

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ANTİKANSER ÖZELLİK GÖSTEREN BAZI MADDELERİN VOLTAMETRİK
YÖNTEMLERLE TAYİNİ İÇİN MODİFİYE KARBON PASTA
ELEKTROTLARIN GELİŞTİRİLMESİ ve ds-DNA ile ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2017**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE tarafından hazırlanan “Antikanser Özellik Gösteren Bazı Maddelerin Voltametrik Yöntemlerle Tayini için Modifiye Karbon Pasta Elektrotların Geliştirilmesi ve ds-DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 13/03/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Zehra YAZAN
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Mehmet Sayım KARACAN
Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü



Üye : Prof. Dr. Zehra YAZAN
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Selma Gül ÖZTAŞ
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Kamran POLAT
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN
Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

13.03.2017


Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE

ÖZET

Doktora Tezi

ANTİKANSER ÖZELLİK GÖSTEREN BAZI MADDELERİN VOLTAMETRİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ İÇİN MODİFİYE KARBON PASTA ELEKTROTLARIN GELİŞTİRİLMESİ ve ds-DNA ile ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zehra YAZAN

Bu tez çalışmasında antikanser özelliğe sahip olan Şikonin (ŞKN), Mitoksantron (MTK), Etoposid (ETP) ve Bikalutamid (BİKA)'ın elektrokimyasal yükseltgenme mekanizmalarının aydınlatılması ve duyarlı bir voltametrik tayin yöntemi geliştirilmesi amacıyla, sepiyolit kili, çok duvarlı karbon nanotüp, TiO_2 nanoparçacıkları ve bunların uygun karışımlarıyla hazırlanan modifiye karbon pasta elektrotlar geliştirilmiştir. Bu elektrotların yüzey özellikleri dönüşümlü voltametri (DV), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) yöntemleriyle yapılmış ve en iyi özelliğe sahip elektrot/elektrotlar belirlenmiştir. Belirlenen elektrot yüzeylerinde, her bir madde için en uygun destek elektrolit ve pH belirlendikten sonra, elektrokimyasal davranışları incelenmiş ve olası reaksiyon mekanizmaları önerilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre de, her bir madde için voltametrik bir yöntem geliştirmek amacıyla AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla, biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi gibi değişkenler için en uygun koşullar belirlenmiştir. Bu koşullarda kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve doğrusal çalışma aralıkları belirlenmiştir. Geçerliliklerinin belirlenmesi amacıyla, geliştirilen yöntemler gerçek numunelere uygulanmıştır. Her iki pH değerinde de DNA-ilâç bağlanma sabiti, difüzyon katsayısı, heterojen hız sabiti (k_s) yüzey kaplama sayısı (Γ) ve Standart Gibbs serbest enerjisi (ΔG°) değişkenleri, ilâç molekülleri serbest halde iken ve ortamda DNA var iken hesaplanarak karşılaştırılmıştır.

Mart 2017, 215 sayfa

Anahtar Kelimeler: Şikonin, Mitoksantron, Etoposid, Bikalutamid, voltametri, modifiye karbon pasta elektrot, sepiyolit kili, çok duvarlı karbon nanotüpler, TiO_2 nanoparçacıkları, ds-DNA

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DEVELOPMENT of MODIFIED CARBON PASTE ELECTRODES FOR DETERMINATION OF SOME ANTICANCER AGENTS WITH VOLTAMMETRIC METHODS and INVESTIGATION of ITS ds-DNA INTERACTIONS

Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE

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

Supervisor: Prof. Dr. Zehra YAZAN

In this thesis, the electrochemical oxidation mechanisms and sensitive voltammetric determination of some anticancer agents, Shikonin (SHI), Mitoxantrone (MTX), Etoposide (ETP) and Bicalutamide (BICA), were studied. For this purpose, carbon paste electrodes were developed by using sepiolite clay, TiO₂ nanoparticles, multiwalled carbon nanotubes and their proper combination. Surface characterization of modified electrodes were done by using cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and scanning electron microscope (SEM) techniques. Then, the electrodes which have good performance were selected. For each anticancer agent, the best modified carbon paste electrode was selected and then an uygun pH, supporting electrolyte were determined. Reversibility, quasi-reversibility, irreversibility, adsorption/diffusion properties and proton/electron numbers were specified, too. By using this data, for each component, possible oxidation mechanisms were suggested. After that, AdsDPV and AdsSWV methods were developed for voltammetric analysis of components. To this end, deposition potential and deposition time were optimized on both bare carbon paste and modified carbon paste electrodes. Under optimized condition, calibration studies were done and limit of detections, limit of quantifications and linear ranges were determined. For validation, developed methods were successfully applied for the determination of agents in real samples. Drug-DNA interaction studies were carried out in two pH values of 4.8 and 7.4. In order to compare, diffusion coefficient (D), heterogeneous rate constant (k_s), surface concentration (Γ) and Standard Gibbs free energy (ΔG°) were calculated for free drug and drug-DNA complex.

March 2017, 215 pages

Key Words: Shikonin, Mitoxantrone, Etoposide, Bicalutamide, voltammetry, carbon paste electrode, sepiolite clay, multiwalled carbon nanotubes, TiO₂ nanoparticles, ds-DNA

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında bilgisi, deneyimleri ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, akademik çalışmalarımın dışında da, hayata olan bakış açısı ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Zehra YAZAN'a, (Ankara Üniversitesi Kimya ABD),

Tez çalışmalarım sırasında ihtiyaç duyduğum her anda bilgisi ve birikimi ile çalışmalarına katkıda bulunan sayın Doç. Dr. Kamran POLAT'a, (Ankara Üniversitesi Kimya ABD),

Deneysel çalışmalarım sırasında, olumlu katkılarından dolayı sayın Doç. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN'a, (Gazi Üniversitesi Kimya ABD)

Hayatımın her aşamasında bana her anlamda destek olan, güç veren ve şuanki bulunduğum yerde olmamı sağlayan en büyük destekçim, babam Yaver ESKİKÖY'e ve canım annem Azime ESKİKÖY'e, tez çalışmalarım süresince sabrı, anlayışı ve tahammülü için sevgili eşim Volkan BAYRAKTEPE ve ailesine, umutsuzluğa kapıldığım her anda hayata tutunmamı ve umutla bakmamı sağlayan canımın içi kızım Defne BAYRAKTEPE'ye,

Destek ve katkılarından dolayı, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya anabilim dalında birlikte çalıştığım sevgili arkadaşlarım Dr. Berna DALKIRAN, Dr. Ceren KAÇAR, Dr. Kübra İNAL ve İrem OKMAN KOÇOLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doktora eğitimimi TÜBİTAK-BİDEB tarafından düzenlenen 2211-Yurtiçi Lisansüstü (Doktora) Burs Programı kapsamında, bursiyer olarak aldığım destekle tamamlamaktayım. BİDEB Daire Başkanlığı'na desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'nce 13L4240009 no'lu "Bazı İlaç Etken Maddelerinin Tayini İçin Çeşitli Modifiye Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması, Elektrokatalitik Etkinin ve DNA İle Etkileşimlerinin Araştırılması" konulu projeden temin edilen sarf malzemeler kullanılarak tamamlanmıştır.

Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE
Ankara, Mart 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Kanser ve Antikanser İlaçları.....	4
2.1.1 Şikonin (ŞKN).....	6
2.1.2 Mitoksantron (MTK)	7
2.1.3 Bikalutamid (BİKA)	8
2.1.4 Etoposid (ETP)	9
2.2 Elektroanalitik Yöntemler	11
2.2.1 Dönüşümlü voltametri (DV).....	12
2.2.1.1 Tersinir reaksiyonlar	13
2.2.1.2 Tersinmez ve yarı tersinir reaksiyonlar.....	15
2.2.1.3 DV ile adsorpsiyon-difüzyon özelliklerinin incelenmesi.....	18
2.2.2 Puls voltametrisi (PV)	19
2.2.2.1 Normal puls polarografisi - voltametrisi (NPV).....	20
2.2.2.2 Diferansiyel puls voltametrisi (DPV).....	21
2.2.2.3 Kare dalga voltametrisi (KDV).....	22
2.2.3 Sıyırma voltametrisi (SV)	24
2.2.3.1 Anodik sıyırma voltametrisi (ASV)	25
2.2.3.2 Katodik sıyırma voltametrisi (KSV)	26
2.2.3.3 Adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV)	26
2.2.4 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS).....	28
2.2.5 Çalışma Elektrotları.....	30
2.2.5.1 Civa elektrotlar	30
2.2.5.2 Katı elektrotlar	31
2.3 DNA ve DNA-İlaç Etkileşimleri.....	39
2.3.1 DNA nedir?	39
2.3.2 DNA-ilaç etkileşimi ve önemi	41
2.3.2.1 DNA-ilaç etkileşim türleri	42
2.3.2.2 DNA-ilaç etkileşiminin voltametrik yöntemlerle incelenmesi.....	44
2.4 Kaynak Araştırması.....	48
2.4.1 Şikonin ile ilgili yapılan çalışmalar.....	48
2.3.2 Mitoksantron ile ilgili yapılan çalışmalar	51
2.3.3 Etoposid ile ilgili yapılan çalışmalar.....	53
2.3.4 Bikalutamid ile yapılan çalışmalar	55
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	57
3.1 Kullanılan Elektrokimyasal Sistem ve Elektrotlar	57
3.2 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Diğer Cihazlar ve Malzemeler	59
3.3 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	59

3.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	61
3.4.1 İlaç etken maddelerinin stok çözeltilerinin hazırlanması.....	61
3.4.2 0,04 M Britton Robinson (BR) tampon çözeltisinin hazırlanması.....	62
3.4.3 0,1 ve 0,2 M H ₂ SO ₄ çözeltisinin hazırlanması.....	62
3.4.4 0,1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması.....	62
3.4.5 0,1 M HCl çözeltisinin hazırlanması.....	62
3.4.6 1,0 M Asetik asit/sodyum asetat tampon çözeltisinin hazırlanması	63
3.4.7 0,05 M Fosfat tamponunun hazırlanması	63
3.4.8 Stok ds-DNA çözeltisinin hazırlanması.....	63
3.4.9 Girişim çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	63
3.5 Yalın ve Modifiye Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması	64
3.6 Farmasötik Numunelerin Analize Hazırlanması	66
3.7 Serum ve İdrar Örneklerinin Analize Hazırlanması.....	67
3.8 Elektrokimyasal Deneylerin Yapılışı.....	67
3.8.1 Voltametrik ölçümlerin yapılışı	67
3.8.1.1 pH ve destek elektrolit ortamının etkisi.....	68
3.8.1.2 Biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresinin etkisi.....	68
3.8.1.3 Kalibrasyon çalışmaları.....	68
3.8.1.4 Girişim yapan türlerin etkisi.....	69
3.8.1.5 DNA ile etkileşim çalışmalarının yapılışı	69
3.8.1.5 Elektrotların tekrar üretilebilirlik ve ömür çalışmalarının yapılışı.....	69
3.8.2 Empedans ölçümlerinin yapılışı.....	70
3.9 Taramalı Elektron Mikroskobu Ölçümlerinin Yapılışı	70
4.1 Modifiye KPE'ların Yüzey Morfolojilerinin DV, EIS ve SEM ile incelenmesi.....	70
4.1.1 Modifiye elektrotların SEM ile incelenmesi	74
4.2 Şikonin (ŞKN) ile İlgili Yapılan Voltametrik Çalışmalar	74
4.2.1. ŞKN'in elektrokimyasal davranışının DV ile incelenmesi	74
4.2.3 Tarama hızı çalışması	82
4.2.4 ŞKN'nin AdsKDV ve AdsDPV ile tayini.....	88
4.2.4.2 AdsDPV için yöntem değişkenlerinin optimizasyonu.....	92
4.2.4.3 Girişim etkisi	99
4.2.4.4 Geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelere uygulamaları	100
4.2.5 ŞKN'in ds-DNA ile etkileşimin DV ve DPV yöntemleri ile incelenmesi	102
4.2.5.1 DPV yöntemi ile elde edilen bulgular.....	102
4.2.5.2 ŞKN - DNA etkileşiminin bağlanma sabitinin (K) DPV ile hesaplanması.....	107
4.2.5.3 DV yöntemi ile elde edilen bulgular	108
4.3 Mitoksantron (MTK) ile İlgili Yapılan Voltametrik Çalışmalar.....	110
4.3.1. MTK'nın elektrokimyasal davranışının DV ile incelenmesi.....	110
4.3.2 Destek elektrolit seçimi ve pH'ın belirlenmesi	112
4.3.3 Tarama hızı çalışması	113
4.3.4 MTK'nın AdsKDV ve AdsDPV ile tayini	121
4.3.4.1 AdsKDV için yöntem değişkenlerinin belirlenmesi	122
4.3.4.2 AdsDPV için yöntem değişkenlerinin belirlenmesi.....	124
4.3.4.3 Girişim etkisi	129
4.3.4.4 Geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelere uygulamaları	130
4.3.5 MTK'nın ds-DNA ile etkileşimin DV ve DPV yöntemleri ile incelenmesi....	135
4.3.5.1 DPV yöntemi ile elde edilen bulgular.....	135
4.3.5.2 MTK - DNA etkileşiminin bağlanma sabitinin (K) DPV ile hesaplanması	137
4.3.5.3 DV yöntemi ile elde edilen bulgular	138

4.4 Etoposid (ETP) ile İlgili Yapılan Voltametrik Çalışmalar	140
4.4.1. ETP'nin elektrokimyasal davranışının DV ile incelenmesi.....	140
4.4.2 Destek elektrolit seçimi ve pH'ın belirlenmesi	146
4.4.3 Tarama hızı çalışması	148
4.4.4 ETP'nin AdsKDV ve AdsDPV ile tayini	155
4.4.4.1 AdsKDV için yöntem değişkenlerinin belirlenmesi	155
4.4.4.2 AdsDPV için yöntem değişkenlerinin belirlenmesi	157
4.4.4.3 Girişim etkisi	163
4.4.4.4 Geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelere uygulamaları	164
4.4.5 ETP'nin ds-DNA ile etkileşimin DV ve DPV yöntemleri ile incelenmesi.....	169
4.4.5.1 DPV yöntemi ile elde edilen bulgular	169
4.4.5.2 ETP - DNA etkileşiminin bağlanma sabitinin (K) DPV ile hesaplanması	171
4.4.5.3 DV yöntemi ile elde edilen bulgular	172
4.5 Bikalutamid (BİKA) ile İlgili Yapılan Voltametrik Çalışmalar	174
4.5.1. BİKA'nın elektrokimyasal davranışının DV ile incelenmesi	174
4.5.2 Destek elektrolit seçimi ve pH'ın belirlenmesi	175
4.5.3 Tarama hızı çalışması	178
4.5.4 BİKA'nın KDV ve DPV ile tayini	181
4.5.4.1 KDV ile kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması	182
4.5.4.2 DPV ile kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması	182
4.5.4.3 Girişim etkisi	186
4.5.4.4 Geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelere uygulamaları	187
4.5.5 BİKA'nın ds-DNA ile etkileşimin DV ve DPV yöntemleri ile incelenmesi ...	191
4.5.5.1 DPV yöntemi ile elde edilen bulgular	191
4.5.5.2 BİKA - DNA etkileşiminin bağlanma sabitinin (K) DPV ile hesaplanması.....	194
4.5.5.3 DV yöntemi ile elde edilen bulgular	195
5. SONUÇ.....	198
KAYNAKLAR	204
ÖZGEÇMİŞ.....	212

