

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BAZI ANTİKANSER İLAÇLARIN DNA İLE ETKİLEŞMESİNİN
ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERLE İNCELENMESİ**

Selva BİLGE YÜCEL

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI ANTİKANSER İLAÇLARIN DNA İLE ETKİLEŞMESİNİN ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERLE İNCELENMESİ

Selva BİLGE YÜCEL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışmanı: Prof. Dr. Ali SINAĞ
Eş danışmanı: Doç. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL

Yürütülen tez çalışması kapsamında antikanser ilaç etken maddelerinden ibrutinib, palbosiklib ve pazopanibin elektrokimyasal davranışları ve çift sarmal DNA (*dsDNA*) ile etkileşimleri camsı karbon elektrot (CKE) kullanılarak incelenmiştir. Bu ilaçların voltametrik analizi için CKE nin yüzeyi sentezlenen karbon malzemeler ve nanoparçacıklar ile modifiye edilerek nanosensor ve nanobiyosensörler tasarlanmıştır. Elektrot modifikasyon malzemeleri olarak COVID-19 pandemisi nedeniyle çevrede çok sayıda bulunan atık maskelerden yeşil bir sentez tekniği olan hidrotermal karbonizasyon ile elde edilen M ve atık insan saçından yine aynı teknik ile elde edilen H karbon malzemeleri kullanılmıştır. Modifikasyon malzemesi olarak karbon malzemelerin yanı sıra hidrotermal yöntemle sentezlenen küresel morfolojiye sahip SnO₂ ve çubuk benzeri morfolojiye sahip CuO nanoparçacıklar kullanılmıştır. Sentezlenen tüm malzemelerin SEM-EDX, TEM, FT-IR, XPS, XRD, RAMAN, TGA ve BET gibi çok çeşitli karakterizasyon teknikleri aracılığıyla kimyasal ve fiziksel yapıları aydınlatılmıştır. İlaç-*dsDNA* etkileşim mekanizmalarını aydınlatmak için spektrofotometrik çalışmalar da yapılmıştır.

Aralık 2021, 248 sayfa

Anahtar Kelimeler: Atık maske, insan saçı, hidrotermal karbonizasyon, nanoparçacık, biyosensör, nanosensör, nanobiyosensör, antikanser, ibrutinib, palbosiklib, pazopanib

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF SOME ANTICANCER DRUGS WITH DNA BY ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

Selva BİLGE YÜCEL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ali SINAĞ
Co- Supervisor: Doç Dr. Burcu DOĞAN TOPAL

Within the scope of the thesis study, the electrochemical behaviors of the anticancer drug active substances ibrutinib, palbociclib, and pazopanib and their interactions with double-stranded DNA (dsDNA) were investigated using a glassy carbon electrode (GCE). For the voltammetric analysis of these drugs, the surface of the GCE was modified with synthesized carbon materials and nanoparticles, and nanosensors and nanobiosensors were designed. As electrode modification materials, M obtained by hydrothermal carbonization, a green synthesis technique, from waste masks found in large numbers in the environment due to the COVID-19 pandemic, and H carbon materials obtained from waste human hair with the same technique were used. In addition to carbon materials, SnO₂ with spherical morphology and CuO nanoparticles with rod-like morphology were used as modification materials. The chemical and physical structures of all synthesized materials were elucidated through a wide variety of characterization techniques such as SEM-EDX, TEM, FT-IR, XPS, XRD, RAMAN, TGA, and BET. Spectrophotometric studies have also been conducted to elucidate drug-dsDNA interaction mechanisms.

December 2021, 248 pages

Keywords: Waste mask, human hair, hydrothermal carbonization, nanoparticle, biosensor, nanosensor, nanobiosensor, anticancer, ibrutinib, palbociclib, pazopanib

TEŞEKKÜR

Öncelikle lisansüstü öğrenim sürecim boyunca yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tecrübe ve fikirleriyle bana her zaman ışık tutan, bilimsel çalışmayı öğreten ve bu konuda her zaman teşvik eden çağdaş bilim insanlığıyla ve çalışma azmiyle örnek aldığım, danışman hocam Prof. Dr. Ali SINAĞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi) çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca bana alt yapı ve imkânlarını sunan, doktora çalışmalarımın ilerlemesini sağlayan bana her zaman yol gösteren, bilimsel tecrübelerini benimle paylaşan ve akademik ilerlememde beni geliştiren hocam Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi) çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince beni her anlamda samimiyet ve içtenlikle destekleyip, bana her zaman güvenen ve yalnız bırakmayan tez çalışmalarımı yürütmemi sağlayan eş danışman hocam Doç. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL'a (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi) çok teşekkür ederim.

İlk elektrokimyasal çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan, bilgi ve tecrübesi ile desteğini üzerimden eksik etmeyen Doç. Dr. Nurgül KARADAŞ BAKIRHAN'a (Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi) çok teşekkür ederim.

Yaptığım çalışmaların spektroskopik analiz aşamasında yardımlarını esirgemeyen, beni çalışmalarım konusunda cesaretlendiren ve kendine özgü bakış açısıyla yönümü bulmamı sağlayan Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN'a (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi) çok teşekkür ederim.

Tüm doktora süreci boyunca desteği ve sevgisini benden esirgemeyen dert ortağım sevgili arkadaşım Arş. Gör Leyla KARADURMUŞ'a (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi) çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım boyunca bana maddi ve manevi bakımdan büyük yardımları olan YK 100/2000 ve BİDEB 2211-A burslarından faydalanmamı sağlayan Yüksek ğretim Kurumu ve TÜBİTAK' a tüm itenliğim ile teşekkür ederim.

Akademik ideallerimi gerçekleştirmemde ve tüm zorlu koşulların üstesinden gelebilmemde en büyük desteği aldığım eşim Abdullah YÜCEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında koşulsuz ve şartsız arkamda duran desteklerini hep üzerimde hissettiğim ablalarım Esra BİLGE SAVCI ve Fatma Gülçin KAHRAMANER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve kararlarımı destekleyen annem Zeynep BİLGE ve babam Mustafa BİLGE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2021

Selva BİLGE YÜCEL

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1 Elektrokimya	5
2.2 Biyosensörler	58
2.3 Analitik Yöntem Validasyonu	69
2.4 İlaç Tanımı ve Sınıflandırılması	82
2.5 İlaç Etken Maddeleri İçin Analiz Teknikleri	95
2.6 Nanoparçacık ve Nanoparçacık Sentezleme Teknikleri.....	100
2.7 Atık Yönetimi	106
2.8 Biyokütle	108
2.9 Karbon Malzeme Sentezleme Teknikleri.....	109
3. MATERYAL VE YÖNTEM	115
3.1 Analizler	115
3.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Diğer Ekipmanlar.....	123
3.3 Deneyler Boyunca Kullanılan Kimyasallar.....	125
3.4 Elektrot Modifikasyon Materyali Olarak Kullanılacak Malzemelerin Sentezi	127
3.5 Çalışma Elektrodunun Elektrokimyasal Ölçümlere Hazırlanması.....	129
3.6 İlaç Etken Maddelerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	132
3.7 Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Formalara Uygulanması.....	133
3.8 Geri Kazanım Uygulaması.....	134
3.9 Yapay İnsan Serumı Uygulaması.....	134
3.10 Girişim Çalışması	134
3.11 UV-Vis Spektroskopi Tekniği ile İlaç-DNA Etkileşiminin İncelenmesi	135
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	136
4.1 H ve NH ₂ - MWCNT Elektrot Modifikasyon Malzemelerinin Karakterizasyonu	136
4.2 M ve CuO Elektrot Modifikasyon Malzemelerinin Karakterizasyonu	147

4.3 SnO ₂ Elektrot Modifikasyon Malzemesinin Karakterizasyonu.....	155
4.4 İbrutinib Üzerine Yapılan Voltametik Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular.....	159
4.5 Palbosiklib Üzerine Yapılan Voltametik Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular.....	168
4.6 Pazopanib Üzerine Yapılan Voltametik Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular.....	201
5. SONUÇ	237



SİMGELER DİZİNİ

Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
Ag ₂ SO ₄	Gümüş sülfat
C	Derişim
CaCl ₂	Klasiyum klorür
Cu	Bakır
CuO	Bakır oksit
Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	Bakır nitrat trihidrat
CuSO ₄	Bakır sülfat
CO ₂	Karbondioksit
D	Difüzyon katsayısı
E°	Redoks reaksiyonu için standart potansiyeli
F	Faraday sabiti
HCl	Hidroklorik Asit
HgO	Civa oksit
I	Akım şiddeti
J	Difüzyon akısı
KCl	Potasyum klorür
KOH	Potasyum hidroksit
K _{sp}	Bakır sülfatın çözünürlük sabiti
NaOH	Sodyumhidroksit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
Hz	Frekans, Hertz
m	Eğim
n	Kesme noktası, transfer edilen elektron sayısı
nm	Nanometre
p°	Standart basınç
r	Korelasyon katsayısı
R	Gaz sabiti
Rpm	Dakikada Devir
R ²	Determinasyon katsayısı
SnO ₂	Kalay oksit
t	Zaman
T	Sıcaklık, Kelvin
°C	Santigrat Derece
μ	mikro
μl	mikro litre
μg	mikro gram

Kısaltmalar

A	Adenin
AA (AC)	Alternatif Akım
AdsKDV	Adsorptif Sıyırma Kare Dalga Voltametrisi

ATP	Adenozin Tri Fosfat
BET	Brunauer Emmett Teller
BH	Bağıl hata
BRT	Britton-Robinson Tamponu
BSS	Bağıl Standart Sapma
CKE	Camsı Karbon Elektrot
COVID-19	Koronavirüs Hastalığı 2019
DA (DC)	Doğru Akım
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTA	Diferansiyel Termal Analiz
DTV	Doğrusal Taramalı Voltametri
DV	Dönüşümlü Voltametri
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
dsDNA	Çift sarmal deoksiribonükleik asit
EDX	Enerji Dağılımlı X-Işını
Ep	Pik potansiyeli
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
G	Guanin
H	İnsan Saçından Elde Edilen Karbon Malzeme
HPLC	Hızlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HTC	Hidrotermal Karbonizasyon
ICH	International Conference on Harmonization
IGC	İnert Gaz Yoğuşması
IR	İnfrared
İp	Pik akımı
KDV	Kare Dalga Voltametrisi
LC/MS-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
M	Atık Maskeden Elde Edilen Karbon Malzeme
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
ORR	Oksijen İndirgeme Reaksiyonu
PLB	Palbosiklib
PZB	Pazopanib
RNA	Ribonükleik Asit
RP-HPLC	Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
S	Sitozin
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SHE	Standart Hidrojen Elektrodu
ssDNA	Tek Sarmal Deoksiribonükleik asit
T	Timin
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGA	Termogravimetrik Analiz
UPLC-MS/MS	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi - Tandem Kütle Spektrometresi
UV	Ultraviyole
XPS	X-Işını Fotoelektron Spektroskopi
XRD	X-Işını Kırınım Difraktometrisi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Elektrokimyasal uygulamalarda kullanılan üç elektrotlu sistemin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.2	Uygulanan potansiyel etkisiyle meydana gelen elektrokimyasal çift tabaka (Anonim).....	9
Şekil 2.3	Temel elektroanalitik tekniklerin şematik gösterimi ve en genel sınıflandırılması (Anonim).....	17
Şekil 2.4	Temel elektroanalitik tekniklerin şematik gösterimi ve detaylı sınıflandırılması (Anonim).....	18
Şekil 2.5	Voltametri tekniği kapsamında en fazla kullanılan sinyallerin şematik gösterimi (Anonim).....	22
Şekil 2.6	Doğrusal taramalı ve dönüşümlü voltametri tekniği ile elde edilen sinyallerin incelenmesi (Anonim).....	24
Şekil 2.7	Polarografi tekniğinin örnek bir polarogram ile açıklanması (Anonim).....	27
Şekil 2.8	Klasik ve güncel polarogramların karşılaştırılması (Anonim).....	29
Şekil 2.9	Normal puls polarogramının puls mekanizmasının gösterilmesi (Anonim).....	29
Şekil 2.10	Diferansiye puls polarogramının puls mekanizmasının gösterilmesi (Anonim).....	30
Şekil 2.11	Standart hidrojen elektrodunun şematik gösterimi (Anonim).....	35
Şekil 2.12	Doygun kalomel elektrodunun şematik gösterimi (Anonim).....	37
Şekil 2.13	Gümüş-gümüş klorür referans elektrodunun şematik gösterimi (Anonim).....	41
Şekil 2.14	Klasik civa elektrodunun şematik gösterimi (Anonim).....	45
Şekil 2.15	Civa damla elektrodun etkisiyle oluşturulmuş örnek polarogram (Anonim).....	47
Şekil 2.16	Camsı karbon elektrot yüzeyinin morfolojik yapısının yıllara göre geliştirilmesi (de Souza Vieira vd. 2021).....	52
Şekil 2.17	Perde baskılı karbon elektrodun şematik gösterimi (Musa vd. 2021).	53
Şekil 2.18	Camsı karbon elektrot modifikasyonunun şematik gösterimi	56
Şekil 2.19	Biyosensör sisteminin şematik gösterimi	59
Şekil 2.20	DNA ve heliks yapısı (Anonim).....	60
Şekil 2.21	DNA interkalasyon mekanizması (Anonim).....	63
Şekil 2.22	DNA hibridizasyon mekanizması (Anonim).....	64
Şekil 2.23	İnterkalatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması	67
Şekil 2.24	İndikatörsüz DNA dizi algılanması	68
Şekil 2.25	Teşhis sınırı tayininde kullanılan sinyal/gürültü oranının gösterimi	77
Şekil 2.26	Teşhis alt sınırı tayininde kullanılan sinyal/gürültü oranının gösterimi	78
Şekil 2.27	Örnek kalibrasyon grafiği	80
Şekil 2.28	Antikanser ilaçların genel olarak sınıflandırılması	83
Şekil 2.29	Önemli bazı antikanser ilaçlar ve etki mekanizmaları (Anonim).....	88
Şekil 2.30	İbrutinib'in kimyasal yapısı (Anonim).....	93
Şekil 2.31	Palbosiklib'in kimyasal yapısı (Anonim).....	94
Şekil 2.32	Pazopanib'in kimyasal yapısı (Anonim).....	95
Şekil 2.33	Lignin yapısı (Shen vd. 2020).....	110
Şekil 2.34	Ligninin ayrışma mekanizması (Shen vd. 2020).....	112
Şekil 3.1	XRD analiz tekniğinin şematik gösterimi (Anonim).....	119

Şekil 3.2 Atomların titreşim frekansları (Anonim)	121
Şekil 3.3 Temel termogram eğrilerinin sınıflandırılması (Gabbott 2008)	122
Şekil 4.1 Modifikasyon malzemelerinin SEM görüntüleri A) NH ₂ - MWCNT B) H ...	136
Şekil 4.2 Modifikasyon malzemelerinin EDX sonuçları A) H B) NH ₂ - MWCNT	137
Şekil 4.3 Modifikasyon malzemelerinin TEM görüntüleri A) H ve NH ₂ - MWCNT B) H C) NH ₂ - MWCNT.....	138
Şekil 4.4 H modifikasyon malzemesinin XPS spektrumları A) genel spektrum B) C1s spektrumu C) O1s spektrumu D) N1s spektrumu	140
Şekil 4.5 NH ₂ - MWCNT modifikasyon malzemesinin XPS spektrumları A) genel spektrum B) C1s spektrumu C) O1s spektrumu D) N1s spektrumu	142
Şekil 4.6 Modifikasyon malzemelerinin XRD kırınım desenleri A) H ve B) NH ₂ - MWCNT.....	143
Şekil 4.7 Modifikasyon malzemelerinin Raman kaymaları A) H ve B) NH ₂ - MWCNT.....	144
Şekil 4.8 H malzemesi için elde edilen FT-IR spektrumu.....	145
Şekil 4.9 Modifikasyon malzemesi H için TG ve DT eğrileri.....	146
Şekil 4.10 Modifikasyon malzemelerinin SEM görüntüleri A) CuO nanoparçacıklar, B) atık maskeden elde edilen karbon (M).....	148
Şekil 4.11 Modifikasyon malzemelerinin EDX sonuçları A) CuO B) M.....	149
Şekil 4.12 Modifikasyon malzemelerinin TEM görüntüleri A) CuO nanoparçacıklar (500 nm and 200 nm), B) atık maskeden elde edilen karbon (M) (200 nm and 100 nm)	150
Şekil 4.13 M modifikasyon malzemesinin XPS spektrumları (C1s ve O1s spektrumları).....	151
Şekil 4.14 Modifikasyon malzemelerinin XRD kırınım desenleri (CuO ve M).....	152
Şekil 4.15 M malzemesi için elde edilen FT-IR spektrumu	153
Şekil 4.16 Modifikasyon malzemesi M için TG ve DT eğrileri	154
Şekil 4.17 SnO ₂ modifikasyon malzemesinin SEM görüntüleri (10.00 kx).....	156
Şekil 4.18 SnO ₂ modifikasyon malzemesinin EDX sonuçları.....	157
Şekil 4.19 SnO ₂ modifikasyon malzemesinin TEM görüntüleri (10-100 nm)	158
Şekil 4.20 SnO ₂ modifikasyon malzemesinin XRD kırınım deseni	159
Şekil 4.21 İbrutinib üzerine yapılan incelemelerin akış şeması.....	160
Şekil 4.22 A) pH 4,70 asetat tamponunda biyosensör, asetat tamponu ile etkileşim, 2×10 ⁻⁶ M ibrutinib ve biyosensörün 1×10 ⁻⁵ M ibrutinib ile etkileşimine ait voltammogramlar B) Biyosensörün artan ibrutinib derişimlerinde guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar.....	161
Şekil 4.23 pH 4,70 asetat tamponunda biyosensörün artan ibrutinib derişimlerinde guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi.....	162
Şekil 4.24 pH 4,70 asetat tamponunda biyosensörün artan ibrutinib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi.....	163
Şekil 4.25 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar	164
Şekil 4.26 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi	165

Şekil 4.27	pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi	166
Şekil 4.28	İbrutinib ile dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi A) 100 ppm dsDNA, 2×10^{-6} M ibrutinib ve bunların karışımının 3 saat sonra elde edilen voltammogramları B) 100ppm dsDNA ve 2×10^{-6} M ibrutinib karışımının 0- 3 saat aralığında kaydedilen voltammogramları	167
Şekil 4.29	Palbosiklib üzerine yapılan incelemelerin akış şeması.....	168
Şekil 4.30	A) pH 4,70 asetat tamponunda biyosensör, biyosensörün asetat tamponu ile etkileşimi, 4×10^{-6} M palbosiklib ve biyosensörün 4×10^{-6} M palbosiklib ile etkileşimine ait voltammogramlar B) Biyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine etkisini gösteren voltamogramlar	170
Şekil 4.31	pH 4,70 asetat tamponunda biyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi.....	171
Şekil 4.32	pH 4,70 asetat tamponunda biyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi.....	172
Şekil 4.33	pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar	173
Şekil 4.34	pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi	174
Şekil 4.35	pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi	175
Şekil 4.36	Çözelti ortamında 4×10^{-6} M palbosiklib ile 100 ppm dsDNA karışım çözeltisinin 0- 5 saat bekletme sürelerine ait voltamogramlarda guanin sinyali.....	176
Şekil 4.37	Çözelti ortamında 4×10^{-6} M palbosiklib ile 100 ppm dsDNA karışım çözeltisinin 0- 5 saat bekletme sürelerine ait voltamogramlarda adenin sinyali.....	177
Şekil 4.38	Palbosiklib ile dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; 100 ppm dsDNA, 4×10^{-6} M palbosiklib ve bunların karışımının 3 saat sonra elde edilen voltammogramları.....	178
Şekil 4.39	Palbosiklib ile poly A, poly G etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; A) poly G ve palbosiklib karışımına ait voltammogramlar ve hata çubuklu grafiği B) poly A ve palbosiklib karışımına ait voltammogramlar ve hata çubuklu grafiği.....	179
Şekil 4.40	Palbosiklib ile poly A, poly G etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; poly A, poly G, 4×10^{-6} M palbosiklib ve bunların karışımının 3 saat sonra elde edilen voltammogramları	180
Şekil 4.41	A) Farklı oranlardaki modifikasyon malzemelerinin pik akımına etkisinin incelenmesi B) boş CKE'nin pH 4,7 destek elektrolitinde, boş CKE'nin 4×10^{-6} M palbosiklib ortamında ve modifiye CKE'nin 4×10^{-6} M palbosiklib ortamında kaydedilen voltammogramları	182
Şekil 4.42	dsDNA'nın derişim optimizasyonu için guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine ait voltammogramlar	183

Şekil 4.43 Artan dsDNA derişiminin guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi.....	184
Şekil 4.44 Artan dsDNA derişiminin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi.....	184
Şekil 4.45 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesi	185
Şekil 4.46 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin guanin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin hata çubuklu halleri ile incelenmesi	186
Şekil 4.47 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin hata çubuklu halleri ile incelenmesi	187
Şekil 4. 48 Nanobiyosensör, asetat tamponu ile etkileşim, nanobiyosensörün 2×10^{-7} ve 1×10^{-6} M PLB ile 30 dk etkileşmesi ve nanobiyosensörün 1×10^{-6} M PLB’de 30 dk bekletilmesine ait voltammogramlar	188
Şekil 4.49 pH 4,70 asetat tamponunda nanobiyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi.....	189
Şekil 4.50 pH 4,70 asetat tamponunda nanobiyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi.....	190
Şekil 4.51 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi	191
Şekil 4.52 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi	192
Şekil 4.53 2×10^{-7} - 1×10^{-5} M derişim aralığında pH 4,7 asetat tamponu içerisinde palbosiklib yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğı....	193
Şekil 4.54 4×10^{-7} - 1×10^{-5} M derişim aralığında pH 4,7 asetat tamponu içerisinde guanin yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğı	194
Şekil 4.55 4×10^{-7} - 1×10^{-5} M derişim aralığında pH 4,7 asetat tamponu içerisinde adenin yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğı.....	195
Şekil 4.56 Ürik asit, glukoz ve askorbik asitin 1:1 ve 1:10 oranlarında varlığında kaydedilen voltammogramlar	198
Şekil 4.57 NaNO_3 , KCl ve CaCl_2 ’nin 1: 1 ve 1: 10 oranlarında varlığında kaydedilen voltammogramlar	199
Şekil 4.58 Palbosiklib ve dsDNA arasında ilişkinin doğrusal olmayan regresyon analizi yöntemiyle gösterilmesi	200
Şekil 4.59 Pazopanib üzerine yapılan incelemelerin akış şeması	201
Şekil 4.60 A) Biyosensör, asetat ile etkileşim, 1×10^{-4} M pazopanib ve biyosensörün 1×10^{-4} M pazopanib ile etkileşimine ait voltammogramlar B) pH 4,7 asetat tamponu ortamında artan pazopanib derişiminin guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin voltammogramlar ile incelenmesi	203
Şekil 4.61 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar	204

Şekil 4.62 Pazopanib ile dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi 100 ppm dsDNA, 1×10^{-5} M pazopanib ve bunların karışımının 0- 4 saat aralığında kaydedilen voltammogramları....	205
Şekil 4.63 Pazopanib ile dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; 100 ppm dsDNA, 1×10^{-5} M pazopanib ve bunların karışımının 3 saat sonra adenin yükseltgenme sinyallerine ait kaydedilen voltammogramlar	206
Şekil 4.64 Pazopanib ile dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; 100 ppm dsDNA, 1×10^{-5} M pazopanib ve bunların karışımının 3 saat sonra adenin yükseltgenme sinyallerine ait kaydedilen voltammogramlar	207
Şekil 4.65 Farklı oranlardaki modifikasyon dispersiyonlarının guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesi.....	209
Şekil 4.66 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesi	210
Şekil 4.67 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin hata çubuklu halleri ile incelenmesi	210
Şekil 4.68 pH 4,7 asetat tamponunda biyosensörün artan pazopanib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar.....	212
Şekil 4.69 pH 4,70 asetat tamponunda nanobiyosensörün artan pazopanib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi.....	213
Şekil 4.70 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar	214
Şekil 4.71 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi	215
Şekil 4.72 Pazopanib ve dsDNA arasında ilişkinin doğrusal olmayan regresyon analizi yöntemiyle gösterilmesi	216
Şekil 4.73 Britton Robinson (2,0- 10,0) tampon çözeltiğinde boş CKE yüzeyinde 2×10^{-6} M PZB'nin kare dalga voltamogramları	217
Şekil 4.74 Fosfat -asetat -asit (2,0- 9,0) tampon çözeltiğinde boş CKE yüzeyinde 2×10^{-6} M PZB'nin kare dalga voltamogramları	217
Şekil 4.75 Boş elektrot için asetat-fosfat-BRT tamponları ortamında elde edilen Ep-pH grafiği	218
Şekil 4.76 1×10^{-4} M PZB'nin tarama sayısında DV'leri; A) diklofenak, B) nilotinib ve C) lapatinib D) pH 2,0 fosfat tamponunda boş CKE üzerinde pazopanib.....	221
Şekil 4.77 M, CuO ve M- CuO ile modifiye edilmiş CKE'nin pH 7,0 fosfat tamponu ortamında kaydedilen AdsKDV voltammogramları.....	223
Şekil 4.78 CuO- M modifiye CKE üzerinde 2×10^{-6} M PZB'nin pH 2,0- 10,0 aralığındaki Britton Robinson tampon çözeltiğinde elde edilen AdsKDV voltamogramları	224
Şekil 4.79 CuO-M modifiye CKE üzerinde 2×10^{-6} M PZB'nin pH 2,0- 9,0 aralığındaki fosfat-asetat-asit tampon çözeltiğinde elde edilen AdsKDV voltammogramları	224

Şekil 4.80 CuO- M ile modifiye edilmiş elektrot için asetat-fosfat-BRT tamponları ortamında elde edilen Ep- pH grafiği	225
Şekil 4.81 CuO- M ile modifiye edilmiş elektrot için asetat- fosfat- BRT tamponları ortamında elde edilen İp- pH grafiği	225
Şekil 4.82 CuO- M ile modifiye edilmiş boş CKE üzerinde AdsKDV kullanılarak pH 7,0 fosfat ortamında A) biriktirme potansiyelinin etkisinin ve B) biriktirme süresinin etkisinin incelenmesi	228
Şekil 4.83 2×10^{-6} M PZB varlığında ve pH 7,0 fosfat tamponu ortamında KDV parametrelerinin incelenmesi A) Estep potansiyeli, B) frekans, C) puls genliği	230
Şekil 4.84 2×10^{-10} - 1×10^{-6} M derişim aralığında pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde PZB yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiği	232
Şekil 4.85 4×10^{-10} - 1×10^{-6} M derişim aralığında yapay insan serumu eklenmiş pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde PZB yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiği	233
Şekil 4.86 Girişim yapan maddelerin ve pH 7,0 fosfat tamponu varlığında CuO-M ile modifiye edilmiş camısı karbon elektrot üzerinde pazopanib'in AdsKDV voltamogram yanıtlarının grafiksel gösterimi A) NaNO_3 B) CaCl_2 C) KCl D) NaCl E) parasetamol F) dopamin G) askorbik asit H) ürik asit	235

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Cihazların elektrokimyasal teknik içerikleri	124
Çizelge 3.2 Tampon Çözeltilerin Bileşimleri.....	126
Çizelge 4.1 Palbosiklib için geliştirilen analitik yönteme ait analiz bulguları.....	196
Çizelge 4.2 Farmosötik dozaj form uygulamasından elde edilen analitik veriler.....	197
Çizelge 4.3 Pazopanib için geliştirilen algılama yöntemine ait analiz bulguları	233
Çizelge 4.4 Farmosötik dozaj form uygulamasından elde edilen analitik veriler.....	235



1. GİRİŞ

Biyosensör, bir dönüştürücüyü (transdüser) biyolojik olarak hassas ve seçici bir bileşenle birleştiren bir algılama cihazı olarak tanımlanır (Lin vd. 2021). Özellikle bir hedef molekül biyolojik bileşenle etkileşime girdiğinde, dönüştürücü seviyesinde maddenin derişimiyle orantılı bir sinyal meydana gelir (Lin vd. 2021). Biyosensörler diğer analitik yöntemlerle kıyaslandığında çok daha seçici, hassas, basit, hızlı ve az maliyetli sistemlerdir. Ayrıca biyosensörler çok düşük derişimlerde özellikle biyolojik türlerin tayinine imkân sağlarlar. Bu nedenle biyosensörler, geleneksel analitik tekniklerle karşılaştırıldığında çevrede, kimyasal süreçlerde, gıdada ve insan vücudunda bulunan bileşiklerin algılanmasında daha çok tercih edilmektedirler.

Elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörü kavramı ilk kez Millan ve Mikkelsen tarafından 1993 yılında ileri sürülmüş bu önemli araştırma alanı dünya çapında çeşitli gruplar tarafından yoğun ilgi görmüştür (Moradi vd. 2021). DNA biyosensörleri, Watson-Crick baz çifti tanıma olayını okunabilir bir analitik sinyale dönüştürme prensibine dayanmaktadır. Temel bir DNA biyosensörü, hibridizasyon yoluyla tamamlayıcı (hedef) DNA dizisini tanımak için bir dönüştürücü yüzeyinde bir oligonükleotidin immobilizasyonu ile tasarlanmaktadır. Elektrot yüzeyinde oluşan DNA çifti hibrit olarak tanımlanır. Bu olay daha sonra dönüştürücü tarafından analitik bir sinyale dönüştürülmektedir. Elektrokimyasal biyosensörler hızlı, basit ve düşük maliyetli algılamayı mümkün kıldığından, mevcut diğer ölçüm sistemlerine göre üstün özelliklere sahiptir.

Nükleik asitlerin tespiti, tıp, biyo-teknoloji, genetik mühendisliği ve moleküler biyoloji gibi çeşitli bilimsel dallar için çok büyük bir önem taşımaktadır. Hibridizasyonun elektrokimyasal tespiti, esas olarak, çift sarmal DNA (dsDNA) veya tek sarmal DNA (ssDNA) içeren veya içermeyen etiketlerin elektrokimyasal davranışındaki farklılıklara dayanmaktadır. Hibridizasyon tespiti için etiket olarak antikanser maddeler, organik boyalar, metal kompleksler, enzimler veya metal nanopartiküller kullanılmaktadır. DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini için temel olarak dört farklı yol vardır;

1. dsDNA/ssDNA ile seçimli olarak bağlanan etiketin oksidasyon veya redüksiyon pik akımındaki artış veya azalış izlenilir.

2. Oksidasyon veya redüksiyon pik akımındaki artış veya azalış guanin veya adenin gibi elektroaktif DNA bazlarının akımı üzerinden izlenilir.
3. Enzim etiketli bir dizi ile hibridizasyondan sonra substratın elektrokimyasal sinyali izlenilir.
4. Hedef ile hibridizasyondan sonra eklenen bir metal nanoparçacık dizisinin elektrokimyasal sinyali izlenilir.

Son yıllarda, araştırmacıların biyosensörlere olan ilgisinin giderek artmasıyla çok çeşitli özellikte biyosensörler her uygulamaya yönelik olarak hızla geliştirilmiştir. Araştırmacılar, algılayıcı sistemlerini çok küçük boyutlara indirgeyebilmiş ve bu sayede ihtiyaç hallerinde biyosensör sistemlerini taşınabilir seviyede geliştirmişlerdir. Biyosensör sistemlerindeki gelişmeleri zirve noktasına çıkartan bir diğer yenilik ise “giyilebilir” (wearable) sensörler üzerine yapılan araştırmalardır. Giyilebilir biyosensör teknolojisi, hastane dışı ortamlarda dinamik fizyolojik koşullar da insan biyo-sıvısından kimyasal ve biyolojik türlerin biyometrik bilgilerini potansiyel olarak sağlayabilmektedir. Böylece belki de ilerleyen zamanlarda hastalar sağlık hizmetlerinden zamanında aktif bir şekilde ve kişiselleştirilmiş olarak faydalanabileceklerdir. Fakat bu alanda yapılan çalışmalar henüz çok yeni olmakla birlikte modifiye biyosensör alanı ile kıyaslanabilecek düzeyde verim alınmaya başlanmamıştır.

Biyosensör alanında yaşanan en büyük gelişmelerden biri ise çok düşük derişimler da biyolojik türlerin izlenmesi ve algılama performansını arttırabilmek amacıyla algılayıcı yüzey geliştirme çalışmalarıdır. Bunun için araştırmacılar üstün özelliklere sahip modifikasyon malzemeleri sentezlemektedir. Algılama yüzeyinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar araştırmacıların biyosensöre olan ilgisini giderek daha çok arttırmakta ve bu alanda yapılan çalışmalara literatürde oldukça sık rastlanılmaktadır. Yüzey modifikasyon malzemesi olarak çeşitli türde metal oksitlere, kuantum noktalara, fonksiyonlaştırılmış malzemelere ve karbon temelli malzemelere literatürde yer verilmiştir.

Tüm bunların içerisinde karbon malzemeler, üstün kimyasal, fiziksel ve elektriksel iletkenliğe sahip benzersiz şekilde yapılandırılmış malzemelerdir. Fonksiyonel grupları, yüksek yüzey alanı ve yüksek iletkenlikleri nedeniyle elektrot modifikasyon

malzemeleri olarak çok fazla tercih edilirler. Ne yazık ki, fonksiyonel karbon malzemelerinin sentezlenmesi için sayısız sentez yöntemi bulunmakla birlikte bu yöntemler pahalı, karmaşık, toksik özellikte ve kısıtlayıcıdır.

Bu nedenle “yeşil sentez” yöntemleri çevre dostu olmaları, düşük maliyetli olmaları, daha az kimyasal gerektirmeleri ve daha az sentez adımı içermeleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Biyo-organizmalar, tarımsal, evsel atıklar ve kanalizasyon çamurları kullanılarak yapılan yeşil sentez, yeşil kimya ilkelerine uygundur ve toksik olmayan, güvenli reaktiflerin kullanımına dayanmaktadır. Bu yöntem, istenen yapı ve özelliklere sahip karbon malzemelerin daha az kirletici reaksiyon koşulları altında tasarlanıp sentezlenmesine olanak tanır. Yeşil sentezle sentezlenen malzemeler, tek adımlı bir işlem kullanılarak daha mükemmel stabilite sergilerken çeşitli morfolojilere sahip olabilmektedirler. En popüler yeşil sentez yöntemleri arasında hidrotermal karbonizasyon tekniği yer almaktadır.

Tez çalışması kapsamında hidrotermal karbonizasyon yöntemi aracılığıyla elektrot modifikasyon malzemesi olarak COVID-19 pandemisi sebebiyle kullanımı çok yoğun olan atık maskelerden elde edilen karbon malzeme ve atık insan saçlarından elde edilen karbon malzeme kullanılmıştır.

Özellikle bu karbon kaynaklarının seçilmesinin sebebi ise atık maskelerin selülozik ve polimerik yapılı olmasından dolayı karbonizasyon veriminin yüksek olması ve insan saçının doğal olarak içerdiği N ve S atomlarının elektrokimyasal oksidasyon sürecinde faydalı olmasından kaynaklıdır.

Ayrıca elektrot modifikasyon malzemesi olarak yeşil sentezle sentezlenen karbon malzemelerin yanı sıra hidrotermal yöntemle sentezlenen küresel morfolojiye sahip SnO_2 nanoparçacıklar ve çubuk morfolojiye sahip CuO nanoparçacıklar da kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında çalışılan ilaçların analizleri ve DNA ile etkileşimlerini incelemek için sentezlenen karbon malzemeler ve nanoparçacıklar kullanılarak elektrokimyasal tabanlı nanobiyosensörler ve nanosensör tasarımları gerçekleştirilmiştir. İlaç etken maddelerinin dsDNA ile etkileşimleri elektrot modifikasyon materyali kullanılmaksızın DNA biyosensörleri ile de performansları

incelenmiştir. Elektrokimyasal deneylerde elektrot olarak camı elektrot tercih edilirken nükleotid olarak çift sarmal sığır timüs bezi DNA'sı tercih edilmiştir. İlaç etken maddelerinin çift sarmal DNA ile etkileşimi için optimum etkileşme süresi, derişimi ve doğrusal çalışma aralığı incelenmiştir. İlaç etken maddelerinin tespiti amacıyla diferansiyel puls voltametri tekniğı kullanılarak guaninin ve adeninin yükseltgenme sinyalindeki değışim incelenmiştir. Bu çalışmalarda diferansiyel puls voltametri tekniğı kullanılarak etkileşim öncesinde ve sonrasında ilaç sinyalindeki, DNA bazlarından guanin ve adeninin yükseltgenme sinyallerindeki değışim incelenmiştir. Ayrıca etken maddelerden bazılarının voltametrik miktar tayini için yöntem geliştirilmesi, geliştirilen yöntemin farmasötik dozaj formlarına uygulanması, girişim ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. İlaç-DNA etkileşim mekanizmalarını aydınlatabilmek amacıyla voltametri tekniğinin yanısıra UV-Vis spektroskopisi çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalar sırasında antikanser ilaçların tirozin kinaz inhibitör sınıfına dahil olan ibrutinib, palbosiklib ve pazopanib etken maddeleri ile çalışılmış olup söz konusu ilaç etken maddeler ile ilgili literatürde herhangi bir voltametrik çalışma bulunmamaktadır. Sentezlenen elektrot modifikasyon malzemelerinin kullanılması ve bu ilaçlar için literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamış olması tezin özgünlüğü açısından büyük öneme sahiptir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Elektrokimya

Maddenin elektrik enerjisiyle etkileşmesi sonucunda elektriksel ve kimyasal enerjinin birbirine dönüşümünü inceleyen bu sırada gerçekleşen kimyasal reaksiyonları ve fiziksel değişimleri aydınlatan önemli bir fizikokimya alt dalıdır (Bagotsky 2005).

Elektrokimyasal sistemler, çözeltiyi iletken özellikte kılan elektrolit, çözelti ile temas ettiğinde yüzeyinde kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği katı elektrot, indirgenme reaksiyonların gerçekleştiği katot, yükseltgenme reaksiyonların gerçekleştiği anot ve çözeltideki yük dağılımını sağlayan iyonlardan oluşmaktadır (Bagotsky 2005).

Elektrokimyasal reaksiyonların kimyasal reaksiyonlara karşı avantajı, en geniş anlamıyla değerlendirildiğinde ayarlanabilir voltaj veya akım tarafından elde edilen serbestlik derecesinden kaynaklanmaktadır. Elektroaktif türlerin enerjisini oda sıcaklığında, sürekli ve kontrollü bir şekilde değiştirmek ve oluşacak ürünleri oldukça seçici bir reaktivite aralığında elde etmek mümkündür (Zoski 2006).

Elektrokimyasal teknikler sayesinde çok düşük gözlenebilme sınırına inebilme, reaksiyon ara yüzeylerindeki yük aktarım hızı ve kütle aktarım hızı, maddenin adsorpsiyon özellikleri, kimyasal tepkimelerin denge ve hız sabiti değerlerini hızlı, doğru ve güvenilir bir şekilde elde etmek mümkündür.

Elektrokimyasal tekniklerin diğer üstünlükleri;

- Elektrokimyasal uygulamalar genellikle bir element, molekül ya da tepkime sonunda oluşan ürün için spesifik yükseltgenme basamağı için özel olması
- Elektrokimyasal reaksiyonlar sonucunda alından sonuçların çözelti ortamı elektrotlar ve dış parametreler gibi birçok etkene duyarlı olması
- Elektrokimyasal reaksiyonların çok hızlı gerçekleşmesi ve hızlı cevap alınabilmesi
- Kolay numune hazırlama basamaklarından oluşması
- Az miktardaki numune ile çalışabilme olanağı

- Doğrusallık aralığının geniş olması
- Çeşitli katalitik etkiler sayesinde seçici ürünler elde edilebilmesi
- Farklı elektrot çeşitlerinin kullanılabilirliği
- Elektrokimyasal uygulamaların diğer uygulamalara kıyasla daha az maliyetli olması (Glasstone 2011).

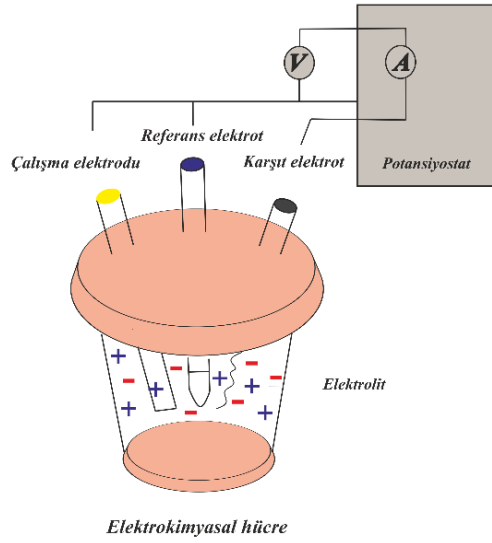
2.1.1 Bazı elektrokimyasal kavramlar ve temeller

Kimyasal temelli sistemlerde gerçekleştirilen elektriksel ölçümler, elektrotların yüzeyinde ve çözeltinin ara yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal mekanizmayı ve elektrot reaksiyonlarının genel prensiplerini kavramayı zorunlu kılar. Temel olarak elektrokimya, kimyasal faz geçişleri arasında ara yüzeyi sırasında gerçekleşen yük aktarım sürecinde etkili olan sebepleri incelemektedir. Bahsedilen kimyasal fazlardan ilki, elektrolit olarak nitelendirilen iyon hareketi aracılığıyla yükün taşındığı kısımdır. Elektrolitler çoğunlukla sıvı çözeltiler, eriyik haldeki katılar ya da iyonik temelli iletken katılardan meydana gelmektedir. Kimyasal fazlardan ikincisi ise yükün elektron hareketiyle metaller veya yarı iletkenler aracılığıyla taşındığı elektrot olarak nitelendirilen kısımdır (Gooding 2005).

Elektrokimyasal hücre elektrot ve elektrolit arasında bulunan ara yüzeyin tüm özelliklerinin ve mekanizmasının aydınlatıldığı sistemdir. Elektrokimyasal hücre sistemi, analit ile beraber destek elektroliti içeren bir çözeltiye çalışma, karşıt ve referans elektrotlarının daldırılmasıyla oluşmaktadır.

Elektrokimyasal bir uygulamanın gerçekleştirilebilmesi için çalışılacak analitinde bulunduğu elektrolitik ölçüm çözeltisine, yüzeyinde tüm elektrokimyasal ya da kimyasal tepkimelerin gerçekleşeceği elektrot sistemine ve bahsedilen sistemden sinyal geçmesini sağlayan bir çevriciye gerek vardır (Gooding 2005).

Tez kapsamında gerçekleştirilen elektrokimyasal uygulamalar **şekil.2.1**'deki gibi bir sistemde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1 Elektrokimyasal uygulamalarda kullanılan üç elektrotlu sistemin şematik gösterimi

2.1.2 Elektrokimyasal deneylerde kullanılacak üçlü elektrot sistemine genel bir bakış

Çalışma elektrodu; Yüzeyinde tüm kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği ve zamana bağlı olarak gerilimi doğrusal bir şekilde değişmekte olan elektrottur.

Referans elektrot; Çalışma elektrodu ile gerilimi kıyaslanabilen ve analit bileşiminden tamamen ayrı şekilde tekrar edilebilir, stabil ve sabit potansiyel sağlayan elektrottur.

Karşıt elektrodu; Sistemin güç kaynağından gelen elektrik akımının ölçüm çözeltisi aracılığıyla çalışma elektroduna transferini gerçekleştiren ve herhangi bir kimyasal reaksiyona girmeyen platin gibi iletkenliği yüksek materyalden meydana gelen elektrottur. Karşıt elektrot aynı zamanda akım taşıyıcı elektrot olarak adlandırılmaktadır.

Temel olarak elektrokimyasal uygulamalar destek elektroliti varlığında ve çözelti ortamında gerçekleştirilir. Uygun çözücünün seçilmesinde analitin redoks aktivitesi, çözünürlüğü ve çözücünün elektriksel iletkenliği, reaktivitesi ve kimyasal aktivitesi oldukça kritiktir. Ayrıca ideal çözücünün, analitle kimyasal bir reaksiyonu olmamalı ve

geniş potansiyel penceresinde elektrokimyasal olarak inert davranış sergilemelidir. Elektrokimyasal uygulamalarda en çok tercih edilen inorganik çözücü genellikle su olmakla birlikte çift destile özelliğe olmasına dikkat edilir. En çok tercih edilen organik çözücüler ise sırasıyla etanol, dimetilformamid (DMF), metanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve asetonitril gibi organik çözücülerdir. Çoğu durumda bahsedilen organik çözücülerin karışımlarında kullanılabilmektedir.

Gerilim kontrollü elektrokimyasal uygulamalarda çözelti direncini azaltma, iyonik şiddeti artırma ve elektriksel migrasyonu engelleme gibi avantajlarından dolayı destek elektrolitin mutlaka kullanılması gereklidir.

Destek elektrolitlerinin kullanımı elektrokimyasal uygulamanın kapsamına göre sınırlandırılabilir. Örneğin pH kontrollü elektrokimyasal uygulamalarda destek elektroliti olarak tampon sistemleri tercih edilmelidir. İnert destek elektroliti kullanımı için ise inorganik tuzlar, mineral ya da asitler tercih edilmelidir. Destek elektrolitin sahip olması gereken birtakım temel özellikler bulunmaktadır. Destek elektrolit özelliğine sahip kimyasal bileşikler yüksek saflıkta olmakla birlikte kolay yükseltgenip indirgenme eğiliminde olmamalıdır. Elektrot tepkimesinde yer alan elektroaktif türlerin derişimi destek elektrolit derişiminden büyük olmamalıdır (Pelesz & Czapka, 2020).

2.1.3 Elektrokimyasal tabakaların incelenmesi

Elektrokimyasal ölçümler sırasında elektrot yüzeyi ve analit çözeltisi arasında birtakım heterojen tabakalar oluşmaktadır. Bu tabakaların oluşma nedeni çalışma elektrodunun yüzeyine yakın bulunan çözelti tabakasında bulunan bir maddeye elektron vermesi veya bahsedilen elektron almasından kaynaklıdır. En çok bilenen elektrokimyasal tabakalar sırasıyla türbülent akış tabakası, laminar akış bölgesi ve Nerst difüzyon tabakalarıdır. Türbülent akış tabakası, elektrot yüzeyine yakın olmayan çözelti bölgesinde gözlenir ve düzenli bir akış davranışı bulunmamaktadır. Laminar akış bölgesi, elektrot yüzeyine yakın çözelti bölgesinde gözlenir ve laminar akışa sebep olur sonuç olarak tabakalar elektrot yüzeyinin paralel yönünde birbirinin üzerinde kaymaya devam eder. Nernst

difüzyon tabakası, $10^{-2} - 10^{-3}$ cm kalınlığına sahip olmakla birlikte çalışma elektrodu yüzeyine δ cm uzakta meydana gelmektedir (Sharma ve Bhatti 2010).

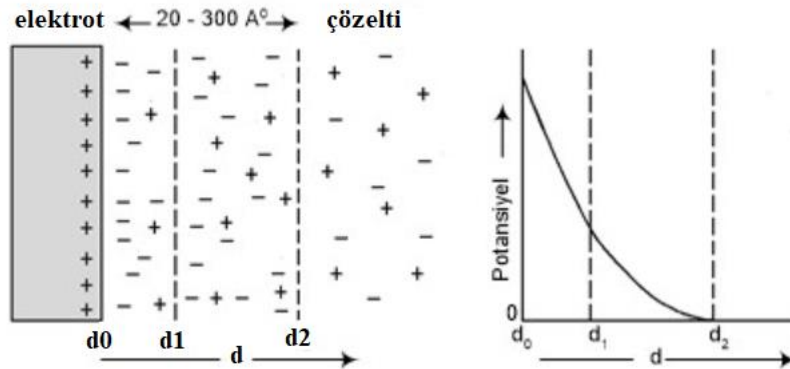
2.1.4 Elektrokimyasal çift tabakanın incelenmesi

Elektrokimyasal reaksiyonlar gerçekleşirken elektrot yüzeyine yakın çözelti tabakasında elektron alışverişi gerçekleşir ve böylece heterojen sistemler oluşur. Bu sebeple, elektrokimyasal çift tabakanın kimyasal bileşimi çözelti matrisinin bileşiminden oldukça farklı olabilmektedir.

Elektrot yüzeyine pozitif bir gerilim uygulandığında yüzeyde elektroaktif bir tür bulunmadığı durumda gerilim ani bir düşüş ile sıfıra iner ve bir akım dalgası meydana gelir. Meydana gelen bu akım, elektrot yüzeyi üzerinde negatif bir yük eksikliği veya fazlalığına neden olan yükleme akım çeşididir.

Yine de iyon hareketliliği nedeniyle elektrot yüzeyine yakın bulunan çözelti tabakalarında zıt yüklenme durumu meydana gelir.

Bahsedilen etkileşme mekanizması **şekil.2.2**'de açıklanmıştır. Verilen pozitif gerilim nedeniyle elektrot yüzeyinde, pozitif yük fazlalığı meydana gelmiştir. Elektrokimyasal çift tabaka her bir tabakası yüklerle kaplı iki katmandan oluşmaktadır. Bu tabakalar sırasıyla yoğun iç tabaka ve difüze tabakadır.



Şekil 2.2 Uygulanan potansiyel etkisiyle meydana gelen elektrokimyasal çift tabaka (Anonim)

Yoğun iç tabaka ($d_0 \rightarrow d_1$) ile elektrot yüzeyi arasında ki uzaklık arttıkça oluşan gerilim mesafeyle doğru orantılı şekilde azalmaktadır. Söz konusu tabakayı çözücünün molekülleri veya spesifik biçimde adsorblanan moleküller veya iyonlar oluşturur.

Difüze tabaka ($d_1 \rightarrow d_2$) ile elektrot yüzeyi arasında ki uzaklık arttıkça oluşan potansiyel üstel şekilde azalmaktadır. Elektrot yüzeyinde oluşan ve bu yüzeye yakın mesafede bulunan çözeltideki yük dağılımı elektriksel çift tabaka olarak nitelendirilir (Amiri ve Bélanger 2021).

2.1.5 Elektrokimyasal süreçlerde rol oynayan akım türleri

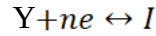
Basit bir elektrot sistemine bilinen ölçüde bir gerilim uygulandığında iki çeşit akım türü meydana gelir. Bu akım türleri sırasıyla faradayik akım ve kapasitif akım olmak adlandırılır.

Kapasitif akım (i_c), elektrokimyasal çift tabakanın bir kapasitör görevi görmesi ile oluşan akım türüdür. Elektrolit çözeltisine çalışma elektrodunun daldırılması ve elektrodun negatif yükle yüklenmesi sonucunda çözeltide var olan pozitif yüklenmiş iyonlarda elektrot yüzeyine yönelerek hareket eder. Sonuçta çözelti ara yüzeyinde gerilim farkının oluşmasına neden olur. Birbirine zıt işaretli yük topluluğunun ara yüzeyin iki ucunda toplanmasıyla bölgede elektriksel çift tabaka oluşumuna sebep olur. Bahsedilen elektrokimyasal çift tabaka ise kapasitör görevi görür. Oluşan kapasitörü yükleyebilmek için ortamda redoks etkisi yaratacak türler olmadığında bile bu akım türü oluşabilir. Kapasitif akım herhangi bir reaksiyona bağlı olmamakla birlikte sistemde ne kadar düşük seviyelerde olursa, o kadar doğru sinyaller almak mümkün olur (Feldberg 1984).

Faradayik akım (i_f), tamamen çalışma elektrodu ile analit arasından gerçekleşen tepkimeden kaynaklı oluşan akım türüdür. Çalışma elektrodu ve destek elektrolitinin ara yüzeyi boyunca elektron transferiyle redoks dizisi olduğu ve bu olayın Faraday yasalarına uymasından kaynaklı olduğu için faradayik akım olarak nitelendirilir (Dayton vd. 1980).

2.1.6 Elektrokimyasal süreçlerde Faradayik hesaplamalar ve Nerst eşitliği

Çalışma elektrodu ve destek elektroliti arasında gerçekleşen elektron iletimi sırasında, elektrotların birinde yükseltgenme tepkimesi meydana gelirken bir diğerinde indirgenme tepkimesi gerçekleşir. Bu süreçlerde aşağıda verilen örnek reaksiyon oluşur.



Bu reaksiyonda;

Y= yükseltgenme reaksiyonu

I = indirgenme reaksiyonu

n= elektron transfer sayısı

olarak tanımlanmaktadır.

Bir elektrokimyasal hücre sisteminde elektrotun potansiyeli, elektrodun elektron alması veya vermesi eğilimi şeklinde nitelendirilmektedir. Bütün elektrokimyasal hücreler iki yarı hücrenin varlığı ile tanımlanmaktadır.

Bahsedilen yarı hücrelerin potansiyelleri ise Nernst eşitliği aracılığıyla sayısal olarak hesaplanmaktadır (Feiner ve McEvoy 1994).

$$E = E^0 + \frac{2,303 R \times T}{n \times F} \times \ln \frac{a_{M+}}{a_M}$$

Nerst eşitliğinde yer alan terimlerin açıklaması aşağıda verilmektedir;

E^0 = Redoks reaksiyonu için standart potansiyeli

R = Gaz sabiti değeri ($8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)

T = Sıcaklık (K)

n = Reaksiyon sırasında aktarılan elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96487 coulombs)

Bir kimyasal değişim yaratmak için elektrik enerjisinin kullanıldığı kimyasal olaylar elektroliz olarak tanımlanmaktadır.

Michael Faraday tarafından elektroliz kanunları olarak adlandırılan Faraday kanunları elektrokimyasal süreçler için çok önemli olup bu “bir elektrotta değişikliğe uğrayan maddenin ağırlığı elektrottan geçen elektrik miktarı ve maddenin eşdeğer gram ağırlığı ile orantılıdır” şeklinde tanımlanmaktadır.

Birinci faraday yasası aşağıdaki eşitlikte verilmiştir;

$$Q = I \times t$$

Q = Değişen madde miktarı

I = Akım şiddeti

t = Zaman (s)

Faraday’ın II. Kanunu: “Aynı miktarda elektrik yükü geçen farklı elektrolitlerin elektrolizi sırasında her bir hücre elektrotlarında, indirgenerek veya yükseltgenerek ayrılan madde miktarları bu maddelerin eşdeğer kütleleriyle doğru orantılıdır” şeklinde tanımlanmaktadır.

Elektrot ara yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonları boyunca akım, elektronların çalışma elektroduna doğrudan aktarımı aracılığıyla iletilmektedir. Bir elektrokimyasal hücre sistemindeki kimyasal madde miktarının hücreden geçen akımla doğru orantılı olduğunu ifade eden bu tip işlemlere, faradayik işlemler, bahsedilen şekilde oluşan akımlara da faradayik akımlar adı verilir. Analizi gerçekleştirilecek analitin ve ürünlerin derişimleri yalnızca elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak ve Nernst tabakası içinde değişime uğramaktadır (Jensen 2012).

2.1.7 Elektrokimyasal süreçlerde kütle aktarım mekanizmaları

Elektrokimyasal süreçlerde kütle aktarımı, ölçüm çözeltisi içerisinde var olan bir türün bir yerden başka bir yere hareketi veya göç etmesi olarak nitelendirilir. Bu durum, başlangıç ve bitiş bölge arasında oluşan elektriksel ya da kimyasal gerilim farkının artmasıyla hızlanmaktadır. Çalışma elektrodu, elektrot yüzeyine bitişik ince bir çözelti tabakası boyunca etki gösterdiğinden çözelti içerisindeki kütle aktarımını devam ettirebilecek faradayik akıma ihtiyaç duyulmaktadır. Faradayik akım ölçüm çözeltisinden elektrot yüzeyine doğru reaksiyona giren türlerin sürekli biçimde kütle aktarımını gerçekleştirir (Diban vd. 2009).

Temel olarak elektroaktif türlerin elektrokimyasal süreçlerde taşınımı üç yolla mümkündür. Bu yollar sırasıyla elektrik alan etkisi altında kütle migrasyonu, karıştırma ve titreşim etkisiyle konveksiyon ve derişim farkı etkisiyle difüzyondur.

Migrasyon, elektriksel alan etkisiyle yüklü taneciklerin ile zıt yüklenmiş kutup yönüne doğru çekilmesi prensibine dayanan bir hareket çeşididir. Bu hareket türünde basitçe anyonlar anot bölgesine doğru katyonlar ise katot bölgesine doğru hareket ederler. Migrasyon temelde yalnızca elektrostatik kuvvetlerden kaynaklanmaktadır. Elektroaktif tür yüklendiği zaman elektroaktif türe zıt yüklü elektrot tarafından çekilir. Ancak migrasyon mekanizması derişime bağlı olmamakla birlikte analiz edilecek türün tamamen migrasyon aracılığıyla aktarımının önüne geçmek için ortama fazla miktarda destek elektrolit eklemesi yapılır. Böylece çözeltide var olan iyonik türler iyonik göçü önemli ölçüde üstleneceğinden analiz edilecek türün az bir kısmı migrasyonla aktarılır.

Son durumda çözelti içerisindeki yükler herhangi bir iyonik tür tarafından taşınabilir ve analitin zıt kutuplu elektroda migrasyon hızı uygulanan potansiyelden daha bağımsız bir hale gelir. Çözelti ortamına destek elektroliti ilavesi sayesinde iyonik göç olayının önüne geçilebilir.

Karıştırma ve titreşim etkisiyle konveksiyonun incelenmesinde öncelikle konveksiyonun prensibine değinilmelidir. Konveksiyonun prensibi yoğunluk ve sıcaklık farkının oluşmasına dayanmaktadır. Ayrıca konveksiyon olayının akım yoğunluğu

üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Bu etkinin önüne geçebilmek amacıyla ölçüm çözeltisi karıştırılır veya elektrot hızla döndürülür.

Asıl beklenen ise, ölçüm çözeltisindeki elektroaktif türün elektrot yüzeyine doğru yalnızca difüzyonla aktarılmasıdır. Difüzyon kontrollü elektrokimyasal süreçlerde analit derişiminin yüksek olduğu kısımdan analit derişimi düşük olan bölgeye doğru yüklü türlerin aktarımı meydana gelmektedir. Böylece elektrolit çözeltisi ve elektrot yüzeyi arasında meydana gelen derişim farkından bir difüzyon akısı oluşur.

Oluşan akı Fick'in birinci yasasına göre aşağıdaki eşitlikle verilir (Weppner 2019);

$$J = -D \times \frac{dc}{dx}$$

J= Difüzyon akısı ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

dc/dx = derişim gradienti (mol m^{-4})

D= Difüzyon katsayısı ($\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) olarak tanımlanır.

Fick'in birinci yasasında kararlı hal difüzyonu göz önünde bulundurulmuştur. Buna göre difüze olan parçacık derişimi ve akı zamana bağlı olarak değişmemektedir. Fick yasası elektrokimyasal süreçlere uyarlandığında, elektrot yüzeyine yakın difüzyon tabakası adı verilen bir bölgede elektroaktif türün elektrot yüzeyine ulaşmasını açıklamaktadır. Böylece elektrot yüzeyine difüze olan türün eşdeğer gram sayısı difüzyon akısına eşit olmaktadır.

Derişim, zaman ve uzaklığa bağlı ise kısmi diferansiyel denklemle ifade edilen Fick'in ikinci yasası geçerli olur.

Fick'in ikinci yasası aşağıdaki eşitlikler ile verilir;

$$\frac{I}{nF} = J = D \times \frac{dc}{dx}$$

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \times \frac{\delta^2 C}{\delta X^2}$$

2.1.8 Elektrot reaksiyon hızını ve akımını etkileyen parametreler ve polarizasyon

Elektrokimyasal hücre sistemlerinde akım ya da elektrot reaksiyon hızı, ölçüm çözeltisinde ki kütle aktarımı, elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron transferi, elektron transferinin öncesinde ve sonrasında gerçekleşen reaksiyonlar, adsorpsiyon, desorpsiyon ve kristalizasyon gibi yüzey tepkimeleri aracılığıyla belirlenir.

Elektroanalitik esaslı yöntemlerin geneli, elektrokimyasal hücre sistemindeki akım değişiminin bir fonksiyonu olarak tayin edilen akım-gerilim eğrilerine dayanmaktadır.

Aşağıda verilen eşitlik, sabit bir elektrot geriliminde, hücre gerilimi ve akım arasında doğrusal bir bağıntının varlığını göstermektedir.

$$E_{hücre} = E_{katot} - E_{anot} - IR$$

Elektrokimyasal süreçlerde doğrusallıktan sapma durumlarına oldukça sık rastlanılır. Bu gibi durumlarda hücrenin polarize olduğu çıkarımı yapılır ve polarizasyon derecesi aşırı gerilim (η) ile açıklanır. Aşırı gerilime uğrayan elektrolitik hücre için gerilim aşağıdaki eşitlikle tanımlanır.

$$E_{hücre} = E_{katot} - E_{anot} - IR - \eta$$

Standart bir elektrokimyasal yarı hücrede üç ana bölge bulunmakta olup bunlar polarizasyonun gerçekleşme ihtimali olan elektrot yüzeyi, elektroda çok yakın bir çözelti tabakası ve ana çözeltidir.

Elektrokimyasal yarı hücrede bulunan elektroaktif türün elektrot yüzeyine doğru hareketi çok basamaklı olarak gerçekleşir. Bu basamaklar kütle aktarımı, kimyasal reaksiyon, fiziksel hal değişimi ve elektron transferi ara basamaklarından meydana gelmektedir. Bahsedilen ara basamaklardan biri toplam reaksiyon hızını ve böylece akımın büyüklüğünü belirleyebilir. Kütle aktarımı ise elektroaktif türün ölçüm çözeltisinden (ana çözelti) yüzey tabakasına doğru olan hareketini kapsamaktadır. Kütle

aktarım basamağı toplam reaksiyonun ve akımın hızını sınırlamasından dolayı derişim polarizasyonunun oluşmasında etkilidir. Bazı elektrokimyasal yarı hücre reaksiyonlarında elektroaktif türün yükseltgenme ve indirgenme hallerinin bulunduğu bir ara kimyasal reaksiyon basamağında bulunmaktadır. Bu ara basamak aynı zamanda elektron transfer mekanizmasında da etkili bir rol oynar. Bu tip bir ara basamak, reaksiyon ürünlerinin oluşum veya bozunma hızı ya da akımı sınırladığı zaman reaksiyon polarizasyonundan bahsedilebilir. Akımı sınırlayan diğer durumlar ise adsorpsiyon, desorpsiyon ve kristallenme gibi bazı fiziksel durumlardır. Bu durumların varlığında adsorpsiyon, desorpsiyon, kristallenme polarizasyonu oluşabilir. Sonuç olarak yük transferi polarizasyonu meydana gelir ve bu durumda yüzey tabakada bulunan yükseltgenen türlere ya da indirgenen türlerden elektroda doğru olan elektron transfer hızının yavaş gerçekleşmesi nedeniyle akımın sınırlanması söz konusudur. Voltametik tekniklerde derişim polarizasyonunun tam olduğu durumlarda çalışmak tercih edilir. Temel olarak derişim polarizasyonu şartlarını sağlamak amacıyla analit derişimleri oldukça düşük miktarlarda tutulurken elektrolit derişimleri yüksek miktarlarda tutulur. Ayrıca mikro elektrotlar gibi yüzey alanı küçük çalışma elektrot ile çalışmak oldukça idealdir. Elektrotlar arasında meydana gelen yükseltgenme ya da indirgenme reaksiyon hızı gerekli olan teorik akımı oluşturacak kadar hızlı değilse yük aktarım polarizasyonu gerçekleşir. Yük aktarım polarizasyonu sonucunda açığa çıkan aşırı gerilim bazı tipik özelliklere sahip olmakla birlikte bunlar; aşırı gerilim ile akım yoğunluğunun artması, aşırı gerilimin sıcaklık arttıkça azalması ve elektrot yüzeyinin kimyasal bileşime göre değişiklik göstermesidir. Aşırı gerilimin oluşması H_2 ve O_2 gibi gaz ürünlerin oluştuğu elektrokimyasal süreçler açısından oldukça önemlidir (Bard vd. 1980).

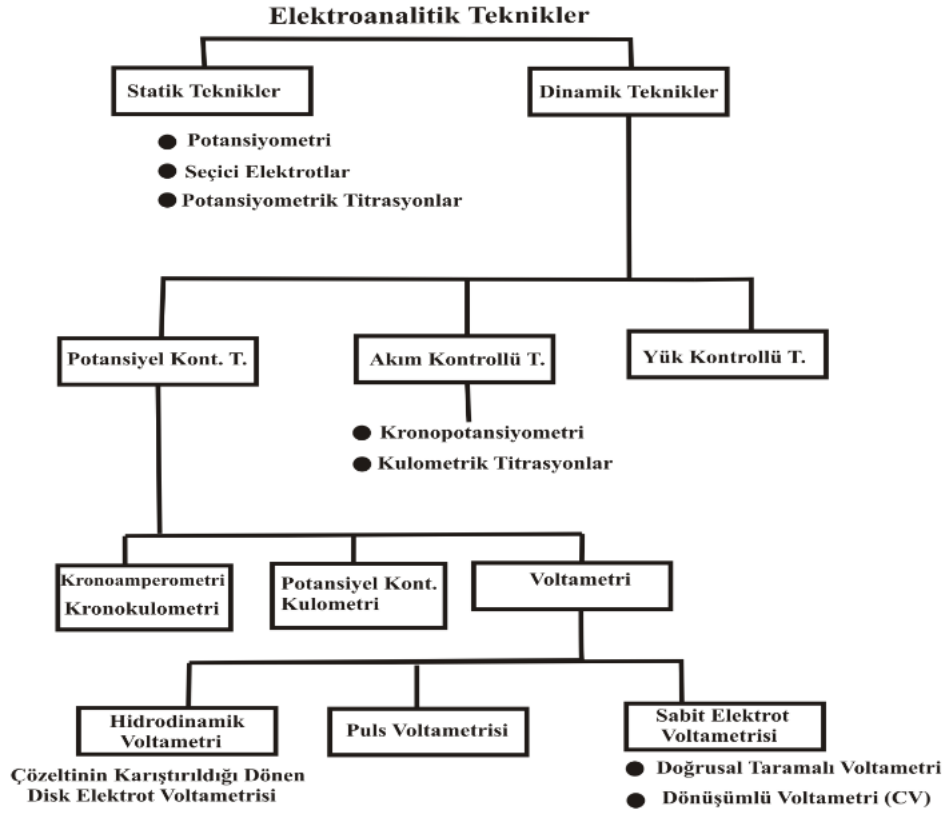
2.1.9 Temel elektroanalitik teknikler

Elektroanalitik teknikler en genel anlamıyla sınıflandırıldığında voltametri, potansiyometri, kulometri ve kondüktometri gibi tekniklerin yer aldığı **şekil 2.3**'teki bir sınıflandırmadan oluşmaktadır.



Şekil 2.3 Temel elektroanalitik tekniklerin şematik gösterimi ve en genel sınıflandırılması (Anonim)

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde elektroanalitik tekniklerin çok çeşitli şekilde sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 2.4). Genel olarak bakıldığında elektroanalitik teknikler net akımın sıfır olduğu denge konumundaki statik teknikler ve denge durumunun olmadığı net akımın gözlemlenebildiği dinamik teknikler olmak üzere ikiye ayrılır. Dinamik tekniklerin çoğunluğu akım veya potansiyel temellidir. Akımın veya potansiyel kontrollü bu tekniklerde söz konusu parametreler büyük genlikli ya da küçük genlikli olarak uygulanmaktadır. Büyük genlikli teknikler diğer teknikler ile kıyaslandığında daha yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.4 Temel elektroanalitik tekniklerin şematik gösterimi ve detaylı sınıflandırılması (Anonim)

Esas olarak elektroanalitik teknikler, hücrenin elektrokimyasal özelliklerinin gözlemlenmesine ve belirlenmesine dayanan yöntemlerdir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde elektroanalitik tekniklerin bilimsel araştırmalarda sıklıkla kullanıldığı göze çarpmaktadır. Elektroanalitik teknikler endüstriyel tabanlı malzemelere, farmasötik maddelere, biyolojik sıvı ve numunelere kolaylıkla uygulanabilmektedir. Elektroanalitik teknikler aracılığıyla oldukça düşük tayin sınırlarına inebilmek mümkündür. Ayrıca elektroanalitik teknikler sayesinde mekanizma tayini yapılabilmektedir. Genel olarak her elementin özel bir yükseltgenme basamağı bulunduğundan elektroanalitik yöntemler bu durum için sınırlandırılabilir. Bu tekniklerde kullanılan cihaz parçaları görece az maliyetlidir. Tüm bunlara ek olarak çözelti ara yüzeyindeki yük aktarım hızı ve stokiyometrisi, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon-desorpsiyon ve kemisorpsiyon olayları, kimyasal reaksiyonların hızı ve denge sabitleri gibi önemli olaylar hakkında bilgi sahibi olunabilir. Yukarıda bahsedilen

bu özelliklerden dolayı, elektrokimyasal teknikler diğer tekniklere göre daha avantajlıdır.

Ayrıca elektroanalitik tekniklerin bir diğer sınıflandırılma şeklide çözelti ara yüzeyinde veya çözelti ortamının neredeyse tamamında meydana gelen değişimlerin incelendiği teknikler olarak da iki sınıfa ayrılmaktadır. Polarografi ve voltametri en çok tercih edilen elektroanalitik tekniklerdendir. Çözelti ara yüzeyi tekniklerinde, fiziksel ve kimyasal değişimler, elektrot yüzeyi ve çok ince çözelti tabakaları arasında gerçekleşir. Ara yüzeyde tekniği olarak kabul edilen voltametri ve potansiyometri, duyarlılık, seçicilik ve uygulanabilirlik gibi kolaylıkları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Özkan vd. 2003).

2.1.9.1 Voltametri tekniği

Tez deneyleri kapsamında elektroanalitik teknikler içerisinde voltametri tekniği tercih edilmiş ve bütün elektrokimyasal süreçler bu teknik üzerinden yürütülmüştür.

Voltametri, akımın uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü kontrollü değişken potansiyelde ($i \neq 0$) çalışan bir grup elektroanalitik tekniktir. Voltametri ilk kez, 1959'da Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülen Çek kimyager Jaroslav Heyrovsky tarafından polarografinin keşfinden sonra geliştirilmiştir. Bu keşfe ek olarak, 1960 ve 1970 yıllarında voltametri alanında teoriler, yöntemler ve aletler geliştirilerek duyarlılığı artırılmış ve elektroanalitik tekniklerin yelpazesi genişletilmiştir. Statik potansiyometrik tekniklerin aksine voltametri, bir elektrokimyasal reaksiyonu (Faradik reaksiyon) tetiklemek/kuvvetlendirmek için analiz edilecek çözeltiye harici bir enerji kaynağı yükler. Herhangi bir analit türü için, elektrokimyasal olarak indirgenebildiği veya oksitlenebildiği sürece, ortaya çıkan faradik akım (i_F), derişim ile doğru orantılıdır.

Voltametrimin birtakım avantajları bulunmaktadır;

- Birden fazla analite ile geniş bir derişim aralığında çalışma imkânı
- Yüksek seçicilik
- Yüksek hassasiyet
- Düşük alt tayin alt sınırında çalışabilme

- Geniş bir sıcaklık aralığında çalışabilme imkânı
- Hızlı analiz süreleri (birkaç saniye)
- Eşzamanlı algılama imkânı
- Türleşme ve kinetik parametreleri belirleyebilme
- Kimyasal ve/veya elektrokimyasal reaksiyonların mekanizmalarını aydınlatabilme yeteneği

Voltametri tekniği temel olarak seçilen bir potansiyel penceresinde elektroaktif türün yükseltgenmesi ya da indirgenmesiyle oluşan anodik/katodik akımın ölçümüne dayanır. Özetle, analitin indirgenmesi veya oksidasyonunun gerçekleştirilebileceği iyi tanımlanmış belirlenen bir aralıkta potansiyel taraması yapılır (artırarak/azaltarak), ve bir eğrinin fonksiyonu olarak ortaya çıkan akım elde edilir. $i=f(E)$ eşitliği sonucunda elde edilen grafik voltamogram olarak adlandırılır. Ek olarak, kaydedilen voltamogram, oksidasyon veya indirgeme reaksiyonunda yer alan redoks türlerinin elektrokimyasal davranışını yansıttığından, bununla ilgili nicel/nitel bilgi sağlamaktadır (Batley ve Florence 1974).

Tipik her üç elektrotlu sistemin kendi termodinamik özellikleri vardır, özellikle elektrot potansiyeli, sistem için önemli bir referans noktasıdır, çünkü hücrede hiçbir akımın ($i=0$) akmadığı denge durumunu tanımlar. Sıfır akımda, elektrolitin elektrolizine neden olmadan üzerinde çalışılabilecek potansiyel penceresinin olması önemlidir (Osteryoung 1993).

Redoks çiftinin (analit) mevcudiyetinde, çalışma elektrodunun termodinamik potansiyeli (E_{th}), standart potansiyeline (E^0) ve ayrıca elektrot yüzeyinde redoks çiftinin oksitlenmiş ve indirgenmiş formlarının derişim oranına bağlıdır. Termodinamik potansiyel, aşağıdaki denklemlerle tanımlanır;

$$E_{th} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_{red}}{C_{ok}} \right)$$

Bu eşitlikte;

R= Gaz sabiti ($8,3144 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

t = Sıcaklık (K)

n = Elektron transfer sayısı

F = Faraday sabiti (96480 C mol^{-1})

E° = Standart potansiyel

$C_{\text{red}}/C_{\text{ok}}$ = Redoks çifti oranı

olarak tanımlanmaktadır.

Bu nedenle, herhangi bir ek potansiyel (termodinamik gereksinimlerin ötesinde), belirli olmayan bir hızda bir elektrokimyasal reaksiyonu tetikler. Hız, elektrot malzemesine, destek elektrolitine ve analitin elektroaktif davranışına bağlı olabilmektedir. Redoks türleri (depolarizörler) içeren bir elektrolit çözeltisine daldırılan bir çalışma elektrodunun termodinamik potansiyeli ile hücrede bir i_F akışı olduğunda yeni denge durumunu karakterize eden farka polarizasyon denir. Polarizasyon derecesi aşırı potansiyel Z ile ölçülür. Akım-potansiyel eğrileri, özellikle kararlı durum koşulları altında elde edilenler, bazen polarizasyon eğrileri olarak adlandırılır ve aşağıdaki denklem aracılığıyla hesaplanır;

$$\eta = E - E_{th}$$

η = Sıfır akımda ölçülen aşırı potansiyel

E = Redoks çiftinin tersine çevrilebilirliğini belirleyen bir kinetik parametre

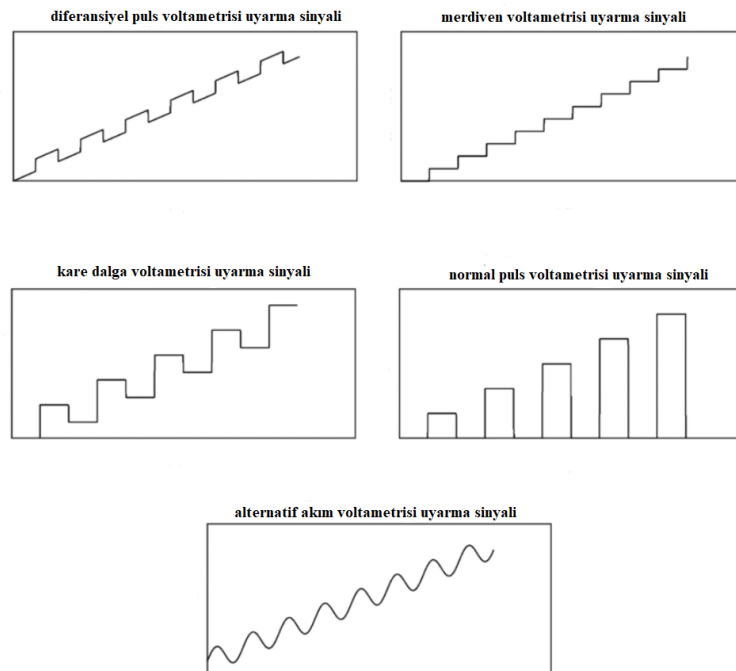
E_{th} = Bir katodik veya anodik elektrokimyasal reaksiyonu tetiklemek için gerekli uygulanan potansiyeldir.

Voltametrik teknikler genellikle katı elektrotlar yardımıyla analitin yükseltgenme sürecinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Karbon temelli elektrotlara voltametri tekniği uygulandığında ise yükseltgenme ve indirgenme bölgesinde yani geniş bir çalışma aralığında çalışabilmek mümkündür

Voltametrik tekniklerde yaygın olarak kullanılan başlıca elektrotlar; inert metallerden elde edilen elektrotlar (altın, platin ve rutenyum), karbon temelli elektrotlar (camı karbon elektrot, kalem grafit elektrot ve pirolitik grafit elektrot) ve yarı iletken elektrotlardır (titanyum dioksit, çinko oksit ve iridyum oksit). Katı elektrotların şekilleride kendi içerisinde değişkenlik göstermektedir. Örneğin, levha, tel, disk ve silindirik tipte olan elektrotların yanı sıra sabit, döner ve titreşen elektrot tipleri de vardır.

2.1.9.1.1 Voltametrik tekniklerde uygulanan uyarma sinyallerinin incelenmesi

Elektrokimyasal hücre sistemine belirlenen ve istenilen potansiyel aralığında sinyaller uygulanabilir. Bu sinyaller, ölçüm sonucunda spesifik akım yanıtlarının alınmasını sağlamaktadır. Voltametri tekniği kapsamında en fazla kullanılan 5 uyarma sinyalinin **şekil 2.5**'de gösterilmiştir. Bahsedilen uyarma sinyalleri sırasıyla; doğrusal taramalı, merdiven, diferansiyel puls, normal puls, kare dalga ve alternatif akım sinyalleridir (Osteryoung 1983).



Şekil 2.5 Voltametri tekniği kapsamında en fazla kullanılan sinyallerin şematik gösterimi (Anonim)

2.1.9.1.2 Doğrusal taramalı ve dönüşümlü voltametri

Hem doğrusal taramalı voltametri hem de dönüşümlü voltametri tekniğinde çalışma elektrotu, yüklü türlerin ve ürünlerin göçünün önüne geçebilmek amacıyla belli miktardaki destek elektrolit içeren karıştırılmamış bir çözeltiye daldırılır, böylece elektroaktif türlerin elektrot yüzeyine ve elektrot yüzeyinden herhangi bir yere aktarımı yalnızca difüzyon yoluyla gerçekleştirilir. Doğrusal taramalı voltametride çalışma elektrodunun potansiyeli, **şekil 2.6'** daki grafikte gösterildiği gibi zamanla doğrusal olarak değiştirilir. Elektrot yüzeyinde herhangi bir reaksiyonunun olmadığı bir potansiyelden başlanarak analit indirgendiği (daha negatif değerler) veya oksidasyona (daha pozitif değerler) uğradığı potansiyele doğru hareket eder, böylece uygulanan anlık potansiyel aşağıdaki denklemdeki gibi ifade edilebilir (Parker 1986);

$$E_t = E_i \pm vt$$

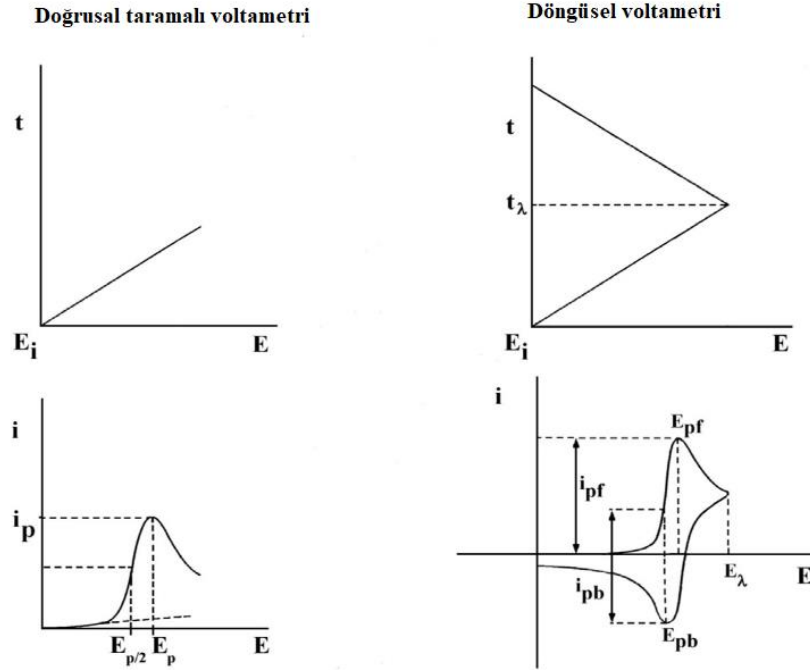
Denklemden yer alan niceliklerin açıklamaları aşağı verilmiştir;

E_t = herhangi bir t zamanında elektrot potansiyeli

E_i = başlangıç potansiyeli

v = tarama hızı, yani potansiyel değişimin sabit hızının mutlak değeri

$\pm$ = İşaret, potansiyel tarama yönüne bağlıdır (anodik taramalar için pozitif ve katodik taramalar için negatiftir).



Şekil 2.6 Doğrusal taramalı ve dönüşümlü voltametri tekniği ile elde edilen sinyallerin incelenmesi (Anonim)

2.1.9.1.3 Polarografi tekniği

Polarografi, ilk bulunan ve voltametrinin oluşumuna neden olan temel bir elektrokimyasal tekniktir. Polarografi tekniğinde çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodu kullanılmaktadır. Polarografi tekniği damlayan civanın yükseltgenmesi sebebiyle daha çok indirgenme süreçlerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Destek elektrolitin polarogramı incelendiğinde ise ortamda analizi yapılacak madde olmadığında bile hücrede artık akım olarak adlandırılan küçük bir akımın meydana geldiğini göstermektedir.

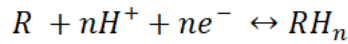
Akımın büyüklüğü analizi gerçekleştirilecek analitin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile kısıtlandığı zaman sınır akımları gözlenir. Kütle aktarımı difüzyonla gerçekleştiği için polarografik sınır akımlarına genel olarak difüzyon akımları adı verilir ve i_d ile gösterilir. Polarografik sınır akımları aynı zamanda difüzyon akımı ile artık akımlar arasındaki fark demektir. Difüzyon akımı ile analizi gerçekleştirilecek analitin derişimi birbiri ile doğru orantılıdır.

Artık akımların oluşum sebepleri; çözelti ortamında bulunan safsızlıkların indirgenmesi ve buna ek olarak safsızlıkların içerisinde bulunan düşük miktardaki serbest oksijen, saf

suda bulunan ağır metal iyonları ve destek elektrolit içerisinde var olan tuzdaki safsızlıklar olabilir.

Polarografi tekniğinde, doğruluk ve hassasiyet, faradayik olmayan artık akımın şiddetine göre değişmekte olup doğru bir sonuç elde etmek amacıyla artık akımın etkisini giderme çözümüne gidilir.

Polarografi tekniği çözelti ortamının pH'sına karşı duyarlılık gösterir. Bu nedenle bazı organik ve inorganik madde reaksiyonlarını incelemek faydalıdır.



Bu reaksiyonda

R= analitin yükseltgenmiş hali

RH_n= analitin indirgenmiş hali

olarak tanımlanmaktadır.

Örnek gösterilen bileşiklerin yarı-dalga potansiyelleri eşitlikten anlaşılacağı gibi büyük ölçüde pH değişimine bağlıdır. Çoğu durumda pH değişimi reaksiyon sonucunda oluşan ürünün tamamen değişmesine neden olmaktadır. Bu sebepten analizin gerçekleştirileceği çözelti çok iyi bir şekilde tamponlanmalıdır. İyi tamponlama işlemi yapılmadığı durumlarda elektrot yüzeyinin pH'sı büyük ölçüde değişmektedir. Bu ve benzeri değişiklikler, reaksiyonun indirgenme potansiyelini etkiler ve yayvan görümlü eğrilerin elde edilmesine sebep olur. Özellikle organik bileşiklerin tampon hassasiyeti çok yüksektir ve tekraredilebilir sonuç elde edebilmek amacıyla pH değişimine çok dikkat etmek gereklidir. Polarografi tekniğinde akım, çalışma elektrodu yüzeyinde var olan türlerin indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sonucunda oluşmaktadır. İndirgenmeden kaynaklı meydana gelen akım, katodik akım olarak yükseltgenmeden kaynaklı meydana gelen akım anodik akım olarak nitelendirilir. Polarografi tekniği, dalga yüksekliğinin elektroaktif türün derişimi ile doğru orantılı olarak arttığı için kantitatif analizlerde kullanılabilir. Buarada dalga yükseliği, sınır akımı ve artık akım arasındaki yükseliği ifade eden bir terimdir.

Yarı dalga potansiyeli, sınır akımı değerinin akımın yarısına eşit olduğu potansiyel olarak ifade edilmektedir. Yarı dalga potansiyeli aşağıdaki örnek polarogramda gösterildiği (**Şekil 2.7**) gibi $E_{1/2}$ ile ifade edilmektedir. Genel olarak yarı dalga potansiyel değeri elektroaktif türün derişimine bağlı olmamakla birlikte standart yarı hücre potansiyeline tamamen bağlıdır. Yarı dalga potansiyeli her analit türü için karakteristik bir değere sahip olması özelliğinden kaynaklı olarak polarografi tekniği kalitatif analizlerde oldukça ilgi görmektedir.

