen, ilgilerini, sevgilerini, benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli Annem, Babam ve Kardeşim'e saygı, sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Hüma

Soyadı: Yılmaz

Doğum Yeri: Trabzon – 1988

Eğitimi: Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi
Kimya Bölümü (2006-2011)
Trabzon Fatih Lisesi (YDA) (2002-2005)
Özel Neşem Koleji (1994 – 2002)

Yabancı Dili: İngilizce
Fransızca

Görevi: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik
Kimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi (2011 -
...)