SİMGELER DİZİNİ

A	Elektrot yüzey alanı
D	Difüzyon katsayısı
E	Potansiyel
E_p^a	Anodik pik potansiyeli
E_p^k	Katodik pik potansiyeli
i	Akım
i_p^a	Anodik pik akımı
i_p^k	Katodik pik akımı
K	İlaç-dna bağlanma sabiti
k_s	Elektrokimyasal reaksiyonun heterojen hız sabiti
n	Aktarılan elektron sayısı
p^a	Anodik pik
p^k	Katodik pik
v	Tarama hızı
α	Elektron transfer katsayısı
Γ	Elektrot yüzey derişimi
ΔE_p	Anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark
ΔG°	Standart Gibbs serbest enerjisi
Π	Pi sayısı, 2,14

Kısaltmalar

AdsDPV	Adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametrisi
AdsKDV	Adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi
BİKA	Bikalutamid
BR	Britton Robinson tampon çözeltisi
C	Karbon
CF	Karbon fiber
CKE	Camsı karbon elektrot
Co	Kobalt
CS	Karbon sülfür
ÇDKNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
ds-DNA	Çift sarma DNA
DV	Dönüşümlü voltametri
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
ETP	Etoposid
FT-IR	Fourier transform infrared
GS	Grafen levha
Hg	Civa
KDV	Kare Dalga voltametrisi
KPE	Karbon pasta elektrot
MTK	Mitoksantron

Ni	Nikel
PDDA	poli(dialildimetilamonyum klorür)
PEDOT	Poli(3,4-etilendioksitiyofen)
Pt	Platin
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
ŞKN	Şikonin
TDKNT	Tek duvarlı karbon nanotüp
TiO ₂	Titanyumdioksit nanoparçacıkları
UME	Ultra mikro elektrot
UV-Vis	Ultraviyole görünür alan
XRD	X-ışınları kırınım
β-CD	β-siklodekstrin



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 ŞKN'in kimyasal yapısı	6
Şekil 2.2 MTK'in kimyasal yapısı	7
Şekil 2.3 BİKA'in kimyasal yapısı	8
Şekil 2.4 ETP'nin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.5 Dönüşümlü voltametri tekniğinde potansiyel - zaman grafiği.....	12
Şekil 2.6 Tersinir bir elektrot reaksiyonuna ait voltamogram.....	13
Şekil 2.7.a.Tersinmez b.yarı tersinir elektrot reaksiyonlarına ait dönüşümlü voltametri tekniği ile kaydedilen voltamogramlar	15
Şekil 2.8 Normal puls voltametrisinde uyarma sinyali	20
Şekil 2.9 İki farklı potansiyelde yükseltgenip indirgenebilen bir moleküle ait DV ve NPV eğrileri.....	21
Şekil 2.10 Diferansiyel puls voltametrisi tekniğinde potansiyel - zaman grafiği.	22
Şekil 2.11 Kare dalga voltametrisi tekniğindeki potansiyel - zaman eğrisi ve dalga şekli	24
Şekil 2.12 Anodik sıyırma voltametrisinde: a. potansiyel zaman dalga şekli b. uygulanan potansiyel neticesinden elde edilen voltamogram.....	26
Şekil 2.13 Adsorptif sıyırma voltametrisi tekniğinde bir metal iyonunun uygun bir ligand varlığındaki biriktirme ve sıyırma basamaklarını gösteren grafikler...	28
Şekil 2.14 Bir anti kanser ilaç etken maddesine (daunrubisin) ait farklı biriktirme sürelerinde kaydedilmiş AdSV voltamogramları (Kissinger 1996).....	28
Şekil 2.15.a. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen olayların modellenendiği devre, b. faradayık empedans spektrumu (Nyquist diyagramı)	29
Şekil 2.16 Karbon pasta elektrodun hazırlanmasının şematik gösterimi	33
Şekil 2.17 Çok duvarlı (ÇDKNT) ve tek duvarlı (TDKNT) karbon nanotüplerin n şematik gösterimi.	35
Şekil 2.18 Sepiyolit kristalinin şematik gösterimi	36
Şekil 2.19 TiO ₂ 'in kristal yapıları	38
Şekil 2.20 DNA ve RNA'daki riboz ve 2-deoksiribozun kimyasal yapıları.....	39
Şekil 2.21 RNA ve DNA'nın nükleozit ve nükleotidlerinin yapıları ve adları.....	40
Şekil 2.22 Watson ve Crick'in önerdiği DNA çift sarmalının şematik görünümü	41
Şekil 2.23. a. Sisplatin'in DNA'ya kovalent bağlanması, b. Sisplatin'in Guanin (G) ve Adenin'e (A) bağlanması.....	43
Şekil 2.24 İnterkalasyon ile ilaç-DNA etkileşiminin şematik gösterimi.....	44
Şekil 2.25 DNA'daki oluklara bağlanma ile ilaç-DNA etkileşiminin şematik gösterimi.....	45
Şekil 2.26 İlaç-DNA etkileşiminin elektrostatik olarak gerçekleşmesinin şematik olarak gösterimi.....	45
Şekil 3.1 CHI 760B elektrokimyasal analiz sistemi.....	57
Şekil 3.2 BAS C3 çalışma ünitesi	58
Şekil 3.3 Karbon pasta elektrot gövdesi.....	65
Şekil 4.1 Modifiye KPE'ların 5,0 mM K ₄ Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} /0,1 M KCl çözelti ortamında kaydedilmiş dönüşümlü voltamogramları (v: 0,050 V/s)	71
Şekil 4.2 Modifiye KPE'ların 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} /0,1 M KCl çözelti ortamındaki Nyquist diyagramları.....	73

Şekil 4.3.a. KPE, b. Kil/KPE c. TiO ₂ /KPE, d. ÇDKNT/KPE e. Kil/TiO ₂ /KPE f. ÇDKNT/TiO ₂ /KPE g. Kil/ÇDKNT/KPE h. Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE elektrotlarına ait SEM fotoğrafları (200 nm)	75
Şekil 4.4 1,0×10 ⁻⁴ M ŞKN'in Kil/KPE, Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE ve KPE elektrotlarında kaydedilmiş Dönüşümlü voltamogramları (pH: 2,5, <i>v</i> : 0,1 V/s)	77
Şekil 4.5 1,0 × 10 ⁻⁵ ŞKN içeren ortamda farklı kil yüzdelерinde elde edilen P ₁ 'in DV voltamogramları	79
Şekil 4.6 1,0 × 10 ⁻⁵ ŞKN içeren ortamda farklı TiO ₂ yüzdelерinde elde edilen P ₁ 'in dönüşümlü voltamogramları	79
Şekil 4.7 1,0 × 10 ⁻⁵ ŞKN içeren ortamda farklı ÇDKNT yüzdelерinde elde edilen P ₁ 'in dönüşümlü voltamogramları İç grafik: % ÇDKNT miktarı- <i>i_p</i> (pH 2,5, 0,2 M H ₂ SO ₄)	80
Şekil 4.8 A. 1,0×10 ⁻⁴ M ŞKN'in farklı elektrolit ortamlarında pH- <i>i_p</i> grafikleri	82
Şekil 4.9 1,0×10 ⁻⁴ M ŞKN'in H ₂ SO ₄ ortamında farklı pH'lardaki dönüşümlü voltamogramları	83
Şekil 4.10 1,0 × 10 ⁻⁴ M ŞKN ortamında P ₁ 'in DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları (pH 2,5)	84
Şekil 4.11 1,0 × 10 ⁻⁴ M ŞKN ortamında P ₂ 'nin DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları (pH 4,5)	84
Şekil 4.12 1,0 × 10 ⁻⁴ M ŞKN'in birinci yükseltgenme pikinin tarama hızı çalışmasında elde edilen a. <i>i_p</i> - <i>v</i> , b. log <i>i_p</i> - log <i>v</i> grafikleri	87
Şekil 4.13 1,0 × 10 ⁻⁴ M ŞKN'in ikinci yükseltgenme pikinin tarama hızı çalışmasında elde edilen a. <i>i_p</i> - <i>v</i> , b. log <i>i_p</i> - log <i>v</i> grafikleri	87
Şekil 4.14 ŞKN moleküllerinin Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE yüzeyinde gerçekleşen yükseltgenme tepkimesi için önerilen yükseltgenme mekanizmaları	89
Şekil 4.15 1,0 × 10 ⁻⁶ M ŞKN'in biriktirme potansiyeli-akım grafikleri	91
Şekil 4.16 1,0 × 10 ⁻⁶ M ŞKN'in biriktirme süresi-akım grafikleri	91
Şekil 4.17 ŞKN'in farklı derişimlerdeki AdsKDV voltamogramları	93
Şekil 4.18 1,0 × 10 ⁻⁶ M ŞKN'in biriktirme potansiyeli-akım grafikleri	94
Şekil 4.19 1,0 × 10 ⁻⁶ M ŞKN'in biriktirme süresi-akım grafikleri	95
Şekil 4.20 ŞKN'in farklı derişimlerdeki AdsDPV voltamogramları	96
Şekil 4.21 ŞKN tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin idrar içeren ortamda ve idrar içermeyen ortamda kaydedilmiş olan voltamogramları	100
Şekil 4.22 ŞKN tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin serum içeren ortamda ve serum içermeyen ortamda kaydedilmiş olan voltamogramları	101
Şekil 4.23 ŞKN'in DPV sinyaline artan DNA derişiminin etkisi	106
Şekil 4.24 ŞKN'in DNA içeren ortamına farklı derişimlerdeki NaCl'nin ilavesiyle elde edilen DPV voltamogramları	107
Şekil 4.25 log(<i>i</i> ŞKN-DNA/ <i>i</i> ŞKN-iŞKN-DNA) - log(1/DNA) grafikleri	108
Şekil 4.26 1,0×10 ⁻⁵ M MTK'nın Kil/KPE, Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE ve KPE elektrotlarında kaydedilmiş dönüşümlü voltamogramları	112
Şekil 4.27 1,0×10 ⁻⁵ M MTK ortamında farklı bileşimdeki kil yüzdelерinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları	113
Şekil 4.28 1,0×10 ⁻⁵ M MTK'nın farklı elektrolit ortamlarında <i>i_p</i> -pH grafikleri	114
Şekil 4.29 1,0×10 ⁻⁵ M MTK'nın 0,1 M H ₂ SO ₄ ortamında farklı pH değerlerindeki dönüşümlü voltamogramları	115

Şekil 4.30 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK ortamında P_1 'in DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları	116
Şekil 4.31 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK ortamında P_2 'nin DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları	116
Şekil 4.32 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK'nın birinci yükseltgenme pikinin tarama hızı çalışmalarından elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri (tarama hızı 0,0050 - 0,500 V/s)	119
Şekil 4.33 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK'nın ikinci yükseltgenme pikinin tarama hızı çalışmalarından elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri (tarama hızı 0,0050 - 0,500 V/s)	119
Şekil 4.34 MTK'nın Kil/KPE elektrot yüzeyinde gerçekleşen olası yükseltgenme mekanizmaları	121
Şekil 4.35 $1,0 \times 10^{-6}$ M MTK'nın biriktirme potansiyeli - akım grafikleri.....	122
Şekil 4.36 $1,0 \times 10^{-6}$ M MTK'nın biriktirme süresi - akım grafikleri.....	123
Şekil 4.37 MTK'nın farklı derişimlerdeki AdsKDönüşümlü voltamogramları.....	125
Şekil 4.38 $1,0 \times 10^{-6}$ M MTK'nın biriktirme potansiyeli - akım grafikleri.....	126
Şekil 4.39 $1,0 \times 10^{-6}$ M MTK'nın biriktirme süresi - akım grafikleri.....	126
Şekil 4.40 MTK'nın farklı derişimlerdeki AdsKDönüşümlü voltamogramları.....	128
Şekil 4.41 MTK'nın idrar içeren ve idrar içermeyen ortamlarındaki AdsKDV voltamogramları	131
Şekil 4.42 MTK tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin serum içeren ve serum içermeyen ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları	132
Şekil 4.43 MTK tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin flakon ve standart ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları	133
Şekil 4.44 MTK'nın pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları	136
Şekil 4.45 $\log(i\text{MTK-DNA}i\text{MTK-iMTK-DNA}) - \log(1/\text{DNA})$ grafikleri.....	138
Şekil 4.46 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP'nin Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE, Kil/KPE ve KPE elektrotlarında kaydedilmiş dönüşümlü voltamogramları	141
Şekil 4.47 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP farklı yüzelerde kil içeren elektrot yüzeylerindeki dönüşümlü voltamogramları	143
Şekil 4.48 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP içeren ortamda farklı TiO ₂ yüzdelğinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları	144
Şekil 4.49 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP içeren ortamda farklı ÇDKNT yüzdelğinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları	145
Şekil 4.50 $5,0 \times 10^{-5}$ M ETP için pH- i_p grafikleri a. P_1 , b. P_2 (v : 0,1 V/s)	147
Şekil 4.51 ETP'ye ait P_1 ve P_2 yükseltgenme piklerinin pH ile değişimini veren dönüşümlü voltamogramları	147
Şekil 4.52 $5,0 \times 10^{-5}$ M ETP ortamında P_1 'in DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları	148
Şekil 4.53 $5,0 \times 10^{-5}$ M ETP ortamında P_2 'in DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları	149
Şekil 4.54 ETP'ye ait P_1 'in DV ile yapılan tarama hızı verilerinden elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri	151
Şekil 4.55 ETP'ye ait P_2 'in DV ile yapılan tarama hızı verilerinden elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri	152
$5,0 \times 10^{-5}$ M ETP, tarama hızı 0,005 - 0,3 V/s.....	152