Fick kanunları aracılığıyla belirlenen diferansiyel denklemlerin küresel elektrot için çözülmesiyle ortalama akım Ilkoviç eşitliği ile açıklanır (Buckley ve Taylor 1945).

Ilkoviç eşitliği aşağıdaki gibi açıklanmaktadır;

$$(\dot{I}_d)_{ort} = 607nCD^{1/2} m^{2/3} t^{1/2}$$

Bu eşitlikte;

i= damla ömrü sonucundaki akım, A

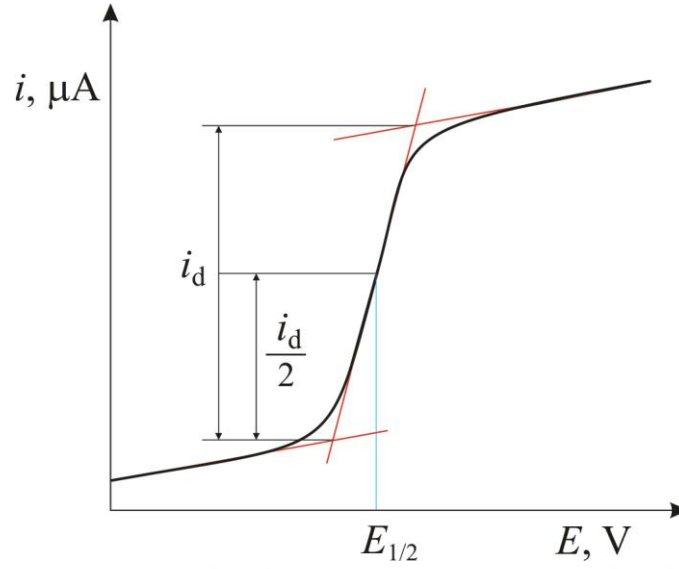
n= aktarılan elektron sayısı, eq mol⁻¹

C= Ana çözeltideki depolarizer derişimi, mol cm⁻³

m= Civa akış hızı, g s⁻¹

t= Damlanın ömrü

olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 2.7 Polarografi tekniğinin örnek bir polarogram ile açıklanması (Anonim)

Tipik bir polarografi deneyinde meydana gelen civa sütunun yüksekliği sabit bir değer olarak tutulduğunda damla ömrü ve civanın akış hızı ve sabit kalır. Deney sabit sıcaklıkta gerçekleştirildiğinde difüzyon katsayısı değeri de sabit kalacağından Ilkoviç denklemi aşağıdaki şekilde uyarlanabilir.

$$i_d = kC$$

Yukarıdaki denklemde, C ifadesi ana çözeltinin derişimi olduğu için polarografi tekniği kantitatif analizlerde rahatça kullanılabilir. Ayrıca yukarıda açıklanan denklem, koordinat sisteminde sıfır noktasından geçen bir doğrunun denklemi olarak ifade edilebilir.

Polarografi tekniğinde difüzyon kontrollü sınır akımı dışında kinetik ve adsorpsiyon kontrollü akımlar da bulunmaktadır. Elektroaktif türün bir kimyasal tepkimeye uğraması sonucunda kinetik akım gözlenmektedir. Elektroaktif türün derişimi, kimyasal tepkimenin hızı ile kontrol edildiği için bu akım kinetik akım olarak adlandırılır.

Bazı durumlarda akım, elektrot yüzeyine elektroaktif türün, ürünün ya da çözelti ortamında var olan birtakım maddelerin adsorpsiyonu aracılığıyla kontrol edilmektedir. Açıklanan akıma ise adsorpsiyon akımı adı verilmektedir.

2.1.9.2.1 Puls polarografisi

Puls polarografisinde, polarografik hücreden geçen akımın üç önemli bileşeni vardır;

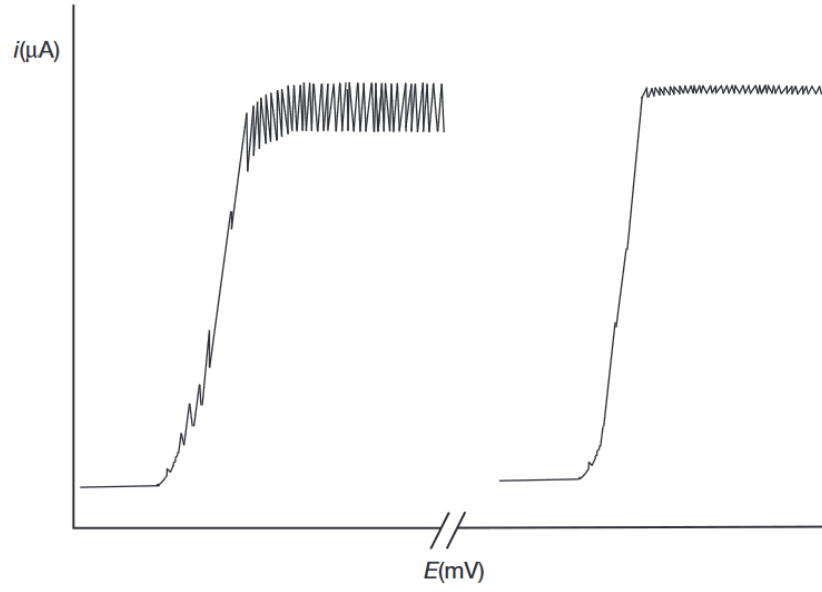
- Damlayan civa elektrotunda devam eden elektrot reaksiyonları ile bağlantılı bir arka plan difüzyon akımı (polarizasyon pulsundan önce)
- Damlayan civa elektrotunun çift katmanlı kapasitesinin şarj edilmesi ve boşaltılması ile ilişkili, puls tarafından üretilen bir akım.
- Elektrot reaksiyonlarının hızlarındaki değişikliklerle bağlantılı, puls tarafından üretilen bir akım.

Yüksek hassasiyet elde etmek için polarogramın şekli bunların birinci ve ikincisinden tamamen bağımsız olmalıdır (Bontempelli vd. 2019).

2.1.9.2.2 Normal puls polarografisi

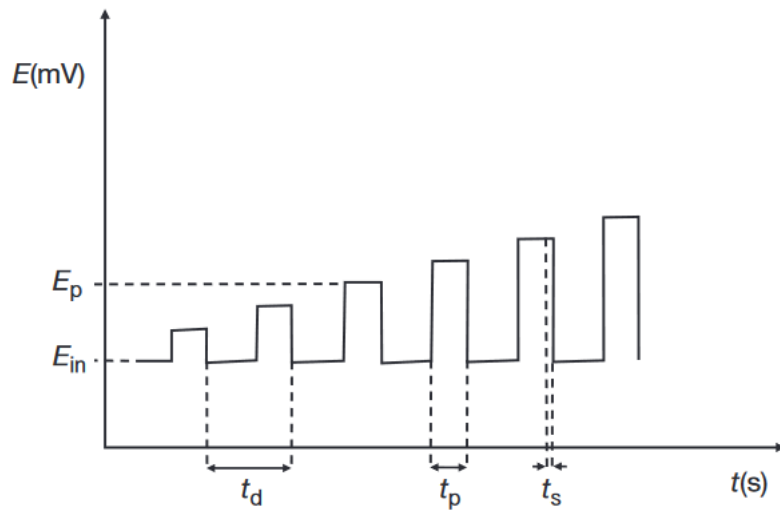
Polarografi tekniği alanında kaydedilen büyük gelişmeler, zamanla farklı difüzyon ve kapasitif akım varyasyonlarından yararlanılabileceğini ve puls tekniklerinden yardım alınılabileceğini göstermiştir. Aslında, akım bir darbe sonunda örneklendiğinde, faradik bileşen hala önemliyken kapasitif akım ihmal edilebilmektedir (Parry ve Osteryoung 1965).

Normal puls polarografisinde, civa damla elektrodu, damlama süresinin büyük bir kısmı boyunca, hiçbir elektrokimyasal reaksiyonun meydana gelmediği sabit bir potansiyel E_i 'nde tutulur. Her damlanın ömrünün son aşamasında, bir t_p süresi (birkaç ms mertebesinde) için potansiyel bir ΔE pulsu uygulanır. E_i ve t_p değerleri polarogramların kaydı boyunca sabit tutulurken, E_p damladan damlaya doğrusal olarak artar.



Şekil 2.8 Klasik ve güncel polarogramların karşılaştırılması (Anonim)

Akım-potansiyel eğrilerinin şekli (**Şekil 2.8**), klasik polarogramlarda olduğu gibi sigmoidaldır ve sınırlayıcı akım difüzyon kontrollüdür. Normal puls polarografisi ve klasik polarografi tekniği için kapasitif akımlar temelde aynıdır, ancak t_p (birkaç ms) için benimsenen çok düşük değerler sayesinde faradik akımlar normal puls polarografisi için belirgin şekilde daha yüksektir (**Şekil 2.9**). Bu kısa süreler, ömrünün sonunda ulaşan civa damlasının yarıçapına kıyasla her iki difüzyon tabakası kalınlığını çok küçük yapar ve puls uygulaması sırasında damla alanı neredeyse sabit kalır.



Şekil 2.9 Normal puls polarogramının puls mekanizmasının gösterilmesi (Anonim)

Normal puls polarografisinde damlayan civa elektroduna zamanla uygulanan potansiyel dizi, düşme ve örnekleme sürelerinin yanı sıra puls süresinin bir göstergesidir (Christie vd. 1966).

$$i_L = nFA_t C \times \left(\frac{D}{\pi t_p}\right)^{1/2}$$

Bu eşitlikte;

A_t = potansiyel pulsun başlangıçtakıdamla yüzeyi

F = Faraday sabiti

n = transfer edilen elektron sayısı

C = derişim

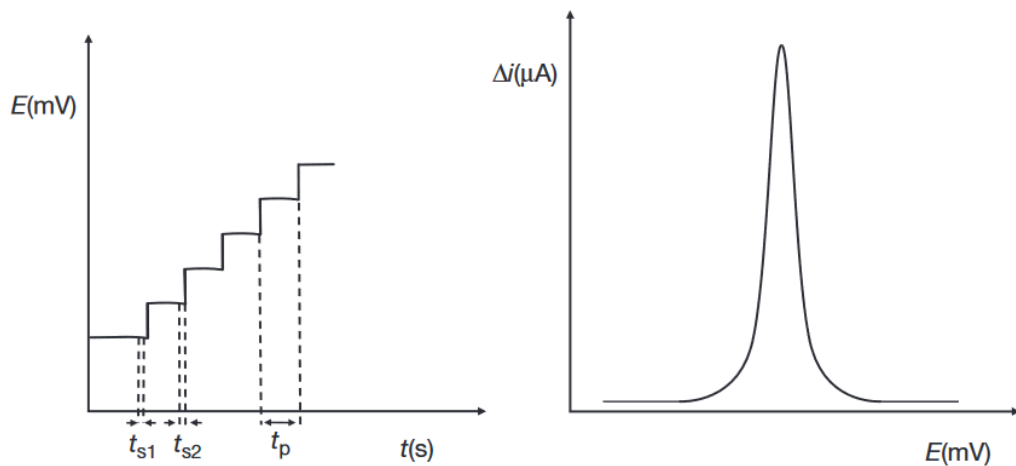
D = difüzyon katsayısı

t_p = potansiyel süresi

olarak tanımlanmaktadır.

Sonuç olarak normal puls polarografisi, klasik polarografiden 10 ile 20 kat daha hassastır.

2.1.9.2.3 Diferansiyel puls polarografisi



Şekil 2.10 Diferansiyel puls polarogramının puls mekanizmasının gösterilmesi (Anonim)

Diferansiyel puls polarografisinde, damlayan civa elektrodu, **şekil 2.10**'da gösterildiği gibi, sabit genlikli ΔE 'nin (genellikle yaklaşık 50 mV) periyodik puls potansiyelinin üst üste bindirildiği doğrusal bir potansiyel taramasına tabi tutulur. Potansiyel puls, yine senkronize bir zamanda bir aparat tarafından ayrılan civanın düşüşünün ömrünün son 50 ms'si sırasında uygulanır. Akım, her damla ömrü t_d sırasında iki kez örneklenir. Bu örnekleme darbeden (t_{s1}) hemen önce ve düşmeden (t_{s2}) hemen önce olarak ifade edilir. Akım farkı $\Delta i = i(t_{s2}) - i(t_{s1})$ potansiyele karşı çizilir ve pikşeklinde polarogramlar elde edilir (Rifkin & Evans, 1976).

Diferansiyel puls polarogramlarının pikşekli, $E_{1/2}$ 'den yeterince düşük potansiyelerde (henüz faradik sürecin olmadığı yerde), hem $i(t_{s2})$ hem de $i(t_{s1})$ sıfır olduğu düşünülerek açıklanmaktadır. Benzer şekilde, $E_{1/2}$ 'den yeterince yüksek potansiyelerde (difüzyon sınırlı akımın erişildiği plato bölgesine karşılık gelir), faradik süreç maksimum hızda gerçekleşir, böylece akım potansiyelden bağımsızdır ve Δi yine sıfırdır (Rifkin ve Evans 1976).

2.1.9.2.4 Kare dalga polarografisi

Kare dalga polarografisi, ilk olarak 1952'de Barker tarafından alternatif akım polarografisinin geliştirilmiş bir versiyonu olarak ileri sürülmüştür. Küçük bir genlik sinüs dalgası voltajının lineer bir voltaj rampası üzerinde üst üste bindirilmesine dayandırılmıştır. Böylece karmaşık enstrümantasyonlar ile ayrılabilen faradik, kapasitif ve empedans bileşenlerini birleştiren akımlar sağladığı düşünülmüştür. Kare dalga polarografisi'nde polarizasyon potansiyeli, üzerine küçük bir genlikli kare dalga voltajının (genellikle 200–250 Hz ve 5–50 mV genlik) bindirildiği olağan bir doğrusal voltaj rampası olarak kabul edilir. Yukarıda bahsedilen diğer puls polarografilerinden farklı olarak, kare dalga polarografisi, civa damlası düşüşünün tüm ömrü boyunca devam eder ve kare dalga uygulamasından önce ve sonra kısa bir süre (10-15 ms) örneklenen akım arasındaki akım fark olan Δi ihmal edilebilir bir zamanda örneklenir. Bu akım farkı, lineer olarak değişen potansiyele karşı çizilir, böylece pikbiçiminde voltamogramlar elde etmek mümkün olur. Bir damlayan civa çalışma elektrodu kullanıldığında, civa damlasının yüzey alanı deneyler boyunca sürekli değişir, bu nedenle zaman zaman toplanan verileri analiz etmek için karmaşık matematiksel modellemenin kullanılması gerekir. Ayrıca bazı ölçümler sırasında kapasitif bileşenleri

de oluştuğu gözlemlenir. Bu nedenle, günümüzde modern potansiyostatlarda mevcut olan birincil tekniklerden biri olan kare dalga voltametrisinden de bahsetmek gereklidir. Kare dalga voltametri aracılığıyla güvenilir ve tekrarlanabilir elektrokimyasal sinyallerin hızlı bir şekilde elde edilebilmesi mümkündür. Kare dalga voltametri, kare dalga polarografi tekniği ile kıyaslandığında çok daha avantajlıdır. Bunun nedeni kare dalga voltametri tekniğinde herhangi bir iletken malzemeden oluşan sabit elektrotlarda kullanılabilir. Fakat Statik civa damlaları ile yürütölen kare dalga polarografisinde, tüm potansiyel dizisi tek bir damlaya uygulanır. Bu nedenle polarogramlar, diğer polarografik tekniklerin gerektirdiği çok daha uzun sürelerle kıyasla çok kısa sürelerde kaydedilir (Barker ve Jenkins 1952).

2.1.9.3 Voltametrik sistemler ve cihazların tanıtımı

Voltametrik deneyleri gerçekleştirebilmek amacıyla hücre sisteminin minimum iki elektrottan meydana gelmesi zorunludur. Analit ile temas halinde olan çalışma elektrodun, belirlenen potansiyel değerini kontrollö olarak uygulamalı ve hücre sisteminden geöen yükün analite ve analitten devreye aktarımını kolaylaştırması beklenir. Hücre sisteminde yer alan ikinci elektrot ise, hücrenin diğer yarısı gibi tamamlayıcı bir rol üstlenir. Söz konusu ikinci elektrot, çalışma elektrot potansiyelini kaydetmek amacıyla bilinen bir potansiyel değere sahip olmalıdır. Ayrıca bu ikinci elektrot çalışma elektrodu tarafından giren - çıkan elektrik yükünü mutlaka dengeleyebilmelidir. İkili elektrot sistemi her ne kadar bilenen ilk elektrot sistemi olsa da, bir takım eksiklikleri bulunmaktadır. Özellikle, ikinci elektrodun, çalışma elektrodundaki karşı indirgenme reaksiyonlarına bağlı akım geöişi gerçekleşirken sabit bir potansiyelde kalabilmesi oldukça güçtür.

Tüm bu problemlerin üstesinden gelebilmek amacıyla, bilenen bir referans potansiyeli oluşturma ve elektron sağlama süreçleri iki farklı elektrot arasında bölünmektedir. Referans elektrodun, bilinen belli bir indirgeme potansiyeline sahip olması beklenir. Referans elektrodun görevi, çalışma elektrodunun potansiyelini kaydetmek ve kontrol etmek için referans rolünü üstlenmek ve herhangi bir noktasından akım geöirmemektir. Buna ek olarak yardımcı elektrot ise çalışma elektrodunun yüzeyinde meydana gelen akımı dengelemek için gerekli tüm akımı üzerinden geöirmektedir. Bu akımı oluşturmak amacıyla, yardımcı elektrot genelde öözücü penceresinin yakınındaki aşırı potansiyelle

salınır ve burada destek elektrolitini oksitler ya da azaltır. Bahsedilen bu sistem günümüzde kullanılan üç elektrotlu sistemi oluşturmaktadır. Üç elektrotlu sistem hakkında detaylı bilgi tez kapsamında elektrokimya ana başlığı içerisinde detaylı olarak tartışılmıştır.

Mikroelektrot alanında yapılan hızlı gelişmeler ve özellikle elektroanalitik cihazların içerisine kullanımı pratik hazır amplifikatörlerin yerleştirilmesi bu alanda bulunan araştırmalara önemli katkılar sağlamıştır. Bu tür cihazlar iki akımdan oluşmakta olup bunlar sırasıyla; hücreye gerilim uygulayan bir polarize akım ve hücre akımının izlenmesi ile ölçülen akımdır. Modern voltametri tekniğinin mekanizması, hücrenin direncinden gelen hataları minimuma indiren çalışma elektrodunun potansiyostatik kontrolüne dayanmaktadır. Potansiyostatik kontrole imkân sağlayan üç elektrot sistemi ile hücre direnci sorunu büyük oranda giderilmiştir. Üç elektrotlu sistemde karşılaştırma elektrodu ve çalışma elektrodu mümkün olduğunca birbirine yakın konumlandırılır. Yardımcı elektrot ise akım taşıyıcı elektrottur ve akım yolunun tamamlanması için çözeltiye yerleştirilir. Böylelikle akım, çalışma elektrot ve yardımcı elektrot arasında çözelti boyunca akmaktadır. Çalışma elektrodunun bütün bölgelerinde akım rotasının eşit ve aynı olması için bütün bu elektrotların simetrik olarak hücrede konumlandırılması oldukça önemlidir. Karşılaştırma elektrodunun ve çalışma elektrodunun birbirine çok yakın olduğu durumlarda karşılaştırma elektrodundan sıfır akım geçer ve bu durum hücre direncinin yani ohmik gerilimin (IR) en aza indirgenmesini sağlar. Geliştirilen tüm çözümlere ve çabalara karşın elektrokimyasal çalışmalarda ohmik gerilim tam anlamıyla sıfırlanamadığından elektrokimyasal ölçümlerden elde edilen gerilimlerde IR'nin etkisi de bulunmaktadır (Compton ve Banks 2018).

2.1.9.4 Sıyırma voltametrisi ve öneminin incelenmesi

Tüm voltametrik teknik içerisinde (alternatif akım, kare dalga ve diferansiyel puls voltametrisi) sıyırma voltametrisinin önemli bir rolü ve etkisi bulunmaktadır. Sıyırma voltametrisi sayesinde çok düşük tayin limitlerine inebilmek mümkündür. Ayrıca sıyırma voltametrisi günümüz polarografik tekniklere kıyasla daha duyarlı ve faradaik akım bakımından istenilen performansı vermektedir. Sıyırma voltametrisi temel olarak ön deriştirme aşamasında elektrot yüzeyinde biriktirilen analitin sonra herhangi bir

polarografik teknik aracılığıyla sıyırılması, yani çözeltiye tekrar geri verilerek ölçümüne dayanmaktadır. Sıyırma voltametrisi teknikleri kendi arasında dört sınıfa ayrılmaktadır. Bu teknikler sırasıyla; anodik sıyırma, katodik sıyırma, adsorptif sıyırma ve potansiyometrik sıyırmadır (Kalvoda 1994).

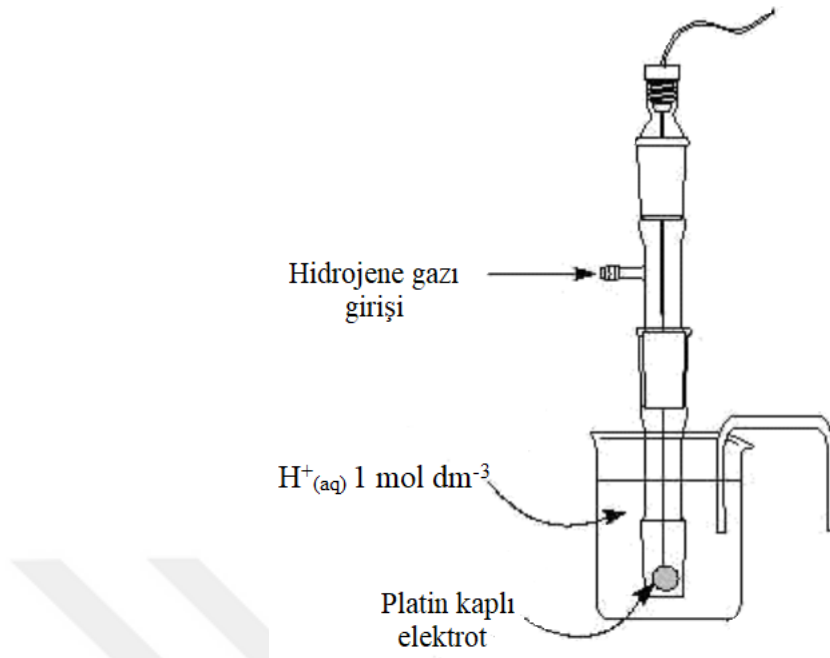
2.1.9.5 Voltametri tabanlı elektrokimyasal süreçlerde kullanılan elektrotlar

Voltametrik ölçümlerde doğru referans elektrot kullanımı büyük önem taşımaktadır. Pratik bir referans elektrot kolayca ve tekrarlanabilir şekilde hazırlanmalı ve muhafaza edilmeli, nispeten ucuz olmalı, zaman içinde stabil olmalı, çok çeşitli koşullar altında kullanılabilir olmalı, tersinir olup Nernst eşitliğine uymalı, potansiyeli sabit olmalı ve çok düşük akım değerleri uygulandığında başlangıç potansiyellerine dönebilmelidirler. En yaygın kullanılan iki ikincil referans elektrottan kalomel ve gümüş-gümüş klorür elektrotlardan gümüş-gümüş klorür elektrotlar tüm bu gereksinimleri oldukça iyi karşılar. Ek olarak gümüş-gümüş klorür elektrotlar, kalomel elektrottan daha sağlamdır ve boyut bakımından kolayca küçültülür. Bu tür cihazların birçok farklı tasarımı literatürde mevcuttur.

2.1.9.5.1 Referans elektrot tipleri ve özellikleri

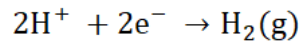
2.1.9.5.1.1 Standart hidrojen elektrodu (SHE)

Standart hidrojen elektrot bir redoks elektrodu olarak kabul edilir ve yükseltgenme ile indirgenme potansiyellerinin termodinamik bakımdan ölçülebilir olmasının temelini oluşturmaktadır (**Şekil 2.11**). Standart bir elektrot potansiyeli oda koşullarında (25°C) 4,44 V olmasına karşın, diğer tüm elektrot reaksiyonları ile karşılaştırılabilir olması bakımından, hidrojenin standart elektrot potansiyel değeri (E^0) genel olarak tüm sıcaklık değerinde sıfır olarak kabul edilmiştir. Herhangi bir elektrodun potansiyeli, standart hidrojen elektrodunun aynı sıcaklıktaki potansiyeli ile karşılaştırılır (Isse ve Gennaro 2010).



Şekil 2.11 Standart hidrojen elektrodunun şematik gösterimi (Anonim)

Standart hidrojen elektrodunun bilinen yarı hücre reaksiyonu aşağıdaki gibidir;



Yukarıda ifade edilen redoks reaksiyonu platin kaplı bir elektrot yüzeyinde meydana gelmektedir. Platin kaplı bir elektrot kullanılmasının sebepleri;

- Elektrot yüzey alanının yüksek olması avantajı (elektrodun yüzey alanı ne kadar yüksek olursa elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyon kinetiği o kadar hızlıdır),
- Ortamda bulunan hidrojeni kendi arayüzeyinde adsorblayabilecek bir elektrot malzemesinin kullanımının avantajı (bu durumda elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyon kinetiğini hızlandırır).

olarak sıralanabilir (Smith ve Stevenson 2007).

Standart hidrojen elektrodu için Nerst denklemi tekrar düzenlenecek olursa;

$$E = \frac{RT}{F} \times \ln \frac{a_{H^+}}{\sqrt{p_{H_2}/p^0}}$$

veya

$$E = -\frac{2.303RT}{F} \times pH - \frac{RT}{2F} \ln p_{H_2}/p^0$$

şeklinde düzenlenebilir.

a_{H^+} = Hidrojen iyonu aktivitesi ($a_{H^+} = f_{H^+} C_{H^+} / C^0$)

p_{H_2} = Hidrojenin kısmi basıncı (pascal, Pa)

R = Gaz sabiti

T = Sıcaklık (Kelvin, K)

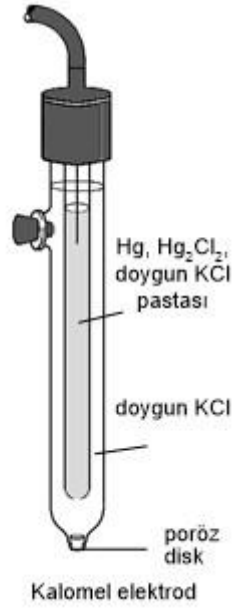
F = Faraday sabiti (1 mol elektronun yükü, $9,6485309 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$)

p^0 = Standart basınç (10^5 Pa)

Elektrokimyada kullanılan ilk referans elektrot standart hidrojen elektrotudur. Fakat standart hidrojen elektrodunun hazırlanması kompleks basamaklar gerektirdiğinden elektrokimyasal uygulamalarda diğer referans elektrotlar daha çok tercih edilmektedir.

2.1.9.5.1.2 Doygun kalomel referans elektrodu (Hg/Hg₂Cl)

Doygun kalomel elektrotun hazırlanması standart hidrojen elektroduna kıyasla daha basit bir hazırlama prosedüründen oluştuğu için ve bu durum deneysel çalışmalarda kolaylık sağladığı için daha çok tercih edilirler. Fakat kullanımı her elektrokimyasal sistem için uygun değildir. Bunun sebebi çok yüksek sıcaklık katsayılarına sahip olmalarından kaynaklıdır. Oldukça kolay ve basitçe hazırlanan doymuş bir kalomel elektrot örneği **şekil 2.12**'de görülmektedir.

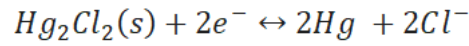


Şekil 2.12 Doygun kalomel elektrodunun şematik gösterimi (Anonim)

Doygun kalomel referans elektrot basitçe, içi potasyum klorür dolu U biçiminde bir tüpten oluşan olan tuz köprüsü, poröz bir disk ve doymuş civa pastasından meydana gelir. Tuz köprüsü kısmı indikatör elektrodu içeren çözelti ile elektriksel bağlantı kurar. Tuz köprüsünün en uç kısmında poröz yapılı cam disk ya da pamuk bir tıkaç bulunmaktadır. Bu şekilde hücre sıvısının sifon tekniği aracılığıyla transferi sağlanırken hücre çözeltisinin yabancı iyonlarla kontamine olması önlenir. Buna ek olarak test tüpü içerisine %5'lik agar jel konularak potasyum klorürle doyurulabilir (Larson vd. 1961).

Doygun kalomel refrans elektrodun oda koşullarında (25°C) elektrot potansiyeli standart hidrojen elektrodu ile kıyaslandığında +0,244 V' dur.

Doygun kalomel refrans elektrodunun bilinen yarı hücre reaksiyonu aşağıdaki gibidir;



Doygun kalomel refrans elektrodu için Nerst denklemi tekrar düzenlenecek olursa;

$$E = E^0 - 0.0591 \log a_{Cl^-}$$

şeklinde düzenlenebilir.

Doygun kalomel referans elektrodunun hücre potansiyeli ise aşağıdaki eşitlik aracılığıyla hesaplanır;

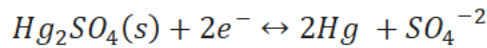
$$E = E^0 - \frac{0.0591}{2} \log [Cl^-]^2 = 0.244 V$$

2.1.9.5.1.3 Civa sülfat referans elektrodu (Hg/Hg₂SO₄)

Civa sülfat referans elektrotların en büyük dezavantajı civa içermeleridir. Civa sülfat tuzu, sulu çözeltilerdeki çözünürlük karakterinin yüksek olmasından kaynaklı olarak hidroliz olur. Çözünürlük yüksek olduğunda çözelti içerisindeki potasyum sülfat tuzu çözeltisinin doygun olması zorunlu hale gelir. Bu sebepten ortamda mutlaka belirli miktar kristal tuz bulunmaktadır. Ayrıca, çözünürlüğün yüksek olması polarizasyonun düşmesine neden olur bu da elektrokimyasal ölçümlerin tekrarlanabilirliği açısından faydalı bir durumdur (Yosypchuk ve Novotny 2003).

Elektrot tabanında yer alan poröz tapa, çözelti ile olan bağlantıyı destekler. Bu elektrotların en önemli uygulama alanlarından biri, yoğun sülfürik asit içeren çözeltilerde ve elektrokimyasal korozyon deneylerinde dış referans elektrot olarak kullanılabilmesidir.

Civa sülfat referans elektrodunun bilinen yarı hücre reaksiyonu aşağıdaki gibidir;



Civa sülfat referans referans elektrodu için Nerst denklemi tekrar düzenlenecek olursa;

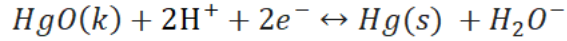
$$E = E^0 - 0.0295 \log a_{SO_4^{2-}}$$

şeklinde düzenlenebilir.

2.1.9.5.1.4 Civa oksit elektrodu (Hg/HgO)

Civa-civa oksit elektrodu en çok alkali çözelti ortamında yapılan elektrokimyasal deneylerde tercih edilir ve çok yüksek sıcaklık koşullarında bile kullanıma elverişlidir. Civa-civa oksit elektrodun potansiyeli, standart hidrojen referans elektrodu ile kıyaslanarak belirlenir. Bu durumda standart hidrojen referans elektrodunun tüm sıcaklıklardaki potansiyeli sıfır olarak kabul edilir (Thacker 1968).

Civa-civa oksit referans elektrodunun bilinen yarı hücre reaksiyonu aşağıdaki gibidir;



Civa-civa oksit referans elektrodu için Nerst denklemi tekrar düzenlenecek olursa;

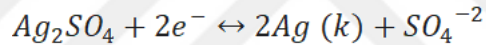
$$E = E^0 - 0.0591pH$$

şeklinde düzenlenebilir.

2.1.9.5.1.5 Gümüş sülfat elektrodu, Ag/Ag₂SO₄

Sıvı bağlantılı Ag/Ag₂SO₄ elektrodun, standart hidrojen elektrodu ile kıyaslandığında oda koşullarında (25°C) potansiyeli, bağlantı potansiyelinden kaynaklı hata nedeniyle sebebiyle 0.70 V'dur. Sıvı bağlantısı bulunmadığı durumda bu değer yaklaşık olarak 0.68 V civarındadır (Komoda vd. 2019).

Gümüş sülfat referans elektrodunun bilinen yarı hücre reaksiyonu aşağıdaki gibidir;



Gümüş sülfat referans referans elektrodu için Nerst denklemi tekrar düzenlenecek olursa;

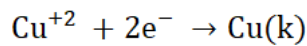
$$E = E^0 - 0.0295 \log a_{SO_4^{-2}}$$

şeklinde düzenlenebilir.

2.1.9.5.1.6 Bakır sülfat elektrodu, Cu/CuSO₄

Bakır-bakır(II) sülfat elektrodu, redoks reaksiyonu mekanizmasına göre etkili olan bir referans elektrot türüdür. Elektrokimyasal potansiyel belirleme süreçlerinde kullanılır. Ayrıca katodik koruma temelli kontrol sistemlerinin tespitinde referans elektrot olarak yer alır (Ansuini ve Dimond 1994).

Bakır sülfat referans elektrodunun bilinen yarı hücre reaksiyonu aşağıdaki gibidir;



Bakır sülfat referans referans elektrodu için Nerst denklemi tekrar düzenlenecek olursa;

$$E = E^0 + 0.0295 \log a_{Cu^{2+}}$$

şeklinde düzenlenebilir.

Aşağıda görüldüğü gibi, Nernst eşitliği, bakır iyonları derişimuna veya aktivitesine, bakır-bakır(II) sülfat elektrodunun bağıllığını gösterir.

$$E = E^{\circ}(Cu/Cu^{2+}) + \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{K_{sp}}{K_{SO_4}^{-2}} \right)$$

$$E^{\circ}(Cu/CuSO_4) = E^{\circ}(Cu/Cu^{2+}) + \frac{RT}{2F} \ln K_{sp}$$

olduğundan,

$$E = E^{\circ}(Cu/Cu^{2+}) + \frac{RT}{2F} \ln a_{SO_4}^{-2}$$

olarak yazılabilir.

K_{sp} = Bakır sülfatın çözünürlük sabitidir.

Bakır sülfatın en kararlı hali, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ bileşimidir. Bu hal için elektrot reaksiyonları:

$$E = E^{\circ}(Cu/Cu^{2+}) + \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{K_{sp}}{a_{SO_4}^{-2}} \right)$$

$$E^{\circ}(Cu/CuSO_4 \cdot 5H_2O) = E^{\circ}(Cu/Cu^{2+}) + \frac{RT}{2F} \ln K_{sp}$$

olduğundan;

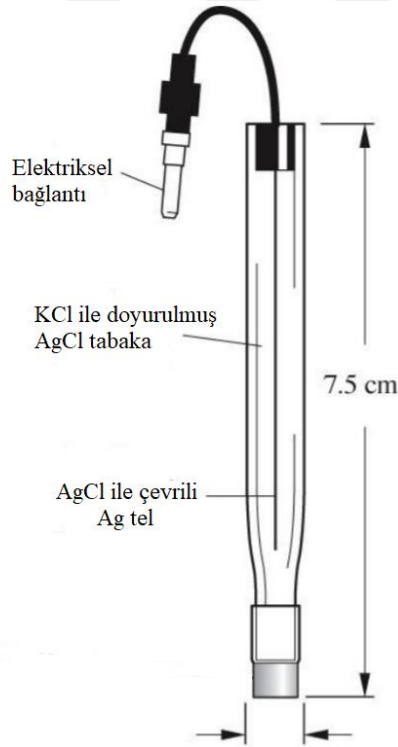
$$E = E^{\circ}(Cu/CuSO_4 \cdot 5H_2O) - \frac{RT}{2F} \ln a_{SO_4}^{-2}$$

olarak yazılabilir.

2.1.9.5.1.7 Gümüş – gümüş klorür referans elektrot (Ag/AgCl_2)

Gümüş – gümüş klorür referans elektrotlar, günümüzde en çok tercih edilen referans elektrot tipi olup da doygun kalomel elektrotların kullanım zorluklarının üstesinden gelebilen referans elektrotlar olarak yaygın kullanılırlar. Gümüş – gümüş klorür referans elektrodun doygun kalomel elektrota göre üstünlüğü çok yüksek sıcaklıklarda dahi kullanılabilmesidir. Ayrıca gümüş iyonu, civa iyonuna göre daha inert özellikte olup analit ile reaksiyona girme ihtimali düşüktür (Adler 2002).

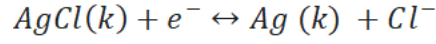
Temel olarak gümüş – gümüş klorür referans elektrodu gümüş bir telin, elektrolitik olarak AgCl ile kaplanmasıyla klor iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasından elde edilir. Tipik gümüş – gümüş klorür referans elektrodun şematik gösterimi **şekil 2.13**'de yer almaktadır.



Şekil 2.13 Gümüş-gümüş klorür referans elektrodunun şematik gösterimi (Anonim)

Doygun potasyum klorür çözeltisi kullanıldığı zaman $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de standart hidrojen elektrota göre potansiyeli $+0,222\text{ V}$ ' kabul edilir.

Gümüş-gümüş klorür referans elektrodunun bilinen yarı hücre reaksiyonu aşağıdaki gibidir;



Gümüş-gümüş klorür referans elektrodu için Nerst denklemi tekrar düzenlenecek olursa;

$$E = E^0 - 0.0591 \log a_{Cl^-}$$

şeklinde düzenlenebilir.

Gümüş-gümüş klorür referans elektrotları genel olarak ticari yollardan satın alınır. Fakat bazı araştırmacılar laboratuvar koşullarında da referans elektrot yapılabilir. Gümüş-gümüş klorür referans elektrodun yapısı oldukça basittir. **Şekil 2.13**'de gösterildiği gibi kolayca tasarlanıp hazırlanabilir. Gümüş-gümüş klorür referans elektrot, bir ucunda 10 mm çapında poröz bir cam diske sahiptir. Bu diskin üzerine ise potasyum klorürle doyurulmuş bir agar jel tapa konularak yarı-hücreden çözelti sızması önlenmiştir.

Referans elektrodun potansiyeli, doldurma çözeltisindeki klorür iyonun derişimine bağlıdır.

$$E = E^{\circ}(Ag/Ag^+) + \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{K_{sp}}{a_{Cl^-}} \right)$$

$$E^{\circ}(Ag/AgCl) = E^{\circ}(Ag/Ag^+) + \frac{RT}{F} \ln K_{sp}$$

$$E = E^{\circ}(Ag/AgCl) - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl^-}$$

2.1.9.5.2 Çalışma elektrodu tipleri ve özellikleri

Zamana bağlı olarak potansiyeli doğrusal şekilde değişen, yüzeyinde çok çeşitli analit türlerinin yükseltgenabildiği ya da indirgenabildiği elektrot türüdür. Çalışma elektrodu aynı zamanda indikatör elektrot olarak da adlandırılmaktadır.

Voltametik tekniğinin performansı çalışma elektrotunun performansı ile doğru orantılıdır. Elektrokimyasal hücre sisteminde gerçekleşen tüm redoks reaksiyonları çalışma elektrotunun yüzeyinde gerçekleştiğinden elektrot yüzeyinin fiziksel ve

kimyasal özellikleri elektrotun performansını doğrudan etkilemektedir. Günümüzde elektroanalitik tekniklerin gelişimi tüm hızıyla devam ederken çalışma elektrotlarını geliştirmeye yönelik çabalar da hala devam etmektedir. Elektroanalitik tekniklerin performansını arttırabilmek amacıyla çalışma elektrotlarının fiziksel şekilleri ve kimyasal yapıları geliştirilmeye çalışılmaktadır (Hickling 1942).

Çalışma elektrotları geliştirilirken uygulama amacına yönelik olarak modifiye edilebilirler. Çalışma elektrotları birçok farklı malzemeden meydana gelebilmektedir. En çok bilenen elektrot malzemeleri arasında platin, altın, pirolitik grafit, civa film, camsı karbon, kalay oksit, indiyum oksit ve rutenyum oksit bulunmaktadır.

Çalışma elektrotları özellikle biyosensör uygulamalarına yönelik olarak tasarlanıp uygun biçimde geliştirilebilir. Çalışma elektrotları tasarlanırken özellikle arzu edilen tekrarlanabilir sinyaller verebilmesine dikkat edilirken aynı zamanda sinyal/ gürültü oran karakteristiğine de dikkat edilir (Hickling 1942).

Çalışma elektrodu seçilirken temelde iki ana faktör üzerine odaklanılır:

- Hedef analit türünün redoks karakteristiği
- Elektrokimyasal ölçüm için gerekli olan gerilim penceresinin üzerindeki artık akım

Ayrıca çalışma elektrotu seçilirken dikkate alınacak diğer önemli faktörler;

- Geniş gerilim penceresine sahip olma,
- Kayda değer elektriksel iletkenlik,
- İyi yüzey tekrarlanabilirliği,
- İyi mekanik dayanım,
- Ucuz maliyetli olması,
- Kolay üretilebilirlik,
- Düşük toksisite

şeklinde sıralanabilir.

Çalışma elektrotlarının kullanıldığı gerilim penceresinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Özellikle gerilim penceresi, sulu çözelti ortamında sadece elektrot

materyaline değil, aynı zamanda elektrotların daldırıldığı çözeltinin bileşenlerine göre de değişmektedir.

Pozitif gerilimin sınırları genelde moleküler oksijen oluşturacak biçimde suyun oksidasyonu sonucunda meydana gelen hidrojenden kaynaklanmaktadır.

Elektroanaliz uygulamaları için geniş bir yelpazeye sahip elektrot materyal olanağının olması büyük avantaj sağlamaktadır. Özellikle altın ve platin gibi soy metaller, karbon çeşitleri ve civa en çok tercih edilen materyallerdir.

Voltametri tekniğinde en çok tercih edilen çalışma elektrotları aşağıda sınıflandırılmıştır;

- Civa elektrotlar
- Katı elektrotlar
- Kimyasal modifiye elektrotlar
- Mikroelektrotlar

2.1.9.5.2.1 Civa elektrotlar

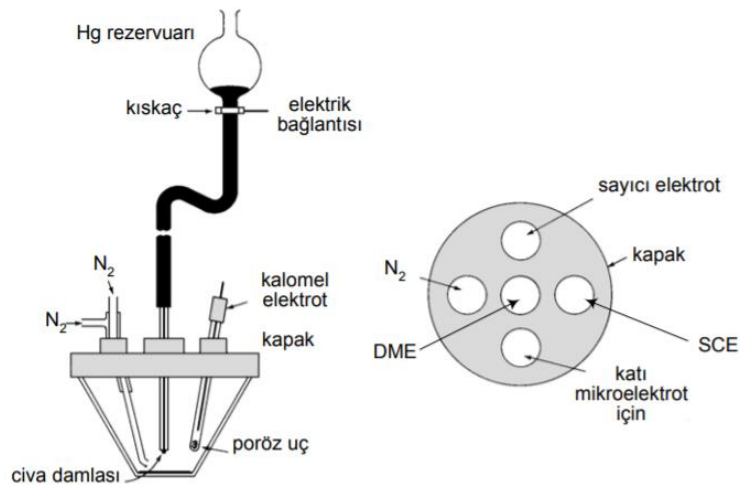
Civa elektrotlar elektrokimyasal çalışmalarda oldukça fazla kullanılmıştır. Civa elektrotlar yüksek negatif potansiyel pencerelerde çalışmaya imkân vermektedir. Ayrıca civa kolayca yükseltgenebilme karakteristiğine sahiptir. Bu karakteristiğinden kaynaklı olarak anot açısından kullanılabileceği potansiyel penceresi oldukça düşüktür. Her seferinde yeni bir metal yüzeyi oluşturabilme imkânı vardır. Bunun yanı sıra civa toksik bir elemet olduğu için kullanımı kısıtlıdır (Skoog vd. 2017).

Civanın kimyasal bakımdan inert olması ve hidrojen indirgenmesine karşı sergilediği yüksek aşırı gerilimden kaynaklı olarak yüksek negatif gerilim koşulların da çalışılabilme olanağı vardır. Civa elektrot aracılığıyla çok çeşitli indirgenme reaksiyonları incelenebilir ve çalışılabilir. Çünkü çeşitli metal iyonları civa elektrot yüzeyinde tersinir olarak indirgenebilir. Civa elektrot, protondan hidrojen gazı oluşum reaksiyonuna karşı aşırı bir gerilim yaratır. Bu sebeple, analitler asit ortamda bile protondan önce indirgenebilmektedir. Civa elektrotlarda pasifleşme ya da yüzey

zehirlenmesi gibi istenmeyen reaksiyonlar meydana gelmez. Sonuç olarak oluşan reaksiyonlar tekrarlanabilir niteliktedir (Yosypchuk ve Barek 2009).

Civa elektrotlarının en büyük avantajlarından birisi, yeni damlaların veya yeni ince civa filmlerinin kolaylıkla oluşturulabilmesidir ve bu aslında bir tür temizleme işlemidir, önceki analizler sonucunda kontaminasyondan kaynaklanabilecek problemleri ortadan kaldırır. Özetle her yeni civa damlası ile temiz ve yeni bir metalik yüzey meydana geldiğinden kaydedilen akım önceki damlada gerçekleşen elektroliz sürecinden etkilenmez, bu sebepten tekrar edilebilirliği yüksek sonuçlar elde etmek mümkün olur. Bu elektrot türünde, elektrot yüzeyi hep stabil ve temiz kalır. Civa elektrotlarında var olan elektrot temizlik prosedürü önceki elektrot yüzeyinden ince bir tabaka kesilerek yapıldığı olası karbon macun elektrotları hariç olmak üzere, diğer malzemelerden yapılan elektrotlar için genellikle geçerli değildir (Skoog et al., 2017).

Diğer bir avantaj ise, daha yüksek tarama hızları kullanarak doğrusal tarama voltametri tekniği için bir sözde durağanlık durumu elde etme imkânıdır. Civa elektrotlarının geniş katodik potansiyel penceresi oldukça (destek elektrolitine göre değişkenlik gösterir; +0,4 ile -2,5 V) önemlidir. Aşağıda şekilde (Şekil 2.14) tipik bir civa elektrodu yer almaktadır.



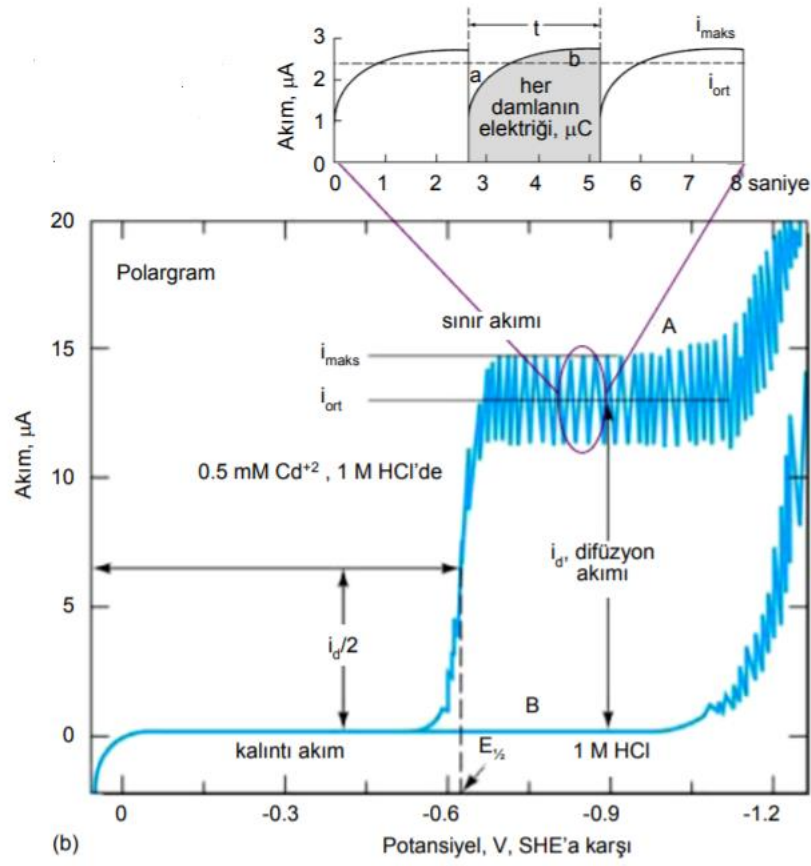
Şekil 2.14 Klasik civa elektrodunun şematik gösterimi (Anonim)

Civa elektrotlarının tüm bu avantajlarının yanında bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Metalik haldeki civanın düşük pozitif gerilimlerde bile kolayca yükseltgenebilmesinin yanı sıra kalomel oluşumuna neden olması civa elektrodun kullanımını sınırlayan nedenlerin başında gelmektedir. Ek olarak elektrokimyasal işlemlerde kullanıldıktan sonra elektrot yüzeyinin temizlenmesi oldukça zor olması, uygun damla süresinin ayarlanmasının dezavantajı, civa damlatımında kullanılan kılcal boruların kolaylıkla tıkanabilmesi, civa buharının toksik özellikte olması ve bundan dolayı tekniğin anvak ön işlem ile uygulanması bu elektrotun kullanımındaki başlıca sıkıntılardır. Ayrıca elektrokimyasal ölçümlerde kullanılacak olan civanın oldukça saf özellikte olması beklenmektedir. Fakat saf özellikte civa bulmak oldukça zordur. Civa kullanımındaki en büyük sorunlardan birisi de, klasik yöntem hassasiyetini yaklaşık 10^{-5} M derişimine kadar sınırlayan faradaik özellikte olmayan artık akım ya da yükleme akımı oluşturmastır.

Civa elektrotunun; disk elektrot, asılı civa damla elektrot, damlayan civa elektrot, durgun civa damla elektrot gibi türleri bulunmaktadır.

2.1.9.5.2 Damlayan civa elektrodu

Damlayan civa elektrotunun bulunduğu elektrokimyasal hücre sisteminde, damlama hızına göre periodik salınımlar tespit edilir. Bir damla düzenekten düştüğünde akım sıfıra iner (**Şekil 2.15**) ve daha sonra hızla yükselişe geçer. Akım artışının sebebi, difüzyon olayının yaşandığı yüzey alanının artması sonucunda elektrot alanının artmasından kaynaklıdır. Ortalama akım değerini belirleyebilmek amacıyla akımda meydana gelen büyük dalgalanmaları azaltmak gereklidir. Bunu yapabilmek için dalga söndürücü ekipman kullanılır ya da akımın zamanla değişiminin çok az olduğu, damlanın sonuna doğru olan akım seçilir. Akım azaltma işlemi galvanometre ya da filtre aracılığıyla sağlanır. **Şekil 2.15**'de görüldüğü gibi azaltma sonunda osilasyonlar uygun bir değerde sınırlandırılır. Böylelikle ortalama akımı ölçmek mümkün olur (Skoog vd. 2017).



Şekil 2.15 Civa damla elektrodun etkisiyle oluşturulmuş örnek polarogram (Anonim)

Civa damla elektrot türünün diğer mikroelettrotlar ile kıyaslandığında birtakım avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlardan birincisi, hidrojen iyonları nedeniyle hidrojen oluşumunda meydana gelen aşırı yüksek gerilimdir. Bu durum asidik tabanlı çözeltilerden herhangi bir kısıtlama olmadan çok çeşitli türlerin indirgenebilmesine imkân sağlar. İkincisi, her yeni ölçümde sürekli olarak yeni bir metal yüzey yaratabilme avantajıdır. Böylece elektrodun kullanım ömrü ya da geçmiş uygulamalarda kullanılması deneyi etkilemez. Sonuçta elektrottan bağımsız olarak tekrarlanabilir akım-voltaj eğrileri elde etmek mümkün olur. Bu elektrot türünün üçüncü avantajı ise, herhangi bir potansiyelde tekrarlanabilir ortalama akım değerlerine hızlı şekilde ulaşılabilmesidir.

Civa damla elektrodun en büyük dezavantajı civanın kolayca yükseltgenebilir özellikte olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı elektrodun anot bakımından kullanılmasını sınırlar. +0.4V 'dan daha yüksek potansiyellerde pozitif yüklü civa iyonu oluşmaktadır. Bu

sırada akım, çözeltideki diğer yükseltgenebilen polarografik dalgaları kapatır maskeler. Bu sebeple civa damla elektrot, yalnızca indirgenebilen veya kolaylıkla yükseltgenebilen maddelerin analizinde kullanılabilir. Ayrıca bu elektrot tipinde çok uzun damlama süreleri elde etmek oldukça zordur.

2.1.9.5.2.3 Asılı Civa Damla Elektrotu

Asılı civa damla elektrotu, elektrokiimyasal deney boyunca devamlı olarak civa damlaları düşüren damlayan civa elektrotunun aksine, bir kılcal borunun ucunda belirli ve kontrollü bir geometride ve yüzey alanında civa damlası oluşturan bir elektrottur. Asılı civa damla elektrotunda damlayan civa ile birlikte devamlı değişen bir yüzey olduğundan bu durum beraberinde dezavantajlar oluşturur. Bunlar bir tanesi civanın etkisiyle oluşan statik yüzeyin adsorpsiyon olayından etkilenmesidir. Birçok elektrodun aksine deney süresince elektrot yüzeyinin mekanik olarak temizlenmesi ya da parlatılmasına gerek duyulmaz (Skoog vd. 2017).

2.1.9.5.2.4 Civa ince film elektrot

Diğer civa temelli elektrotlardan farklı olarak elektrot yüzeyi bir film tabası halinde olduğu için elektrot yüzeyinin yüzey/hacim oranının yüksek olması hem avantaj sağlamaktadır hem de duyarlılığı artırmaktadır. Hacim büyüklüğü yüksek olduğunda, civa yüzeyinde difüzyon yavaşlamakta ve ayırma gücü zayıflamaktadır. Elektrotların geometrik yapısı duyarlılıkta rol oynayan önemli bir etkidir. Yüzey alanının hacime oranla yüksek olması difüzyonu hızlandırdığından üstünlük sağlamaktadır. Bu durum civa film elektrotun asılı civa elektrota karşı üstünlüğü olarak kabul edilir. Civa ince film elektrotların çeşitli türleri bulunmaktadır. Film elektrodun bazı tiplerinde tekrar edilebilirliğin az olması bu elektrotun en büyük dezavantajıdır (Skoog vd. 2017).

2.1.9.5.3 Katı elektrotlar

Civa damla temelli elektrotların en olumsuz iki özelliği, araştırmacıları, bu elektrodun yerine kullanılabilecek alternatif elektrotlara yöneltmiştir. Bu özelliklerden ilki civanın kolayca oksitlenebilmesidir. Bu durum $+0.4\text{ V}$ 'dan daha büyük potansiyellerde okside olan türler ile çalışılmasını sınırlamaktadır. Örneğin halojenler ve bazı iyonlar ile çalışırken elektrot potansiyelinin 0.0 V 'dan daha negatif olması arzu edilir. Fakat bu tür

maddeler civayı kolaylıkla yükseltgeyebilirler. Civa damla temelli elektrotların ikinci olumsuz özelliği ise duyarlılık bakımından zayıf olmalarıdır. Bu elektrot türü 10^{-5} M'dan daha seyreltik çözeltilerin analizine izin vermez. 10^{-5} M'dan daha düşük derişimlerde difüzyon akımı ile artık akım birbirine eşit ya da daha küçüktür. Ham elde edilen akımda üzerinde yapılan düzeltmeler çok büyük hata değerlerine sebep olur ve duyarlılık önemli oranda düşer. Çoğu artık akımlar faradaik kaynaklı değildir ve 1 μA 'in % birkaçından daha azı seviyeye düşürülemez. Günümüzde civa damla temelli elektrotların yerini genellikle, altın, platin ve karbon yapılı katı elektrotlar almaktadır (Navratil ve Barek 2009).

Özel bazı çalışmalarda nikel, bizmut, gümüş ve bakır yapılı katı elektrotlar kullanılmaktadır. Katı elektrotlar kullanımamacına göre boru, halka ve levha gibi çok çeşitli geometrik yapılara sahip olabilmektedir. Ayrıca katı elektrotlar, elektrokimyasal açıdan inert potansiyel penceresine sahiptir. Yüksek sıcaklık ve basınca koşullarına oldukça dayanıklıdır. Elektriksel iletkenlik değerleri elektrokimyasal uygulamalar için arzu edilen düzeydedir. Bu elektrot türünün uygulaması kolay olup geliştirilmeye açık özellikleri bulunmaktadır. Ekonomik olarak ucuz ve kabul edilebilir bir toksisiteye sahip oldukları için vücut içi uygulamalarda tercih edilmektedirler.

Katı elektrot türlerinin en büyük dezavantajı yüzeylerinin tekrar edilebilirlik açısından stabil kalmamasıdır. Elektrokimyasal ölçümler sırasında elektrot yüzeyine safsızlıkların adsorblanarak birikmesinden dolayı katı elektrotlar stabil davranış sergilemezler. Katı elektrotların bir diğer dezavantajı ise civa temelli elektrotta olduğu gibi elektrot yüzeyinin yenilenmesi meydana gelmediğinden tekrar edilebilir sonuçların elde edilebilmesi amacıyla yüzeylerinin her ölçüm öncesi temizlenmesi gerekmektedir. Bu temizlik prosedürüne ön işlem adı verilmektedir (Navratil ve Barek 2009).

2.1.9.5.3.1 Metal elektrotlar

Birçok farklı soy metal türü bu elektrotların yapımında tercih edilmektedir. Araştırmacılar tarafından en çok kullanılan soy metaller altın ve platindir.

Elektrokimyasal uygulamanın amacına yönelik olarak nikel, gümüş, iridyum, bakır ve indiyum gibi metal türlerinin oksitleride kullanılmaktadır. Metal elektrotların en büyük avantajı, hedeflenen elektron aktarım kinetiği ve geniş bir anodik gerilim penceresinde

çalışmaya imkân sağlamasıdır. Fakat düşük hidrojen aşırı gerilimi oluşturmaları, metal elektrotların katodik gerilim penceeresinde çalışmalarını sınırlamıştır. Alternatif olarak çalışılan ortam pH'sına bağlı olarak -0.2 V ile -0.5 V aralığındaki gerilimlerde kullanılabilir. Metal elektrotlar elektrokimyasal ve kimyasal işlemlerle kolayca modifiye edilebilirler. Özellikle tiyol gruplarının altın ve platine olan ilgisi ve yüksek akım cevapları sebebiyle son yıllarda biyosensör uygulamalarındaki kullanımı giderek artmıştır (Łukaszewski vd. 2016).

2.1.9.5.3.2 Karbon elektrotlar

Karbon temelli katı elektrotlar; geniş potansiyel aralıklarında çalışmaya imkân sağlaması, çok çeşitli yüzey kimyasının morfolojilerinin olması, kolay bulunabilmeleri, ekonomik olmaları, kimyasal türlere olan inertlikleri, düşük artık akım vermeleri ve yüksek duyarlılığa sahip olmaları nedeniyle elektrokimyasal analizlerde sıkça tercih edilmektedirler. Metal elektrotlara kıyasla elektron transfer hızları daha yavaştır. En büyük dezavantajlarından biri yüzeylerinin karbon temelli olması sebebiyle, yüksek yüzey aktivitesi sergilemeleri ve bu nedenle organik öncüller tarafından kolayca kirletilebilir olmalarıdır. Grafit yapısında bulunan aromatik halkalar aktif oksijen grupları içerdiğinden çok farklı fonksiyonel grupları (hidrojen, karboksil, hidroksil, kinon grupları ve aminler) karbon yüzeyine bağlamak mümkün olabilmektedir.

Genellikle katı elektrotların kullanıldığı voltametrde, birçok ilaç etken madde ve farmakolojik ürünün etki mekanizmalarının aydınlatılması oldukça önemlidir. Ayrıca indirgenme ve yükseltgenme olaylarının biyolojik ve genetik açıdan incelenmesine yönelik geliştirilmekte olan ultra-mikroelektrotlar canlı organizma içerisinde invivo araştırmaların yapılmasına imkân tanımaktadır. Bu alanda atılan en önemli adımlardan biriside, biyosensörler aracılığıyla biyolojik bir ortamda tepkimeye girebilen ve oluşan türlerin analizlerinin yapılabilme olanağıdır.

Günümüzde özellikle ilaç–DNA etkileşimlerinin araştırılması, etkileşim mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni tipte elektrotların tasarlanmasına yönelik çalışmalar oldukça ilgi görmektedir.

Karbon elektrotlar genel olarak kendi arasında iki sınıfa ayrılmaktadır. Camsı karbon, elmas, grafit, fullerens, perde baskılı karbon, karbon-fiber olan elektrotlar homojen elektrotlardır.

Karbon pasta ve modifiye karbon pasta elektrotlar ise heterojen olanlar elektrotlardır (Wightman vd. 1984).

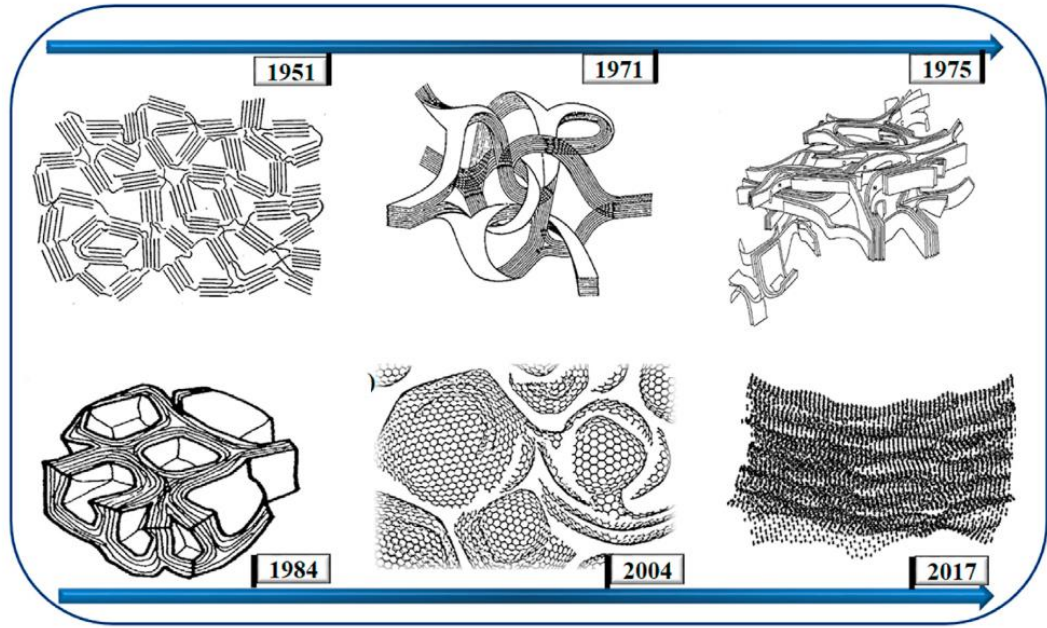
2.1.9.5.3.3 Karbon pasta elektrot

Karbon pasta elektrotlar, karbon tozundan hazırlanan karbon pastası ve uygun şekilde tasarlanmış bir elektrot gövdesine paketlenmiş uygun bir sıvı bağlayıcıdan oluşmaktadır. Sıvı bağlayıcı olarak parafin, petrolatum, poliklorotrifloroetilen, mineral yağ, silikon sıvısı, dioktilftalat, a-bromonaftalen, trikresil fosfat ve diğer malzemeler kullanılabilir. Hem karbon tozunun hem de sıvı bağlayıcının optimal seçimi şüphesiz karbon pastalarının davranışını etkileyen en önemli faktörler arasında sıralanabilir. Karbon pasta elektrotlar, anodik olarak oksitlenebilen organik bileşiklerin belirlenmesi için çok kullanışlı elektrokimyasal sensörler veya elektrotlardır. Karbon pasta elektrotların mevcut yaygın kullanımı, modifikasyonlarının kolaylığı ve dolayısıyla yeni geliştirilen belirleme yöntemlerinin seçicilik ve duyarlılığı ile ilgili özelliklerini uyarlama kolaylığı ile bağlantılıdır. Karbon pasta elektrotların avantajları, geniş potansiyel penceresi, düşük arka plan akımı, kolay çalışma yüzeyinin yenilenmesi ve kimyasal veya biyolojik modifikasyon olasılığıdır (Nemcova vd. 2012).

2.1.9.5.3.4 Camsı karbon elektrot

Camsı karbon, seçilen polimerik bileşiklerin pirolizi ile oluşturulan grafit olmayan bir karbon türü olup yüksek sıcaklıklar (2000 – 2050 °C) sonucunda oluşmaktadır. Camsı karbon elektrodu diğer karbon elektrotlardan ayıran özelliği çok daha küçük gözenek yapısına sahip olmasıdır. Bu elektrot, küçük gözenek boyut dağılımına sahip malzemenin fenol formaldehit reçinesinin inert bir gaz içinde dikkatli bir şekilde ısıtılması ile elde edilmektedir. Camsı karbon elektrotlar deneylerde kullanılmadan önce aktivasyon işleminden geçirilmelidirler. Aktivasyon işleminin amacı elektrodun yüzeyindeki safsızlıkları uzaklaştırmak, fonksiyonel grupların ve serbest keskin uçların oluşumunun sağlanması, yüzey alanının büyütülmesi ve mikro partikül oluşumunun sağlanmasıdır.

Camsı karbon elektrot, kimyasal olarak altıgen bir düzende düzenlenmiş sp^2 hibritlenmiş karbon atomlarından oluşan düzensiz grafit katmanlarından meydana gelmektedir (**Şekil 2.16**). Grafit katmanlarının içindeki karbon atomları arasındaki bağlar kovalent iken, bu katmanlar arasındaki etkileşimin türü van der Waals etkileşimleridir. Camsı karbon elektrot 'daki grafit katmanlarının istiflenmesindeki azaltılmış düzenlilik seviyesi, ideal grafit (0.3354 nm) ile karşılaştırıldığında daha büyük katmanlar arası boşluk (d_{002}) değerlerine yol açar. Ayrıca, camsı karbon elektrodun düşük yapısal sıralanışı, arzu edilen yükseklik (L_c) ve genişlik (L_a) değerlerine sahip kristalitlerle sonuçlanır ve bu, sözde turbostratik yapının oluşmasına neden olur. Aşağıdaki şekilde (**Şekil 2.16**) camsı karbon elektrot yüzeyinin çeşitli morfolojileri görülmektedir.



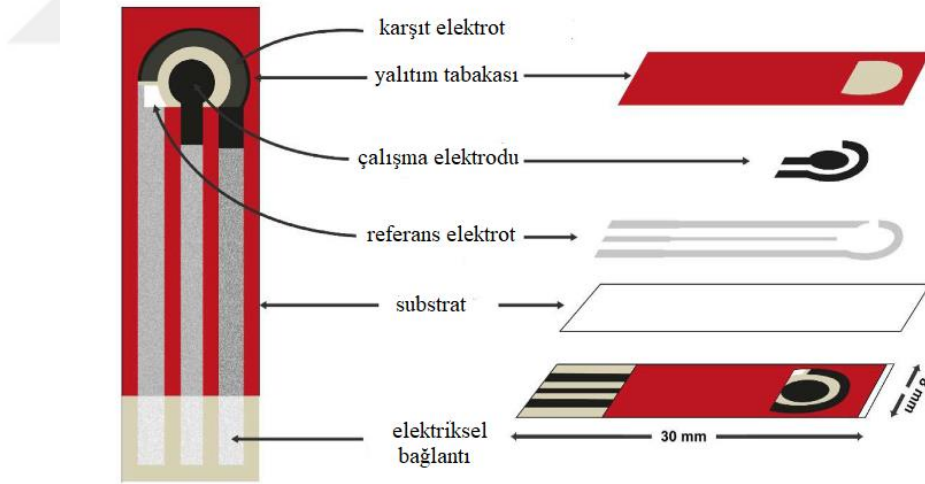
Şekil 2.16 Camsı karbon elektrot yüzeyinin morfolojik yapısının yıllara göre geliştirilmesi (de Souza Vieira vd. 2021)

Karbon temelli çalışma elektrotları ilaç analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu elektrotlar küçük boyutları, uzun ömürleri ve spesifik yüzey özellikleri nedeniyle ilaç analizi ve ilaç mekanizması çalışmaları için idealdir. Camsı karbon elektrot, en yaygın olarak kullanılan karbon temelli elektrotlardan biridir. Camsı karbon ile çok yüksek anodik potansiyellere ulaşıldığında, elektrot yüzeyinin bozulmasına yol açan karbon oksidasyonu meydana gelebilir. Ancak karbon oksidasyonu, yüzey aktivasyonuna neden

olduğu ve elektron transfer hızını arttırdığı için anodik uygulamalarda avantajlıdır. Bu nedenle, Camsı karbon elektrotlar üstün kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle araştırmacıların giderek daha fazla ilgisini çekmektedir (de Souza Vieira vd. 2021).

2.1.9.5.3.5 Perde Baskılı Karbon Elektrotlar

Karbon siyahı (aktif form dahil), grafit nanotüpler, grafen, fullerenler ve kuantum noktaları gibi hemen hemen tüm karbon malzemelerinin baskılamaları yapılabilmektedir. Baskılama işleminin en önemli üç özelliği bu yöntemi vazgeçilmez teknikler arasına sokmaktadır: (1) elektrot alanını, kalınlığını ve bileşimini kontrol etme yeteneği. (2) Tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilir ve istatistiksel olarak doğrulanabilir ve (3) biyolojik olarak uyumlu materyaller gibi hemen hemen her materyal, örn. karbon, metalik nanopartiküller, polimerler, baskılama işlemine dahil edilebilir. Bir perde baskılı karbon elektrot, çalışma elektrotu, bir psödo referans elektrodu ve bir karşı elektrot aracılığıyla iki, üç veya daha fazla elektrotlu katı bir destekten oluşur (Musa vd. 2021).



Şekil 2.17 Perde baskılı karbon elektrodun şematik gösterimi (Musa vd. 2021).

Yukarıda (Şekil 2.17) Perde baskılı karbon elektrodun hangi bölümlerden meydana geldiği açıkça gösterilmektedir.

2.1.9.5.3.6 Karbon-fiber Elektrot

Kimyasal olarak inert karbon fiber olağanüstü mekanik ve elektriksel özelliklere sahiptir ve bir mikrometre veya hatta belki bir nanometre ölçeğinde elektrofizyolojik, elektrokimyasal ve biyosensör uygulamaları için mükemmel bir temel elektrot malzemesidir. Karbon fiber elektrot, diğer tekniklere kıyaslandığında çeşitli özelliklere sahiptir. Karbon fiber elektrotlar, saniyenin altındaki bir zaman diliminde izleme ve gerçek zamanlı olarak kayıt yapma yeteneğine sahiptir. Çok küçük olduklarından, karbon fiber elektrotlar, tek hücreli veya veziküler hacimler gibi çok küçük ortamlarda, diğer cihazların çok büyük olduğu için kullanılamayacağı yerlerde kullanım için de uygundur. Duyarlılık ve seçiciliğin yanı sıra, in vivo ve in situ uygulamalar için uygun bir sensör geliştirmek için elektrotun boyutu da tam olarak dikkate alınmalıdır. Elektrotlar, tek hücreliler veya dokulardaki belirli konumlar gibi biyolojik mikro çevrelerdeki küçük boşluklarla eşleşecek kadar minyatürleştirilmelidir. Bu bağlamda, çapı mikrometre ve nanometre olan karbon fiber mikroeletrot veya karbon fiber nanoeletrot ultra küçük boyutları nedeniyle diğer elektrotlara göre büyük avantajlara sahiptir (Kakhki 2019).

2.1.9.5.3.7 Kalem Grafit Elektrot

Kurşun kalem uçları, elektrokimyasal uygulamalarda elektrot malzemesi olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Genellikle kurşun kalem grafit elektrotları olarak adlandırılan bu elektrotlar, karşılaştırılabilir elektriksel özellikleri nedeniyle son yıllarda araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir. Ancak esas olarak düşük maliyetleri ve bulunabilirlikleri nedeniyle tek kullanımlık uygulamaları mümkün kılan diğer standart elektrotlara uygun bir alternatif sunmaktadırlar. En iyi analitik performansa ulaşmak için, kurşun tipi (sertlik seviyesi) ve elektrot yüzeyi ön işlemi, öngörülen uygulama için kritik öneme sahiptir.

Kurşun kalem madenleri, grafit tozu ve kilden (bağlayıcı malzeme olarak kullanılan) oluşan bir karışımın su içinde ekstrüzyonu ile üretilir, daha sonra sertlik kazandırmak için 1000 °C'ye kadar ısıtılır. Balmumuna daldırma, gözeneklerin dolmasını sağlar ve son ürüne pürüzsüz bir görünüm kazandırır. Yaklaşık % 68 (a/a) grafit, %26 (a/a) kil ve

%5 (a/a) mumdanda oluşan yaklaşık bir bileşim yakın zamanda orta sertlikte Staedtler HB rneği olarak belirtilmiştir (Torrinha vd. 2018).

2.1.9.5.3.8 Elmas elektrotlar

Bor ile dope edilmiş elmas elektrotlarının elektrokimyasal mineralizasyon verimliliği elektrot yüzeyindeki sp^3/sp^2 oranına bağlıdır, elektrot yüzeyinde daha fazla radikal üretimi için sp^2 'ye (grafit) göre daha yüksek bir sp^3 derişimi (elmas) tercih edilir. Bununla birlikte, daha düşük elmas içeriği ile moleküler oksijenin oksidasyonu, organik bileşiklerin bor ile dope edilmiş elmas elektrotların yüzeyinde doğrudan oksidasyonunu teşvik ederek daha fazla tercih edilir. Bu elektrottaki sp^2 karbon, elektrokimyasal dönüşümü teşvik etmek için safsızlık görevi görür ve daha fazla O_2 üretilmesine sebep olur. Ayrıca bor doping seviyesi, bor ile dope edilmiş elmas elektrotunda yk transferini, potansiyel pencerenin genişliğini ve elektroanalitik performansı belirleyen önemli bir parametredir. Daha yüksek bor yükleme, elektrottaki sp^2 safsızlık seviyesini artırabilmektedir. Bununla birlikte, optimum bir bor katkısı seviyesinin üzerinde, elektrot transferi için yük taşıyıcıların sayısı azalır ve elektrotların oksidasyon potansiyelini azaltır (Karim vd. 2021).

Bor ile dope edilmiş elmas elektrotlarının avantajları hakkında aşağıda birtakım bilgiler verilmiştir;

Su bazlı elektrolit zltelerde sergilediği geniş elektrokimyasal gerilim penceresi: Bor ile dope edilmiş elmas elektrotlar aracılığıyla yüksek gerilim değerlerinde moleküllerin oksitlenmesini tespit etmek için kullanılabilirler. Bu tür uygulamalarda kullanılabilmeleri en genel karakteristik özelliklerinden biridir.

Düşük ve kararlı kapasitif arka plan akımına sahip olmaları: düşük elektrostatik kapasite, amperometri sırasında arka plan akımını stabilize etme süresini en aza indirir, bu da bor ile dope edilmiş elmas elektrotlarının diğer elektrot malzemelerinden daha üstün olduğunu gösterir ve düşük derişim tespiti için oldukça elverişlidirler.

Yüksek biyoyumluluğa sahiptirler: Bu özelliklerinden dolayı biyosensör uygulamalarında tercih edilirler.

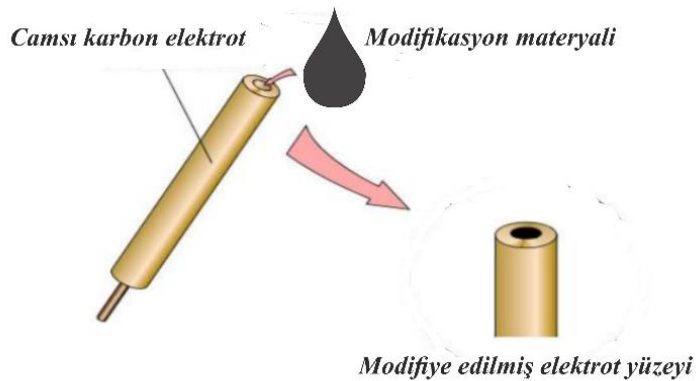
Yüksek tekrarlanabilirlik ve uzun süreli stabiliteye sahiptirler: sulu çözeltilerde çözünmüş polar moleküllerden oldukça az etkilenirler ve adsorpsiyona bağlı kirlenme ile deaktivasyona karşı oldukça yüksek direnç gösterirler. Ayrıca sp^3 hibritleşmesine sahip karbonun yüksek kararlılığından dolayı aşırı anodik ve katodik potansiyellerde ve akım yoğunluklarında morfolojik ve mikroyapısal kararlılık sergilerler. Bahsedilen tüm özellikler bu elektrotları kararlı yapmaktadır (Zhou ve Zhi 2009).

2.1.9.5.4 Mikro elektrotlar

Hücresel seviyede sinir araştırmaları ile ilgilenen nörofizyologların tercih ettikleri en temel ekipmanlarından biri olduğu için, sinir dokusunda tek birim aktivitenin hücre dışı kaydı için metal mikroeletrotların kullanımı yaygındır. Metal mikroeletrotlar konusu üç kısımda ele alınabilir: üretim teknikleri, izotonik salın gibi iletken bir ortamdaki elektriksel özellikleri ve merkezi sinir sisteminin çeşitli bölümlerindeki liflerden ve hücre gövdelerinden izole etme ve kaydetme yetenekleri (Ramos vd. 1998).

2.1.9.5.5 Modifiye elektrotlar

Analitik ölçümlerde kullanılacak olan modifiye elektrotlar organik veya inorganik maddelerin elektrot yüzeyine adsorpsiyonu veya biriktirilmesi ile hazırlanmaktadır (Şekil 2.18). Modifikasyon işlemi sayesinde elektroaktif türlerin tayin edilebilme özellikleri artırılırken bunun yanında elektroaktif olmayan türlerin araştırılmasına da önemli bir katkı sağlanmaktadır (Fitch 1990).



Şekil 2.18 Camı karbon elektrot modifikasyonunun şematik gösterimi

2.1.9.5.5.1 Modifiye elektrotların sahip olması gereken özellikler

Modifiye edilmiş camı karbon elektrotların sahip olması gereken bazı önemli özellikler vardır.

- Kolay hazırlanabilirlik
- Güvenilir ve hızlı sonuç
- Yeniden kullanılabilirlik
- Uzun süre ve aktif olarak kullanılabilirlik,
- Yüksek stabilite

Elektrot ile modifiye edilecek madde arasında elektron alışverişi ile oluşturulan elektrokatalitik modifiye elektrotlar yüksek gerilimi düşürerek yüksek hassasiyet ve yüksek seçicilik ile analiz yapılmasını sağlamaktadırlar. Ayrıca modifiye elektrotlar sahip oldukları bu özellikler sayesinde elektrokimyada yüksek seçicilik ve yüksek hassasiyet ile analiz yapılmasına imkân vermektedir (Fitch 1990).

2.1.9.5.6 Yüzey modifikasyon süreci

Elektroinaktif türlerin elektrot yüzeylerine adsorpsiyonu, bu yüzeyleri kısmen veya tamamen bloke eden bir tabaka oluşturarak elektrot reaksiyonlarını engelleyebilir. Sonuç olarak, elektrot reaksiyonları yalnızca örtülmemiş fraksiyonda meydana gelebilir; bununla birlikte, adsorbe edilen malzemelerin bölgelerinin, adsorbe edilen tabakanın kendisi tarafından elektrokatalizlenen işlemlere yol açan elektrot reaksiyonlarını destekleyebilmesi de mümkündür. Elektroinaktif türlerin adsorpsiyonu, parlatici veya korozyon önleyici olarak hareket edebildikleri elektrodpozisyon proseslerinde önemli bir rol oynar.

Elektroaktif adsorbe edilmiş türlere ilişkin olarak, elektrot yüzeyi ile etkileşimlerine dayalı olarak kabaca bir ayırım yapılabilir. Oldukça zayıf adsorpsiyonlar, pikakımlarında yalnızca küçük artışlara neden olur. Bu nedenle, zayıf adsorbe edilen türler reaktan olduğunda, karmaşık olmayan yük transferleri için beklenenlerden biraz daha yüksek olan DTV ve DV ileri pikleri bulunurken, zayıf adsorbe elektrot ürünleri için DV geriye doğru piklerinde sadece küçük bir artış kaydedilir. Aksine, sırasıyla redoks ürünleri veya reaktanlar kuvvetli bir şekilde adsorbe edildiğinde, difüzyon kontrollü zirveden önce veya sonra ayrı bir adsorpsiyon zirvesi görüntülenir. Reaktan, üründen daha güçlü

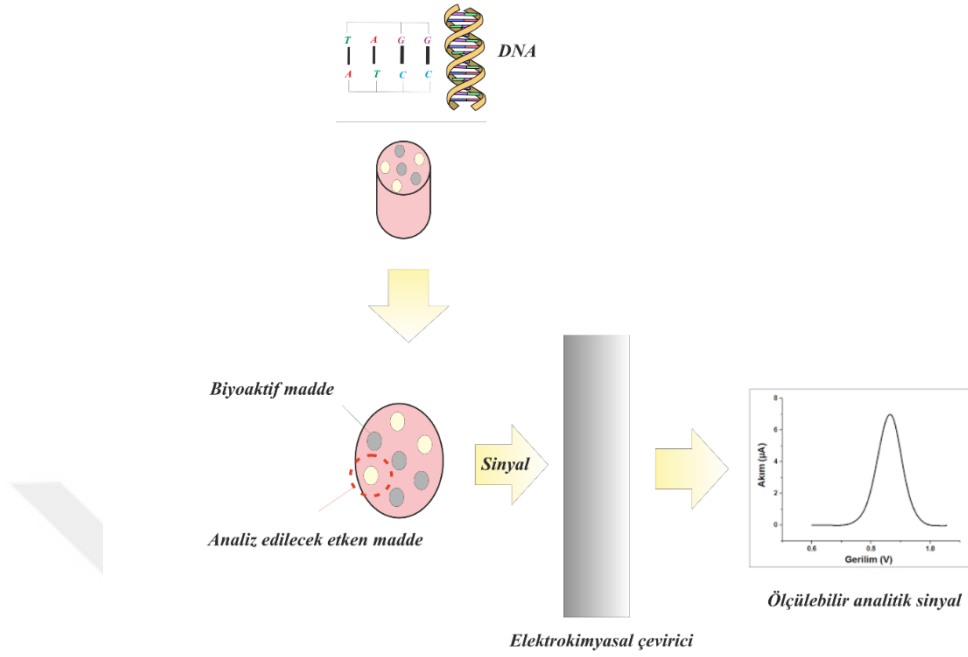
bir şekilde adsorbe edilirse, karşılık gelen difüzyon zirvesine göre adsorpsiyon zirvesinin konumu, daha yüksek potansiyellere doğru yer değiştirir (oksidasyon veya indirgeme işleminin dahil olmasına bağlı olarak daha pozitif veya daha negatif), böylece bir post dalgası bulundu. Ürün daha güçlü bir şekilde adsorbe edilirse, adsorpsiyon piknoktası daha düşük potansiyellerde görüntülenerek bir dalgaya yol açar. Bu adsorpsiyon kontrollü pikler, difüzyon kontrollü piklerden farklı olarak, Ep hakkında simetrik oldukları için kolayca tanınabilir. Ayrıca, tarama ters çevrilmesindeki dönüş zirveleri, potansiyel eksen boyunca yansıyan yönlendirme zirvelerinin ayna görüntüsüdür. Yüksek derişimlerde ip için sabit bir değer elde edilirken, yükseklikleri genellikle yalnızca dar bir düşük derişim aralığında analit derişimuna doğrusal olarak bağlıdır. Ayrıca, elektrot-çözelti ara fazı kapasitif akımlar sağlayan bir kapasitör gibi davrandığından, difüzyon yapan türler için gözlemlenen $v_{1/2}$ bağımlılığının aksine, adsorpsiyon pik akımları için ip v ile orantılıdır (Murray 1980)

2.2 Biyosensörler

Biyosensörlerin temel çalışma prensibi analizi gerçekleştirilecek analitle seçici olarak etkileşecek biyoaktif özellikteki ajanın, etkileşmesi sonucunda oluşan elektrokimyasal, sinyallerin, sinyal aktarıcı bir sistem aracılığıyla birleşmesiyle elde edilen etkileşme ürünlerinin nicel olarak ölçümüne dayanmaktadır (**Şekil 2.19**).

En genel tanımıyla biyosensör tanımlanacak olursa; biyolojik temelli ajan ile kombine edilmiş bir fizikokimyasal detektör olup geliştirilen biyosensör arzu edilen herhangi biyolojik analitin analizini gerçekleştirmek için kullanılabilir.

Basit özelliklere sahip bir biyosensörün genel olarak amacı, bir ya da birden çok analizi gerçekleştirilecek analitin miktarı ile orantılı biçimde devamlı olarak ölçülebilir bir sinyal üretebilmesidir (Serra 2011).



Şekil 2.19 Biyosensör sisteminin şematik gösterimi

Biyosensörler önemli bazı parametrelere uygunluklarıyla değerlendirilir;

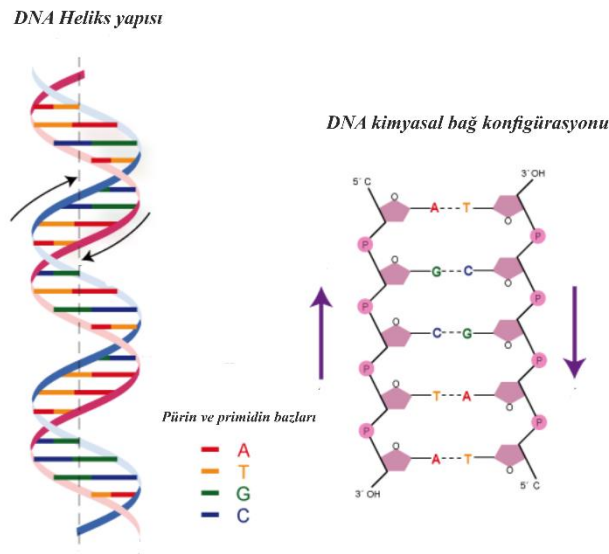
- Yüksek hassasiyet: Geliştirilen biyosensörün algılanacak analit miktarına karşı duyarlı olması ve analit miktar derişimine karşı hassas olması beklenir.
- İyi seçicilik: Geliştirilen biyosensörün yalnız analizi gerçekleştirilecek analite seçimli olmasıdır. Biyosensör, ortamdaki diğer reaktiflere ilgi duymamalı ve hatalı sonuçlar vermemelidir.
- Geniş ölçüm aralığı: Geliştirilen biyosensörün analiti algılayabileceği en geniş derişim aralığıdır.
- Ölçüm süresi: Geliştirilen biyosensörün analiti algılama hızının göstergesidir.
- Tutarlılık: Algılama sonuçları arasındaki korelasyonu ifade eder. Cihazın sonuçlarındaki tutarlılığı belirtir.
- Düşük dedeksiyon limiti: Biyosensörün algılayabildiği en düşük derişim limitini ifade eder.
- Yeniden kullanılabilirlik: Biyosensörün algılama performansı değişmeden tekrar tekrar kullanılabilmesidir.

- Yüksek kararlılık: Geliştirilen biyosensörün ortam koşullarından (ısı, sıcaklık ve nem) ve ortam pH'sından etkilenmemesidir.

2.2.1 Biyosensör hazırlanmasında kullanılan biyolojik materyaller hakkında temel bilgiler

DNA, Canlı organizmaların genetik bilgi aktarımını sağlayan nükleotit adı verilen birimlerden oluşan büyük bir moleküldür. Nükleotit birimleri deoksiriboz şekeri, fosfat ve bazdan oluşmaktadır. Genel olarak nükleik asit temel yapısı, bilenen çeşit ve sayıda bulunan nükleotidlerin dizilim sırasına göre 3'-5' fosfodiester bağları aracılığıyla birbirlerine bağlanarak polinükleotid zincirleri meydana getirmelerinden oluşur (**Şekil 2.20**).

Ayrıca DNA yapısı çift zincirli heliks özelliğine sahip hidrojen bağları ile bütünlük gösteren bir yapıdır.



Şekil 2.20 DNA ve heliks yapısı (Anonim)

DNA molekül yapısında bulunan bazlar adenin (A) ve guanin (G) içeren pürinler ile timin (T) ve sitozin (S) içeren pirimidinlerden oluşur. Pürin ve pirimidin nükleotidleri birbirine hidrojen bağları ile bağlı olup aralındaki eşleşmeler spesifiktir (A-T ve G-C).

Adenin ve timin arasında ikili, guanin ve sitozin arasında üçlü bağlar vardır. Pürin ve pirimidin arasındaki spesifik eşleşmeler sayesinde DNA'nın yapısında bulunan bir polinükleotid zinciri her zaman diğer zincirin tamamlayıcısı konumunda olduğu için bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde diğer zincirdeki baz dizilimi kolaylıkla tahmin edilebilmektedir.

DNA yapısının sıcaklıkla bozulmasına denatürasyon adı verilir. Denatürasyon sırasında heliks yapısı ikiye ayrılır. DNA'nın heliks iskeletinin bozulmasını ultra viyole-spektrofotometrede ölçülen spesifik (260 nm) dalga boyunda ki absorpsiyon değerinden gözlemlenebilir. Denatürasyon olayı yüksek derişimdeki guanin ile sitozin arasında üçlü hidrojen bağı (G=C) olduğundan daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Uygun şartlar altında çift zincirli DNA yapısı tekrar oluşabilir, bu işleme renatürasyon adı verilir.

Çift sarmal yapısındaki DNA molekülünün bir dizisi 5' → 3' yönüne doğru, diğer diziyse 3' → 5' yönüne doğru konumlandığından birbirlerine ters yönlü olarak paraleldirler. DNA yapısını oluşturan zincirler esas olarak çift sarmal iskeletin en dış yüzeyinde bulunmaktadır. Bahsedilen zincirler fosfat ve pentoz gruplarından meydana gelmekte olup her biri fosfodiester köprülerini içermektedir. Bu zincirler aynı zamanda kovalent bağılılığı sağlamaktadır (Herrmann ve Frischauf 1987).

2.2.2 DNA biyosensörlerinde kullanılan bazı ifadeler

Çalışma basamaklarında DNA kullanılacağından dolayı DNA ile ilgili bazı özel tanımların bilinmesi gerekmektedir. Bu tanımlar aşağıda sıralanmıştır (Herrmann ve Frischauf 1987).

- Oligo-nükleotitler: Bu birden çok DNA bazının yan yana konumlanmasından oluşmaktadır.
- Di-nükleotit: İki adet DNA bazının yan yana konumlanmasından oluşmaktadır.
- Tri-nükleotitler: İki adet DNA bazının yan yana konumlanmasından oluşmaktadır.
- Tekrarlı-oligonükleotidler: Tekrarlı oligonükleotidler polimer matrisi içerisindeki, tekrarlı bir adet bazı veya tekrarlı iki/üç adet bazı göstermektedir. Tekrarlı

oligonükleotidlere; mono-nükleotide poly (A), di-nükleotide poly (AT), tri-nükleotide poly (GAT) örnektir.

- Çift sarmal tekrarlayan polimerler: 5' → 3' polaritesine sahip nokta simgesi ile tanımlanan baz çiftlerinden meydana gelen çift sarmal tekrarlı polimerlerdir.

Örnek olarak mononükleotid = poly(A).poly(T) gösterimi verilebilir.

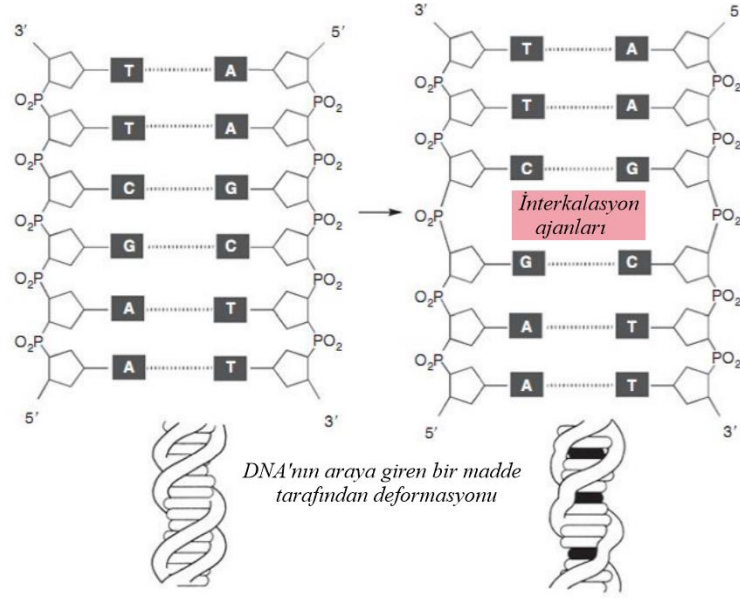
- Baz çifti: Birbirini tamamlayan karşı karşıya konumlanmış iki adet bazı etmektedir. Baz çifti tanımlanırken nokta simgesi kullanılır.

Örnek olarak A.T ya da G.C gösterimi verilebilir.

- Prob: Belirlenen bir baz dizisinden oluşan oligo-nükleotitleri temsil eder.
- Hedef dizi (Target): Prob dizisinin tamamlayıcısını ifade eden oligo-nükleotittir.
- Yanlış eşleşen dizi (Mismatch): bir ya da birden çok hedef diziden farklı konumda bulunan oligo-nükleotit.
- Rastgele dizi (Non complementary): Hedef diziden tamamen farklı bir baz dizilimine sahip oligo-nükleotit.

2.2.3 İnterkalasyon

İnterkalasyon işlemi, araya giren molekülün sulu bir ortamdan iki bitişik DNA baz çifti arasındaki hidrofobik boşluğa aktarılması ile başlar. Sulu bir çözeltide bulunan katayonik özellikteki interkalasyon ajanı elektrostatik etkiyle poli-anyonik karaktere sahip DNA aracılığıyla çekilir. İnterkalasyon ajanı, DNA iskeletinden yer alan magnezyum ya da sodyum katyonları ile yer değiştirerek DNA'nın dış yüzeyi ile zayıf düzeyde elektrostatik bağ yapar. Daha sonra interkalasyon ajanı, DNA'nın hidrofilik konumundan baz çiftleri arasında bulunan hidrofobik konumun iç kısmına yerleşebilir. Bir başka deyişle DNA'nın çözelti ortamındaki moleküllerle çarpışmalarından absorpladığı enerji, baz çiftlerinin kısa süreli açılmasını sağlamaktadır ve bu geçici açılma durumunda interkalasyon ajanı oluşan boşluğa girebilir (Long ve Barton 1990) (Şekil 2.21).



Şekil 2.21 DNA interkalasyon mekanizması (Anonim)

Kimyasal yapılar, DNA ile kovalent ve elektrostatik yoldan da bağlanabilir. Ancak interkalasyon termodinamik açıdan en çok tercih edilenidir. Çünkü su moleküllerinin hidrofobik etkisinden dolayı entropi artışı meydana gelir.

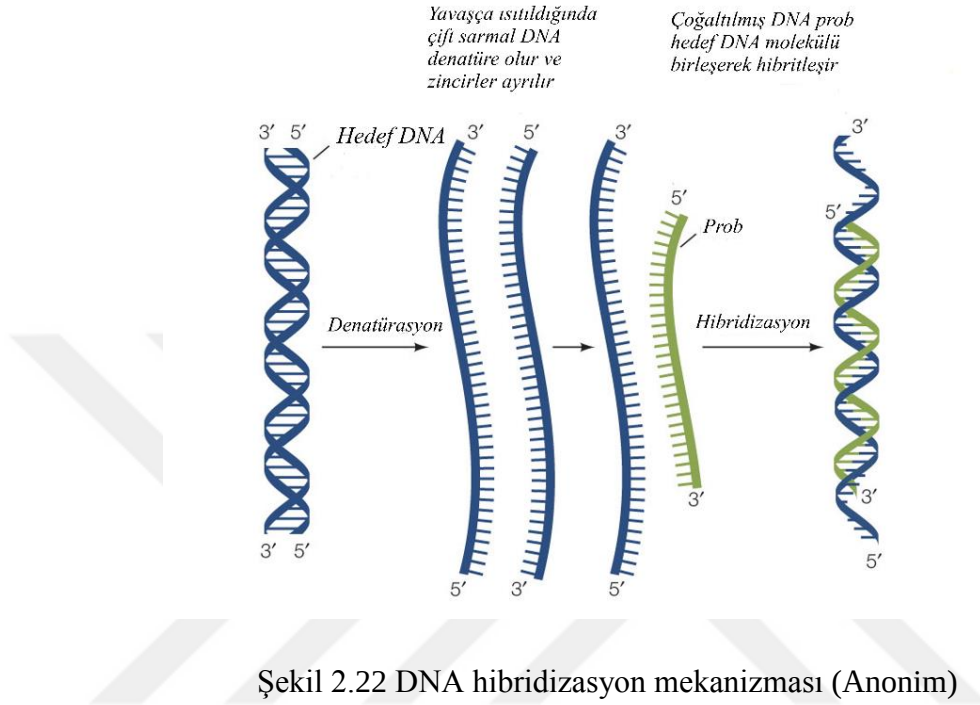
Özetle, katyonik türler daha verimli DNA interkalasyon maddeleridir çünkü ilk aşamalarda negatif yüklü DNA şekeri fosfat omurgası ile daha iyi etkileşir ve interkalasyon Na gibi fosfat grubuyla ilişkili yapıları serbest bırakarak polielektrolit etkisine yol açar.

İnterkalasyon, hem DNA' nın heliks yapısını bozar hem de DNA' ya bağlı RNA sentezini bozar. İnterkalasyon maddeleri Topoizomeraz (II) enzimini inhibe etme mekanizmasına göre hareket ederler. İnterkale olabilen bazı tipik ilaç etken maddelerinin etki mekanizmaları açıklanan şekilde aydınlatılmaktadır (Long ve Barton 1990).

2.2.4 DNA hibridizasyon mekanizması

DNA hibritleşme mekanizması; birbirine eşlenik iki adet tek sarmal nükleik asit dizisinin çift sarmal tek bir yapı haline gelmesi işlemidir.

Laboratuvar ortamında çoğaltılarak DNA problemleri halinde hazırlanan özgün DNA fibrillerinin, gözlemlenecek olan hedef DNA molekülüyle birleştirilme işlemi DNA hibridizasyonudur (Şekil 2.22).



DNA hibridizasyonu ile oluşmuş çift sarmal DNA molekülü aracılığı ile bir elektrokimyasal sinyal transdüserle okunabilir bir sinyal haline gelir.

Nükleik asit hibridizasyonunu etkileyen faktörler; sıcaklık, viskozite, hibritleşme oranı, katalizörler, hibritleşme zamanı, baz bileşimi, DNA dizisinin uzunluğu, ve ortamın pH değeridir (Gooding 2002).

2.2.5 Elektrokimyasal tabanlı DNA biyosensörleri

Algılayıcı yüzey bakımından DNA molekülünün tercih edildiği biyosensörler, DNA biyosensörleri olarak adlandırılmaktadır. Biyosensörün biyokimyasal parçasını oluşturan biyolojik malzeme DNA olduğunda ortaya DNA biyosensörü çıkar. DNA biyosensörleri, ilaç ve kanserojen maddeler gibi etkileşime giren analiz edilmesi hedeflenen maddelerin tayininde kullanılabilir.

Genel olarak elektrokimyasal DNA biyosensöründe, hedef dizi ile hibritlenecek olan prob tanıma yüzeyine immobilize (tutturulur) edilir. Hedef DNA, tanıma yüzeyinde yakalanır ve oluşan hibridizasyon sinyali analiz için kullanılabilecek bir elektronik sinyale dönüştürülür.

DNA biyosensörlerinde tanıma yüzeyine DNA probu kuvvetli ve düzgün tutturmak önemlidir. Elektrot yüzeyine DNA tutturma yöntemleri çeşitlilik göstermektedir. En çok kullanılan yöntemler; elektrostatik yolla prob tutturulması, pasif adsorpsiyon yoluyla tutturma ve kovalent yolla tutturmadır (Özkan vd. 2003).

2.2.5.1 Elektrokimyasal tabanlı DNA Biyosensörleri ile DNA dizi algılanması

SsDNA ve dsDNA'nın birbirlerine göre işaretlemeli veya işaretlemesiz elektrokimyasal davranışlarında ki farklılıklar temel alınarak elektrokimyasal biyosensörlerde DNA dizi algılamaları yapılmaktadır.

Birçok farklı yöntem aracılığı ile bu dizi algılamalarını gerçekleştirmek mümkündür.

DNA'nın dizi analizleri, genellikle gen iskeleti ve genetik kontrol mekanizması üzerine bilgiler sağlamaktadır. En önemli husus kalıtsal hastalıkların oluşum mekanizmasının ve hastalık tedavi aşamalarına ilişkin mekanizmanın aydınlatılabilmesi amacıyla, ilgili bölgede etkili olan gen lokasyonlarının tespit edilmesidir. Bu açıdan DNA dizi analizinin gerçekleştirilmesi hastalık tedavi aşamalarının başlangıç veya devamı için takip edilecek adımları belirleyen önemli bir kısımdır. DNA dizi analizi aracılığıyla çeşitli organizma genlerinin yapısal özellikleri hakkında önemli bilgilere erişmek mümkündür (Serra 2011).

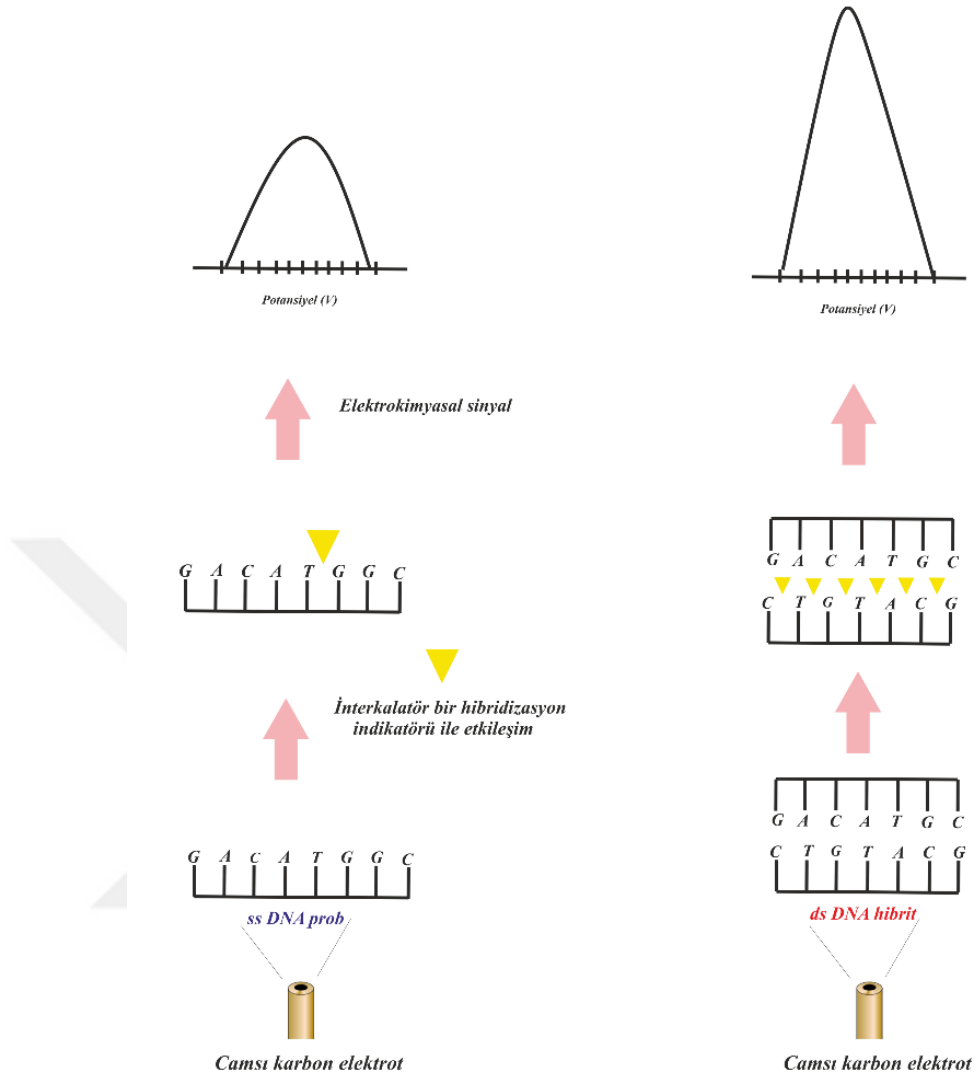
Hibridizasyon tayinlerinde voltametrik yöntemler daha hızlı verdiği belirlenmiştir. Fakat büyük miktarlardaki analizler için sahip immünokimyasal tekniklerin kullanılması daha uygundur.

Birçok farklı yöntem aracılığı ile bu dizi algılamalarını gerçekleştirmek mümkündür.

2.2.5.1.1 İndikatör tabanlı DNA dizi algılama yöntemleri

İndikatör tabanlı DNA dizi algılama iki şekilde gerçekleşebilmektedir.

İlk yöntemde DNA ile interkalasyon yapabilen bazı metal kompleksleri ve antibiyotik maddeleriyle tayin söz konusudur. İkinci yöntemde DNA dizisinde bulunan bazlarla özgün olarak etkileşen elektroaktif türlerle tayin söz konusudur. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen hibritleşme ile etkileşime giren indikatörün sebep olduğu artan/azalan elektrokimyasal cevap, hibridizasyonun belirlenmesi amacıyla sinyal olarak değerlendirilir. Elektroaktif türün indikatör amacıyla hareket edebilmesi için nükleotid (ssDNA ya da dsDNA) ile etkileştiğinde anlamlı ve birbirinde farklı yanıt vermesi gerekmektedir. Elektrokimyasal transdüserler hibridizasyon olayını ölçülebilen elektriksel bir sinyale dönüştürmede kullanılırlar. **Şekil 2.23**, interkalatör özellikte bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanmasının camı karbon elektrot yüzeyinde nasıl gerçekleştiğini göstermektedir (Erdem vd. 2000).



Şekil 2.23 İnterkalatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması

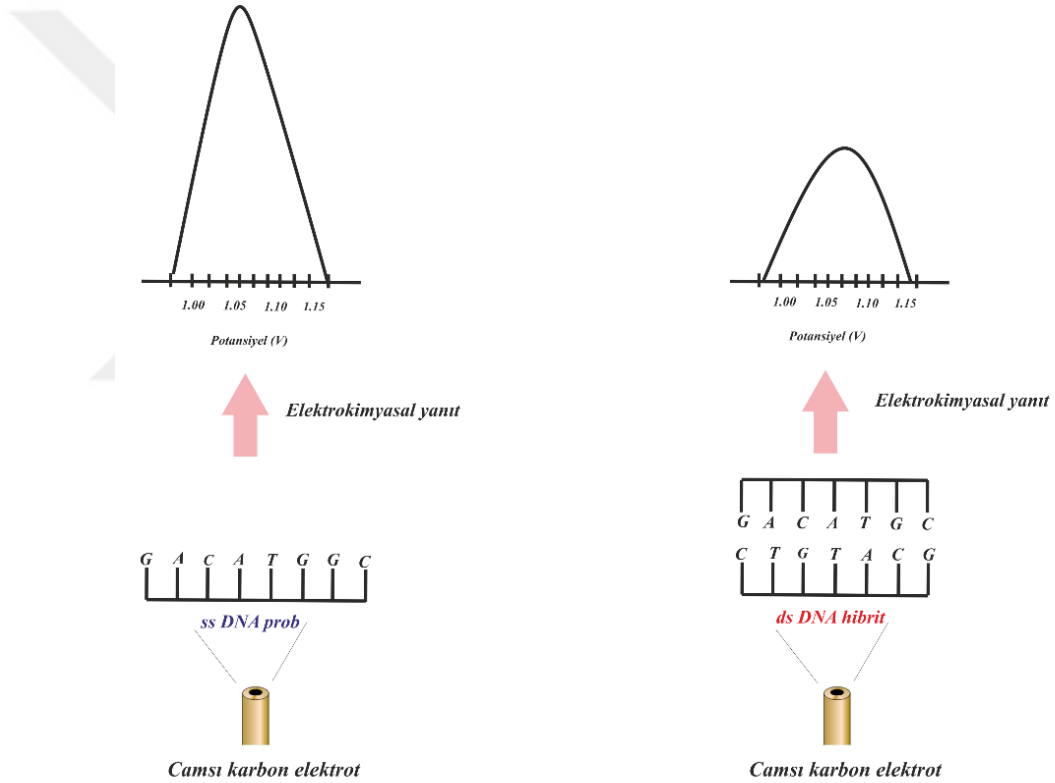
2.2.5.1.2 İnterkalatör ajan ile DNA dizi algılama yöntemi

İnterkalatör özelliğe sahip bir materyalin DNA sarmal yapısına girerek yapıya yerleşmesi durumu interkalasyondur.

dsDNA ile etkileşen maddeden alına sinyal cevabı yapıya yerleşmeden ss DNA ile etkileşmesinden alınan sinyal cevabına göre oldukça yüksektir.

2.2.5.1.3 İndikatörsüz ajan ile DNA dizi algılama yöntemi

Elektrot yüzeyine immobilize edilen tek sarmallı yapıya sahip prob diziye yani tek sarmallı DNA'ya ait guanin bazının verdiği elektrokimyasal cevapla probun tamamlayıcısıyla birleşiminden sonra meydana gelen çift sarmal DNA'ya ait guanin bazlarından alınan elektrokimyasal cevap arasında **şekil 2.24**'de ifade edilen bir farklanma bulunmaktadır. Bahsedilen farklanma hibridizasyonun belirlenmesi açısından elde edilen sinyal olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 2.24 İndikatörsüz DNA dizi algılanması

2.2.6 DNA biyosensörü araştırmalarının önemi

Bazı önemli hastalık tedavilerinin yapı taşı konumunda olan ilaç moleküllerinin nükleotid yapısıyla etkileşmesi ve bu etkileşimin sonucunda elde edilen sinyalin çeşitli

yöntemler ile belirlenmesi oldukça önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar biyosensörlerde tanıma yüzeyi olarak DNA kullanılmasına ilişkindir. Biyosensörlerde tanıma yüzeyi olarak DNA kullanıldığında bu yüzey ile etkileşime giren ilaç gibi analitlerin etkileşim mekanizması incelenebilir, miktar tayini yapılabilir ve bölgelerdeki hibridizasyon mekanizması incelenebilir. Antikanser özellikteki ilaç moleküllerinin DNA ile olan etkileşimi ve bu etkileşimin çeşitli geliştirilen modern tekniklerle aydınlatılması; ileride gerçekleştirilecek ilaç modellemelerine yönelik büyük bir öneme sahiptir. Bu tez kapsamında antikanser ilaçlar ve bu ilaçların DNA ile etkileşiminin sonucunda, alınan ilaç sinyali ve DNA yapısını oluşturan elektroaktif bazların elektrokimyasal sinyallerindeki azalışa bağlı olarak elektrokimyasal tayin gerçekleştirilmiştir (Kerman vd. 2003).

2.2.7 UV-vis spektroskopisi ile ilaç-DNA etkileşiminin incelenmesi

İlaç-DNA etkileşiminin incelenmesi ve etkileşim mekanizmasının aydınlatılmasında spektroskopik yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Son zamanlarda voltametrik ve moleküler modelleme uygulamaları ile birlikte oldukça fazla kullanılmaktadır. Spektroskopik yöntemlerde temel olarak DNA veya DNA ile etkileşime giren etken maddenin absorbans karakteri incelenir. İlaç-DNA etkileşimi incelenirken batokromik, hiperkromik ve hipokromik etkiler göz önünde bulundurulur.

Etkileşimin türü interkalasyon olduğunda söz konusu etki batokromik etki olarak açıklanır. Bunun sebebi DNA'nın bazları ile etkileşime giren molekülün kromofor grubu arasında istiflenme yaşanmasıdır. DNA'nın bazlarının yapısındaki π orbitali etken maddenin π^* orbitali bir π - π^* konjugasyonu oluşturur ki bu sırada geçişler arasında enerji farkı azalmaya başlar ve absorpsiyon bandında bir kayma meydana gelir. Bu kaymaya batokromik kayma adı verilir.

2.3 Analitik Yöntem Validasyonu

Günümüz analitik kimyası, ilaç etken madde, biyolojik örnekler, gıda numuneleri gibi karmaşık numunelerdeki bileşenleri güvenilir bir şekilde tanımlayabilen ve ölçebilen yeni analitik tekniklerin ve yöntemlerin geliştirilmesine dayanmaktadır. Kromatografi, kütle spektrometrisi, çeşitli spektroskopik tekniklerin kombinasyonu ve elektrokimyasal analiz teknikleri, bu gelişmelerin örneklerinden sadece birkaçıdır. Analitik metodlar

sayesinde özellikle ilaç etken maddelerin hem nitel hem de nicel analizini ve bazı metabolitlerin analizini yapmak mümkün olmaktadır.

Bu tür analizlerin yapılabilmesi için tamamen doğrulanmış analitik metodların kullanılması ve geliştirilmesi şarttır. Geliştirilen her yeni metodun validasyon parametreleri birbirinden bağımsız olmak zorundadır. Validasyon, faydalı analitik veriler sağlamak için yöntemin uygunluğunu belirleme sürecidir. Validasyon aynı zamanda, yöntemin performans parametrelerinin analitik veriler için gereklilikler ile karşılaştırıldığı bir değer yargısıdır. Amerikan Farmakopesinin (USP 24) tanımına göre validasyon ise analiz uygulanacak madde için geliştirilen analiz metodunun belirlenen aralıkta doğruluğunu, uygunluğunu, tekrar edilebilirliğini, duyarlılığını, sağlamlığını tespit etmektir.

Validasyon süreci, yöntemin sağlam teknik ilkelere dayandığını ve pratik ölçüm amaçları için uygulamaya indirgendiğini kanıtlamaktadır. Validasyon değerlendirmesi genel veya spesifik ölçekte olabilir (Swartz ve Krull 2012).

2.3.1 Genel validasyon

Ölçüm tekniklerinin validasyonu, dayandıkları bilimsel temellerin iyi açıklanmasına bağlıdır. Ölçüm ilkelerinin daha iyi anlaşılması için kapsamı genişletebilir ve kullanımlarının kalitesi iyileştirebilir. Yöntem validasyonu, genellikle hem ölçüm tekniklerinin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını hem de yüksek derecede bilgi birikimini içeren, genellikle bireyler tarafından yapılan uygulamalı araştırmaların sonucu olarak ortaya çıkar. Genel validasyon basamakları sırasıyla bir cihazın hem donanım hem de yazılım olarak kontrolü ve validasyonuna ve geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için yöntemin parametrelerinde yapılan değişikliklerden sonra uygulanan validasyona dayanmaktadır. Yöntemlerin tipik pratik durumlarda test edilmesi, hem geliştirme sürecinde hem de validasyonda önemli bir rol oynar. Normalde kapsamı sınırlı olmakla birlikte, araştırma aşamasında validasyon kapsamlı olabilir ve çok çeşitli son kullanımlar için geçerli olabilir (Swartz ve Krull 2012).

2.3.2 Spesifik validasyon

Spesifik validasyon belirli kimyasal özellikte ki ilaç etken madde gibi malzemelerin uygulamalarında tercih edilir. Uygun bir ölçüm yöntemin seçimi spesifik validasyon açısından oldukça önemlidir. Daha önce genel terimlerle doğrulanmış olsa bile, örnek matrisindeki olası farklılıklar ve diğer parametreler nedeniyle yöntemler veya prosedürlerin eldeki durum için kesin olarak geçerli olduğu varsayılmaz (Ozkan vd. 2015).

2.3.3 Validasyon karakteristiği

Validasyon çalışmaları yapılırken, mümkün olduğunca numune hazırlamanın tüm adımlarını içeren tüm analitik prosedürler uygulanmalıdır. Buna karşılık, "yöntem" terimi, yalnızca analitik tekniği belirleme amacıyla (örneğin, kapiler elektroforez, (ters faz) kromatografi ve spektrometri) sınırlandırılmalıdır. Validasyon karakteristiğini oluşturan parametreler sırasıyla doğruluk, (geri kazanım (recovery)), seçicilik (selectivity, specificity), teşhis sınırı (limit of detection) tayin alt sınırı (limit of quantification), kesinlik (precision), çalışma aralığı (linearity range), stabilite ve sağlamlık olarak bilinmektedir (Ozkan vd. 2015).

2.3.3.1 Doğruluk

Doğruluk bilinen en genel tanımıyla gerçek veya gerçek olarak kabule edilebilecek değere olan yakınlıktır. Bu kavram aynı zamanda ölçülen hatanın büyüklüğü ile kıyaslanarak ölçülebilmektedir. Öte yandan doğruluk kavramı bir büyüklük olarak düşünüldüğünde gerçek değer hiçbir zaman tam olarak bilinemediğinden tayin edilemez. Doğruluk analiz sonucunda elde edilen değer ile gerçek değer arasında ki yakınlığı belirler. Biyolojik bir malzeme veya ilaç etken madde ile çalışıldığında doğruluk değeri % kazanım üzerinde verilmektedir. Geri kazanım uygulaması analiz yapılan ortamdan istenilen analitin ne kadar oranda geri alınabileceğinin göstergesidir. Geri kazanım uygulaması sayesinde biyolojik sıvı ortamında analitin sergilediği davranış gözlemlenebilir. Genel olarak geri kazanım uygulamasında analitin analiz ortamından % 100 oranında geri alınabilmesi arzu edilir. Fakat geri kazanım değerleri biyolojik ortamlar ve çeşitli ilaç etken maddelerin varlığında çalışıldığında standart sapma değeri ± 4 oranında değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle biyolojik ortamlarda

geri kazanım uygulaması yapıldığında geri kazanım değerlerinin %100 olması beklenmemektedir.

Geri kazanım uygulaması toplamda üç değişik derişim varlığında yapılmaktadır. Bunun sebebi çalışılan derişim aralığının tamamını kapsayacak aralıklarda çalışılmayı hedeflemektir. Bu derişim aralıkları sırasıyla düşük derişim: tayin alt sınırı ya da yakın derişime, orta derişim: çalışılan derişim aralığının orta noktasında bulunan bir derişim son olarak, yüksek derişim: çalışılan derişim aralığının piknoktalarında ya da bitişğinde bulunan derişim olarak tanımlanmaktadır. Seçilen her bir derişim için en az beş analiz yapılmalıdır. Bu analizlerden ortalaması hesaplanan en az üç değerin % 15 inden daha yüksek sapma göstermemesi beklenmektedir. Tayin alt sınırında bulunan derişim için ise sapmanın % 20 değerini geçmemesi beklenmektedir.

Geri kazanım uygulamasına yönelik boş matris ortamına analit ekleme, standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi ve referans standart ile karşılaştırma yöntemleri tercih edilmektedir (Wolters 1990).

2.3.3.1.1 Boş matris ortamına analit ekleme

Bu yöntem farmasötik dozaj formlar gibi matris etkisi yaratabilecek malzemeler ile çalışıldığında uygulanan bir metottur. Bu yöntemde boş matrise farklı derişimler da analit ekleme yapılmaktadır. Boş matris ise etken maddesiz referanslardan ve bilinen standartlardan oluşmaktadır. Analit ekleme basamağında % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranları kullanılır ve her derişim oranında minimum üç analiz yapılır. Elde edilen bulgular % geri kazanım olarak açıklanmakla birlikte % bağıl standart (BS) ve/veya % bağıl standart sapma (BSS) aracılığıyla verilmektedir (Wolters 1990).

2.3.3.1.2 Referans standart ile karşılaştırma

Referans standart ile karşılaştırma yönteminde uygulanan analiz yöntemi aracılığıyla birbirinden farklı derişimde, üç tekrarlı sonuç elde edilir ve bu sonuçlar % geri kazanım bulgularına dönüştürüldükten sonra sonuçlar toplanır. Sonuçlar referans olarak kabul edilen sonuçlar ile istatistiksel bakımdan karşılaştırılır. Bu karşılaştırma işleminde sırasıyla student-t ve Fisher (F) testleri tercih edilir. Student-t testi ile iki metodun kendi aralarındaki ortalama farklılıkları karşılaştırılırken, F testi aracılığıyla da standart

sapmalar arasında meydana gelen farklılıklar kıyaslanır. Hesaplamalarda yer alan F ve t değerleri standart tablolarda sunulan teorik F ve t standart verileri ile karşılaştırılır. Teorik değerler ile kıyaslandığında hesaplanan değerlerin görece daha küçük olması geliştirilen yöntemin ne kadar hassas olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulguların ortalama değerleri, % bağıl standart sapma (%BSS) ve % bağıl hata (BH) (% Bias) ile birlikte sunulur (Wolters 1990).

$$\%Bağıl\ standart\ sapma = \frac{Standart\ sapma}{Gerçek\ değer - Ortalama\ değer} \times 100$$

$$\% Bağıl\ hata = \frac{Gerçek\ değer - Ortalama\ değer}{Gerçek\ değer} \times 100$$

Yukarıda verilen eşitlikler aracılığıyla geri kazanım sonuçları değerlendirilmektedir.

2.3.3.1.3 Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi

Bu yöntemde daha önceden belirlenen ve farklı miktarlardaki analit, matris ortamında bulunan miktarı bilinmeyen ya da önceden analiz edilen aynı analitin üzerine eklenir. Esas örnekteki etken madde derişimu ise elde edilen deneysel datalar kullanılarak matematiksel eşitliklerle hesaplanır. Literatürde araştırmacılar genel olarak % 25, 50, 100 oranında analit eklemeyi uygun görmüşlerdir. Analit eklenen ve eklenmeyen bütün numunelerin minimum üç tekrarlı analizi yapılır. Bulgular eklenen ve tayin edilen analit miktarları açıklanarak sunulur. Bu yöntem, kullanılan katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Elde edilen bulguların ortalamaları, % bağıl standart sapma (% BSS) ve % bağıl hata (BH) (% Bias) ile birlikte verilir (Wolters 1990).

2.3.3.2 Kesinlik

Kesinlik kavramı elde edilen ölçümlerin ne kadar tekrarlanabilir olduğunu yani tamamen aynı yöntemle elde edilen değerlerin birbirine olan yakınlığını göstermektedir.

Temel olarak bir analiz sonucu elde edilen ölçümün kesinliği tekrarlı analizler sonucunda kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Tekrarlanan analizlerden elde edilen sonuçların kesinliğini belirleyebilmek amacıyla standart sapma, varyans ve varyasyon katsayısı terimleri kullanılmaktadır. Söz konusu üç terim x_i tekil değerlerinin ortalamadan ne ölçüde saptığını göstermektedir. Ortalamadan sapma d_i ile temsil edilmektedir.

$$d_i = |x_i - \bar{x}|$$

Ölçümü tamamlanan her bir derişim için en az beş tayin gerçekleştirilmelidir. Bu analizlerden ortalaması hesaplanan en az üç değerin % 15 inden daha yüksek sapma göstermemesi beklenmektedir. Tayin alt sınırında bulunan derişim için ise sapmanın % 20 değerini geçmemesi beklenmektedir.

Genel olarak kesinlik kavramı üç temel kısımdan oluşmaktadır. Bu kavramlar tekrarlanabilirlik (repeatability), orta kesinlik (intermediate precision) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) kavramlarıdır (Skoog vd. 2017).

2.3.3.2.1 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, aynı yolla ve aynı analiz koşulları altında gerçekleştirilen analiz sonuçlarının kesinliğini belirlemektedir. Analizi yapılacak analitin ölçüm çözeltisi hazırlanır ve minimum 10 tekrarlı ölçümü kaydedilir. Bu tekrarlanabilirlik uygulaması bir yandan da gün içi ya da deney aşamasındaki kesinlik olarak tanımlanmaktadır. Sonuç olarak kesin kabul edilen verilerin % BSS oranları hesaplanır ve % BSS oranının %1'in altında olması beklenir. Tez çalışması kapsamında kesinlik araştırmaları için aynı gün içerisinde aynı laboratuvar koşullarında, aynı cihaz ile birbirine paralel tekrarlı ölçümler alınarak sonuçlar % BSS olarak bulgular ve tartışma kısmında ifade edilmiştir (Skoog vd. 2017).

2.3.3.2.2 Orta kesinlik

Orta kesinlik kavramı analizin gerçekleştirildiği laboratuvar içindeki deneysel farklılıkları aydınlatan kesinlik kavramıdır. Tekrarlanabilirliğin aksine orta kesinlik farklı günlerde, farklı analizciler veya farklı cihazlar aracılığıyla saptanabilmektedir. Ayrıca tekraredilebilirlik analizinde olduğu gibi analizi yapılacak analitin ölçüm

çözeltileri hazırlanır ve minimum 10 tekrarlı ölçümü kaydedilir. Orta kesinlik kavramı deneysel çalışmanın tam manada kesinliğini oluşturmaktadır. Ayrıca orta kesinlik çoğu zaman deneyler arası veya günler arası kesinlik olarak da tanımlanmaktadır. Orta kesinlik standartlarını yakalayan bir deneysel çalışma diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış sayılmaktadır. Sonuç olarak orta kesinlik elde edilen değerlerin % BSS oranları hesaplanır ve % BSS oranının %2'in altında olması beklenir. Fakat biyolojik malzemeler ile çalışıldığı takdirde bu oran %10 ile %15 arasında değişkenlik göstermektedir. Tez çalışması kapsamında orta kesinlik araştırmaları için farklı günler içerisinde farklı laboratuvar koşullarında (sıcaklık, nem vb.), birbirine paralel tekrarlı ölçümler alınarak sonuçlar % BSS olarak bulgular ve tartışma kısmında ifade edilmiştir (Skoog vd. 2017).

2.3.3.2.3 Tekrar elde edilebilirlik

Bu kavram, deneysel aşamının farklı laboratuvar ortamlarında sürdürülebilmesi amacıyla test edilmektedir. Özellikle ortak bir çalışma yürüten farklı laboratuvarların uygulamaları sonucunda oluşan ve deneysel farklılıkları vurgulayan kesinlik kavramıdır. Tekrar elde edilebilirlik, genel olarak standardizasyon çalışmaları için oldukça yararlı bir kesinlik derecesidir. Analitik yöntem farklı laboratuvarlarda eş zamanlı olarak anda kullanılacaksa tekrar elde edilebilirliğin hesaplanması ve hesaplanan değerlerin raporlanması gerekmektedir. Analizi gerçekleştirilecek analitin analiz ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı laboratuvarlarda sistemlerinde, farklı zamanlarda ve farklı analizciler tarafından hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden minimum 3 tekrarlı ölçüm kaydedilir. Sonuç olarak tekrar elde edilebilirlik değerleri için sonuçların % BSS oranları hesaplanır ve % BSS oranının % 2'in altında olması beklenir. Fakat biyolojik malzemeler ile çalışıldığı takdirde bu oran %10 ile %15 arasında değişkenlik göstermektedir (Skoog vd. 2017).

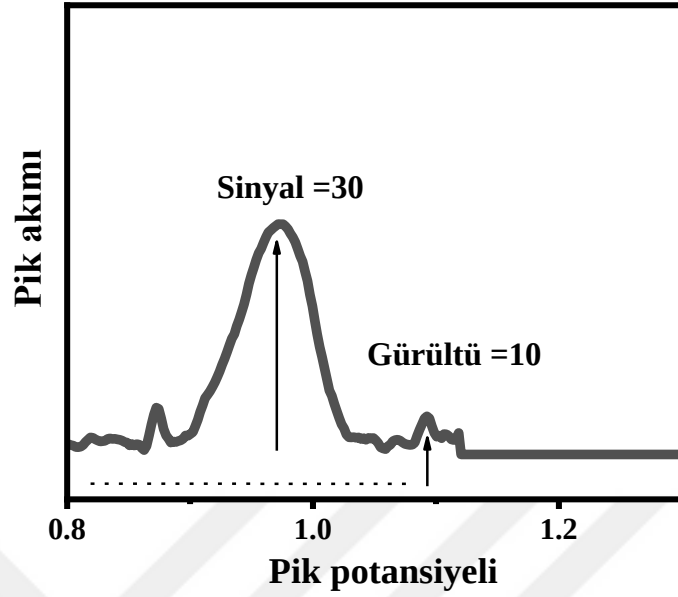
2.3.3.3 Seçicilik

Seçicilik, analizi yapılacak analitin çözelti ortamına bulunan protein, bazı iyonlar ve yardımcı etken maddeler gibi girişim yapma ihtimali olan türler varlığında miktarının tam ve doğru olarak ölçülebileceğinin göstergesidir. Ayrıca bu kavram girişim derecesinin ölçüsünü en iyi ifade eden parametredir. İlaç etken maddesi yanında

safsızlıkların, çeşitli parçalanma ürünlerinin, etken madde ile benzer kimyasal maddelerin ya da plasebo bileşenlerinin olduğu numune ile tüm bileşenlerin olmadığı numune ile yapılan miktar tayini analizlerinde oluşan fark ilaç etken maddesinin konsatrasyonunu vermektedir. Eğer stabilite çalışması gerçekleştirilecekse bu parametrenin kesinlikle incelenmesi gerekmektedir. Seçicilik çalışması öngörülen yöntemin doğruluğu, doğrusallığı ve kesinliği bakımından oldukça önemli olmakla birlikte seçicilik istenilen düzeyde değilse bahsedilen parameterelerin güvenilirliğinden şüphe edilmelidir. Kütle spektrometri analiz tekniği ile birleştirilmiş yöntemlerin kullanım durumunda çözelti ortamında girişimin meydana gelmediği kabul edilmektedir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen sensörler, seçicilik araştırmaları için çözelti ortamında farklı türden biyolojik malzemeler, iyonlar ve ilaç etken maddeleri varlığında birbirine paralel tekrarlı ölçümler alınarak sonuçlar % BSS olarak bulgular ve tartışma kısmında ifade edilmiştir (Skoog vd. 2017).

2.3.3.4 Teşhis sınırı, gözlenebilirlik sınırı

Teşhis sınırı, analizi yapılacak analitin, kantitatif sınırların dışarısında gözlemlenebildiği ve tayin edilebildiği en düşük derişim olarak tanımlanmaktadır. Teşhis sınırını hem deneylerden direkt olarak hem de bir takım hesaplamalar yaparak belirlemek mümkündür. Yapılan deneylerden direkt olarak teşhis yapılırken sinyalin gürültüye olan oranı 3 olarak kabul edilir (**Şekil 2.25**).



Şekil 2.25 Teşhis sınırı tayininde kullanılan sinyal/gürültü oranının gösterimi

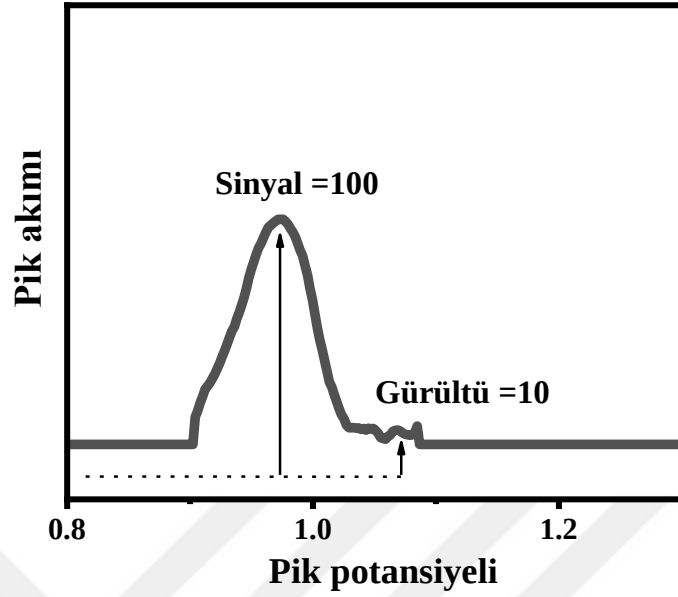
Hesaplama yöntemi ile teşhis yapıldığında ise aşağıda ki eşitlik kullanılır:

$$Teşhis\ sınırı = \frac{3.3 \times standart\ sapma}{eğim}$$

Bahsedilen eşitlikte standart sapma hesaplanırken kör çözeltide yapılan analiz sonucunda minimum 5 ya da kalibrasyon doğrusunun kesişim noktasının standart sapması kullanılır. Eğim ise kalibrasyon doğrusundan elde edilen “y” datalarıdır (Skoog vd. 2017).

2.3.3.5 Teşhis alt sınırı

Teşhis alt sınırı, analizi yapılacak analitin, kantitatif sınırların dışarısında doğru ve kesin bir şekilde tayin edilebildiği ve doğrulsallık sınırına girmeyen, kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim olarak tanımlanmaktadır. Tehiş sınırında olduğu gibi hem deneylerden direkt olarak hem de bir takım hesaplamalar yaparak belirlemek mümkündür. Yapılan deneylerden direkt olarak teşhis yapılırken sinyalin gürültüye olan oranı 10 olarak kabul edilir (Skoog vd. 2017) (Şekil 2.26).



Şekil 2.26 Teşhis alt sınırı tayininde kullanılan sinyal/gürültü oranının gösterimi

Hesaplama yöntemi ile teşhis yapıldığında ise aşağıda ki eşitlik kullanılır:

$$\text{Teşhis alt sınırı} = \frac{10 \times \text{standart sapma}}{\text{eğim}}$$

Bahsedilen eşitlikte standart sapma hesaplanırken kör çözeltide yapılan analiz sonucunda minimum 5 ya da kalibrasyon doğrusunun kesişim noktasının standart sapması kullanılır. Eğim ise kalibrasyon doğrusundan elde edilen “y” datalarıdır.

Biyolojik malzemeler ile çalışıldığı zaman teşhis alt sınırı derişimi seçilirken ölçülen sinyalin cevabının kör için ölçülen sinyalin cevabından minimum 5 katı kadar büyük olmasına dikkat edilmelidir.

Analit için elde edilen pikin net olarak tanımlanabilir ve diğer girişim yapma ihtimali bulunan malzemelerden farklı olması gerekir ayrıca % 20 kesinlik ve % 80– 120 doğrulukta tekrar edilebilir olmalıdır.

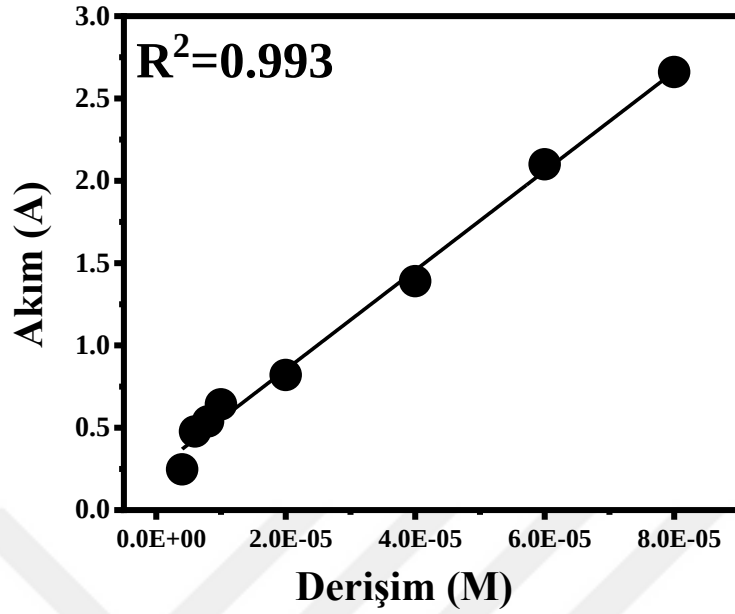
2.3.3.6 Doğrusallık

Derişime karşı (x eksen)- akım (y eksen) değerlerinin doğru orantılı artmasıyla çizdirilen kalibrasyon grafiğinde verilerin nokta biçiminde düz çizgi üzerinde tam olarak konumlanması doğrusallığı açıklamaktadır. Doğrusallığı oluşturan parametreler sırasıyla korelasyon katsayısı (r), eğim (m) ve kesme noktasıdır (n). Bu parametreler, analit derişiminin ölçülen akım değerlerine karşı yapılan bir regresyon analizi ile matematiksel hesaplamalar kullanılarak belirlenir. Korelasyon katsayısı değeri $r= 0,999$ ve üzerinde ise ve akım değerleri çizilen doğrunun üzerinde yer alıyorsa doğrusallık sağlanmış olarak kabul edilir. Doğrusallığı tam olarak belirleyebilmek amacıyla hazırlanan ana çözeltiden en az 5 değişik derişimde analiz yapılması gereklidir.

Bu derişimler seçilirken alt sınırı hedef seviyenin % 50' den küçük ve üst sınırı da hedef seviyenin % 150' den büyük olacak olmasına dikkat edilir. Seçilen 5 derişimle yapılan ölçümler minimum 3 kes tekrarlanmalıdır. Ayrıca doğrusallığın tam valide edilebilmesi için kesişim ve eğim değerlerinin % BSS oranları ya da standart hataları da hesaplanarak raporlanmalıdır (Skoog vd. 2017).

2.3.3.7 Kalibrasyon grafiği

Bilinen analit derişimleri ile cihazda ölçülen akım değerleri arasındaki ilişki kalibrasyon grafiğini oluşturmaktadır. Bir kalibrasyon grafiği çizilirken belirlenen derişimler önceden gerçekleştirilen deneylerle tespit edilir. Kalibrasyon grafiğin de yalnızca doğrusal sonuçlar yer almaz aynı zamanda doğrusallıktan sapan değerlerde yer alabilir. Tayin alt ve tayin üst sınırı derişimleri ile beraber çalışma aralığında kör hariç minimum 5 derişim için kalibrasyon grafiği çizilebilir (**Şekil 2.27**). Doğrusallıktan sapan değerler için standart derişim değerleri arttırılabilir.



Şekil 2.27 Örnek kalibrasyon grafiğı

Biyolojik malzemeler ile çalışıldığı taktirde kalibrasyon grafiğı çizilirken bazı kriterlere dikkat edilmesi gereklidir. Bunlardan ilki tayin alt sınırı derişimundan alınan cevaplar arasındaki sapma % 20 oranından yüksek olmamalıdır. İkincisi ise tayin alt sınırı derişimin dışından seçilen standart derişimlerden alınan cevaplardaki sapmalar % 15 den yüksek olmamalıdır (Skoog vd. 2017).

2.3.3.8 Duyarlılık

Bu kavram, doğrusallığın sağlandığı aralığın içindeki doğru denkleminde elde edilen eğimdir. Duyarlılık kavramı çoğu zaman tayin alt sınırı olarak tanımlanmaktadır. Tayin alt sınırının düşük olması önerilen yöntemi o derece duyarlı kılmaktadır.

2.3.3.9 Çalışma aralığı

Uygun doğruluk ve duyarlılık parameterelerine sahip ve doğrusallığı sağlanmış metodun geçerli olduğu alt/üst sınır aralığında bulunan derişim aralığı, çalışma aralığını oluşturmaktadır. Derişim aralığı belirlenirken genelde seçilen yöntemin türü dikkate alınır. Analit analizinde kullanılan standartların derişimleri arzu edilen seviyede ya da bu seviyeye yakın ölçülür (Skoog vd. 2017).

2.3.3.10 Sağlamlık

Öngörülen yöntemin analiz boyunca değişebilecek parametrelerden ya da kabul edilebilir değişikliklerden etkilenmeden kararlılığını koruyabilme kapasitesidir. Bahsedilen parametreler sıcaklık, nem, pH, çözücü etkisi ve iyonik şiddet gibi etkenlerdir. Sağlamlık geliştirilen yöntemin onaylanmasında anahtar rol oynayan bir parametredir ve mutlaka incelenmelidir. Ayrıca sağlamlık yöntemin geliştirildikten sonra normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür (Boqué vd. 2002).

2.3.3.11 Tutarlılık

Öngörülen yöntemin laboratuvar ölçeği dışında ve gerçekte kullanılan şartlarda tekrar edilebilir olmasının belirlenmesidir. Tutarlılığın belirlenebilmesi için çalışmanın: aynı laboratuvar ve şartlarda farklı araştırmacılar ile; aynı laboratuvar ve farklı cihazlar tarafından; farklı laboratuvar ve gerçekleştirilmesi; reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi; farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi; ayırma yöntemlerinde aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir.

Tutarlılık kavramı ile orta kesinlik kavramı benzerlik göstermekte olup % BSS ile ifade edilir. Bu nedenle ICH (International Conference on Harmonization) tutarlılığın incelenmesi zorunlu işlemler grubuna dahil etmemiştir.

2.3.3.12 Stabilité

Stabilité kesin yapılması gereken bir validasyon parametresi olmamakla birlikte yapılması çoğu zaman tavsiye edilen bir parametredir. Sonuçların tekrar edilebilirliği ve güvenilirliği açısından numunelerin, standart maddelerin ve kullanılan çözücülerin hedeflenen süre/süreler içerisinde stabilitesini koruması gereklidir.

Bir ilaç etken maddeyi stabilité açısından değerlendirmek amacıyla etken madde oda koşullarında (25 °C), minimum 6 saat çerçevesinde test edilmelidir. Saklama süresi test edildikten sonra stabilité değerlendirmesi yeni hazırlanan ana çözeltiyle karşılaştırıldıktan sonra ölçüm yapılmalıdır. Stabilité donma-çözme stabilitesi, kısa süreli stabilité ve uzun süreli stabilité olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Boqué vd. 2002).

2.4 İlaç Tanımı ve Sınıflandırılması

İlaç, canlı bir organizmaya sistemine alındıklarında, organizma sistemi üzerinde meydana getirdikleri etki ile herhangi bir hastalığın teşhisini, iyileştirilmesini veya semptomların ortadan kaldırılmasını imkân sağlayan canlı organizmalara çeşitli uygulamalar ile verilen kimyasalların bütünüdür (Keiser vd. 2010).

İlaçlar genel olarak fizyolojik etkilerine göre sınıflandırılır ve değerlendirilirler. İlaçların fizyolojik olarak sınıflandırılması şu şekildedir;

- Sinir sistemini etkileyenler
- Merkezi sinir sistemini etkileyenler
- Perifer sinir sistemini etkileyenler
- Otonom sinir sistemini etkileyenler
- Kalp ve damar sistemini etkileyenler
- Sindirim sistemini ve bağırsakları etkileyenler
- Solunum sistemini etkileyenler
- Kemoterapik etki etkileyenler
- Vitaminler ve hormonlar
- Dezenfektan ve antiseptikler

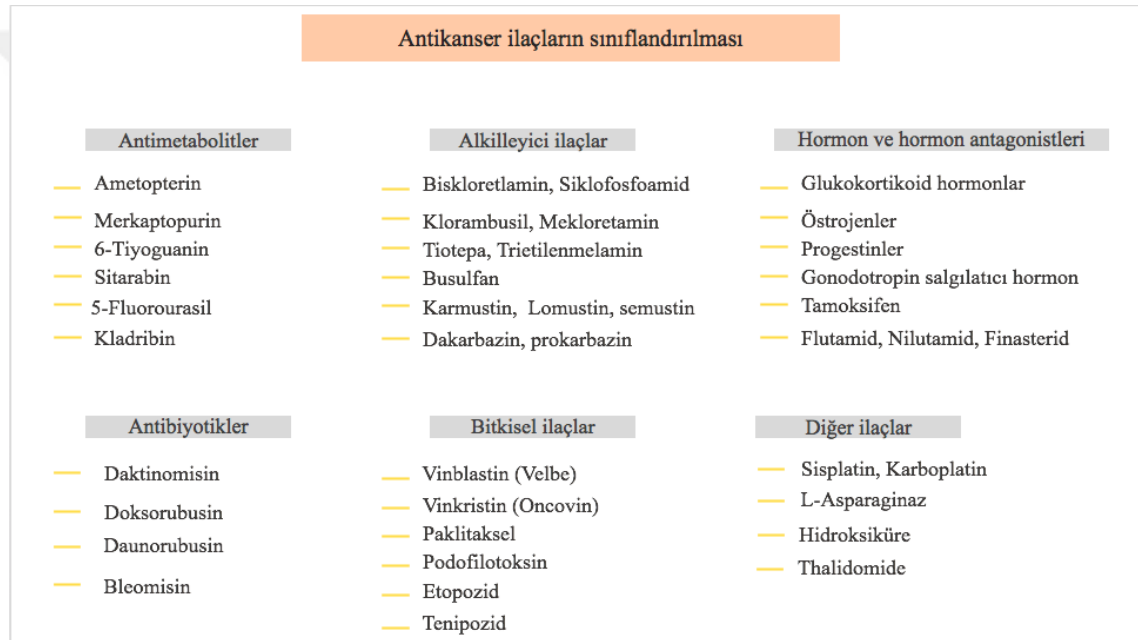
2.4.1 Antikanser (Antineoplastik) İlaçlar

Antikanser ilaçlar temel olarak konak işlevi gören hastanın normal hücrelerine etki göstermeksizin tümör hücresinin büyümesini durdurmakla görevli ilaçlardır. Antikanser ilaçların kanser hücrelerine karşı seçicilikleri düşüktür. Bir taraftan kanserli hücreleri etkisizleştirirken bir taraftan da hızlı çoğalmı gösteren normal hücreleride yok edebilirler. Ayrıca antikanser ilaçların (mutajenik, teratojenik ve karsinojenik) bazı önemli etkileride bulunmaktadır. Antikanserlerin neredeyse tamamının hücre bölünmesi ve/veya çoğalması olaylarını inhibe etmeleri bahsedilen ilaçlarda ortak bir özelliktir. Bu nedenle kemikiliği (lökosit ve eritrosit oluşumu), gonadlar, gastrointestinal kanal

(epitel tabakanın sürdürülebilirliği), deri (özellikle saç folikülleri) gibi dokular en fazla etkilenir (Kenakin ve Christopoulos 2011).

2.4.1.1 Antikanser ilaçların sınıflandırılması

Antikanser ilaçlar antimetabolitler, antibiyotikler, alkilleyiciler, bitkisel ilaçlar ve hormon-hormon antagonistleri olmak üzere 5 ana sınıfa ayrılırlar. Bu gruplar içerdikleri organik yapılara göre de çeşitli alt sınıflara ayrılmaktadır. Aşağıdaki alt başlıklar içerisinde bazı önemli ilaçlara özellikle değinilmiştir (Şekil 2.28).



Şekil 2.28 Antikanser ilaçların genel olarak sınıflandırılması

2.4.1.2 Antimetabolitler

Antimetabolitler, proteinler, DNA ve RNA gibi temel hücre bileşenlerinin sentez adımlarında substrat veya koenzim işlevi gören farklı doğal metabolitlerin analoglarıdır. Bu sebepten enzim yüzeyinde kendi doğalarına özel bölgelere karşı ilgili türlerle yarışarak bağlanmayı engellerler. Bazı metabolitlerde yarışma olmaksızın yüzeydeki aktif bölgelere kovalent bağlanma türüyle bağlanarak sentez ile ilgili enzimi tersinmez olarak inhibe eder. Antimetabolit ilaçlar alkilleyici ajanlar gibi oldukça fazla tercih edilene antikanser ilaç sınıfındandır. Etki mekanizmalarının haricinde bu gruptakilerden

diğer önemli farklılıkları, aşamaya özgü olmaları ve çoğalma riski yüksek tümörlerde etki göstermeleridir. Aynı gruba dahil ilaçlar folik asit, pürin, pirimidin antimetabolitleri olmak üzere üç alt sınıfa ayrılırlar (Yeh vd. 2006).

2.4.1.3 Folik asit antimetabolitleri

Folik asit yolağında etkili olan ilaçlar kanser, enfeksiyöz hastalıklar, romatoid artrit ve sedef hastalığında kullanılmaktadır. Bu gruptaki ilaçlara ametopterin ve aminopterin dahil olmaktadır. Bu grubun en çok tercih edilen türü ametopterindir. İnsan ve hayvanlarda kanser ve maling olmayan hastalıklarda ayrıca yine insanlarda koryokarsinom gibi çeşitli neoplazmalarda kullanılmaktadır. Dihidrofolat redüktaz enziminin aktif bölgesine güçlü olarak bağlanmasıyla enzim inhibe olur ve tetrahidrofolik asit oluşumunun önüne geçer. Böylece DNA, RNA, ATP sentezi için gerekli pürin sentezi gerçekleşemez ve protein sentezi yapılamaz. Hücre içine aktif taşımayla girmesi ve hücre zarını kolay geçememesi diğer özellikleridir (Yeh vd. 2006).

2.4.1.4 Pürin antimetabolitleri

6-Merkaptopurin ve 6-Tiyoguanin ilaçları bu grupta yer alan ilaçlardır. 6-Merkaptopurin ön ilaç konumuna sahiptir. Bunun nedeni sitotoksik etki gösterebilmesi için, hücre içinde diğer purin bazı analogları ve purin nükleozid analogları gibi, nükleotid şekline dönüştürülmesi gerekliliğidir. Bu ilaç allopurinol, inaktivasyonunu inhibe ederek etkinliğini arttırmaktadır. Ayrıca allopurinol, kanser tedavisinde aşırı hücre yıkımı sonucu oluşan fatal hiperürisemiye önlemek amacıyla da kullanılan ürikozürük bir ilaçtır.

2.4.1.5 Pirimidin Antimetabolitleri

Bu grupta 5-Fluorourasil, Floksuridin, Tegafur ve Sitarabin ilaç türleri yer almaktadır. 5-Fluorourasil DNA ve RNA'nın yapı taşı olan urasil ve timin bazlarına benzerlik gösteren florlanmış bir pirimidin analogdur. Meme bezi ve kolorektal karsinomlar gibi sindirim kanalı karsinomlarında kullanılmaktadır. Sitarabin, hücre siklus faz spesifik bir pirimidin analogudur

Genellikle hücrelerin S tipindeki fazlarında etkili olup, DNA ve RNA içine katılmasına rağmen esas etkisini DNA polimeraz enzimini inhibe ederek gösterir. Bunun sonucunda çoğalma ve onarma mekanizmaları inhibe olmaktadır.

2.4.1.6 Alkilleyici ilaçlar

Alkilleyici ilaçlar, günümüzde en çok kullanılan Antikanser ilacı olarak kullanılmaktadır. Alkilleyici ilaçlar, döneme (siklusa) bağlı olmayan özellikte ilaçlardır. Hücreler hangi dönemde olursa olsun kullanımları mümkündür. Bu sınıfa ait ilaçlarda ön ilaç olarak kabul edilir. Alkilleyici ilaçlar ın büyük bir bölümü kanserli hücrede ilk olarak etilenimonyum ve sonradan pozitif yüklü karbon içerikli karbonyum türevlerine dönüşmektedir. Kimyasal olarak dört sınıfa ayrılmaktadırlar (Yeh vd. 2006) .

2.4.1.7 Azotlu hardallar

Azotlu hardallar arasında farmakokinetik farklılıklar bulunmaktadır. Hardallar özellikle lenfositlere ve kemik iliği hücrelerine toksisite gösterir. Etkilenen hücrelerde, mitoz bölünme durur ve lenfoid doku ile kemik iliğinin elementlerinin parçalanması terapötik dozun verildiği saatler içerisinde şekillenir. Bu durum immosupresyon ve myelosupresyon tedavide doz sınırlayıcı bir faktör olmaktadır. Siklofosfamid, İfosfamid, Mekloreタミン, Melfalan ve Klorambusil azotlu hardal sınıfına dahil olan ilaçlardır. En yaygın kullanılanı ise Siklofosfamid türüdür. Siklofosfamid, (Sitoksan, Cytosan) özellikle diğer ilaçlar ile kombine şeklinde veteriner sağaltımda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Maliyet olarak oldukça uygundur ve toksisitesi yüksek bir ilaç değildir. Metabolitlerinden biri olan aldofosfomid hedef hücrelerde fosforamid hardal ve akrolein toksik bileşiklerine dönüşebilmektedir. Ayrıca fosforamid hardal DNA iplikçiklerini çapraz bağlar ve alkiler (Yeh vd. 2006).

Bu ilacın metabolitleri vücuttan idrarla atılma yoluyla uzaklaştırılır.

2.4.1.8 Etileniminler ve Metilmelaminler

Bu gruba ait ilaçlar, Aziridin ve Altretamin'dir.

2.4.1.9 Alkil sülfonatlar

Alkil sülfonat grubunda kullanılan ilaç etken maddesi Busulfan etken maddesi olup grubunun tek üyesidir.

2.4.1.10 Nitrozoüreler

Bu ilaç türleri, kloroetil türevi nitrozoüreler (semustin, lomustin ve karmustin) ve glukozamin türevi (streptozosin) nitrozoürelerdir. Bu ilaç türlerinin önemli bir avantajı yüksek yağda çözünürlükleri nedeniyle santral sinir sistemi tümörlerine karşı kullanılabilir olmalarıdır. Kan-beyin engelini aşarak santral sinir sistemine rahatça girebilirler. Bu ilaçlar esas olarak DNA-DNA, DNA-protein bağları oluşturabilen iki fonksiyonlu alkilleyici ilaçlardır. Hücrede bulunan DNA ve proteinleri alkilerler, proteinler ile DNA zinciri arasında çapraz bağlar oluşturarak DNA'yı kırarlar (Yeh vd. 2006).

2.4.1.11 Hormon ve hormon antagonistleri

Bazı malign tümörler, hormona bağlı olmayıp tümöre karşı duyarlıdır. Bu tümörler, hücrelerin proliferasyonunu hormon ile baskılayan dokulardan kaynaklanır. Böyle durumlarda antikanser ilaç etken sınıfına dahil olan inhibisyon etkili hormon/hormon antagonistleri türevleri tercih edilir. Diğer tümör grubundaysa hücrelerin proliferasyonunu stimüle edilen doku baskılar ve tümör meydana gelir. Bu durumda hormonu salgılayan endokrin organ çıkartılabilir ya da radyasyon tedavisi uygulanabilir (Yeh et al., 2006).

2.4.1.12 Antibiyotikler

Çeşitli mikroorganizma kültürlerinden elde edilen antibiyotik niteliği taşıyan etken maddeler antikanser ilaçlarını oluşturur. Daktinomisin, Daunorubisin ve Bleomisin en sık kullanılan ilaçlardır. Antibiyotikler, mide ve bağırsak kanalından absorbe edilmeyip sadece parenteral olarak uygulanırlar. Döneme özgü ilaç türüne girmezler ancak etkileri özellikle mitoz bölünmenin S fazında oldukça etkilidir (Yeh vd. 2006).

2.4.1.13 Bitkisel ilaçlar

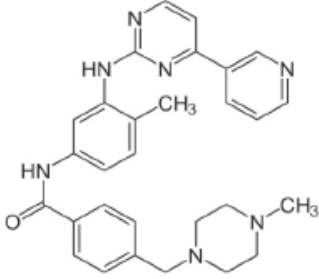
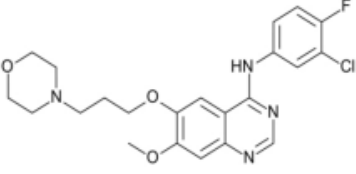
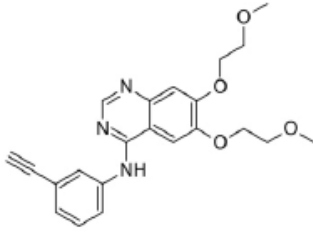
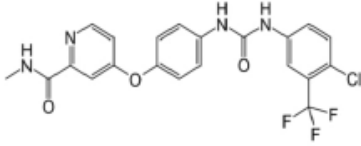
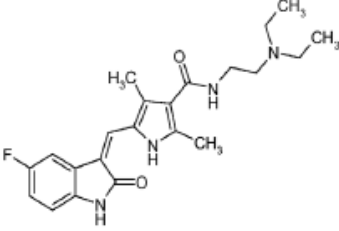
Bitkisel ilaçlar mitoz bölünmenin metafaz dönemine yönelik ilaçlardır. Etkili taşıma kapasiteleri ile hücrelere girip metafazı durdurarak hücre bölünmesini de durdurmuş olurlar. Vinca rosea bitkisinden elde edilen alkaloidler bu ilaç grubunu oluşturur. Vinkristin ve Vinblastin kimyasal yapıları oldukça benzerdir fakat anti tümör etki güçleri birbirinden farklıdır. Vinkristin ile vinblastinin yapıları benzer olmasına rağmen aralarında çapraz direnç şekillenebilir nitelikte değildir. Vinkristin plazmadan hızla ayrılarak geniş dağılımla trombosit ve hücrelerde yoğunlaşır (Yeh vd. 2006).

2.4.1.14 Tirozin kinaz inhibitörleri

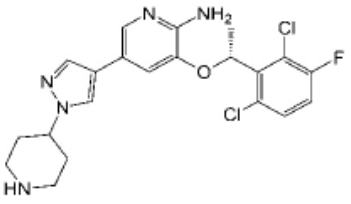
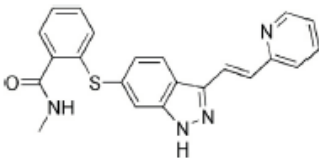
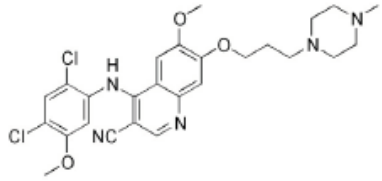
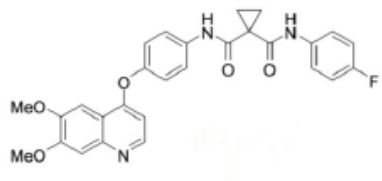
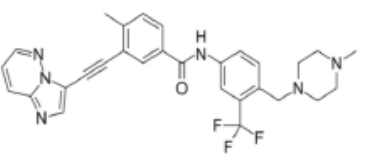
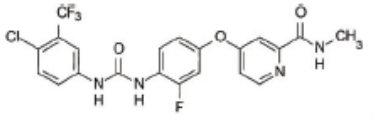
Temel olarak tirozin kinaz enzimi, hem adenosin trifosfattan hedef olan protein türüne doğru fosfor grubu transferi gerçekleştiren, hem de protein fosforilasyon olayını katalize edebilen enzim türüdür. En önemli rolü ise sağlıklı olan hücrelerin normal uygun bölünmesini sağlamaktır. Söz konusu inhibitörler; hücrelerarası sinyal aktarımı, hücre çoğalımı, hücre apoptozisi gibi kritik süreçleri yönettiğinde, bahsi geçen kritik olaylarda yaşanan birtakım değişikliklerde kanser oluşumuna yol açar.

Son yıllarda tirozin kinaz inhibitörleri çok çeşitli kanser türlerinin tedavi sürecinde, hatta kronik miyeloid lösemi hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır. Kullanımları sırasında birtakım yan etkilerin yaşanması mümkündür. Çoğu sitokrom- P450 enzimiyle metabolize olabildiğinden dolayı (sunitinib, sorafenib, gefitinib) etkileşme potansiyelleri oldukça yüksek ilaç grupları olarak tanınmaktadırlar (Ölgen vd. 2021).

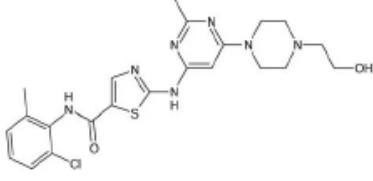
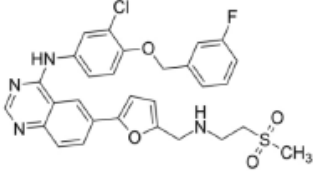
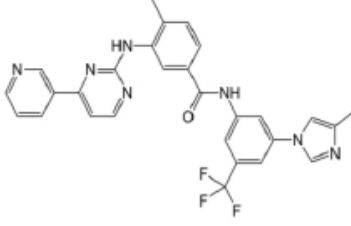
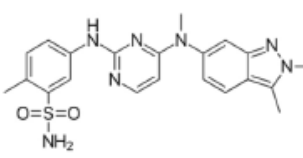
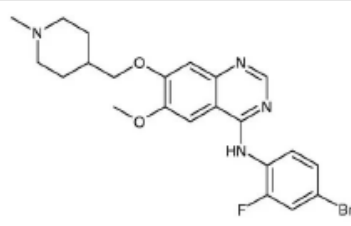
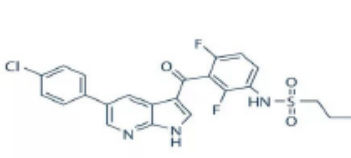
Tirozin kinazların sınıflandırılması, kimyasal yapıları ve endikasyonları aşağıdaki şekilde verilmiştir (**Şekil 2.29**).

Tirozin kinaz İnhibitörleri	Hedefler	Kimyasal formül	Endikasyonları
Imatinib Gleevec® Fiximax® Glivon® İmavec® İmagliv® İmatenil® İmatis® FDA: 2001	BCR-ABL PDGFR ARG KIT VEGF DDR1 NQO2		- Kronik myeloid lösemi - Gastrointestinal stromal tümör - Akut lenfoblastik lösemi
Gefitinib Iressa® FDA: 2003	EGFR		- Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
Erlotinib Tarceva® Ertinob® FDA: 2004	EGFR		- Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri - Metastatik pankreatik kanser
Sorafenib Nexavar® FDA: 2005	KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3 PDGFR-B		- İlerlemiş böbrek hücreli karsinom
Sunitinib Sutent® FDA: 2006	PDGFR (α,β) VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3, KIT, FLT3, CSF-1R, RET		- İlerlemiş böbrek hücreli karsinom - Gastrointestinal stromal tümör

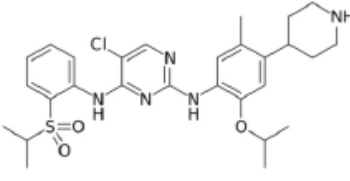
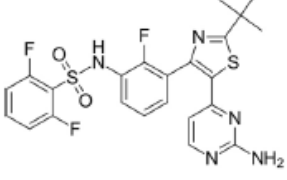
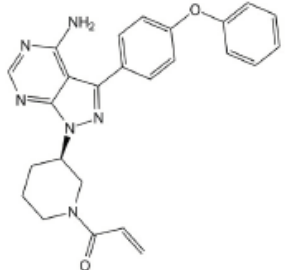
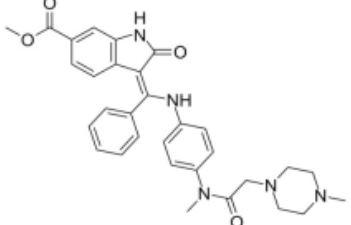
Şekil 2.29 Önemli bazı antikanser ilaçlar ve etki mekanizmaları (Anonim)

Krizotinib Xalkori® FDA: 2011	ALK, MET, RON		- Akut lenfoblastik lösemi - Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
Aksitinib Inlyta® FDA: 2012	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3		- İlerlemiş böbrek hücreli karsinom
Bosutinib Bosulif® FDA: 2012	BCR-ABL, SRC		- Kronik myeloid lösemi
Kabozantinib Cometriq® FDA: 2012	RET, MET, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, KIT, FLT-3,		- Tiroid kanseri
Ponatinib Iclusig® FDA: 2012	BCR-ABL		- Kronik myeloid lösemi - Akut lenfoblastik Lösemi
Regorafenib Stivarga® FDA: 2012	VEGFR-2 TIE		- Metastatik kolorektal kanser - Gastrointestinal stromal tümör

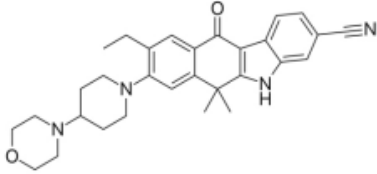
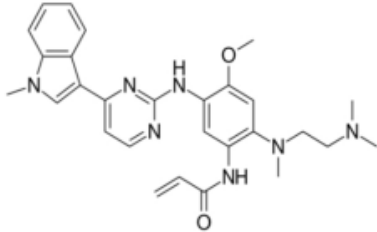
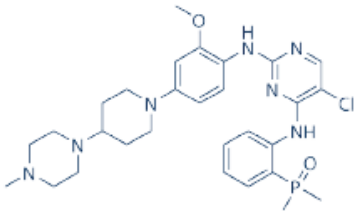
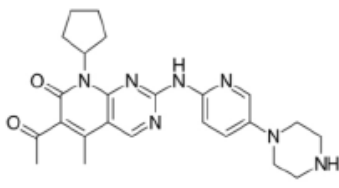
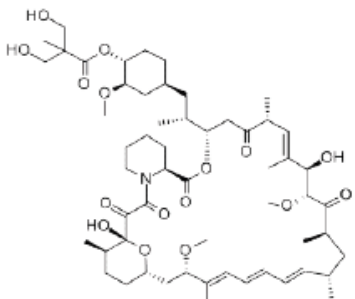
Şekil 2.29 Önemli bazı antikanser ilaçlar ve etki mekanizmaları (Anonim) (devam)

Dasatinib Sprycel® FDA: 2006	BCR-ABL, ARG KIT, PDGFR SRC, EPHA2 DDR1, TEC BTK		- Kronik myeloid lösemi, - Akut lenfoblastik lösemi
Lapatinib Tykerb® FDA: 2007	EGFR, HER2		- Metastatik meme kanseri
Nilotinib Tasigna® FDA: 2007	BCR-ABL, PDGFR, ARG KIT, VEGF DDR1, NQO2		- Kronik myeloid lösemi
Pazopanib Votrient® FDA: 2009	VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3		- İlerlemiş böbrek hücreli karsinom - Yumuşak doku sarkomları
Vandetanib Caprelsa® FDA: 2011	EGFR, VEGFR RET		- Tiroid kanseri
Vemurafenib Zelboraf® FDA: 2011	BRAF, MEK		- Yayılmış melanoma

Şekil 2.29 Önemli bazı antikanser ilaçlar ve etki mekanizmaları (Anonim) (devam)

Ceritinib Zykadia® FDA: 2014 (ALK) FDA: 2017 (KHDAK)	ALK		- Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) pozitif - Metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)
Dabrafenib Tafinlar® FDA: 2014	BRAF V600E veya V600K		- Metastatik melanoma - KHDAK
İbrutinib Imbruvica® FDA: 2015	BTK		- Kronik lenfositik lösemi (CLL), - Küçük lenfositik lenfoma (SLL), - Waldenström makroglobulinemi (WM), - Marjinal bölge lenfoma (MZL)
Cetuximab Erbix® FDA: 2013	EGFR	-	- Metastatik kolorektal kanser - Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Kanseri - Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri - Skuamöz Hücre Cilt Kanseri
Nintedanib Ofev® FDA: 2015	VEGFR1-3, PDGFRα/β, FGFR1-3, FTL3		- İdiyopatik pulmoner fibröz

Şekil 2.29 Önemli bazı antikanser ilaçlar ve etki mekanizmaları (Anonim) (devam)

Alectinib Alecensa® FDA: 2016	ALK, RET		- Anaplastik lenfomakınaz-pozitif - KHDAAK
Osimertinib Tagrisso® FDA: 2017	EGFR-T970M		- Pozitif küçük hücreli dışı akciğer kanseri
Brigatinib Alunbrig® FDA: 2017	ALK, ROS1, IGF-1.		- İlerlemiş ya da tolere edemeyen ALK pozitif metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri
Palbociclib Ibrance® FDA: 2017	HER2		- Negatif ileri veya metastatik meme kanseri
Temsirolimus Torisel® FDA: 2007	FKBP12 mTOR		- İleri böbrek kanseri

Şekil 2.29 Önemli bazı antikanser ilaçlar ve etki mekanizmaları (Anonim) (devam)

2.4.1.15 Diğer ilaçlar

Sisplatin, Karboplatin, Oksiplatin ve Lobaplatin gibi plantin kompleksleri proteinlerdeki sülfür ve nükleik asitlerdeki nitrojen gibi nükleofilik maddeler ile güçlü kimyasal bağlar oluşturabilme özellikleri açısından alkilleiyici ajanlara benzerler. Kapesitabin, ağız yoluyla alınan birçok kanser hastalığının tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Kapesitabin, bir ön-ilâç olup, vücutta enzimatik biçimde 5- fluorourasil'e

dönüşebilmektedir. Dosetaksel, klinik olarak iyi kurulmuş bir anti-mitotik kemoterapi ile birlikte etki eden antikanser bir ilaçtır.

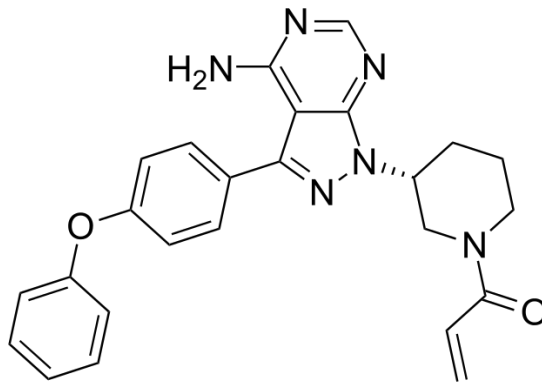
2.4.2 Tez kapsamında kullanılan ilaçlar ile ilgili bilgiler

2.4.2.1 İbrutinib ile ilgili bilgiler

İbrutinib kimyasal olarak 1 - [(3 R) -3- [4-amino-3- (4-fenoksifenil) -1Hpirazolo [3,4-d] pirimidin-1-il] -1-piperidinil] -2-propen-1-on şeklinde adlandırılır (Şekil 2.30).

Küçük molekül yapılı antikanser kanser ilacı olan ibrutinib, Bruton's tirozin kinaz (BTK) adındaki bir enzimi hedef alarak bu enzimin çalışmasını engeller (inhibe).

Bu tirozin kinaz enziminin aktif bölümüne bağlanan ibrutinib, bağışıklıkta etkin rol alan B hücrelerini etkisiz hale getirmektedir. Bruton's tirozin kinaz enzimi, B-hücre reseptörü ile ilişkilidir; hücrelerin yer değiştirmesi, belli bir bölgeye yapışması (adezyon) ve programlı hücre ölümünün (apoptozis) düzenlenmesi olmak üzere, paralel olarak ortaya çıkan en az üç kritik mekanizmada rol almaktadır. İbrutinib, B-lenfosit adı verilen savunma sistemi hücrelerinde bu mekanizmaları engelleyerek hem kan ve kemik iliği kanserleri bazı lösemi ve lenfomaların tedavisinde hem de bağışıklık sisteminin baskılanmak istendiği durumlarda (örneğin graft versus host hastalığı) kullanılır.