Şekil 4.56 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP'nin Kil/KPE elektrot yüzeyindeki çok döngülü DV'leri	153
Şekil 4.57 ETP moleküllerinin Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE yüzeyinde gerçekleşen olası yükseltgenme mekanizması.....	154
Şekil 4.58 $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP'nin biriktirme potansiyeli - akım grafikleri	156
Şekil 4.59 $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP'nin biriktirme süresi - akım grafikleri.....	157
Şekil 4.60 ETP'nin farklı derişimlerdeki AdsKDV voltamogramları	158
Şekil 4.61 $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP'nin biriktirme potansiyeli - akım grafikleri	159
Şekil 4.62 $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP'nin biriktirme süresi - akım grafikleri.....	160
Şekil 4.63.a. ETP'nin KPE elektrot yüzeyinde farklı derişimlerdeki DPV voltamogramları b. ETP'nin Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE yüzeyinde farklı derişimlerdeki AdsDPV voltamogramları	161
Şekil 4.64 ETP tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin idrar içeren ve idrar içermeyen ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları	164
Şekil 4.65 ETP tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin serum içeren ortamda ve serum içermeyen ortamda kaydedilmiş olan voltamogramları	166
Şekil 4.66 Etosid flakon ve ETP standardının voltamogramları.....	167
Şekil 4.67 ETP'nin pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları	170
Şekil 4.68 log(iETP-DNAiETP-iETP-DNA)'ye karşılık log(1/DNA) grafikleri.....	172
Şekil 4.69 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın Kil/KPE, Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE ve KPE elektrotlarında kaydedilmiş dönüşümlü voltamogramları	175
Şekil 4.70 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA ortamında farklı bileşimdeki kil yüzdelinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları.....	176
Şekil 4.71 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın farklı elektrolit ortamlarında i_p -pH grafikleri (v :0,1 V/s)	177
Şekil 4.72 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın fosfat tamponu ortamında farklı pH değerlerindeki dönüşümlü voltamogramları	177
Şekil 4.73 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA ortamında DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramlar (Fosfat tamponu pH: 7,0)	178
Şekil 4.74 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın tarama hızıyla pik akımının değişimi	180
Şekil 4.75 BİKA'nın Kil/KPE elektrot yüzeyinde gerçekleşen olası yükseltgenme mekanizması.....	181
Şekil 4.76 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın a. Klasik DPV ve farklı biriktirme sürelerindeki AdsDPV voltamogramları b. Klasik KDV ve farklı biriktirme sürelerindeki AdsKDV voltamogramları	182
Şekil 4.77 BİKA'nın farklı derişimlerdeki KDönüşümlü voltamogramları	183
Şekil 4.78 BİKA'nın farklı derişimlerdeki DPV voltamogramları.....	184
Şekil 4.79 BİKA tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin idrar içeren ve idrar içermeyen ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları	188
Şekil 4.80 BİKA tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin serum içeren ve serum içermeyen ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları	189
Şekil 4.81 BİKA tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin tablet ve standart ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları	190
Şekil 4.82 BİKA'nın pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları	194
Şekil 4.83 log(iBİKA-DNAiBİKA-iBİKA-DNA)-log(1/DNA) grafiği	195

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Antineoplastik ilaçların sınıflandırılması.....	6
Çizelge 2.2 KPE'un farklı elektrolit ortamlarındaki potansiyel pencereleri (Yılmaz 2016)	33
Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.....	60
Çizelge 3.2 Modifiye karbon pasta elektrotlar ve bileşim miktarları.....	65
Çizelge 4.1 Modifiye KPE'lerin 5,0 mM $K_4Fe(CN)_6^{3-/4-}$ /0,1 M KCl çözelti ortamındaki elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması	72
Çizelge 4.2 KPE ve Modifiye KPE'lerin 5,0 mM $K_4Fe(CN)_6^{3-/4-}$ /0,1 M KCl çözelti ortamında DV yöntemi ile hesaplanan ortalama yüzey alanı değerleri	72
Çizelge 4.3 Modifiye KPE'lerin $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN çözelti ortamındaki elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması	77
Çizelge 4.4 Kil miktarı optimizasyonunda her bir bileşenin % bileşim oranları	78
Çizelge 4.5 ÇDKNT miktarı optimizasyonunda her bir bileşenin % bileşim oranları	80
Çizelge 4.6 Kil/ÇDKNT/ TiO_2 /KPE için en uygun bileşim yüzdeleri	81
Çizelge 4.7 ŞKN'in birinci yükseltgenme piki olan P_1 'in tarama hızı değişimi ile elde edilen elektrokimyasal değişkenler	81
Çizelge 4.8 ŞKN'in ikinci yükseltgenme piki olan P_2 'in tarama hızı değişimi ile elde edilen elektrokimyasal değişkenler	85
Çizelge 4.9 KPE ve Kil/ÇDKNT/ TiO_2 /KPE elektrotları yüzeyinde geliştirilen yöntemlerin regresyon değişkenleri	85
Çizelge 4.10 ŞKN'in AdsDPV ile tayinine girişim yapması muhtemel türlerin etkisi	97
Çizelge 4.11 AdsKDV ve AdsDPV yöntemlerinde idrar içeren ortamda ŞKN için yapılan geri kazanım verileri.....	99
Çizelge 4.12 AdsKDV ve AdsDPV yöntemlerinde serum içeren ortamda ŞKN için yapılan geri kazanım verileri.....	101
Çizelge 4.13 AdsKDV ve AdsDPV yöntemlerinde serum içeren ortamda ŞKN için yapılan geri kazanım verileri.....	102
Çizelge 4.14 ŞNK tayini için geliştirmiş olan voltametrik tekniklerin literatürde Yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması	104
Çizelge 4.15 MTK'nın birinci yükseltgenme piki olan P_1 'in tarama hızı değişimi ile elde edilen elektrokimyasal değişkenler.....	110
Çizelge 4.16 MTK'nın ikinci yükseltgenme piki olan P_1 'in tarama hızı değişimi ile elde edilen elektrokimyasal değişkenler.....	117
Çizelge 4.17 KPE ve Kil/KPE elektrotları yüzeyinde geliştirilen yöntemlerin validasyon değişkenleri.....	118
Çizelge 4.18 MTK'nın AdsKDV ile tayinine girişim yapması muhtemel türlerin etkisi	129
Çizelge 4.19 MTK tayini için serum ortamında AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri	130
Çizelge 4.20 MTK tayini için flakon örneklerinden AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri	132

Çizelge 4.21 MTK tayini için geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerin literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması.....	133
Çizelge 4.22 MTK-DNA etkileşimi için hesaplanan Difüzyon katsayısı (D), heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (Γ), bağlanma sabiti (K) ve standart Gibbs serbest enerji ΔG^0	134
Çizelge 4.23 Modifiye KPE'lerin $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP ortamındaki elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması	140
Çizelge 4.24 Kil miktarı optimizasyonunda elde edilen her bir bileşenin % oranları.....	142
Çizelge 4.25 TiO_2 miktarı optimizasyonunda elde edilen her bir bileşenin % oranları.....	144
Çizelge 4.26 ÇDKNT miktarı optimizasyonunda elde edilen her bir bileşenin % oranları.....	145
Çizelge 4.27 Kil/ÇDKNT/ TiO_2 /KPE için en uygun bileşim yüzdeleri.....	146
Çizelge 4.28 ETP'nin birinci yükseltgenme piki olan P_1 'in tarama hızı değişimi ile elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması	146
Çizelge 4.29 ETP'nin ikinci yükseltgenme piki olan P_2 'in tarama hızı değişimi ile elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması	149
Çizelge 4.30 ETP'nin ikinci yükseltgenme piki olan P_2 'in tarama hızı değişimi ile elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması	150
Çizelge 4.31 KPE ve Kil/ÇDKNT/ TiO_2 /KPE elektrotları yüzeyinde geliştirilen yöntemlerin regresyon değişkenleri	162
Çizelge 4.32 ETP'nin AdsKDV ile tayinine girişim yapması muhtemel türlerin etkisi	163
Çizelge 4.33 ETP tayini için idrar ortamında AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri	165
Çizelge 4.34 ETP tayini için serum ortamında AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri	166
Çizelge 4.35 ETP tayini için flakon örneklerinden AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri	167
Çizelge 4.36 ETP tayini için geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerin literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması.....	168
Çizelge 4.37 ETP-DNA etkileşimi için hesaplanan Difüzyon katsayısı (D), heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (Γ), bağlanma sabiti (K) ve Gibbs serbest enerji (ΔG^0) değerleri.....	174
Çizelge 4.38 BİKA'nın yükseltgenme pikinin tarama hızı değişimi ile elde edilen elektrokimyasal değişkenleri	179
Çizelge 4.39 KPE ve Kil/KPE elektrotları yüzeyinde geliştirilen yöntemlerin regresyon değişkenleri	185
Çizelge 4.40 BİKA'nın KDV ile tayinine girişim yapması muhtemel türlerin etkisi	187
Çizelge 4.41 KDV ve DPV yöntemlerinde idrar içeren ortamda ETP için yapılan geri kazanım verileri.....	188
Çizelge 4.42 KDV ve DPV yöntemlerinde serum içeren ortamda BİKA için yapılan geri kazanım verileri.....	189
Çizelge 4.43 ETP tayini için tablet örneklerinden KDV ve DPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri	191

Çizelge 4.44 BİKA tayini için geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerin literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması	193
Çizelge 4.45 BİKA-DNA etkileşimi için hesaplanan Difüzyon katsayısı (D), heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (Γ), bağlanma sabiti (K) ve Gibbs serbest enerji (ΔG°) değerleri	197



1. GİRİŞ

Kelime anlamı olarak kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren kötü urlara denir. Genel anlamda ise kanser vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan 100'den fazla hastalık grubudur. Tedavi edilmez ise ciddi rahatsızlıklara, hatta ölüme dahi neden olabilir. Günümüzde kanserin tedavi edilmesi amacıyla kullanılan teknikler arasında yer alan ve en sık kullanılan yöntemlerden biri kemoterapidir. Kemoterapi, kanser hücrelerini yok etmek veya bu hücrelerin büyümesini kontrol altına almak için antikanser ilaçlar kullanılarak yapılan tedavidir. Antikanser ilaçlarının hasta vücuduna uygulama şekilleri değişiklik göstermekle birlikte, dozları genellikle hasta vücudunun metrekaresi başına mg olarak uygulanır. Diğer tüm ilaçlarda olduğu gibi, antikanser ilaçlarının da vücuda alındıktan sonra;

- ✓ yapısında meydana gelen fiziksel ve farmokinetik değişikliklerin izlenmesi,
- ✓ hedef doku ve organlarının belirlenmesi,
- ✓ insan vücudundan atılma şeklinin belirlenmesi

amacıyla ilaç analiz yöntemleri günümüzde oldukça önemlidir. Bu amaçla geliştirilmiş veya geliştirilecek olan hızlı, duyarlı, düşük maliyetli, yüksek doğruluk ve kesinlikte analiz yapan yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle günümüzde, bu ihtiyaçları karşılayacak yeni cihaz ve yöntem geliştirme çalışmaları hızla devam etmektedir.

Son yıllarda ilaç analizlerinde kullanılan çok çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemler arasında kromatografik, spektroskopik ve voltametrik yöntemler sayılabilir. 1960'lı yılların ortalarında klasik voltametrik yöntemlerde yapılan pek çok değişiklik, yöntemin duyarlılığını ve seçiciliğini büyük ölçüde arttırmış ve özellikle tıp, eczacılık, biyokimya ve çevre çalışmalarında geniş ve giderek artan bir uygulama alanı sağlamıştır. Bu yöntemlerin, çalışmalarda sıklıkla kullanılmasının nedeni numunelerin kolayca ve çok kısa bir sürede hazırlanabilmesi, analiz süresinin kısa olması, ortamda bulunan katkı maddelerinin veya safsızlıkların analiz sonucunu etkilememesi, bu tekniklerin ürün

kalite kontrolünde kullanabilmesine olanak sağlamaktadır. Tablet, kapsül, süspansiyon, şurup v.b. ilaç formülasyonlarının çözünmeyen kısımlarının veya katkı maddelerinin genelde elektroaktiviteleri bulunmadığı için herhangi bir ayırma işlemine gerek olmadan analizleri yapılabilir. Ayrıca bu yöntemlerin diğer bir üstünlüğü de pahalı ve az miktardaki ilaçların analizinde de çok az miktarda numuneye ihtiyaç göstermesidir.

Bu avantajlarının yanı sıra, ilaçların vücuda alınmasını takiben fiziksel ve farmokinetik yapısında meydana gelen değişiklikler bu ilaçların yükseltgenme/indirgenme davranışlarındaki değişikliklere ve bu değişiklikler sonrasında meydana gelen ürünlere dayanmaktadır. Bütün bu değişiklikler ve yükseltgenme/indirgenme mekanizmaları son yıllarda geliştirilmiş olan modern voltametrik yöntemlerle aydınlatılabilmektedir.

Bu tez çalışmasında, antikanser özellik gösteren ve yapısında kinon - hidrokinon redoks grubu içeren Şikonin (ŞKN), Mitoksantron (MTK), Etoposid (ETP) ve bunların dışında Biklutamid (BİKA)'ın elektrokimyasal davranışı yalın karbon pasta ve uygun modifiye karbon pasta elektrotlarla incelenmesi ve olası yükseltgenme mekanizmalarının önerilmesi amaçlanmıştır. Karbon pasta elektrodun modifikasyonu amacıyla sepiyolit kili, çok duvarlı karbon nanotüpler ve TiO_2 nanoparçacıklarla bunların uygun karışımlarının kullanılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre uygun elektrot bileşimine sahip elektrot yüzeyleri belirlendikten sonra, bu elektrot yüzeylerinde her bir madde için AdsKDV ve AdsDPV yöntemlerinin geliştirilmesi ve bu yöntemlerin gerçek numunelere (idrar, serum ve tablet/flakon) uygulanması düşünülmüştür.

Bilindiği üzere, vücudumuzdaki sağlıklı hücreler bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Normalde vücudun sağlıklı ve düzgün çalışması için hücrelerin büyümesi, bölünmesi ve daha çok hücre üretmesine gereksinim vardır. Bazı durumlarda ise bunun aksi bir durum ortaya çıkabilir ve yeni hücrelere gerek olmadan hücreler bölünmeye devam eder. Bilincini kaybetmiş kanser hücreleri, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalarak tümör oluştururlar. Bu olayın sebebi ise DNA iplikçğinde meydana

gelen bir hasardır ve DNA'nın bu şekilde kontrolsüz çoğalmasıyla kötü huylu tümör olarak adlandırdığımız kanser hücreleri ortaya çıkmaktadır. Kemoterapide kullanılan antikanser ilaçları ise bu kontrolsüz çoğalmanın önüne geçmek amacıyla direk olarak DNA'ya etki etmektedirler. Bu nedenle, tez çalışmasının ikinci kısmında antikanser özellik gösteren söz konusu maddelerin DNA ile etkileşimlerinin önemli olması sebebiyle ds-DNA ile etkileşimleri voltametrik olarak 2 farklı fizyolojik pH değerinde (4,8 ve 7,4) yürütülmesi amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser ve Antikanser İlaçları

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen, sonucu bazı türler için ölüme biten ve bu nedenle de tedavisi için en çok araştırma yapılan, çok çeşitli yöntemler denenmiş ve batı ülkelerinde kalp hastalıklarından sonra ölüme neden olan ikinci sıradaki hastalıktır (Ölgen vd. 2002). Klinik olarak kanser ise, köken aldıkları hücre tiplerine bağlı olarak değişik davranışlar gösteren yüze yakın sayıdaki karmaşık hastalıkları kapsayan bir olgu olarak tanımlanır. Kanserler başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, yayılımına, evrelerine ve tedaviye verdikleri tepkilere göre çeşitlilik göstermektedirler. Buna rağmen, tüm kanserler, onları tek bir birim aile içerisinde birleştiren, moleküler seviyede ortak, karakteristik özellikler gösterirler.

Tüm kanser hücreleri iki temel özelliği paylaşırlar;

- ✓ anormal hücre büyümesi ve bölünmesi (hücre çoğalması)
- ✓ hücreleri vücudun diğer bölümlerine yayılmasını ve istilasını engelleyen normal sınırlamalardaki anormallikler.

Bu işlevler, normal hücrelerde uygun bir şekilde, zamanında ve yerinde ifade edilen genler tarafından sıkıca denetlenmektedirler. Kanser hücrelerinde ise bu genler ya mutasyona uğrar ya da uygun olmayan şekilde ifade edilirler.

Kanser tedavisinde uygulanan yöntemler başlıca 3 ana başlık altında toplanabilir;

- (1) Cerrahi Girişim
- (2) Işınla Tedavi
- (3) İlaçla Tedavi (Kemoterapi)

Neoplastik, yani tümör özelliğinde olan hücreler, önce cerrahi olarak veya radyasyon tedavisi ile azaltılır veya gelişimi yavaşlatılır. Bunu kemoterapi, immunoterapi veya bu tedavi yöntemlerinin birlikte kullanılması takip eder. Kansere kemoterapisinde amaçlanan, kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek ve farklı odaklarda yeniden gelişmesini, tümüyle ortadan kaldırılmasını sağlayacak sitotoksik etki sağlamaktır.

Gelişmiş ülke insanların en önemli sağlık sorunlarının başında kanser hastalığı gelmektedir. Örneğin, Amerikan halkının yaklaşık % 25'inin yaşamları boyunca bir kez herhangi bir kanser tanısıyla karşılaşacakları düşünülmektedir. Dünyada her yıl bir milyon yeni kanser hastası teşhis edilmektedir. Bu hastaların % 25'den azı tek başına cerrahi ve/veya radyoterapi ile tedavi edilebilmektedir. Geriye kalan hastaların büyük bir bölümüne hastalığın herhangi bir evresinde kemoterapi uygulanmaktadır. Günümüzde kanser hastalarının belli bir bölümünde kanserin tipine de bağlı olmak üzere kemoterapi ile tam tedavi veya uzun bir iyileşme dönemi (remisyon) sağlanabilmektedir. Günümüzde, tek başına cerrahi veya radyasyonla tedavi başarısı % 20 iken, kemoterapi ile tedavi başarısı % 75'lere kadar çıkmıştır (Ölgen vd. 2002).

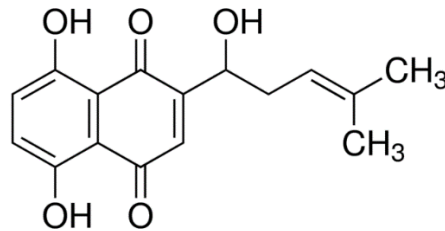
Kemoterapi ile (Antineoplastik) tedavinin ana ilkesi hastanın veya konakçının normal hücrelerine zarar vermeksizin, tümör hücresinin büyümesini, çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Ancak, bu ilaçların seçicilikleri oldukça düşüktür. Kemoterapide kullanılan antineoplastik ilaçların etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması çizelge 2.1'de verilmiştir.

Bu tez çalışmasında, aşağıda kimyasal ve farmakolojik özellikleri verilen 4 antikanser özelliğe sahip madde ile voltametrik çalışmalar yer almaktadır.

Çizelge 2.1 Antineoplastik ilaçların sınıflandırılması

Alkilleyici ilaçlar	Siklofosamid, Mekloretamin, Klorambusil, Melfalan, İfosamid, Aziridin, Altretamin, Busulfan, Karmustin, Lemustin, Semustin, Dakarbazin, Prokarbazin
Antimetabolitler	Metotreksat, Aminopterin, Merkaptopurin, Tioguanin, Fludarabin, 5-Fluorourasil, Sitarabin, Gemsitabin, Kladribin, Raltitreksed
Vinka alkaloidleri ve diğer bitkisel kaynaklı ilaçlar	Vinblastin, Vinkristin, Vindesin, Vinorelbin, Podofilotoksin, Etoposid, Tenipozid, Paklitaksel, Dosetaksel, İrinotekan, Topotekan,
Sitotoksik antibiyotikler	Daktinomisin (Aknitinomisin - D), Daunorubisin, Doksorubisin (Adriamisin), Epirubisin, Aklarubisin, Mitoksantron (Mitozantron), Bleomisin, Plikamisin (Mitramisin), Mitomisin,
Platin türevleri	Sisplatin, Karboplatin, Oksaliplatin, Amifostin,
L- Asparaginaz	
Hormonlar ve Hormon Antagonistleri	Estrojenler, Progestinler, Antiöstrojenler, Antiandrojenler, GnRH analogları, Glukokortikoid Hormonlar, Mitotan, Aminoglutetimid, Trilostan, Bikalutamid
Diğer ilaçlar	Hidroksiüre (Hidroksikarbamid), Amsakrin, Altretamin, Pentostatin, Tiretinoin, Radyoizitoplar

2.1.1 Şikonin (ŞKN)



Şekil 2.1 ŞKN'in kimyasal yapısı

Sistematik (IUPAC) isimlendirmesi: (R)-5,8-Dihidroksi-2-(1-hidroksi-4-metilpent-3-en-1-il)naftalin-1,4-dion

Kapalı Formülü: C₁₆H₁₆O₅

Molekül Kütlesi: 288.295 g/mol

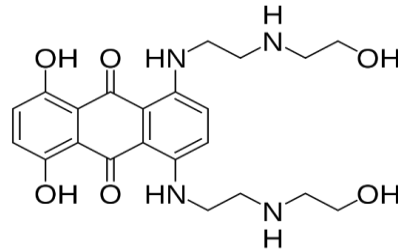
Şikonin için hayvan deneyleri tamamlanmış olup henüz ilaç olarak piyasaya sürülme aşamasına gelmemiştir.

Şikonin'in antikanser özellik göstermesinin yanı sıra; anti-mikrobiyal, anti-fungal, Anti-inflamatuvar özellikleri de mevcuttur (Huang vd. 2007). Bu madde, Çin'de yetişen *Lithospermum erythrorhizon* adlı bitkiden ekstrakte edilmektedir. Çin'in geleneksel ilacı olarak ün salmış olup çeşitli kızarıklıklar ve döküntülerde, boğaz ağrılarında, sivilcelerde ve yanık tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Wiench vd. 2012).

Şikonin'in farmokinetik özellikleri üzerine yapılan bir fare deneyinde, söz konusu maddenin oral ve intramüsküler olarak vücuda enjekte edilmesinden sonraki yarı ömrünün 8,79 saat, dağılım hacminin ise 8,91 L/kg olduğunu gözlemlemişlerdir (Andujar vd. 2013).

He vd. (2005) yılında, Şikonin'nin serumda yer alan albümine hidrofobik interkalasyon bağları ile kuvvetli bir şekilde bağladığını spektroskopik olarak kanıtlamışlardır (He vd. 2005).

2.1.2 Mitoksantron (MTK)



Şekil 2.2 MTK'nin kimyasal yapısı

Sistematik (IUPAC) isimlendirmesi: 1,4-dihidroksi-5,8-bis[2-(2-hidroksietilamino) etilamino]-antrasen-9,10-dion

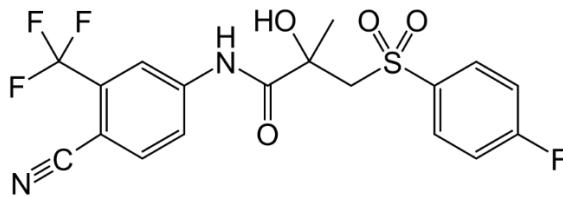
Kapalı Formülü: C₂₂H₂₈N₄O₆

Molekül Kütlesi: 444,481 g/mol

Hormon tedavisine cevap vermeyen ve ağırlı prostat kanser hastalarında başlangıç kemoterapisi olarak uygulanır. Başlangıç tedavisi olarak uygun görülen diğer ilaçlarla birlikte akut nonlimfositik lösemi (myelojen, promyelositik, monositik ve akut eritroid lösemi) tedavisinde kullanılır.

Mitoksantron bir antrasiklin türevi olup antrosenedion grubundan sentetik bir antineoplastiktir. Mitoksantron'un etki mekanizması tam anlaşılmamakla birlikte tümör hücresinde DNA ve RNA sentezini inhibe ederek sitotoksik etki gösterdiği ileri sürülmüştür. Mitoksantron bir DNA-reaktif ajanıdır, DNA (deoksiribonükleik asit)'nın hidrojen bağları arasına girerek çarpaz bağlara ve tel kopmalarına neden olur. Yaklaşık %78 oranında plazma proteinlerine bağlanır (www.ilacprospektusu.com. 2016).

2.1.3 Bikalutamid (BİKA)



Şekil 2.3 BİKA'nın kimyasal yapısı

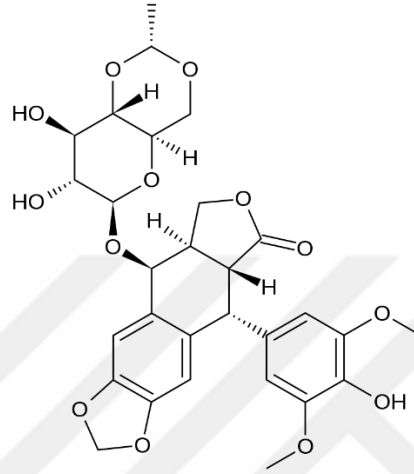
Sistematik (IUPAC) isimlendirmesi: (RS)-N-[4-siyano-3-(triflorometil)fenil]-3-[(4-florofenil)sulfonyl]-2-hidroksi-2-metilpropanamid

Kapalı Formülü: C₁₈H₁₄F₄N₂O₄S

Molekül Kütlesi: 430,373 g/mol

Bikalutamid ilerlemiş prostat kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bikalutamid kandaki proteinlere yüksek oranda (% 96) bağlanır (www.ilacprospektusu.com, 2016).

2.1.4 Etoposid (ETP)



Şekil 2.4 ETP'nin kimyasal yapısı

Sistematik (IUPAC) isimlendirmesi: 4'-Dimetil-epipodofilotoksin 9-[4,6-O-(R)-etiliden-beta-D-glukopranosid], 4' -(dihidrojen fosfat)

Kapalı Formülü: $C_{29}H_{32}O_{13}$

Molekül Kütlesi: 588,557 g/mol

- Refrakter testis tümörleri: Refrakter testis tümörlü hastaların tedavisinde diğer kemoterapötik ajanlarla kombine tedavide.
- Küçük hücreli akciğer kanseri: Küçük hücreli akciğer kanserli hastaların tedavisinde diğer kemoterapötik ajanlarla kombine tedavide.
- Hoçkin hastalığı
- Malin (Hoçkin dışı) lenfomalar, özellikle histiyositik tip
- Akut non-lenfositik löseminin tedavisinde kullanılmaktadır.

Çevremizde bulunan birçok gıda, pestisit, içecek, ilaç etken maddesi gibi maddelerin tayininde genellikle kromatografik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bu yöntemlerle maddelerin analizleri hızlı, hassas bir şekilde gerçekleştirilebilmekle birlikte

tekrarlanabilirlikleri oldukça yüksektir. Ayrıca, bu tekniklerin çoklu karışımlara uygulanabilmesi en önemli avantajlarıdır. Ancak, cihaz maliyetlerinin yanı sıra kullanılan kimyasalların miktarı ve maliyeti oldukça yüksektir. Kromatografik yöntemlerin dışında, pek çok ilaç etken maddesinin kromofor gruplara sahip olmasından dolayı, spektrofotometrik yöntemler de söz konusu maddelerin analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak kromatografik çalışmalarda kullanılan yöntemin gözlenebilme ve tayin sınırı değerleri, sistemde kullanılan dedektöre bağlı olduğundan sıradan dedektörler kullanıldığında plazma, idrar ve serumda çoğu zaman eser miktarda bulunan türlerin tayini mümkün olmamaktadır. Eser miktarda bulunan türlerin tayini için daha gelişmiş dedektör sisteminin kullanılması gerekmektedir ki bu gereksinim analiz yöntemini daha karmaşık hale getirirken yöntemin ekonomik maliyetini de arttırmaktadır. Spektrofotometrik yöntemlerde ise gözlenebilme ve gözlenebilme sınırı değerlerinin diğer yöntemlere göre daha yüksek olmasının yanında kan ve plazma sıvılarında uygulama alanlarının oldukça kısıtlı olması yöntemin geçerliliğini sınırlandırmaktadır (Taşdemir vd. 2011).

Diğer taraftan biyolojik numunelerin ve ilaçların analizinde elektrokimyasal yöntemlerin kullanımı gün geçtikçe daha yaygın hale gelmektedir. Bu artışın sebebi, kolaylıkla ve güvenle kullanılabilen geniş çeşitliliğe sahip elektrotların, elektrokimyasal cihazların ve elektrokimyasal yöntemlerin ticari olarak geliştirilmesidir. İlaç etken maddelerinin birçoğu elektroaktiftir ve bu da söz konusu maddelerin voltametrik yöntemler yardımıyla analiz edilmesine imkân sağlamaktadır. Voltametrik yöntemlerle etken maddelerin analizi, çözünmeyen ilaç katkı maddeleri, serumda ve plazmada bulunabilen endojen maddeler gibi bozucu etkilere rağmen girişim etkisi olmadan duyarlı bir biçimde yapılabilmektedir. Voltametrik yöntemlerin diğer yöntemlere göre bir takım avantajları vardır. Bu avantajlar; az miktarda etken madde ve çözücü ile çalışma olanağı sunması, kullanılan cihazların oldukça basit ve diğer yöntemlere göre daha ekonomik olması, kolay uygulanabilir olması, herhangi bir ön işleme ihtiyaç duyulmaması ve oldukça hassas bir yöntem olmasıdır (Wang 2000, Bard ve Faulkner 2001). Diğer yöntemlere göre birçok avantaja sahip olan voltametrik yöntemlerle ilgili ayrıntılı bilgi bölüm 2.2’de verilmiştir.