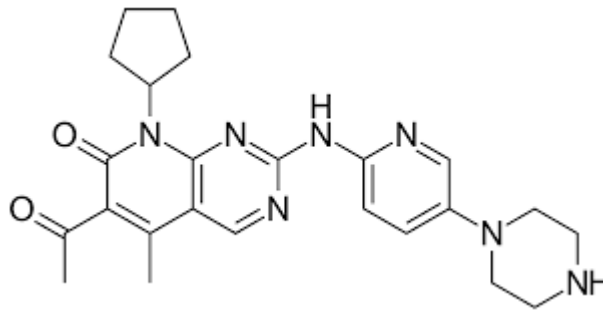
Şekil 2.30 İbrutinib'in kimyasal yapısı (Anonim)

2.4.2.2 Palbosiklib ile ilgili bilgiler

Palbosiklib kimyasal olarak 6-asetil-8-siklopentil-5-metil-2-[[5-(piperazin-1-il)piridin-2il]amino}pirido[2,3- NS]pirimidin-7(8 H)- şeklinde adlandırılır (**Şekil 2.31**).

Reampla (etken maddesi palbosiklib), hormon reseptörü pozitif, ileri (4.) evre meme kanseri olan hastaları tedavi etmek için kullanılan CDK4/6 inhibitörü sınıfından yeni nesil bir antikanser ilaçtır.

Palbosiklib, bir aromataz inhibitörü (letrozol gibi) veya östrojen reseptör blokörü (fulvestrant gibi) ile birlikte kullanılmaktadır. Ayrıca tersinir küçük moleküllü bir sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olarak da bilinmektedir. Palbosiklib antikanser ilacı, hücrede sikline bağımlı kinaz, CDK 4 ve CDK 6 adı verilen proteinleri bloke eder. Hormon pozitif meme kanseri hücrelerinde, bu proteinlerin bloke edilmesi, hücrelerin yeni hücreler oluşturmak için mitoz bölünmeyi durdurmasına yardımcı olmaktadır. Bölünme sürecinde hücrelerin G1'den S hücre döngüsü aşamasına geçmesini büyük ölçüde önlemesini sağlamaktadır. Sonuç olarak kanser büyümesini yavaşlama eğilimi izlemektedir.

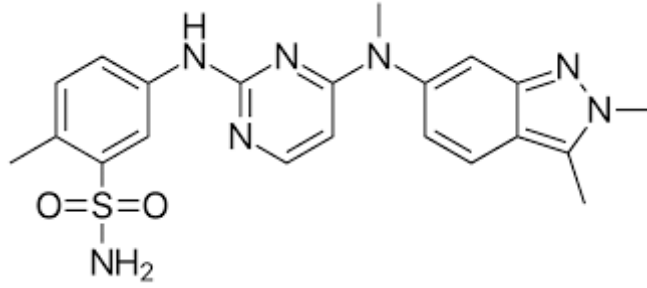


Şekil 2.31 Palbosiklib'in kimyasal yapısı (Anonim)

2.4.2.3 Pazopanib ile ilgili bilgiler

Pazopanib kimyasal olarak 5-[[4-[(2,3-dimetil-2H-indazol-6-il) metilamino] -2-pirimidinil] amino] -2 metilbenzensülfonamid monohidroklörür şeklinde adlandırılır (Şekil 2.32).

Pazopanib, önemli bir antikanser ilaç olarak bilinmektedir. Tümör büyümesini bloke eden ve anjiyogenezi inhibe eden güçlü ve seçici birçok hedefli reseptör tirozin kinaz inhibitörü olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca renal hücreli karsinom ve yumuşak doku sarkomu için kullanılmaktadır.



Şekil 2.32 Pazopanib'in kimyasal yapısı (Anonim)

2.5 İlaç Etken Maddeleri İçin Analiz Teknikleri

2.5.1 İbrutinib için analiz teknikleri

2.5.1.1 Kromatografik teknikler

Sridhar ve çalışma grubunun 2015 yılında gerçekleştirdikleri ibrutinib, tolbutamidin ve lenalidomid ilaç etken maddelerini kullanılarak yaptıkları etkinlik değerlendirme çalışmaları sonucunda, her iki ilacın da plazmada kesin olarak belirlenebilmesi için analitik bir yöntemin geliştirilmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Sıçan plazmasında lenalidomid, ibrutinib ve aktif metabolit PCI- 45227'nin eş zamanlı tayini için yüksek performanslı bir sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC- MS/ MS) yöntemi geliştirmişlerdir. 50 ul sıçan plazmasından lenalidomid, ibrutinib, PCI- 45227 ve tolbutamidin ekstraksiyonu, etil asetat: diklorometan (90: 10) oranı ve sıvı- sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Maddelerin kromatografik ayrımı, hareketli fazlar olarak 1 ml/ dk akış hızında asetonitril: % 0,1 formik asit

tamponu ile gradyan koşulları altında ODSAM (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Etken maddelerin öncü iyon geçişi, pozitif iyonizasyon modu ile seçici reaksiyon izlemede çalıştırılan üçlü dört kutuplu bir kütle spektrometresinde izlenmiştir. Yöntem, ibrutinib için 0,72- 183,20 ng/ml, PCI- 45227 için 0,76- 194,33 ng/ml ve lenalidomid için 1,87- 479,16 ng/ml derişim aralığında doğrulanmıştır. Ortalama ekstraksiyon geri kazanım değerleri, ibrutinib, PCI- 45227 ve lenalidomid için % 75,2, % 84,5 ve % 97,3 olarak saptanmıştır. Tüm analitler için ıslak, donma-çözülme ve uzun vadeli stabilite testleri uygulanmıştır. Analitik yöntem, sıçan örneğinde lenalidomid, ibrutinib ve PCI- 45227'nin eş zamanlı tayininin farmakokinetik çalışmasını desteklemek için uygulanmıştır. Testin tekrarlanabilirliği, oluşan 18 örneğin yeniden analiziyle kanıtlanmıştır (Veeraraghavan vd. 2015).

Takeo ve çalışma grubunun 2018 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmada insan plazmasından ibrutinib'in miktar tayinini yapmak amacıyla oldukça hassas ve hızlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniğini geliştirmişlerdir. Analiz, 200 µl'lik bir plazma numunesinin ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu kullanılarak proteinlerin çöktürülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi, 10- 500 ng/ml plazma derişim aralığında regresyon katsayısı 0.999 olarak doğrusal bulunmuştur. Gün içi ve günler arası doğrulama katsayıları sırasıyla % 4,0- 6,6 ve % 2,6- 7,7 olarak belirlenmiştir. İbrutinib plazma derişimini belirlemek için ultraviyole (UV) ile birleştirilmiş HPLC yönteminin, rutin hastane kontrolleri için oldukça kullanışlı ve basit olduğu kanıtlanmıştır (Yasu vd. 2019).

Raman ve çalışma grubunun 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada tirozin kinaz inhibitörü ilaç sınıfına dahil olan ibrutinib'in enantiyomer ayrımı için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. İbrutinib enantiyomerlerinin ayrılması ve tayini, silika jel (Chiral-pack-IC) üzerine immobilize edilmiş selüloz tris (3,5-diklorofenilkarbammat) kullanılarak araştırılmıştır. % 0,1 dietil amin ve % 0,3 trifloroasetik asit ile birlikte 55 ve 45 (% h/h) oranında n-Heksan, etanolden oluşan normal faz koşulu altında silika jel de iyi bir enantiyomer ayrımı elde edilmiştir. İbrutinib ve enantiyomeri arasındaki çözünürlük yaklaşık 4' ün üzerinde tespit edilmiştir. Akış hızı ve kolon fırın sıcaklığı sırasıyla 0,9 ml/dk ve 30 °C olarak belirlenmiştir. Analiz 260 nm'de gerçekleştirilmiştir. Optimize edilmiş enjeksiyon hacmi 10 µl olarak saptanmıştır. Geliştirilen yöntem,

özgüllük, teşhis sınırı, tayin alt sınırı, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, ve sağlamlık için ICH yönergelerine uygun olarak doğrulanmıştır (Reddy vd. 2021).

2.5.1.2 Voltametrik teknikler

İbrutinib ilaç etken maddesi için hali hazırda literatürde yer alan voltametrik tabanlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan ibrutinib ilaç etken maddesinin ilk defa bu tez kapsamında çalışılmış olması tezin orijinalliğini yansıtmaktadır.

2.5.2 Pazopanib için analiz teknikleri

2.5.2.1 Kromatografik teknikler

Mukul ve çalışma grubunun 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada fare plazması ve beyin dokusu sıvısında pazopanib'in kantitatif tayini için basit, hızlı ve hassas bir LC/MS–MS yöntemi geliştirmiş ve doğrulamıştır. Pazopanib ve dahili standart (IS) analizi için etil asetat ile tek bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. HPLC ayrımı, 50 mm x 4,6 mm, 5,0 µm bir anXTerra®MS C18 kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 0,25 ml/dk'lık bir akış hızında pompalanan % 0,1 formik asit, % 70 asetonitril ve % 30 su kullanılmıştır. Etken maddeleri tayin etmek için çoklu reaksiyon izleme modu kullanılmıştır. Kütle spektrometresi, algılama için pozitif iyon modunda çalıştırılmıştır. Kalibrasyon eğrileri, her iki biyolojik matriste de 3,9-1000 ng/ml aralığında doğrusal bulunmuştur. Fare plazması ve beyin dokusu sıvısı için tayin alt sınır değeri 3,9 ng/ml olarak saptanmıştır. Günler arası ve gün içi kesinlik ve doğruluk değerleri, analitik değerlendirme için kabul edilebilir aralıklar içinde bulunmuştur (<% 15). Bu yöntem, farelerde 5 mg/kg'lık tek bir intravenöz dozdan sonra pazopanib'in beyin-plazma derişim oranını ve ilgili farmakokinetik parametrelerini belirlemek için uygulanmıştır (Minocha vd. 2012).

Gorja ve çalışma grubu 2015 yılında pazopanib'in tayini için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemini geliştirerek çalışma gerçekleştirilmiştir. Ayrıca iyi stabilite sergileyen, C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µ) kolonu kullanılarak farmasötik dozaj formlarında çalışılmıştır. Pazopanib tayini, 269 nm'de bir PDA detektörü kullanılarak, 269 nm'lik bir akış hızıyla izlenmiştir. Kolon 1 ml/dak hızında ve fırın sıcaklığı 30°C'de tutularak şartlanmıştır. 0.999 korelasyon katsayısı ile 25 µg/ml – 150 µg/ml derişim aralığında iyi bir lineer

yanıt gözlenmiştir. Yöntem, ICH yönergelerine göre doğrulanmıştır. Pazopanib hidroklorür asidik, alkali, oksidasyon, fotoliz, termal ve nötr bozunma gibi stres koşullarına maruz bırakılmış ve sonuçlar net bozunmanın sınırlar içinde olduğunu göstermiştir (Escudero-Ortiz vd. 2015).

Marie ve çalışma grubunun pazopanib'in eşzamanlı tayinine ve metabolitlerinin yarı tayinine yönelik bir yöntemin geçerliliğini ilk kez 2018 yılında çalışmışlardır. Analizler, hem pazopanib hem de metabolitlerin izlenmesine yönelik bir ultra performanslı sıvı kromatografisi- tandem kütle spektrometresi (UPLC–MS/MS) yönteminin geliştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kontrollü deneyleri gerçekleştirebilmek amacıyla insan karaciğer mikrozomları ile çalışılmıştır. Optimize edilmiş yöntem, doğrusalılık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, matris etkisi ve kararlılık bakımından doğrulanmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik için varyasyon katsayısı sırasıyla % 2,1 -% 7,9 ve %5,6- % 13,1 arasında değişmiştir. Doğruluk değerlendirmesi için sapmalar % 12- % 2,3 (gün içi) ve % 3,8 - % 13,1 (günler arası) arasında değişkenlik göstermiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik Dvaryasyon katsayısı sırasıyla % 20,1 ve % 19,6 iken doğruluk sapmaları, tayin alt sınırında % 20,7 (gün içi) ve % 3,8 (günler arası) arasında bulunmuştur. Pazopanib eklenmiş matris numunelerinden elde edilen geri kazanımlar, kalibrasyon aralığının düşük ve yüksek seviyelerinde sırasıyla % 102,6 ± % 12,9 ve % 102,5 ± 1,2 olmuştur. Kısa süreli, uzun süreli ve süreç içi saklama koşulları sırasında ve üç dondurma/çözme döngüsünden sonra pazopanib'in stabilite testleri tamamlanmıştır. Yöntem, tedavi sırasında metabolit profillerini (yarı kantitatif veriler) oluşturmak için pazopanib ile tedavi edilen üç hastadan alınan klinik örneklerle uygulanmıştır (Paludetto vd. 2018).

2.5.2.2 Voltametrik teknikler

Pazopanib ilaç etken maddesi için literatürde sadece bu tez kapsamında gerçekleştirilen nanosensör çalışması bulunmaktadır. Bu bakımdan Pazopanib ilaç etken maddesinin ilk defa bu tez kapsamında çalışılmış olması yine tezin orijinalliğini yansıtmaktadır.

Bilge ve ark (2021) Mevcut çalışmada, tirozin kinaz inhibitör sınıfına ait farmasötik olarak aktif bir bileşen olan pazopanib'in modifiye edilmiş bir camı karbon elektrotu kullanılarak saptanması için ilk voltametrik yöntem geliştirmiştir. Modifikasyon ajanı

olarak hidrotermal yöntemle sentezlenen çubuk benzeri CuO nanoparçacıkları ve atık maskelerinin hidrotermal karbonizasyonundan elde edilen parmak benzeri karbon malzeme kullanılmıştır. Sentezlenen malzemelerin kimyasal yapısı ve yüzey morfolojisi çeşitli analitik teknikler kullanılarak aydınlatılmıştır. Sonuçlar, karbon malzemenin, elektrik iletkenliğini artıran kritik bir özellik olan bir çekirdek-kabuk yapısına sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle pazopanib'in elektro-oksidasyon davranışı üzerine hem nanopartiküllerin hem de karbon malzemenin etkileri araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Tarama hızı, pH ve destekleyici elektrolitin pazopanib'in voltametrik yanıtı üzerindeki etkisi boş ve modifiye edilmiş camı karbon elektrot üzerinde araştırılmıştır. Olası elektrokimyasal oksidasyon mekanizması boş camı karbon elektrot üzerinde model ilaçlarla tartışılmıştır. Pazopanib'in elektrooksidasyonu, dönüşümlü voltametri ile kanıtlandığı üzere pH 7,0 fosfat tampon çözeltisinde modifiye camı karbon elektrot üzerinde adsorpsiyon kontrollü bir işlemle gerçekleştirilmiştir. Sıyırma koşullarının ve kare dalga voltametrisinin tüm parametreleri optimize edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi, adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi ile $2,0 \times 10^{-10}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M aralığında doğrusal bulunmuştur. Önerilen yöntem, insan serumu numunelerinde ve farmasötik dozaj formlarında pazopanib miktarının tatmin edici kesinlik ve doğrulukla belirlenmesi için kullanılmıştır. Yöntem, nano algılama seviyelerinde mükemmel analitik performans göstermiştir. Ayrıca nanosensör, bazı girişim yapan bileşiklerin ve iyonların varlığında da test edilmiştir (Bilge vd. 2021).

2.5.3 Palbosiklib için analiz teknikleri

2.5.3.1 Kromatografik teknikler

Mona ve ve çalışma grubu 2021 yılında sıçan plazmasında palbosiklib, letrozol ve metabolit karbinolünü eşzamanlı olarak belirlemek için hassas ve seçici bir UHPLC-MS/MS yöntemi geliştirerek doğrulamışlardır. Asetonitril ile protein çökeltmesi ön işleminden sonra, kromatografi çözünürlüğü, bir metanol ve su karışımından oluşan izokratik mobil fazda ters fazlı Acquity®UPLC BEH C18 kolonu (partikül boyutu, 50 mm 2,1 mm ID) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı ve çalışma süresi, sırasıyla 300 ml/dk ve 2,5 dk olarak belirlenmiştir. Hedef ilaçlar, öncüllerden ürüne doğru olan iyon geçişlerini izlemek için pozitif ESI arayüzüne bağlanan bir tandem kütle spektrometresi kullanılarak çoklu reaksiyon izleme modunda tespit edilmiştir.

Doğrulama parametrelerinin geri kalanı kabul edilen sınırlar içinde bulunmuştur. Doğrulanmış yöntem, sıçanlarda bu ilaçların PK çalışmasına uygulanmış ve palbosiklib için PK parametrelerinin değerlerini belirlenmesi gerçekleştirilmiştir (Al-Shehri vd. 2020).

2.5.3.2 Voltametrik teknikler

Palbosiklib ilaç etken maddesi için literatürde yer alan voltametrik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan Palbosiklib ilaç etken maddesinin ilk defa bu tez kapsamında çalışılmış olması tezin orijinalliğini yansıtmaktadır.

2.6 Nanoparçacık ve Nanoparçacık Sentezleme Teknikleri

Boyutu 100 nanometrenin (nm) altında olan malzemeler nano parçacık olarak tanımlanmaktadır (Sarip vd. 2021). Hacimsel yapıları malzemelerden çok daha farklı olup bazı kendine özgü özelliklerinden ötürü üstünlükleri bulunmaktadır. 1 nanometre, metrenin milyarda birine eşittir ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$).

Herhangi bir malzeme tipinin boyutlarından en az biri 100 nm'nin altına düştüğünde, mekanik, termal, optik, manyetik ve diğer özellikleri o malzemenin bazı boyut özelliklerinde değişir. Böylece aynı malzeme içinde, bir dizi özellik elde edilebilir. Nanoparçacıklar fiziksel, kimyasal, biyolojik ve hibrit olmak üzere birçok farklı teknik ile sentezlemek mümkündür. Bu çalışmada kullanılacak olan nanoparçacıklar kimyasal bir sentez tekniği olan hidrotermal yöntem ile sentezlenmiştir (Naito vd. 2018).

2.6.1 Sol-jel tekniği

Sol-jel reaksiyonları, seramikler, polimerler ve alüminosilikat zeolitler gibi nanogözenekli katılar dahil olmak üzere birçok önemli malzeme sınıfının sentezinde merkezi bir rol oynar. Sıvı halin kimyası çok önemlidir ve genellikle sol-jel sentezinin temelini oluşturmaktadır. Sol-jel işleminde özetle, bir kimyasal reaksiyonla moleküler öncüllerin bir solüsyonunun sol veya jele dönüştürülmesini içerir, bu daha sonra kurutma, yoğunlaştırma veya kalsinasyon sonrasında kristalli bir malzemeye dönüştürülür. Sol-jel sentezi sırasıyla moleküler başlatıcı hidrolizi, dehidrasyon aracılığıyla kondenzasyon, çekirdeklenme, jelleşme, yaşlanma, kurutma ve yüksek sıcaklık basamaklarından meydana gelmektedir. Sıvıdaki öncü modifikasyon, sol-jel

kimyasında ve ince filmler içeren seramiklerin işlenmesinde önemli bir yön olarak kabul edilmektedir. Öncü türlerin hidroliz ve yoğunlaşmasının koşulları, koloidal parçacıkların büyüme ve kümelenme mekanizması kristalleşme sıcaklıklarını ve reaksiyon sürelerini belirlediği bilinmektedir. Sıvı fazda bulunan katyonların ortamı ve anyonların kimliği ise sol-jel sentezinde malzeme morfolojisi için belirleyici bir rol oynamaktadır. Bu da sıvı fazdaki kimyasal kompleksleşmenin neden olduğu iç kabuk modifikasyonlarını anlamaya olan ilgiyi arttırmaktadır.

Bu tekniğin çok sayıda avantajları bulunmaktadır. Hem malzemelerin “oksit” bileşimlerinin elde edilmesine hem de çok çeşitli hibrit (organik- inorganik) malzemelerin geliştirilmesine olanak tanır (Cheetham vd. 1997).

Bu teknik ile ılıman koşullarda çalışma imkânı vardır. Yoğunlaşma basamağı dışındaki tüm sentez basamaklarında kullanılan sıcaklıklar oldukça düşüktür, çoğu durumda normal koşullara (25 °C) çok yakın çalışılır. Böylelikle sentezlenecek materyalin hem termal bakımdan bozunma olasılığı düşürülmüş olur hem de yüksek saflık ve sitokiyometrik oranlarda verim alınabilir. Ayrıca sol-jel tekniğinin ılıman sıcaklık koşullarında çoğu zaman “oksit” karakterli malzemelerin kristalizasyon sıcaklığının altında gerçekleşmesi elde edilen ürünün nadir amorf yapılı olmasına neden olur.

Metal alkoksitler ve bunların karışım alkil/alkoksitler gibi moleküler öncüller genellikle uçucudur ve geliştirilen çeşitli teknikler kullanılarak kolaylıkla oldukça yüksek oranlarda saflaştırılırlar (kristallendirme, destilasyon ve süblimleşme). Böylece çok yüksek saflıkta malzeme sentezlenebilmesine olanak tanınır.

Farklı türden metal içeren çeşitli organo-metalik malzemelerin ve bunların karışımının kullanılabilmesi nedeniyle homojen şekilde kontrollü katkılandırma yapılabilir.

Yaşlandırma ve kurutma basamakları kontrollü uygulandığı takdirde gözenek boyutu ve yüzey alanı özellikleri istenilen değerlere ayarlanabilir.

Bahsedilen tüm bu avantajlara rağmen sol-jel tekniğinin birtakım sınırlamaları mevcuttur. Bunlardan bazıları başlangıç öncüllerinin ekonomik olmaması, işlemin nemden etkilenmesi, sentez basamaklarının kompleks olması ve yoğunlaştırma

basamağında malzeme boyutunda değişmelerin meydana gelebilmesidir (Toygun vd. 2013).

2.6.2 Elektrokimyasal sentez

Elektrokimyasal sentez, destek elektrolit varlığında iki veya daha fazla elektrot arasından elektrik akımı geçirilerek uygulanmaktadır. Elektrokimyasal sentez, elektrot-destek elektrolit arayüzeyinde gerçekleşmektedir. Ayrıca bu sentez tekniğinde metal oksit elde etmek için element halinde ki katı metal levhalar veya çubuklar kullanılmaktadır. Seçilen element halindeki metal çözeltiye daldırıldıktan sonra belli bir potansiyel uygulanarak metal iyonlarının katotta indirgenmesi beklenmektedir. Elektrokimyasal sentezi diğer sentez tekniklerinden ayıran bazı önemli özellikler vardır.

Elektrokimyasal sentez tekniği, yaklaşık 10^5 V cm⁻¹ gibi çok yüksek bir potansiyel aralığına sahip olan elektrik çift tabakası içinde elektrotta yakın bir bölgede gerçekleşir. Bu koşullar altında, reaksiyonlar genellikle kimyasal sentezde elde edilemeyen malzemelerin sentezlenmesine imkân verir.

Metal iyonları, elektrot yüzeyinde ince bir film veya kaplama şeklinde biriktirilir. Ayrıca, katı-sıvı ara yüzeyi, uygun şekilde şekillendirilmiş bir karşı elektrot kullanılıyorsa özellikle tek tip polarizasyon sağlamak için oluşturulabilmektedir. Bu durum kaplamanın kolaylaşmasına olanak tanır.

Elektrokimyasal sentez, elektrolitin kaynama noktası ile sınırlandırılmış düşük sıcaklık koşullarında uygulanan bir tekniktir. Sentez sıcaklığı, erimiş tuz elektrolitleri kullanılarak yükseltilebilir.

Uygun hücre potansiyeli seçildiği takdirde hücreden geçen akım kontrol edilerek kinetik kontrollü, dolayısıyla termodinamik kontrollü sentez uygulanabilir.

Elektrokimyasal sentez tekniğini kimyasal sentezden ayıran en önemli özellik, elektrokimyasal sentezin oksidasyon veya indirgeme reaksiyonu prensibine dayanmasıdır. Hücre potansiyeli ayarlanarak, oksitleme veya indirgeme gücü sürekli olarak değiştirilebilir.

Son olarak elektrokimyasal sentez oldukça kolay bir tekniktir ve aletler ucuzdur, kolaylıkla temin edilebilir (Therese ve Kamath 2000).

2.6.3 Sonokimyasal sentez

Sonokimyasal sentezin temel prensibi ultrasonik ses dalgaları yardımı aracılığıyla moleküler anlamda bir birleşme meydana gelmeden malzeme sentezine dayanmaktadır. Bu sentez tekniğinde moleküler öncüller şiddetli ultrasonik ses dalgaları aracılığıyla toprak halde çöker ve daha sonra büyümeye başlar son aşamada ise morfolojik bir karaktere sahip olur. Ayrıca bu sentez tekniğinde, akustik kavitasyon sadece aşırı sıcaklıklar değil, aynı zamanda olağanüstü soğutma hızlarına çıkılabildiğini sağlamaktadır (10^9 Ks⁻¹ üzerinde). Sonokimyasal sentezde kullanılan oranlar çeşitli deneysel parametrelere bağlıdır. İyi bir verim elde etmek için, moleküler öncülerin uçucu olması gereklidir. Bunun sebebi sonokimyasal reaksiyon bölgesinde kavitasyon yapan kabarcıkların içinde yoğun şekilde buhar bulunmasıdır.

Sonokimyasal sentez özellikle geçiş metali karbonil bileşiklerinin ayrışmasında ve nanoyapılı geçiş metalleri üretmek için oldukça yararlı bir tekniktir (Suslick vd. 1995).

2.6.4 Kimyasal buhar biriktirme yöntemi

Kimyasal buhar biriktirme tekniğinde başlangıç materyali olarak metal organikler, klorürler, karboniller ve hidritler gibi birtakım buhar fazına kolayca geçen türler kullanılır. Kimyasal buhar biriktirme tekniği, malzemenin gaz halindeki fazının yüksek sıcaklıklarda termal parçalama yoluyla parçacıklara dönüştürülmesine dayanır. Taşıyıcı gaz olarak Ar, He veya H₂ gibi soy gazlar kullanılır. Termal bozunma işlemi sonucunda oluşan malzeme, fırın çıkışında farklı toz toplama yöntemleri ile toplanır. Bu tekniğin en önemli avantajı, farklı yapılara sahip biyokütlenin hammadde olarak kullanılabilmesi ve çok küçük boyutlarda fonksiyonel materyallerin elde edilebilmesidir. Ancak kimyasal buhar biriktirme tekniğinin çalışma prensibi çok yüksek sıcaklık koşullarına ve maliyetli taşıyıcı gazlara dayandığından araştırmacılar bu tekniği tercih etmemektedir (Bryant 1977).

2.6.5 Mikrodalga destekli yöntem

Mikrodalga destekli sentez tekniği, fonksiyonel bir mikrodalga fırın kullanarak mikrodalga radyasyonunun homojen ısıtma etkisi yoluyla malzemelerin sentezine izin verir. Mikrodalga radyasyonu malzeme tarafından emildikten sonra, dielektrik ısıtma yoluyla ısı üretilir. Diğer tekniklerde olduğu gibi, mikrodalga ışıması hedef molekülleri iletken veya konvektif olarak değil doğrudan ısıtır. Mikrodalga destekli sentezde, ısıtma işlemi oldukça kontrollüdür, bu nedenle karbonizasyon ve aktivasyon işlemleri için de kullanılabilir ve genellikle yüzey alanı ve gözenek yapısı gelişimi için oldukça faydalı bir yöntemdir (Jiang vd. 2006).

2.6.6 Hidrojen redüksiyon yöntemi

Hidrojen redüksiyon tekniğinde gaz fazında redüksiyon aracılığıyla bazı metalik ve manyetik özellikteki nanoparçacıkların sentezini sağlayan bir sentez tekniğidir. Hidrojen redüksiyon sentez tekniği sırasıyla parçacık oluşumu, parçacık toplanması ve inert gaz ile muamele adımlarından meydana gelmektedir. Bu sentez tekniğinin ilk adımında hazırlanan çözelti buharlaştırıldıktan sonra taşıyıcı ya da indirgeyici özellikteki gaz türüyle ısıtılan bölgeye ve daha sonra redüksiyon işleminin gerçekleştiği sıcak bölgeye doğru taşınır son adımda ise parçacık oluşumu gerçekleşir. Bu süreçte yalnızca hidrojen gazı hem indirgeyici hem de taşıyıcı görevi görebilir. Argon ve azot gibi inert gazlar ise yalnızca taşıyıcı göreviyle kullanılabilir. Girdilerin derişimi, reaksiyonun sıcaklığı, ön-ısıtma uygulanmış bölge sıcaklığı, parçacık/buharın fırında kalma süresi gibi etkenlerin hepsi boyut dağılımı, parçacık boyutu ve kristaliteyi belirleyen kritik parametrelerdir (Gürmen ve Ebin 2008).

2.6.7 İnert gaz yoğunlaştırma yöntemi

Sentez tekniği genel olarak azot, argon ve hidrojen gibi inert gaz ortamında çeşitli enerji kaynakları kullanılarak başlangıç öncüllerinin buharlaştırılması prensibine dayanmaktadır. İnert gaz yoğunlaşması (IGC), iki temel adımı içeren nanoyapılı malzemelerin sentezlenmesine yönelik aşağıdan yukarıya bir yaklaşımdır. İlk adım, nanokristalin metal ve alaşımlarının aşırı doygun buhar fazında buharlaştırılmasıdır ve ikinci adım, gerekli parçacık boyutunu üretmek için hızlı kontrollü bir yoğunlaştırmayı içerir.

Çok çeşitli kullanım olmasından kaynaklı olarak son yıllarda laboratuvar ölçekli nanomalzeme sentezinde sıkça tercih edilmektedir. Bu sentez tekniğinde metalik seramik ve kompozit yapılı nano parçacıklar sentezlenebildiği gibi reaktif gazlar aracılığıyla nano metal oksitler veya diğer bileşiklerinde sentezlenebilmesi mümkündür.

Soğuk bir ortamda suyun ısıtıldıktan sonra ısınan suyun buharlaştırılır ve bulunduğu ortamla etkileşmesinden kaynaklı olarak ısı kaybetmeye başlar daha sonra soğuk cam yüzeyinde su damlacıkları halinde yoğunlaşmaya başlar. Buharlaştırma işlemi uygulanırken Ta, Mo, ve W gibi malzemelerden elde edilmiş potalar kullanılır. Başlangıç öncülleri buharlaştıktan sonra homojen halde toplanarak ısı kaynağının yakınlarında atom kümelerini oluşturur. Başlangıç öncüllerinin buharlaşan atom kümeleri ile sistem içinde gaz moleküllerinin birbirleri ile çarpışarak enerjilerini kaybetmeleriyle çekirdeklenme ve parçacık oluşumu meydana gelmektedir. Bu sentez tekniğinde sistemdeki gaz basıncının çarpışma sayısını arttırmasından kaynaklı olarak daha hızlı soğuma ile çok homojen nano parçacıkların elde edilebilmesidir. Sentezlenen nano parçacıkların boyutu sırasıyla sistemde bekleme sürelerine, başlangıç öncüllerinin buharlaşma kinetiğine, sistem sıcaklığına, sistemde ki gaz basıncına ve inert gaz türüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Suryanarayana ve Prabhu 2007).

2.6.8 Hidrotermal yöntem

Hidrotermal sentez, ılıman sıcaklık ve basınç koşullarında kapalı ısıtılmış bir çözelti içinde maddelerin kimyasal reaksiyonlarla sentezlenmesine dayanmaktadır. Bu sentez tekniğinde herhangi bir çözücü ya da toksik kimyasal kullanılmamakla birlikte ortamda yalnızca su vardır. Hidrotermal reaksiyonların mekanizmasını anlamak, hem bir yöntemin belirli bir senteze uygun şekilde uygulanması hem de istenen özelliklere sahip yeni malzemelerin araştırılması için özellikle gereklidir. Temel olarak, hidrotermal reaksiyonların mekanizması bir sıvı çekirdeklenme modelini takip eder.

Yeni tip işlevsel malzemelerin sentezi açısından, hidrotermal reaksiyonların mekanizmalarının anlaşılmasını ve yeni yapay yöntem ve tekniklerin geliştirilmesi önemlidir. Hidrotermal reaksiyon mekanizması temel olarak reaktanlar arasında oluşan arayüzdeki atomların veya iyonların difüzyonunu içerdiği katı hal reaksiyonlarından farklıdır. Bununla birlikte, suyun kritik üstü bölgesi için yalnızca saf su ve basit tuzlu su

çözeltilerin davranışları bilinmektedir. Hidrotermal sentezin araştırılmasında yeni yöntemler, literatür çalışmaları ve stratejiler önemli bir rol oynamaktadır.

Hidrotermal sentez, mikro gözenekli kristaller, süperiyonik iletkenler, kimyasal sensörler malzemeleri, elektronik olarak iletken katılar, kompleks oksit seramikler, florürler, manyetik malzemeler ve lüminesans fosforlar gibi önemli materyallerin sentezlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Hidrotermal sentez aracılığıyla aynı zamanda çeşitli morfolojilere sahip nano parçacıklar, jeller, ince filmler, bazı yüzey kusurlu katılar, işlevsel sarmal ve kiral yapılar ve özellikle istifleme dizisi malzemeleri dahil olmak üzere benzersiz materyalleri de sentezlemek mümkündür (Feng ve Xu 2001).

2.7 Atık Yönetimi

Dünya genelinde artan nüfus, organik atık üretiminin ciddi boyutlarda artmasına ve buna bağlı olarak enerji talebinde artışa ve de geleneksel fosil yakıtların hızla tükenmesine yol açmıştır. Polimerik atıklar, dünya çapında üretilen en büyük organik katı atık gruplarından biri olarak kabul edilmekte ve üretim hızı giderek artmaktadır. Polimerik atıkların bertaraf edilmesi ve enerji, alternatif yakıtlar, besinler ve diğer kimyasallar gibi değerli kaynaklara dönüştürülmesi kritik öneme sahiptir. Polimerik atıklar temel olarak doğal polimerleri (örneğin lignoselüloz) ve yapay polimerleri (örneğin plastikler) içerir. Doğal biyokütle kalıntıları (veya biyo-atıklar) esas olarak tarımsal ormancılık atıklarından (hayvan gübresi, odun selülozik atıklar vb.), endüstriyel atıklardan (gıda işleme atıkları, fermantasyon atıkları vb.) ve belediye atıklarından (gıda atıkları, atık kağıtlar, tahtalar, kanalizasyon çamuru vb.) oluşmaktadır. Yapay polimerik atıklar ise endüstriyel atıklar ve belediye atıklarının (plastikler, kauçuk vb.) organik fraksiyonlarından kaynaklanır. Özellikle plastikler, düşük üretim maliyetleri ve çok çeşitli işlevsel özellikleri (düşük yoğunluk, dayanıklılık ve korozyona karşı direnç) nedeniyle günümüzde vazgeçilmez malzemeler sınıfına dahil olmuştur. Plastik atık yönetimi, ciddi çevresel sorunlara neden olan düşük geri dönüşüm potansiyeli nedeniyle mutlaka çözülmesi problemlerin başında gelmektedir.

Plastik atıklar, polipropilen, polikarbonat, polietilen tereftalat, polivinil klorür, polietilen, polistiren, gibi düşük ve yüksek yoğunluklu malzemelere sahip farklı

polimerler içerir. Bu polimerlerin her biri farklı karbon, oksijen ve kül içeriğine sahip farklı monomer bileşimine sahip olsa da, aralarındaki tipik özellik, yüksek uçucu içerik, yüksek viskozite ile birlikte düşük erime noktaları ve çok düşük nem ve kül içeriği nedeniyle yüksek enerji yoğunluğudur.

Çok büyük miktarlardaki polimerik atıklarla başa çıkmak için enerji ve kaynakların geri dönüştürülmesi için geliştirilmiş, sağlam ve esnek bir süreç geliştirmek acilen gereklidir. Genel olarak, biyokütle atıklarından enerji geri kazanımı için yollar, ıslak substratlar için biyokimyasal teknolojileri (anaerobik çürütme) ve kuru substratlar için termokimyasal teknolojileri (piroliz, gazlaştırma vb.) içerir. Bununla birlikte, plastik atıklar genellikle termokimyasal teknolojilerle işlenir. Bunların arasında hidrotermal karbonizasyon, kaynak geri kazanımı yoluyla hem kuru hem de ıslak alt tabakalardan elde edilen gelir akışlarının elden çıkarılması ve oluşturulması için sürdürülebilir ve uygun maliyetli bir çözüm sunar. Bu süreç, organik atıkları yok etmek veya çözmek için oksitleyici bir madde olmadan yüksek sıcaklıkların ve basınçların kullanılmasını içerir. Bu koşullar altında, karmaşık organik atıklar (lignoselülozik biyokütle vb.) asetik asitler, karboksilik asitler, biyokömür, karbon dioksit ve su gibi daha basit organik bileşiklere parçalanır. Son yıllarda, hidrotermal karbonizasyon aynı zamanda çok karmaşık kentsel katı atıklarla başa çıkmak için de kullanılmaktadır (Lu vd. 2012).

Tez çalışması kapsamında atık temelli hammadeler olarak kullanılmış atık maskeler ve atık insan saçları kullanılmıştır.

Son iki yılda tüm dünyayı etkisi altına COVID-19 hastalığı nedeniyle WHO dünya genelinde pandemi ilan etmiştir. Bu hastalıktan korunmak ve bireyler arasında ki bulaş riskini en aza indirmek amacıyla cerrahi maskelerin kullanımı zorunlu hale gelmiştir. Fakat tek kullanımlık bu cerrahi maskelerin çevrede atık olarak birikimi son derece hızlı bir şekilde artmakta ve ileride atık yönetimi konusunda büyük bir problem haline geleceği öngörülmektedir. Tez kapsamında bu atık malzemelerin tercih edilip değerlendirilmesi ileride oluşacak bu önemli problem için yeşil bir yaklaşım sergilemektedir.

Atık insan saçı çoğunluğun işe yaramaz olarak kabul ettiği bir malzemedir ve bu nedenle dünyanın hemen hemen tüm şehir ve kasabalarında belediye atık akışlarında bulunmaktadır. Kırsal alanlarda veya nüfus yoğunluğunun düşük olduğu bölgelerde, saçlar doğada atılır ve burada birkaç yıl içinde yavaş yavaş ayrışır ve ayrışma sonucunda doğal yapı elementleri olan karbon, nitrojen, kükürt ve diğer bileşenleri doğal döngüde geri dönüşüme uğramaktadır. Kentsel alanlarda veya nüfus yoğunluğunun yüksek olduğu bölgelerde, genellikle katı atık akışlarında büyük miktarlarda birikerek drenaj sistemlerini tıkar ve çok yönlü bir soruna yol açar. Yavaş bozunma kinetiği nedeniyle, özellikle büyük hacimlerde biriktiğinde çöplüklerde/atık akışlarında uzun zaman kalabilir. Zamanla, bu çöplüklerden gelen sızıntı suyu, su kütlelerindeki nitrojen derişimini artırarak ötrofikasyon sorunlarına neden olur. İnsan saçının veya bunları içeren atık yığınlarının yakılması - dünyanın birçok yerinde gözlemlenen bir uygulamadır. Fakat bu tip uygulamalar kötü kokuya sebep olan amonyak, karbonil sülfürler, hidrojen sülfürler, kükürt dioksit, fenoller, nitriller, piroller ve piridinler gibi zehirli gazların açığa çıkmasına sebep olur. Atık saçın endüstride ve akademik araştırmalarda, Lityum iyon piller, süper kapasitörler, gaz adsorpsiyonu, fotodegradasyon ve hidrojen eldesi gibi birçok uygulamada etkisi kanıtlanmıştır. İnsan saçı lifleri, tüm memelilerde bulunan tırnak, yün ve boynuz gibi diğer α -keratin içeren parçalara benzer tipik bir hiyerarşik yapıdan oluşmaktadır. Tez kapsamında bu atık malzemelerin tercih edilip değerlendirilmesi bahsedilen sorunlara laboratuvar ölçekli bir bakış açısı ve çözüm getirmektedir.

2.8 Biyokütle

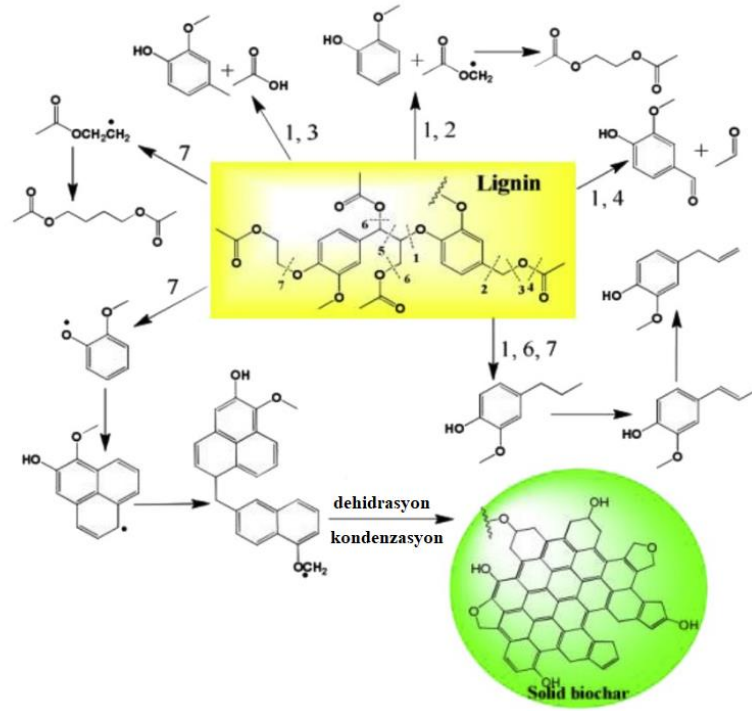
Biyokütlenin karbonizasyon değeri, kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Genel olarak biyokütle, tüm bitki (yosunlar, ağaçlar ve mahsuller dahil) bazlı organik madde için kullanılan bir terimdir. Temel olarak bir biyokütle kaynağı, güneş ışığı enerjisinin kimyasal bağlarla depolandığı organik maddelerin bütünü olarak düşünülebilir. Karbon, hidrojen ve oksijen molekülleri içeren hammaddelerin bağları sıkıştırma, yanma, bozunma ve hidroliz ile kırıldığında bu maddeler kimyasal enerjilerini açığa çıkarırlar. Biyokütle türlerine göre araştırmacılar tarafından sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma, odunsu bitkiler, otsu bitkiler/çimler, su bitkileri, gübreler ve yüksek mineral/karbon içeriğine sahip türleri içerir. Karbon malzeme sentezinde karbonizasyon

verimi çok önemli olduğu için genellikle selüloz, lignin ve hemiselüloz içeriği yüksek atıklar tercih edilmektedir. Ayrıca biyokütlenin atık, ucuz, bol ve kolay temin edilebilir olması büyük ölçekli üretimde kilit rol oynamaktadır (Rosillo-Calle ve Woods 2012).

2.9 Karbon Malzeme Sentezleme Teknikleri

2.9.1 Piroliz

Piroliz, en etkili ve iyi bilinen termal dönüşüm tekniklerinden biridir. Piroliz tekniği, çeşitli sıcaklıklarda oksijen yokluğunda gerçekleştirilir (Sınağ vd. 2006). Çeşitli kimyasallar ve biyoyakıtların hammaddesi olan değerli gaz ürünlerinin (CO , H_2 ve CH_4) yanı sıra piroliz yöntemiyle de yüksek yüzey alanına ve gözenekliliğe sahip karbon malzemeler üretilmektedir. Bu açıdan piroliz, diğer termal dönüşüm tekniklerine göre daha çevreci ve daha faydalı bir özellik sergilemektedir. Piroliz tekniğinde sıcaklık değeri, karbon malzemenin nihai özelliklerini etkileyen en kritik faktörlerden biridir. Piroliz tekniği, sulu bir ortamda basınç altında uygulanmaz ve çok daha gözenekli bir karbon malzeme sentezlemek mümkündür. Karbon malzemelerde yüksek gözeneklilik, kütle transfer akışlarını ve katalizör/adsorbat yüklemesini hızlandırdığı için oldukça arzu edilir. Bu yönüyle hidrotermal karbonizasyondan farklıdır. Bu teknikte sıcaklık, karbon malzemenin karakterini belirleyen en önemli özelliktir. Daha düşük sıcaklıklarda ($<400\text{ }^{\circ}\text{C}$), karbon amorf bir yapı sergiler; yapı çok düzensizlik içerir ve yüzey fonksiyonel gruplar açısından zengindir. Bu noktada karbon yüzeyinde oluşan fonksiyonel gruplar karbona hidrofilik bir özellik kazandırmakta ve karbon malzemenin su içindeki dağılım performansı artmakta, bu da elektrokimyasal ve floresans tabanlı algılama uygulamalarında önemli bir avantaj sağlamaktadır. Aslında, düşük sıcaklıkta piroliz, yeşil sentez ilkeleriyle tamamen uyumludur (Naik vd. 2010). Piroliz işleminde lignoselülozik bazlı biyokütle ve atıklar kullanıldığında, karbon yapısı hemiselüloz, selüloz ve ligninin (**Şekil 2.33**) farklı sıcaklıklarda termal ayrışmasıyla farklılaşır. $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve üzerindeki sıcaklıklarda yapıda hidrojen-oksijen eliminasyonu meydana gelir ve karbonizasyon hızlanır. Karbonizasyon hızı arttıkça daha yüksek miktarlarda aromatik yapılar oluşur ve malzemenin adsorpsiyon özellikleri azalır. Yüzeysel olarak işlevselleştirilmiş bir karbon malzeme, hammaddeden daha fazla türü adsorbe edebildiği için algılama uygulamalarında dikkat çekmektedir.



Şekil 2.33 Lignin yapısı (Shen vd. 2020)

Bu nedenle, biyokütleden türetilen fonksiyonel karbon malzemeleri, ağır metal iyonlarının elektrokimyasal, floresan ve fotolüminesans tabanlı algılama uygulamalarında kullanılır. Buğday samanı, pirinç samanı, sorgum samanı, yosun, acı çay kalıntısı, mango yaprağı, hint yağı keki, bayberry-çekirdeği, kahve telvesi, mikroalg, şarap tortusu, mısır tozu, badem kabuğu, greyfurt gibi farklı biyokütle türleri kabuklar, tüyler, yumurta ve gübre son on yılda araştırılmıştır. Tüm biyokütle kaynakları kendine has özelliklere sahiptir ve buna göre karbon kaynakları olarak seçilir. Örneğin tüyler β -keratinden oluştuğu için karbon, nitrojen, kükürt ve oksijen elementleri açısından zengindir. Ayrıca yumurta, yağ içeren çok sayıda heteroatomdan oluşur. Karbon iskeletinin nitrojen ve kükürt gibi heteroatom yapısı, elektrokatalitik performansı, elektriksel iletkenliği ve algılama hassasiyetini artıran önemli bir parametredir. Özellikle tarımsal atıklar yüksek lif ve selüloz içeriklerinden dolayı biyokütle olarak tercih edilmektedir (Shen 2020).

2.9.2 Spray piroliz tekniği

Karbon nanotüplerin sentezi, sprey piroliz yöntemiyle gerçekleştirilir. Bu teknik, başlangıç maddelerinin atomize edilmesini ve solventin buharlaştırılarak nanotüplerin

oluşumu ile sonuçlanan yüksek bir sıcaklığa ısıtılmış bir substrat üzerine püskürtülmesini içermektedir. Bir tür CVD tekniği olarak alt kategorilere ayrılmaktadır. Bu yöntemin diğerlerine göre sahip olduğu en büyük avantajlardan biri, katalizörün ve karbon başlangıç maddelerinin reaksiyon bölgesine sürekli olarak enjekte edilebilmesi ve böylece işlemi yarı sürekli hale getirmesidir. Bu durum sentezlenen karbon nanotüplerin maliyetini düşürmede önemli bir rol oynamaktadır. Bu yöntemde katalizör olarak genellikle metalosenleri (Ferro-cene, Cobaltocene, Nickelocene ve Iron pentacarbonyl) ve karbon kaynakları kullanılır. Akış hızlarının yanı sıra, ksilen, asetilen gibi çözücülerin hızının da karbon nanotüplerin sentezinde önemli bir rol oynadığına dikkat etmek önemlidir. (Goswami vd. 2021).

2.9.3 Lazer ile aşındırma tekniği

Lazer ile aşındırma tekniği aracılığıyla yüksek miktarda tek duvarlı karbon nanotüp sentezi yapma imkânı bulunmaktadır. Sentezlenen nanotüpler ark boşalım tekniği aracılığıyla sentezlenenlere karşı daha az safsızlık içerebilmektedir. İlk defa Guo ve çalışma arkadaşlarının geliştirdiği tekniği hemen ardından Hafner ve çalışma ekibi çok daha etkili hale dönüştürmüştür.

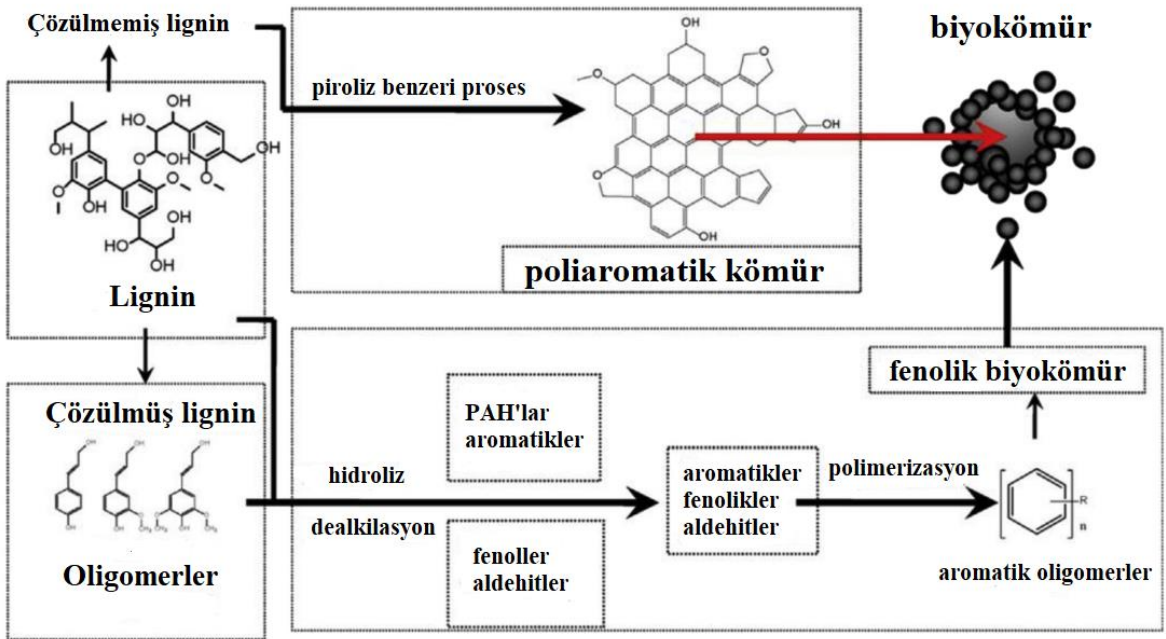
2.9.4 Hidrotermal karbonizasyon yöntemi

Hidrotermal karbonizasyon işlemi, 140- 350 °C sıcaklıkta ve 1- 20 bar aralığında sızdırmaz paslanmaz çelik otoklavlarda gerçekleştirilir. Bu işlem sırasında hidroliz, dehidrasyon, yoğunlaşma ve dekarboksilasyon gibi bir dizi kimyasal reaksiyon katalizlenir ve ürün olarak fonksiyonel karbon malzemesi oluşur.

Hidrotermal karbonizasyon işleminin ilk adımı, suyun hemi-selüloz veya selüloz vb. yapılar ile reaksiyona girmesi sonucu ester ve eter bağlarını (çoğunlukla β -(1-4)-glikosidik bağlar) kırarak hemiselülozlardan (oligo-) sakkaritler gibi çözünür oligomerlere dönüştürdüğü selüloz hidrolizi adımıdır.

2,5-hidroksimetilfurfuraldehit oluşumu ile sonuçlanan glikoz dehidrasyonu, ardından aldol kondenzasyonu, küresel morfolojiye sahip karbon malzemelerin oluşumunu özetlemektedir.

HTC genellikle iki yol izlemektedir: (i) polimerizasyon yoluyla ara ürünlerin çözünmesi ve (ii) hidrotermal şiddete bağlı olarak piroliz benzeri ayrışma. Biyokütlede bulunan hemiselüloz daha düşük bir sıcaklıkta hidrolize olabilir, bu nedenle polimerizasyon esas olarak homojen reaksiyonda meydana gelir. İlk yol, amorf selüloz kritik altı koşullar altında kolayca çöktüğü için selülozun ve ligninin çözünmüş kısmıdır. İkinci yol, çözünmemiş biyokütle için piroliz benzeri bir süreçtir. Selüloz ve ligninin kristal bölgelerinin yüksek yoğunlukta işlenmesi gerekir. Piroliz benzeri süreçten elde edilen kömür, ligninden türetilen nispeten yüksek aromatik bir yapıya sahiptir. Tüm süreç, fenolik kömür ve poliaromatik kömür dahil olmak üzere iki tip karbon oluşturabilir (Şekil 2.34). Homojen bir süreçte, çeşitli karbonlar, molekül yeniden düzenlenmesi ve dehidrasyon gibi otomatik entegrasyondan geçer ve yüksek sıcaklıklar veya kalma süresi kullanıldığında birleşik HTC ürünleri oluşur.



Şekil 2.34 Ligninin ayrışma mekanizması (Shen vd. 2020)

Piroliz ve HTC işlemleri sırasında lignin ayrışma mekanizmalarının bir karşılaştırması yapılmıştır. Hemiselüloz ve selüloz ile karşılaştırıldığında, ligninin pirolizi daha karmaşıktır ve daha geniş bir sıcaklık aralığında gerçekleşir. Piroliz işlemi sırasında, lignin ayrışması, düşük sıcaklıklarda daha zayıf bağların (örneğin, hidrojen bağı, C-OH bağı) kırılmasıyla başlar ve artan sıcaklıkla daha güçlü bağların (örneğin, küçük moleküllü aldehytler, toluoller, stirenler ve guaiaçil hidroksiller), ilk aşamada lignin

bozunmasının başlıca ürünleriyken, p-hidroksi-fenoller, katekoller ve kresoller daha sonraki bozunma ürünleridir. β -O-4 bağlantısının kırılmasından kaynaklanan serbest radikaller, lignin zincirinin depolimerizasyonunun ilk adımı olarak bilinir. Radikaller, vanilin ve 2-metoksi-4-metil fenol gibi ürünleri oluşturmak için protonları yakalayabilirken, radikaller daha sonraki reaksiyonlar için diğer türlere geçirilerek zincir yayılmasına yol açar. Reaksiyonlar, kararlı bileşikler oluşturmak için iki radikal birbiriyle çarpışana ve radikallerin $>350^\circ\text{C}$ 'de rastgele yeniden polimerizasyonu yoluyla poliaromatik biyokömür formları oluşana kadar sona ermez.

HTC sırasında, C–O–C ve C–C bağlarının hidrolizi ve bölünmesi, demetoksilasyon, alkilasyon ve yoğunlaşma birbirleriyle rekabet halindeki ana reaksiyonlardı. β -O-4 eter bağlarının ve α C- β C bağlarının bölünmesi, ligninin HTC sırasında önceliğe sahipken, aromatik halkalardaki bağlar etkilenmeden kalır. Daha kısa reaksiyon süresi ve daha düşük sıcaklık, ön hidroliz ve C–O–C bağlarının ve alifatik C–C bağlarının bölünmesi yoluyla ligninden fenolik monomerler ve dimerler üretmek için uygundur. Artan reaksiyon sıcaklığı ve süresi ile daha fazla alkil fenol üretmek için fenolik bileşiklerin demetoksilasyonu ve alkilasyonu meydana gelebilir. Ligninin HTC sırasında char yapısındaki değişiklikler araştırıldığında, ligninin ayrışmasının sıcaklığın artmasıyla arttığı bulundu. Daha yüksek sıcaklıklarda üretilen kömür, genellikle pürüzlü bir yüzeye ve birkaç kesecik ve yüksek sıralı bir kristal yapıya sahipti. Ayrıca 350°C 'nin üzerinde char'daki fonksiyonel grupların çoğu (OH grubu hariç) elimine edilmiştir (Shen 2020).

Hidrotermal karbonizasyonda, reaksiyon aşaması herhangi bir toksik çözücü içermez. Su ortamında uygulanır, bu nedenle atıklardan karbon malzemelerin sentezlenmesinde en umut verici yeşil sentez yöntemlerinden biridir. Hidrotermal karbonizasyon genellikle düşük enerji tüketimine, hafif deneysel koşullara, basit bir aparat sistemine ve toksik olmayan kimyasal maddelere dayanır. Hidrotermal karbonizasyon işlemi sırasında kullanılan su, atık biyokütlenin hidrolizini ve karbonizasyonunu kolaylaştıran bir çözücü ve katalizör rolünü oynar. Ek olarak, reaksiyon sıcaklığı arttıkça suyun yüksek bir iyonlaşma sabiti vardır ve asitler/bazlar tarafından katalize edilen organik bileşiklerin hidrolizinden sorumludur.

Atık temelli karbon malzemenin gözenekli ve hiyerarşik yapısı, elektrolit penetrasyonunu kolaylaştıran ve iyon difüzyon mesafesini kısaltan birçok aktif bölge

içerir. Ek olarak, atık bazlı fonksiyonel karbon malzemelerin çoğu, çok yüksek elektrik iletkenliğine, yüksek spesifik yüzey alanına sahiptir. Ayrıca nitrojen ve kükürt gibi heteroatomlar içerirler ve farklı aktif bölgeler olarak hizmet ederler. Bütün bunlar karbon malzemeleri iyi bir elektrot modifikasyon malzemesi yapar ve sulu ortamdaki elektrokimyasal algılama uygulamalarında avantajlıdır.

Hidrotermal karbonizasyon işleminin genel olarak avantajları;

- Hidrotermal karbonizasyon prosesinde kullanılan enerji miktarı ve çalışma koşulları oldukça uygundur.
- Hidrotermal karbonizasyon işlemi sulu fazda sentezlenir ve toksik çözücüler gerektirmez.
- Karbon kaynağı için sürdürülebilir ve yenilenebilir girdi malzemesi özelliğindeki biyokütle kullanılmaktadır.
- Girdi malzemesi niteliğinde alınan materyallerin ucuz ve kolay temin edilebilir olması nedeniyle düşük maliyetli bir yöntemdir.
- Hidrotermal karbonizasyon prosesi karmaşık ve çok aşamalı bir sistemden oluşmaz, bu da zaman açısından avantajlıdır.
- Sentezlenmiş ürünler kullanılacağı uygulamaya göre fonksiyonelleştirilebilir veya diğer malzemelerle beraber kullanılabilir.
- Diğer proseslerden farklı olarak sentez sırasında ek soğutma sistemlerine ihtiyaç duyulmaz.
- Hidrotermal karbonizasyon işlemi sayesinde çok çeşitli morfolojilere sahip malzemelerin sentezlenmesi mümkündür.
- Hidrotermal karbonizasyon işlemi ile yüksek saflıkta malzemeler elde etmek mümkündür.
- Yüzey alanı yüksek malzeme elde edilmesi açısından son derece avantajlı bir tekniktir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Analizler

Sentezlenen karbon malzemenin elektrot modifikasyon özelliklerini ve fizikokimyasal özelliklerini belirleyebilmek amacıyla karbon malzemeye geçirimli elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu- enerji dağılımlı x- ışını (SEM-EDX), çok noktalı Brunauer- Emmett- Teller (BET), dispersif Raman spektrometresi, x- ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), x- ışını kırınım difraktometresi (XRD), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT- IR), termogravimetrik (TG) ve diferansiyel termal (DT) analiz gibi çok çeşitli karakterizasyon teknikleri uygulanmıştır.

3.1.1 TEM analiz tekniği

TEM analizi, çok çeşitli nanomalzemelerin boyutunu, morfolojisini, kristalografik yapısını ve kimyasal bileşimini analiz etmek için çok yönlü bir tekniktir. Tipik TEM cihazlarının çalışma prensibi tungsten/LaB6 filamentine sahip elektron tabancasının vakum atmosferi altında yüksek sıcaklıklarda ısıtılıp hızlandırılmasına dayanmaktadır. Isıtılan elektronlar serbest kaldıktan sonra anot ile katot arasında gerilime girerek ivme kazanır ve hızlanırlar. Anot bölgesinde ki merkez açıklıktan hareket ederek kesintisiz bir elektron demeti haline dönüşürler. TEM cihazları manyetik lensler oluşmaktadır ve hızlandırılmış elektronlar bu lensler tarafından saptırılır. Sapan elektronların bir kısmı merkez açıklıkta bulunan atomlarla etkileşime girerken bir kısmı örneğin içerinden geçer. Analizin ismi bu yüzden geçirimli elektron mikroskopudur. Son aşamada elektronlar objektife ulaşır ve fotoğraf plakalarına düşer. TEM görüntüleri siyah ve beyaz tonlardan oluşmaktadır. Bunun sebebi gözlemlene yapabilmek için kontrast özelliğine ihtiyaç duyulmasından kaynaklıdır. İyi bir kontrast elde edebilmek için saçılma özelliğinden yararlanılır. Elde edilen görüntülerde ki koyu renkli alanlar elektronca yoğun bölgelere işaret ederken açık renkli alanlar elektronca geçirgen bölgeye işaret etmektedir (Kamaladasa ve Picard 2010).

Bu çalışmada EOL-JEM-2100 F model bir TEM cihazı kullanılmıştır. Numuneler analize hazırlanırken metanol içerisinde disperse edildikten sonra eşit miktarda alınarak ızgara benzeri örnek platformuna damlatılmıştır. Çözücü belli bir sıcaklıkta uzaklaştırıldıktan sonra vakum atmosferinde analiz gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 SEM analiz tekniği

Taramalı elektron mikroskobu, bir parçacığın yüksek kalitede ve uzaysal çözünürlükte ayrıntılı bir görsel görüntüsünü elde edebilen önemli bir elektron mikroskobu tekniğidir. SEM, büyük ölçüde malzemelerin yüzey kimyasını gözlemlemek için kullanılan çok amaçlı son teknoloji bir araçtır. Numune, SEM'de yüksek enerjili elektron ışınına maruz bırakılır ve bir malzemenin topografyası, morfolojisi, bileşimi, kimyası, tanelerin homojenliği, kristalografik bilgiler vb. hakkında bilgi verir ve bu nedenle SEM, malzemelerin karakterizasyonu için kullanılabilecek yararlı bir tekniktir. TEM analizi ile kıyaslandığında numune hazırlaması daha kolay olup, kırılma yüzeyleri incelenebilir ve daha düşük maliyetlidir. Fakat TEM analizine kıyasla 100kx büyötmeye kadar çıkılabilir, numuneler iletken olmak zorundadır ve kristalografik bilgi elde edilemez.

Bu analiz tekniğinde elektron demeti tek bir noktadan hareket ettirilir ve elektronlar TEM analizinde olduğu gibi yüzey görüntüsü elde edilecek malzemenin içersinden geçmek yerine malzemenin yüzeyine kaplanan metal tabakaya çarparak yansır. Farklı açılarda saçılan elektronlar algılayıcı tarafından toplanır ve toplanan sinyaller mikroskoba iletilir. SEM analizi yapılacak numunenin yüksek vakum atmosferine dayanıklı olması gereklidir. Ayrıca numuneler fazla nem tutmamalı ve sıcaklık etkisi ile buharlaşmamalıdır. Bu çalışmada Quanta 400 F model bir SEM cihazı kullanılmıştır (Akhtar vd. 2018).

3.1.3 EDX analiz tekniği

EDX tekniği, malzemenin elementel analizini ya da kimyasal karakterizasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan önemli bir analitik tekniktir. Bu yöntem, x- ışını uyarma kaynağı ile bir numunenin etkileşimine dayanmaktadır. EDX tekniği, x- ışını emisyon spektrumunda her elementin, farklı pikler halinde kümesine izin veren bir tekniktir. EDX analiz tekniğinde elektron ışın demeti malzeme yüzeyine çarparak, yüzeyde bulunan elektronları uyarır ve elektronlar saçılması sonucunda elementin elektronik yapısında bir elektron deliği oluşturmaktadır. Bu teknik sayesinde malzeme de var olan elementlerin spesifik pikleri ve elementlerin % miktarları belirlenebilmektedir (AbdMutalib vd. 2017).

3.1.4 BET analiz tekniği

Brunauer- Emmett- Teller tekniği, gaz adsorpsiyon izotermelerinin yarı-ampirik değerlendirilmesi ile gözenekli malzemelerin yüzey alanlarını karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Gözenekli malzemeler, kimyasal reaksiyon ve ayırma işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gözenekli bir malzemenin pratik performansı, genellikle gaz adsorpsiyon deneyi ile karakterize edilen birim ağırlık veya hacim başına iç yüzey alanı cinsinden ölçülmektedir. Orijinal “yüzey alanı ölçümü” fikri, Langmuir'in tek tabakalı adsorpsiyon konusundaki öncü niteliğinde ki çalışmalarına kadar uzanmaktadır. Langmuir modeli, düzlemsel bir substratın yüzey alanının nicel bir temsilini sağlayan kafes bölgeleriyle gaz moleküllerinin stokiyometrik bir şekilde bağlandığını varsaymaktadır. Termodinamik model daha sonra Brunauer, Emmett ve Teller tarafından çok katmanlı adsorpsiyonlara kadar genişletilmiştir. BET yöntemini kullanarak yüzey alanı karakterizasyonu, yalnızca teorik varsayımlara değer, aynı zamanda adsorbe edilmiş gaz moleküllerinin kesit alanı gibi ampirik parametrelerin seçimine de bağlı olan esasen ampirik bir prosedürdür. Azot adsorpsiyonu için bile, model parametreleri, farklı yüzey yapıları ve etkileşimleri olan mikro gözeneklerde adsorpsiyon için değerştirilebilmektedir.

HTC işlemi sonucunda elde edilen karbon malzeme BET yöntemi ve Quantachrome NOVA 2200 seri adsorpsiyon cihazı aracılığıyla analiz edilmiştir. Karbon malzeme analiz uygulanmadan vakum atmosferinde ısı işlemi uygulanmış ve nemi giderilmiştir. Böylece nem ya da ortamdaki diğer değerşkenlerden dolayı kapalı halde olan gözeneklerin açılabilmesi sağlanmıştır (Naderi 2015).

3.1.5 Dispersif Raman spektrometresi

Raman ve Krishnan 1928'de ilk kez moleküler titreşimlerin, ışığı her moleküler yapı için benzersiz bir şekilde esnek olmayan bir şekilde dağıttığını keşfetmişlerdir. Raman analiz tekniği malzemenin görünür-bölge özellikteki monokromatik bir ışın yolundan meydana gelen şiddetli lazer kaynağı tarafından ışınlanmasının ardından saçılan ışının belirlenen açıdan ölçümü prensibinden oluşmaktadır. Raman analiz tekniğinde Rayleigh ve Raman olmak üzere toplamda iki adet saçılma gözlemlenmektedir. İlk saçılma elastik karakterlidir ve tek bir pik vererek moleküler titreşimler hakkında bilgi vermez. İkinci

saçılma olan Raman saçılması moleküler titreşimler ve geçişler hakkında bilgi vermekle birlikte titreşim düzeyleri enerji farkından hesaplanmaktadır. Raman analiz tekniği sayesinde karbonlu malzemelerin yapısı ve elektronik özellikleri hakkında birçok bilgi edinilebilmektedir. Raman ölçümlerinin elde edilmesi oldukça kolaydır, çok az numune hazırlığı gerektirir, genellikle numunelere zarar vermez veya atık üretmez; spektrumlar şeffaf cam, plastik, su veya solvent yoluyla elde edilebilmektedir. Karbon malzemenin Raman analizi için BRUKER-FRA 106/S model bir cihazı kullanılmıştır (Conti vd. 2014).

3.1.6 XPS analiz tekniği

XPS analizinin çalışma prensibi, yüksek enerjili fotonlar (genellikle keV aralığında) bir malzemeye çarptığında ortaya çıkan fotoelektrik etkiye ve bunun sonucunda meydana gelen elektron emisyonuna (fotoelektronlar) dayanmaktadır. Analizi yapılacak malzemenin yüzeyi x-ışını bombandırmanına tutulur ve malzeme yüzeyinden saçılan elektronların kinetik enerjileri hesaplanır. Nicel olarak ölçülen fotoelektron kinetik enerjisi (E_k), Einstein kanunu $E_k = h\nu - E_b$ ile verilmiştir. Bu formülasyonda $h\nu$, gelen radyasyonun enerjisi ve aynı zamanda belirli bir seviyede elektronun bağlanma enerjisidir. Belirli bir element seviyesindeki bağlanma enerjilerinin kimyasal kaymaları, farklı oksidasyon durumları ve farklı kimyasal ortamlardan kaynaklanmaktadır.

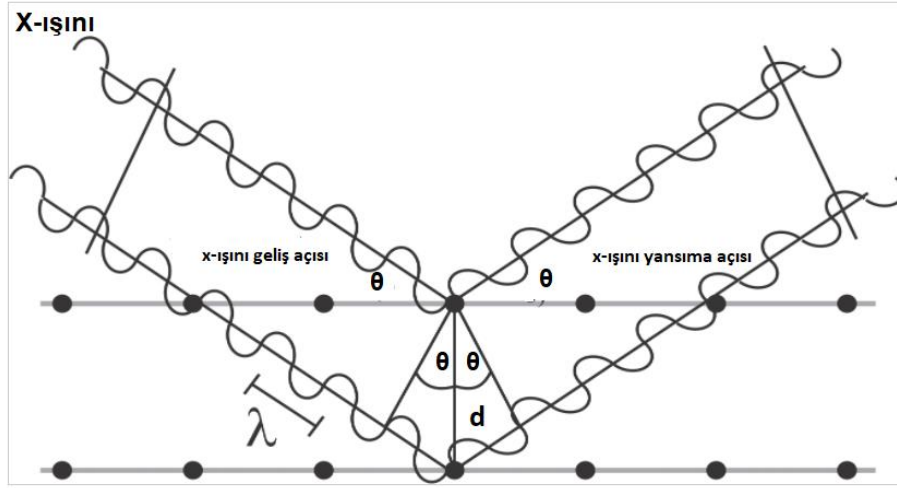
XPS analiz tekniği sayesinde malzeme yüzeyinde konumlanan atomların kimyasal özelliklerinin belirlenmesi mümkündür. Ayrıca saf bileşimde bulunan katıların basit formüllerinin saptanabilmesi, yüzeyde var olan element ve bileşiklerin hem çizgi profilinin çıkarılması hem aşındırılması da mümkündür.

Karbon malzemelerin XPS analizinde x-ray beam'i yaklaşık 10-200 μm arasına odaklanabilen PHI-5000 Versaprobe model bir cihaz ile çalışılmıştır (Bagotsky 2005).

3.1.7 XRD analiz tekniği

XRD analiz tekniği, tespit edilen pik noktalarının konumları ve yoğunlukları aracılığıyla amorf organik maddenin kristalit parametrelerini belirleyerek yapısal karakterizasyonlarını sağlamaktadır. XRD pik noktaları, bir numunedeki her bir kafes düzlemi kümesinden belirli açılarda saçılan monokromatik bir x-ışınları demetinin

girişimi aracılığıyla meydana gelmektedir. Pik yoğunlukları ise kafes düzlemleri içindeki atomik konumlar tarafından belirlenmektedir. XRD analiz tekniği sayesinde yapılar, nitel ve nicel fazlar, tercih edilen kristal yönelimleri (doku) ve ortalama tanecik boyutu, kristallik, gerinim ve kristal kusurları gibi diğer yapısal parametreler hakkında bilgi edinilebilmektedir.



Şekil 3.1 XRD analiz tekniğinin şematik gösterimi (Anonim)

Şekil 3.1 XRD analiz tekniğinin temel çalışma prensibinin şematik gösterimidir. Elde edilen malzemenin kristal büyüklüğü kırınım desenleri aracılığıyla belirlenebilmektedir. Malzemeye uygulanan x-ışını malzeme yüzeyinden yansırken maksimum seviyede bir pik vermektedir. Bu pikin gözlemlendiği açıdan yola çıkılarak Scherrer eşitliği yardımıyla kristal büyüklüğü hesabı yapılabilmektedir.

$$d = \frac{\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Belirtilen formülde β ; kırınımı sonucunda oluşan pikin radyan türünden yarı yükseklik genişliğini, d ; kristal büyüklüğünü, λ ; yansıtılan x-ışınının dalga boyunu ve θ ; düzlemin gözlemlendiği Bragg açısını temsil etmektedir. Scherrer eşitliği genelde polikristal malzemelere uygulanmaktadır ve K (0,9) düzeltme faktörü gerektirir. Kristal büyüklüğü ile yarı yükseklikteki pik genişliği birbiriyle ters orantılıdır. Sonuç olarak geniş yapıya sahip olan piklerin kristal boyutu daha küçüktür.

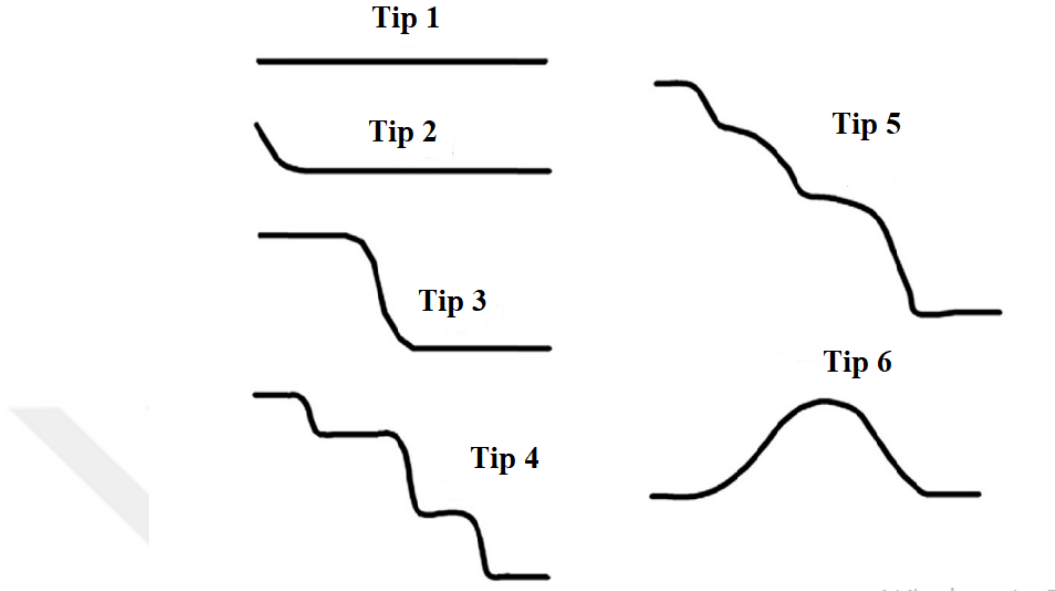
Bu çalışmada BRUKER model cihaz aralığı ile $\text{CuK}\alpha$ radyasyonu kullanılarak x-ışını kırınım desenleri elde edilmiştir (Walenta ve Füllmann 2004).

3.1.8 FT-IR analiz tekniği

FT-IR analizi, organik veya inorganik bileşenlerin yapısının aydınlatılmasında kullanılan önemli bir tekniktir. IR spektrumu, malzemeyi oluşturan atomlar arasında meydana gelen bağların titreşim frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile malzemenin parmak izini belirleyebilmektedir. Elektromanyetik ışımının malzemeyi oluşturan moleküller tarafından soğurulması tamamen atomların cinsine, düzenlenme ve yönelimine, molekül şekline, çapına bağlıdır. Ayrıca her malzemenin kendine özgü bir spektrumu bulunmaktadır. Spektrumun özellikle 2000 cm^{-1} den sonra oluşan kısmı yorumlanmaya değer niteliktedir. Bu bölgeye parmak izi bölgesi adı verilmektedir ve moleküler titreşimleri daha iyi yorumlayabilmek amacıyla spektrum iki kat genişletilerek ölçeklendirilir.

FT-IR analizi karbonlu malzemelerin kimyasal yapısını hızlı güvenilir, hassas ve ucuz bir şekilde aydınlatılmasını sağlayan önemli bir teknik olmasına rağmen karbon temelli materyallerden çoğunlukla doğru ve iyi spektrumlar elde etmek mümkün olmamaktadır. En önemli sebep ise hazırlanan malzemenin siyah renkli olmasından kaynaklı olarak görünür bölgede var olan tüm ışığı absorplamasıdır. Sonuçlar sinyal/gürültü oranı çok daha düşük çıkar ve elde edilen pikleri doğru şekilde tayin etmek güçleşir. Bu durumun önüne geçmek amacıyla malzeme çok küçük boyutlara inilecek şekilde öğütülmelidir ve ısınmadan kaynaklı oksidasyonun önüne geçilmelidir (Baravkar vd. 2011).

veya zamanın bir fonksiyonu olarak ağırlık değişiminin bir grafiğini temsil eder. TG eğrisinin yorumu aşağıdaki gibi çeşitli şekillerde yapılabilir (**Şekil 3.3**).



Şekil 3.3 Temel termogram eğrilerinin sınıflandırılması (Gabbott 2008)

- ✓ Tip 1: Bu tür eğri, analiz için kullanılan tüm sıcaklık aralığı boyunca hiçbir kütle kaybı değişikliği göstermez. Bunun olası nedeni, malzemenin termal stabilitesinin sıcaklık aralığından daha yüksek olması olabilir.
- ✓ Tip 2: Bu tür bir eğri, daha sonra sabit bir çizgi ile takip edilen bir kütle kaybı bölgesi sergilemektedir. Tip 2 TG eğrileri, uçucu bileşiklerin buharlaştığı ve desorpsiyonun meydana geldiği kurutma gibi belirli işlemlerden kaynaklanmaktadır.
- ✓ Tip 3: Tek bir kütle kaybı veya ayrışma aşamasını gösteren TG eğrileri, tip 3'e karşılık gelir
- ✓ Tip 4: Bu tür bir eğri, çok aşamalı bir ayrıştırma sürecinden geçen malzemeler tarafından sergilenmektedir.
- ✓ Tip 5: Bu tür bir eğri, reaksiyona giren bir atmosferde meydana gelen yüzey oksidasyon reaksiyonlarından dolayı malzeme ağırlığında bir artış olduğunda ortaya çıkabilir.
- ✓ Tip 6: Bu tip eğri, birden fazla eğri varsa mümkün olabilir. Sıcaklık artışı ile ilgili reaksiyonlar. Kütledeki artış, yüzey oksidasyon reaksiyonundan kaynaklanırken, sıcaklıktaki daha fazla artışla ağırlıktaki azalma, reaksiyon ürünlerinin ayrışma sürecine karşılık gelir.

Hidrotermal karbonizasyon işlemi sonucunda elde edilen karbonlu malzemeler genel olarak tip 3 eğrisine benzer bir karakter sergilemektedirler. "Termogram" terimi, TGA tarafından elde edilen ve sıcaklığa karşı kütle kaybı verilerini içeren bir grafiği ifade eder. Aşağıdaki bilgiler, tipik bir termogramdan elde edilebilir:

- ✓ Termal stabilite: Termal stabilite, TGA kullanan bir malzemenin, ısıya maruz kaldığında neredeyse etkilenmeden özelliklerini koruma kabiliyetine dayalı olarak belirlenir. Isıl kararlılık bilgisi malzeme açısından önemlidir, böylece alaşımların, polimerlerin ve nanomalzemelerin sıcaklık profilini tahmin etmek mümkün olmaktadır.
- ✓ Malzemenin bileşimi: Bir malzemenin sıcaklığı arttırıldığında, malzemenin kütle kaybına uğradığı bilinmektedir. Kütle kaybıyla ilgili bilgiler, araştırmacılar için bir malzemenin bileşimini belirlemede önemlidir. Ayrıca ayrışma sürecinde yer alan reaksiyon adımlarını anlamak mümkün olmaktadır. Kütle kaybı profili aracılığıyla, malzemede bulunan bilinmeyen bir bileşiği belirlemek veya malzemedeki farklı bileşiklerin bir karışımı arasında bulunan belirli bir bileşiğin miktarını veya yüzdesini değerlendirmek de mümkün olmaktadır.
- ✓ İşlemsel bozunma sıcaklığı: Bir malzemenin buharlaşma veya bozunma işlemlerini gösteren işlemsel bozunma sıcaklığı bir termogram yardımıyla değerlendirilebilmektedir (Gabbott 2008).

Karbon numuneye SHIMADZU-60 cihazı ile termogravimetrik ve diferansiyel termal analiz uygulanmıştır. Analizler N₂ atmosferinde ve 10 °C dk⁻¹ ısıtma hızında platin panlar kullanılarak yapılmıştır.

3.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Diğer Ekipmanlar

Ölçümler ve deneyler sırasında kullanılan tüm cihaz, donanım ve yazılımlar aşağıda sıralanmıştır;

- Parr model otoklav
- Protherm marka piroliz fırını
- 29/32 rodaj sistemine sahip kuvartz reaktör
- Nüve marka vakum etüvü Shimadzu UV 1601
- Shimadzu UV-1601 model Ultraviyole- spektrometre
- ISO-lab marka ısıtıcı karıştırıcı

- Elma marka sonik banyo
- Ependorf marka mikropipet seti
- Terazı
- pH-metre Model 538 (WTW, Austria)
- Manyetik karıştırıcı (Elektro– mag ve ARE 2– Velp)
- Potansiyostatlar; IVIUM- compact– stat, AUTOLAB 30
- Ag/AgCl– referans elektrot
- Platin tel– karşıt elektrot
- Camsı karbon elektrot- CKE (BASİ marka– İletken yüzeyin çapı (iç çap) 3mm)

3.2.1 Potansiyostat hakkında bilgiler

Tez deneyleri kapsamında elektrokimyasal teknikler IVIUM- compact-stat (Eindhoven, Netherlands) model potansiyostat ve AUTOLAB 30 (Eco Chemie, Hollanda) cihazlarında gerçekleştirilmiştir. Cihazların yazılımı Microsoft Windows® sistemi ile uyumludur. Bu cihazlar aşağıdaki elektrokimyasal tekniklerin kullanılmasına olanak vermektedirler.

Çizelge 3.1 Cihazların elektrokimyasal teknik içerikleri

IVIUM- compact-stat	AUTOLAB 30
Dönüşümlü Voltametri	Dönüşümlü Voltametri
Doğrusal Taramalı Voltametri	Doğrusal Taramalı Voltametri
Galvanostatik şarj- deşarj	Galvanostatik şarj- deşarj
Kronoamperometri	Kronoamperometri
Kronopotansiyometri	Kronokulometri
Normal Puls Voltametri	Nomal Puls Voltametri ve Polarografisi
Diferansiyel Puls Voltametri	Diferansiyel Puls Voltametri ve Polarografisi
Kare Dalga Voltametri	TAST Polarografisi
Empedans	Barker Kare Dalga Voltametri ve Polarografisi
Alternatif akım (ac) Voltametri	Osteryoung Kare Dalga Voltametri ve Polarografisi
Doğrusal Taramalı Sıyırma Voltametrısı	Alternatif akım (ac) Voltametri ve Polarografisi

Çizelge 3.1 Cihazların elektrokimyasal teknik içerikleri (devam)

IVIUM- compact-stat	AUTOLAB 30
	Faz Selektif ac Voltametri ve Polarografisi
	2. Harmonik ac Voltametri ve Polarografisi
	Üçgen Dalga ac Voltametri ve Polarografisi
	Diferansiyel Üçgen Dalga ac Voltametri ve Polarografisi
	Döner Disk Elektrotla DTV
	Hidrodinamik Modülasyon Voltametrisi
	Barker Kare Dalga Sıyırma Voltametrisi
	Diferansiyel Puls Sıyırma Voltametrisi
	Doğrusal Taramalı Sıyırma Voltametrisi
	Osteryoung Kare Dalga Sıyırma Voltametrisi

3.3 Deneyler Boyunca Kullanılan Kimyasallar

- Asetik asit (%99-100) (Merck)
- Hidroklorik asit (%37) (Merck)
- Sodyum Hidroksit (Merck)
- Di potasyum mono hidrojen fosfat (Sigma-aldrich)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Sigma-aldrich)
- Tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorür (Sigma-aldrich)
- Sodyum klorür (Sigma-aldrich)
- Buzağı timus bezinden elde edilen dsDNA [=Calf Thymus DNA; çift sarmal DNA (dsDNA) (Sigma)

Tüm çalışmalarda Mili Q distile su kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında ($25,0 \pm 0,5$) °C’ de gerçekleştirilmiştir.

Elektrokimyasal deneylerde kullanılacak çözeltilerin hazırlanışı

3.3.1.1 Oligonükleotit çözeltilerinin hazırlanışı

Sığır timüs bezi çift sarmal DNA (*dsDNA*), poly A ve poly G stok çözeltileri Mili Q distile su ile 1000 µg/ ml derişimunda hazırlanmıştır ve +4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.3.1.2 Tampon çözeltilerin hazırlanışı

Deneylerde destek elektroliti olarak 0,1 M H₂SO₄ ve 0,5 M H₂SO₄ yanında değişik yapıda asidik ve bazik tampon çözeltileri (fosfat, asetat ve Britton-Robinson tamponları) kullanılmıştır.