2.2 Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik yöntemlerin en yaygın kullanılanları voltametri ve potansiyometridir. Potansiyometri, hücredeki potansiyel değişimini temel alır. Voltametri ise uygulanan anodik veya katodik potansiyelle, akım değişimini inceler. Her iki yöntemde de elektrokimyasal hücre, en az iki elektrot ve bir elektrolit çözeltisinden oluşmalıdır. Çözelti içerisinde yer alan hedef analit veya analitlere cevap veren elektroda indikatör elektrot veya çalışma elektrodu adı verilir. Voltametrinde indikatör elektrot olarak, cıva, platin, altın, paladyum, karbon elektrot (grafit, karbon pasta elektrot, camsı karbon, karbon cloth elektrot) gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Sabit potansiyele sahip olan diğer elektroda ise referans elektrot adı verilir (Wang 2006).

Voltametrinde deneyler üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirilmektedir. Üç elektrottan birisi indikatör elektrottur. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrottur. Elektrot sistemindeki üçüncü elektrot ise karşıt veya yardımcı elektrottur. Karşıt elektrot olarak ise genellikle platin (Pt) tel kullanılır.

Voltametrik teknikler, sistemden geçen akımın sıfır olmadığı durumlarda, elektrot-çözelti ara yüzeyinde meydana gelen yük transferi olaylarını inceler. Voltametrinde akım, çalışma elektrodu üzerinde, elektroaktif türlerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. İndirgenmeden kaynaklanan akıma *katodik akım*, yükseltgenmeden kaynaklanan akıma ise anodik akım denir.

Voltametrik teknikler; yüksek duyarlılık, elektroaktif türlere karşı seçicilik, geniş doğrusal çalışma aralığı, taşınabilir ve düşük maliyetli cihazlara ve çok çeşitli elektrotlara sahip olması gibi avantajlar sunar (Wang 2006).

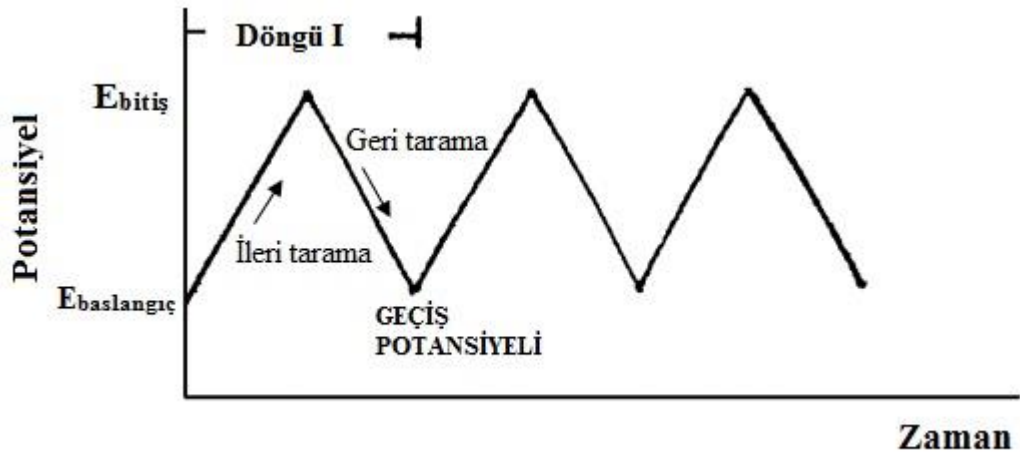
Bu tez çalışmasında, voltametrik tekniklerden yararlanılmıştır ve bundan sonraki bölümlerde tez çalışmasında kullanılmış olan yöntemlerle ilgili ayrıntılı bilgilere yer verilmiştir.

2.2.1 Dönüşümlü voltametri (DV)

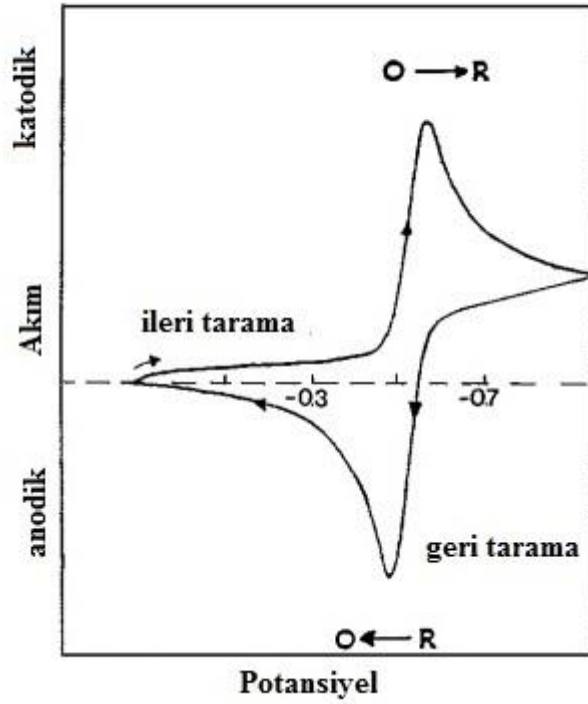
Dönüşümlü voltametri (DV) tekniği, elektrokimyasal reaksiyonlarla ilgili bilgi sahibi olmamızı sağlayan ve en sık kullanılan tekniktir. DV yardımıyla, redoks reaksiyonlarının termodinamiği, heterojen elektron transfer reaksiyonlarının kinetiği ve adsorpsiyon özellikleri ile ilgili bilgiler hızlı bir şekilde edinilmektedir.

DV, durgun çözelti ortamında, çalışma elektroduna uygulanan üçgen dalga şeklindeki potansiyelin (Şekil 2.5) doğrusal olarak değiştirilmesi neticesinde oluşan akım-potansiyel eğrisinin incelenmesine dayanan elektrokimyasal bir yöntemdir. Elde edilen bu akım-potansiyel eğrisine “voltamogram” adı verilir (Şekil 2.6).

DV yöntemi ile elektrokimyasal reaksiyonun tersinirliği, tersinmez ve yarı-tersinirliği hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Wang 2006).



Şekil 2.5 Dönüşümlü voltametri tekniğinde potansiyel - zaman grafiği (Wang 2000)



Şekil 2.6 Tersinir bir elektrot reaksiyonuna ait voltamogram (Wang 2000)

2.2.1.1 Tersinir reaksiyonlar

Şekil 2.6 tersinir bir elektrokimyasal reaksiyona ait Dönüşümlü voltamogramını göstermektedir.



Bu voltamograma göre, başlangıçta ortamda sadece yükseltgenmiş “O” türü mevcuttur. Daha sonra negatif yönde potansiyel uygulanınca “O” türünün indirgendiği potansiyel olan E^0 değerine ulaştığında katodik akım bir pik oluşmaktadır. Negatif yöndeki potansiyel taraması tamamlandıktan sonra, pozitif yöndeki tarama başlamaktadır. Burada indirgenmiş olan “R” türü tekrar elektron vererek “O” türüne yükseltgenmekte ve bu da anodik bir pikle sonuçlanmaktadır. Ancak deney esnasında yüzeyde oluşan R, çözeltiliye doğru difüzleneceğinden ters pik akımı (anodik akım) katodik akımdan biraz daha düşük olacaktır.

Tersinir bir elektrot reaksiyonunun pik akımı için 25 °C sıcaklıkta aşağıdaki eşitlik yazılabilir (Brown vd. 1986):

$$i_{p(\text{ters})} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad (2.2)$$

Bu eşitlik, Randles-Sevcik eşitliği olarak bilinir. Bu eşitlikteki terimlerin anlamları aşağıdaki şekildedir:

n: aktarılan elektron sayısı

i_p : pik akımı, Amper

D_0 : Difüzyon katsayısı, cm^2/s

v : tarama hızı, V/s

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

A: elektrot yüzey alanı, cm^2

Görüldüğü gibi, pik akımı elektro-aktif maddenin derişimi ve tarama hızının kareköküyle doğru orantılıdır.

Dönüşümlü voltametrinde, tersinir elektrot reaksiyonları için katodik ve anodik pik potansiyelleri arasındaki fark aşağıdaki şekilde verilebilir;

$$E_p^k - E_p^a = 2(1,11) \frac{RT}{nF} \quad (2.3)$$

25°C' de bu fark, $E_p^k - E_p^a = 59/n \text{ mV}$ 'a eşittir.

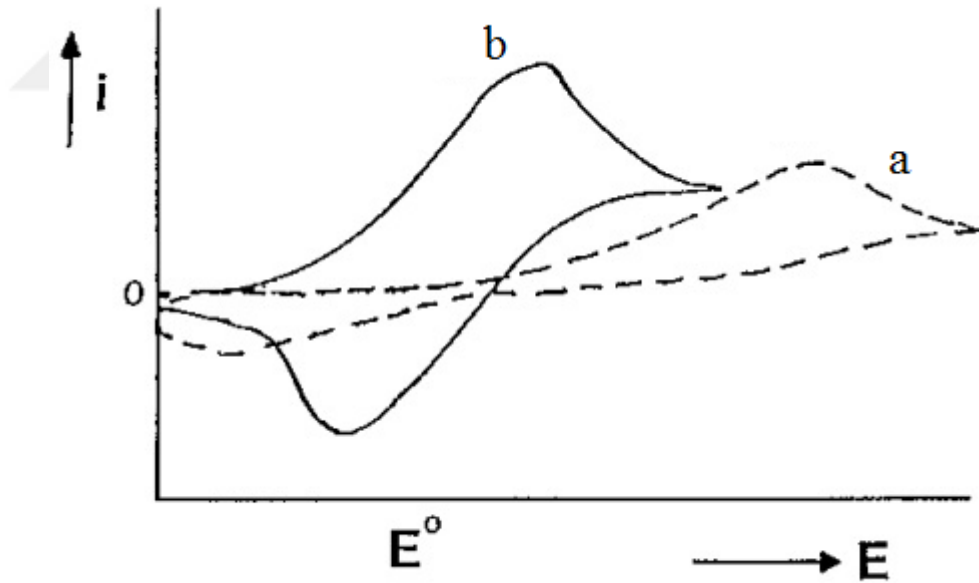
DV ile tarama hızı çalışması verilerinden faydalanılarak, bir reaksiyona tersinirlik testi yapılabilir. Eğer $i_p - v^{1/2}$ grafiği doğrusal ise ve orjinden geçiyorsa sistem tersinirdir. Buna ek olarak bir sistemin tersinir olması için bazı özelliklerinin de bulunması gerekir. Bu özellikler şunlardır;

1. $E_p^k - E_p^a = 59/n \text{ mV}$ 'a eşittir.
2. E_p tarama hızı işe değişmez, sabit kalır.
3. $i_p^k/i_p^a = 1$ 'dir ve bu oran tarama hızı ile değişmez.
4. $i_p/v^{1/2}$, tarama hızı ile değişmez.
5. Pikin dalga şekli tarama hızı ile değişmez.

Bir sistemin tersinir olması için yukarıdaki özelliklerin hepsinin geçerli olması gereklidir. Bir veya birkaçı geçerli değilse sistem tersinir değildir. i_p ve E_p 'nin v ile ilişkisi yeteri kadar geniş bir tarama hızı aralığında test edilmelidir (Brown vd. 1986).

2.2.1.2 Tersinmez ve yarı tersinir reaksiyonlar

Tersinir sistemlerde her potansiyelde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyüktür ve bu nedenle elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerlidir.



Şekil 2.7.a.Tersinmez b.yarı tersinir elektrot reaksiyonlarına ait dönüşümlü voltametri tekniği ile kaydedilen voltamogramlar (Wang 2000)

Tersinmez sistemlerde ise elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerli değildir. Şekil 2.7 A'da görüldüğü gibi,

tamamen tersinmez bir sistemin en önemli belirtisi ters tarama pikinin gözlenmemesidir. Ancak unutmamak gerekir ki bunun tersi her zaman doğru değildir. Yani anodik pikin gözlenmeyişi mutlaka elektron aktarım basamağının çok yavaş olduğu anlamına gelmez. Mesela, hızlı bir elektron aktarım basamağını takip eden çok hızlı bir kimyasal reaksiyonda da aynı durum gözlenir. Oluşan ürün hızlı bir şekilde başka bir maddeye dönüşeceği için ters taramada yükseltgenme gözlenmeyebilir. Bu sebeple elektrot reaksiyonunun mekanizması belirlenmeden tersinirliği hakkında bir şey söylemek hatalı sonuçlara yol açar.

Tersinmez bir elektrot reaksiyonunun pik akımı için 25 °C sıcaklıkta aşağıdaki eşitlik yazılabilir;

$$i_p = 2,99 \times 10^5 n(\alpha_c n_\alpha)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (2.4)$$

Burada n_α hız belirleyen basamağa kadar aktarılan elektron sayısıdır. Buna hız belirleyen basamakta aktarılan elektron sayısı da dâhildir. Tersinir durumda olduğu gibi pik akımı derişimle ve tarama hızının karekökü ile doğru orantılıdır.

Tersinir durumda pik potansiyeli E_p , tarama hızının bir fonksiyonu olmadığı halde tersinmez durumda tarama hızı ile aşağıdaki eşitliğe göre değişir:

$$E_p = E^0 + \left(\frac{RT}{\alpha n F} \right) \left[\ln \left(\frac{RT k_s}{\alpha n F} \right) \ln v \right] \quad (2.5)$$

Bu eşitlikten, elektron aktarım hızı arttıkça E_p ile E^0 arasındaki farkın artacağı anlaşılmaktadır. Başka bir ifade ile k_s küçüldükçe indirgenme E^0 'dan daha negatif potansiyellerde meydana gelmektedir. Yine bu eşitlikten anlaşılağı üzere, tersinmez bir reaksiyonun pik potansiyeli tarama hızı ile değişir. Tersinmez bir elektron transfer reaksiyonunun pik potansiyeli tarama hızı arttıkça pozitif bölgeye kayar ve bu kaymanın miktarı her 10 birimlik tarama hızı artışına karşı 25 °C'de $30/\alpha_c n_\alpha$ mV'dur. Ayrıca dalganın şeklindeki değişme ölçütü olarak alınan $|E_p - E_{p/2}|$ kayması da farklıdır.

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{48}{\alpha_c n_\alpha} \quad (2.6)$$

Dolayısıyla, E_p kaymalarından, $i_p-v^{1/2}$ eğimi ve $|E_p - E_{p/2}|$ farklarından; $\alpha_c n_\alpha$, D ve k_s sabitleri hesaplanabilir.

Özetlenecek olursa; tersinmez bir dönüşümlü voltamogramının aşağıdaki kriterlerin tümüne uyması gerekmektedir (Wang 2006):

1. Ters potansiyel taramasında anodik veya katodik pik gözlenmez.
2. $i_p^k/v^{1/2}$, tarama hızı ile değişmez.
3. E_p^k kayması 25 °C’de her 10 birimlik tarama hızı artışına karşı $30/\alpha_c n_\alpha$ mV kadardır.
4. $|E_p - E_{p/2}| = \frac{48}{\alpha_c n_\alpha}$ mV’dir. (25 °C’de)

Yarı tersinir reaksiyonlarda akım, kütle transferi ve elektron aktarım hızı ile birlikte kontrol edilir. Dönüşümlü voltamogramlarının şekli $k^0/\sqrt{\pi\alpha D}$ ($\alpha=nFv/RT$) denkleminin bir fonksiyonudur. $k^0/\sqrt{\pi\alpha D}$ değeri yükseldiğinde, yükseltgenme veya indirgenme prosesi tersinir duruma yaklaşır. Fakat $k^0/\sqrt{\pi\alpha D}$ fonksiyonunun küçük değerlerinde (çok yüksek tarama hızı değerlerinde), sistem tersinmez olarak davranır. Bunlarla birlikte, yarı tersinir reaksiyonların voltamogramları tersinir voltamogramlara oranla daha yayvandır ve $E_p^a - E_p^k$ (ΔE_p) farkları daha fazladır (Şekil 2.7 B) (Wang 2006).

Bir yarı tersinir reaksiyonun kriterleri aşağıdaki gibidir;

1. $i_p/v^{1/2}$ tarama hızına bağlı değildir.
2. Eğer $\alpha=0,5$ ise $i_p^a/i_p^k=1$ ’dir.
3. E_p^k , tarama hızı ile değişir. Bu değişme genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.

4. Tarama hızı arttıkça pik genişlemesi olur.
5. $E_p^k - E_p^a$ farkı düşük tarama hızlarında 59/n mV değerine yaklaşır. Yüksek tarama hızlarında bu değerden uzaklaşır ve tarama hızı arttıkça artar (Brown ve Sandifer 1986).

2.2.1.3 DV ile adsorpsiyon-difüzyon özelliklerinin incelenmesi

Voltametrde, elektroaktif tür ve çalışma elektrodu arasındaki elektron aktarımının yapılabileceği iki bölge vardır. Bunlar:

- ✓ Çözelti – elektrot ara yüzeyi
- ✓ Elektrot yüzeyi’dir.

Elektron aktarımı, çözelti-elektrot ara yüzeyinde gerçekleşiyor ise, bu dönüşümlere kinetik veya difüzyon kontrollü sistemler, elektron aktarımı elektrot yüzeyinde gerçekleşiyor ise bu sistemlere de adsorpsiyon kontrollü sistemler adı verilir. Dönüşümlü voltametri tekniğinde, tarama hızı değişkeninin değiştirilmesi ile (türün derişiminin sabit kalması şartı ile) elektrokimyasal dönüşümlerin difüzyon veya adsorpsiyon kontrollü sistemlerden hangisine ait olduğu belirlenebilmektedir. Aşağıdaki tanımlanmış olan grafiklere bakılarak ilgili yorumlar yapılır.

- ✓ Tarama hızına karşı pik akımı ($i_p - v$): Bu grafiğin doğrusal olması adsorpsiyon kontrollü sistemlerde mümkündür.
- ✓ Tarama hızının kareköküne karşı pik akımı ($i_p - \sqrt{v}$): Bu grafiğin doğrusal olması difüzyon kontrollü sistemlerde mümkündür.
- ✓ Tarama hızının logaritmasına karşı pik akımının logaritması ($\log i_p - \log v$): Bu grafiğin 1,0’e yaklaşması adsorpsiyonu desteklerken, 0,5 civarında olması ise difüzyon kontrollü sistemleri desteklemektedir (Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006,).

Sistem tersinir ve difüzyon kontrollü ise elde edilen akım ve tarama hızı arasındaki ilişki eşitlik 2.2’de, difüzyon kontrollü ve tersinmez ise eşitlik 2.4’de verildiği gibidir.

Adsorpsiyon kontrollü sistemlerde ise akım ile tarama hızı arasındaki ilişki ise aşağıda gösterildiği gibidir (Wang 2006):

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma \quad (2.7)$$

Bu eşitlikte i_p pik akımını, n aktarılan elektron sayısını, F faraday sabitini, v tarama hızını, A elektrot yüzey alanını, Γ elektrot yüzey derişimini, T sıcaklığı, R ise ideal gaz sabitini ifade etmektedir. Elektrot yüzey derişiminin formülü ise şu şekildedir:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (2.8)$$

Burada, eşitlik 2.8 eşitlik 2.7’de yerine yazılırsa adsorpsiyon kontrollü sistemlerde pik akımı için eşitlik 2.13 elde edilir (Laviron eşitliği) (Zhou vd. 2010, Bayraktepe vd. 2016).

$$i_p = \frac{nFQv}{4RT} \quad (2.9)$$

2.2.2 Puls voltametrisi (PV)

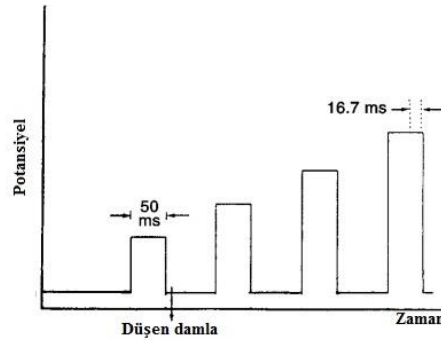
Voltametrik çalışmalarda okunan akım, elektroaktif bileşenin yükseltgenmesi veya indirgenmesi neticesinde oluşan faradayik akım ve destek elektrolit-elektrot ara yüzeyinde meydana gelen yüklenmeden kaynaklanan kapasitif akım bileşenlerinden oluşmaktadır. Voltametride, kapasitif akımı düşürmek ve faradayik akımı yükseltmek ölçüm doğruluğu açısından önemlidir. Bu doğrultuda, faradayik akımın yanında kapasitif akımın düşürülebildiği puls voltametrisi teknikleri geliştirilmiştir. Puls voltametrisi teknikleri ile ilgili çalışmalar, Barker ve Jenkin tarafından, voltametrik ölçümlerin gözlenebilme sınırlarını düşürmek amacıyla başlatılmıştır. Faradayik ve faradayik olmayan (kapasitif) akımın oranının artırılması ile bu tekniklerin gözlenebilme sınırları 10^{-8} M seviyelerine düşürülebilmektedir. Modern puls teknikleri,

son yıllardaki gelişmiş performansları sayesinde, klasik yöntemlerin yerini almaya başlamıştır.

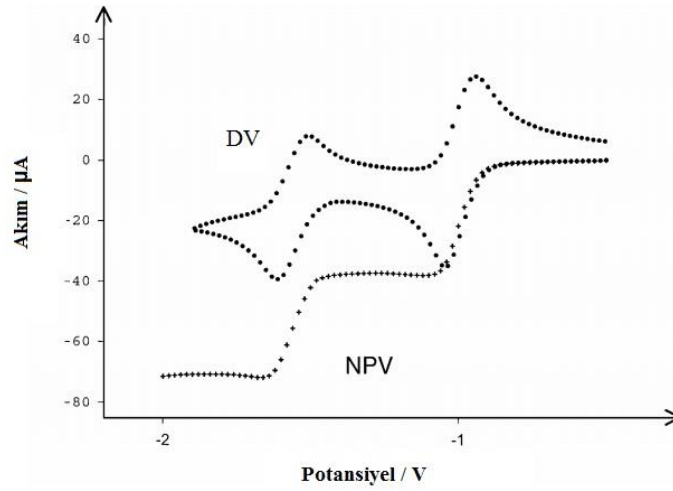
Puls tekniklerinin temeli akım-potansiyel basamağına dayanmaktadır. Çalışma elektroduna belli aralıklarla, 50 ms duraklama zamanına sahip potansiyeller uygulanmaktadır. Potansiyel uygulama basamağından sonra faradayik akım düşüşü yavaşken, kapasitif akım hızlı bir şekilde düşmektedir. Böylece faradayik akım ile kapasitif akım oranı artmakta olup okunan akım sinyalleri daha belirgin hale gelmektedir (Wang 2006, Scholz 2010).

2.2.2.1 Normal puls polorografisi - voltametrisi (NPV)

Normal puls tekniği, ard arda gelen damlalara, damla ömrünün sonuna doğru bir seri şeklinde pulsların uygulanmasına dayanır. Şekil 2.8’de uygulanan potansiyelin şekli gösterilmiştir; Pulslar arasında, elektroda uygulanan potansiyel sabit tutulur ve bu potansiyelde analitte herhangi bir reaksiyonun gözlenmesi beklenmez. Puls genliği değeri her bir damlada giderek artar. Akım ise, uygulanan pulstan 50 ms sonra ölçülür. Bu noktada kapasitif akımın faradayik akıma katkısı yok denecek kadar azdır. Aynı zamanda, puls sürelerinin kısa olması da, difüzyon tabakasının daha ince ve faradayik akımın daha yüksek olmasını sağlamaktadır. Bunun sonucu olarak, NPV’de voltamogramlar sigmoidal yapıdadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.8 Normal puls voltametrisinde uyarma sinyali (Wang 2000)



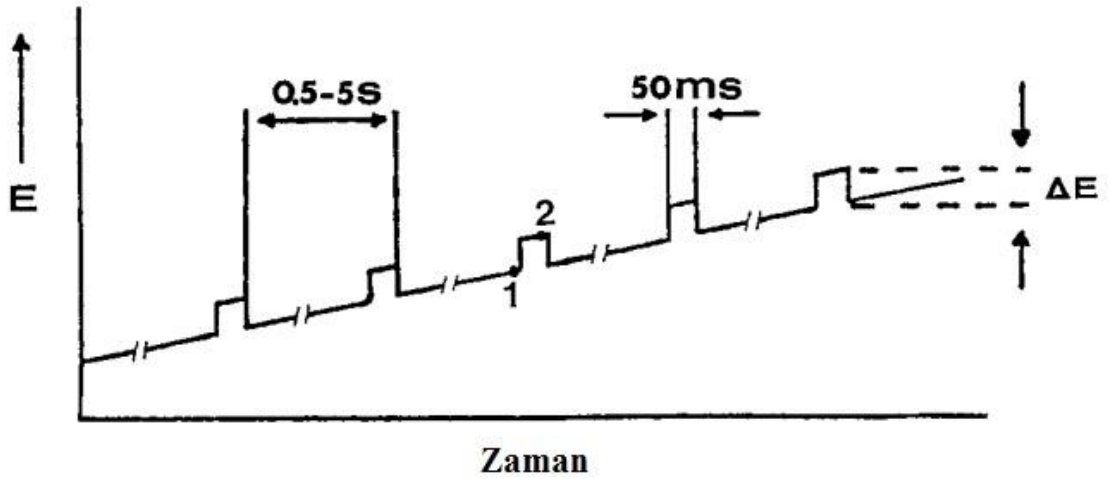
Şekil 2.9 İki farklı potansiyelde yükseltgenip indirgenebilen bir moleküle ait DV ve NPV eğrileri.

NPV tekniği, katı elektrotlar kullanılarak uygulandığında da avantajlı bir tekniktir. Özellikle düşük bir başlangıç potansiyeli uygulandığında, yüzeye adsorbe olan ürünlerden kaynaklanan elektrot yüzeyinin kirlenmesi, zehirlenmesi gibi problemler asgari düzeye inmektedir (Wang 2006, Scholz 2010).

2.2.2.2 Diferansiyel puls voltametrisi (DPV)

Diferansiyel puls voltametrisi, eser miktardaki organik ve anorganik türlerin tayin edilmesinde son derece yararlı bir tekniktir (Wang 2006). Bu teknik ilk olarak Barker tarafından ortaya atılmış, daha sonra ise Osteryoungs tarafından biraz daha geliştirilmiş ve günümüzde sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Kissinger 1996).

Bu yöntemde, çalışma elektroduna damla bitiminden hemen önce sabit büyüklükte pulsler uygulanır (Şekil 2.10). Akım ise, puls uygulamasından hemen önce ve sonra olmak üzere iki kez ölçülür ve aradaki fark uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilerek DPV voltamogramları elde edilir. Voltamogramlardan okunan akımlar, söz konusu analitin derişimi ile orantılı olarak değişmektedir.



Şekil 2.10 Diferansiyel puls voltametrisi tekniğinde potansiyel - zaman grafiği.

DPV tekniği ile derişimi 10^{-8} M civarında olan analitlerin tayini yapılabilmektedir. Ayrıca, söz konusu teknik yardımıyla birbirine çok yakın redoks potansiyeline sahip olan iki farklı türün pik potansiyellerinin birbirinden ayrılması sağlanabilmektedir. Öyle ki, bazı durumlarda pik potansiyelleri arasında 50 mV fark olan türlere ait pikler dahi okunabilmektedir.

Bu yöntemde, seçilen puls genliği ve potansiyel tarama hızının değiştirilmesi duyarlılık, pik ayrımı ve ölçüm hızı gibi bir takım değişkenlerin değişmesine sebep olmaktadır. Örneğin, yüksek puls genliği değerleri, daha büyük ve yayvan piklerin elde edilmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle genellikle puls genliği 25 - 50 mV değerleri arasında, potansiyel tarama hızı ise 5 mV/s olarak uygulanmaktadır. Ayrıca, elektrot reaksiyonunun tersinir veya tersinmez olması da DPV'deki pik şeklini etkilemektedir. Tersinmez elektrot reaksiyonunun sahip sistemlerden elde edilen voltamogramlarda gözlenen pikler tersinir sistemlere göre daha düşük akım değerine sahiptirler ve pik şekilleri daha geniştir (Wang 2006).