Britton – Robinson tamponu, 2,47 g H₃BO₃, 2,7 ml derişik H₃PO₄ ve 2,3 ml glasiyel CH₃COOH içeren 1000 ml çözelti bidistile su kullanılarak hazırlanmış ve 5,0 M NaOH çözeltisi ile istenen pH değerine ayarlanmıştır. Bu tamponla pH 2,20 – 12,01 aralığında çalışılmıştır.

Çizelge 3.2’ de, her bir asetat ve fosfat tampon çözeltinin bileşiminde kullanılan kimyasal malzemeler hakkında gerekli bilgiler verilmiştir. Tampon çözeltiler saf su ile 100 ml’lik balonjojelerde hazırlanmıştır. Ultrasonik banyoda homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan her bir tampon çözeltinin pH değerleri pH metre ile ölçülerek kayıt altına alınmıştır.

Çizelge 3.2 Tampon Çözeltilerin Bileşimleri

pH Değeri	Tampon Cinsi	Kimyasal Malzeme (I)	Kimyasal Malzeme (II)	Madde Miktarı (I)	Madde Miktarı (II)
1,5	Fosfat	fosforik asit	sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	1,816 ml	1,56 g
2,0	Fosfat	fosforik asit	sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	0,576 ml	1,56 g
3,0	Fosfat	fosforik asit	sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	0,058 ml	1,56 g

Çizelge 3.2 Tampon Çözeltilerin Bileşimleri (devam)

pH Değeri	Tampon Cinsi	Kimyasal Malzeme (I)	Kimyasal Malzeme (II)	Madde Miktarı (I)	Madde Miktarı (II)
3,7	Asetat	asetik asit	sodyum asetat trihidrat	1,425 ml	0,34 g
4,7	Asetat	asetik asit	sodyum asetat trihidrat	0,570 ml	1,36 g
5,7	Asetat	asetik asit	sodyum asetat trihidrat	0,142 ml	3,40 g
6,0	Fosfat	sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	disodyum hidrojen fosfat	4,68 g	0,71 g
7,0	Fosfat	sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	disodyum hidrojen fosfat	0,94 g	1,42 g
8,0	Fosfat	sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	disodyum hidrojen fosfat	0,16 g	2,27 g

3.4 Elektrot Modifikasyon Materyali Olarak Kullanılacak Malzemelerin Sentezi

3.4.1 Metal oksit nanoparçacıkların sentezlenmesi

Tez kapsamında sentezlenen metal oksit nanoparçacıkların tamamı hidrotermal yöntem aracılığıyla sentezlenmiştir.

3.4.1.1 CuO nanoparçacıkların sentezlenmesi

CuO nanoparçacıkları, literatürde bilinen bir hidrotermal sentez yöntemiyle sentezlenmiştir. İlk aşamada, 20 ml 0,1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine 0.004 M Triton X- 100 ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışıma 20 ml 0,2 M NaOH solüsyonu eklenmiş ve eklemeler sırasında karışım kuvvetlice karıştırılmıştır. Karışım 4 saat kuvvetlice karıştırıldıktan sonra otoklava aktarılmış ve 5 saat boyunca 200 °C'de reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürün saf su/etanol (1: 1) ile yıkanmış ve 120 °C'de 4 saat etüvde kurutulmuştur.

3.4.1.2 SnO₂ nanoparçacıkların sentezlenmesi

SnO₂ nanoparçacıkların sentezi için 150 ml 0,5 M H_2SO_4 sulu çözeltisi ile 10 ml % 30'luk H_2O_2 ve kalay tozu teflon astarlı otoklava konulduktan sonra 150 °C'de 6 saat boyunca hidrotermal reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oda sıcaklığına kadar soğutulan otoklavdan alınan ürün süzülüp etanol ve su karışımında yıkanmıştır (1: 1). Sonuçta elde edilen açık gri renkli bir ürün olmuştur.

3.4.2 Karbon malzemelerin sentezlenmesi

Tez kapsamında sentezlenen karbon malzemelerin tamamı hidrotermal karbonizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen karbon malzemelerin yüzey alanını arttırmak amacıyla aktivasyon prosedürü uygulanmıştır.

3.4.2.1 Atık maskeden karbon malzeme sentezi

Çevreden toplanan atık maskeler su/etanol/aseton (1: 1: 1) karışımında bekletilerek 2 saat boyunca ultrasonik banyoda temizlenmiştir. Kurutulmuş atık maskeler (toplam 20 g) küçük parçalar halinde kesildikten sonra 400 ml distile su ile karıştırılarak otoklava aktarılmıştır. Daha sonra 250 °C'de 2 saat karbonizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan gri malzemeler oldukça hidrofobik karakterli olduklarından saf su ile yıkanamamıştır. Bu nedenle etanol ile 3 kez yıkandıktan sonra 120 °C'de 24 saat kurutulmaya bırakılmıştır.

Malzemelerin hidrofobik özelliğinden dolayı aktivasyon aşamasında su kullanılmamıştır. Malzeme/KOH oranı 2: 1 olarak belirlenmiş ve karışım havanda

homojenize edilmiştir. Bu işlemten sonra homojen karışım 110 °C'de 24 saat kurutulmuştur. Karışım daha sonra bir kuvarz kayığa alınmış ve 3 °C/dk ısıtma hızı uygulanmıştır. Sıcaklık 800 °C'de sabitlendiğinde 1 saat sürekli azot gazı akışı altında aktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Aktive edilen ürün, nötralizasyonu için 2 M HCl ile yıkanmış, süzölmüş ve 110 °C'de 24 saat kurutulmuştur.

3.4.2.2 İnsan saçından karbon malzeme sentezi

Literatürdeki çalışmaların aksine (Si vd. 2013), saç biyokütlesine önce ön karbonizasyon işlemi ardından hidrotermal karbonizasyon işlemi uygulanmıştır. Aktivasyon işlemi çok yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinden, yüzeydeki fonksiyonel gruplar zarar görebilmektedir. Bu fonksiyonlu gruplar elektriksel iletkenlik açısından kritik öneme sahip (Valdés vd. 2002).

Toplanan saç örnekleri (20 g) aseton, etil alkol ve distile su karışımında (1: 1: 1) bekletilmiş ve safsızlıkları gidermek için 1 saat sonik banyoda temizlenmiştir. 100 °C'de kurutulan saç örnekleri, oda sıcaklığında 24 saat boyunca 100 ml 1M KOH çözeltisi içinde tutulduktan daha sonra 24 saat boyunca 110 °C'de ısıtılmıştır. Jel benzeri katı karışım 800 °C' de 5°C/dk ısıtma hızında ve sürekli azot atmosferi akışı altında 1 saat boyunca piroliz edilmiştir. Son olarak karbon malzemedeki organik tuzları uzaklaştırmak için 2 M HCl ile pH nötr olana kadar yıkama ve süzme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Aktif karbon materyali 400 ml distile su ile karıştırıldıktan sonra otoklava aktarılmıştır. Karışım 220 °C'de 1 saat karbonize edilmiştir. Siyah renkli karbon malzeme, su ve etanol (1: 1) karışımı içinde yıkandıktan sonra etüvde 110 °C' de kurutulmuştur. İnsan saçından elde edilen karbon malzemeye H adı verilmiştir.

3.5 Çalışma Elektrodunun Elektrokimyasal Ölçümlere Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında, tüm elektrokimyasal ölçümler camı karbon elektrot aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Camı karbon elektrodun kararlı ve tekraredilebilir sonuçlar vermesi için yüzey temizliğinin yapılması gerekmektedir. Boş elektrot ile yapılan çalışmalarda, nanosensör çalışmalarında ve biyosensör çalışmalarında yüzey temizliği için ön işlemler yapılmıştır.

3.5.1 Camsı karbon elektroda uygulanan fiziksel ön işlemler

Elde edilen sonuçların tekrar edilebilir olması için standart bir elektrot yüzeyi oluşturmak gerekmektedir. Bu nedenle elektrot yüzeyine parlatma işlemi uygulanması uygulanmıştır. Bu işlem özel bir yumuşak kumaş üzerine seyreltilmiş alüminyum oksit (boyut 0,400 μm) konularak elektrot yüzeyinin dairesel hareketlerle parlatılmasına dayanmaktadır.

3.5.2 Camsı karbon elektroda uygulanan elektrokimyasal ön işlemler

Fiziksel temizlik yapıldıktan sonra elektrot yüzeyini elektrokimyasal olarak temizlemek amacıyla destek elektroliti varlığında 0,2 V – 1,8 V aralığında üç kez dönüşümlü voltametri tekniği uygulanmış ve elektrot yüzeyi elektrokimyasal olarak temizlenmiştir.

3.5.3 Biyosensör çalışmalarında elektrot yüzeyinin modifiye edilmesi

Biyosensör çalışmalarında ibrutinib, palbosiklib ve pazopanib ilaç etken maddeleri ile etkileşim incelenirken aynı prosedür takip edilmiştir. Elektrot yüzeyi, her seferinde 50 ppm dsDNA içeren solüsyondan 5 μl damlatılarak üç katman oluşturacak şekilde modifiye edilmiştir. dsDNA solüsyonu elektrot yüzeyine damlatıldıktan sonra 35°C' de kurutulmuş ve ardından damlatma işlemine geçilmiştir. Ayrıca elektrot, bağlanmamış dsDNA'yı elektrot yüzeyinden uzaklaştırmak için 5 saniye boyunca pH 4,7 asetat tampon çözeltisine daldırılmıştır. Daha sonra temiz pH 4,7 asetat tamponunda 0,2- 1,6 V aralığında DPV ölçümü alınmıştır. Her yeni elektrokimyasal ölçümden önce elektrot yüzeyi aynı prosedürle modifiye edilmiştir.

3.5.4 Nanobiyosensör çalışmalarında elektrot yüzeyinin modifiye edilmesi ve yüzey aktivasyonunun gerçekleştirilmesi

3.5.4.1 Palbosiklib deneyleri

Elektrot modifikasyon materyallerinin farklı oranlarının (mg) yükseltgenme sinyallerine etkisini gözlemlemek ve optimum modifikasyon bileşimini belirleyebilmek amacıyla sırasıyla 4 mg H, 0,5 mg NH₂- MWCNT, 4 mg H⁺ 0,5 mg NH₂- MWCNT, 2 mg H⁺ 0,5 mg NH₂- MWCNT ve 8 mg H⁺ 0,5 mg NH₂- MWCNT bileşimleri kullanılmıştır. Elektrot yüzeyini modifiye etmek amacıyla sentezlenen materyallerden sırasıyla 4 mg insan saçından elde edilen karbon ve 0,5 mg amin fonksiyonlaştırılmış- çok duvarlı karbon nanotüp (NH₂- MWCNT) optimum modifikasyon bileşimi olarak belirlenip 1 ml

etanol içinde karıştırıldıktan sonra, malzemelerin çözücü içerisindeki dağılımını arttırmak amacıyla 2 saat ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra modifikasyon dispersiyonu elektrot yüzeyine farklı miktarlarda sırasıyla 3, 5, 7 ve 10 µl olacak şekilde damlatılmış ve kurutma makinesi altında kurutulmuştur. Optimum modifikasyon dispersiyonu miktarı 10 µl olarak bulunmuştur. Elektrot yüzeyi üzerine kaplanmış modifikasyon malzemesini aktifleştirmek amacıyla pH 4.7 asetat ortamında 0.2 V – 1.6 V potansiyel aralığında 15 tarama sayısında dönüşümlü voltametri tekniği uygulanmıştır. Aktive edilen elektrot oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldıktan sonra kuru elektrot yüzeyine tek seferde 5 µl 50 ppm dsDNA çözeltisi damlatılarak kurutma makinesinin altında (35 °C) 5 dk süreyle kurutulmuştur. Modifiye etme süreci tamamlanan elektrot oda sıcaklığında soğutulduktan sonra taze pH 4.7 asetat tamponunda ölçüm alınmaya hazır hale gelmiştir.

3.5.4.2 Pazopanib deneyleri

Elektrot modifikasyon materyallerinin farklı oranlarının (mg) yükseltgenme sinyallerine etkisini gözlemlemek ve optimum modifikasyon bileşimini belirleyebilmek amacıyla sırasıyla 2 mg SnO₂, 0,5 mg M, 1 mg M+ 4 mg SnO₂, 0,5 mg M+ 4 mg SnO₂, 1 mg M+ 2 mg SnO₂, 0,5 mg M+ 2 mg SnO₂, 1 mg M+ 8 mg SnO₂ ve 0,5 mg M+ 8 mg SnO₂ bileşimleri kullanılmıştır. Elektrot yüzeyini modifiye etmek amacıyla sentezlenen materyallerden sırasıyla 0,5 mg atık maskeden elde edilen karbon ve 2 mg SnO₂ nanoparçacık optimum modifikasyon bileşimi olarak belirlenip 1 ml etanol içinde karıştırıldıktan sonra, malzemelerin çözücü içerisindeki dağılımını arttırmak amacıyla 2 saat ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra modifikasyon dispersiyonu elektrot yüzeyine farklı miktarlarda sırasıyla 3, 5, 7 ve 10 µl olacak şekilde damlatılmış ve kurutma makinesi altında kurutulmuştur. Optimum modifikasyon dispersiyonu miktarı 10 µl olarak bulunmuştur. Elektrot yüzeyi üzerine kaplanmış modifikasyon malzemesini aktifleştirmek amacıyla pH 4.7 asetat ortamında 0.2 V – 1.6 V potansiyel aralığında 15 tarama sayısında dönüşümlü voltametri tekniği uygulanmıştır. Aktive edilen elektrot oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldıktan sonra kuru elektrot yüzeyine tek seferde 5 µl 50 ppm dsDNA çözeltisi damlatılarak kurutma makinesinin altında (35 °C) 5 dk süreyle kurtulmuştur. Modifiye etme süreci tamamlanan elektrot oda sıcaklığında

soğutulduktan sonra taze pH 4,7 asetat tamponunda ölçüm alınmaya hazır hale gelmiştir.

3.5.5 Nanosensör çalışmalarında elektrot yüzeyinin modifiye edilmesi ve yüzey aktivasyonunun gerçekleştirilmesi

Elektrot modifikasyon materyallerinin farklı oranlarının (mg) yükseltgenme sinyallerine etkisini gözlemlemek ve optimum modifikasyon bileşimini belirleyebilmek amacıyla sırasıyla 1 mg CuO, 1 mg M, 1 mg M+ 1 mg CuO, 2 mg M+ 2 mg CuO, 0,5 mg M+ 1 mg CuO, 1 mg M+ 0,5 mg CuO, 1 mg M+ 2 mg CuO ve 2 mg M+ 1 mg CuO bileşimleri kullanılmıştır. Elektrot yüzeyini modifiye etmek amacıyla sentezlenen materyallerden sırasıyla 1 mg CuO nanoparçacık ve 1 mg maskeden elde edilen karbon malzeme optimum modifikasyon bileşimi olarak belirlenip 1 ml DMF içinde karıştırıldıktan sonra, malzemelerin çözücü içerisindeki dağılımını arttırmak amacıyla 2 saat ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra modifikasyon dispersiyonu elektrot yüzeyine farklı miktarlarda sırasıyla 5, 10, 15 ve 20 µl olacak şekilde damlatılmış ve 50 °C'de bir vakum etüvünde kurutulmuştur. Optimum modifikasyon dispersiyonu miktarı 10 µl olarak bulunmuştur. Elektrot yüzeyi üzerine kaplanmış modifikasyon malzemesini aktifleştirmek amacıyla pH 3,7 asetat ortamında 0,2 V – 1,8 V potansiyel aralığında 15 tarama sayısında dönüşümlü voltametri tekniği uygulanmıştır. Optimum biriktirme süresi 240 s ve biriktirme potansiyeli 0,6 V parametreleri belirlenerek sıyırma voltametrisi ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmiş elektrodun kararlılığı, 3 günlük bir süre boyunca 1×10^{-4} M ilaç derişimunda ölçümler alınarak test edilmiştir.

3.6 İlaç Etken Maddelerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

3.6.1 Palbosiklib

Palbosiklib'in, stok çözeltisi DMSO kullanılarak 10^{-3} M olacak şekilde hazırlanmıştır ve hazırlanan stok çözelti +4 °C'de karanlıkta saklanmıştır. Deneyler boyunca hazırlanan stok çözeltileri ve ölçüm çözeltilerinde çözücü oranı yani DMSO oranı % 10 olarak sabit tutulmuştur. Palbosiklib'in tüm voltametrik çalışmaları, 0,5 M pH 4,7 asetat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tüm voltametrik deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltiler, bozulmayı önlemek için günlük ve taze olarak hazırlanmıştır.

3.6.2 İbrutinib

İbrutinib'in, stok çözeltisi DMSO kullanılarak 10^{-3} M olacak şekilde hazırlanmıştır ve hazırlanan stok çözelti +4 °C'de karanlıkta saklanmıştır. Deneyler boyunca hazırlanan stok çözeltileri ve ölçüm çözeltilerinde çözücü oranı yani DMSO oranı %10 olarak sabit tutulmuştur. İbrutinib'in tüm voltametrik çalışmaları, 0,5 M pH 4,7 asetat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tüm voltametrik deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltiler, bozulmayı önlemek için günlük ve taze olarak hazırlanmıştır.

3.6.3 Pazopanib

Pazopanib'in, stok çözeltisi DMSO kullanılarak 10^{-3} M olacak şekilde hazırlanmış ve hazırlanan stok çözelti +4 °C'de karanlıkta saklanmıştır. Deneyler boyunca hazırlanan stok çözeltileri ve ölçüm çözeltilerinde çözücü oranı yani DMSO oranı %10 olarak sabit tutulmuştur. Ayrıca tüm voltametrik deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltiler, bozulmayı önlemek için günlük ve taze olarak hazırlanmıştır.

3.7 Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Formalara Uygulanması

3.7.1 Palbosiklib

Bu uygulama için üç adet “Reample” tableti (125 mg palbosiklib içermektedir), homojen bir toz karışım elde etmek için havanda ezilmiştir. Hesaplanan tablet tozu miktarı kullanılarak, toz karışım DMSO ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım ultrasonik banyoda ve santrifüjde 10 dk tutularak 1×10^{-3} M pazopanib içeren tablet stok çözeltisi hazırlanmıştır. Tablet uygulamasında kullanılmak üzere üstte kalan berrak kısımdan kalibrasyon grafiği içerisinde yer alan bir derişime karşılık gelen hacimde çözelti alınmış ve destek elektroliti ile seyreltilip voltamogramları (en az 5 ölçüm) kaydedilmiştir.

3.7.2 Pazopanib

Bu uygulama için üç adet “Votrient” tableti (400 mg pazopanib içermektedir), homojen bir toz karışım elde etmek için havanda ezilmiştir. Hesaplanan tablet tozu miktarı kullanılarak, toz karışım DMSO ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım ultrasonik banyoda ve santrifüjde 10 dk tutularak 1×10^{-3} M pazopanib içeren tablet stok çözeltisi hazırlanmıştır. Tablet uygulamasında kullanılmak üzere üstte kalan berrak kısımdan kalibrasyon grafiği içerisinde yer alan bir derişime karşılık gelen hacimde çözelti

alınmış ve destek elektroliti ile seyreltilip voltamogramları (en az 5 ölçüm) kaydedilmiştir.

3.8 Geri Kazanım Uygulaması

Farmosötik dozaj formlar içerisindeki birtakım maddelerin çözelti ortamında herhangi bir girişime yol açıp açmadığını belirleyebilmek amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışma için bilinen miktarda etken madde ve farmosötik dozaj formdan alınıp çözücü olarak kullanılan DMSO ile bir stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin berrak kısmı ayrılarak ölçüm çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır ve bu ölçüm çözeltisinin voltamogramları kaydedilmiştir. Kalibrasyon grafiği analiz verileri yardımıyla eklenen saf madde miktarının ne kadarının tayin edilebildiği hesaplanan % geri kazanım değerleri ile gösterilmiştir.

3.9 Yapay İnsan Serum Uygulaması

Yapay insan serumunun bozulmasını önlemek için serum $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Serum uygulaması için 5,4 ml asetonytril, 3,6 ml serum ve 1 ml 1×10^{-3} M ilaç etken madde karıştırılarak stok çözelti hazırlanmıştır. İnsan serumunda bulunan proteinlerin girişim etkisini önlemek ve bunları ayırmak için optimum miktarda asetonytril ilave edilmiştir. Daha sonra karışım, ultrasonik banyoda ve santrifüjde 10 dakika tutulmuştur. İnsan serumu uygulamasında kullanım için üstte kalan kısım karışımdan ayrılarak berrak çözelti saklanmıştır. Geliştirilen nanosensörün doğruluğunu bulmak için standart bir ekleme prosedürü uygulanmış ve serum % geri kazanım deneyleri tamamlanmıştır. Geri kazanım deneyleri için birbirine yakın beş veri seçilerek hesaplamalarda kullanılmıştır. Elde edilen akım yanıtı, önceden çizilen kalibrasyon grafiklerinin karşılık gelen regresyon denklemlerinden hesaplanmıştır.

3.10 Girişim Çalışması

Girişim çalışması için dopamin, ürik asit, askorbik asit, glukoz, NaCl, NaNO_3 , KCl ve CaCl_2 girişim maddelerinin 10^{-3} M'lık stok çözeltileri hazırlanmış ve ölçüm çözeltileri 10^{-4} , 10^{-5} M ara stok çözeltilerden hazırlanmıştır. Bu girişim maddeleri ile palbosiklib için 1: 1 ve 1: 10 oranlarında çalışılırken pazopanib için 1: 1, 1: 10, 1: 100 ve 1: 1000 oranlarında çalışılmıştır.

3.11 UV-Vis Spektroskopi Tekniği ile İlaç-DNA Etkileşiminin İncelenmesi

İlaç-DNA etkileşimi için yapılan UV-vis spektroskopi deneylerinde Tris tamponu kullanılmıştır (0,1 M, 100 ml NaCl ve 10 mM Trizma oranları kullanılarak hazırlanmıştır.) Titrasyon işlemi için 2940 µl Tris tamponu ve 60 µl ilaçdan oluşan ölçüm çözeltisi hazırlanmış ve kuartz küvete aktarılmıştır. Titrasyon işlemi gerçekleştirilirken *ds*DNA eklemelerinin 1 µl gibi küçük miktarlarda olmasına dikkat edilmiştir. Spektrumlar 200- 600 nm absorbans aralığında kaydedilmiştir.

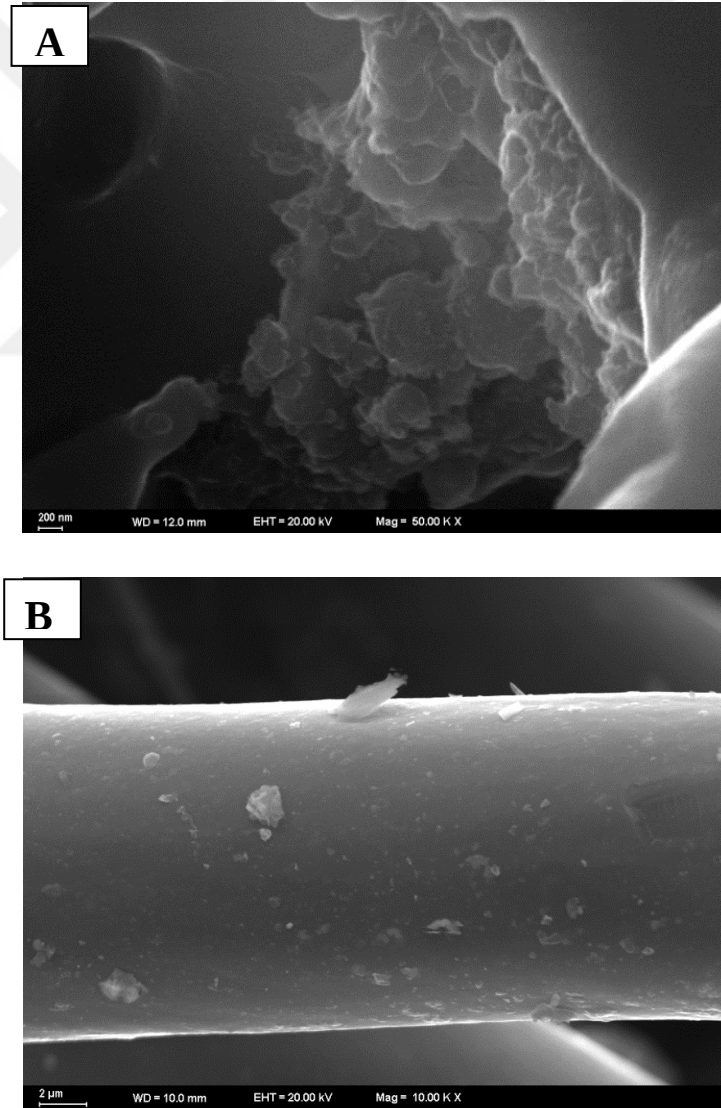


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 H ve NH₂- MWCNT Elektrot Modifikasyon Malzemelerinin Karakterizasyonu

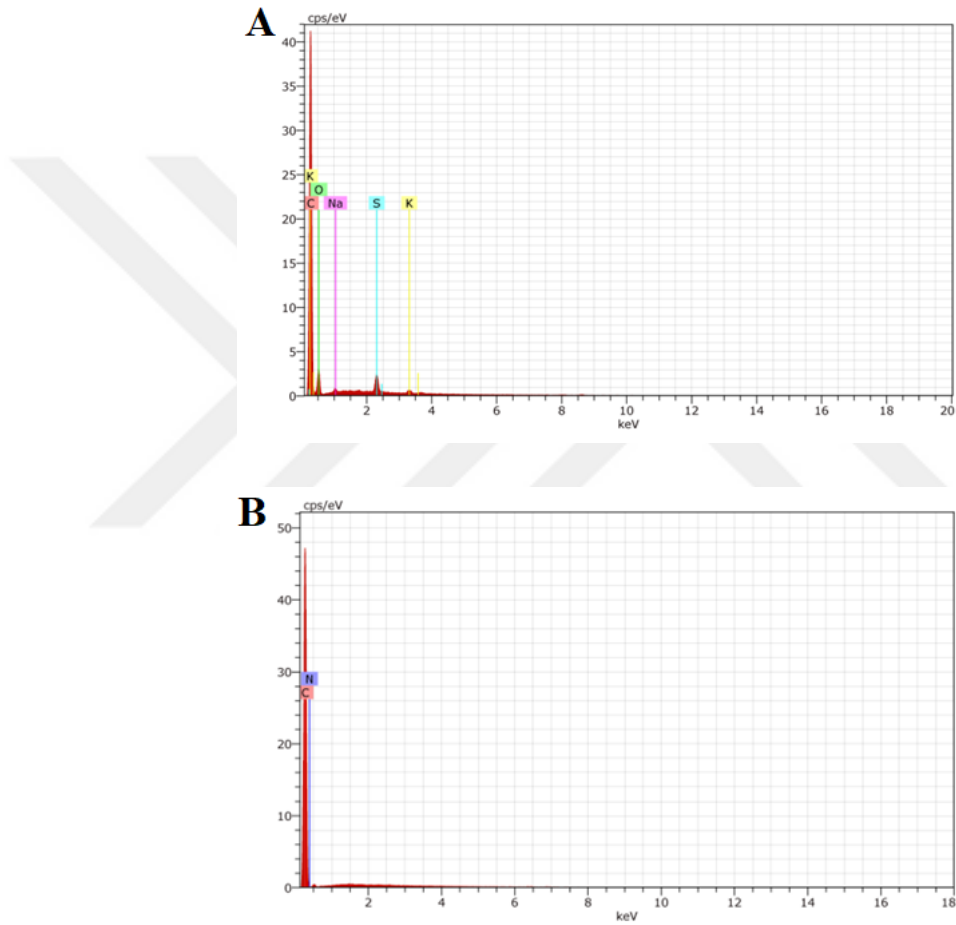
İnsan saçından elde edilen karbon malzeme (H) ve NH₂- MWCNT karbon malzemesi palboksiklib ile DNA etkileşim çalışmalarında elektrot modifikasyon malzemesi olarak birlikte kullanıldığı için söz konusu malzemelerin karakterizasyon sonuçları ve bu sonuçların yorumlanması aynı başlık altında sunulmuştur. Karakterizasyon sonuçları verilirken malzemelere konulan kısaltılmış kodlardan faydalanılmıştır.

4.1.1 SEM –EDX analiz sonuçları



Şekil 4.1 Modifikasyon malzemelerinin SEM görüntüleri A) NH₂- MWCNT B) H

Şekil 4.1 insan saçından elde edilen karbon malzemenin ve NH₂- MWCNT karbon malzemesinin SEM görüntüsünü içermektedir. Görüntüler incelendiğinde H malzemesinin çubuk morfolojisine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu yorumu destekleyebilmek için malzemenin TEM görüntüleride kaydedilmiş ve yorumlanmıştır. NH₂- MWCNT karbon malzemesi için elde edilen görüntülerden ise topaklanmadan kaynaklı olarak malzemenin morfolojisi hakkında yorum yapılamamıştır. Bu nedenle söz konusu malzeme içinde ayrıca TEM görüntüleri kaydedilip yorumlanmıştır.



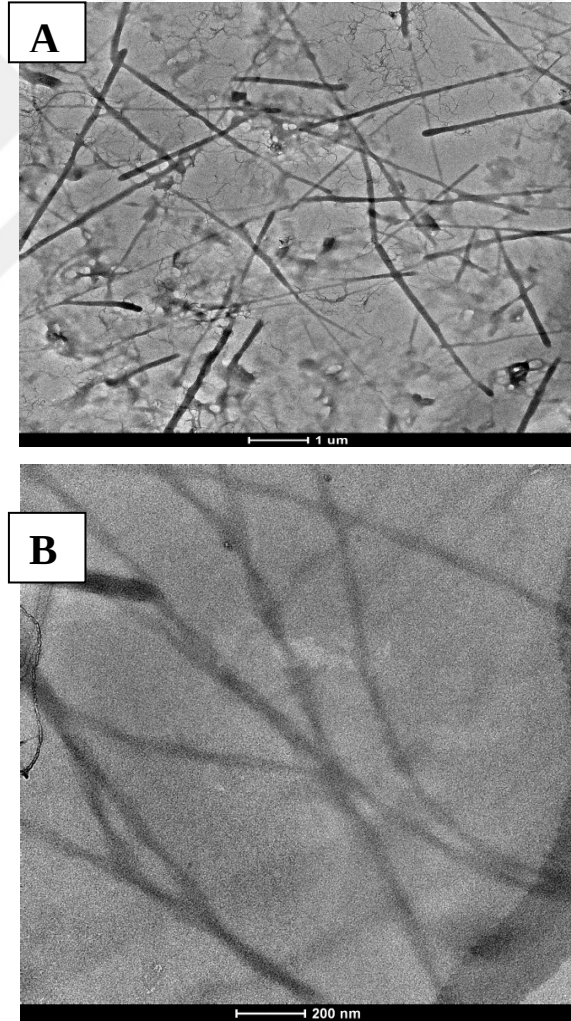
Şekil 4.2 Modifikasyon malzemelerinin EDX sonuçları A) H B) NH₂- MWCNT

Modifikasyon malzemelerinin EDX sonuçları incelendiğinde (**Şekil 4.2**) H malzemesinin içeriğinde sahip olduğu doğal yapıdan kaynaklı olarak özellik kükürt atomlarının varlığı dikkat çekmektedir. Ayrıca EDX sonuçlarında görülen % 61 C içeriği hidrotermal karbonizasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Tüm bunların yanında insan saçından elde edilen karbon malzeme

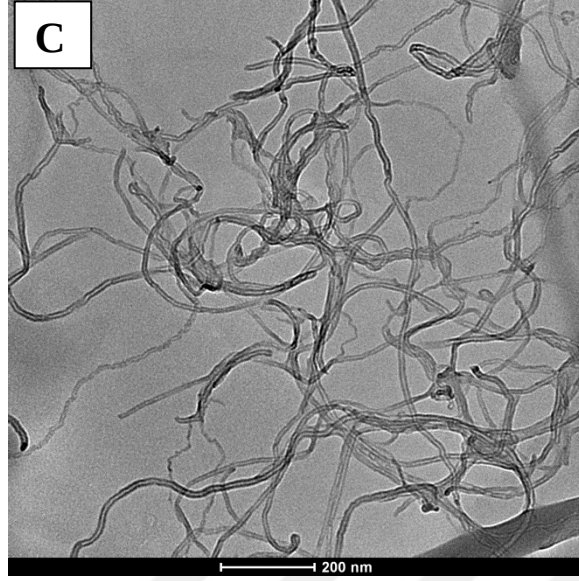
yapısında N atomlarını da içermektedir. XPS analiz sonuçları ise bu yorumu desteklemektedir. Fakat EDX analizi kısmi tarama şeklinde uygulandığı için N atomlarının bağıl bolluk yüzdesi analiz sonucunda gözlemlenememiştir. H malzemesi için verilen EDX sonuçlarında az miktarda (% 0,62) K atomunun gözlenme sebebi ise insan saçının karbonizasyonu işleminde aktivasyon maddesi olarak KOH kullanılmasından kaynaklı olabileceği öngörülmüştür.

EDX analiz sonuçları NH₂- MWCNT bakımından değerlendirildiğinde ise yaklaşık % 72 oranında C atomu ve % 27 oranında N atomunun var olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar XPS analiz sonuçları ile paralellik göstermiştir.

4.1.1 TEM analiz sonuçları



Şekil 4.3 Modifikasyon malzemelerinin TEM görüntüleri A) H ve NH₂- MWCNT B) H C) NH₂- MWCNT

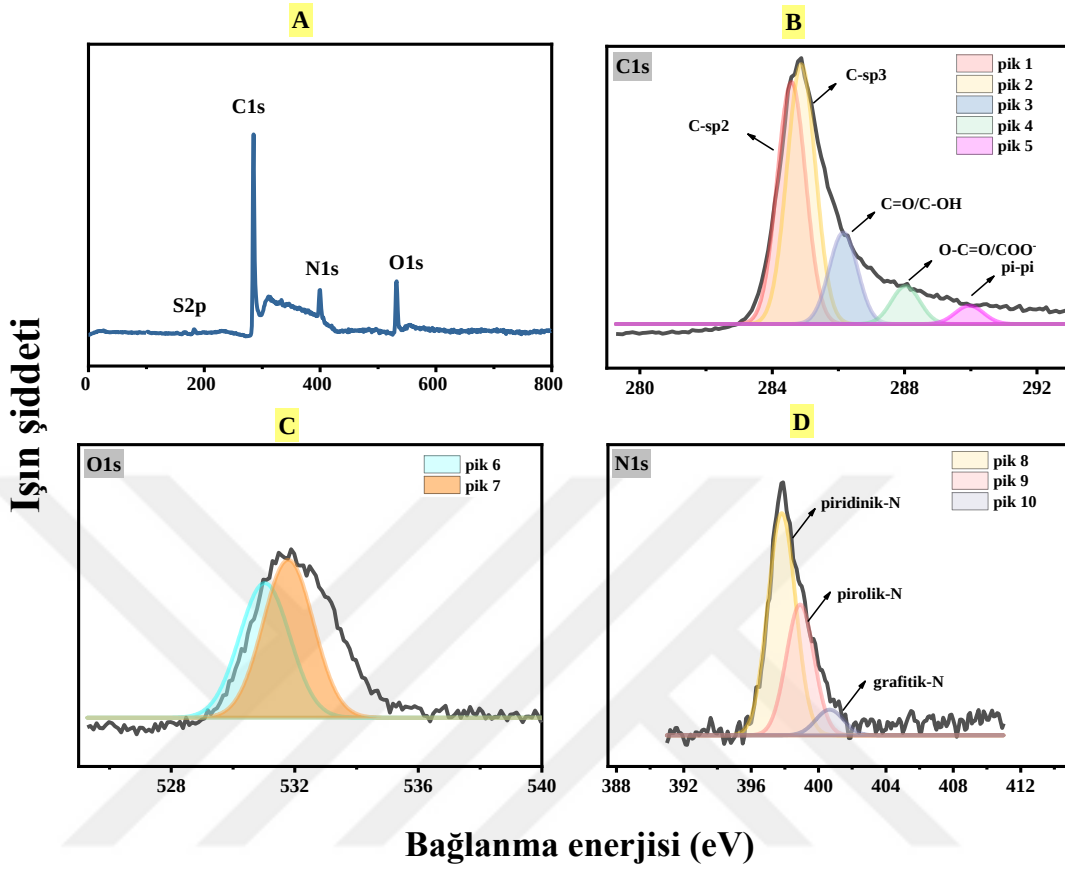


Şekil 4.3 Modifikasyon malzemelerinin TEM görüntüleri A) H ve NH₂- MWCNT B) H C) NH₂- MWCNT (devam)

TEM analizi malzemelerin yüzey morfolojisi hakkında bilgi edinilmesi açısından oldukça yararlı bir yöntemdir. **Şekil 4.3** her bir modifikasyon malzemesi için elde edilen yüzey görüntülerini içermektedir. Sonuçlar incelendiğinde H malzemesinin (**Şekil 4.3.b**) çubuk morfolojisine sahip olduğu görülmüştür. Malzemenin çubuk morfolojisine sahip olması yüzey alanının yüksek olduğunu desteklemektedir. Bu tip çubuk, yıldız, küre vb. morfolojiler hazırlanan malzemelerin yüksek yüzey alanına sahip olduğunun göstergesidir. Ayrıca H malzemesi hazırlanırken aktivasyon basamağında KOH aktivasyon maddesi kullanılmıştır. Genel olarak KOH aktivasyon maddesi malzemenin yüzey morfolojisine hasar vermektedir. Fakat **şekil 4.3.b'** de görüldüğü gibi H malzemesinin yüzeyinde belirgin bir hasar gözlemlenmemiştir. TEM görüntüleri aktivasyon basamağının başarılı bir şekilde uygulandığını göstermiştir.

Şekil 4.3.c, NH₂- MWCNT malzemesinin yüzey görüntüsünü göstermektedir. TEM analizi sonuçlarına göre NH₂- MWCNT modifikasyon malzemesinin “wrinkle” tipte morfolojiye sahip olduğu açıkça görülmüştür. **Şekil 4.3.a** ise her iki malzemenin fiziksel olarak birlikte var olduğu analiti göstermektedir. Sonuçlar incelendiğinde hem çubuk hem de sarmal morfolojisinin net bir şekilde tespit edilebildiği gözlenmiştir.

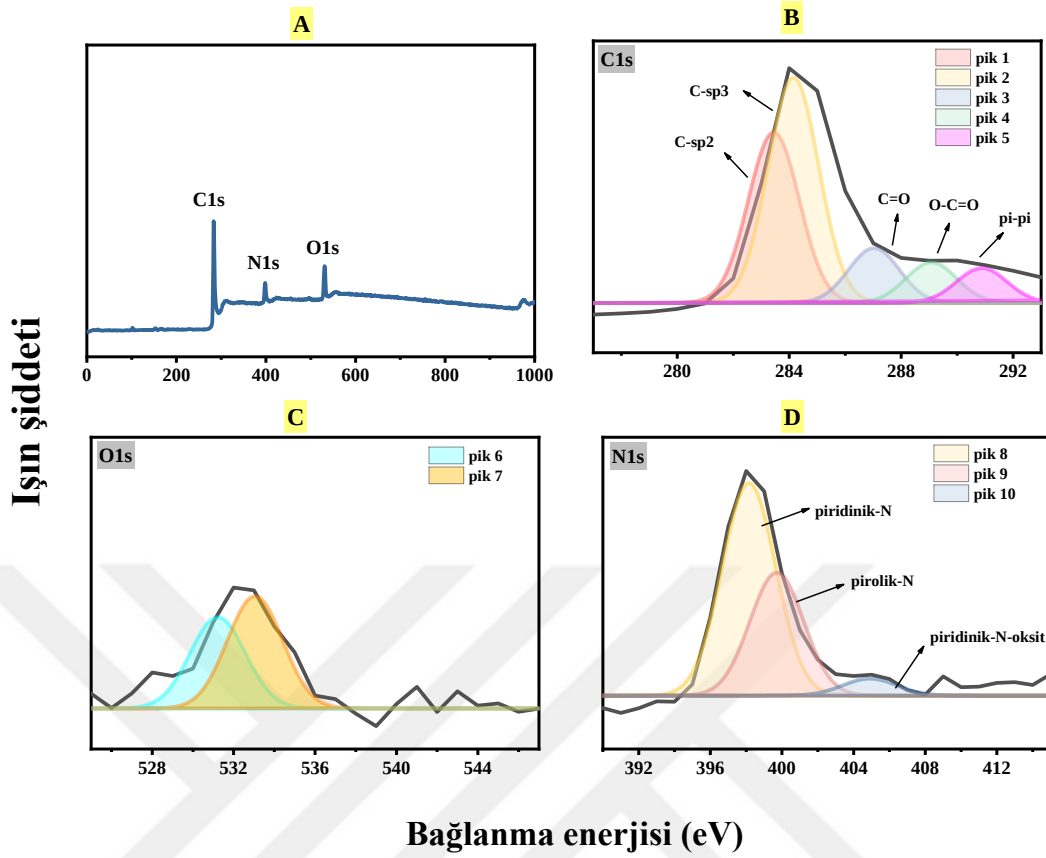
4.1.2 XPS analiz sonuçları



Şekil 4.4 H modifikasyon malzemesinin XPS spektrumları A) genel spektrum B) C1s spektrumu C) O1s spektrumu D) N1s spektrumu

XPS analizi hazırlanan malzemelerin yüzey kimyasının belirlenmesinde ve yüzeyde bulunan fonksiyonlu grupların varlığının tespit edilmesi bakımından oldukça kritik rol oynayan bir analiz tekniğidir. Malzemenin yüzeyinde bulunan fonksiyonlu gruplar malzemenin kullanılacağı uygulamanın türünün belirlenmesine yardımcı olur. **Şekil 4.4** H modifikasyon malzemesinin XPS analiz sonuçlarını göstermektedir. Spektrumlar (**Şekil 4.4.a**) detaylı bir şekilde incelendiğinde H malzemesinin belirgin bir şekilde sp^2 , C1s, O1s ve N1s geçişlerini içerdiği gözlemlenmiştir. **Şekil 4.4.b** C1s spektrumunu temsil etmektedir ve bu spektrum yüzeydeki karbon içeren fonksiyonlu gruplar hakkında bilgi vermektedir. C1s spektrumuna göre toplamda 5 dekonvule halde pik bulunmuştur. Bu piklerin bağlanma enerjileri sırasıyla; pik1: 284, 59- pik 2: 285, 08- pik 3: 286, 15- pik 4: 288, 04 ve pik 5: 289, 96 eV olarak belirlenmiştir. Bahsedilen

bağlanma enerjileri için pik 1 ve pik 2 sırasıyla sp^2 ve sp^3 hibritleşmelerini temsil etmektedir. Pik 3 ve pik 4 için verilen bağlanma enerjileri ise $C=O$ / $C-OH$ ve $O-C=O$ / COO^- gruplarına karşılık gelmektedir. Bahsedilen gruplar malzemeye hidrofilik karakter kazandırdığından dolayı malzemenin sulu çözeltideki dispersiyon performansını arttırmıştır. Son olarak pik 5 için elde edilen bağlanma enerjisi elektriksel iletkenlik için önemli olan π - π geçişlerini temsil etmektedir. O1s spektrumu incelendiğinde pik 6: 531, 03 eV ve pik 7: 532, 01 eV toplamda 2 spesifik pikin dekonvule olduğu açıkça görülmüştür. Buna göre pik 6 karboksil ve hidroksil gruplarına karşılık gelen tek bağlı oksijene karşılık gelirken pik 7 çift bağlı oksijene karşılık gelmektedir. H malzemesi içerdiği doğal azottan kaynaklı olarak N1s elektron geçişine sahiptir. N1s spektrumu için toplam 3 dekonvule pik olduğu gözlemlenmiştir. Bu pikler için bağlanma enerjileri sırasıyla pik 8: 397, 83- pik 9: 398, 92 ve pik10: 400, 67 eV olarak belirlenmiştir. Söz konusu pikler artan bağlanma enerjisi seviyesine göre sıralandığında sırasıyla piridinik-N, pirolitik-N ve grafitik-N geçişlerine karşılık gelmektedir. Tüm bu geçişler oksijen indirgeme reaksiyonunda (ORR) anahtar bir rol oynamaktadır. Azot atomunun farklı geçiş formlarının görece pik alanları yarı nitel inceleme yapabilmeye olanak verir. Bu farklı geçiş formlarının pik alan büyüklüklerine bakıldığında piridinik-N formun pik alanının çok daha geniş olduğu görülmüştür. Piridinik-N'un elektron verici/ alıcı özelliklerini büyük ölçüde etkilediği ve π - elektron geçişi sayesinde elektriksel iletkenliği iyileştirebileceği öngörülmüştür. Bu nedenle N1s geçişinde yer alan piridinik azot baskın elektriksel iletkenlik karakteriyle biyosensör uygulamalarında önemli bir fayda sağlamıştır.

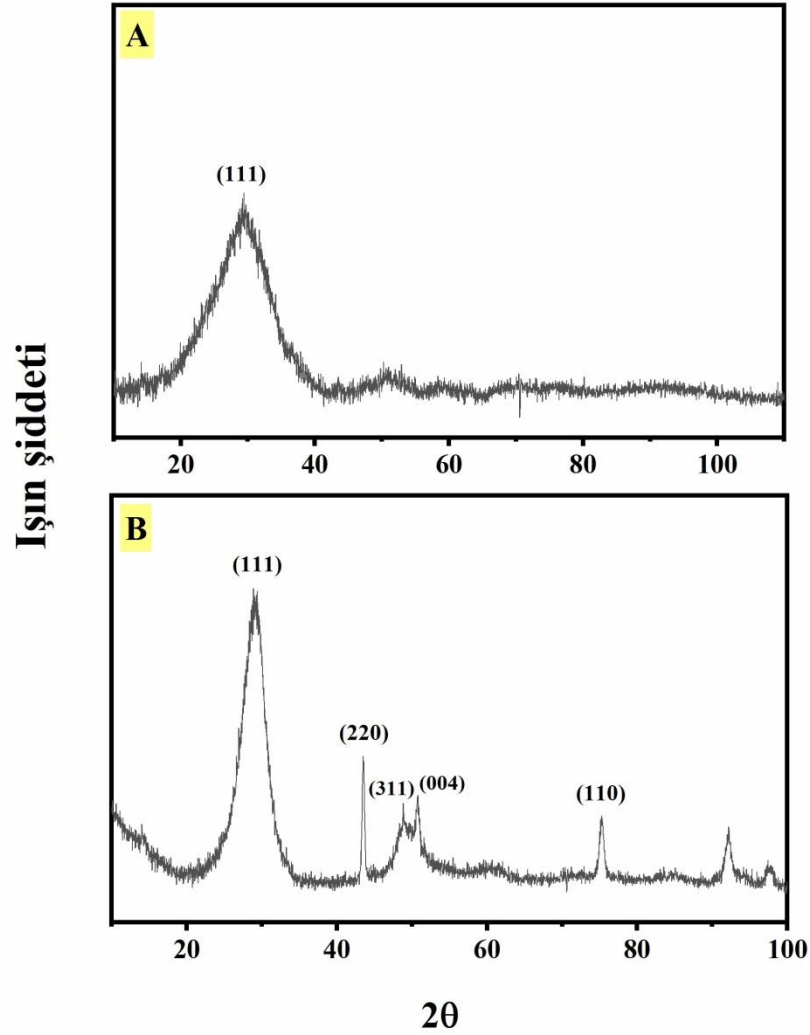


Şekil 4.5 NH₂- MWCNT modifikasyon malzemesinin XPS spektrumları A) genel spektrum B) C1s spektrumu C) O1s spektrumu D) N1s spektrumu

Şekil 4.5 NH₂- MWCNT modifikasyon malzemesinin XPS analiz sonuçlarını göstermektedir. **Şekil 4.5.a** malzeme için alınan tüm XPS spetrumunun C1s, O1s ve N1s geçişlerini içerdiği görülmektedir. **Şekil 4.5.b** C1s spektrumunun toplam 5 dekonvule pikten meydana geldiğini göstermiştir. Bu piklerin bağlanma enerjileri sırasıyla; pik 1: 283, 45- pik 2: 284, 15- pik 3: 287, 03- pik 4: 289, 09 ve pik 5: 290, 83 eV olarak belirlenmiştir. Pik 1 sp² ve pik 2 sp³ hibritleşmelerini temsil etmektedir. Pik 3, pik 4 ve pik 5 için verilen bağlanma enerjileri ise sırasıyla C=O, O-C=O ve pi-pi geçişlerinin varlığını göstermektedir. NH₂- MWCNT modifikasyon malzemesi için O1s spektrumu incelendiğinde pik 6: 531, 22 eV ve pik 7: 533, 06 eV toplamda 2 spesifik pikin dekonvule olduğu sonucuna varılmıştır. Buna göre pik 6 karboksil ve hidroksil gruplarına karşılık gelen tek bağlı oksijene karşılık gelirken pik 7 çift bağlı oksijene karşılık gelmektedir. NH₂- MWCNT içerdiği amin fonksiyonlu grubundan kaynaklı olarak N1s elektron geçişini içermektedir. N1s spektrumu için toplam 3 dekonvule pikin

bulunduğu açıkça görülmüştür. Bu pikler için bağlanma enerjileri sırasıyla pik 8: 398, 16- pik 9: 399, 72- pik 10: 404, 90 eV olarak belirlenmiştir. Söz konusu pikler artan bağlanma enerjisi seviyesine göre sıralandığında sırasıyla piridinik- N, pirolitik- N ve piridinik-N-oksit geçişlerine karşılık gelmektedir. Bu farklı geçiş formlarının pik alan büyüklüklerine bakıldığında piridinik- N formunun pik alanının pirolitik- N ve piridinik-N- oksit pik alanlarından çok daha geniş olduğu görülmüştür. Fakat NH₂- MWCNT malzemesinin N1s spektrumu ile H malzemesinin N1s spektrumu kıyaslandığında piridinik- N formunun pik alanının çok daha geniş olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum H malzemesinin ORR aktivitesinin çok daha iyi olduğunu göstermiştir.

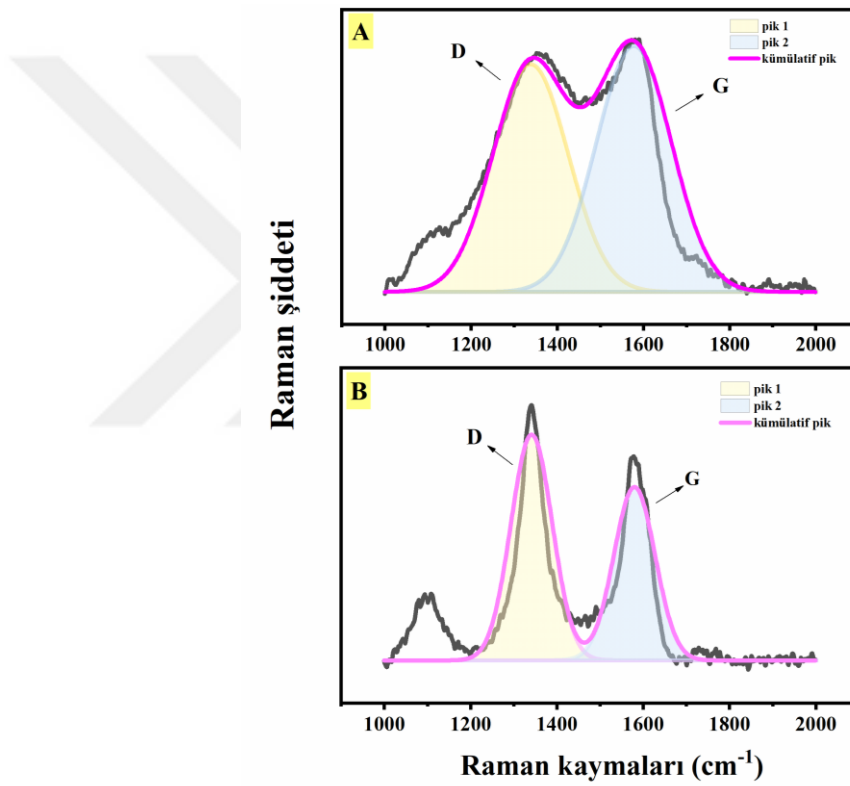
4.1.3 XRD analiz sonuçları



Şekil 4.6 Modifikasyon malzemelerinin XRD kırınım desenleri A) H ve B) NH₂-MWCNT

Modifikasyon malzemelerinin fazı ve yapısı XRD kırınım desenleri aracılığıyla incelenmiştir. **Şekil 4.6'**da NH₂- MWCNT malzemesinin XRD kırınım desenleri yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde 26° (111) civarındaki pik noktası amorf bölgelere karşılık gelmekle (Zhang vd. 2018) birlikte **şekil 4.6.a'**da bu pik H malzemesi oldukça geniş gözlemlenmiştir. Öte yandan 43,9, 52,1, 53,5 ve 77,5 civarındaki 2θ açıları **şekil 4.6.b'**de gösterildiği gibi sırasıyla (220), (311), (004) ve (110) pik noktalarına karşılık gelmiştir.

4.1.4 RAMAN analizi sonuçları

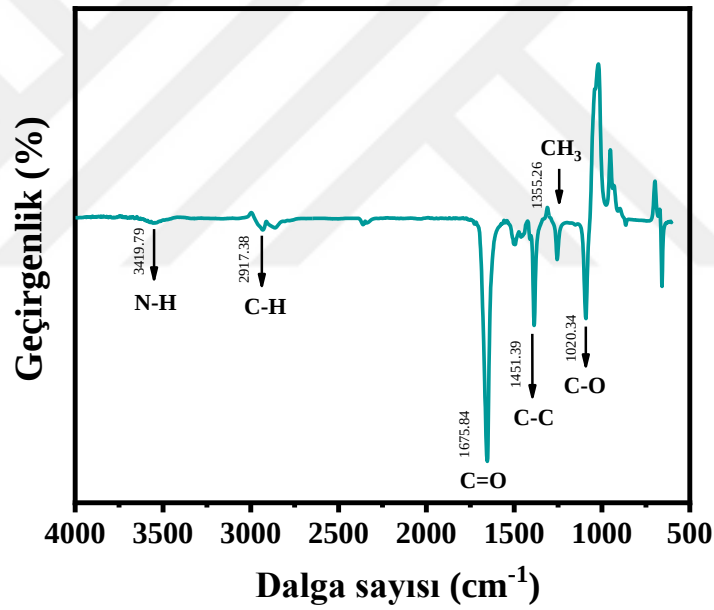


Şekil 4.7 Modifikasyon malzemelerinin Raman kaymaları A) H ve B) NH₂- MWCNT

Raman analizi özellikle karbon malzemelerin mekanik ve elektronik özelliklerini aydınlatmak amacıyla kullanılan önemli bir analiz tekniğidir. Raman kaymaları yorumlandığında grafitizasyon derecesine bağlı olarak malzemenin elektriksel iletkenliği hakkında yorumlamalar yapılmaktadır. Grafitizasyon derecesi arttıkça malzemenin elektronik özelliklerinde iyileşmeler olduğu kabul edilmektedir. Karbon malzemelerin Raman kaymaları incelendiğinde, düşük frekans aralığında elde edilen

sinyalin iki tür spesifik band sergilediği gözlemlenmektedir. Bu bantlara G- grafitik bant ve D- bozukluk bandı adı verilir. G bandı (570 cm^{-1} ve 1600 cm^{-1}), sp^2 karbon atomlarının düzlem içi bağ germe hareketi ile ilgilidir. Benzen halkalarında veya kısmen düzensiz/hidrojene amorf karbon malzemelerde halkada bulunan titreşimler 1330 cm^{-1} ile 1360 cm^{-1} (D bandı) arasında bir pik noktası verir. Analiz sonuçları (Şekil 4.7), tüm numuneler için D ve G bantlarının ölçüldüğünü kanıtlamaktadır. ID ve IG bantlarının genişliği ve oranı, numuneler için grafitleşme derecesinin hesaplanmasına olanak verir. Yukarıda bahsedilen oranın sayısal büyüklüğü, daha düşük bir grafitleşme derecesinin göstergesidir (Bilge vd. 2020).

4.1.5 FT-IR analiz sonuçları

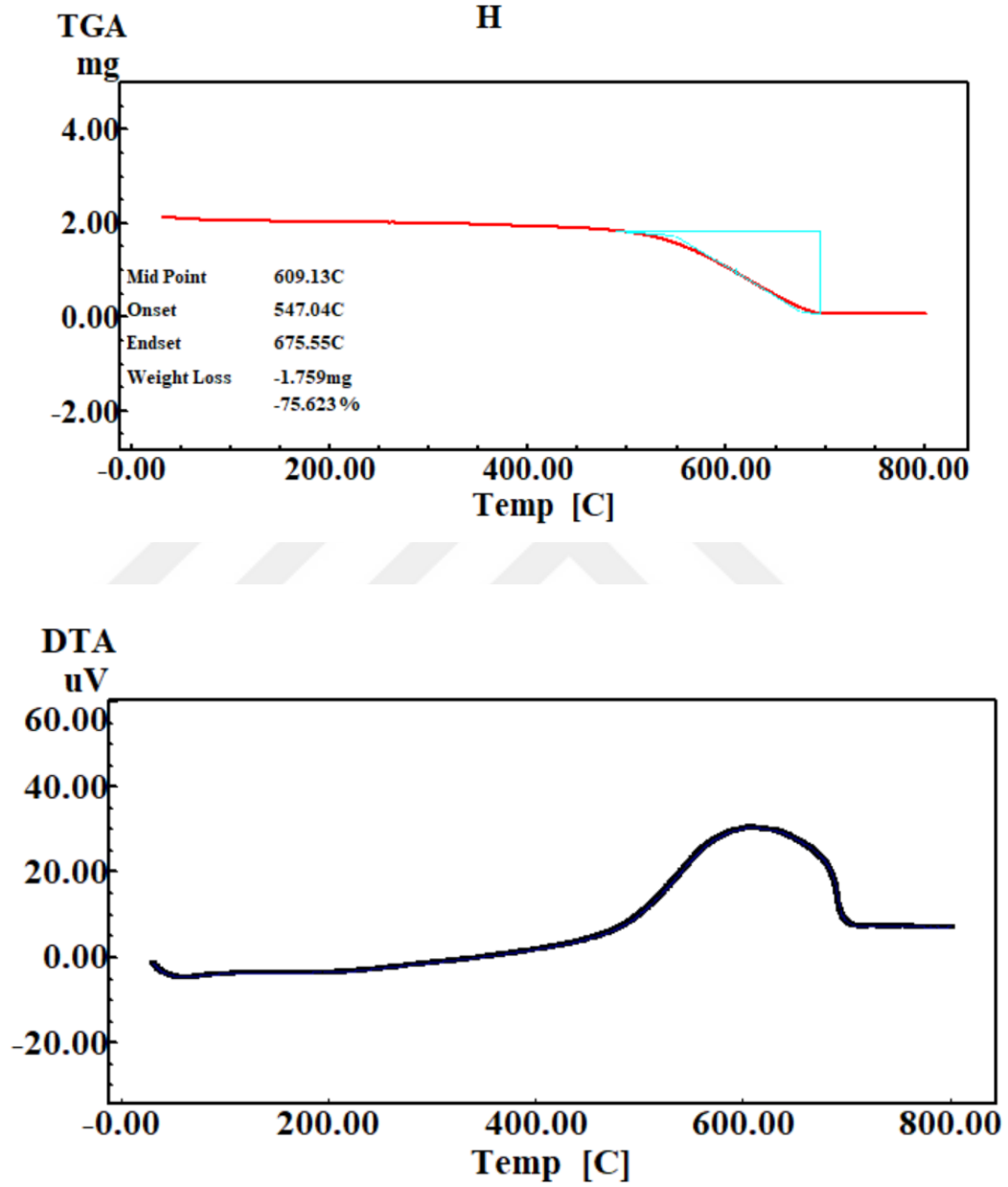


Şekil 4.8 H malzemesi için elde edilen FT-IR spektrumu

Şekil 4.8 insan saçından elde edilen karbonun FT-IR analiz sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlara göre $3419, 79\text{ cm}^{-1}$ 'deki moleküler titreşimler N-H bağlarını, $2917, 38$ ve $1675, 84\text{ cm}^{-1}$ deki titreşimler ise sırasıyla C-H ve C=O bağlarının varlığını göstermektedir. C=O bağları, elektrooksidasyonda anahtar rol oynayan karboksil ve kinon gruplarının varlığını gösterir. Ayrıca $1451, 39, 1355, 26$ ve $1020, 34\text{ cm}^{-1}$ 'deki

moleküler titreşimler sırasıyla C-C, CH₃ ve C-O bağlarının varlığını gösterir (Gökdağ vd. 2010). Sonuç olarak, FT-IR analiz sonuçları XPS yorumlarını desteklemektedir.

4.1.6 Termogravimetrik analiz sonuçları



Şekil 4.9 Modifikasyon malzemesi H için TG ve DT eğrileri

İnsan saçından elde edilen karbon için TG eğrileri (Şekil 4.9) incelendiğinde, eğrilerin tip- 3 karakterde olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar, 500- 700 °C sıcaklık aralığında %75, 62'lik bir kütle kaybı ile paralellik göstermiştir (Şekil 4.9). Bu sonuçlara göre,

karbon malzemenin yaklaşık 500 °C sıcaklığa kadar termal bakımdan kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. DT analizi, ısıtma-soğutma sırasında malzeme ile referans arasındaki sıcaklık farkının ölçülmesine dayanmaktadır. DT analizi ayrıca malzemenin ekzotermik karaktere sahip olduğunu göstererek TGA sonuçlarını desteklemiştir. Sonuç olarak, termal analiz sonuçları, sentezlenen malzemenin bir elektrot modifikasyon malzemesi olarak oldukça kararlı olduğunu kanıtlamıştır.

4.1.7 BET analiz sonuçları

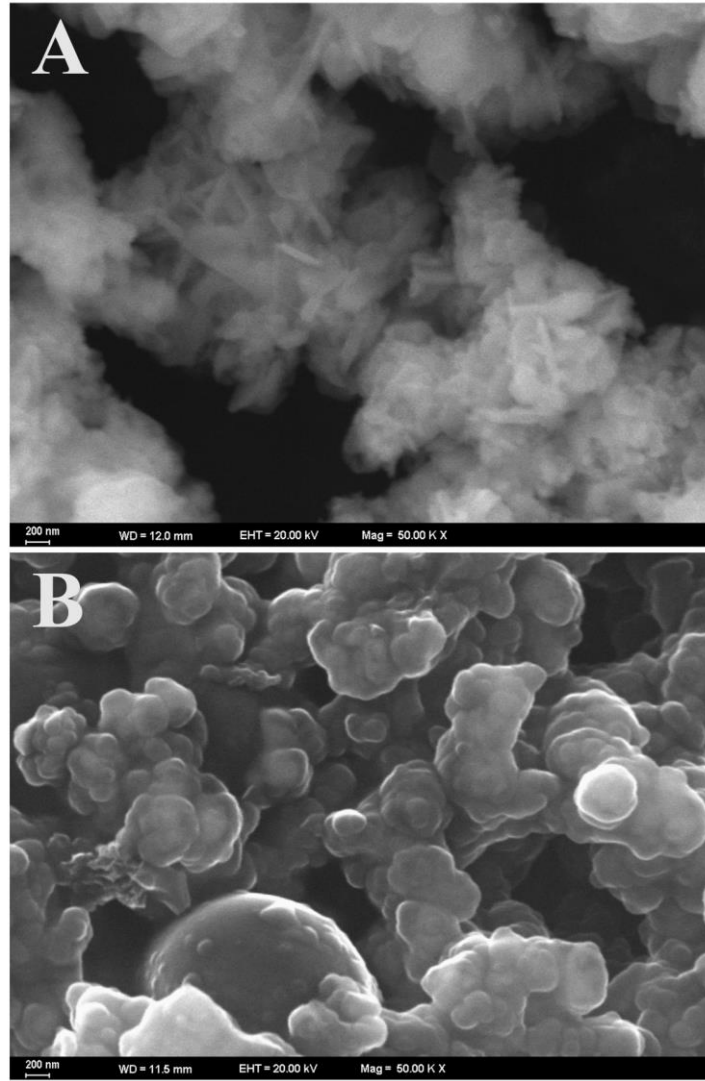
Sentezlenen karbon malzemenin yüzey alanı yapılan BET analizi sonucunda 115, 78 m²g⁻¹ olarak bulunmuştur.

4.2 M ve CuO Elektrot Modifikasyon Malzemelerinin Karakterizasyonu

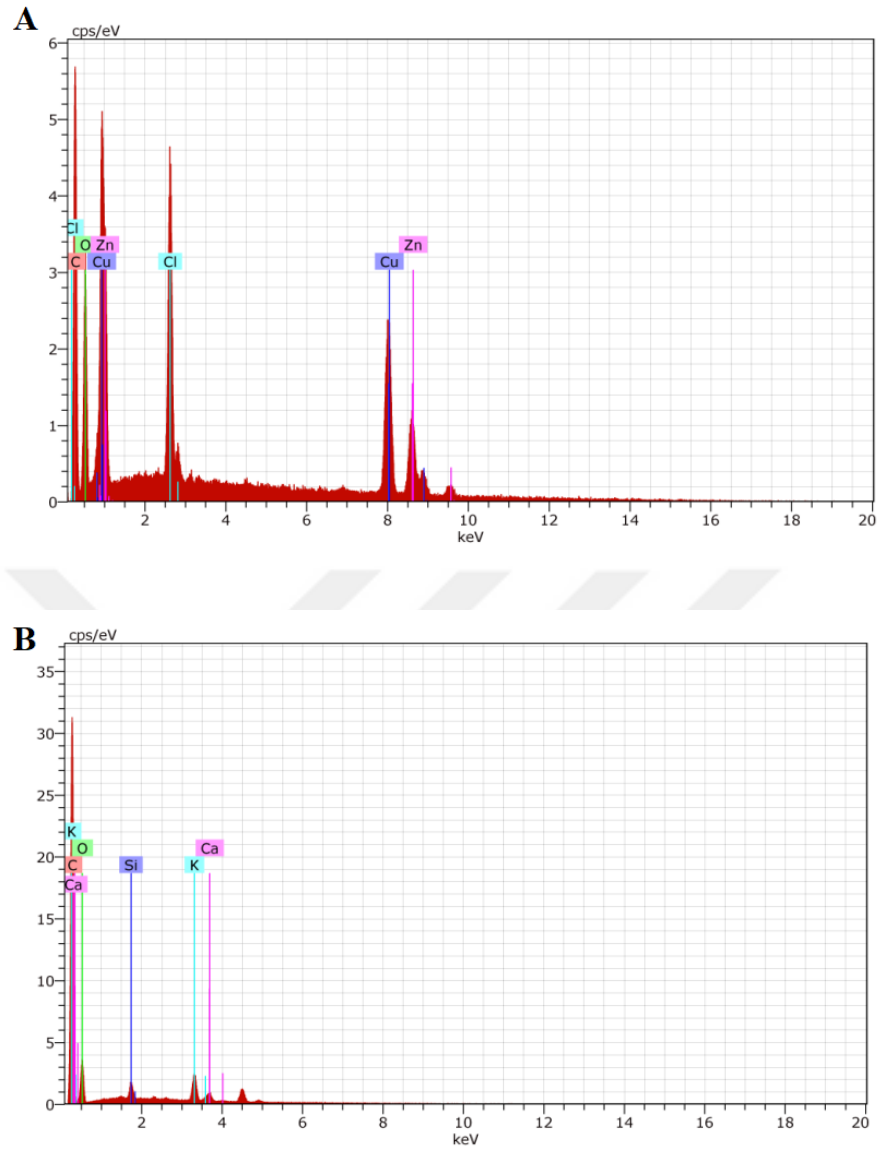
Atık maskeden elde edilen karbon malzeme (M) ve CuO nanoparçacıklar pazopanib'in biyolojik ortamlarda tayini nanosensör çalışmalarında elektrot modifikasyon malzemesi olarak birlikte kullanıldığı için söz konusu malzemelerin karakterizasyon sonuçları ve bu sonuçların yorumlanması aynı başlık altında sunulmuştur. Karakterizasyon sonuçları verilirken malzemelere konulan kısaltılmış kodlardan faydalanılmıştır.

4.2.1 SEM –EDX analiz sonuçları

Elde edilen malzemelerin SEM görüntüleri **Şekil 4.10**'da gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde atık maskeden elde edilen karbon malzemenin (M) morfolojisinin topaklanma nedeniyle net gözlemlenemediği göstermiştir. Bununla birlikte, **şekil 4.10.a**'da CuO nanoparçacıklarının çubuk benzeri bir yapıya sahip olduğu açıkça görülmüştür.



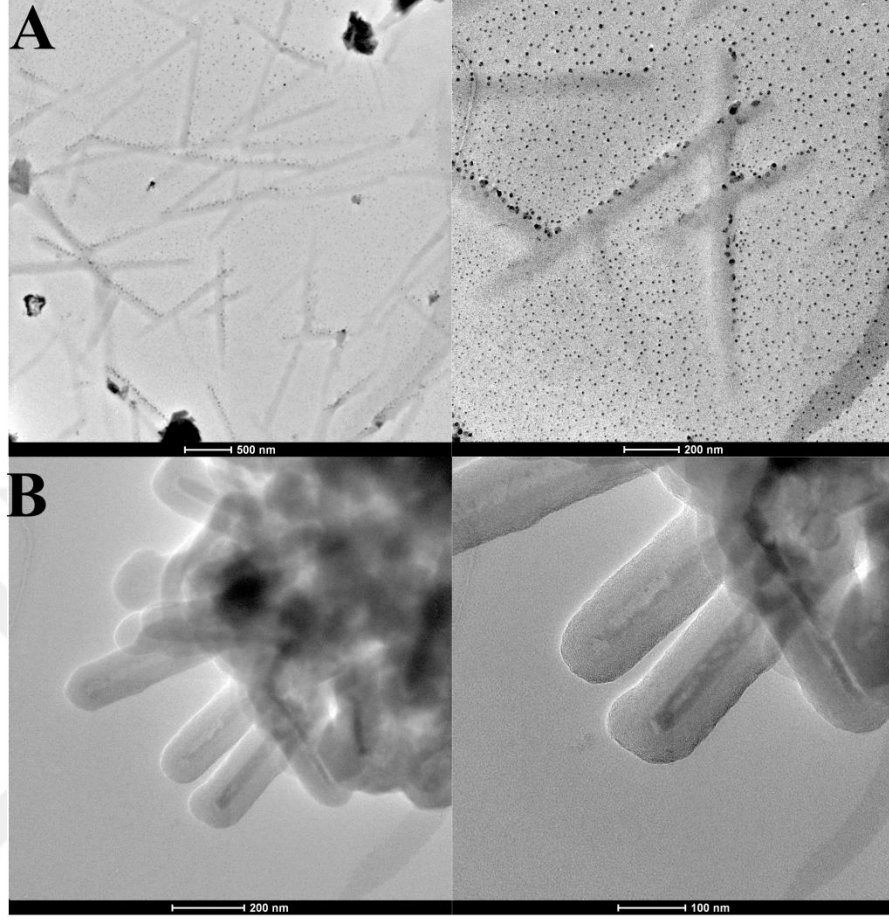
Şekil 4.10 Modifikasyon malzemelerinin SEM görüntüleri A) CuO nanoparçacıklar, B) atık maskeden elde edilen karbon (M)



Şekil 4.11 Modifikasyon malzemelerinin EDX sonuçları A) CuO B) M

EDX sonuçları **şekil 4.11**'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, CuO nanoparçacıkları için karakteristik bir Cu piki açıkça gözlemlenmektedir. Ayrıca aktivasyon işleminde KOH kullanılması nedeniyle M numunesinde K pikinin olduğu belirlenmiştir. Ek olarak karbon malzemede Ca ve Si eşit dağılımla tespit edilmiştir. Son olarak, EDX sonuçları, HTC işleminden sonra atık maskelerin yaklaşık % 50'sinin (ağırlıkça) karbonize olduğunu göstermektedir.

4.2.2 TEM analiz sonuçları

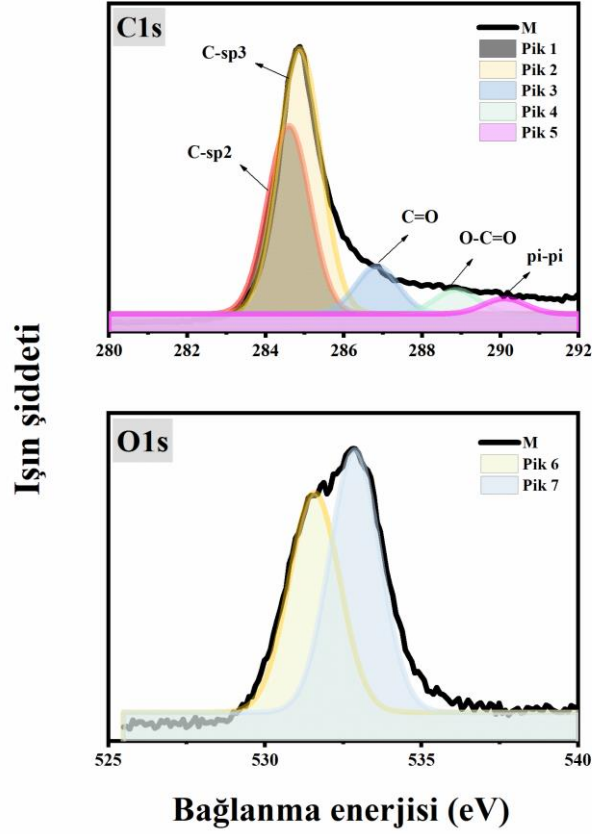


Şekil 4.12 Modifikasyon malzemelerinin TEM görüntüleri A) CuO nanoparçacıklar (500 nm and 200 nm), B) atık maskeden elde edilen karbon (M) (200 nm and 100 nm)

Elde edilen malzemelerin TEM görüntüleri **şekil 4.12**'de gösterilmiştir. **Şekil 4.12.a** CuO nanoparçacıklarının koyu renkli küresel çekirdekli bir yapıya sahip olduğunu ve çubuk şekilli morfolojiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Sentezlenen CuO nanoparçacıklarının 1- 2 μm uzunluğunda ve 75- 100 nm çapında çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir. CuO malzemesinin spesifik ve düzenli bir yapıya sahip olması, elektrokimyasal yükseltgenme sürecinde tekrarlanabilirliği yüksek sonuçların elde edilmesini sağlamıştır. **Şekil 4.12.b**, atık maskelerden sentezlenen karbon malzemenin parmak benzeri bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca malzeme, tıpkı CuO nanoparçacıkları gibi çubuk benzeri bir çekirdek yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Karbon malzemenin çekirdek-kabuk yapısı, elektrik iletkenliğini artıran kritik bir

özelliştir çünkü bu yapı, çözeltideki elektron transfer hızında bir artışa neden olmaktadır.

4.2.3 XPS analiz sonuçları

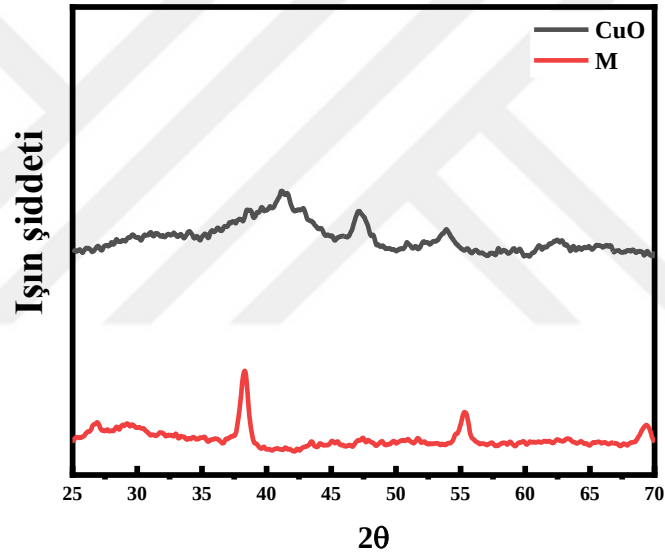


Şekil 4.13 M modifikasyon malzemesinin XPS spektrumları (C1s ve O1s spektrumları)

Daha önceki bölümlerde ifade edildiği gibi hidrotermal karbonizasyon işlemi sonucunda elde edilen karbon malzeme önemli fonksiyonel grupları içermektedir. Bu fonksiyonel gruplar sadece karbon malzemenin fonksiyonel özelliklerini değil, aynı zamanda malzemenin hangi uygulamalara katkıda bulunabileceğini de göstermektedir. Malzeme yapısında önemli bazı fonksiyonel grupların varlığı, malzemenin karakterini büyük ölçüde etkilemektedir. Atık maskelerden elde edilen karbon malzemenin C1s ve O1s için elde edilen XPS spektrumları **şekil 4.13**'de gösterilmiştir. Sentezlenen malzeme için C1s spektrumu incelendiğinde toplam beş sinyalin dekonvole olduğu görülmüştür. Bu beş sinyal 284, 6 eV (pik 1), 285, 7 eV (pik 2), 287, 3 eV (pik 3), 289, 1 eV (pik 4) ve

291, 1 eV (pik 5) olarak belirlenmiştir. Bu piklerin **şekil 4.13**'de gösterilen bazı fonksiyonel gruplara karşılık geldiği öngörülmüştür. Pik 5, π - π^* geçişini temsil etmektedir ve karbon iskeletinin yoğunlaştırılmış aromatik bir yapıdan oluştuğunu kanıtlamaktadır. Bu aromatik yapı, karbon malzemenin elektriksel iletkenliğini sağlayan özelliklerden biridir. Çünkü π - π^* geçişleri, karbon malzemenin elektron transferini etkileyen kritik parametrelerdendir. Ayrıca bu malzeme için O1s spektrumu incelendiğinde toplamda iki sinyalin dekonvule olduğu görülmüştür. Bu iki sinyal sırasıyla 532, 1 eV (pik 6) ve 533, 1 eV (pik 7) olarak belirlenmiştir (Bilge vd. 2019).

4.2.4 XRD analiz sonuçları

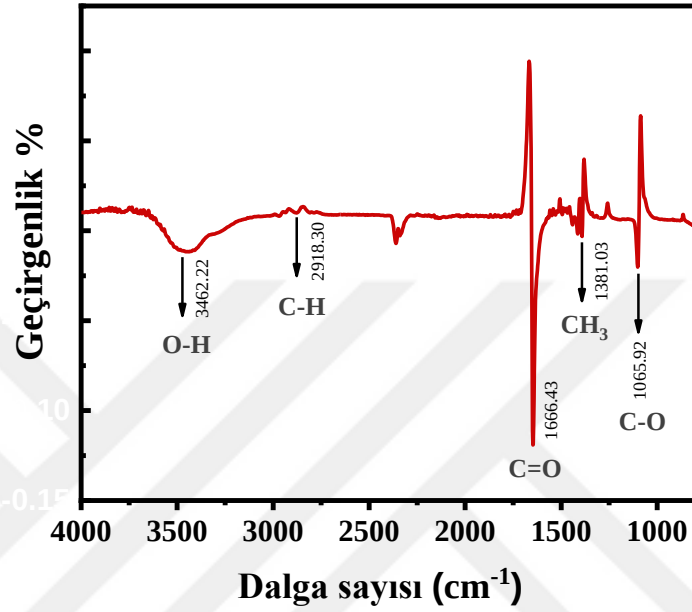


Şekil 4.14 Modifikasyon malzemelerinin XRD kırınım desenleri (CuO ve M)

Sentezlenen malzemelerin kristal yapıları ve faz tanımlamaları XRD analiz tekniği ile aydınlatılmıştır. CuO nanoparçacıklarının ve karbon malzemesinin XRD desenleri **şekil 4.14**'de gösterilmiştir. CuO nanoparçacıklarının karakteristik piklerinin hafif kayma gösterdiği gözlemlenmiştir. XRD modellerinde pik genişlemesi, sentezlenen malzemelerin küçük bir boyuta sahip olduğunu göstermektedir. CuO nanoparçacıklarının XRD desenleri incelendiğinde piklerin oldukça geniş olduğu görülmüştür. Bu bulgu, CuO nanoparçacıklarının küçük bir boyuta sahip olduğunu desteklemektedir (Borgohain vd. 2000). Ayrıca sentezlenen CuO nanoparçacıklarının

XRD desenleri, malzemenin tek fazlı monoklinik yapıya sahip olduğunu desteklemektedir (JCPDS 80- 1268) (Zhang vd. 2021) .

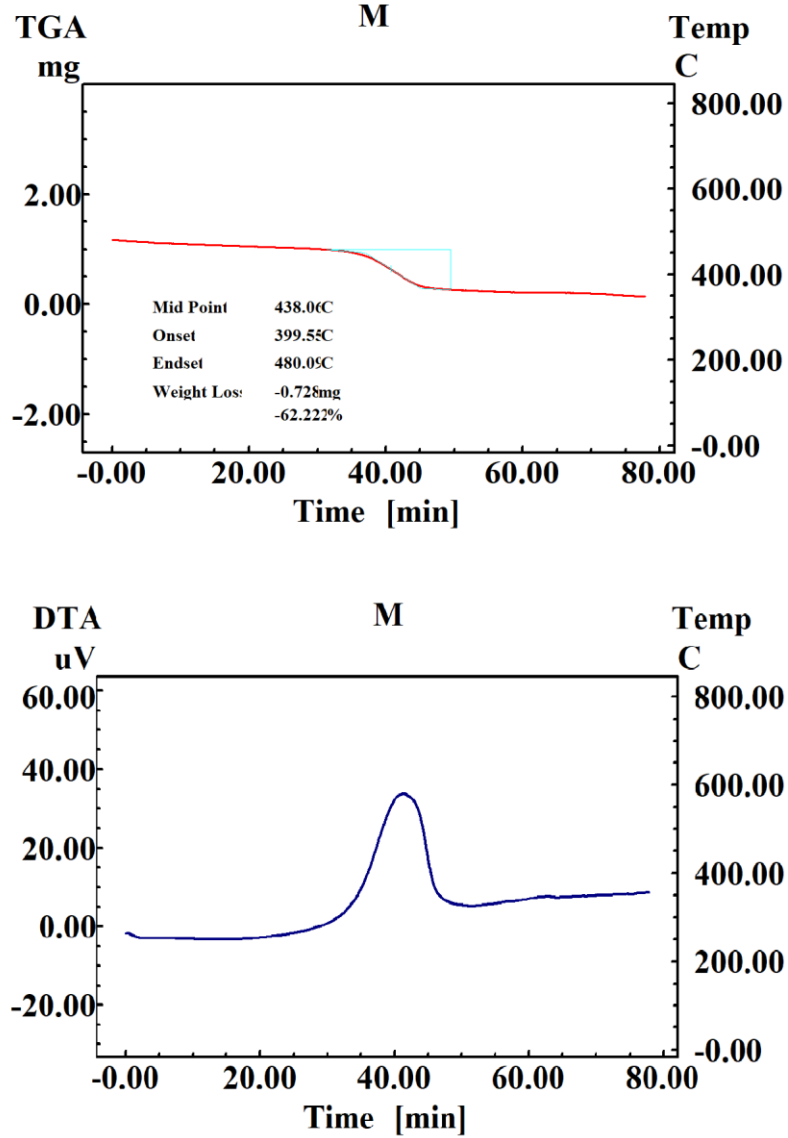
4.2.5 FT-IR analiz sonuçları



Şekil 4.15 M malzemesi için elde edilen FT-IR spektrumu

Şekil 4.15 Atık maskelerden elde edilen karbon malzemenin FT-IR analiz sonuçlarını göstermektedir. Genel olarak 1000- 1500 cm^{-1} aralığındaki moleküler titreşimler, hidroksil, eter ve ester gibi C-O bağlarına sahip bileşenleri temsil etmektedir. 1600- 1710 cm^{-1} aralığındaki titreşimler ise elektrokimyasal yükseltgenme için büyük öneme sahip C=O bağı bulunan kinon ve karboksil bileşiklerini temsil etmektedir. Ayrıca 2900- 3000- 3700 cm^{-1} ’lık titreşim aralıkları, sırasıyla hidroksil veya karboksil bileşiklerine karşılık gelen alifatik, C - H ve O - H bağlarını göstermektedir (Gökdağ vd. 2010).

4.2.6 Termogravimetrik analiz sonuçları



Şekil 4.16 Modifikasyon malzemesi M için TG ve DT eğrileri

Atık maskelerden elde edilen karbon malzeme (M) için TGA sonuçları, karbon malzemenin tip- 3 eğrisine sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4 16). Tip- 3 eğrisi aynı zamanda tek kademeli kütle kaybının varlığının bir göstergesidir. Sonuçlar, 399-480 °C sıcaklık aralığında % 69,22'lik bir kütle kaybı ile paralellik göstermiştir. Ayrıca DTA sonuçları, karbon malzemenin sıcaklığın artmasıyla ekzotermik reaksiyon gösterme eğilimi olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlara göre karbon malzemenin yaklaşık 400 °C sıcaklığa kadar termal olarak kararlı özellik gösterdiği görülmüştür.

Elde edilen analiz sonuçlarına dayanılarak çalışmalarda kullanılan elektrot modifikasyon malzemesinin termal olarak oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir. Karbon malzeme termal olarak kararlı olduğu için elektrot yüzeyinde uzun süre yenilenmeden kullanılabilmiş ve tekrarlanabilir sinyaller elde edilmiştir (Gökdağ vd. 2010).

4.2.7 BET analiz sonuçları

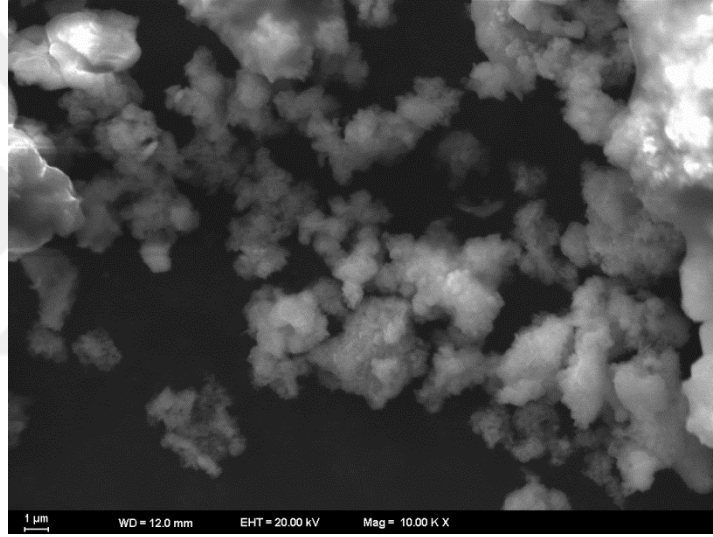
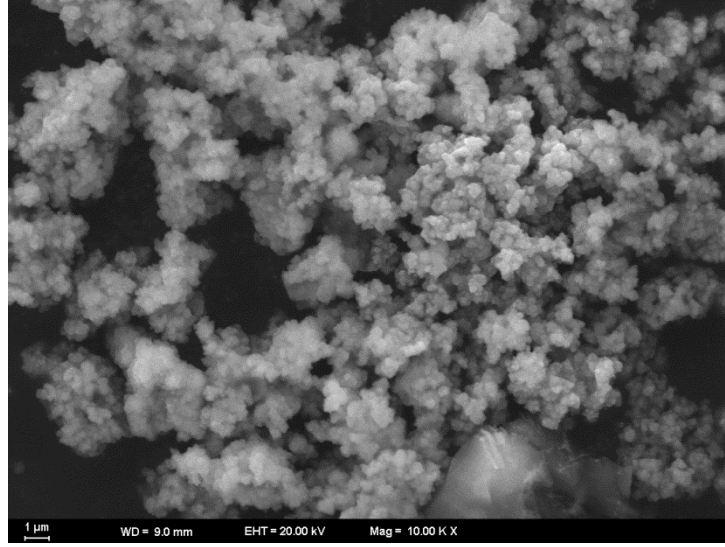
Sentezlenen M karbon malzemesinin ve CuO nanoparçacıkların yüzey alanı yapılan BET analizi sonucunda sırasıyla 87, 20 m²g⁻¹ ve 23, 46 m²g⁻¹ olarak bulunmuştur. Özellikle CuO nanoparçacıklarının yüzey alanı değerlerinin oldukça yüksek olması modifikasyon malzemesi olarak etkili olduğunu göstermiştir.

4.3 SnO₂ Elektrot Modifikasyon Malzemesinin Karakterizasyonu

Bu başlık kapsamında analizi gerçekleştirilen SnO₂ nanoparçacıklar pazopanib'in DNA ile etkileşme çalışmalarında geliştirilen nanobiyosensör tasarımında atık maskeden elde edilen karbon malzeme ile beraber kullanılmıştır. Söz konusu malzemelerden M'nin karakterizasyonu, 4.2 kısmında ayrıntılı olarak verildiği için bu başlık kapsamında ilgili açıklamalara yer verilmemiştir. Karakterizasyon sonuçları verilirken malzemelere konulan kısaltılmış kodlardan faydalanılmıştır.

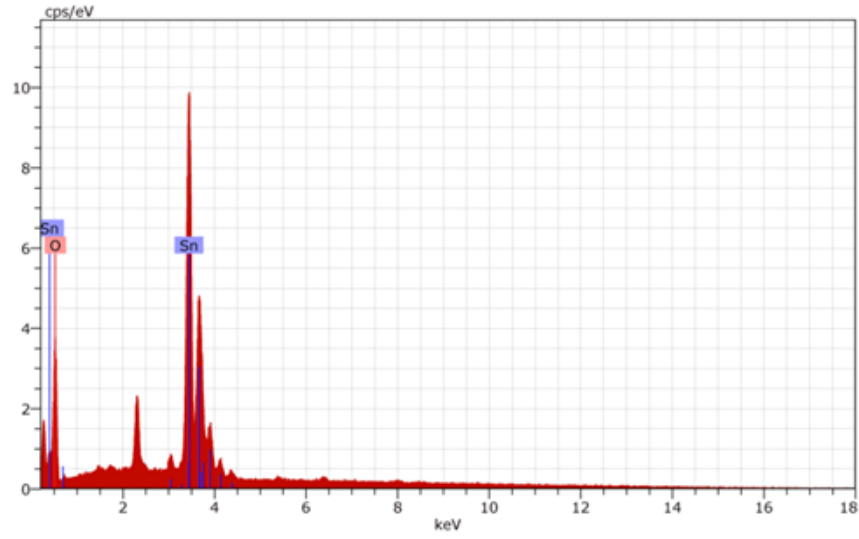
4.3.1 SEM –EDX analiz sonuçları

Hidrotermal sentez yöntemi aracılığıyla sentezlenen nanoparçacıkların SEM görüntüleri **şekil 4.17'**de verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde SnO₂ nanoparçacıkların “küresel” şekle sahip olduğu açıkça görülmüştür. Genel olarak SEM analiz tekniği nanoparçacıkların disperse edildikleri çözelti içerisinde toplanmasından kaynaklı olarak morfolojik yapı belirlenmesinde çok faydalı olmasa da SnO₂ nanoparçacığı farklı bölgelerden alınan görüntüleri küresel morfoloji hakkında fikir vermiştir.



Şekil 4.17 SnO₂ modifikasyon malzemesinin SEM görüntüleri (10.00 kx)

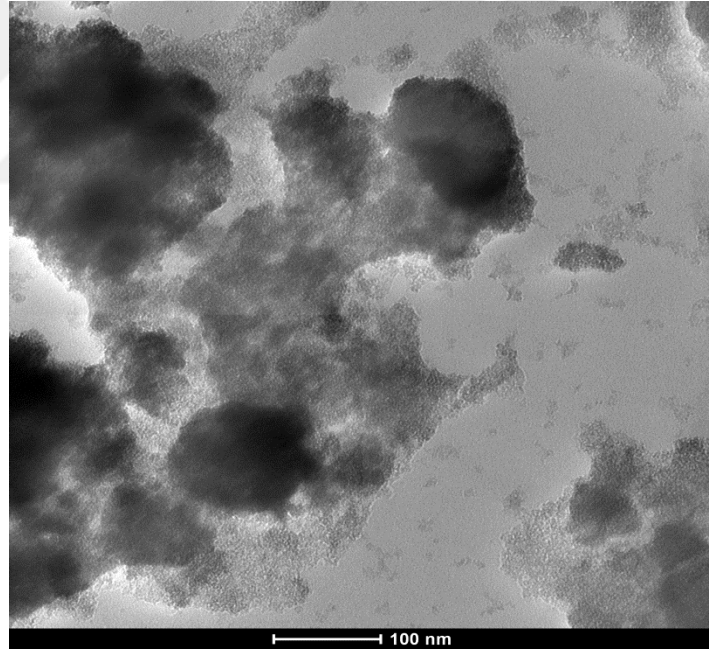
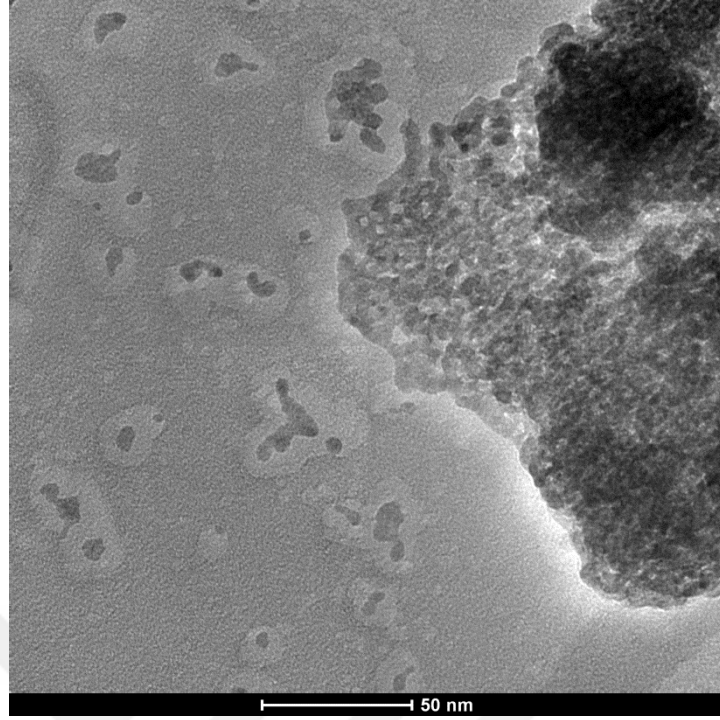
SnO₂ modifikasyon malzemesi için EDX sonuçları **şekil 4.18**'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, SnO₂ nanoparçacıkları için karakteristik bir Sn piki % 54 oranında açıkça gözlemlenmiştir. EDX sonuçları nanoparçacıkların parçacığın sahip olduğu karakteristik elemanın varlığına bağlı olarak başarılı şekilde sentezlendiğini göstermiştir.



Şekil 4.18 SnO₂ modifikasyon malzemesinin EDX sonuçları

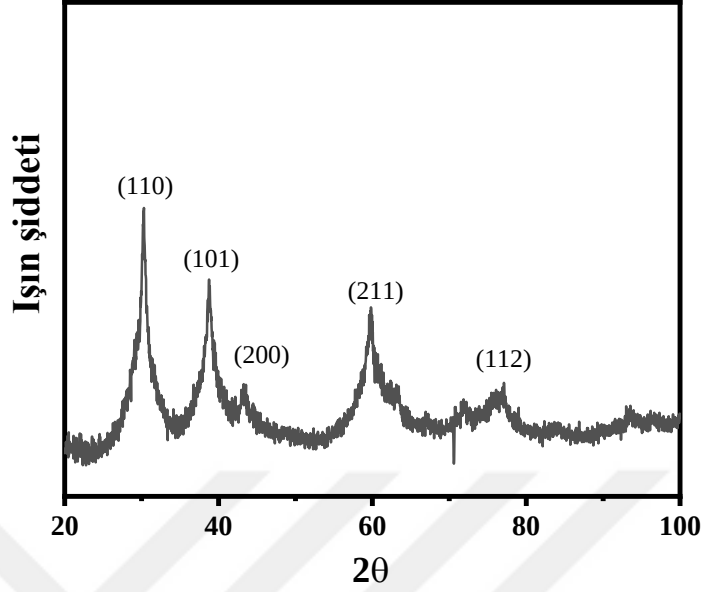
4.3.2 TEM analiz sonuçları

Hidrotermal sentez ile elde edilen nanoparçacıkların TEM görüntüleri **şekil 4.19**'da verilmiştir. Görüntüler SnO₂ nanoparçacıklarının 2- 4 nm boyutuna sahip olduğunu ve küresel morfolojiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. SnO₂ nanoparçacıklar küçük boyutlarından kaynaklı olarak elektrot yüzeyini modifiye etmek için hazırlanan çözeltide iyi şekilde disperse olmuş ve elektrot yüzeyine damlatıldığında homojen bir şekilde yüzeyi kaplamıştır. Bu neden elde edilen nanobiyosensör sinyalleri oldukça tekrar edilebilir karakterde olmuştur.



Şekil 4.19 SnO₂ modifikasyon malzemesinin TEM görüntüleri (10-100 nm)

4.3.3 XRD analiz sonuçları



Şekil 4.20 SnO₂ modifikasyon malzemesinin XRD kırınım deseni

Şekil 4.20 sentezlenen SnO₂ nanoparçacıkların XRD kırınım desenlerini göstermektedir. XRD kırınım desenleri değerlendirildiğinde SnO₂ nanoparçacıkların tetragonal kristal yapısına sahip olduğu tahmin edilmiştir (JCPDS, 41- 1445). Scheerer eşitliğine göre parçacıkların 2 nm boyutunda olduğu öngörülmüştür (He vd. 1999).

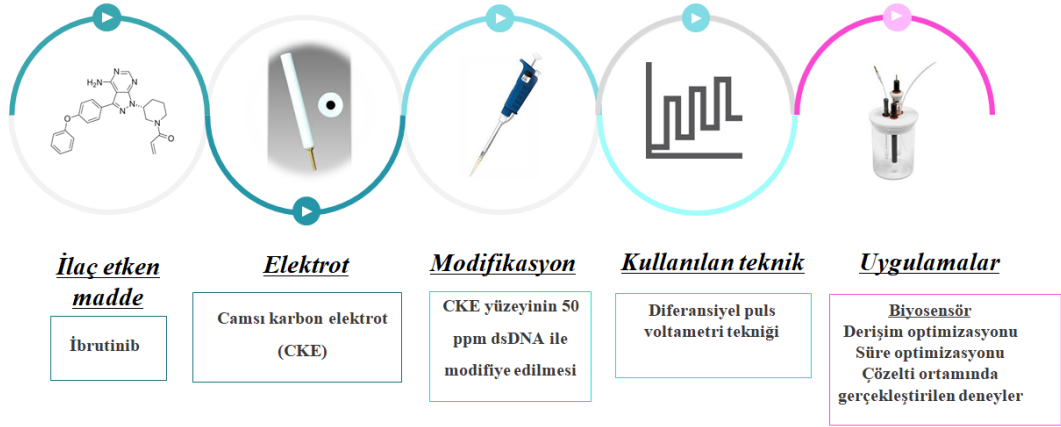
4.3.4 BET analiz sonuçları

Sentezlenen SnO₂ nanoparçacıklarının yüzey alanı yapılan BET analizi sonucunda 31, 22 m²g⁻¹ olarak bulunmuştur. BET yüzey analiz sonuçları hidrotermal sentez yönteminin üstünlüğünü vurgulamaktadır.

4.4 İbrutinib Üzerine Yapılan Voltametrik Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular

İbrutinib'in voltametrik araştırması, camı karbon elektrot ile diferansiyel puls voltametrisi tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İbrutinib'in farklı derişimlerinin farklı sürelerde çift sarmal DNA ile etkileşimi hazırlanan biyosensör yardımıyla incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında derişim ve süre optimizasyonları yapıldıktan sonra çözelti ortamında deneyler gerçekleştirilerek etkileşmenin türü hakkında birtakım yorumlar yapılmıştır. İbrutinib üzerine yapılan incelemelerin şematik gösterimi **şekil 4.21**'de verilmiştir.

İbrutinib

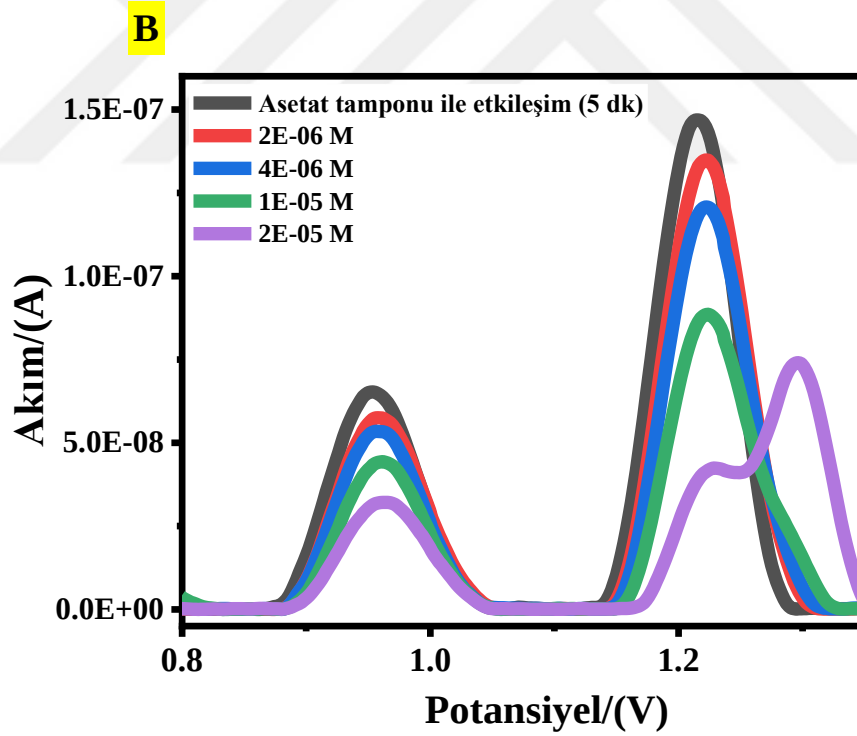
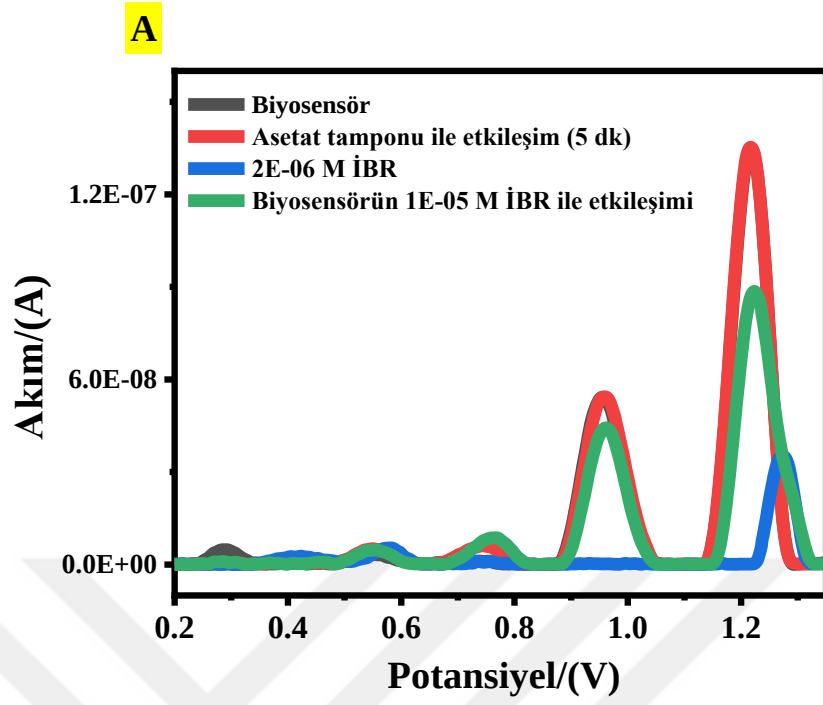


Şekil 4. 21 İbrutinib üzerine yapılan incelemelerin akış şeması

4.4.1 İbrutinib ile DNA etkileşmesinin camı karbon elektrot kullanılarak, guanin ve adenin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesinden elde edilen bulgular

4.4.1.1 Derişim optimizasyonu

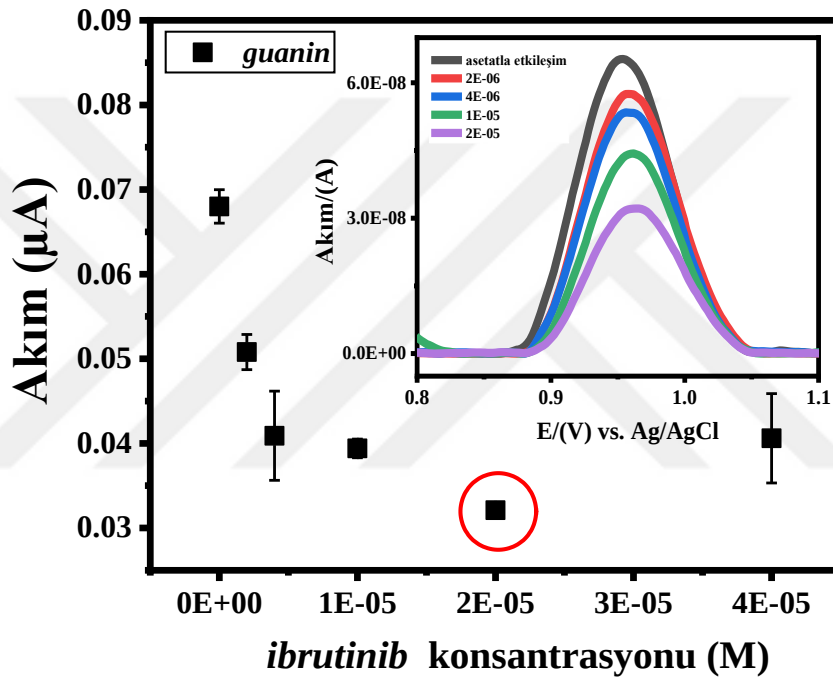
İbrutinib'in, boş camı karbon elektrot yüzeyinde 1,227 V'da yükseltgenme sinyali verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.22.a). Biyosensöre ait voltammogramlar incelendiğinde ise guanin ve adeninin sırasıyla 0,956 V ve 1,218 V'da yükseltgendiği görülmüştür. Hazırlanan biyosensör 1×10^{-5} M ibrutinib ile etkileştirildiğinde guanin ve adenin yükseltgenme pik akımları azalmıştır.



Şekil 4.22 A) pH 4,70 asetat tamponunda biyosensör, asetat tamponu ile etkileşim, 2×10^{-6} M ibrutinib ve biyosensörün 1×10^{-5} M ibrutinib ile etkileşimine ait voltammogramlar B) Biyosensörün artan ibrutinib derişimlerinde guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar

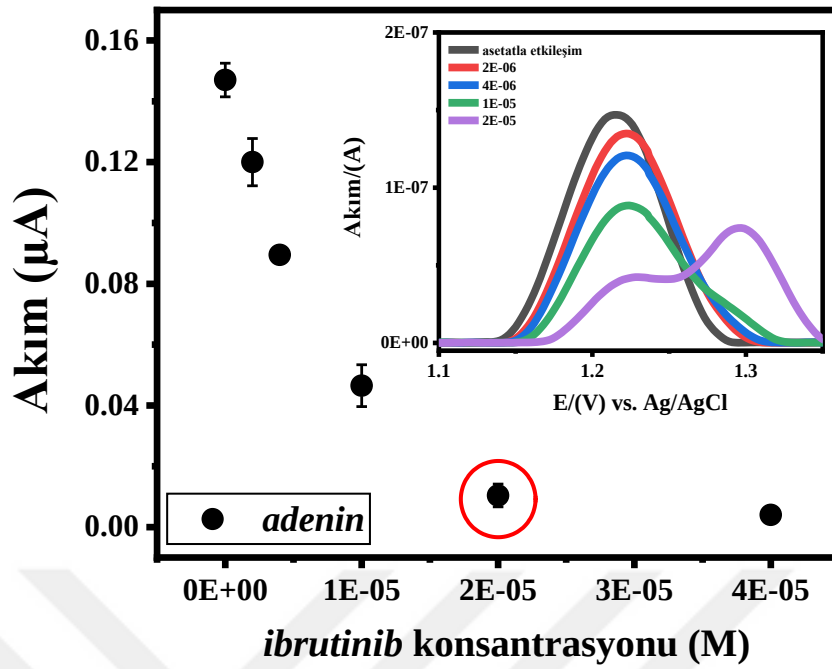
Guanin ve adenin pik akımlarının tekrarlanabilirlik sonuçları (BSS %) sırasıyla % 1,95 ve % 1,74 olarak bulunmuştur.

İbrutinib derişiminun guanin ve adenin voltametrik sinyalleri üzerindeki etkisini belirleyebilmek için, *dsDNA* biyosensörü farklı derişimlerdeki (2×10^{-6} - 2×10^{-5} M) ibrutinib çözeltilerinde 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Daha sonra adenin ve guaninin yükseltgenme sinyalleri izlenmiş ve voltammogramlar kaydedilmiştir. Bahsedilen deney prosedürü tüm derişimler için üç kez tekrarlanarak elde edilen sonuçlar hata çubukları şeklinde verilmiştir. (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 pH 4,70 asetat tamponunda biyosensörün artan ibrutinib derişimlerinde guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

İbrutinib etken maddesinin farklı derişimlerinin guanin yükseltgenmesine olan etkisi incelendiğinde en tekrar edilebilir ve en güçlü etkileşimin gözlemlendiği derişim 2×10^{-5} M olmuştur. 1×10^{-5} M ibrutinib derişimu varlığında elde edilen sonuçlar tekraredilebilir özellikte olmasına rağmen etkileşim bakımından 2×10^{-5} M derişimden daha zayıf kalmıştır. 4×10^{-5} M ibrutinib derişimu varlığında elde edilen sonuçlar ise az tekrar edilebilir olmakla birlikte etkileşimin gücü oldukça azalmıştır.



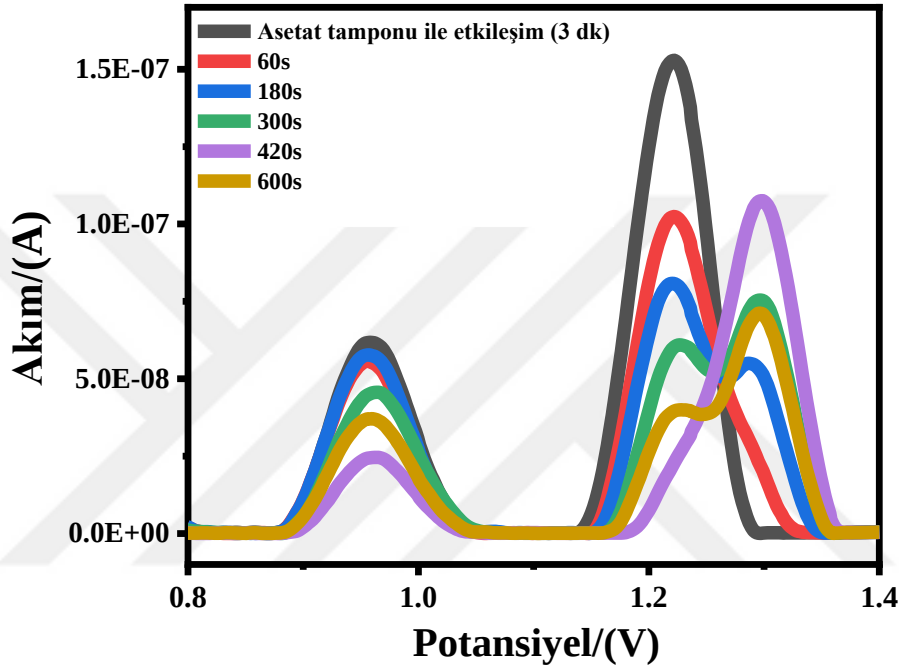
Şekil 4.24 pH 4,70 asetat tamponunda biyosensörün artan ibrutinib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

İbrutinib etken maddesinin farklı derişimlerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisi incelendiğinde (Şekil 4.24) en tekrar edilebilir ve en güçlü etkileşimin gözlemlendiği derişim 2×10^{-5} M olmuştur. 1×10^{-5} M ibrutinib derişimi varlığında elde edilen sonuçlar hem daha az tekraredilebilir özellikte olup hem de etkileşim bakımından 2×10^{-5} M derişimden daha zayıf kalmıştır. 4×10^{-5} M ibrutinib derişimi varlığında elde edilen sonuçlar ise tekrarlanabilirliği iyi olmasına rağmen etkileşim yönünden zayıf kalmıştır.

Sonuç olarak yukarıda verilen voltamogramlar incelendiğinde, adenin ve guanin pik akımlarının 2×10^{-5} M ibrutinib etkileşim derişimuna kadar azaldığı görülmüştür. Etkileşim adenin ve guanin açısından ayrı ayrı değerlendirildiğinde, adenin pik akımındaki azalmanın guanin pik akımına kıyasla lineer olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece sonuçların, çözelti ortamında gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen bilgilerle paralellik gösterdiği sonucuna varılmıştır.

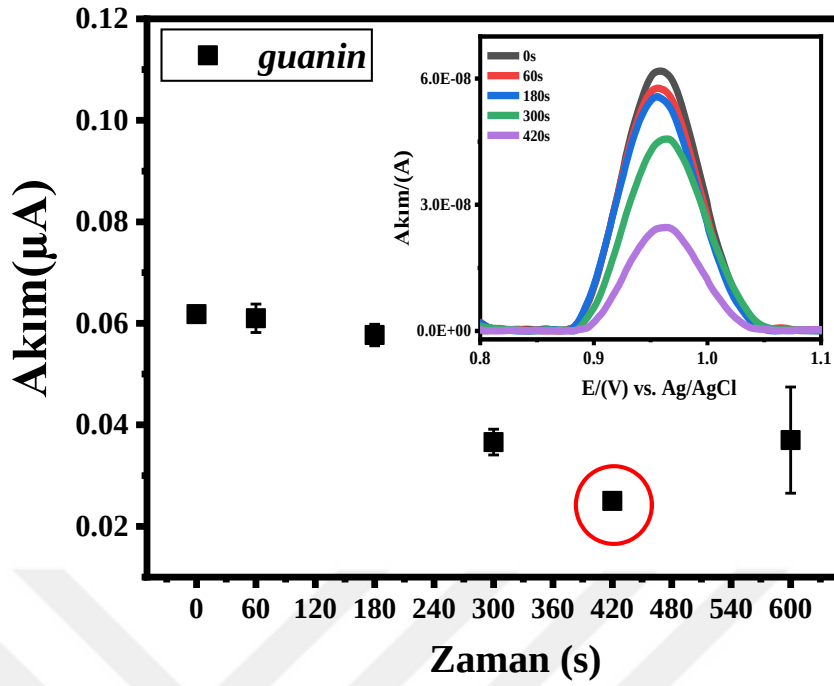
4.4.1.2 Süre optimizasyonu

Optimum ibrutinib derişimu belirlendikten sonra 2×10^{-5} M ibrutinib çözeltisinde sırasıyla 60s- 180s- 240s- 420s- 600s aralıklarla etkileşim süresi çalışmaları yapılmıştır. dsDNA biyosensörünün belirlenen zaman aralıkların da 2×10^{-5} M ibrutinib çözeltisine daldırılmasından sonra elde edilen elektrokimyasal sinyal izlenmiş ve elde edilen voltamogram aşağıdaki **şekilde 4.24**'de kaydedilmiştir.



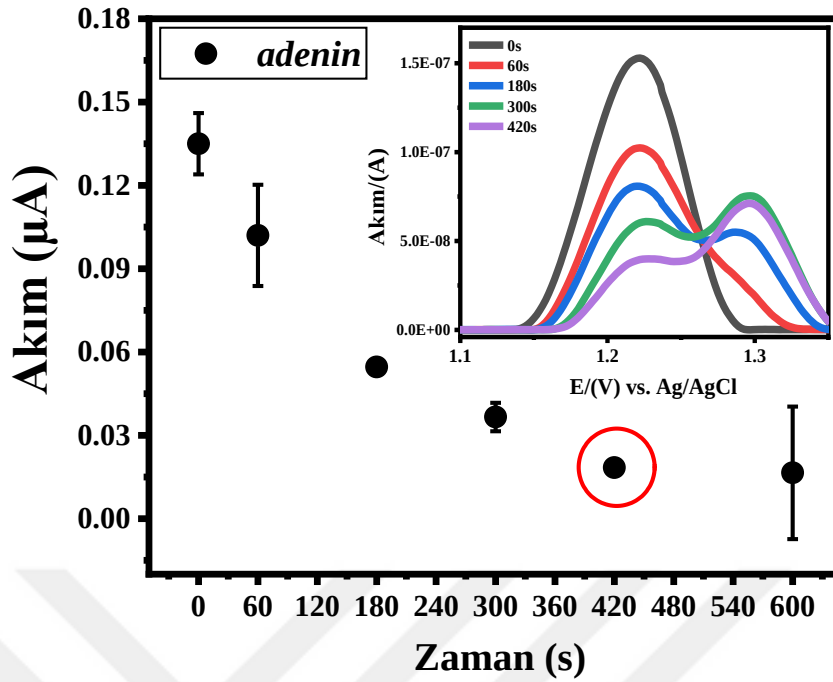
Şekil 4.25 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar

2×10^{-5} M ibrutinib etken maddesi ile farklı etkileşim sürelerinin guanin yükseltgenme sinyallerine olan etkisi incelendiğinde (**Şekil 4.26**) en tekrar edilebilir ve en güçlü etkileşimin gözlemlendiği süre 420 s olmuştur. 300 s süresinde elde edilen etkileşim sonuçları tekraredilebilir özellikte olmasına rağmen etkileşim bakımından 420 s süresinden daha zayıf kalmıştır. 600 s' de yapılan etkileşim çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise az tekrar edilebilir olmakla birlikte etkileşimin gücü oldukça azalmıştır.



Şekil 4.26 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

2×10^{-5} M ibrutinib etken maddesi ile farklı etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisi incelendiğinde (Şekil 4.27) en tekrar edilebilir ve en güçlü etkileşimin gözlemlendiği süre 420 s olmuştur. 300 s süresinde elde edilen etkileşim sonuçları guanin sonuçlarında olduğu gibi tekraredilebilir özellikte olmasına rağmen etkileşim bakımından 420 s süresinden daha zayıf kalmıştır. 600 s' de yapılan etkileşim çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise yine guanin sonuçlarından olduğu gibi az tekrar edilebilir olmakla birlikte etkileşimin gücünün oldukça zayıf olduğu görülmüştür.



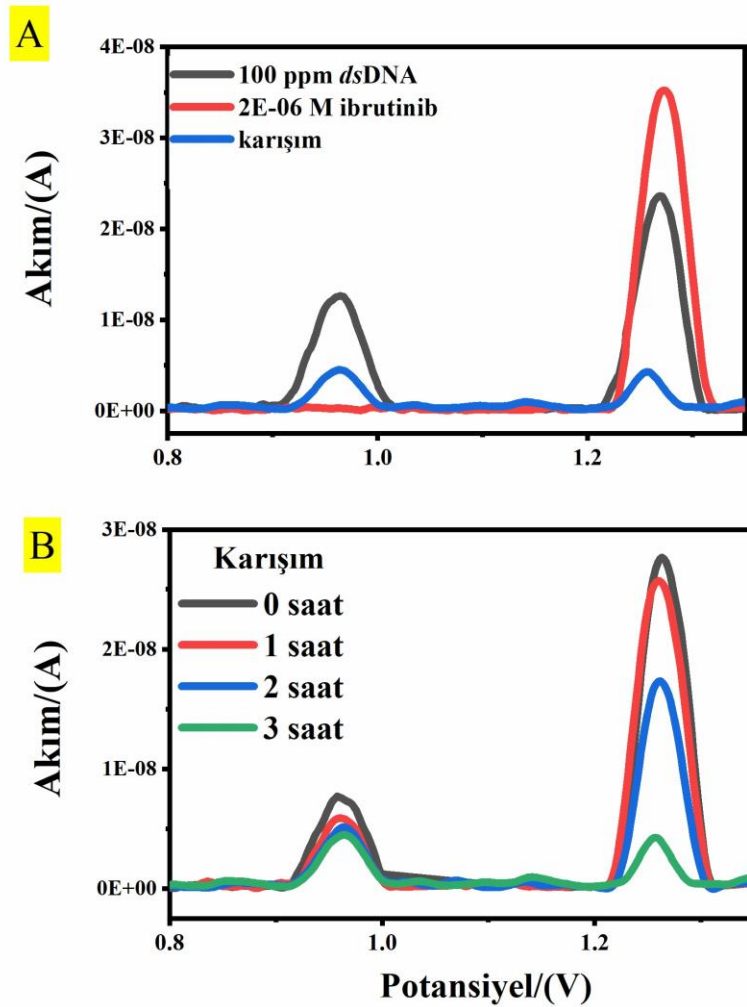
Şekil 4.27 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

Sonuçlar hem adenin hem de guanin yükseltgenme sinyalleri açısından değerlendirildiğinde en iyi etkileşim sinyalini 420 s verdiği görülmüştür. Şekil 4.27’de görüldüğü gibi, adenin pik akımları, guanin pik akımı ile karşılaştırıldığında doğrusal olarak azalmıştır.

4.4.1.3 Çözelti ortamında gerçekleştirilen incelemeler

İbrutinib’in çözelti ortamında gerçekleştirilen deneyleri *dsDNA*, 2×10^{-6} M ibrutinib ve 100 ppm *dsDNA* ile 2×10^{-6} M ibrutinib karışımının diferansiyel puls sinyalinin kaydedilmesiyle izlenmiştir. Guanin ve adenin pik potansiyelleri sırasıyla 0,96 V ve 1,25 V’ta elde edilmiştir. Ayrıca ibrutinib’in pik potansiyeli de 1,25 V’ta gözlemlenmiştir. Çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerde ibrutinib’in *dsDNA* ile etkileşimi, farklı bekletme süreleri (1- 2- 3 saat) uygulanarak araştırılmıştır. Elektrot yüzeyinde olası kirlilikleri önlemek için her ölçümden önce fiziksel ve elektrokimyasal temizlik yapılmıştır. Yükseltgenme sinyallerini karşılaştırabilmek amacıyla 100 ppm *dsDNA* ve 2×10^{-6} M ibrutinib’in kontrol çözeltilerinin de diferansiyel puls voltametri ölçümleri kaydedilmiştir (Şekil 4.28.a). Ayrıca 100 ppm *dsDNA* ve 2×10^{-6} M ibrutinib karışımı 1-3 saat aralığında bekletildikten sonra adenin yükseltgenme sinyallerinde

önemli bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.28.b). Bu sonuçların, biyosensörle gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen bilgilerle paralellik gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, şekil 4.28.a 'da görüldüğü gibi, adenin pik potansiyelinin hafifçe daha az pozitif potansiyellere kaydığı görülmüştür. Biyosensör için elde edilen adenin pik potansiyeli 1,227 V iken etkileşimden sonra elde edilen adenin pik potansiyeli 1,225 V olarak bulunmuştur. Bu kaymanın ibrutinib'in dsDNA yapısı ile elektrostatik olarak etkileşim gösterdiği sonucunu çıkarabiliriz (Pešić vd. 2020).

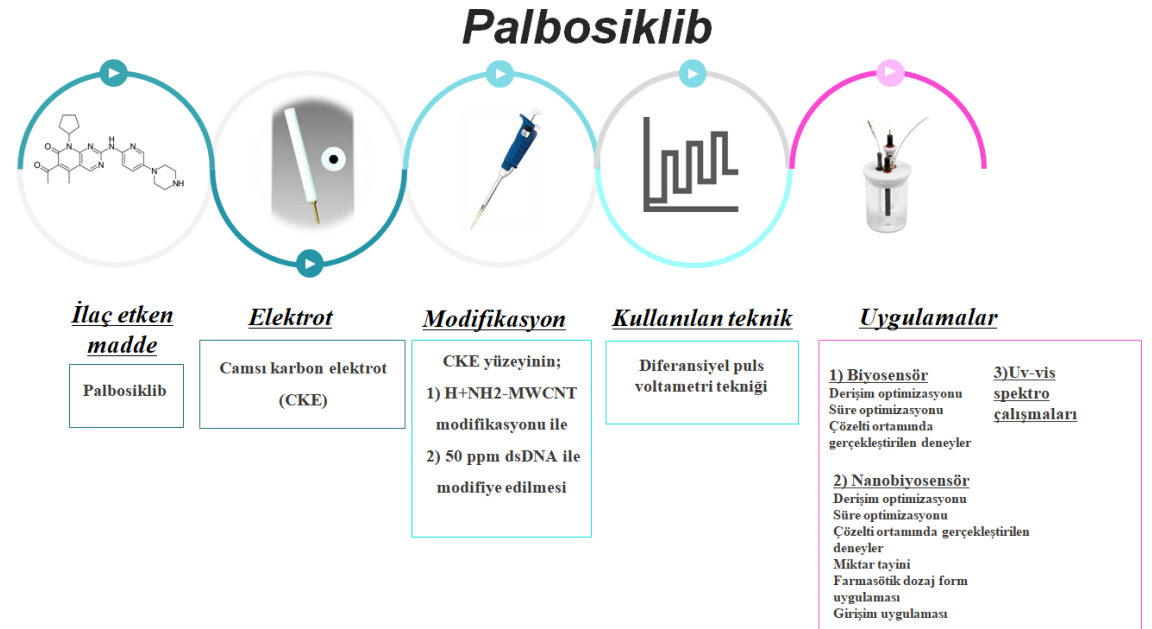


Şekil 4.28 İbrutinib ile dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi A) 100 ppm dsDNA, 2×10^{-6} M ibrutinib ve bunların karışımının 3 saat sonra elde edilen voltammogramları B) 100ppm dsDNA ve 2×10^{-6} M ibrutinib karışımının 0- 3 saat aralığında kaydedilen voltammogramları

4.5 Palbosiklib Üzerine Yapılan Voltametrik Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular

Palbosiklib'in voltametrik çalışması, camı karbon elektrot ve diferansiyel puls voltametrisi tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Palbosiklib'in farklı derişimlerinin farklı sürelerde çift sarmal DNA ile etkileşimi hazırlanan biyosensör ve nanobiyosensörler ile incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında öncelikle biyosensöre ait derişim ve süre optimizasyonları gerçekleştirildikten sonra çözelti ortamında deneyler gerçekleştirilerek etkileşmenin türü hakkında yorumlar yapılmıştır. Palbosiklib etken maddesinin biyosensör kısmına ait deneysel incelemeleri tamamlandıktan sonra elektrot yüzeyi insan saçından elde edilen karbon malzeme ve NH₂-MWCNT ile modifiye edilerek nanobiyosensör deney aşamasına geçilmiştir.

Nanobiyosensör incelemeleri kapsamında materyal seçimi ve damlatma optimizasyonları, derişim ve süre optimizasyonları gerçekleştirildikten sonra geliştirilen nanobiyosensörün analitik performansı değerlendirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntem farmasötik dozaj formuna uygulanmıştır ve girişim yapabilme ihtimali olan maddeler varlığında nanobiyosensörün performansı değerlendirilmiştir. Palbosiklib üzerine yapılan incelemelerin şematik gösterimi **şekil 4.29**'da verilmiştir.



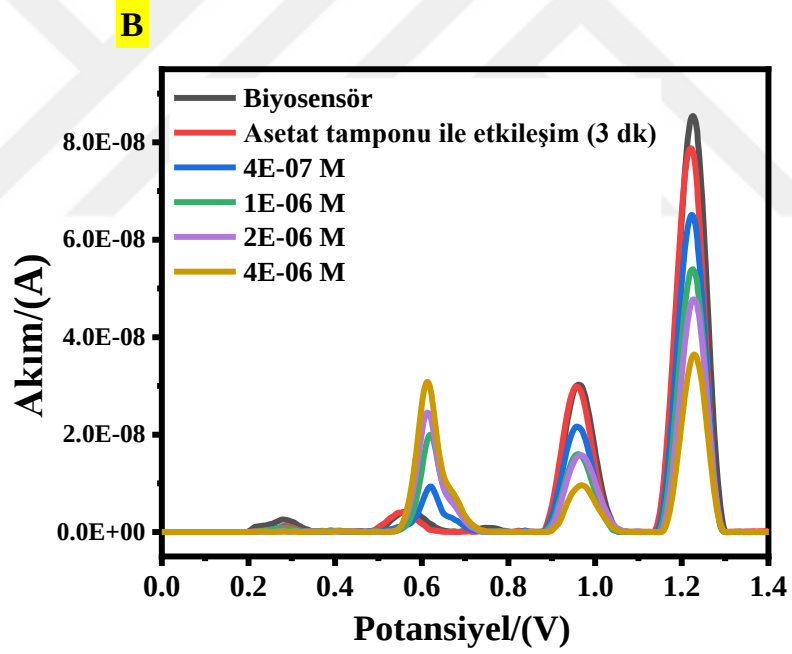
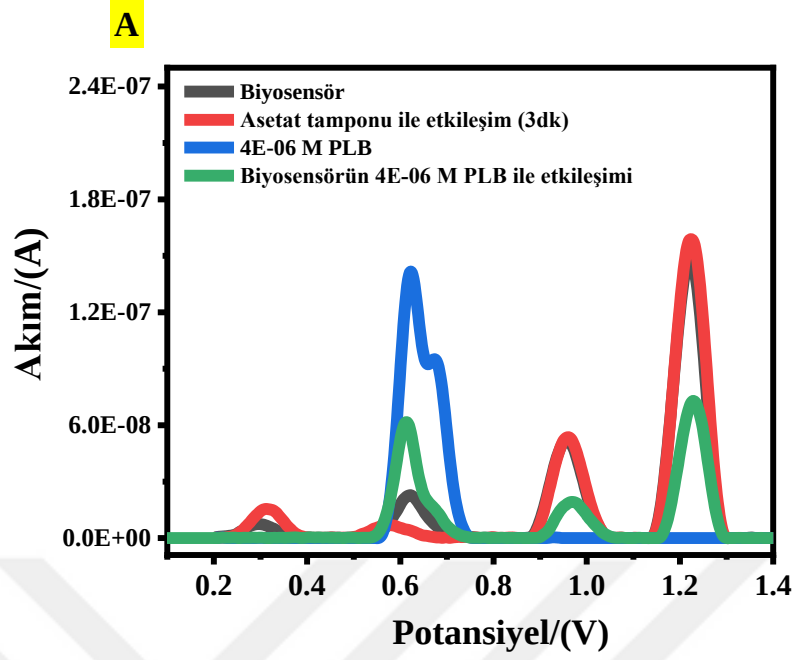
Şekil 4.29 Palbosiklib üzerine yapılan incelemelerin akış şeması

4.5.1 Palbosiklib ile DNA etkileşmesinin boş camı karbon elektrot kullanılarak, guanin ve adenin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesinde elde edilen bulgular

4.5.1.1 Derişim optimizasyonu

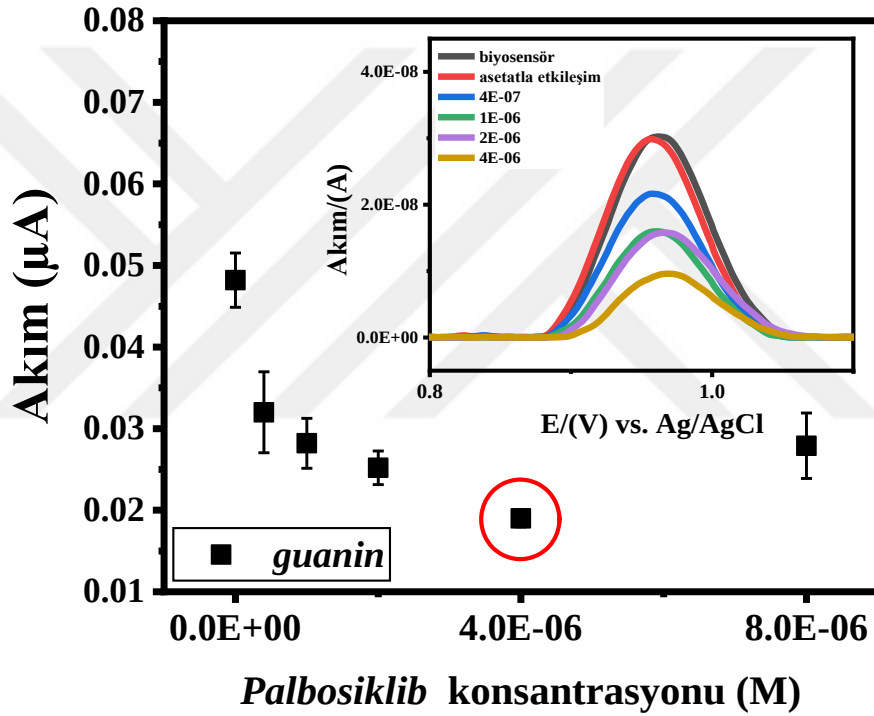
Palbosiklib'in, boş camı karbon elektrot yüzeyinde 0,623 V ve 0,930 V'da (çok düşük akımlarda yaklaşık 0,0001 μ A) iki yükseltgenme sinyali verdiği gözlemlenmiştir (**Şekil 4.30.a**). Biyosensöre ait voltammogramlar incelendiğinde guanin ve adeninin sırasıyla 0,962 V ve 1,226 V'da yükseltgendiği görülmüştür. Hazırlanan biyosensör 4×10^{-6} M palbosiklib ile etkileştirildiğinde guanin ve adenin sinyallerinin hafifçe daha pozitif potansiyellere kaydığı görülmüştür (0,968 V ve 1,228 V). Palbosiklib'in 0,623 V'da bulunan 0,116 μ A akımına sahip yükseltgenme sinyali dsDNA ile etkileşimde düşmüş ve gözlemlenen omuz kaybolmaya başlamıştır.

Elde edilen diferansiyel puls voltamogramında da görüldüğü gibi ilaç-dsDNA etkileşimi, hem DNA'nın elektroaktif bazları guanin ve adenin yükseltgenme sinyalleri üzerinden hem de palbosiklib'in sinyalindeki değişim üzerinden incelenmiştir (**Şekil 4.30.b**).



Şekil 4.30 A) pH 4,70 asetat tamponunda biyosensör, biyosensörün asetat tamponu ile etkileşimi, 4×10^{-6} M palbosiklib ve biyosensörün 4×10^{-6} M palbosiklib ile etkileşimine ait voltammogramlar B) Biyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine etkisini gösteren voltammogramlar

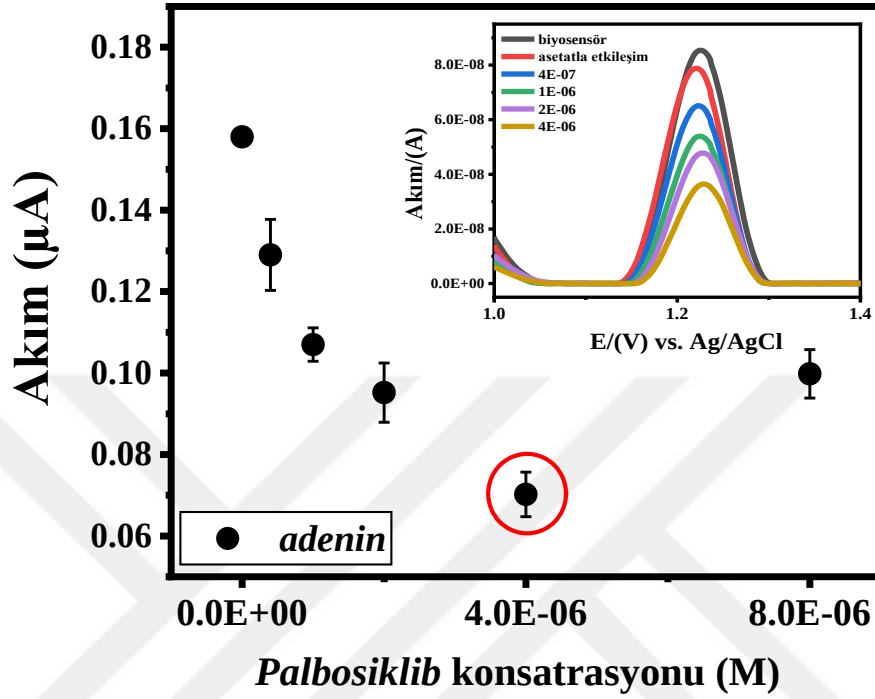
Palbosiklib derişiminun guanin ve adenin voltametik sinyalleri üzerindeki etkisini belirleyebilmek için, dsDNA biyosensörü farklı derişimlerdeki (4×10^{-7} - 8×10^{-6} M) palbosiklib çözeltilerinde 3 dakika süreyle bekletilmiştir. Daha sonra adenin ve guaninin yükseltgenme sinyalleri izlenmiş ve voltammogramlar kaydedilmiştir. Bu deney prosedürü tüm derişimler için üç kez tekrarlanarak elde edilen sonuçlar hata çubukları şeklinde verilmiştir (**Şekil 4.31**). Sonuçlar guanin açısından incelendiğinde en az hata oranıyla elde edilen sonucun 4×10^{-6} M palbosiklib derişimunda olduğu açıkça görülmüştür. 8×10^{-6} M palbosiklib derişimunda etkileşimin azaldığı ve hata oranının önemli ölçüde arttığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.31 pH 4,70 asetat tamponunda biyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

Palbosiklib etken maddesinin farklı derişimlerinin adenin yükseltgenme sinyaline olan etkisi incelendiğinde (**Şekil 4.32**) en tekrar edilebilir ve en güçlü etkileşimin gözlemlendiği derişimin 4×10^{-6} M palbosiklib derişimi olduğu açıkça görülmüştür. Diğer derişimlerin varlığında elde edilen sonuçlar hem tekraredilebilir özellikte olmayıp hem de etkileşim bakımından 4×10^{-6} M palbosiklib derişimden daha zayıf kalmıştır. 4×10^{-6} M palbosiklib derişimi ile etkileşim sonuçları incelendiğinde ise hem guanin

hem de adenin yükseltgenme sinyallerinin akım değerleri artış göstermiştir. Bunun sebebinin artan palbosiklib derişimi ile elektrot yüzeyinde doygunluk oluşturmaları olduğu öngörölmüştür.

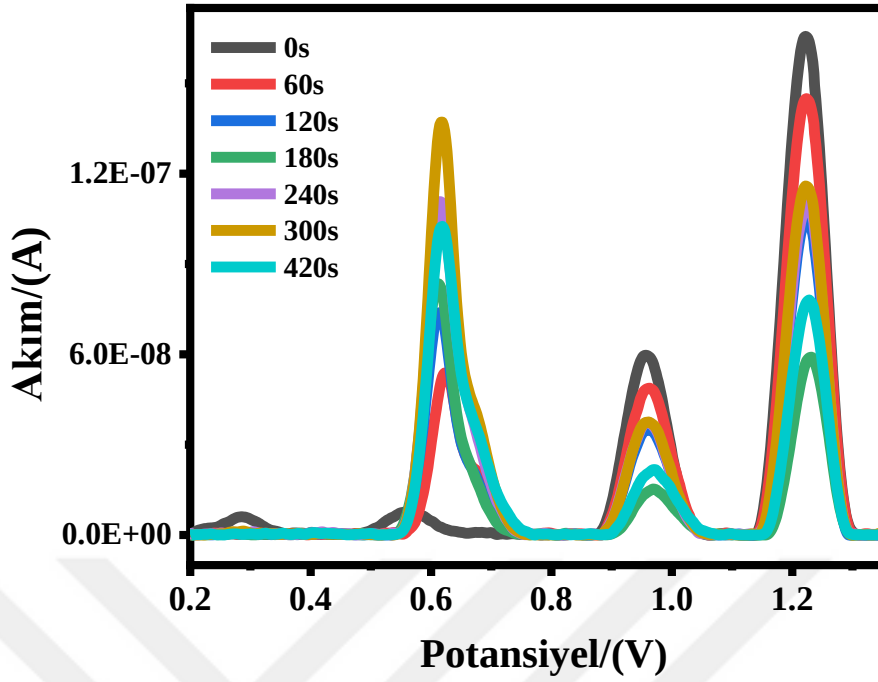


Şekil 4.32 pH 4,70 asetat tamponunda biyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

4.5.1.2 Süre optimizasyonu

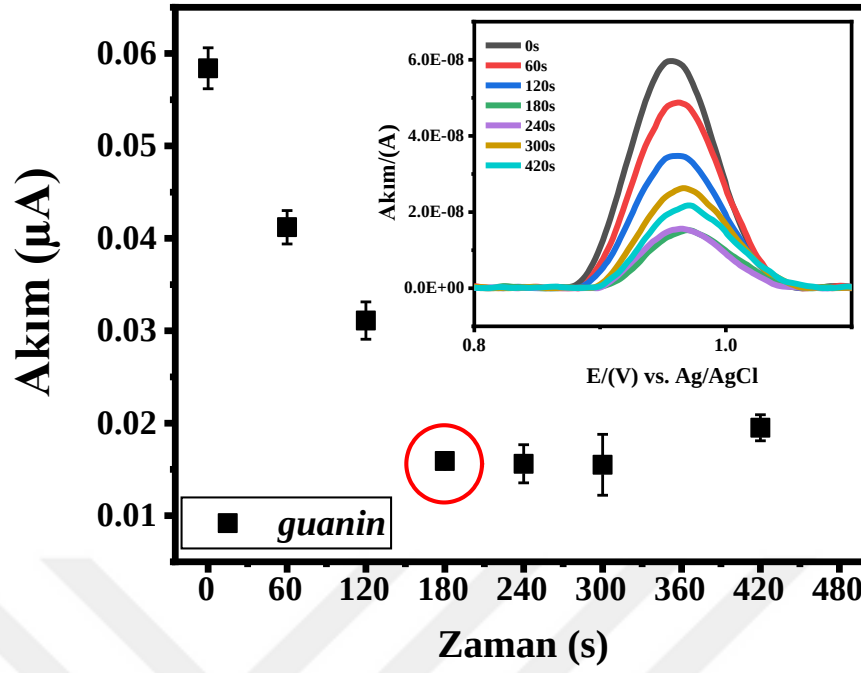
Optimum palbosiklib derişimi belirlendikten sonra 4×10^{-6} M palbosiklib çözeltisinde sırasıyla 60s- 180s- 240s- 420s aralıklarla etkileşim süresi çalışmaları yapılmıştır. dsDNA biyosensörünün belirlenen zaman aralıkların da 4×10^{-6} M palbosiklib çözeltisine daldırılmasından sonra elde edilen elektrokimyasal sinyal izlenmiş ve elde edilen voltamogram **şekil 4.33**'de gösterilmiştir.

Ayrıca voltammogramlar incelendiğinde etkileşim süresinin artmasıyla guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerinin daha pozitif değerlere hafifçe kaydığı gözlenmiştir.



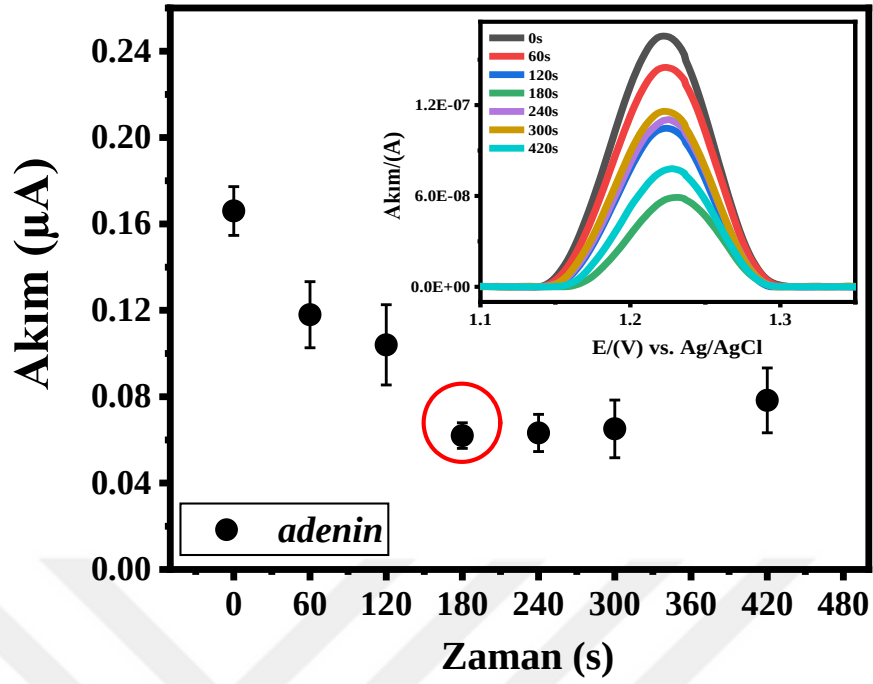
Şekil 4.33 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar

Artan etkileşim süresinin guanin yükseltgenme sinyalleri üzerindeki etkisini gösterebilmek için tekrarlanan üç sonuç üzerinden çizilen hata çubuklu grafik **şekil 4.34’de** verilmiştir. Grafik detaylı olarak incelendiğinde en az hata oranına ve en iyi etkileşim süresine 180 s’nin sahip olduğu gözlemlenmiştir. 240 s ve sonraki süreler için hata oranı düşük olsa da, etkileşimin sabitlendiği görülmüştür.



Şekil 4.34 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

Artan etkileşim süresinin guanin yükseltgenme sinyalleri üzerindeki etkisini gösterebilmek için tekrarlanan üç sonuç üzerinden çizilen hata çubuklu grafik **şekil 4.35’de** verilmiştir. Grafik detaylı olarak incelendiğinde en az hata oranına ve en iyi etkileşim süresine 180 s’nin sahip olduğu gözlemlenmiştir. 240 s ve sonraki süreler için hata oranları oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca 180 s’den sonra etkileşimin gücü azalmıştır.

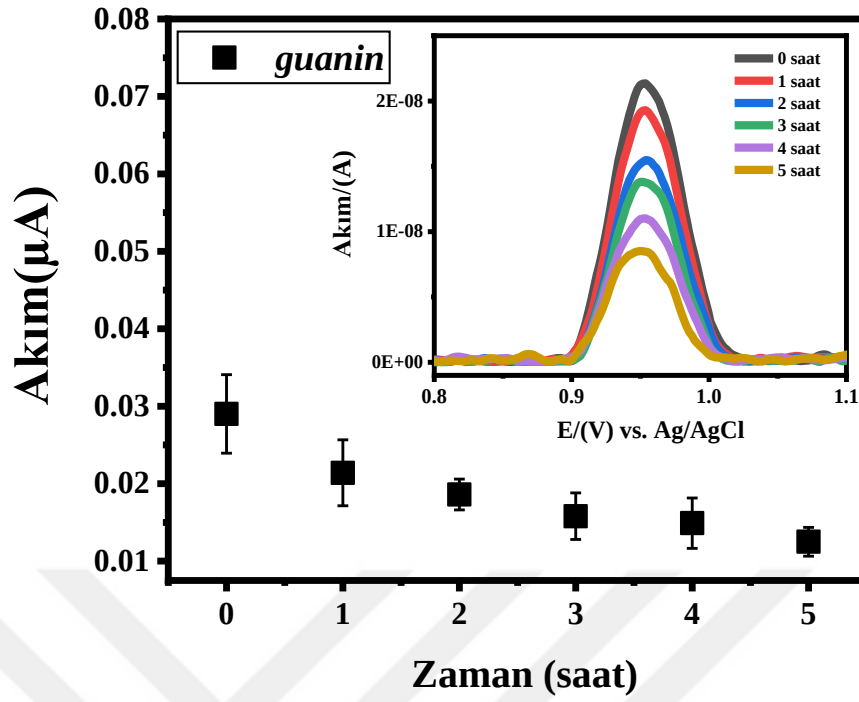


Şekil 4.35 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

4.5.1.3 Çözelti ortamında gerçekleştirilen incelemeler

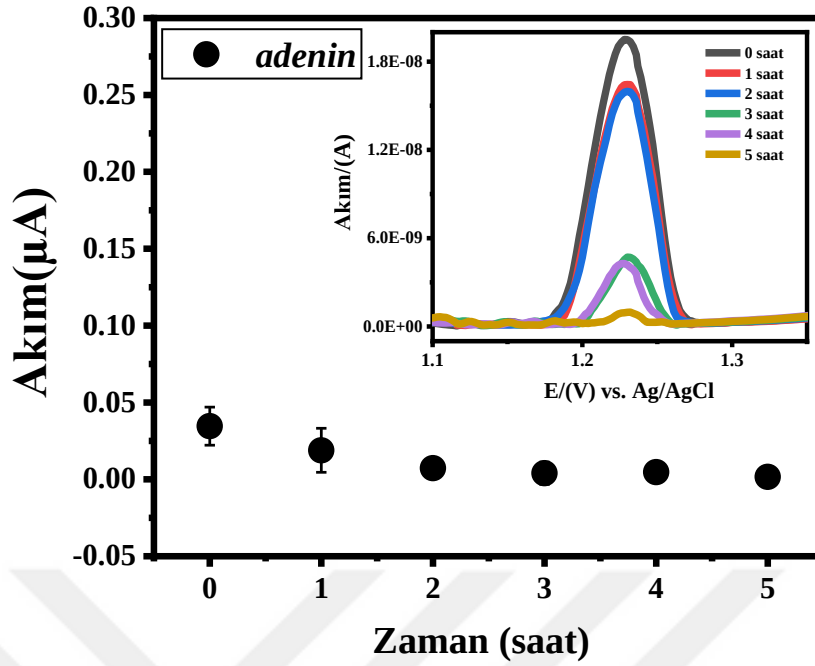
Çözelti ortamında Palbosiklib'in 100 ppm dsDNA ile etkileşimi, farklı bekletme süreleri (1-2-3-4-5 saat) uygulandıktan sonra kaydedilen diferansiyel puls voltamogramları (Şekil 4.36, Şekil 4.37 ve Şekil 4.38) ile incelenmiştir. Elektrot yüzeyinde olası kirlilikleri önlemek için her ölçümden önce fiziksel ve elektrokimyasal temizlik yapılmıştır. Yükseltgenme sinyallerini karşılaştırmak amacıyla 100 ppm dsDNA ve 4×10^{-6} M palbosiklib'in kontrol çözeltilerinin de aynı sürelerde (1- 2- 3- 4- 5 saat) diferansiyel puls voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.38).

Şekil 4.36 ve Şekil 4.37 'de görüldüğü gibi, guanin ve adenin pik akımları, farklı zamanlar da bekletme uygulamasından sonra giderek azalmıştır.



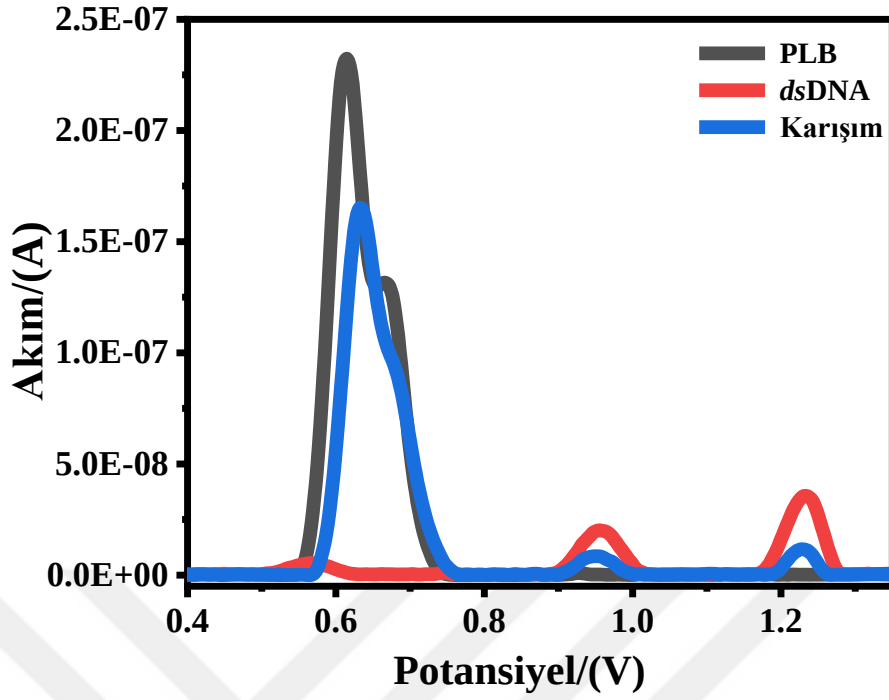
Şekil 4.36 Çözelti ortamında 4×10^{-6} M palbosiklib ile 100 ppm dsDNA karışım çözeltisinin 0-5 saat bekletme sürelerine ait voltamogramlarda guanin sinyali

Şekil 4.36’de hata çubukları ile birlikte verilen voltammogramlar incelendiğinde guanin sinyalinin artan bekletme süresine bağlı olarak hızla düştüğü gözlenmiştir. Çözelti ortamında gerçekleştirilen deneyler DNA’nın elektroaktif bazı guaninin palbosiklib ile iyi bir şekilde etkileştiğini göstermiştir. Tekrarlı sonuçlardan elde edilen hata çubukları incelendiğinde ise özellikle 5. saatte hata payının en az olduğu yani en tekraredilebilir deney sonucunun elde edilebildiği görülmüştür.



Şekil 4.37 Çözelti ortamında 4×10^{-6} M palbosiklib ile 100 ppm *dsDNA* karışım çözeltisinin 0- 5 saat bekleme sürelerine ait voltamogramlarda adenin sinyali

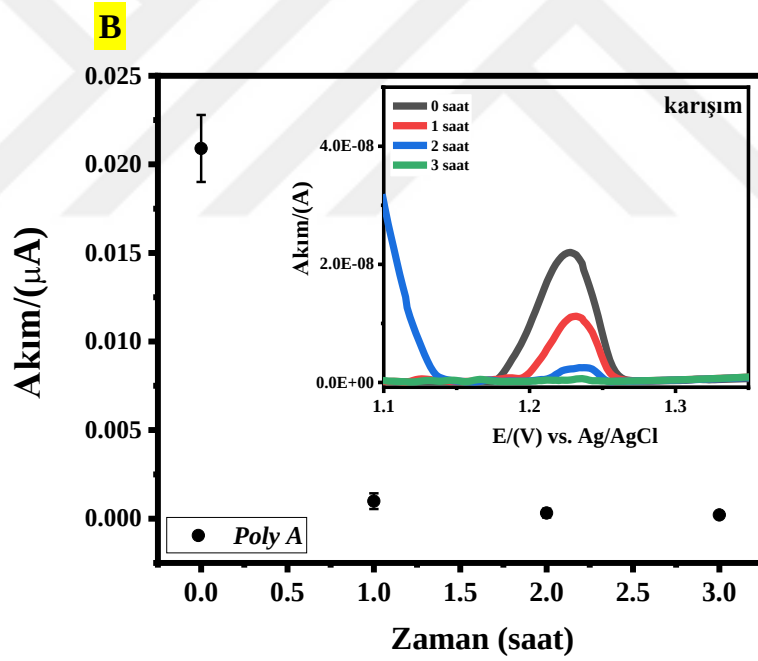
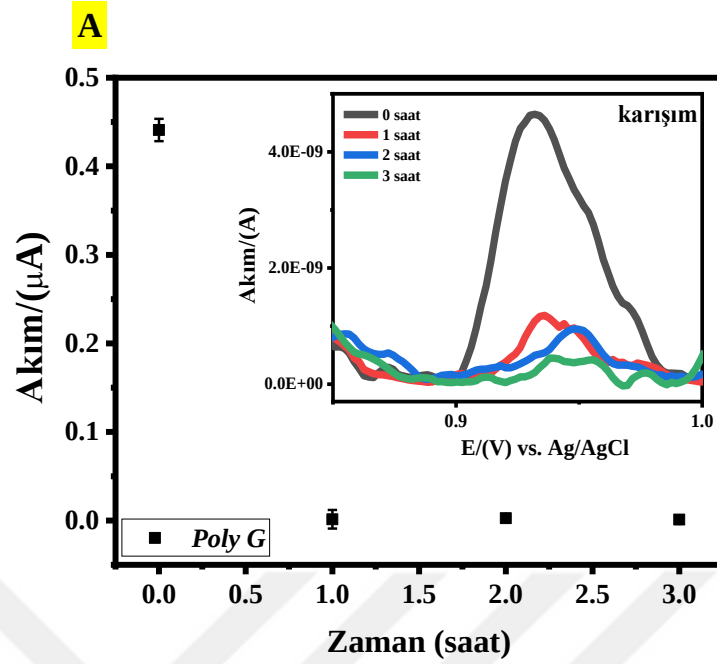
Şekil 4.37’de hata çubukları ile birlikte verilen voltammogramlar incelendiğinde adenin sinyalinin artan bekleme süresine bağlı olarak düştüğü gözlenmiştir. Özellikle 2. saatte gerçekleştirilen etkileşimden sonra kaydedilen voltamogramlarda pik akımı azalışının önemli ölçüde olduğu görülmüştür. Çözelti ortamında gerçekleştirilen deneyler DNA’nın elektroaktif bazı adenin için de palbosiklib ile iyi bir şekilde etkileştiğini göstermiştir. Etkileşim sonuçları guanin ile karşılaştırıldığında adeninin palbosiklib ile daha iyi etkileştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.38 Palbosiklib ile *dsDNA* etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; 100 ppm *dsDNA*, 4×10^{-6} M palbosiklib ve bunların karışımının 3 saat sonra elde edilen voltammogramları

Şekil 4.38’da verilen voltammogramlar, çözelti ortamında 100 ppm *dsDNA* kontrol ve 4×10^{-6} M palbosiklib kontrol ve karışım çözeltilerinin 3. saat sonundaki değerlendirilmesine aittir. Voltammogramlar incelendiğinde DNA’nın elektroaktif bazları guanin ve adeninin 4×10^{-6} M palbosiklib ile etkileştiğinde pik akımlarının ciddi oranda düştüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca, Şekil 4.38’da verilen voltammogramlarda görüldüğü gibi, karışım çözeltisinde palbosiklib’in pik potansiyeli daha pozitif potansiyel değerine kaymıştır. Bu pozitif kayma UV sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde etkileşim türünün interkalasyon olabileceğini göstermektedir (Dogan vd. 2014).

Bu etkileşimi daha iyi gösterebilmek için çözelti fazında poly A ve poly G ile etkileşim çalışmaları yapılmıştır (Şekil 4.39).

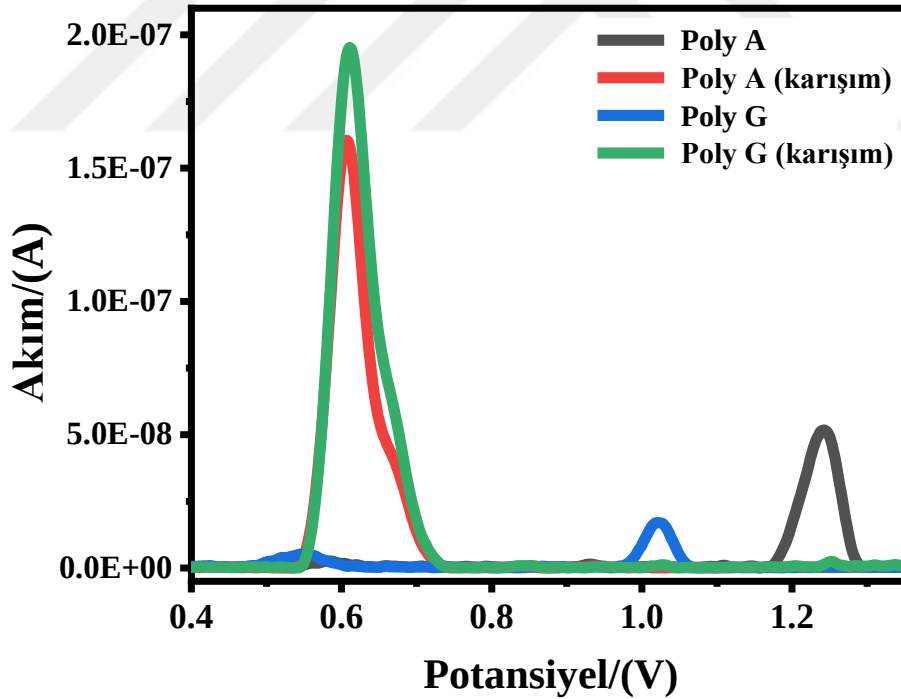


Şekil 4. 39 Palbosiklib ile poly A, poly G etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; A) poly G ve palbosiklib karışımına ait voltammogramlar ve hata çubuklu grafiği B) poly A ve palbosiklib karışımına ait voltammogramlar ve hata çubuklu grafiği

Şekil 4.39.a''da verilen voltammogramlar incelendiğinde Poly A'nın palbosiklib ile karışımına ait yükseltgenme sinyalinin ilk etkileşim zamanında sonra hızla düştüğü gözlemlenmiştir. Poly G yükseltgenme sinyalinin 3. saat sonunda elde edilen voltammogramlarda 0,00103 μA değerine düştüğü sonucuna varılmıştır.

Şekil 4.39.b''de verilen voltammogramlar incelendiğinde Poly A'nın palbosiklib ile karışımına ait yükseltgenme sinyalinin ilk etkileşim zamanından sonra daha pozitif potansiyellere kayarak hızla düştüğü gözlemlenmiştir. Poly A yükseltgenme sinyalinin 3. saat sonunda elde edilen voltammogramlarda 0,000208 μA değerine düştüğü gözlemlenmiştir.

Şekil 4.40 Poly A, Poly G ve bunların palbosiklib ile karışımının 3 saat bekleme süresinden sonra elde edilen diferansiyel puls voltamogramlarını göstermektedir. Karışım sinyallerinin azalması Poly A ve Poly G sinyalleri ile karşılaştırılarak gösterilmiştir.



Şekil 4. 40 Palbosiklib ile poly A, poly G etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; poly A, poly G, 4×10^{-6} M palbosiklib ve bunların karışımının 3 saat sonra elde edilen voltammogramları

4.5.2 Palbosiklib için nanobiyosensör deneyleri

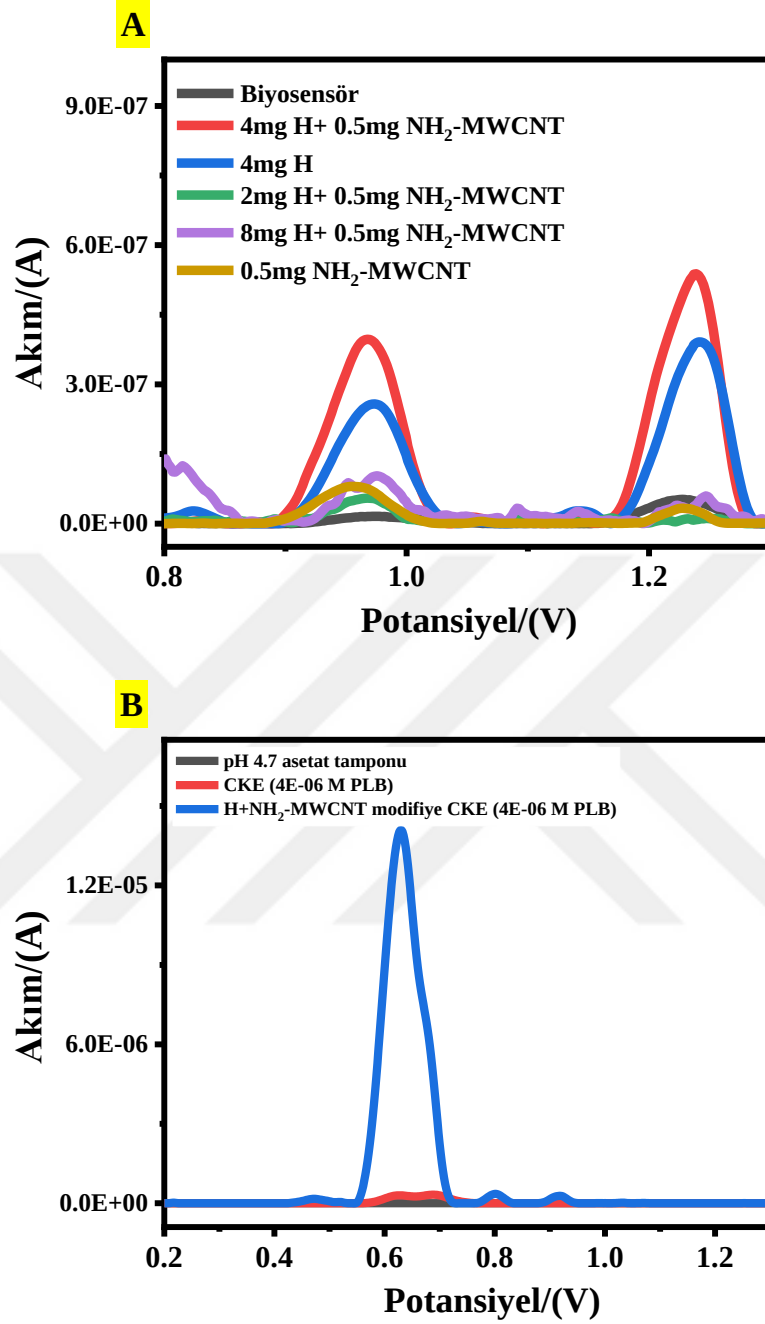
Palbosiklib'in DNA ile etkileşimini daha iyi inceleyebilmek amacıyla elektrot yüzeyi atık insan saçının hidrotermal karbonizasyonundan elde karbon malzeme (H) ve NH₂-MWCNT ile modifiye edilmiştir. Tek başına sentezlenen karbon malzeme, guanin ve adenin bazlarının pik akımlarını arttırmasına rağmen NH₂- MWCNT ile birlikte çok daha yüksek pik akımlarına ulaşılabilmiştir.

4.5.2.1 Modifikasyon materyalinin belirlenmesi

Şekil 4.41.a H ve NH₂- MWCNT malzemelerinin modifikasyon malzemesi bakımından farklı oranlarda kullanımı hakkında bilgi vermektedir. Sonuçlar incelendiğinde H malzemesinin, NH₂-MWCNT'den daha etkili olduğu görülmektedir. Ancak, her iki malzeme birlikte kullanıldığında guanin ve adenin sinyallerinin önemli ölçüde arttığı sonucuna varılmıştır. Özellikle 4 mg H+ 0,5 mg NH₂- MWCNT kombinasyonu en yüksek pik akımı değerini vermiştir.

Biyosensör ve nanobiyosensör, palbosiklib ve dsDNA sinyallerinin pik akımı ve potansiyeli açısından karşılaştırdığında guanin ve adenin pik akımları dsDNA biyosensöründe 0,016 ve 0,049 μ A iken nanobiyosensörde 0,374 ve 0,641 μ A olarak bulunmuştur. dsDNA sinyallerinin nanomateryal sayesinde önemli ölçüde arttığı sonucuna varılmıştır. Palbosiklib ile nanosensörde 0,632V ve 0,912 V'da iki yükseltgenme piki elde edilmişken, boş camı karbon elektrotta 0,622V ve 0,930 V'ta elde edilmiştir, Nanosensör sayesinde, palbosiklib'in ikinci pik potansiyeli, boş camı karbon elektrotta kıyasla daha az pozitif potansiyel değerine kaymıştır. Sonuç olarak modifikasyon dispersiyonu sayesinde palbosiklib'in guanin ile yakın potansiyelde yükseltgenme sinyali veren 2. piki için iyi bir ayırım sağlanabilmiştir.

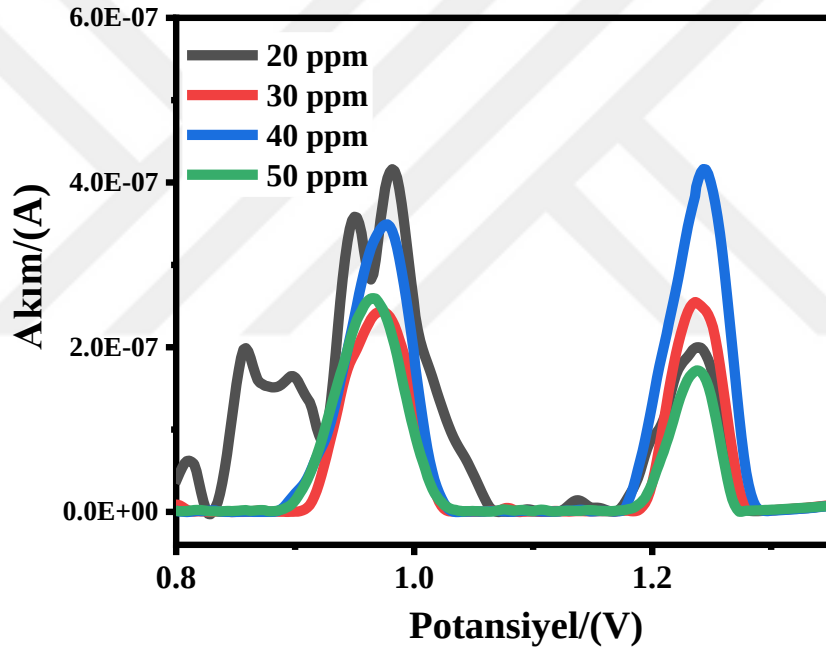
Şekil 4.41.b boş CKE'nin pH 4,7 destek elektrolitinde, boş CKE'nin 4×10^{-6} M palbosiklib ortamında ve modifiye CKE'nin 4×10^{-6} M palbosiklib ortamında kaydedilen voltammogramlarını göstermektedir. Voltammogramlar incelendiğinde H+ NH₂-MWCNT modifikasyon çözeltilerinin palbosiklib pik akımını boş CKE'ye göre oldukça fazla arttırarak daha pozitif potansiyele kaydırıldığı görülmüştür. Boş CKE için kaydedilen pik akımı 0,142 μ A iken modifiye CKE için kaydedilen pik akımı 9,15 μ A olmuştur.