2.2.2.3 Kare dalga voltametrisi (KDV)

Kare dalga voltametrisi, son yıllarda modern bilgisayarlarla kontrol edilebilen elektroanalitik tayin yapabilen cihazlarda (Autolab, μ Autolab, Bioanalytical systems,

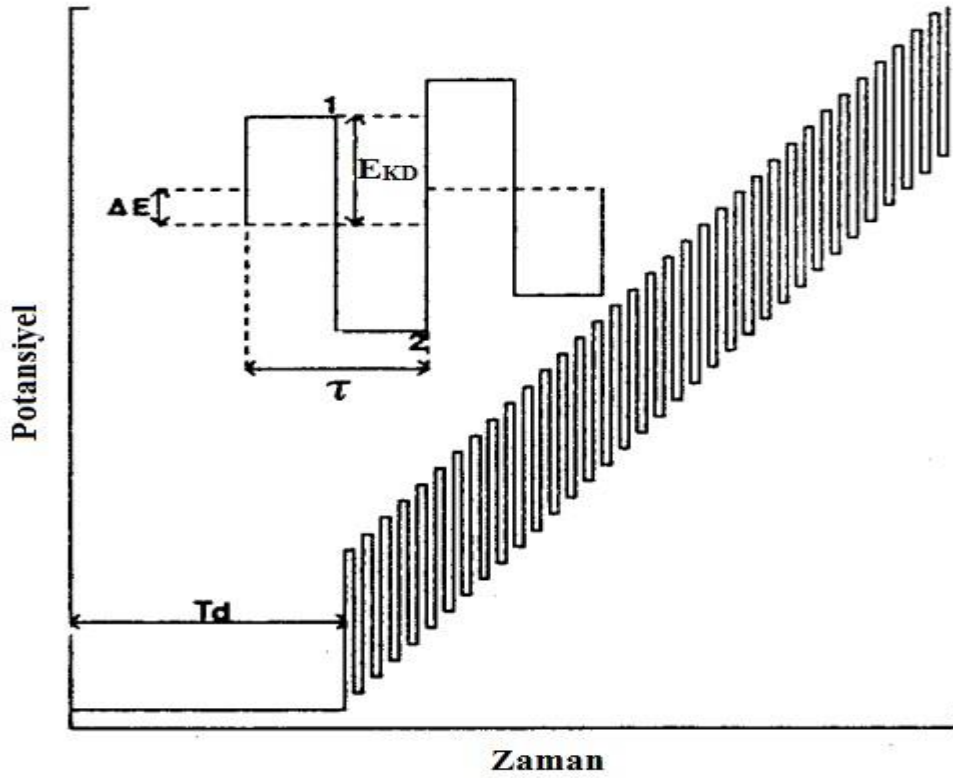
PAR and CH Instruments, vb) yer alan başlıca dört voltametrik teknikten biridir (Scholz 2010).

Yukarıda da belirtildiği gibi, KDV tekniği son yıllarda yıldızı parlayan teknikler arasında yerini almıştır. Bunun sebebi, yeni nesil cihazlarda yaygın olarak yer alması, iyi geliştirilmiş bir teoriye sahip olması ve en önemlisi ise elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonlar için yüksek duyarlılık göstermesidir. Adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi tekniği ise, elektrot yüzeyine adsorbe olan organik moleküllerin tayini için en iyi elektroanalitik tekniktir (Wang 2006).

Modern KDV tekniğinin tarihi Kalovsek ve Barker'in yapmış oldukları kare dalga polarografi çalışmalarına dayanmaktadır (Scholz 2010). Bu teknik, yüksek genlik ve yüksek frekansın basamak şeklindeki dalga ile birleştirilmesi sonucu ortaya çıkan potansiyel pulslarının çalışma elektroduna uygulandığı bir diferansiyel puls tekniğidir. Şekil 2.11 modern KDV tekniğine ait potansiyel - zaman eğrisini göstermektedir (Wang 2000);

Her bir kare dalga periyodu, 1 merdiven basamağı periyodu (τ) sırasında meydana gelmektedir. Dolayısıyla uyarma sinyalinin frekansı $f = \tau^{-1}$ ve puls süresi $t_p = \tau/2$ 'dir. Kare dalga genliği E_{KD} pik genliğinin yarısına eşittir. Potansiyeldeki değişim ΔE ise, merdiven dalgasının basamak yüksekliğine eşittir. Tarama hızı da $\Delta E / \tau$ şeklinde tanımlanır. Tarama yönüne bağlı olarak, ΔE , ileri ve geri yöndeki pulslar ayrılabilir. Net akım olarak her puls sonrasında ve iki ardışık pulslar arasında okunan akımların farkı verilir. Akımlar merdiven şeklindeki potansiyel dalgasına karşı elde edilir (Scholz 2010).

KDV tekniğinin en önemli avantajı hızlı bir teknik olmasıdır. DPV ile karşılaştırıldığında, bir voltamogram KDV tekniğinde birkaç saniyede kaydedilirken, DPV tekniğinde ise 2 - 3 dk'da kaydedilmektedir (Wang 2006).



Şekil 2.11 Kare dalga voltametrisi tekniğindeki potansiyel - zaman eğrisi ve dalga şekli (Wang 2000)

(E_{KD}: puls genliği, ΔE : basamak yüksekliği, τ : kare dalga periyodu, T_d : bekleme süresi, 1 ve 2: akım ölçülen noktalar)

2.2.3 Sıyırma voltametrisi (SV)

Voltametrik sıyırma teknikleri, eser element tayininde kullanılan oldukça hassas elektrokimyasal tekniklerdir. Karışım numunelerinin analiz edilmesinde kullanılması, cihazların ucuzluğu ve ölçümlerin kolaylığı sebebiyle son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Bu tekniğin yüksek hassasiyete sahip olması, yöntemin ön deriştirme basamağı ve ileri derecedeki voltametrik tekniklerle ölçme işleminin birleştirilmesi esasına dayanmaktadır. Bu şekilde, oldukça iyi sinyal/gürültü oranı elde edilebilmektedir.

Sıyırma teknikleri, yukarıda da bahsedildiği gibi, iki basamakta uygulanan bir tekniktir. İlk olarak; analit elektrot yüzeyinde elektrolitik olarak biriktirilmektedir. Bu basamağa biriktirme ve ya ön deriştirme basamağı adı verilmektedir. Bu basamağı, sıyırma

basamağı adını verdiğimiz, analitin elektrot yüzeyinden ayrılıp çözelti fazına geçirildiği adım izlemektedir.

Sıyırma voltametrisi teknikleri, analitin elektrot yüzeyinde biriktirilme yönteminin değişmesi veya sıyırma basamağında uygulanan tekniğin değişmesine göre farklı şekillerde uygulanabilmektedir (Wang 2006).

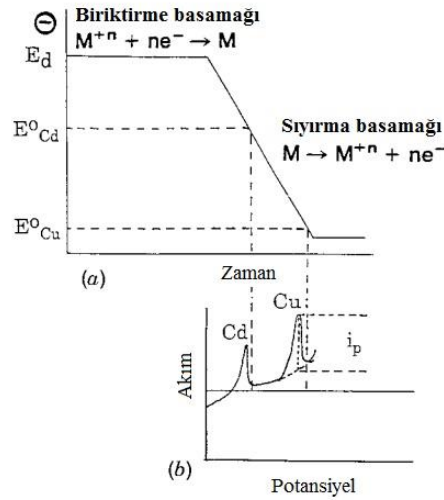
2.2.3.1 Anodik sıyırma voltametrisi (ASV)

Bu yöntem, sıyırma yöntemlerinin en sık kullanılan şeklidir. Bu yöntemde, metal iyonları elektrot yüzeyinde biriktirilir. Bu basamağa ön deriştirme adı verilir. Ön deriştirme kontrollü potansiyel altında katodik olarak gerçekleştirilir. Uygulanan potansiyel, metal iyonunun kolayca indirgenebilmesi için genellikle iyonunun E^0 değerinden 0,3 - 0,5 V daha negatif potansiyel değerinde olmalıdır.



Biriktirme basamağını takiben, potansiyel anodik olarak taranır. Uygulanan potansiyel doğrusal veya puls şeklinde olabilir. Genellikle artık akımı bertaraf etmek amacıyla kare dalga ve diferansiyel puls voltametrisi teknikleri tercih edilmektedir.

ASV’de, potansiyel - zaman değişimini veren ve bu değişim esnasındaki voltamogramı gösteren grafik şekil 2.12’de verilmiştir.



Şekil 2.12 Anodik sıyırma voltametrisinde: a. potansiyel zaman dalga şekli b. uygulanan potansiyel neticesinden elde edilen voltamogram (Wang 2000)

2.2.3.2 Katodik sıyırma voltametrisi (KSV)

Katodik sıyırma voltametrisi ASV tekniğinin ayna görüntüsü gibidir. Analitin anaodik olarak biriktirilmesi ve sonrasında negatif yöndeki potansiyel taramasıyla gerçekleştirilen sıyırma basamağından oluşmaktadır.

Oluşan indirgenme pik akımı, istenilen nicel bilgiyi sunmaktadır. KSV tekniği, organik ve inorganik olan, civa ile çözünmeyen tuz oluşturabilen türlerin tayininde kullanılır (tiyoller, penisilinler, siyanür ve sülfid gibi) (Wang 2006).

2.2.3.3 Adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV)

Adsorptif sıyırma analizleri, eser miktardaki türlerin tayin edildiği sıyırma ölçümlerinin kapsamını oldukça genişletmiştir. Bu yöntem, iyonların elektrot yüzeyine elektrolitik olarak biriktirilmesinin mümkün olmadığı veya zor olduğu durumlarda uygulanmaktadır. Bu yöntemde, çözelti içerisindeki metal, uygun bir ligand yardımıyla şelat haline getirilmekte ve sonrasında oluşan bu şelatın elektrot yüzeyine adsorpsiyonla ve kontrollü bir şekilde biriktirilmesine dayanmaktadır. Daha sonra ise adsorplanan

şelat içerisinde yer alan metal katyonu, uygulanan negatif potansiyel yardımıyla indirgenmektedir (Şekil 2.13) (Kissinger 1996, Wang 2006).

İndirgenme, metal üzerinden izlenebileceği gibi ligand üzerinden de izlenebilmektedir. Yüzeyde biriken türlerden elde edilen sinyal direk olarak o türün yüzeydeki derişimine Langmuir adsorpsiyon izotermiyle bağlıdır. Bu izoterme göre, yüzeydeki madde derişimi, o türün elektrot yüzeyindeki derişimiyle doğru orantılıdır;

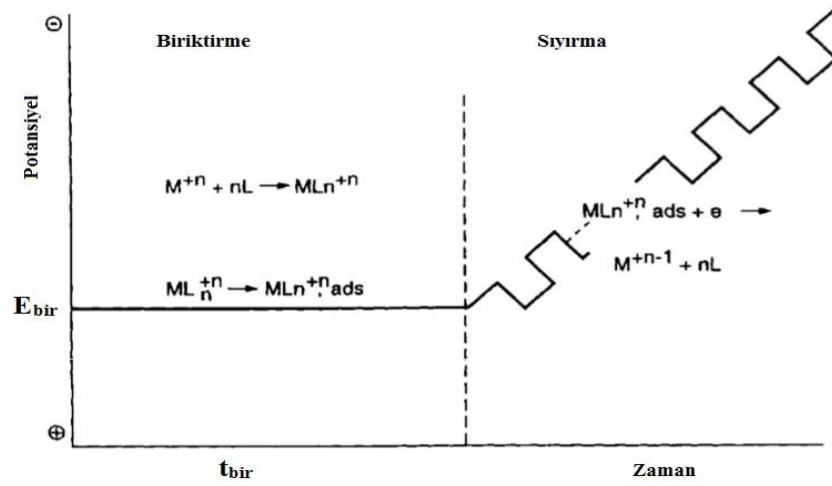
$$\Gamma = \Gamma_m \left(\frac{BC}{1+BC} \right) \quad (2.10)$$

Burada Γ_m türün yüzey derişimi, B adsorpsiyon katsayısını ifade etmektedir. Sonuç olarak, kalibrasyon grafikleri, analitin yüksek derişimlerinde ($> 10^{-7}$ M) doğrusallıktan sapma göstermektedir.

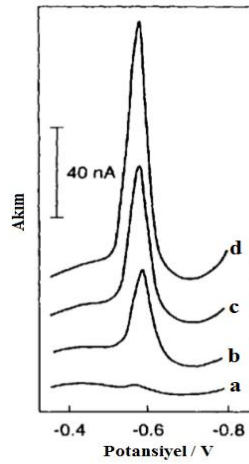
Düşük adsorpsiyon zamanı (1 - 5 dk) ile yüzeyde etkin bir biriktirme sağlanmaktadır. Benzer şekilde yüzeyde biriken bütün türün indirgenmesiyle de etkili bir indirgenme basamağı gerçekleşmektedir. Bu iki basamağın başarılı bir şekilde uygulanması sonucu bazı önemli metaller için oldukça düşük gözlenebilme sınırı (10^{-10} - 10^{-12} M) değerlerine inilebilmektedir.

Eser elementlerin yanı sıra, AdSV tekniği bazı organik moleküllerin (kalp ilaçları, antikanser ilaçları, nükleik asitler, vitaminler, pestisitler gibi) tayininde de kullanılabilmektedir. Moleküllerin redoks davranışına bağlı olarak, yüzeyde adsorbe edilen türün indirgenme veya yükseltgenmesiyle tayini gerçekleştirilebilmektedir.

Şekil 2.14’de bir antikanser (daunrubisin) ilacına ait farklı biriktirme sürelerinde elde edilen voltamogramlar görülmektedir (Kissinger 1996, Wang 2006).



Şekil 2.13 Adsorptif sıyırma voltametrisi tekniğinde bir metal iyonunun uygun bir ligand varlığındaki biriktirme ve sıyırma basamaklarını gösteren grafikler (Kissinger 1996).



Şekil 2.14 Bir anti kanser ilaç etken maddesine (daunrubisin) ait farklı biriktirme sürelerinde kaydedilmiş AdSV voltamogramları (Kissinger 1996)

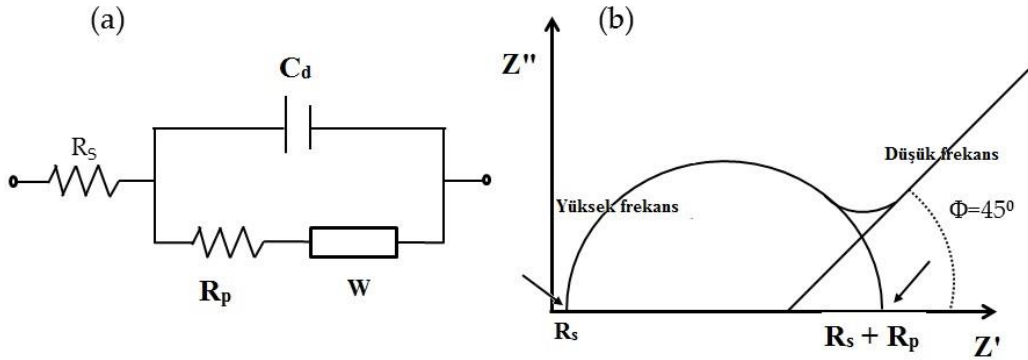
a: 0 s; b: 90 s; c:180 s; d: 300 s

2.2.4 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

EIS tekniği, kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotların özelliklerinin incelenmesi ve elektrokimyasal reaksiyonların hızları hakkında bilgi sahibi olunması amacıyla sıklıkla kullanılan tekniklerden biridir. Son yıllarda EIS tekniği, temel elektrokimyasal

çalışmaların dışında, modern elektrokimyasal immünosensör ve DNA biyosensörlerindeki biyoafinite olaylarının incelenmesi amacıyla da sıklıkla kullanılmaktadır.