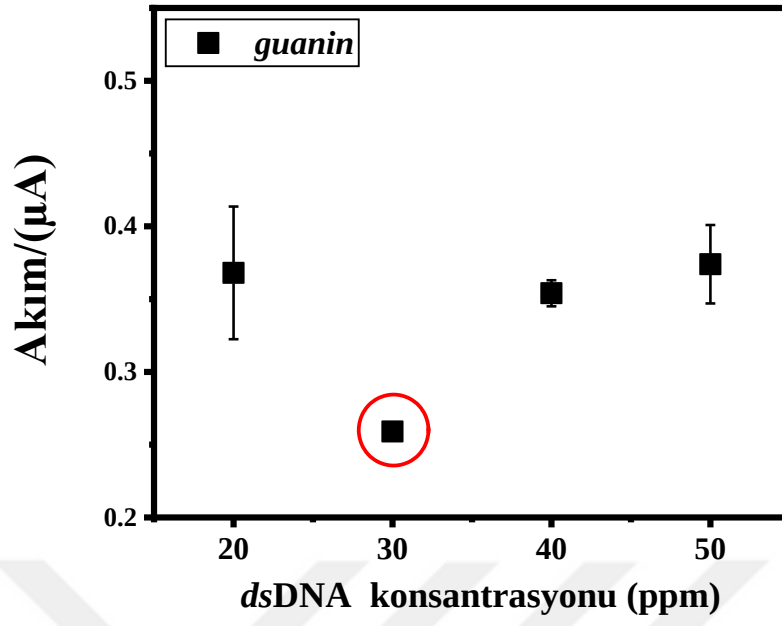
Şekil 4. 41 A) Farklı oranlardaki modifikasyon malzemelerinin pik akımına etkisinin incelenmesi B) boş CKE'nin pH 4,7 destek elektrolitinde, boş CKE'nin 4×10^{-6} M palbosiklib ortamında ve modifiye CKE'nin 4×10^{-6} M palbosiklib ortamında kaydedilen voltammogramları

4.5.2.2 dsDNA derişim optimizasyonu

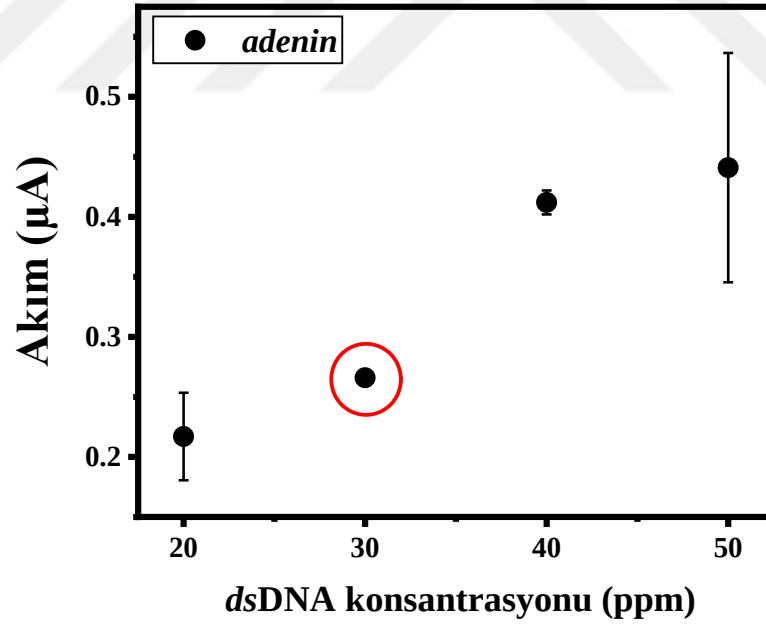
Modifikasyon malzemesi için damlatma optimizasyonu basamağına geçilmeden 20- 30- 40- 50 ppm aralığında çalışılarak dsDNA'nın derişim optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.42). Sonuçlar hem guanin hem de adenin yükseltgenme sinyalleri üzerinden incelendiğinde optimum dsDNA miktarı 30 ppm olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak nanomateryal sayesinde biyosensör (50 ppm dsDNA) ile karşılaştırıldığında daha düşük derişimlerde dsDNA ile çalışabilme imkânı olmuştur. Hata çubuklu grafikler incelendiğinde en az hata payına sahip olan DNA derişiminin 30 ppm olduğu açıkça görülmüştür. 40 ppm ve 50 ppm derişimleri daha yüksek sinyallerin elde edilmesini sağlamıştır. Fakat tekrarlı sonuçların birbirinden farklı olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.42 dsDNA'nın derişim optimizasyonu için guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine ait voltammogramlar



Şekil 4.43 Artan *dsDNA* derişiminin guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

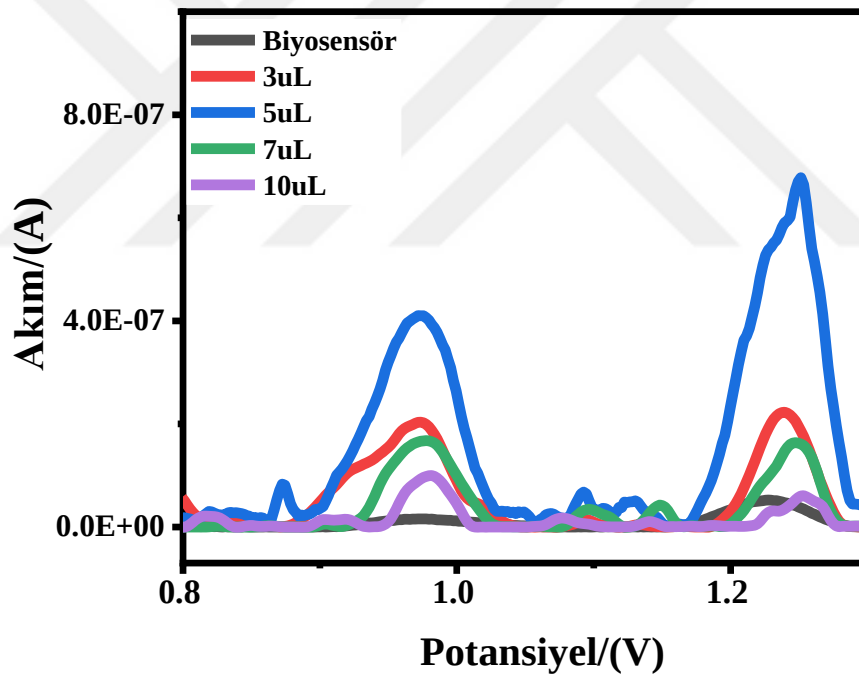


Şekil 4.44 Artan *dsDNA* derişiminin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

4.5.2.3 Modifikasyon materyali için damlatma optimizasyonunun gerçekleştirilmesi

Modifikasyon optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra 4 mg H⁺ 0,5 mg NH₂- MWCNT malzeme kombinasyonu ile daha tekrar edilebilir sonuçlar almak ve pik akımının en yüksek olduğu damlatma miktarını belirleyebilmek amacıyla damlatma miktarı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.45).

Bu modifikasyon kompozisyonu boş camısı karbon elektrot yüzeyine damlat-kurut yöntemiyle sırasıyla 3- 5- 7 ve 10 µl'de hacimde kaplandığında en yüksek pik akımının 5 µl miktarında elde edildiği gözlenmiştir. Böylece optimum modifikasyon bileşimi 4 mg H⁺ 0,5 mg NH₂- MWCNT olarak belirlenirken, optimum damla miktarı 5 µl olarak belirlenmiştir.



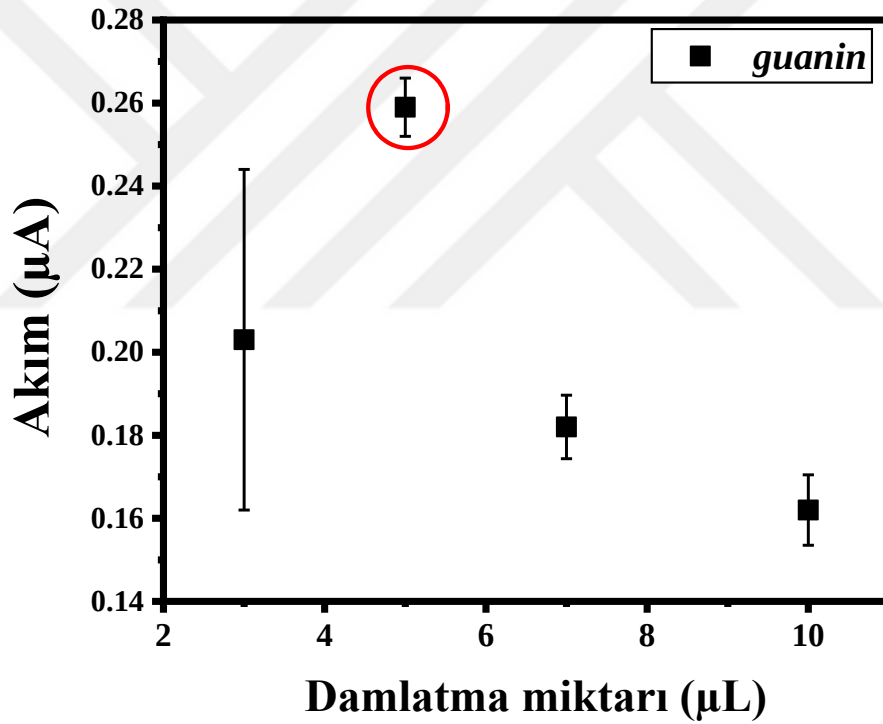
Şekil 4.45 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesi

Şekil 4.46 ve şekil 4.47 sırasıyla damlatma miktarının guanin ve adenin sinyaline etkisinin hata çubuklu grafiklerini içermektedir. Grafikler guanin açısından incelendiğinde 5 µl ve 7 µl damlatma miktarlarının en az hata oranına sahip olduğunu

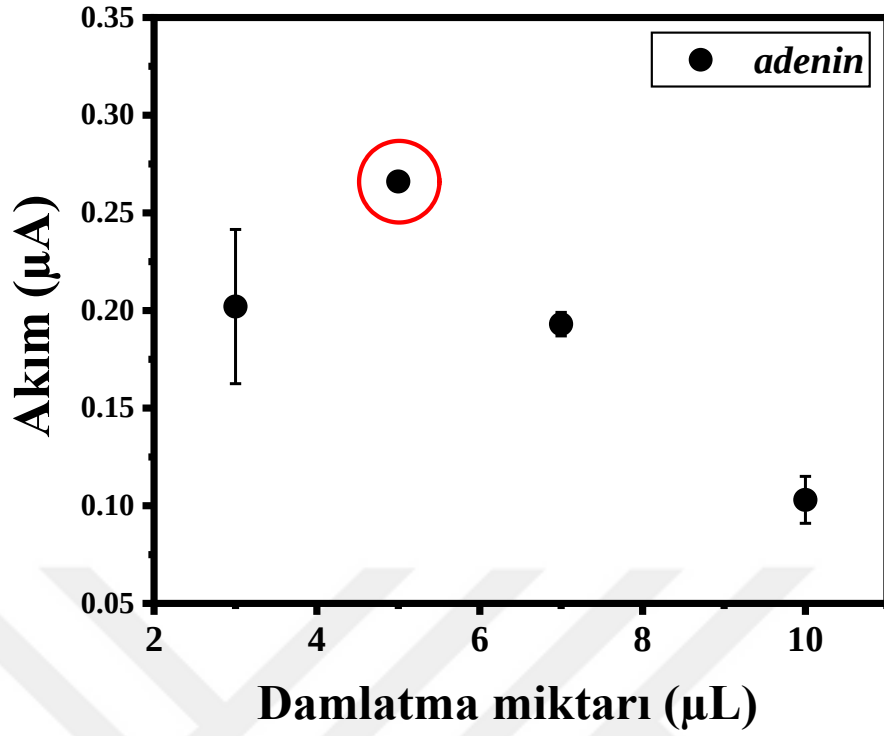
göstermektedir. Fakat 5 μ l damlatma miktarı guaninin pik akımını daha çok arttırdığı için optimum damlatma miktarı olarak 5 μ l belirlenmiştir.

Grafikler adenin açısından incelendiğinde ise 3 μ l damlatma miktarı haricinde elde edilen diğer tüm sonuçların hata oranının oldukça düşük olduğu görülmektedir. 3 μ l damlatma miktarının hata oranının bu kadar yüksek olmasının sebebi modifikasyon miktarının hacimce çok küçük olmasından kaynaklı olarak elektrot yüzeyini tam olarak kaplamaması ve bunun sonucunda modifikasyon malzemesinin elektrot yüzeyinde homojen bir şekilde etki gösterememesinden olduğu öngörülmüştür.

Sonuç olarak hem guanin hem de adenin pik akımlarını en az hata ile arttıran damlatma hacmi 5 μ l olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.46 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin guanin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin hata çubuklu halleri ile incelenmesi

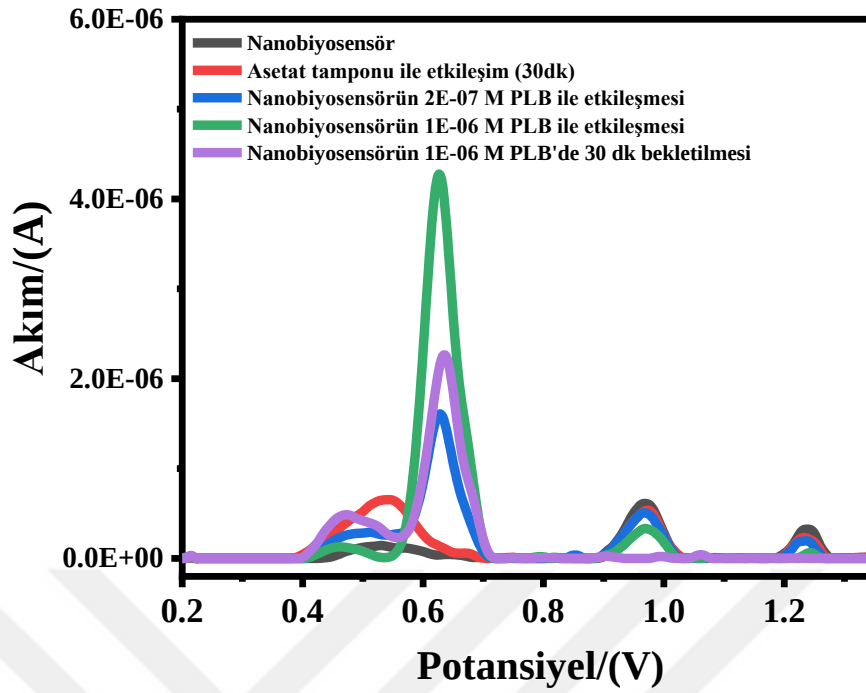


Şekil 4.47 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin hata çubuklu halleri ile incelenmesi

4.5.2.4 Derişim optimizasyonu

Optimum analitik koşulları bulmak için, palbosiklib derişiminun *dsDNA*'nın voltametrik sinyalleri üzerindeki etkisi, diferansiyel puls voltametrisi tekniği ile pH 4.7 asetat tamponunda nanobiyosensörler kullanılarak araştırılmıştır.

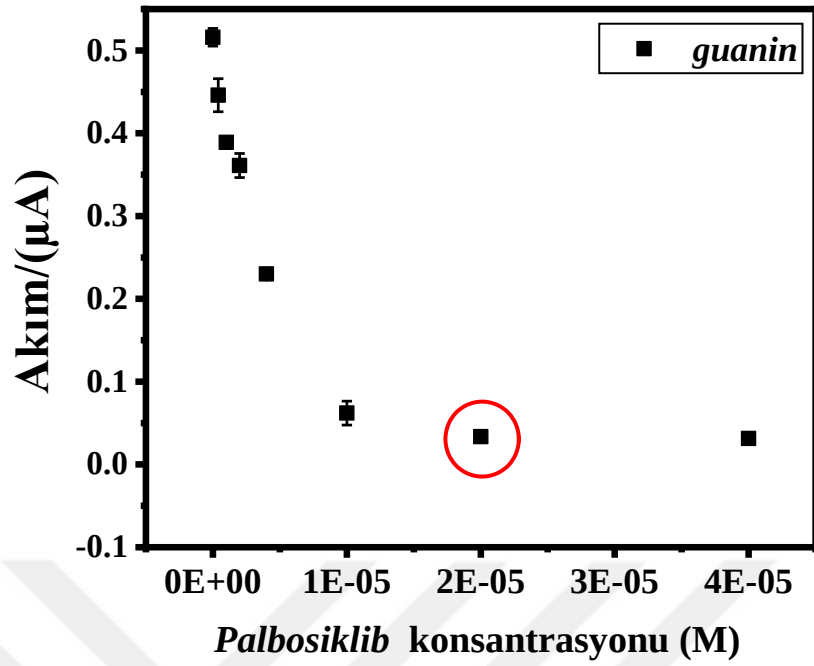
Şekil 4.48 nanobiyosensör, asetatla etkileşim, nanobiyosensörün 2×10^{-7} ve 1×10^{-6} M PLB ile 30 dk etkileşmesi ve nanobiyosensörün 1×10^{-6} M PLB'de 30 dk bekletilmesine ait voltammogramları içermektedir. Voltammogramlar incelendiğinde modifikasyon dispersiyonu sayesinde oldukça düşük 2×10^{-7} M PLB derişiminde bile etkileşimin incelenebildiği görülmektedir. Ayrıca elektrot yüzeyinin modifiye edilmesi palbosiklib yükseltgenme sinyalini önemli ölçüde arttırmıştır.



Şekil 4. 48 Nanobiyosensör, asetat tamponu ile etkileşim, nanobiyosensörün 2×10^{-7} ve 1×10^{-6} M PLB ile 30 dk etkileşmesi ve nanobiyosensörün 1×10^{-6} M PLB'de 30 dk bekletilmesine ait voltammogramlar

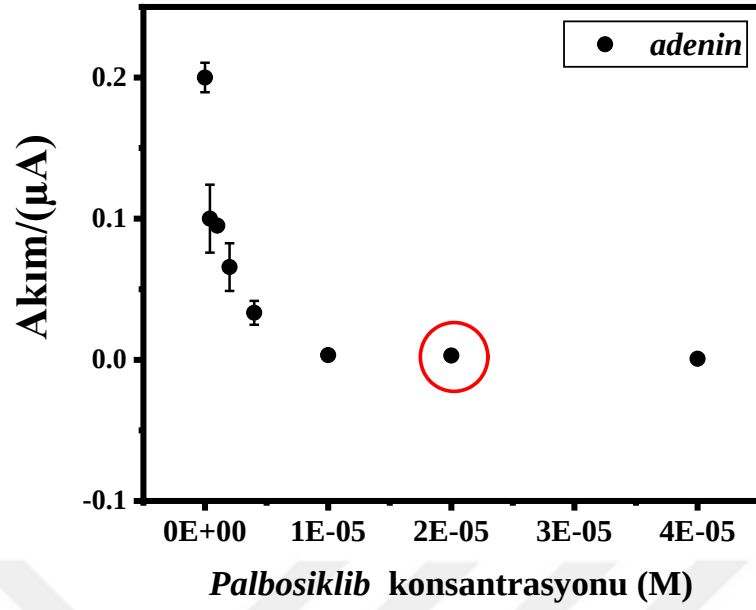
Şekil 4.49 üç kere tekrarlanan bu deneylerin sonuçları için hata çubuk grafiklerini göstermektedir.

Nanobiyosensör, 2×10^{-7} - 4×10^{-5} M aralığında farklı palbosiklib derişimlerine daldırılmış ve 30 dk bekletilmiştir. Guanin pik akımları 2×10^{-5} M derişime kadar azalma gösterip bu derişimden sonra doygunluk sınırına ulaşıldığı için azalma yerini sabitlenmeye bırakmıştır. Bu nedenle optimum derişim miktarı olarak 2×10^{-5} M seçilmiştir. Sonuç olarak artan palbosiklib derişimi etkisiyle guanin pik akımları doğrusal olarak azalmıştır.



Şekil 4.49 pH 4,70 asetat tamponunda nanobiyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde guanine yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

Optimizasyon sonuçları adenin açısından değerlendirildiğinde ise benzer durum söz konusudur. Belli bir azalma eğiliminden sonra pik akım değeri sabitlenmekte ve hata oranı minimum düzeye ulaşmaktadır. Bu nedenle adenin için de optimum derişim miktarı olarak 2×10^{-5} M seçilmiştir.

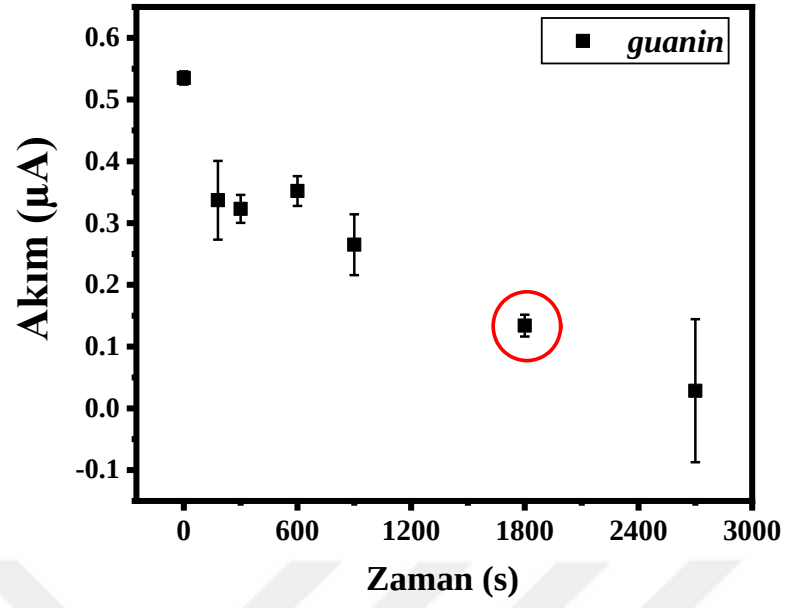


Şekil 4. 50 pH 4,70 asetat tamponunda nanobiyosensörün artan palbosiklib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

4.5.2.5 Süre optimizasyonu

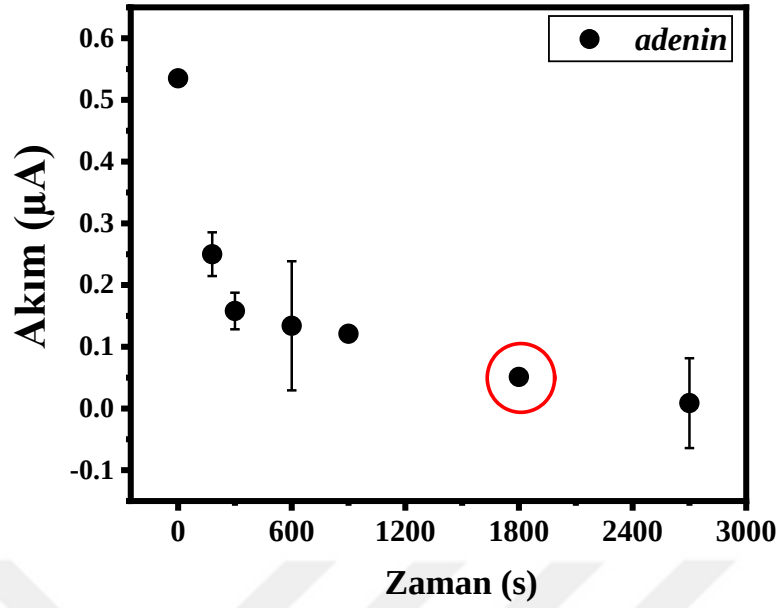
Optimum analitik koşulları bulmak için, palbosiklib ile etkileşim süresinin *dsDNA*'nın voltametrik sinyalleri üzerindeki etkisi, diferansiyel puls voltametrisi tekniği ile pH 4,7 asetat tamponunda nanobiyosensör kullanılarak araştırılmıştır. Palbosiklib 'in etkileşim derişimi optimizasyonundan sonra, 2×10^{-5} M pallbosiklib derişimunda 3- 45 dk aralığında etkileşim süresi deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.51 üç kere tekrarlanan deney sonuçlarının guanin sinyali için hata çubuklu grafiklerini göstermektedir. Sonuçlar incelendiğinde 15 dk'dan 45 dk'ya kadar etkileşimin etkisiyle pik akımında düzenli bir azalış gözlenmiştir. Süre optimizasyonu deneylerinde 45 dk en düşük pik akımının gözleendiği süre olsa da hata oranının yüksek olması sebebiyle optimum etkileşim süresi 30 dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 51 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin guanin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

Sonuçlar adenin yükseltgenme sinyalleri üzerinden değerlendirildiğinde ise guaninin davranışı ile paralellik gösterdiği gözlemlenmiştir. 10 dk ve 45 dk en çok hata oranının elde edildiği etkileşim süreleri olup tekrar edilebilir cevaplar alınamamıştır. Pik akımının en çok düştüğü etkileşim süresi 30 dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 52 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

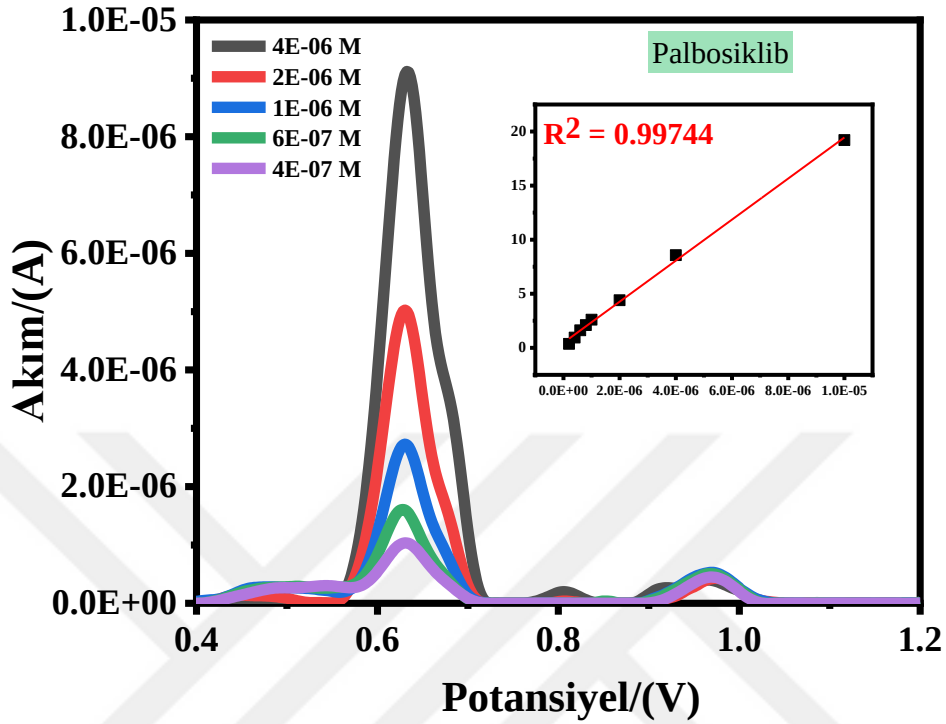
4.5.2.6 Analitik performansın incelenmesi

Nanobiyosensör ile elde edilen palbosiklib-dsDNA etkileşim sonuçları sayesinde, farmasötik dozaj formlarında palbosiklib'in tayini için bir elektroanalitik yöntem geliştirilmiştir.

Etkileşim sonrasında guanin ve adenin sinyallerinde gözlenen azalma üzerinden 4×10^{-7} - 1×10^{-5} M palbosiklib derişim aralığında doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Ayrıca palbosiklib ve dsDNA ile etkileşiminden sonra palbosiklib pik akımının artması da analitik performans açısından değerlendirilmiştir. İlgili kalibrasyon grafikleri ve regresyon denklemleri aşağıda verilmiştir. Kalibrasyon denkleminin parametreleri ve gerekli olan yöntem geçerlilik testleri **çizelge 4.1**'de özetlenmiştir. Bu sonuçlar geliştirilen nanobiyosensörün analitik performansını ortaya koymaktadır

Teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri hesaplanarak **çizelge 4.1**'de verilmiştir. Geliştirilen yöntemin gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik parametreleri, bağıl standart sapmalar (BSS %) ile birlikte tanımlanmıştır. **Çizelge 4.1** de önerilen nanobiyosensörün doğrusallık, kesinlik ve duyarlılık parametre sonuçları

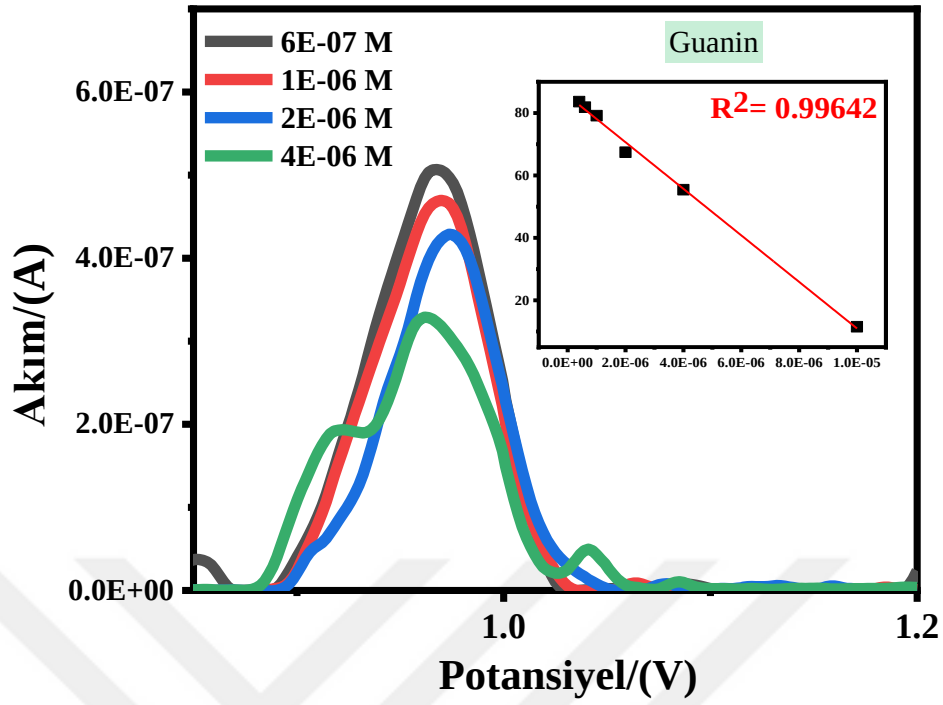
incelendiğinde, geliştirilen yöntem ile palbosiklib'in farmasötik dosaj formlarından tayin edilebileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4. 5.3×10^{-7} - 1×10^{-5} M derişim aralığında pH 4,7 asetat tamponu içerisinde palbosiklib yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğı

Şekil 4.53 2×10^{-7} - 1×10^{-5} M derişim aralığında pH 4,7 asetat tamponu içerisinde palbosiklib yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğini göstermektedir. Grafiğı göre palbosiklib için elde edilen doğrusallık aralığı içerisinde (2×10^{-7} - 1×10^{-5}) korelasyon katsayısı değeri 0,999 olarak belirlenmiştir.

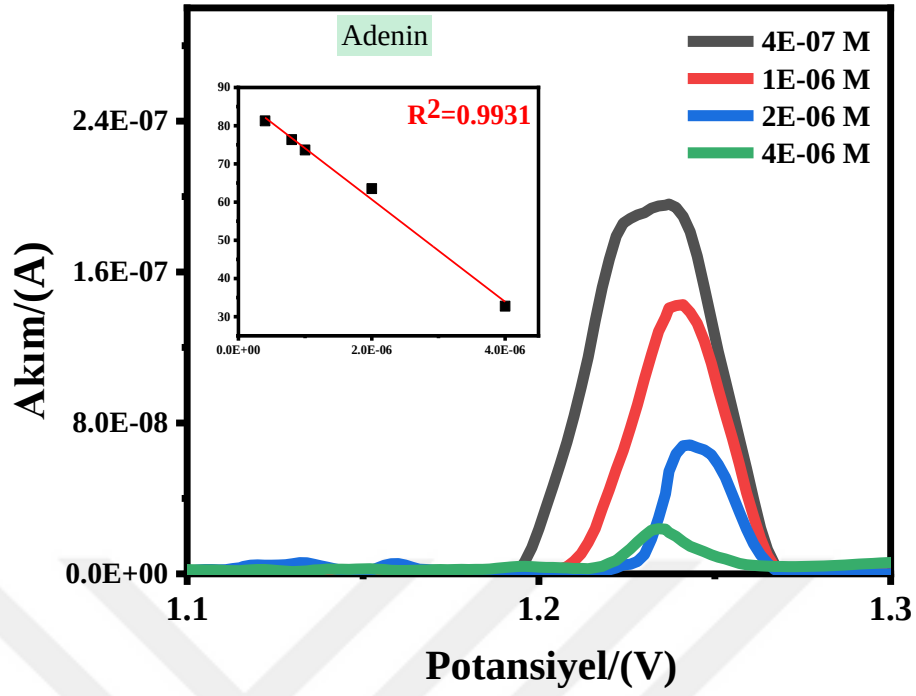
Ayrıca çizelge 4.1 incelendiğinde palbosiklib için elde edilen teşhis ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla $4,82 \times 10^{-8}$ ve $1,46 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur.



Şekil 4.54 4×10^{-7} - 1×10^{-5} M derişim aralığında pH 4,7 asetat tamponu içerisinde guanin yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğı

Şekil 4.54 4×10^{-7} - 1×10^{-5} M derişim aralığında pH 4,7 asetat tamponu içerisinde guanin yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğini göstermektedir. Grafiğıe göre guanin için elde edilen doğrusallık aralığı içerisinde (4×10^{-7} - 1×10^{-5}) korelasyon katsayı değeri 0,998 olarak belirlenmiştir.

Ayrıca çizelge 4.1 incelendiğinde palbosiklib için elde edilen teşhis ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla $9,91 \times 10^{-8}$ ve $3,00 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur.



Şekil 4.55 4×10^{-7} - 1×10^{-5} M derişim aralığında pH 4,7 asetat tamponu içerisinde adenin yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğı

Şekil 4.55 4×10^{-7} - 1×10^{-5} M derişim aralığında pH 4,7 asetat tamponu içerisinde adenin yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğini göstermektedir. Grafiğıe göre adenin için elde edilen doğrusallık aralığı içerisinde (4×10^{-7} - 1×10^{-5}) korelasyon katsayı değeri 0,999 olarak belirlenmiştir.

Ayrıca çizelge 4.1 incelendiğinde palbosiklib için elde edilen teşhis ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla $8,43 \times 10^{-8}$ ve $2,56 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Palbosiklib için geliştirilen analitik yönteme ait analiz bulguları

	Palbosiklib	Guanin	Adenin
Ölçülen pik potansiyeli (V)	0,630	0,958	1,222
Doğrusallık aralığı (M)	$2 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$
Eğim ($\mu\text{A M}^{-1}$)	$2,20 \times 10^6$	$-7,46 \times 10^6$	$-1,34 \times 10^7$
Kesme noktası (μA)	$1,71 \times 10^{-1}$	$8,55 \times 10^1$	$8,75 \times 10$
Korelasyon katsayısı (r)	$9,99 \times 10^1$	$-9,98 \times 10^1$	$-9,97 \times 10^1$
Teşhis sınırı /TS (M)	$4,82 \times 10^{-8}$	$9,91 \times 10^{-8}$	$8,43 \times 10^{-8}$
Tayin alt sınırı/TAS (M)	$1,46 \times 10^{-7}$	$3,00 \times 10^{-7}$	$2,56 \times 10^{-7}$
Pik akımlarının gün-içi tekrarlanabilirliği (BSS %) ^a	2,37	3,12	1,33
Pik potansiyellerinin gün-içi tekrarlanabilirliği (BSS %) ^a	0,09	0,12	0,82
Pik akımlarının günler-arası tekrarlanabilirliği (BSS %)	1,83	3,97	2,27
Pik potansiyellerinin günler-arası tekrarlanabilirliği (BSS %)	0,09	0,06	0,94

4.5.2.7 Farmasötik dozaj formlarında uygulama

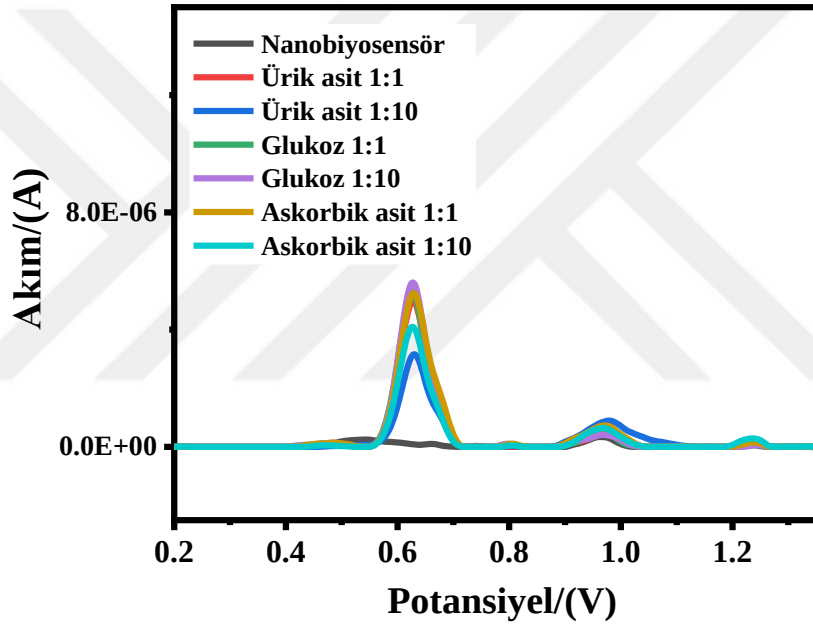
Farmasötik dozaj form uygulamaları genel olarak analitik kimya da ekstraksiyon, buharlaştırma veya filtrasyon adımı gibi zaman alıcı basamaklar ile yürütülmektedir. Bu bakımdan elektroanalitik yöntemlerin diğer analitik yöntemlere göre önemli bir avantajı bulunmaktadır. Nanobiyosensör aracılığıyla geliştirilen yöntem ile tablet dozaj formlarında palbosiklib'in doğrudan miktarının belirlenmesi sağlanmıştır. Doğruluk çalışmaları için, tablet dozaj formu örneklerine bilinen miktarlarda palbosiklib eklenmiştir. Sonuçlar **çizelge 4.2** 'de verilmiştir. Tüm sonuçlar, önerilen nanobiyosensörün yeterli doğruluk ve kesinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Geliştirilen yöntemin gerçek numunelerde palbosiklib'in miktar tayini için önemli bir performansa sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2 Farmosötik dozaj form uygulamasından elde edilen analitik veriler

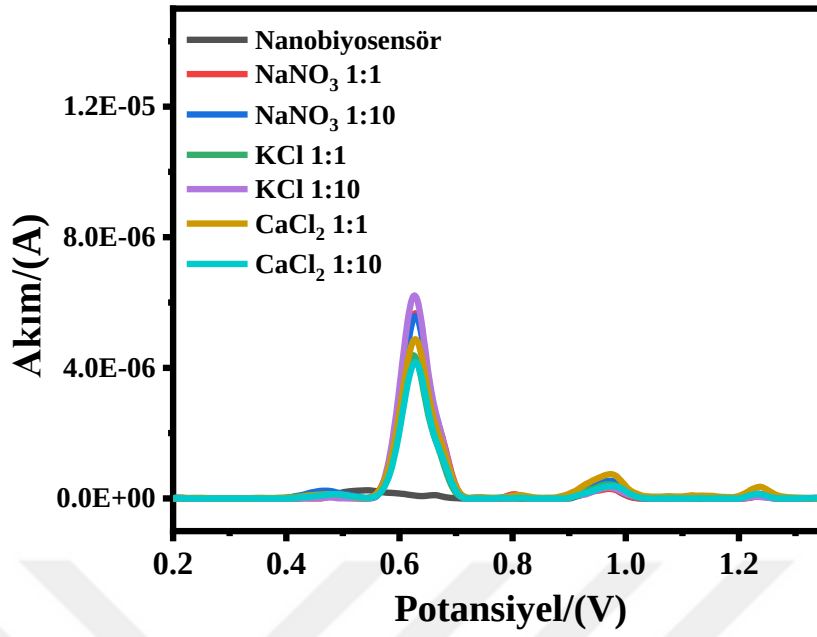
	Palbosiklib	Guanin	Adenin
Tablette bulunan madde miktarı (mg)	125	125	125
Bulunan miktar ^a (mg)	124,87	124,34	123,21
BSS%	0,45	2,38	0,73
Bias%	0,14	0,52	1,43
Eklenen (M)	$1,99 \times 10^{-6}$	$1,96 \times 10^{-6}$	$1,94 \times 10^{-6}$
Bulunan ^a (M)	99,9	98,25	97,05
BSS% Geri kazanım	3,57	0,58	1,33
Bias%	0,08	1,75	2,95

4.5.2.8 Girişim Çalışması

Geliştirilen nanobiyosensörün üstünlüğünü açıklayabilmek için çeşitli girişim yapabilecek bileşiklerle test edilmesi önemlidir. Askorbik asit, ürik asit, glukoz, NaNO_3 , KCl ve CaCl_2 gibi girişim maddelerinin varlığında nanobiyosensör sinyalleri kararlı ve tekrarlanabilir sonuçlar vermelidir. Vücut sıvı sisteminde yaygın olarak bulunan bu maddelerin palbosiklib-dsDNA etkileşimi üzerindeki etkilerinin sonuçları aşağıda verilen voltamogramlarda (Şekil 4.56 ve Şekil 4.57) gösterilmiştir. Sonuçlar nanobiyosensör ile karşılaştırıldığında, girişim maddelerinin pik akımını önemli ölçüde değiştirmedini göstermiştir.



Şekil 4.56 Ürik asit, glukoz ve askorbik asitin 1:1 ve 1:10 oranlarında varlığında kaydedilen voltammogramlar



Şekil 4.57 NaNO_3 , KCl ve CaCl_2 ’nin 1: 1 ve 1: 10 oranlarında varlığında kaydedilen voltammogramlar

Voltammogramlar incelendiğinde çözelti ortamında CaCl_2 ve ürik asitin 1: 10 oranındaki varlığında nanobiyosensör yükseltgenme sinyalinin arttırdığı sonucuna varılmıştır.

4.5.3 Palbosiklib üzerine yapılan spektrofotometrik çalışmalar ve elde edilen bulgular

Palbosiklib’in *dsDNA* ile etkileşimini daha iyi aydınlatabilmek amacıyla UV-spektrofotometre analizinden yararlanılarak bağlanma katsayısı hesabı gerçekleştirilmiştir.

Buna göre hazırlanan palbosiklib çözeltisine belli aralıklarla küçük miktarlarda ($1\mu\text{l}$) *dsDNA* eklemeleri yapılarak bir titrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Eklenen *dsDNA* etkisiyle meydana gelen etkileşim UV spektrumunda palbosiklib’in absorbansındaki artmaya karşılık gelmiştir.

200–600 nm dalga boyu aralığında kaydedilen spektrumlar palbosiklib’in 354 nm dalga boyunda absorbans verdiğini doğrulamıştır. Titrasyon boyunca eklenen *dsDNA* miktarı etkisiyle palbosiklib pikinde yaklaşık 4 nm’ye kadar uzun dalga boyuna doğru bir

kayma gözlenmiştir (batokromik etki). Batokromik kayma, ilaç etken maddenin dsDNA'ya kısmi interkalasyon ile bağlanma olabileceğini göstermektedir. (Cui vd. 2011). Buna göre voltametrik yorumlamalara da dayanılarak palbosiklib'in dsDNA ile interkalasyon yönünden etkileştiği tahmin edilmektedir.

Elde edilen sonuçlar doğrusal olmayan regresyon analizi yöntemiyle değerlendirildiğinde bağlanma katsayısı (k) $3,98 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.58). Bu yöntemde aşağıdaki eşitlikten faydalanılmıştır;

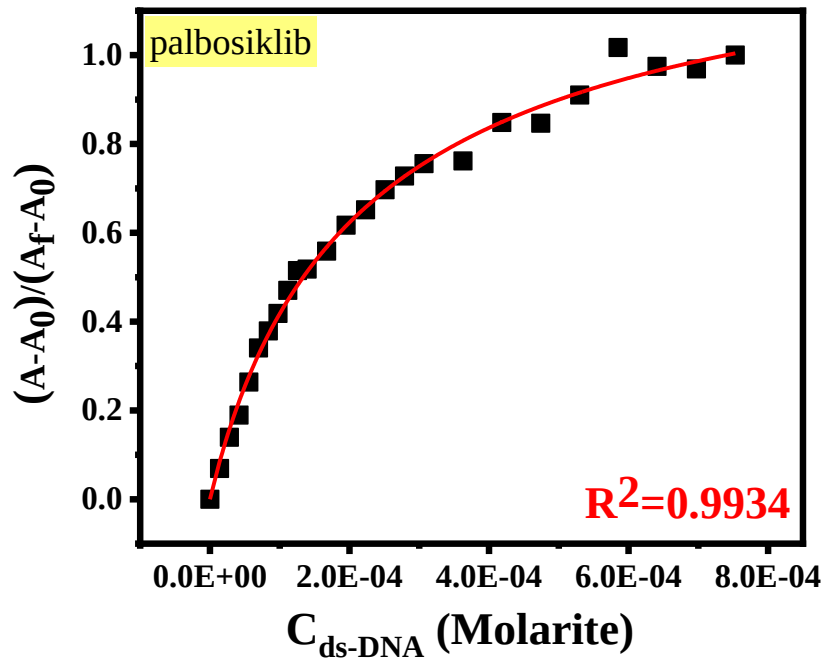
$$\frac{A - A_0}{A_f - A_0}$$

Bu eşitlikte;

A= İlacın absorbans değeri

A₀= Başlangıç derişiminin absorbans değeri

A_f= Bitiş derişiminin absorbans değeri



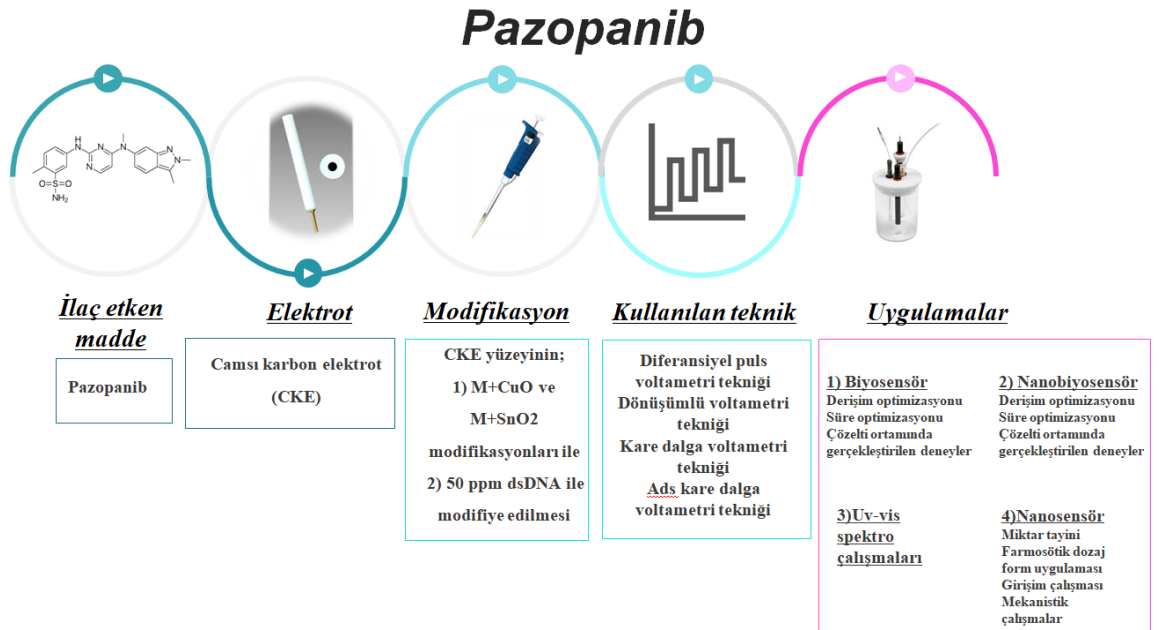
Şekil 4.58 Palbosiklib ve dsDNA arasında ilişkinin doğrusal olmayan regresyon analizi yöntemiyle gösterilmesi

4.6 Pazopanib Üzerine Yapılan Voltametrik Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular

Pazopanib'in biyosensör ve nanobiyosensör üzerine yapılan voltametrik araştırması, camısı karbon elektrot ile diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pazopanib'in çeşitli derişimlerinin farklı sürelerde çift sarmal DNA ile etkileşimi hazırlanan biyosensör ve nanobiyosensörler ile incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında öncelikle biyosensöre ait derişim ve süre incelemeleri gerçekleştirildikten sonra çözelti ortamında deneyler gerçekleştirilerek etkileşmenin türü hakkında yorumlamalar yapılmıştır. Pazopanib etken maddesinin biyosensör kısmına ait deneysel incelemeleri tamamlandıktan sonra elektrot yüzeyi atık maskelerden elde edilen karbon malzeme ve küresel morfolojiye sahip SnO₂ nanoparçacıklar ile modifiye edilerek nanobiyosensör deney aşamasına geçilmiştir.

Nanobiyosensör incelemeleri kapsamında materyal seçimi ve damlatma optimizasyonları, derişim ve süre optimizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Pazopanib'in DNA ile etkileşim deneylerinde sadece adenin bazının yükseltgenme sinyali üzerinden değerlendirmeler yapılabilmektedir. Bunun sebebi pazopanib etken maddesi ile guanin elektroaktif bazının yaklaşık aynı potansiyel değerinde yükseltgenmesinden kaynaklıdır. Pazopanib üzerine yapılan incelemelerin şematik gösterimi **şekil 4.59**'de verilmiştir.



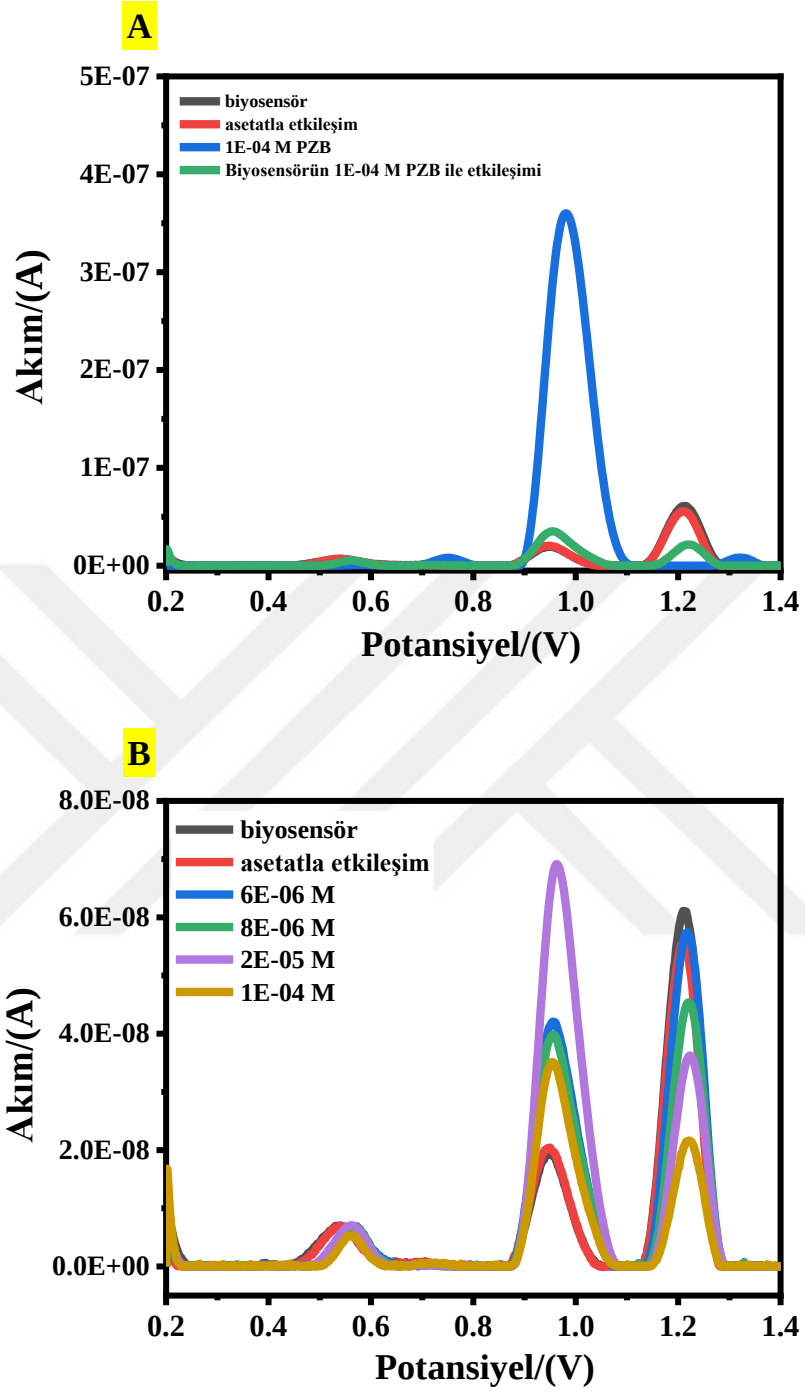
Şekil 4.59 Pazopanib üzerine yapılan incelemelerin akış şeması

4.6.1 Pazopanib ile DNA etkileşmesinin camısı karbon elektrot kullanılarak, adenin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesinde elde edilen bulgular

4.6.1.1 Derişim optimizasyonu

Pazopanib'in, boş camısı karbon elektrot yüzeyinde 0,978 V'da (akımlarda değeri 0,789 μ A) yükseltgenme sinyali verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.60.a). Biyosensöre ait voltammogramlar incelendiğinde ise guanin ve adeninin sırasıyla 0,954 V ve 1,222 V'da yükseltgendiği görülmüştür. Hazırlanan biyosensör 1×10^{-4} M pazopanib ile etkileştirildiğinde pazopanib'in yükseltgenme pikinin guanin yükseltgenme piki ile yaklaşık aynı potansiyelde bulunduğu gözlemlenmiştir. Etkileşim adenin sinyali üzerinden incelendiğinde ise sinyalin daha pozitif potansiyele kaydığı görülmüştür (1,232 V).

DNA'nın elektroaktif bazı adenin'e ait +1,222 V 'da gözlenen yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden incelediğimizde, elde edilen diferansiyel puls voltamogramı aşağıdaki gibidir (Şekil 4.60.b). Derişim optimizasyonu için 6×10^{-6} - 1×10^{-4} M pazopanib derişim aralığında çalışılmış ve elde edilen sinyaller biyosensör cevabı ile karşılaştırılarak pik akımlarındaki düşüşler dikkate alınmıştır. Sonuçlar incelendiğinde DNA ile en iyi etkileşimin gözlemlendiği derişim 1×10^{-4} M olarak belirlenmiştir.

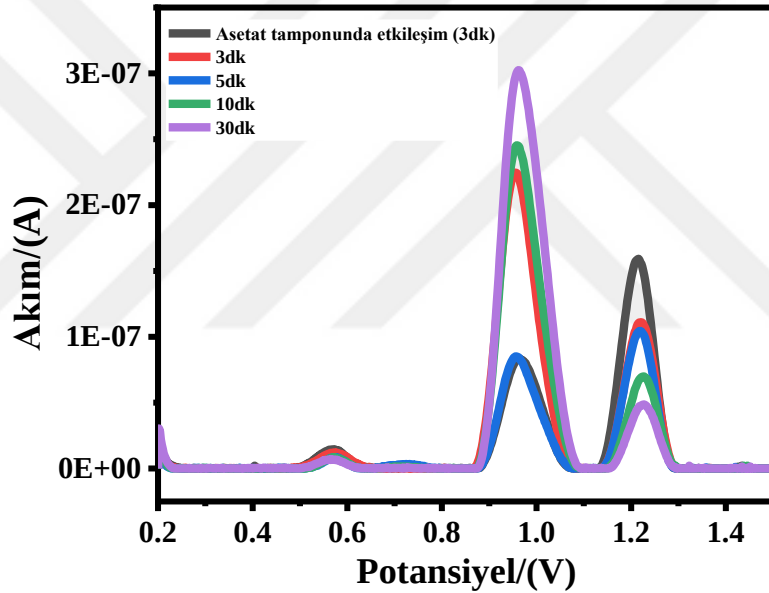


Şekil 4.60 A) Biyosensör, asetat ile etkileşim, 1×10^{-4} M pazopanib ve biyosensörün 1×10^{-4} M pazopanib ile etkileşimine ait voltammogramlar B) pH 4,7 asetat tamponu ortamında artan pazopanib derişiminun guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin voltammogramlar ile incelenmesi

Derişim taraması sonuçları değerdendirildiğinde pazopanib ile dsDNA'nın yüksek derişimlerde etkileştiğı gözlemlenmiştir. Duyarlılığı arttırmak ve daha düşük derişim değerdelerinde etkileşimi inceleyebilmek amacıyla bu etken madde için nanobiyosensör çalışmaları yapılmıştır.

4.6.1.2 Süre optimizasyonu

Optimum pazopanib derişimu belirlendikten sonra 1×10^{-4} M pazopanib çözeltisinde sırasıyla 3-5-10-30 dk aralıklarla etkileşim süresi çalışmaları yapılmıştır. dsDNA biyosensörünün belirlenen zaman aralıklarında 1×10^{-4} M pazopanib çözeltisine daldırılmasından sonra elde edilen elektrokimyasal sinyaller izlenmiş ve elde edilen voltamogramlar şekilde 4.61'de gösterilmiştir.

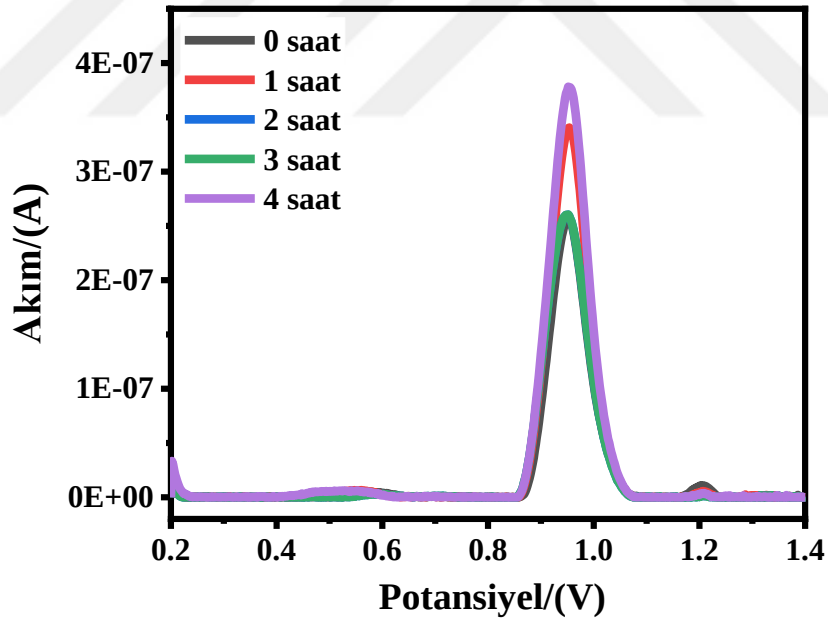


Şekil 4.61 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar

Sonuçlar değerdendirildiğinde etkileşimin en iyi gözlemlendiğı süre 30 dk olarak belirlenmiştir.

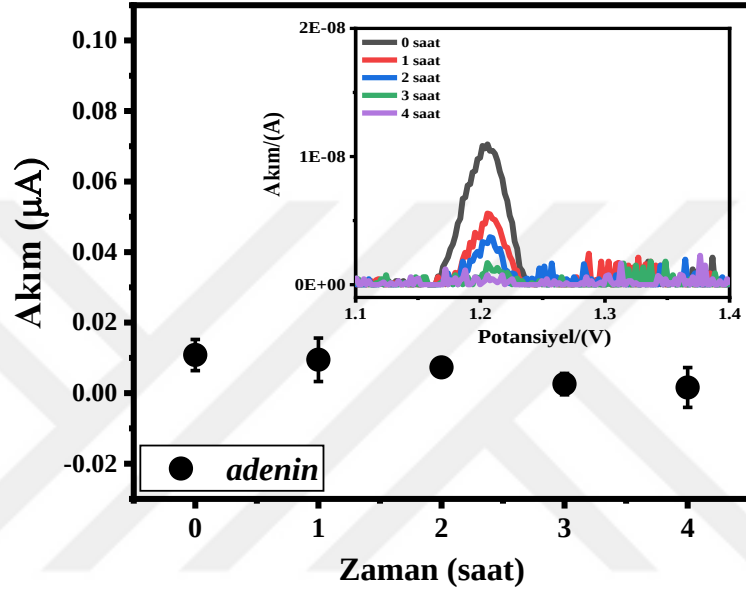
4.6.1.3 Çözelti ortamında gerçekleştirilen incelemeler

Pazopanib'in çözelti içinde *dsDNA* ile bekletilmesi, pH 4,7 asetat tampon çözeltisi içinde hazırlanan 1×10^{-5} M pazopanib ve 100 ppm *dsDNA* karışımının yükseltgenme sinyallerinin kaydedilmesiyle izlenmiştir. Guanin ve adenin pik potansiyelleri sırasıyla 0,93 V ve 1,22 V'ta elde edilmiştir. Ayrıca pazopanib'in pik potansiyeli de 0,95 V'ta gözlemlenmiştir. Çözelti ortamından gerçekleştirilen deneylerde pazopanib'in *dsDNA* ile etkileşimi, farklı bekletme süreleri (1- 2- 3- 4 saat) uygulanarak araştırılmıştır. Elektrot yüzeyinde olası kirlilikleri önlemek için her ölçümden önce fiziksel ve elektrokimyasal temizlik yapılmıştır. Yükseltgenme sinyallerini karşılaştırabilmek amacıyla 100 ppm *dsDNA* ve 1×10^{-5} M pazopanib'in kontrol çözeltilerinin yükseltgenme sinyalleri de kaydedilmiştir (Şekil 4.62). Sonuç olarak 100 ppm *dsDNA* ve 100 ppm *dsDNA* ve 1×10^{-5} M pazopanib karışımı 1-4 saat aralığında bekletildikten sonra adenin elektrokimyasal sinyalinde önemli bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.63).



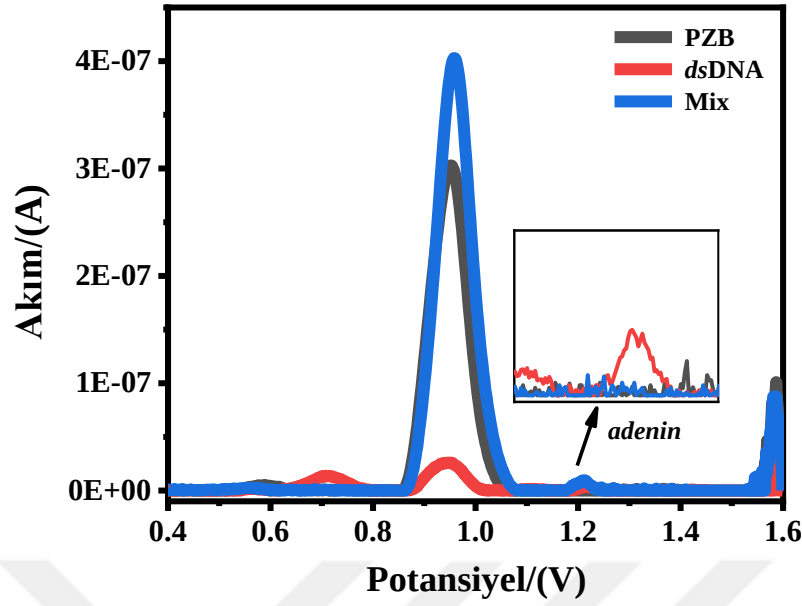
Şekil 4.62 Pazopanib ile *dsDNA* etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi 100 ppm *dsDNA*, 1×10^{-5} M pazopanib ve bunların karışımının 0- 4 saat aralığında kaydedilen voltammogramları

Şekil 4.62 incelendiğinde çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerde guanin ve palbosiklib'e ait pik akımları yaklaşık aynı potansiyel değerinde geldiği için yalnızca adenin yükseltgenme sinyalleri incelenmiştir. Şekil 4.63'de adenin yükseltgenme sinyallerine ait voltammogramlarda pik akımının değişen bekletme süresine bağlı olarak önemli bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir. Özellikle 4. saat sonunda pik akımı 0,0009µA'a kadar düşmüştür.



Şekil 4.63 Pazopanib ile dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; 100 ppm dsDNA, 1×10^{-5} M pazopanib ve bunların karışımının 3 saat sonra adenin yükseltgenme sinyallerine ait kaydedilen voltammogramlar

Sonuçların incelendiğinde en tekrar edilebilir ve en az hata oranına sahip etkileşimin 2. ve 3. saat sonunda elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.64 Pazopanib ile dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında gerçekleştirilen deneylerle incelenmesi; 100 ppm dsDNA, 1×10^{-5} M pazopanib ve bunların karışımının 3 saat sonra adenin yükseltgenme sinyallerine ait kaydedilen voltammogramlar

Voltammogramlar incelendiğinde guanin ve pazopanib yükseltgenme sinyallerinin yaklaşık aynı potansiyel değerinde geldiği gözlemlenmiştir.

4.6.2 Pazopanib için nanobiyosensör deneyleri

Pazopanib'in DNA ile etkileşimini daha iyi inceleyebilmek amacıyla elektrot yüzeyi atık maskeler hidrotermal karbonizasyonundan elde karbon malzeme (M) ve hidrotermal yöntemle sentezlenen SnO_2 nanoparçacıklar ile modifiye edilmiştir. Sentezlenen karbon malzemenin kullanıldığı durumda DNA'nın elektro aktif bazlarının pik akımları artmasına rağmen SnO_2 nanoparçacıklar ile çok daha yüksek pik akımları elde edilmiştir.

Ayrıca elektrot yüzeyinin sentezlenen karbon malzemeler ile modifiye edilmesiyle elektrot yüzeyi daha hassas hale gelmiş ve çok daha düşük pazopanib konsantrasyonlarında etkileşimin incelenmesi mümkün olmuştur.

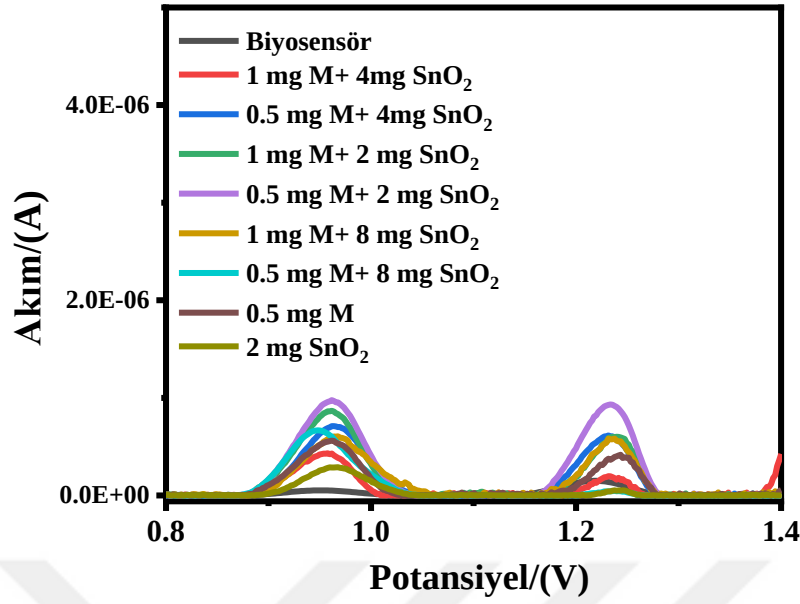
4.6.2.1 Modifikasyon materyalinin belirlenmesi

Şekil 4.65 M ve SnO₂ malzemelerinin modifikasyon malzemesi bakımından farklı oranlarda kullanımı hakkında bilgi vermektedir. M modifikasyon malzemesi guanin ve adeninin pik akımlarını kayda değer şekilde arttırmıştır. Sonuçlar incelendiğinde M karbon malzemesinin, SnO₂ nanoparçacıklardan daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, her iki malzeme birlikte kullanıldığında guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerinin önemli ölçüde yükseldiği sonucuna varılmıştır. Sonuçlar ileride gerçekleştirilecek farklı ilaç etken maddeleri ile DNA etkileşim çalışmaları için de bu modifikasyon çözümlerinin oldukça yararlı olacağını göstermektedir.

Özellikle 0,5 mg M+ 2 mg SnO₂ kombinasyonu en yüksek pik akım değerini vermiştir. Fakat bu çalışmada pazopanib ve guanin piki yaklaşık olarak aynı potansiyelde bulunduğu için yorumlamalar adenin piki üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Biyosensör ve nanobiyosensör, pazopanib ve dsDNA sinyalleri pik akımı açısından karşılaştırdığında adeninin pik akımı dsDNA biyosensöründe 0,150 µA iken nanobiyosensörde 0,932 µA olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, dsDNA yükseltgenme sinyalleri nanobiyosensör sayesinde önemli ölçüde arttırılmıştır.

Biyosensör ve nanobiyosensör, pazopanib ve dsDNA sinyalleri pik potansiyeli açısından karşılaştırdığında adenin pik potansiyeli dsDNA biyosensörü ile 1,211 V iken nanobiyosensörde 1,231 V olarak bulunmuştur. Modifikasyon dispersiyonu sayesinde pik potansiyeli biyosensörle karşılaştırıldığında daha pozitif potansiyel değerine kaymıştır.



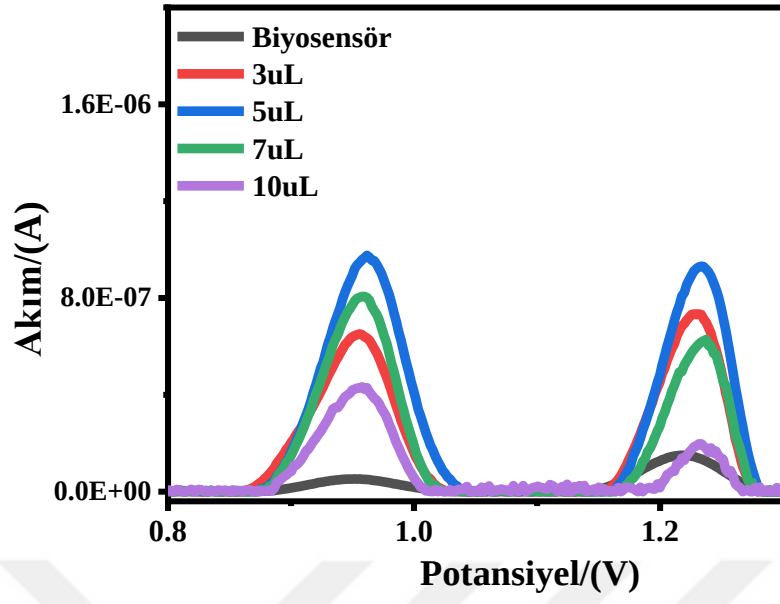
Şekil 4.65 Farklı oranlardaki modifikasyon dispersiyonlarının guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesi

Ayrıca sonuçlar incelendiğinde bütün modifikasyon dispersiyonlarının adenin ve guanin yükseltgenme sinyallerini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu modifikasyon dispersiyonu ileride gerçekleştirilebilecek ilaç-DNA etkileşim çalışmaları açısından büyük öneme sahiptir.

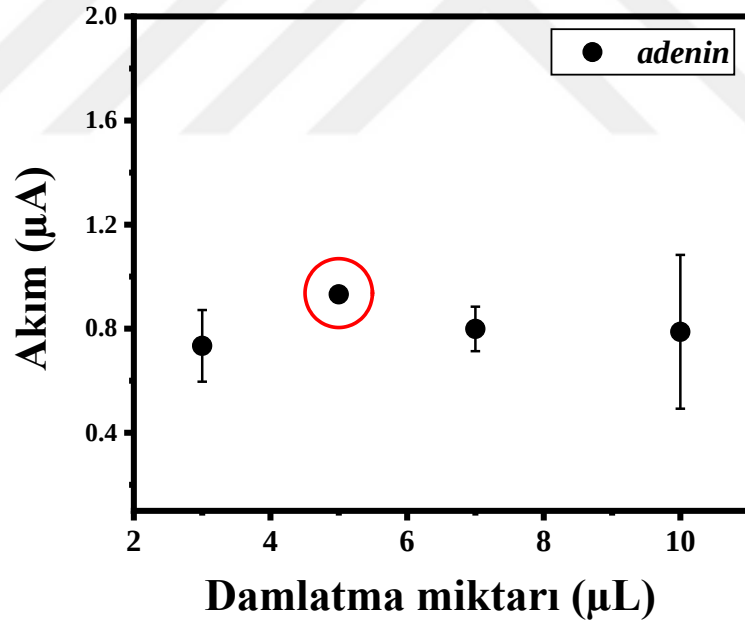
4.6.2.2 Modifikasyon materyali için damlatma optimizasyonunun gerçekleştirilmesi

Modifikasyon optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra 0,5 mg M+ 2 mg SnO₂ malzeme kombinasyonu ile daha tekrar edilebilir sonuçlar alabilmek ve pik akımının en yüksek olduğu damlatma miktarını belirleyebilmek amacıyla damlatma miktarı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.66).

Bu modifikasyon kompozisyonu boş camsı karbon elektrot yüzeyine damlat-kurut yöntemiyle sırasıyla 3- 5- 7 ve 10 µl'de hacimde kaplandığında en yüksek pik akımının 5 µl miktarında elde edildiği gözlenmiştir. Böylece optimum modifikasyon bileşimi 0,5 mg M+ 2 mg SnO₂ olarak belirlenirken, optimum damla miktarı 5 µl olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.66 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesi



Şekil 4.67 Farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılan modifikasyon çözeltilerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin hata çubuklu halleri ile incelenmesi

Sonuçlar adenin yükseltgenme sinyalleri açısından incelendiğinde (Şekil 4.67) 5 μ l damlatma miktarı dışında elde edilen diğer tüm sonuçların hata oranının oldukça yüksek

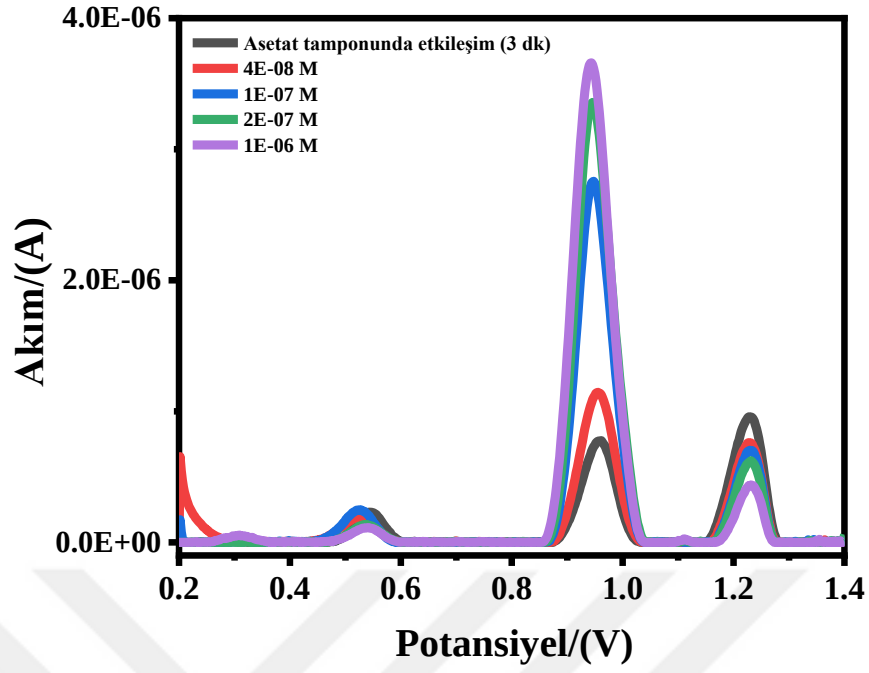
olduğu gözlemlenmiştir. 3 µl damlatma miktarının hata oranının yüksek olmasının sebebi modifikasyon miktarının hacimce çok küçük olmasından kaynaklı olarak elektrot yüzeyini tam olarak kaplamaması ve bunun sonucunda modifikasyon malzemesinin elektrot yüzeyinde homojen bir şekilde etki gösterememesinden kaynaklı olduğu öngörülmüştür.

Sonuç olarak guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerini en az hata ile arttıran damlatma hacminin 5 µl olduğunu göstermiştir.

4.6.2.3 Derişim optimizasyonu

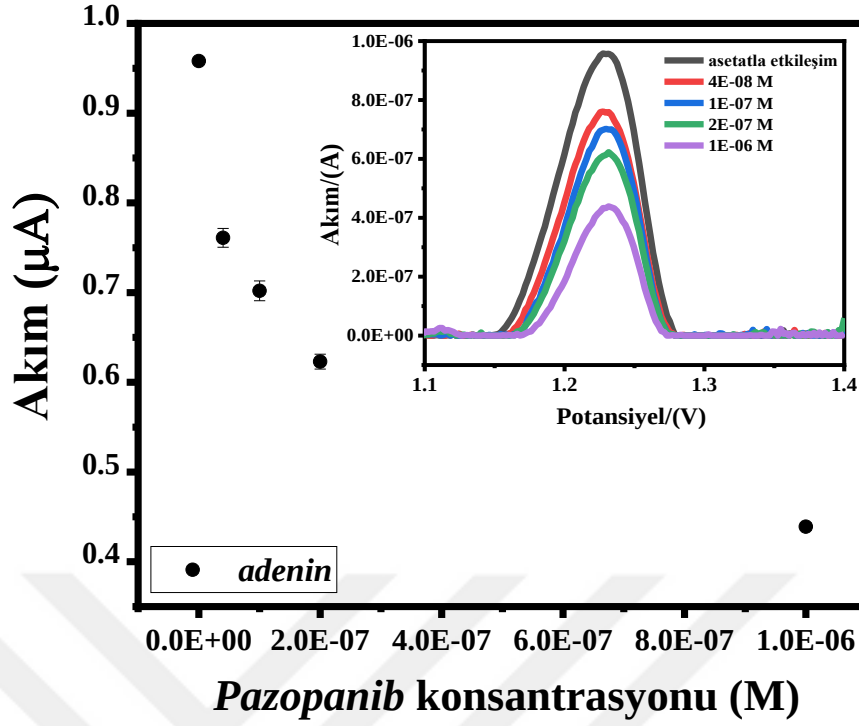
Optimum analitik koşulları bulmak için, pazopanib derişiminun *dsDNA*'nın voltametrik sinyalleri üzerindeki etkisi, diferansiyel puls voltametrisi tekniği ile pH 4,7 asetat tamponunda nanobiyosensörler kullanılarak araştırılmıştır **Şekil 4.68** etkileşim derişimine ait voltammogramları göstermektedir.

Nanobiyosensör, 4×10^{-8} - 1×10^{-6} M aralığında farklı pazopanib derişimlerine daldırılmış ve bekletilmiştir. Adenin yükseltgenme sinyalleri 1×10^{-6} M derişime kadar azalma gösterip bu derişimden sonra doygunluk sınırına ulaşıldığı için azalma yerini sabitlenmeye bırakmıştır. Bu nedenle optimum derişim miktarı 1×10^{-6} M seçilmiştir. Sonuç olarak artan pazopanib derişimi etkisiyle adenin yükseltgenme sinyalleri doğrusal olarak azalmıştır.



Şekil 4.68 pH 4,7 asetat tamponunda biyosensörün artan pazopanib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar

Şekil 4.69 üç kere tekrarlanan derişim taraması sonuçları için hata çubuklu grafikleri göstermektedir. Sonuçlar incelendiğinde etkileşimin en güçlü olduğu ve hata oranının en az olduğu derişim değeri 1×10^{-6} M olarak belirlenmiştir.

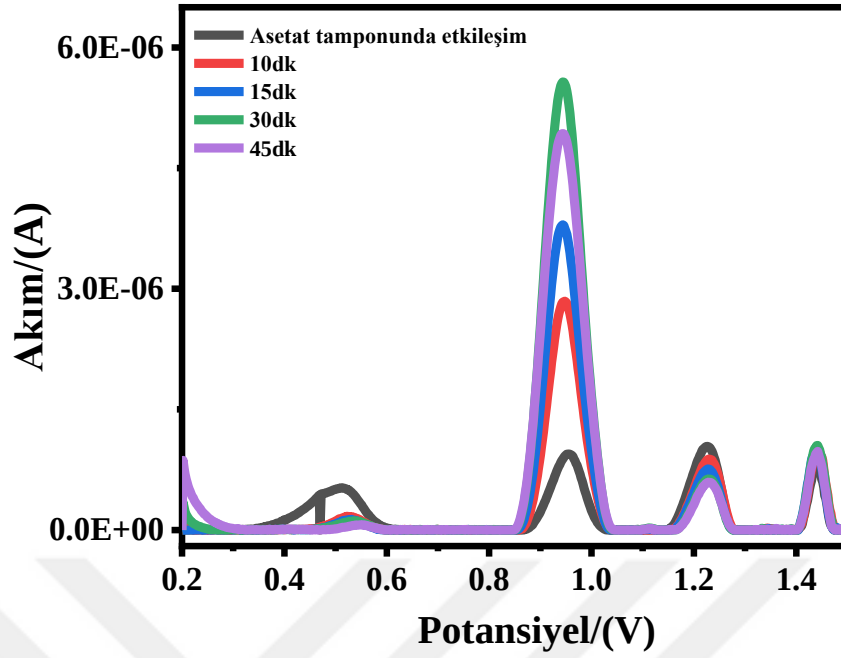


Şekil 4.69 pH 4,70 asetat tamponunda nanobiyosensörün artan pazopanib derişimlerinde adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

Nanobiyosensör sayesinde elektrot yüzeyinin hassasiyeti artırılmış ve ilaç-DNA etkileşim süreci biyosensöre kıyasla çok daha düşük derişimlerde incelenebilmiştir. Biyosensör için yapılan derişim optimizasyonu denemelerinde 6×10^{-6} - 1×10^{-4} M pazopanib derişim aralığında etkileşim incelenirken, nanobiyosensör için bu aralık çok daha düşük derişimlerde (4×10^{-8} - 1×10^{-6} M) olmuştur.

4.6.2.4 Süre optimizasyonu

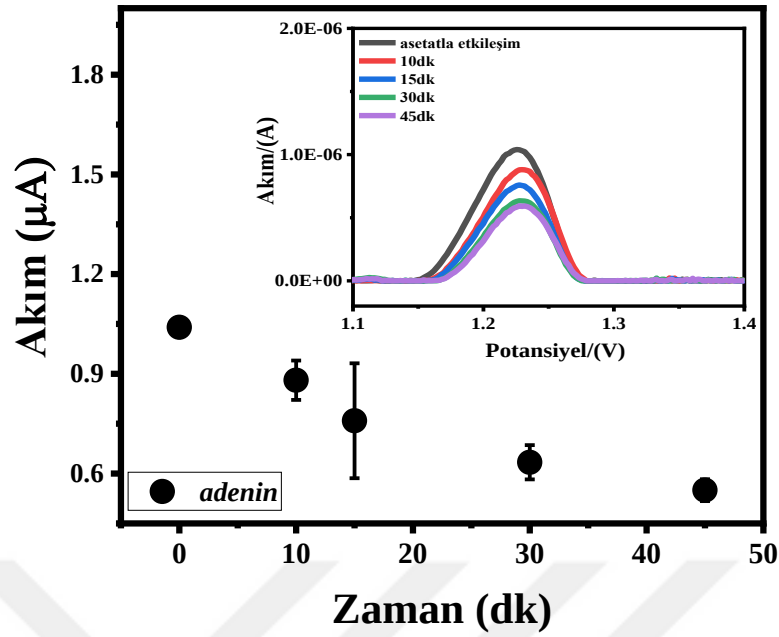
Optimum pazopanib derişimi belirlendikten sonra 1×10^{-6} M pazopanib çözeltisinde sırasıyla 10- 15- 30- 45 dk aralıklarla etkileşim süresi çalışmaları yapılmıştır. dsDNA biyosensörünün belirlenen zaman aralıklarında 1×10^{-6} M palbosiklib çözeltisine daldırılmasından sonra elde edilen elektrokimyasal sinyal izlenmiş ve elde edilen voltamogram şekilde 4.70’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 70 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine olan etkisini gösteren voltammogramlar

Şekil 4.71 süre optimizasyonu için tekrarlanan üç sonuç için değişen sürenin adenin yükseltgenme sinyalleri üzerinde etkisinin hata çubuklu grafiğini göstermektedir. Sonuçlar incelendiğinde 45 dk etkileşim süresinin en az hata oranına ve en iyi etkileşim süresine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle 15dk sonunda elde edilen sonuçlar için hata oranları oldukça yüksek olmuştur. 10 dk ve 30 dk etkileşim sürelerinde elde edilen sonuçların hata oranı düşük olmasına rağmen etkileşim yönünden zayıf kalmıştır.

Sonuç olarak optimum etkileşim süresi 45 dk belirlenmiştir.



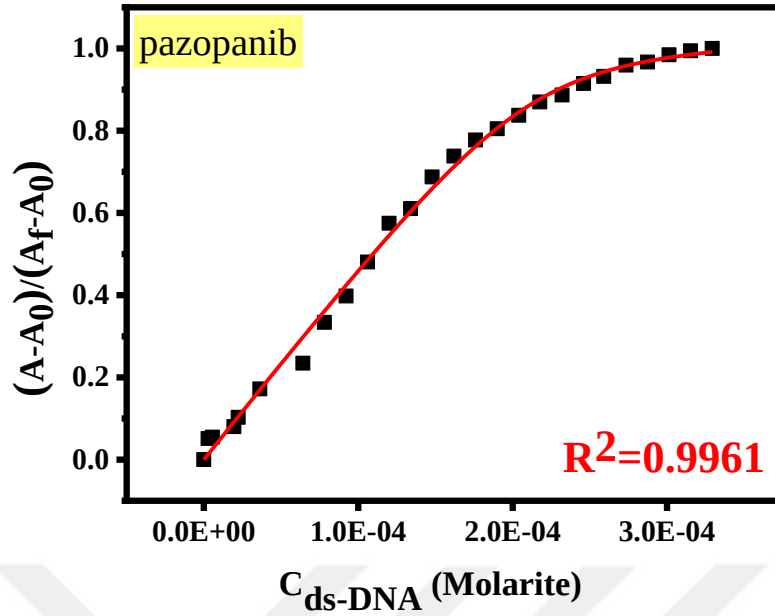
Şekil 4.71 pH 4,70 asetat tamponunda artan etkileşim sürelerinin adenin yükseltgenme sinyallerine etkisinin hata çubukları ile gösterilmesi

4.6.3 Pazopanib üzerine yapılan spektrofotometrik çalışmalar ve elde edilen bulgular

Pazopanib'in *dsDNA* ile etkileşimini daha iyi aydınlatabilmek amacıyla UV-spektrofotometre analizinden yararlanılarak bağlanma katsayısı hesabı gerçekleştirilmiştir.

Buna göre hazırlanan pazopanib çözeltisine belli aralıklarla küçük miktarlarda (1μl) *dsDNA* eklemeleri yapılarak bir titrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Eklenen *dsDNA* etkisiyle meydana gelen etkileşim UV spektrumunda pazopanib'in absorbansındaki azalmaya karşılık gelmiştir. Etkileşim etkisiyle ilaç pikinin absorbansının azalması hipokromik etki olarak tanımlanmaktadır.

200– 600 nm dalga boyu aralığında kaydedilen spektrumlar pazopanib'in 296 nm ve 314 nm dalga boyunda 2 absorbans piki verdiğini doğrulamıştır. İncelemeler ilk pikin *dsDNA* ile yaklaşık aynı dalga boyunda pik vermesinden dolayı 314 nm dalga boyunda gelen 2. pik üzerinden gerçekleştirilmiştir. Titrasyon boyunca eklenen *dsDNA* miktarı etkisiyle pazopanib pikinde yaklaşık 1 nm kadar uzun dalga boyuna doğru hafif bir kayma gözlenmiştir (batokromik etki). Batokromik kaymanın yanında gözlemlenen hipokromik etki ilaç etken maddenin *dsDNA*'ya kısmi interkalasyon ve minör oluk bağlanma ile bağlanabileceğini göstermektedir (Sirajuddin vd. 2013).



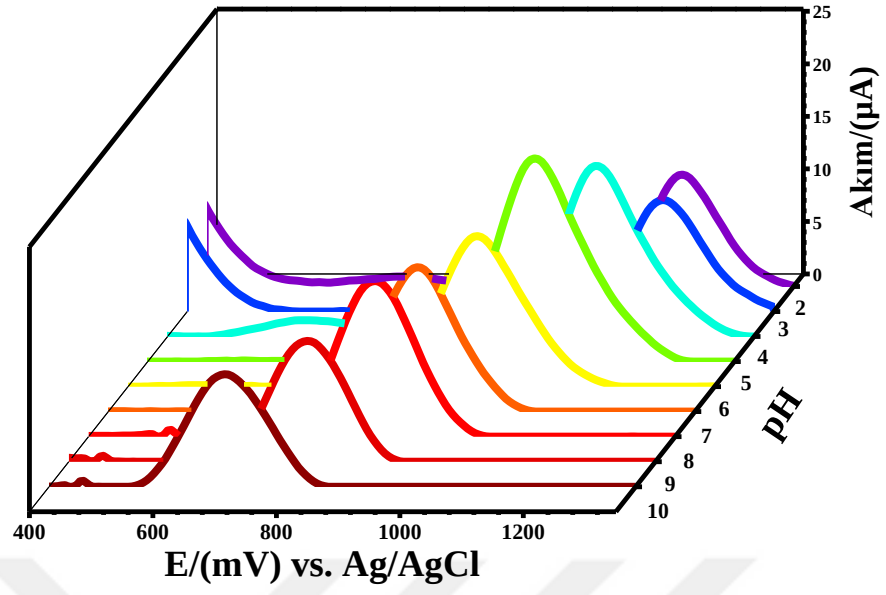
Şekil 4. 72 Pazopanib ve dsDNA arasında ilişkinin doğrusal olmayan regresyon analizi yöntemiyle gösterilmesi

Elde edilen sonuçlar doğrusal olmayan regresyon analizi yöntemiyle değerlendirildiğinde bağlanma katsayısı (k) $1,4 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

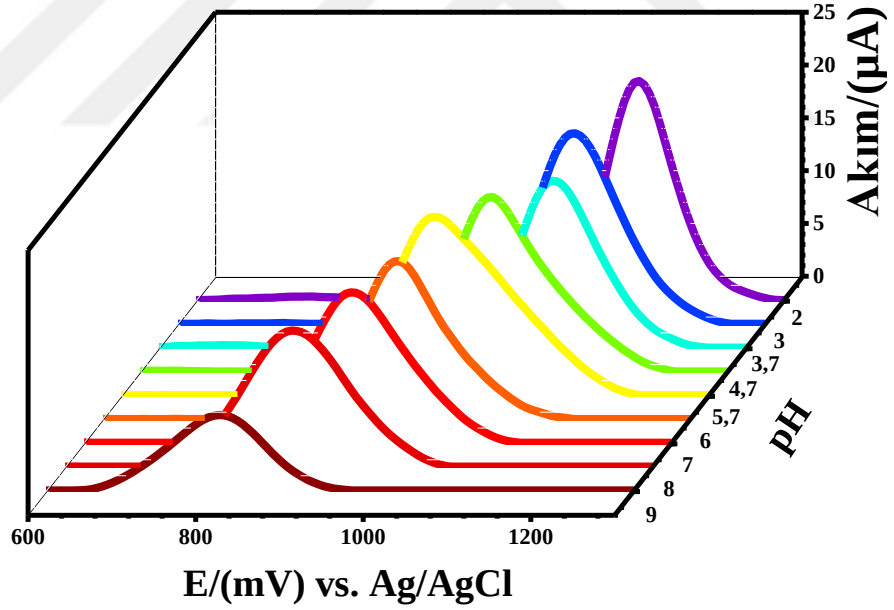
4.6.4 Pazopanib'in boş camısı karbon elektrot üzerindeki elektrokimyasal davranışının incelenmesi

Pazopanib'in elektrokimyasal davranışı, pH ve tarama hızının pazopanibin voltametrik sinyali üzerindeki etkisi incelenerek ve ayrıca model ilaçlarla karşılaştırılarak boş camısı karbon elektrot üzerinde araştırılmıştır. pH ın etkisini incelemek için $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ pazopanib'in yükseltgenme sinyali pH 2,0- 10,0 aralığında, dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametrisi ve kare dalga voltametri teknikleri ile boş camısı karbon elektrot kullanılarak incelenmiştir.

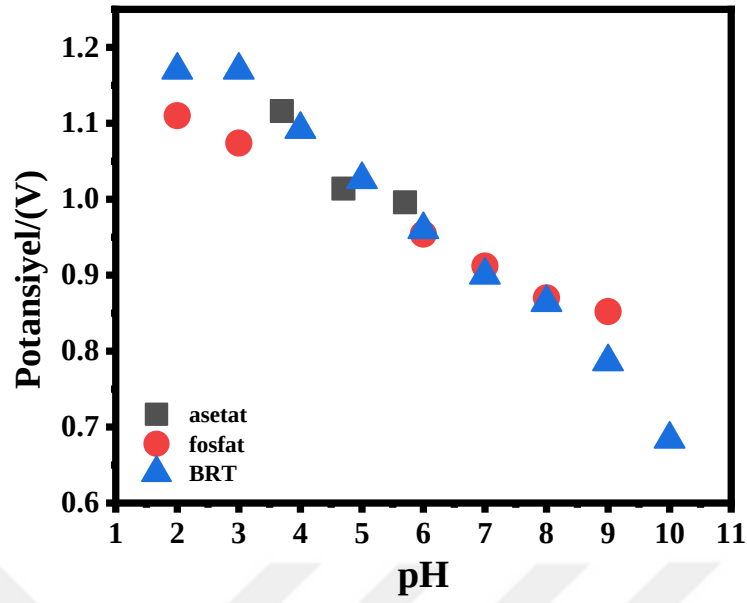
Şekil 4.73 ve şekil 4.74 çeşitli pH değerlerinde $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ pazopanib'in yükseltgenme sinyallerine ait kare dalga voltamogramlarını göstermektedir. Pazopanib, tüm pH ortamlarında boş camısı karbon elektrot yüzeyinde anodik yükseltgenme sinyali vermiştir. pH arttıkça pazopanib pik potansiyeli (E_p) daha az pozitif potansiyele kaymıştır (Şekil 4.75).



Şekil 4.73 Britton Robinson (2,0- 10,0) tampon çözeltilerinde boş CKE yüzeyinde 2×10^{-6} M PZB'nin kare dalga voltamogramları



Şekil 4.74 Fosfat -asetat -asit (2,0- 9,0) tampon çözeltilerinde boş CKE yüzeyinde 2×10^{-6} M PZB'nin kare dalga voltamogramları



Şekil 4.75 Boş elektrot için asetat-fosfat-BRT tamponları ortamında elde edilen Ep-pH grafiği

Ep- pH grafiği, pH 2,0 ile 10,0 aralığında (DV için $r = 0,993$ ve KDV için $r = 0,992$) boş camı karbon elektrotta doğrusallık göstermiştir ve denklemler aşağıda verilmiştir;

$$Ep (mV) = 1289,6 - 56,61 \text{ pH DV için ve KDV için } Ep (mV) = 1334,5 - 61,75 \text{ pH.}$$

Bu iki denklemin eğimleri teorik olarak 59,2 mV/pH değerine yakındır, bu da pazopanib'in yükseltgenmesi için aktarılan proton sayısının aktarılan elektron sayısına eşit olduğunu göstermektedir (Compton vd. 2018).

Hız taraması çalışmaları, farmasötik bileşiklerin redoks mekanizmasını ve elektrokimyasal reaksiyonunu araştırmak için önemli bir teknik olan bir dönüşümlü voltametri ile yapılmıştır. Bu çalışmada, 8×10^{-5} M pazopanib'in yükseltgenme sinyalleri pH 3,0 fosfat tamponunda incelenmiş ve ip'nin tarama hızı (v) ile doğrusal olarak (0,005- 0,25 Vs⁻¹ aralığında) aşağıdaki denklemde verildiği gibi arttığı bulunmuştur. :

$$i_{p1} (\mu A) = 0,028 v (mVs^{-1}) + 0,376 (r = 0,990)$$

Ek olarak, doğrusallığın aşağıdaki denklemle kanıtlandığını gösteren log ip vs log v eşitliği de verilmiştir:

$$\log i_{p1} (\mu A) = 0,672 v (mVs^{-1}) - 0,830 (r = 0,985)$$

Bu denklemin eğimi, elektrokimyasal reaksiyonların difüzyon-adsorpsiyon karışık kontrollü proses altında meydana geldiğini göstermektedir.

Geri dönüşümsüz reaksiyon için tarama hızındaki her 10 katlık artış için E_p yaklaşık 30/ αn mV'ye kaymıştır. α değeri, genellikle 0,5 olarak kabul edilebilir ve bu değer elektrokimyasal redoks işlemindeki anodik yük transfer katsayısına karşılık gelmektedir.

E_p , 0,005- 0,075 Vs^{-1} hız aralığında pik potansiyeli tersinmez olarak kaymıştır.

E_p ile $\log v$ arasındaki doğrusal ilişki aşağıdaki gibi açıklanmıştır:

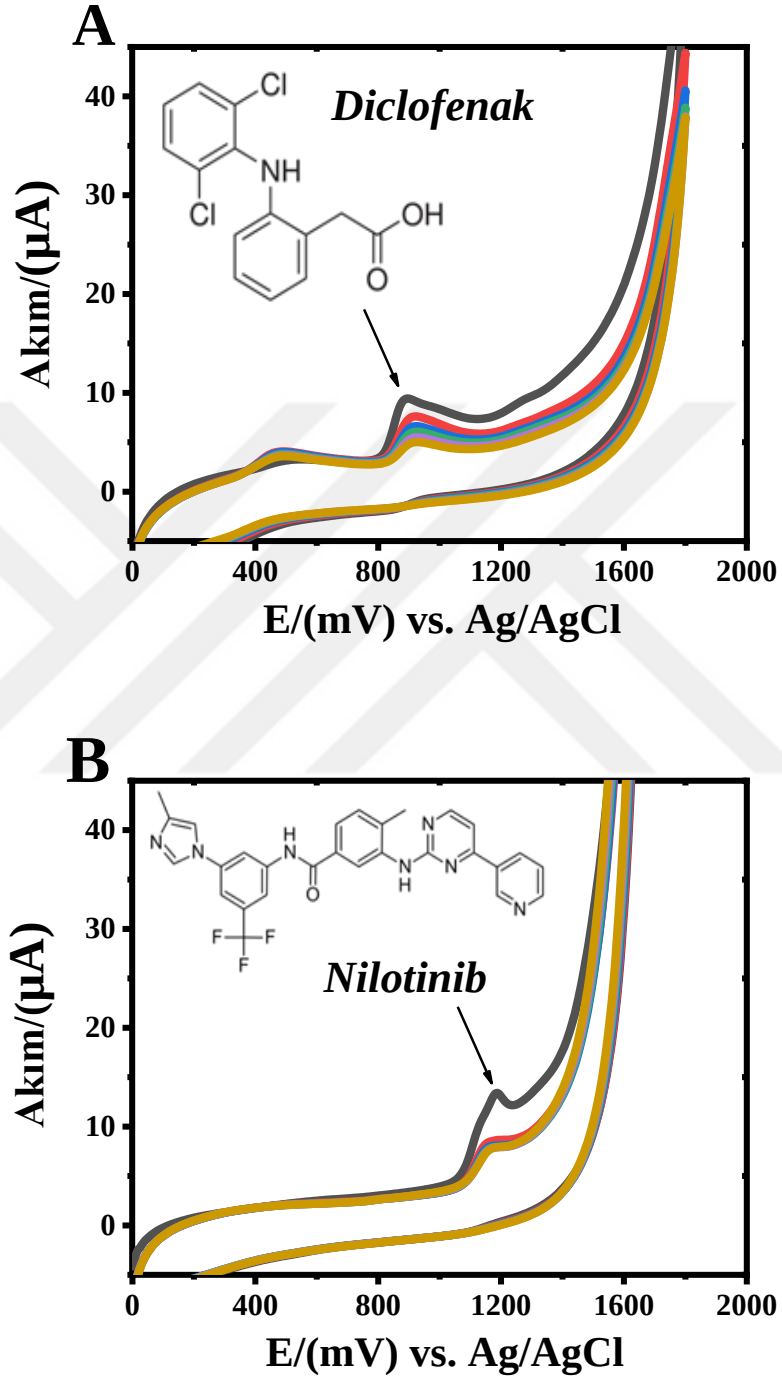
$$E_p (mV) = 27,50 \log v (mVs^{-1}) + 1047,7 (r = 0,985)$$

Pazopanib'in elektrokimyasal yükseltgenmesi için elektron sayısı (n) değerlerinin 2,18 (~ 2) olduğu tahmin edilmiştir. pH ve tarama hızı çalışmaları, elektrokimyasal reaksiyonun iki elektron ve iki proton aktarılarak gerçekleştiğini göstermiştir.

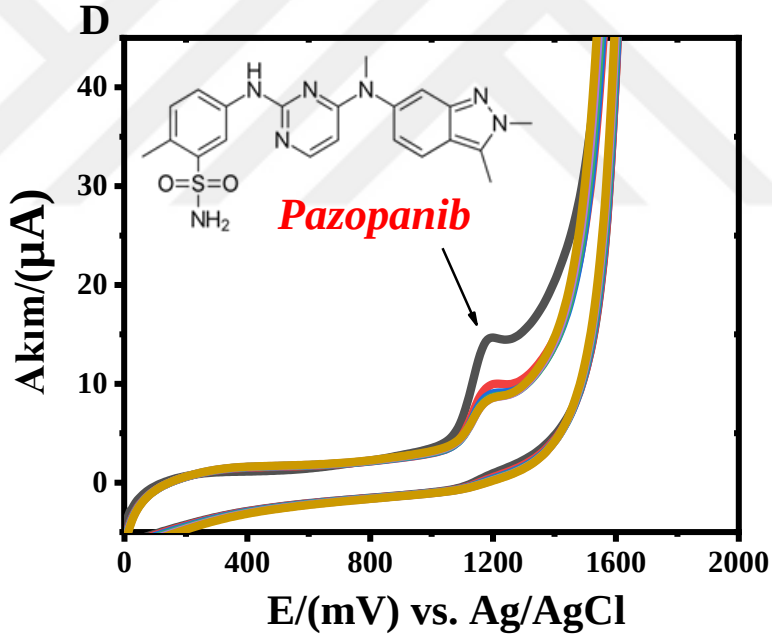
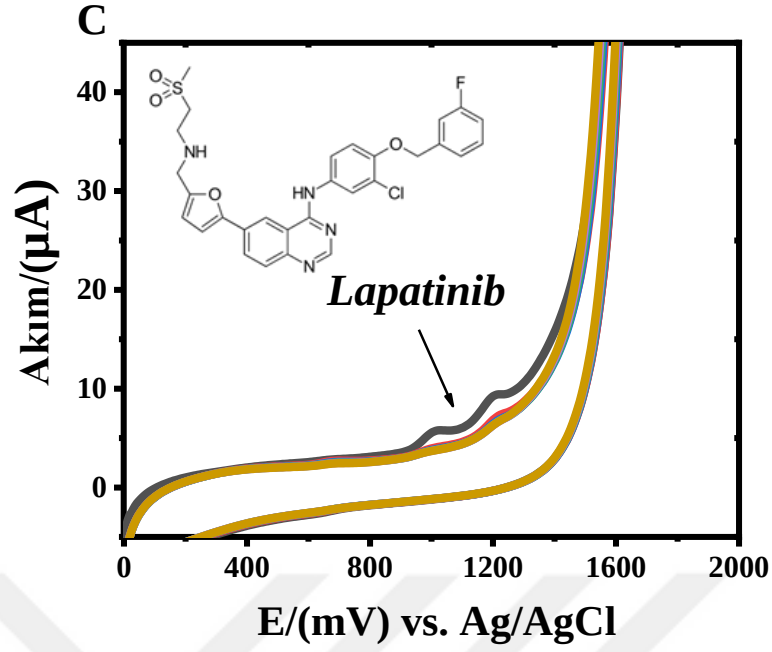
Ayrıca dönüşümlü voltametri çalışmaları biyolojik matriste bulunan farmasötik bileşiklerin metabolik redoks davranışını da aydınlatmaktadır. Pazopanib'in elektrokimyasal yükseltgenmesinin boş CKE'deki davranışı, benzer elektroaktif gruplar içeren bazı model bileşiklerle tarama sayısında dönüşümlü voltametri taramaları aracılığıyla karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, pazopanib'in yapısında indazol, pirimidin ve aminobenzen-sülfonamid dahil olmak üzere üç ana gruba ait yükseltgenme piki tespit edilmiştir.

Şekil 4.76 Boş camı karbon elektrot üzerinde ve pH 2,0 fosfat tamponu ortamında pazopanib, diklofenak, nilotinib ve lapatinib'in tekrarlayan dönüşümlü voltametri sonuçlarını göstermektedir. **Şekil 4.76**'da görüldüğü gibi, pazopanib ve nilotinib, dönüşümlü voltametri tekniği uygulandığında yaklaşık 1,2 V'ta yükseltgenme sinyali vermiştir. Pazopanib'in elektrokimyasal yükseltgenmesinin sebebinin, aminobenzen-sülfonamid yapısındaki amin grubu nedeniyle hidroksillenmiş bir ürün oluşturmaktan kaynaklandığı öngörülmüştür. **Şekil 4.76.d**'de dönüşümlü voltametride

geri dönüşte herhangi bir pik gözlenmemesi elektrokimyasal reaksiyonun tersinmez olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.76 1×10^{-4} M PZB'nin tarama sayısında DV'leri; A) diklofenak, B) nilotinib ve C) lapatinib D) pH 2,0 fosfat tamponunda boş CKE üzerinde pazopanib

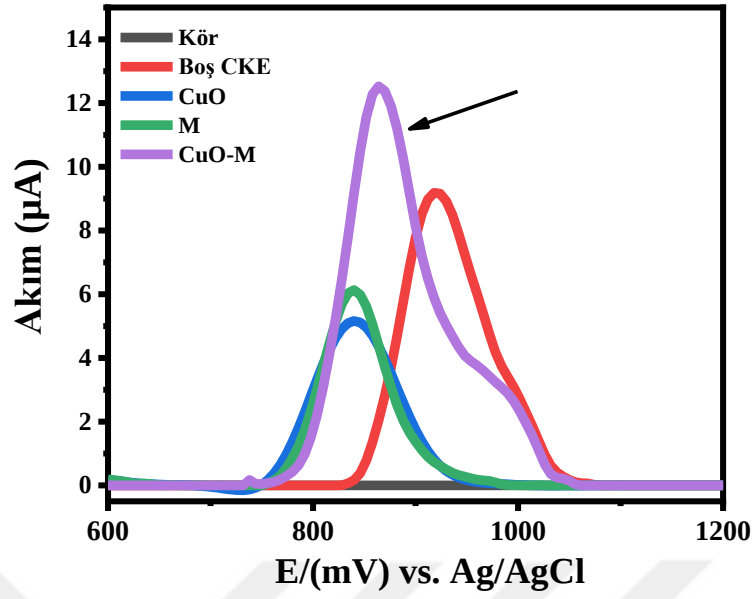


Şekil 4.76 1×10^{-4} M PZB'nin tarama sayısında DV'leri; A) diklofenak, B) nilotinib ve C) lapatinib D) pH 2,0 fosfat tamponunda boş CKE üzerinde pazopanib (devam)

Literatürde yapılan bir çalışmada indazol halkası içeren granisetron molekül yapısının pH 2,0 fosfat tamponu ortamında 1,57 V'da (yüksek pozitif potansiyel) yükseltgenme sinyali verdiği görülmüştür. Ancak pazopanib molekülü için bahsedilen çalışma koşullarında ve bu potansiyelde yükseltgenme sinyali elde edilememiştir.

4.6.5 Pazopanib için nanosensör deneyleri

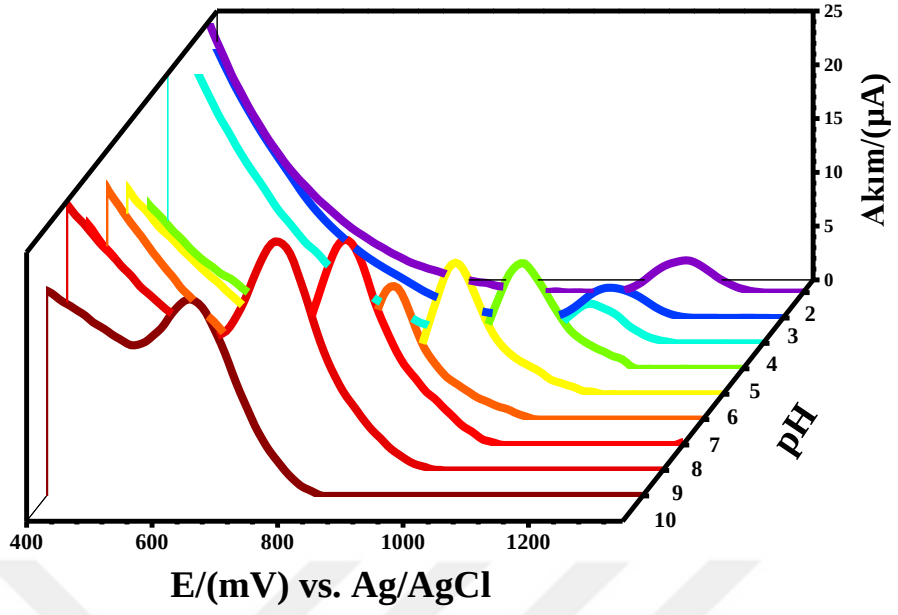
Pazopanib'in yükseltgenme sinyalinin arttırabilmek amacıyla yüzey modifikasyonu için karakterizasyonu başarıyla gerçekleştirilen çeşitli sentezlenmiş nanomalzemeler seçilmiştir. Modifikasyon malzemelerinin etkinliğinin karşılaştırılması adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametrisi ve adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi teknikleri için rastgele seçilen biriktirme potansiyeli (0 V) ve biriktirme süresi (120 s) altında yapılmıştır. Modifikasyon materyalinin camı karbon elektrot üzerindeki davranışını ve etkisini incelemek için boş ve modifiye edilmiş (CuO, M ve CuO- M) elektrotlara yukarıda bahsedilen voltametri teknikleri uygulanmıştır (**Şekil 4.77**). Tez kapsamında yapılan çalışmada, çubuk benzeri CuO nanoparçacıkların ve atık maskelerden elde edilen karbon malzemenin camı karbon elektrot yüzeyi üzerinde pazopanib'in yükseltgenme sinyalinin arttırdığı belirlenmiştir. Atık maskelerin hidrotermal karbonizasyonundan elde edilen karbon malzeme (yüksek yüzey alanına sahip) ile CuO nanoparçacıklarının birlikte sinerjik bir etki yarattığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada hem nanoparçacıkların hem de atıklardan elde edilen karbon malzemelerin yükseltgenme mekanizması üzerindeki etkisi büyük ölçüde aydınlatılmıştır. Aynı zamanda CuO-M malzemesi elektrot yüzeyindeki elektron transfer hızını artırarak elektrokatalitik etkiyi hızlandırmış ve sonuç olarak pik potansiyeli daha az pozitif değere kaymıştır. Pazopanib'in pik potansiyeli, boş camı karbon elektrodun (918 mV) sinyaline kıyasla CuO- M modifiye elektrot (864 mV) ile daha az pozitif bir potansiyele kaymıştır. Yükseltgenme sinyalleri karşılaştırıldığında, CuO- M (14,60 μ A) ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot, boş elektrottan (9,19 μ A) daha yüksek bir yanıt vermiştir. CuO ve M malzemeleri, ayrı ayrı incelendiğinde her iki malzemenin de elektrokatalitik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, bu malzemeler tek başına boş elektroda göre daha düşük yükseltgenme sinyalleri vermiştir.



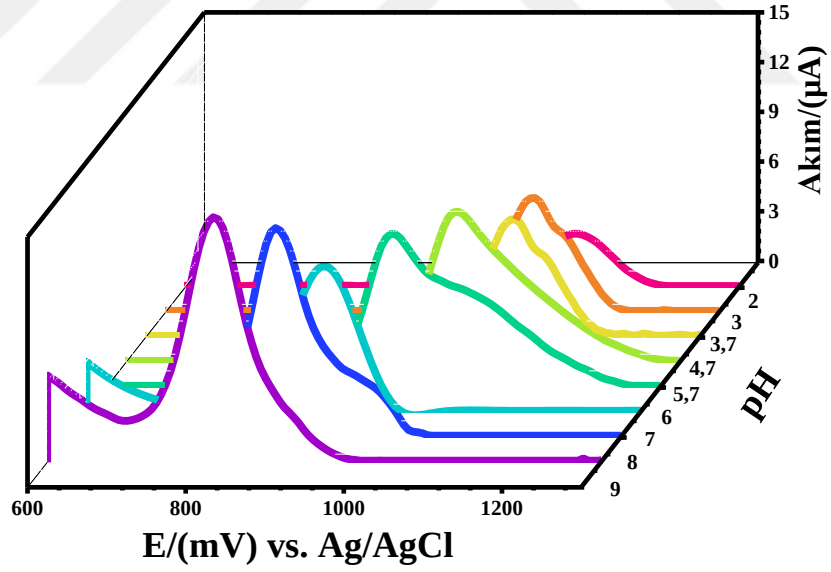
Şekil 4.77 M, CuO ve M- CuO ile modifiye edilmiş CKE'nin pH 7,0 fosfat tamponu ortamında kaydedilen AdSKDV voltammogramları

4.6.5.1 Ortam pH'sının ve farklı destek elektrolitlerin etkisinin incelenmesi

Ortamın pH'sının etkisi, geniş bir pH aralığında (2,0– 10,0) CuO-M modifikasyon dispersiyonu ile modifiye edilmiş CKE üzerinde ve 2×10^{-6} M pazopanib'in varlığında sırasıyla adsorptif kare dalga, adsorptif puls voltametri teknikleri aracılığıyla (0 V sabit potansiyel ve 120 s sabit zamanda) incelenmiştir.

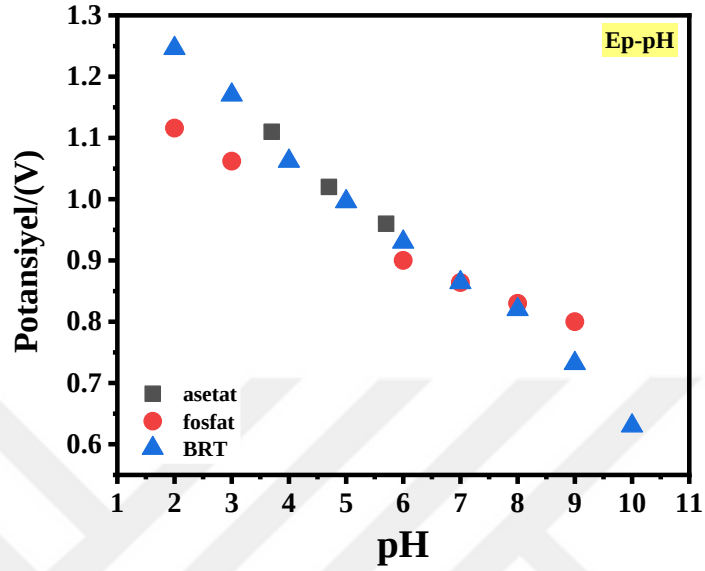


Şekil 4.78 CuO- M modifiye CKE üzerinde 2×10^{-6} M PZB'nin pH 2,0– 10,0 aralığındaki Britton Robinson tampon çözeltilerinde elde edilen AdsKDV voltamogramları

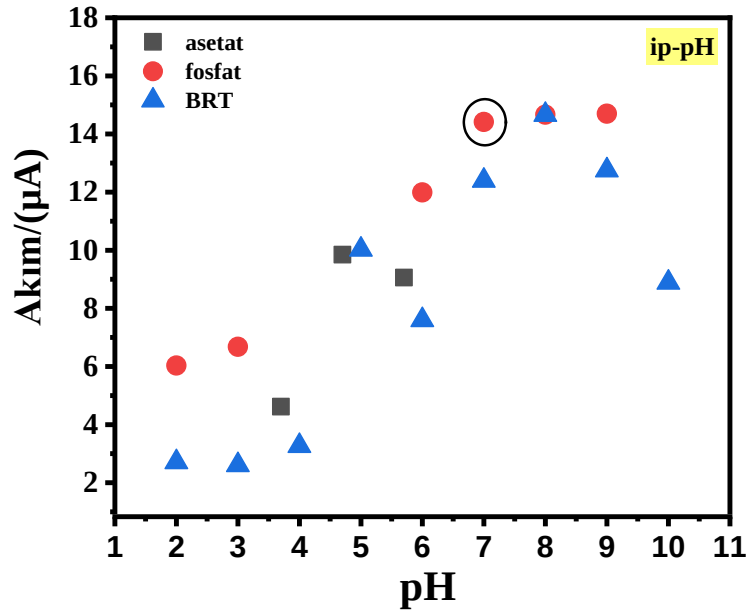


Şekil 4.79 CuO-M modifiye CKE üzerinde 2×10^{-6} M PZB'nin pH 2,0– 9,0 aralığındaki fosfat-asetat-asit tampon çözeltilerinde elde edilen AdsKDV voltammogramları

Pazopanib, **şekil 4.78** ve **şekil 4.79**'de gösterildiği gibi AdsKDV tekniği uygulandığında CuO- M ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotta pH değerine bağlı olarak yayvan ve omuzlu bir anodik yükseltgenme sinyali vermiştir.



Şekil 4.80 CuO- M ile modifiye edilmiş elektrot için asetat-fosfat-BRT tamponları ortamında elde edilen Ep- pH grafiği



Şekil 4.81 CuO- M ile modifiye edilmiş elektrot için asetat- fosfat- BRT tamponları ortamında elde edilen İp- pH grafiği

Ep-pH grafiği (Şekil 4.81) aşağıdaki denklemlerle ifade edilmiştir.

AdsDPV tekniği için (pH 2,0- 10,0 aralığında);

$$E_p (mV) = 1267,8 - 63,12 \text{ pH} (r = 0,991)$$

AdsKDV tekniği için (pH 2,0- 10,0 aralığında);

$$E_p (mV) = 1376,5 - 73,11 \text{ pH} (r = 0,996)$$

Elde edilen eğimler, boş camsı karbon elektrottan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermekle birlikte, elektrokimyasal yükseltgenme olayı için proton sayısının elektron sayısına eşit olduğunu göstermektedir.

4.6.5.2 Hız taramasının etkisinin incelenmesi

Bu alışmada, 2×10^{-5} M pazopanib'in yükseltgenme sinyalleri pH 7,0 fosfat tamponunda ve CuO- M ile modifiye edilmiş CKE üzerinde incelenmiş ve ip'nin tarama hızı (v) ile doğrusal olarak (0,005- 0,25 Vs⁻¹ aralığında) aşağıdaki denklemde verildiği gibi arttığı ve elektrot davranışının adsorpsiyon kontrollü olduğu (r= 0,991) gözlenmiştir;

$$ip(\mu A) = 0,014 \text{ v (mVs}^{-1}) - 0,092 (r = 0,991)$$

Ek olarak, doğrusallığın aşağıdaki denklemle kanıtlandığını gösteren log ip vs log v eşitliği de verilmiştir:

$$\log ip(\mu A) = 1,068 \text{ v (mVs}^{-1}) - 2,092 (r = 0,996)$$

Bu denklemin eğiminin (teorik değerinin) 1'e yakın olması elektrokimyasal reaksiyonların adsorpsiyon kontrollü gerçekleştiğini göstermiştir.

Doğrusallığın aşağıdaki denklemle kanıtlandığını gösteren Ep ve log v eşitliği de verilmiştir:

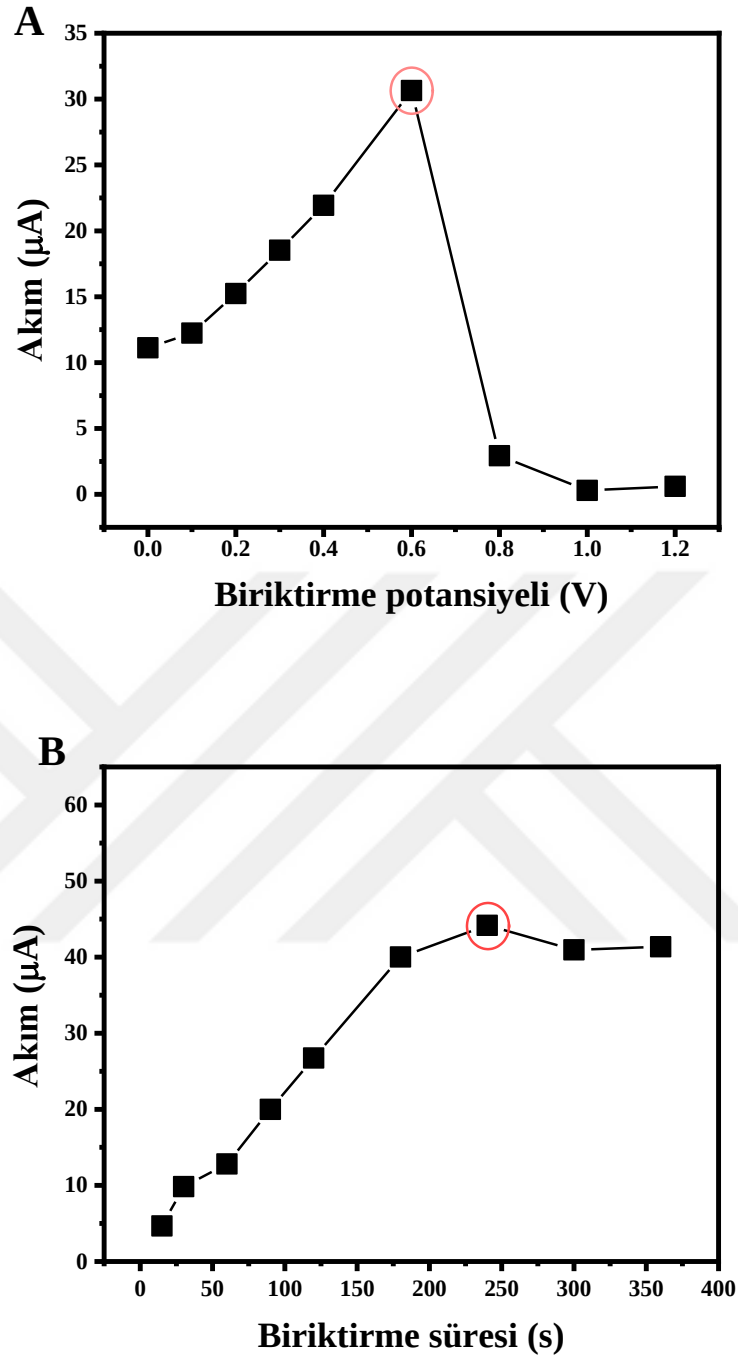
$$E_p (mV) = 33,13 \log v \text{ (mVs}^{-1}) + 828,8 (r = 0,992)$$

0,005- 0,25 Vs⁻¹ hız aralığında pik potansiyeli tersinmez olarak kaymıştır. Boş camı karbon elektrottan elde edilen sonuçlar tarama hızındaki her on katlık artış için potansiyelin, 33,13 mV kaydığını göstermiştir.

Pazopanib'in yükseltgenme sinyali için n değeri 1,81 (~2) olarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar boş camı karbon elektrottan elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermiştir.

4.6.5.3 Biriktirme süresi ve potansiyelin pazopanib'in pik akımına etkisinin incelenmesi

Adsorpsiyon kontrollü elektrokimyasal reaksiyonlarda, biriktirme süresi ve potansiyelinin etken madde yanıtı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla koşullar optimize edilmiştir. Kare dalga tekniği ile biriktirme potansiyeli ve zamanın etkisi incelenmiştir. **Şekil 4.82.a**, CuO- M modifiye camı karbon elektrot üzerinde pH 7,0 fosfat tamponunda 2×10^{-6} M pazopanib için biriktirme potansiyeline karşı elde edilen pik akımını göstermektedir. Biriktirme potansiyeli, 60 s'lik sabit bir biriktirme süresi ile 0,0- 1,2 V aralığında uygulanmıştır. Pazopanib'in anodik yükseltgenme sinyalinin 0,0- 0,6 V potansiyel aralığında kademeli olarak arttığı gözlenmiştir. Ancak 0,6 V potansiyelden sonra hızlı bir düşüş meydana gelmiştir. Bu nedenle optimum biriktirme potansiyeli değeri olarak 0,6 V belirlenmiştir. 0- 400 s aralığında uygulanan biriktirme süresinin etkisi **şekil 4.82.b**'de verilmiştir. Yükseltgenme sinyali 0 ile 240 s arasında sürekli olarak artmıştır. Ancak 240 s sonra yükseltgenme sinyali sabitlenmiştir. Sonuç olarak, optimum biriktirme süresi olarak 240 s seçilmiştir. Tüm biriktirme deneylerinde önceden optimize edilmiş 300 rpm karıştırma hızı kullanılmıştır.

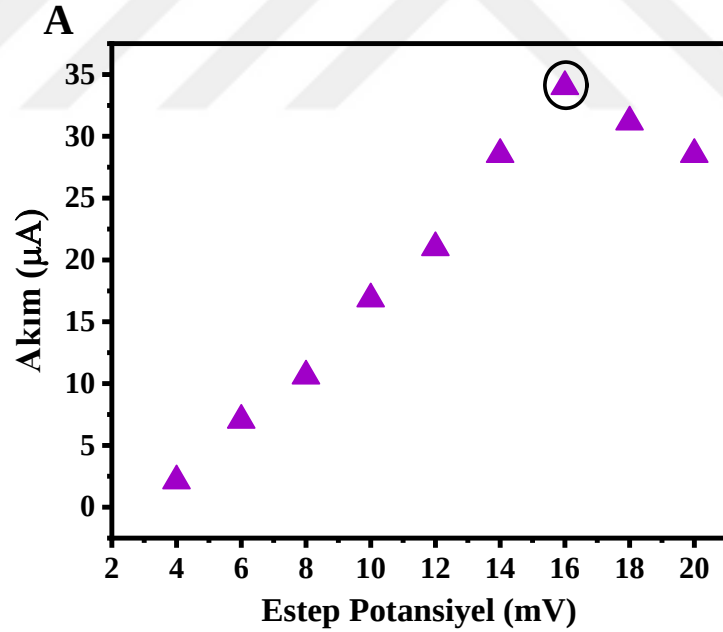


Şekil 4.82 CuO- M ile modifiye edilmiş boş CKE üzerinde AdsKDV kullanılarak pH 7,0 fosfat ortamında A) biriktirme potansiyelinin etkisinin ve B) biriktirme süresinin etkisinin incelenmesi

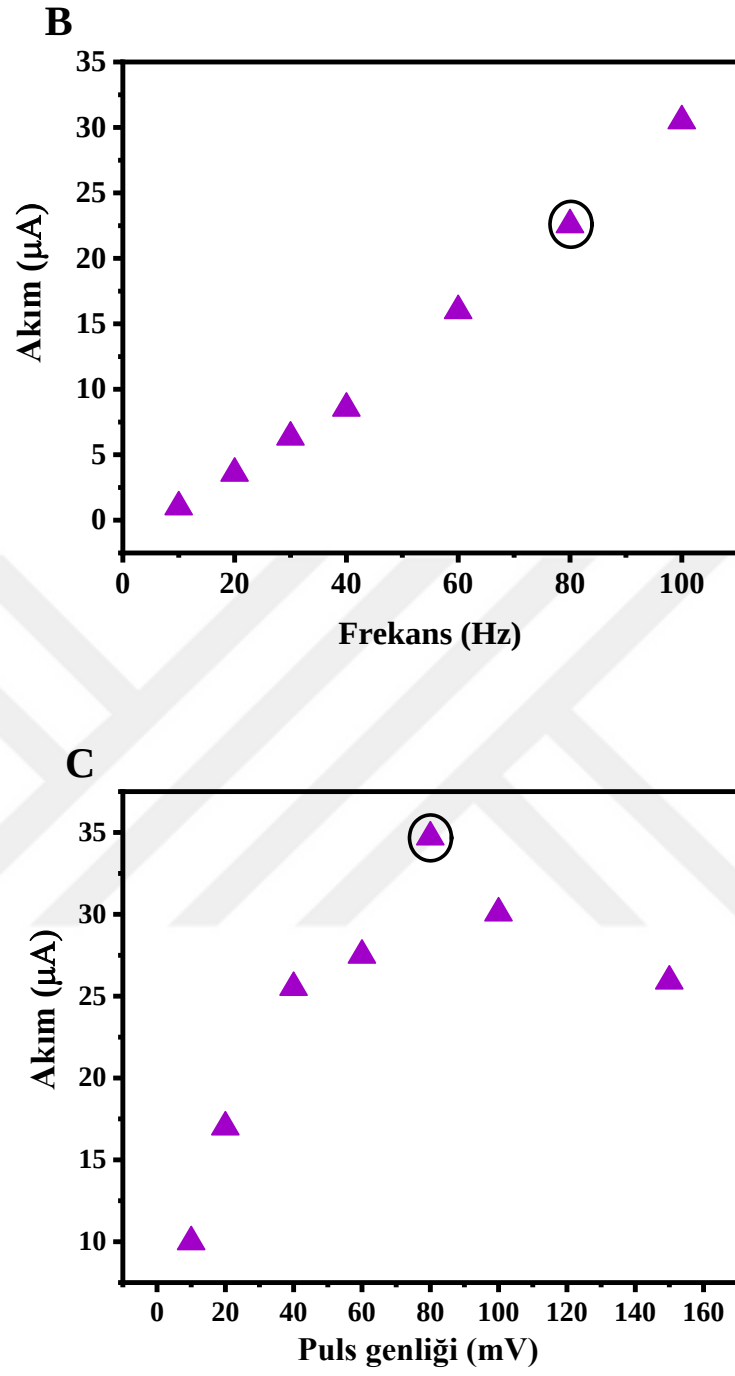
4.6.5.4 Kare dalga voltametri parametrelerinin etkisi

Bu başlık altında Estep potansiyeli, puls genliği ve frekansı gibi puls parametrelerinin elektrokimyasal yanıtı etkisi detaylı olarak incelenmiştir. Bahsedilen kare dalga voltametri parametreleri 2×10^{-6} M pazopanib derişiminde çalışılarak incelenmiştir.

Estep potansiyeli (sabit tutulan değerler; frekans 80 Hz ve puls genliği 90 mV) için optimum değeri belirlemek amacıyla 4- 20 mV aralığında ölçümler yapılmıştır. **Şekil 4.83** optimizasyon sonuçlarını göstermektedir. Sonuç olarak optimum Estep potansiyel değeri 16 mV olarak seçilmiştir. Ayrıca optimum puls genliği değerini (sabit tutulan değerler; 80 Hz frekans ve 16 mV Estep potansiyeli) belirlemek için 10- 150 mV aralığında ölçümler alınmış ve optimum değer olarak 80 mV seçilmiştir. Son olarak 10- 100 Hz frekans aralığında (sabit tutulan değerler; puls genliği 80 mV ve Estep potansiyeli 16 mV) yapılan ölçümlerle alınan sonuçlar değerlendirilerek optimum frekans değeri 80 Hz olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.83 2×10^{-6} M PZB varlığında ve pH 7,0 fosfat tamponu ortamında KDV parametrelerinin incelenmesi A) Estep potansiyeli, B) frekans, C) puls genliği



Şekil 4.83 2×10^{-6} M PZB varlığında ve pH 7,0 fosfat tamponu ortamında KDV parametrelerinin incelenmesi A) Estep potansiyeli, B) frekans, C) puls genliği (devam)

4.6.5.5 Analitik performansın incelenmesi

Pazopanib derişimu ve yükseltgenme sinyali arasındaki ilişki, Pazopanib'in CuO- M ile modifiye edilmiş camısı karbon elektrot üzerindeki analitik performansını değerlendirmek için incelenmiştir. Pazopanib'in elektrokimyasal yükseltgenmesi, CuO- M ile modifiye edilmiş camısı karbon elektrot üzerinde adsorpsiyon kontrollü olarak gözlemlenmiştir. Hassas ve hızlı bir elektroanalitik teknik olan, AdSKDV, CuO- M modifiye camısı karbon elektrot üzerinde ve pH 7,0 fosfat tamponunda pazopanib'in tayini için geliştirilmiştir.

Nanosensörün analitik performansı, doğrusallık aralığı, TS, TAS, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, vb. gibi bazı önemli parametrelere oldukça bağlıdır. Optimum koşullar altında, kalibrasyon eğrisi 2×10^{-10} ile 1×10^{-6} M aralığında doğrusal olup (Şekil 4.84) regresyon analizine ait bulgular çizelge 4.3' de listelenmiştir. Farklı derişimlerde pazopanib varlığında nanosensör performansı çizelge 4.3' de gösterilmektedir. TS, TAS ve kesinlik gibi diğer gerekli validasyon parametreleri hesaplanarak çizelge 4.3' de listelenmiştir. TS ve TAS değerleri;

$$LOD = 3,3 \times \frac{s}{m}$$

ve

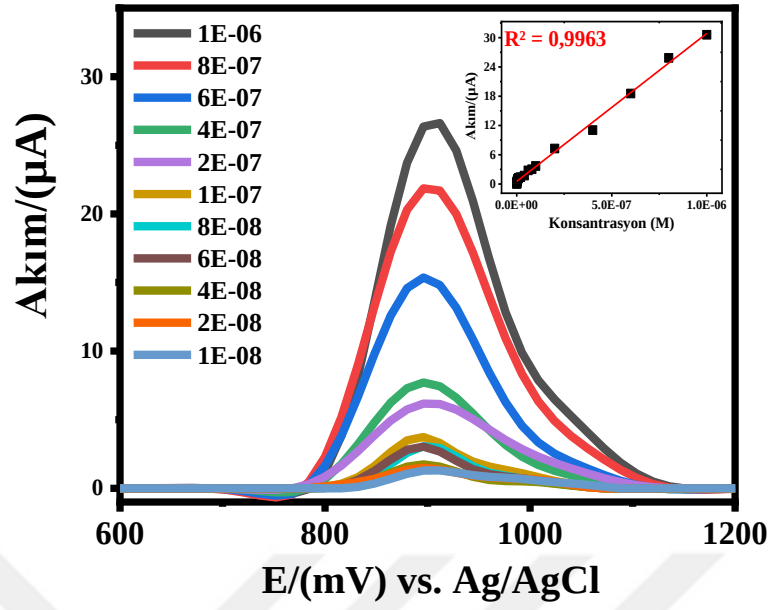
$$LOQ = 10 \times \frac{s}{m}$$

denklemlerinden hesaplanmıştır.

m= kalibrasyon grafiğinin eğimi

s= tekrarlı verilerin standart sapması

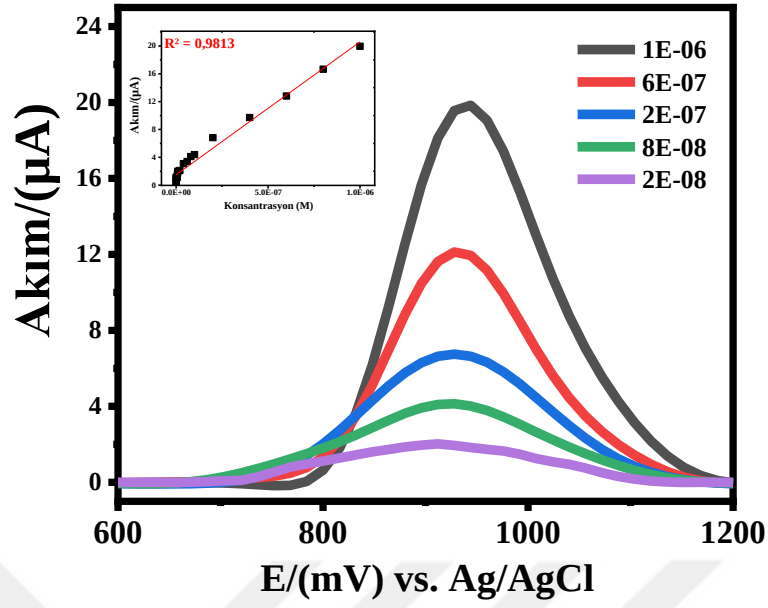
TS ve TAS değerleri sırasıyla $9,03 \times 10^{-11}$ ve $2,74 \times 10^{-10}$ M olarak hesaplanmıştır. Yöntemin kesinliği, ICH yönergelerinde belirtilen değerleri karşılayan % BSS olarak sunulmuştur. Tüm bu sonuçlar, önerilen yöntemle pazopanib miktarının farmasötik dozaj formunda ve biyolojik numunelerde kolaylıkla analiz edilebileceğini göstermiştir.



Şekil 4.84 2×10^{-10} - 1×10^{-6} M derişim aralığında pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde PZB yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğı

4.6.5.6 Biyolojik numunelerde performansın incelenmesi

Önerilen nanosensör, geliştirilen yöntemin uygulanabilirliğini göstermek için insan serum örneklerinde pazopanib'in tayini için başarıyla uygulanmıştır. Geliştirilen yöntemin analitik performansı, AdsKDV tekniğı ile insan serumunda 4×10^{-10} - 1×10^{-6} M aralığında doğrusal olarak test edilmiştir. Regresyon analizine ait bulgular ve analitik validasyon parametreleri **çizelge 4.3**'de özetlenmiştir. Farklı derişimlerde pazopanib eklenmiş insan serumunda elde edilen AdsKDV voltamogramları **şekil 4.85**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.85 4×10^{-10} - 1×10^{-6} M derişim aralığında yapay insan serumu eklenmiş pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde PZB yükseltgenme sinyalleri için elde edilen kalibrasyon grafiğı

Çizelge 4 3 Pazopanib için geliştirilen algılama yöntemine ait analiz bulguları

	Standart çözelti	Serum
Ölçülen pik potansiyeli (mV)	896	895
Doğrusallık aralığı (M)	2×10^{-10} - 1×10^{-6}	4×10^{-10} - 1×10^{-6}
Eğim ($\mu\text{A M}^{-1}$)	$3,3 \times 10^7$	$2,59 \times 10^7$
Kesme noktası (μA)	$5,38 \times 10^{-1}$	1,36
Korelasyon katsayısı	$9,98 \times 10^{-1}$	$9,93 \times 10^{-1}$
Eğimin standart sapması ($\mu\text{A M}^{-1}$)	$4,4 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$
Kesmen noktasının standart sapması (μA)	0,146	0,136
TS (M)	$4,94 \times 10^{-11}$	$1,28 \times 10^{-10}$
TAS (M)	$1,50 \times 10^{-10}$	$3,86 \times 10^{-10}$

Çizelge 4.3 Pazopanib için geliştirilen algılama yöntemine ait analiz bulguları (devam)

	Standart çözelti	Serum
Pik akımlarının gün-içi tekrarlanabilirliği (BSS %) ^a	1,69	1,28
Pik potansiyellerinin gün-içi tekrarlanabilirliği (BSS %) ^a	0,05	0,06
Pik akımlarının günler-arası tekrarlanabilirliği (BSS %)	1,93	1,92
Pik potansiyellerinin günler-arası tekrarlanabilirliği (BSS %)	0,08	0,05

4.6.5.7 Farmasötik dozaj formlarında performansın incelenmesi

Önerilen nanosensörün analitik performansı, herhangi bir zaman alıcı ekstraksiyon veya buharlaştırma aşaması olmaksızın tablet dozaj formlarında pazopanib'in tayiniyle de incelenmiştir. Numune hazırlama prosedürü deney bölümünde açıklanmıştır. Tablet dozaj formlarında pazopanib tayini için önerilen yöntem **çizelge 4.3**'de verilen ilgili kalibrasyon denklemleri kullanılarak doğrulanmıştır. Ayrıca Bias % değeri 0,915 olarak elde edilmiştir.

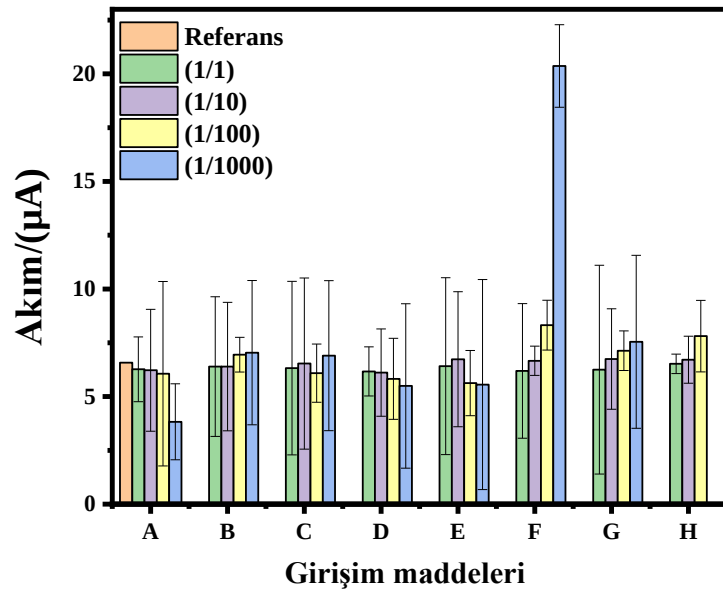
Geliştirilen yöntemin doğruluğu, dozaj formunda ve insan serumunda yapılan geri kazanım çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Önerilen yöntem kullanılarak farmasötik dozaj formuna ve biyolojik numunelere bilinen derişimlerde ilaç maddesinin eklenmesinden sonra geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Pazopanib'in geri kazanım sonuçları, ilgili regresyon denklemlerinden hesaplanmıştır. Ortalama geri kazanım yüzdesi değerleri (beş deneyin ortalaması) farmasötik dozaj formları ve biyolojik numuneler için sırasıyla % 101,16 (% 1,16 Bias) ve % 102,03 (% 2,03 Bias) olarak bulunmuştur (**Çizelge 4.4**). Ayrıca farmasötik dozaj formları ve biyolojik numuneler için % BSS değerleri sırasıyla % 0,12 ve % 3,25 olarak hesaplanmıştır. Ortalama geri kazanım ve % BSS sonuçları, önerilen yöntemin ICH ile ilgili uygun

doğruluk ve kesinlik gösterdiğini desteklemiştir. Sonuçlar, farmasötik dozaj formlarında ve biyolojik numunelerde pazopanib'in miktar tayini için önerilen nanosensörün potansiyel uygulanabilirliğini göstermektedir.

Çizelge 4. 4 Farmosötik dozaj form uygulamasından elde edilen analitik veriler

	Tablet	Serum
İlave edilen miktar (M)	$8,00 \times 10^{-8}$	$2,00 \times 10^{-7}$
Bulunan miktar (M)	$8,10 \times 10^{-8}$	$2,04 \times 10^{-7}$
Geri kazanım (%) ^a	101,16	102,03
Bias (%)	1,16	2,03
BSS (%)	0,12	3,25

4.6.5.8 Girişim çalışması



Şekil 4.86 Girişim yapan maddelerin ve pH 7,0 fosfat tamponu varlığında CuO-M ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot üzerinde pazopanib'in AdsKDV voltamogram yanıtlarının grafiksel gösterimi A) NaNO₃ B) CaCl₂ C) KCl D) NaCl E) parasetamol F) dopamin G) askorbik asit H) ürik asit

Geliştirilen biyosensörlerin en büyük sorunlarından biri hücreler arası sıvıdaki biyolojik materyallerin etkisiyle performanslarının düşmesidir. Bu maddeler dopamin, ürik asit ve askorbik asit ile NaCl, NaNO₃ ve KCl gibi büyük hacimli iyonlardır. Bu çalışmada girişim maddesi olarak KCl, NaCl, NaNO₃, CaCl₂ gibi bazı iyonlar ve ürik asit, dopamin ve askorbik asit gibi biyolojik türler seçilmiştir. **Şekil 4.85**, nanosensörün çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında test edilmesini göstermektedir. Deneysel sonuçlar, girişim yapan maddelerin geliştirilen yöntemde pikakımını önemli ölçüde etkilemediğini göstermiştir. Ayrıca 1: 1000 dopamin varlığında, referans pik akımına kıyasla pik akımı artış göstermiştir.



5. SONUÇ

Elde edilen sonuçların sentezlenen malzemeler bakımından incelenmesi;

Tez çalışması kapsamında ilk olarak voltametrik çalışmalarda yüzey algılama performansını arttırması için kullanılacak olan nanomalzemeler günümüzde araştırmacıların dikkatini çekmekte olan ve önemli bir yeşil sentez tekniği kabul edilen hidrotermal karbonizasyon tekniği aracılığıyla sentezlenmiştir.

Sentez basamağının ilk adımında ise karbon malzemelerin sentezlenmesine odaklanılmış ve atık hammaddelerin karbonlaşma derecesi ve yapısal içerik bakımından voltametrik çalışmalara sağlayacağı katkılar değerlendirilerek literatür araştırmalarıyla desteklenmiştir.

COVID-19 pandemisi nedeniyle kullanımı giderek artan ve çevre kirliliğine neden olan atık cerrahi maskeler ilk kez bu tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir. Bulaş riskini azaltmak kapsamında alınan önlemler içerisinde yer alan tek kullanımlık maske takma zorunluluğu pandeminin sona erme belirsizliğine bağlı olarak çevrede birikmektedir. Yakın gelecekte bu maskelerin geri dönüşümünün büyük bir sorun haline geleceği öngörülmektedir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında atık hammadde olarak selüloz içeriği yüksek yani karbonlaşmaya yüksek eğilimi olan tek kullanımlık cerrahi maskeler tercih edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında seçilen atık hammaddelerden bir diğeri ise atık insan saçlarıdır. İnsan saçı, atomları birbirine disülfid ve hidrojen bağları ile sıkıca bağlı olan bu keratinler nedeniyle yüksek bir kükürt içeriğine sahiptir. Doğal yapısında var olan azot ve kükürt içeriği voltametrik çalışmalarda elektriksel iletkenlik açısından büyük öneme sahip olup tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde de etkisi analiz sonuçlarından da destek alınarak kanıtlanmıştır.

Sonuç olarak atık niteliği taşıyan karbon malzemeler yeşil bir sentez tekniği olan hidrotermal karbonizasyon tekniği aracılığıyla sentezlendikten sonra sentezlenen malzemelerin yapısını aydınlatmak amacıyla sırasıyla SEM-EDX, TEM, FT-IR, XPS, XRD, RAMAN, TGA ve BET gibi çok çeşitli analiz tekniklerinden faydalanılmıştır.

Elektrot yüzeyinin algılama performansını daha da iyileştirmek amacıyla CuO ve SnO₂ nanoparçacıkları hidrotermal yöntemle sentezlendikten sonra SEM-EDX, TEM, BET ve XRD analiz teknikleri ile karakterize edilmiştir.

Elde edilen sonuçların ibrutinib bakımından incelenmesi;

Kritik bir öneme sahip tirozin kinaz inhibitörü olan ibrutinib'in *dsDNA* ile etkileşimine yönelik ilk çalışma bu tez çalışmaları sayesinde literatüre kazandırılmıştır. Bu bakımdan antikanser ilaç sınıfına dahil olan ibrutinib ile *dsDNA* etkileşim çalışmaları, kanser tedavisine yönelik yeni DNA hedefli moleküllerin tasarımı doğrultusunda katkı sağlayacaktır. Bu çalışmada, ibrutinib ve *dsDNA* arasındaki etkileşim, diferansiyel puls voltametri tekniği aracılığıyla araştırılmıştır. Voltametrik çalışmalar, çözelti ortamında incelemeler ve *dsDNA* biyosensörü olmak üzere iki etkileşim yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Voltametrik incelemeler hem guanin hem de adenin yükseltgenme sinyalleri üzerinden yürütülmüştür. Voltametrik çalışmalarda, ibrutinib ve *dsDNA* karışım çözeltisinin bekletilmesinden elde edilen sonuçlar ibrutinib'in pik potansiyelinin daha az pozitif potansiyele doğru hafifçe kaydığını göstermiştir. Bu sonuç ibrutinib'in *dsDNA*'ya elektrostatik etkileşim ile bağlanabileceğini göstermiştir.

Elde edilen sonuçların pazopanib bakımından incelenmesi;

Tirozin kinaz inhibitör sınıfına dahil olan pazopanib ile yapılan DNA etkileşim çalışmaları ve nanosensör çalışmaları da tez çalışması kapsamında ilk kez literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışmada, pazopanib ve *dsDNA* arasındaki etkileşim, diferansiyel puls voltametri tekniği aracılığıyla araştırılmıştır. Voltametrik çalışmalar, çözelti ortamında incelemeler, *dsDNA* biyosensörü, nanobiyosensör ve spektrofotometrik olmak üzere dört etkileşim yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Voltametrik incelemeler adenin yükseltgenme sinyalleri üzerinden yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar palbosiklib'in pik potansiyelinin daha pozitif potansiyele doğru hafifçe kaydığını göstermiştir. Ayrıca UV spektrofotometri sonuçlarından elde edilen batokromik etki ve hipokromik etki, pazopanib'in *dsDNA*'ya kısmi interkalasyon ve minör oluk bağlanma ile bağlanabileceğini göstermiştir.

Ayrıca bu tez çalışmasında gerçekleştirilen incelemeler, kanser tedavisinde yeni nesil bir ilaç olarak kullanılan pazopanib'in tayini için hassas özellikte nanosensör tasarımını

da kapsamaktadır. Çubuk benzeri CuO nanoparçacıkları ile atık maskelerden yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen karbon malzemeden oluşan elektrot modifikasyon çözeltilerinin sinerjik etkisi, nanosensörün geliştirilmesinde önemli bir avantaj sağlamıştır. Bu nedenle, seçilen modifikasyon dispersiyonu, AdsKDV kullanılarak pazopanib tayini için çok hassas bir voltametrik yöntemin geliştirilmesine izin vermiştir. Ayrıca pazopanib'in elektrokimyasal oksidasyon mekanizması bu çalışma ile ilk defa aydınlatılmıştır. Geliştirilen nanosensör aracılığıyla pazopanib'in tayini için hızlı, kolay, hassas, doğru ve tekrarlanabilir bir AdsKDV tekniği geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem ve tasarlanan nanosensör farmasötik dozaj formlarında ve yapay insan serumlarında, herhangi bir karmaşık numune hazırlama prosedürü kullanılmadan doğrudan uygulanmıştır. Pazopanib'in elektrokimyasal incelemesi hakkında mevcut literatürde herhangi bir çalışmanın olmaması elde edilen deneysel bulguların, farklı elektrot modifikasyon malzemelerinin veya tekniklerinin kullanımına odaklanan gelecekte yapılacak elektrokimyasal çalışmalar için bir alt yapı oluşturacağını kanıtlamaktadır.

Elde edilen sonuçların palbosiklib bakımından incelenmesi;

Tirozin kinaz inhibitör sınıfına dahil olan palbosiklib ile yapılan DNA etkileşim çalışmaları da tez çalışması kapsamında ilk kez literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışmada, palbosiklib ve dsDNA arasındaki etkileşim, diferansiyel puls voltametri tekniği aracılığıyla araştırılmıştır. Voltametrik çalışmalar, çözelti ortamında incelemeler, dsDNA biyosensörü, nanobiyosensör ve spektrofotometrik olmak üzere dört etkileşim yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Voltametrik incelemeler ilacın, guaninin ve adeninin yükseltgenme sinyalleri üzerinden yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar palbosiklib'in pik potansiyelinin daha pozitif potansiyele doğru kaydığını göstermiştir. Ayrıca UV spektrofotometri sonuçlarından elde edilen batokromik etki ve hiperkromik etki, palbosiklib'in dsDNA'ya interkalasyon ile bağlanabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Abd Mutalib, M., Rahman, M. A., Othman, M. H. D., Ismail, A. F., & Jaafar, J. (2017). Scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray (EDX) spectroscopy. In *Membrane characterization* (pp. 161–179). Elsevier.
- Adler, S. B. (2002). Reference electrode placement in thin solid electrolytes. *Journal of the Electrochemical Society*, 149(5), E166.
- Akhtar, K., Khan, S. A., Khan, S. B., & Asiri, A. M. (2018). Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization. In *Handbook of materials characterization* (pp. 113–145). Springer.
- Al-Shehri, M., Hefnawy, M., Abuelizz, H., Alzamil, A., Mohammed, M., Alsaif, N., Almehezia, A., Alkahtani, H., & Abounassif, M. (2020). Development and validation of an UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of palbociclib, letrozole and its metabolite carbinol in rat plasma and pharmacokinetic study application. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(2), 4024–4034. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.05.005>
- Amiri, M., & Bélanger, D. (2021). Physicochemical and Electrochemical Properties of Water- in- Salt Electrolytes. *ChemSusChem*.
- Ansuini, F. J., & Dimond, J. R. (1994). Factors affecting the accuracy of reference electrodes. *Materials Performance*, 33(11), 14–17.
- Bagotsky, V. S. (2005). *Fundamentals of electrochemistry* (Vol. 44). John Wiley & Sons.
- Baravkar, A. A., Kale, R. N., & Sawant, S. D. (2011). FT-IR spectroscopy: Principle, technique and mathematics. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), 513–519.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., Leddy, J., & Zoski, C. G. (1980). *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, vol 2 John Wiley & Sons. New York, NY.[Google Scholar].
- Barker, G. C., & Jenkins, I. L. (1952). Square-wave polarography. *Analyst*, 77(920), 685–696.
- Batley, G. E., & Florence, T. M. (1974). An evaluation and comparison of some techniques of anodic stripping voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 55(1), 23–43.
- Bilge, S., Bakirhan, N. K., Donar, Y. O., Sinag, A., Ozkan, S. A., & Okudan, E. Ş. (2020). Green synthesis of carbon based biosensor materials from algal biomass

for the sensitive detection of vardenafil. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 871. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114286>

Bilge, S., Bakirhan, N. K., Osman Donar, Y., Sinağ, A., & Ozkan, S. A. (2019). Turning toxic cigarette butt waste into the sensor material for the sensitive determination of antihypertensive drug trandolapril from its dosage form and biological samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 296, 126626. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126626>

Bilge, S., Dogan-Topal, B., Atici, E. B., Sinağ, A., & Ozkan, S. A. (2021). Rod-like CuO nanoparticles/waste masks carbon modified glassy carbon electrode as a voltammetric nanosensor for the sensitive determination of anti-cancer drug pazopanib in biological and pharmaceutical samples. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 343(March). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130109>

Bontempelli, G., Dossi, N., & Toniolo, R. (2019). Voltammetry | Polarography. In P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, & M. Miró (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)* (Third Edit, pp. 218–229). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14326-4>

Boqué, R., Maroto, A., Riu, J., & Rius, F. X. (2002). Validation of analytical methods. *Grasas y Aceites*, 53(1), 128–143.

Borgohain, K., Singh, J. B., Rama Rao, M. V, Shripathi, T., & Mahamuni, S. (2000). Quantum size effects in CuO nanoparticles. *Physical Review B*, 61(16), 11093–11096. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.61.11093>

Bryant, W. A. (1977). The fundamentals of chemical vapour deposition. *Journal of Materials Science*, 12(7), 1285–1306.

Buckley, F., & Taylor, J. K. (1945). Application of the Ilkovic equation to quantitative polarography. *J. Research Nat'l. Bur. Standards*, 34, 97.

Cheetham, A. K., & Mellot, C. F. (1997). In Situ Studies of the Sol–Gel Synthesis of Materials. *Chemistry of Materials*, 9(11), 2269–2279.

Christie, J. H., Parry, E. P., & Osteryoung, R. A. (1966). The use of normal pulse polarography in the study of electrode kinetics. *Electrochimica Acta*, 11(10), 1525–1529.

Compton, R. G., & Banks, C. E. (2018). *Understanding voltammetry*. World Scientific.

Conti, C., Colombo, C., Realini, M., Zerbi, G., & Matousek, P. (2014). Subsurface Raman analysis of thin painted layers. *Applied Spectroscopy*, 68(6), 686–691.

Cui, L., Ai, S., Shang, K., Meng, X., & Wang, C. (2011). Electrochemical determination of NADH using a glassy carbon electrode modified with Fe₃O₄ nanoparticles and poly-2, 6-pyridinedicarboxylic acid, and its application to the determination of antioxidant capacity. *Microchimica Acta*, 174(1), 31–39.

- Dayton, M. A., Brown, J. C., Stutts, K. J., & Wightman, R. M. (1980). Faradaic electrochemistry at microvoltammetric electrodes. *Analytical Chemistry*, 52(6), 946–950.
- de Souza Vieira, L. (2021). A review on the use of glassy carbon in advanced technological applications. *Carbon*.
- Diban, N., Voinea, O. C., Urtiaga, A., & Ortiz, I. (2009). Vacuum membrane distillation of the main pear aroma compound: Experimental study and mass transfer modeling. *Journal of Membrane Science*, 326(1), 64–75.
- Dogan-Topal, B., Bozal-Palabiyik, B., Ozkan, S. A., & Uslu, B. (2014). Investigation of anticancer drug lapatinib and its interaction with dsDNA by electrochemical and spectroscopic techniques. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 194, 185–194.
- Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U. S., & Ozsoz, M. (2000). Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. *Analytica Chimica Acta*, 422(2), 139–149.
- Escudero-Ortiz, V., Pérez-Ruixo, J. J., & Valenzuela, B. (2015). Development and validation of an HPLC-UV method for pazopanib quantification in human plasma and application to patients with cancer in routine clinical practice. *Therapeutic Drug Monitoring*, 37(2), 172–179. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000121>
- Feiner, A.-S., & McEvoy, A. J. (1994). The nernst equation. *Journal of Chemical Education*, 71(6), 493.
- Feldberg, S. W. (1984). Reinterpretation of polypyrrole electrochemistry. Consideration of capacitive currents in redox switching of conducting polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 106(17), 4671–4674.
- Feng, S., & Xu, R. (2001). New materials in hydrothermal synthesis. *Accounts of Chemical Research*, 34(3), 239–247.
- Fitch, A. (1990). Clay-modified electrodes: a review. *Clays and Clay Minerals*, 38(4), 391–400.
- Gabbott, P. (2008). *Principles and applications of thermal analysis*. John Wiley & Sons.
- Glasstone, S. (2011). *An introduction to electrochemistry*. Read Books Ltd.
- Gökdağ, Z., Sinağ, A., & Yumak, T. (2010). Comparison of the catalytic efficiency of synthesized nano tin oxide particles and various catalysts for the pyrolysis of hazelnut shell. *Biomass and Bioenergy*, 34(3), 402–410.

- Gooding, J. J. (2002). Electrochemical DNA hybridization biosensors. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 14(17), 1149–1156.
- Gooding, J. J. (2005). Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. *Electrochimica Acta*, 50(15), 3049–3060.
- Goswami, A. D., Trivedi, D. H., Jadhav, N. L., & Pinjari, D. V. (2021). Sustainable and green synthesis of carbon nanomaterials: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 106118.
- Gürmen, S., & Ebin, B. (2008). Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. *Metalurji Dergisi*, 150, 31–38.
- He, Y., Li, Y., Yu, J., & Qian, Y. (1999). Chemical control synthesis of nanocrystalline SnO₂ by hydrothermal reaction. *Materials Letters*, 40(1), 23–26. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(99\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(99)00043-9)
- Herrmann, B. G., & Frischauf, A.-M. (1987). Isolation of genomic DNA. *Methods Enzymol.:(United States)*, 152.
- Hickling, A. (1942). Studies in electrode polarisation. Part IV.—The automatic control of the potential of a working electrode. *Transactions of the Faraday Society*, 38, 27–33.
- Isse, A. A., & Gennaro, A. (2010). Absolute potential of the standard hydrogen electrode and the problem of interconversion of potentials in different solvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(23), 7894–7899.
- Jensen, W. B. (2012). Faraday's Laws or Faraday's Law? *Journal of Chemical Education*, 89(9), 1208–1209.
- Jiang, H., Moon, K., Zhang, Z., Pothukuchi, S., & Wong, C. P. (2006). Variable frequency microwave synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 8(1), 117–124.
- Kakhki, R. M. (2019). A review to recent developments in modification of carbon fiber electrodes. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 1783–1794.
- Kalvoda, R. (1994). Review of adsorptive stripping voltammetry—assessment and prospects. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 349(8), 565–570.
- Kamaladasa, R. J., & Picard, Y. N. (2010). Basic principles and application of electron channeling in a scanning electron microscope for dislocation analysis. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 3, 1583–1590.

- Karim, A. V, Nidheesh, P. V, & Oturan, M. A. (2021). Boron doped diamond electrodes for the mineralization of organic pollutants in the real wastewater. *Current Opinion in Electrochemistry*, 100855.
- Keiser, M. J., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2010). The chemical basis of pharmacology. *Biochemistry*, 49(48), 10267–10276.
- Kenakin, T., & Christopoulos, A. (2011). Analytical pharmacology: the impact of numbers on pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(4), 189–196.
- Kerman, K., Kobayashi, M., & Tamiya, E. (2003). Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. *Measurement Science and Technology*, 15(2), R1.
- Komoda, M., Shitanda, I., Hoshi, Y., & Itagaki, M. (2019). Instantaneously usable screen-printed silver/silver sulfate reference electrode with long-term stability. *Electrochemistry Communications*, 103, 133–137.
- Larson, R. C., Iwamoto, R. T., & Adams, R. N. (1961). References electrodes for voltammetry in acetonitrile. *Analytica Chimica Acta*, 25(1), 371–374.
- Lin, Y., Bariya, M., & Javey, A. (2021). Wearable biosensors for body computing. *Advanced Functional Materials*, 31(39), 2008087.
- Long, E. C., & Barton, J. K. (1990). On demonstrating DNA intercalation. *Accounts of Chemical Research*, 23(9), 271–273.
- Lu, X., Jordan, B., & Berge, N. D. (2012). Thermal conversion of municipal solid waste via hydrothermal carbonization: Comparison of carbonization products to products from current waste management techniques. *Waste Management*, 32(7), 1353–1365.
- Łukaszewski, M., Soszko, M., & Czerwiński, A. (2016). Electrochemical methods of real surface area determination of noble metal electrodes—an overview. *Int. J. Electrochem. Sci*, 11(6), 4442–4469.
- Minocha, M., Khurana, V., & Mitra, A. K. (2012). Determination of pazopanib (GW-786034) in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 901, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.06.004>
- Moradi, R., Khalili, N. P., Septiani, N. L. W., Liu, C., Doustkhah, E., Yamauchi, Y., & Rotkin, S. V. (2021). Nanoarchitectonics for Abused- Drug Biosensors. *Small*, 2104847.
- Murray, R. W. (1980). Chemically modified electrodes. *Accounts of Chemical Research*, 13(5), 135–141.

- Musa, A. M., Kiely, J., Luxton, R., & Honeychurch, K. C. (2021). Recent Progress in Screen-printed Electrochemical Sensors and Biosensors for the Detection of Estrogens. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116254.
- Naderi, M. (2015). Surface Area: Brunauer–Emmett–Teller (BET). In *Progress in filtration and separation* (pp. 585–608). Elsevier.
- Naik, S. N., Goud, V. V., & Rout, P. K. (2010). Dalai ,AK,". *Production of First and Second Generation Biofuels: A Comprehensive Review" Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597.
- Naito, M., Yokoyama, T., Hosokawa, K., & Nogi, K. (2018). *Nanoparticle technology handbook*. Elsevier.
- Navratil, T., & Barek, J. (2009). Analytical applications of composite solid electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39(3), 131–147.
- Nemcova, L., Barek, J., & Zima, J. (2012). A voltammetric comparison of the properties of carbon paste electrodes containing glassy carbon microparticles of various sizes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 675, 18–24.
- Ölgen, S., & Şentürk, A. M. (2021). Tirozin Kinaz İnhibitörü Bileşiklerin Tasarımı ve Antikanser Etki Mekanizmaları. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(2), 159–178.
- Osteryoung, J. (1983). *Pulse voltammetry*. ACS Publications.
- Osteryoung, J. (1993). Voltammetry for the future. *Accounts of Chemical Research*, 26(3), 77–83.
- Ozkan, S. A., Kauffmann, J.-M., & Zuman, P. (2015). Electroanalytical method validation in pharmaceutical analysis and their applications. In *Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences* (pp. 235–266). Springer.
- Özkan, S. A., Uslu, B., & Aboul-Enein, H. Y. (2003). Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 33(3), 155–181.
- Paludetto, M. N., Puisset, F., Le Louedec, F., Allal, B., Lafont, T., Chatelut, E., & Arellano, C. (2018). Simultaneous monitoring of pazopanib and its metabolites by UPLC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154, 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.013>
- Parker, V. D. (1986). Linear sweep and cyclic voltammetry. In *Comprehensive Chemical Kinetics* (Vol. 26, pp. 145–202). Elsevier.
- Parry, E. P., & Osteryoung, R. A. (1965). Evaluation of analytical pulse polarography. *Analytical Chemistry*, 37(13), 1634–1637.

- Pelesz, A., & Czapka, T. (2020). Empirical and numerical analysis of conduction and induction charging of droplets in a three-electrode system. *Energies*, 13(2), 469.
- Pešić, M., Bugarinović, J., Minić, A., Novaković, S. B., Bogdanović, G. A., Todosijević, A., Stevanović, D., & Damljanović, I. (2020). Electrochemical characterization and estimation of DNA-binding capacity of a series of novel ferrocene derivatives. *Bioelectrochemistry*, 132, 107412.
- Ramos, A., Morgan, H., Green, N. G., & Castellanos, A. (1998). Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 31(18), 2338.
- Reddy Gopireddy, R., Maruthapillai, A., Mahapatra, S., & Tamilselvi, M. (2021). Development and validation of HPLC method for enantioseparation of Ibrutinib on immobilized chiral stationary phase. *Materials Today: Proceedings*, xxxx, 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.08.358>
- Rifkin, S. C., & Evans, D. H. (1976). Analytical evaluation of differential pulse voltammetry at stationary electrodes using computer-based instrumentation. *Analytical Chemistry*, 48(14), 2174–2179.
- Rosillo-Calle, F., & Woods, J. (2012). *The biomass assessment handbook*. Routledge.
- Sarip, N. A., Aminudin, N. I., & Danial, W. H. (2021). Green synthesis of metal nanoparticles using *Garcinia* extracts: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 1–25.
- Serra, P. A. (2011). – *EMERGING MATERIALS AND APPLICATIONS Edited by Pier Andrea Serra*.
- Sharma, P., & Bhatti, T. S. (2010). A review on electrochemical double-layer capacitors. *Energy Conversion and Management*, 51(12), 2901–2912.
- Shen, Y. (2020). A review on hydrothermal carbonization of biomass and plastic wastes to energy products. *Biomass and Bioenergy*, 134, 105479.
- Sirajuddin, M., Ali, S., & Badshah, A. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1–19.
- Sınağ, A., Sungur, M., Güllü, M., & Canel, M. (2006). Characterization of the liquid phase obtained by copyrolysis of Mustafa Kemal Paşa (MKP) lignite (Turkey) with low density polyethylene. *Energy & Fuels*, 20(5), 2093–2098.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
- Smith, T. J., & Stevenson, K. J. (2007). Reference electrodes. In *Handbook of Electrochemistry* (pp. 73–110). Elsevier.

- Suryanarayana, C., & Prabhu, B. (2007). Synthesis of nanostructured materials by inert-gas condensation methods. In *Nanostructured materials* (pp. 47–90). Elsevier.
- Suslick, K. S., Hyeon, T., Fang, M., & Cichowlas, A. A. (1995). Sonochemical synthesis of nanostructured catalysts. *Materials Science and Engineering: A*, 204(1–2), 186–192.
- Swartz, M. E., & Krull, I. S. (2012). *Handbook of analytical validation*. CRC Press.
- Thacker, R. (1968). A simple procedure for making Hg\HgO reference electrodes. *Journal of Chemical Education*, 45(3), 180.
- Therese, G. H. A., & Kamath, P. V. (2000). Electrochemical synthesis of metal oxides and hydroxides. *Chemistry of Materials*, 12(5), 1195–1204.
- Torrinha, Á., Amorim, C. G., Montenegro, M. C., & Araújo, A. N. (2018). Biosensing based on pencil graphite electrodes. *Talanta*, 190, 235–247.
- TOYGUN, Ş., KÖNEÇOĞLU, G., & KALPAKLI, Y. (2013). GENERAL PRINCIPLES OF SOL-GEL. *Sigma: Journal of Engineering & Natural Sciences/Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 31(4).
- Veeraraghavan, S., Viswanadha, S., Thappali, S., Govindarajulu, B., Vakkalanka, S., & Rangasamy, M. (2015). Simultaneous quantification of lenalidomide, ibrutinib and its active metabolite PCI-45227 in rat plasma by LC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.041>
- Walenta, G., & Füllmann, T. (2004). Advances in quantitative XRD analysis for clinker, cements, and cementitious additions. *Powder Diffraction*, 19(1), 40–44.
- Weppner, W. (2019). Principles of main experimental methods. In *The CRC Handbook of Solid State Electrochemistry* (pp. 295–327). CRC Press.
- Wightman, R. M., Deakin, M. R., Kovach, P. M., Kuhr, W. G., & Stutts, K. J. (1984). Methods to improve electrochemical reversibility at carbon electrodes. *Journal of the Electrochemical Society*, 131(7), 1578.
- Wolters, R. (1990). *The quantitative validation of analytical results*. [Sl: sn].
- Yasu, T., Momo, K., Yasui, H., & Kuroda, S. (2019). Simple determination of plasma ibrutinib concentration using high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 33(3), 1–6. <https://doi.org/10.1002/bmc.4435>
- Yeh, P., Tschumi, A. I., & Kishony, R. (2006). Functional classification of drugs by properties of their pairwise interactions. *Nature Genetics*, 38(4), 489–494.
- Yosypchuk, B., & Novotny, L. (2003). Mercurous sulfate reference electrode based on solid silver amalgam. *Chemické Listy*, 97(11).

- Yosypchuk, Bogdan, & Barek, J. (2009). Analytical applications of solid and paste amalgam electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39(3), 189–203.
- Zhang, H., Quan, L., Shi, F., Li, C., Liu, H., & Xu, L. (2018). Rheological behavior of amino-functionalized multi-walled carbon nanotube/polyacrylonitrile concentrated solutions and crystal structure of composite fibers. *Polymers*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/polym10020186>
- Zhang, S., Sheng, K., Yan, W., Liu, J., Shuang, E., Yang, M., & Zhang, X. (2021). Bamboo derived hydrochar microspheres fabricated by acid-assisted hydrothermal carbonization. *Chemosphere*, 263, 128093. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128093>
- Zhou, Y., & Zhi, J. (2009). The application of boron-doped diamond electrodes in amperometric biosensors. *Talanta*, 79(5), 1189–1196.
- Zoski, C. G. (2006). *Handbook of electrochemistry*. Elsevier.