Elektrokimyasal dönüşümler elektrot - çözelti ara yüzeyinde gerçekleşir. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen bu dönüşümler elektronik devre elemanlarıyla, deneysel empedans spektrumlarıyla ilişkili olarak modellenenmektedir. Şekil 2.15.a, elektrot yüzeyinde gerçekleşen olayların Randles ve Ershler tarafından modellenen yararlı bir devre modelini göstermektedir. Bu devre, elektrot - çözelti ara yüzeyinde meydana gelen elektriksel çift tabaka direnci C_d , elektrolit çözeltisinin direnci R_s , elektron aktarım direnci R_p ve Warburg (W) devre elemanından oluşmaktadır. W, çözeltide yer alan iyonların elektrot yüzeyine difüzyon aracılığı ile ulaşmasının sonucu olarak ortaya çıkmaktadır.



Şekil 2.15.a. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen olayların modellenendiği devre, b. faradayik empedans spektrumu (Nyquist diyagramı)

Elektrot - çözelti ara yüzeyinin empedansı, Ohm tarafından geliştirilmiş olan aşağıdaki eşitlik ile hesaplanabilmektedir.

$$Z(\omega) = \frac{R_s + R_p}{(1 + \omega^2 R_p^2 C_d^2)} - \frac{j\omega R_p^2 C_d}{(1 + \omega^2 R_p^2 C_d^2)} = Z' + jZ'' \quad (2.11)$$

EIS, düşük genlikli sinüzoidal ω frekansındaki potansiyelin elektrokimyasal hücreye uygulanması ve oluşan akımın ölçülmesine dayanır. Elde edilen faradayik empedans spektrumu ise Nyquist diyagramı olarak adlandırılır (Şekil 2.15b). Nyquist eğrisi, elektrikle yüklenmiş yüzey ve elektron transfer reaksiyonu ile ilgili bilgi vermektedir. Söz konusu eğri, elektron transfer direncini ifade eden, yüksek frekanslarda kaydedilen, bir yarım daireden ve düşük frekanslarda elde edilen, difüzyon - sınırlı olayları temsil eden doğrusal bir kısımdan oluşmaktadır. Bu diyagramlar, elektrot yüzeyindeki elektron aktarımının kinetiği ve difüzyon özellikleri hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadır. Örneğin; elektron transferinin çok hızlı olduğu durumlarda empedans spektrumu sadece doğrusal kısımdan oluşur. Elektron transferinin düşük olduğu durumlarda ise, yarım daire ve doğrusal kısımdan ibaret olup elektron transfer hızı azaldıkça yarım dairenin çapı artmaktadır. Yarım dairenin çapı ise elektron transfer direnci (R_s) olarak tanımlanmaktadır. Yarım dairenin Z' eksenini kestiği nokta R_s 'nin sayısal değerini vermektedir (Wang 2006).

Tüm bu bahsedilen elektrokimyasal tekniklerin performansları kullanılan çalışma elektrodunun kimyasal ve fiziksel özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Bir çalışma elektrodu voltametrik ölçümlerde tekrarlanabilir cevap sağlamalı, yüksek sinyal/gürültü oranına sahip olmalıdır. Ayrıca, çalışma elektrodunun seçiminde potansiyel çalışma aralığı, elektriksel iletkenliği, yüzeyin tekrarlanabilirliği, maliyeti ve toksik olup olmaması gibi özellikler de ön plana çıkmaktadır (Wang 2006, Uslu vd. 2007). Elektroanalitik tekniklerle yapılan analiz çalışmalarında birçok çalışma elektrodu kullanılmaktadır. Bu çalışma elektrotları ile ilgili ayrıntılı bilgi bölüm 2.2.5'de verilmiştir;

2.2.5 Çalışma elektrotları

2.2.5.1 Civa elektrotlar

Civa elektrodu, yüksek hidrojen aşırı gerilimi sayesinde sağlamış olduğu geniş potansiyel aralığından (katı elektrotlara kıyasla) dolayı ilgi çeken bir elektrottur. Ayrıca,

düzgün, yenilenebilir ve kolaylıkla tekrarlanabilir yüzeye sahiptir. Bu avantajlarının yanı sıra, zehirli olması ve civanın yükseltgenmesinden dolayı kısıtlı anodik potansiyel aralığına sahip olması gibi dezavantajları da mevcuttur. Civa elektrotlar, elektroanalitik çalışmalarda, damlayan civa elektrot, asılı damla civa elektrot ve civa film elektrot şeklinde kullanılmaktadır (Wang 2006).

2.2.5.2 Katı elektrotlar

Voltametik tekniklerde, son 50 yıldan beri çok çeşitli katı elektrotlar kullanılmaktadır. Bu elektrotların tercih edilmesinin sebebi, sınırlı anodik potansiyel penceresinden dolayı civa elektrotla çalışılması mümkün olmayan birçok organik molekülün yükseltgenme davranışlarının incelenmesine olanak tanımasıdır. Bunun yanında katı elektrotların civa elektroda göre daha düşük tekrarlanabilirliğe sahip olması bir dezavantaj olarak görülmektedir. Ancak son yıllarda Analitik kimyacılar katı elektrot yüzeylerine yaptıkları bir takım ön işlemler ve yüzeye uyguladıkları modifikasyonlarla elektrotların tekrarlanabilirliğini, duyarlılık ve seçiciliğini arttırmayı başarmışlardır (Uslu vd. 2007).

Günümüze kullanılan çok çeşitli katı elektrot malzemeleri bulunmaktadır. Bunlardan, karbon esaslı elektrotlar, altın, platin, rutenyum, gümüş, nikel, bizmut ve bakır elektrotlar voltametik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Katı elektrotlar farklı yüzey şekillerinde ve farklı boyutlarda hazırlanabilmektedir. Boru, halka ve düzlemsel şekillerde olduğu gibi, makro veya mikro büyüklüklerdeki katı elektrotlara da rastlamak mümkündür (Wang 2006, Uslu vd. 2007).

Metal elektrotlar

Soy metaller olarak adlandırdığımız Pt, Au ve Pd metallerinden oluşan elektrotlar, yüksek iletkenliklerinden dolayı elektrokimyasal mekanizmaların aydınlatıldığı çalışmalarda tercih edilmektedirler. Yüksek hidrojen aşırı gerilimlerinden dolayı elektroanalitik çalışmalarda kullanımları kısıtlıdır. En sık kullanılanları ise platin ve altın elektrotlardır (Uslu vd. 2007).

Karbon temelli elektrotlar

Elektrotların iyi bir elektriksel iletkenliğe sahip olmaları elektroanalitik çalışmalarda önemli bir faktördür. Karbon temelli elektrotların elektriksel iletkenliği (elektron aktarım hızı) soy metallerden oluşan katı elektrotlara göre daha düşüktür. Buna karşın, geniş potansiyel çalışma aralığı sunması, düşük maliyete sahip olması, çeşitli sensör ve analiz teknolojilerinde uygulanabilmesinden dolayı elektroanalitik çalışmalarda, diğer katı elektrotlara nazaran daha sık kullanılmaktadır. Karbon temelli elektrotlar başlıca iki ana grupta incelenebilir (Wang 2006, Uslu vd. 2007):

Karbon temelli elektrotlar	
<u>Homojen yapıdaki karbon elektrotlar</u>	<u>Heterojen yapıdaki karbon elektrotlar</u>
1. Camsı karbon elektrot (CKE)	1. Karbon pasta elektrotlar (KPE)
2. Pirolitik grafit elektrot	2. Modifiye karbon pasta elektrotlar
3. Elmas elektrotlar	
4. Perde baskılı elektrotlar	
5. Kalem grafit elektrot	

Bu tez çalışmasında, karbon temelli elektrotlar arasında yaygın kullanım alanına sahip olan karbon pasta elektrot ve bazı modifiye karbon pasta elektrotlar kullanılmıştır.

Karbon pasta elektrot (KPE)

Karbon pasta elektrotlar, grafit tozu ve su ile karışmayan, inert, iletken olmayan organik bağlayıcıların fiziksel olarak karıştırılmasıyla oluşan yaygın kullanım alanına sahip bir kompozit elektrottur (Uslu vd. 2007). Bu bağlayıcılar, nujol (mineral yağı), parafin yağı, silikon yağı ve bromonaftalinler olabilmektedir. Söz konusu elektrodu hazırlamak için uygun bileşimdeki grafit tozu ve bağlayıcı karıştırılarak bir tüp içerisine (genellikle teflon tüp) sıkıştırılmaktadır (Şekil 2.16). Elektriksel iletkenliğin sağlanması amacıyla da bakır, platin veya pirinç tellerden faydalanılmaktadır (Yılmaz 2016). Pastanın

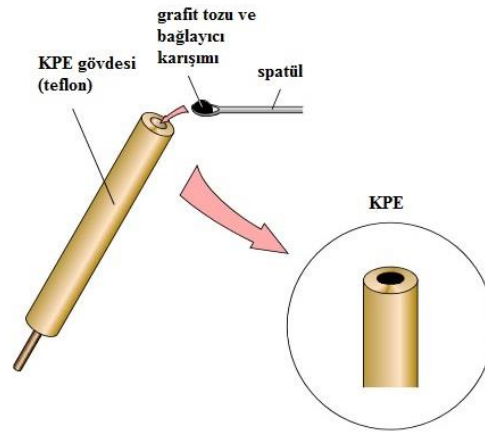
bileşimi elektrodun aktivitesini ciddi şekilde etkilemektedir. Öyle ki; bağlayıcı miktarının artması, bu elektrot yüzeyindeki elektron aktarımını düşürmekte ve artık akım değerini arttırmaktadır (Wang 2006).

Karbon pasta elektrodun farklı elektrolit ortamlarındaki potansiyel pencereleri çizelge 2.2’de (Yılmaz 2016) verilmiştir.

KPE, 1950’li yılların sonlarına doğru Adams tarafından geliştirilmiştir. Bu elektrotların, düşük maliyete sahip olması, üretiminin ve kullanımının kolay olması, düşük artık akım ve geniş potansiyel aralığında çalışma imkânı sunması, yüksek hassasiyet, yüksek tekrarlanabilirlik ve kolaylıkla modifikasyon olanağı sunması gibi çok çeşitli avantajları vardır (Benvidi vd. 2016).

Çizelge 2.2 KPE’un farklı elektrolit ortamlarındaki potansiyel pencereleri (Yılmaz 2016)

Destek elektrolit	pH	Anodik sınır (+V)	Katodik sınır (-V)
0,1 M HCl		1,02	0,90
0,1 M KCl		1,10	1,10
0,1 M H ₂ SO ₄		1,30	-
Asetat tamponu	4,70	1,27	-
NH ₃ /NH ₄ Cl			1,20
0,1 M NaClO ₄			1,10
0,1 M NaOH			1,40



Şekil 2.16 Karbon pasta elektrodun hazırlanmasının şematik gösterimi

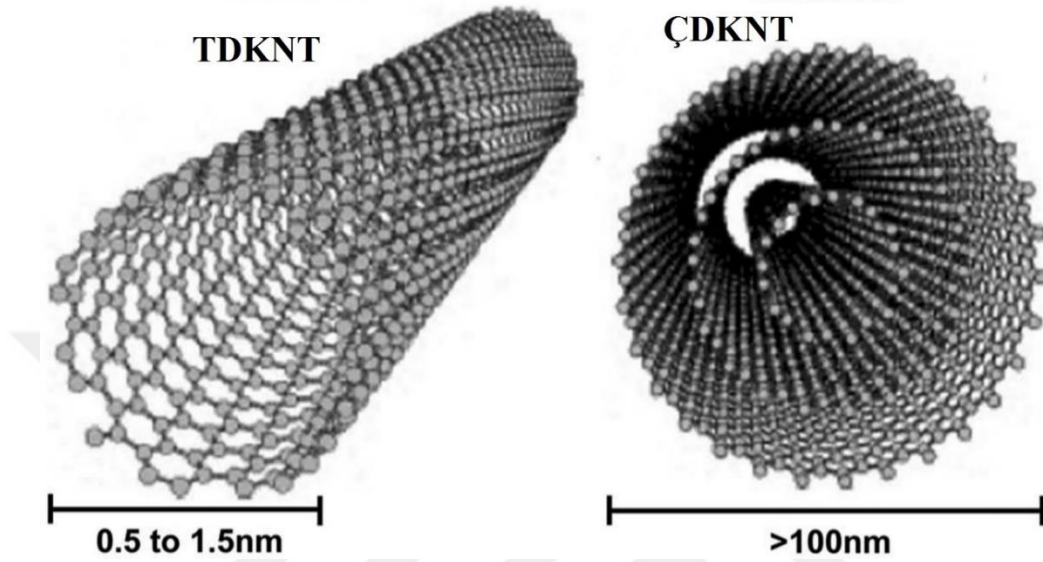
Karbon pasta elektrodun modifiye edilmesi, yukarıda da bahsedildiği gibi, oldukça kolaydır. Modifiye edilecek olan tür grafit tozu ve bağlayıcıyla birlikte kolaylıkla karıştırılabilmektedir. Modifiyer madde genellikle tek başına kullanılmaktadır ama birden fazla modifiyer madde kullanılarak da KPE modifiye edilebilmektedir. Modifiyer maddenin miktarı, modifiyer malzemenin yüzeyde yeterinde aktif bölge oluşturabilme yeteneğine göre genellikle kütlece % 10 - % 30 arasında değişebilmektedir (Uslu vd. 2007). Modifiyer malzemeler mineral yağı, parafin yağı gibi bağlayıcı sıvıda çözünmediği gibi, fiziksel olarak grafit tozu ile de karıştırılabilmektedir. Karbon pasta elektrodun modifikasyonu, kullanılan modifiyer maddeye göre farklı gruplara ayrılmaktadır. Bunlar maddeler: HgO, 8-hidroksikinolin, karbon nanotüpler, grafen, bazı nanoparçacıklar gibi kimyasal bileşikler ve analitik reaktifler; sepiyolit (Bayraktepe vd. 2016), zeolit ve montmorillonit gibi kil mineralleri; silika, silika içeren bileşikler ve yosun, alg, enzim ya da bakteri içeren bir takım substratlar'dır (Uslu vd. 2007). Görüldüğü gibi çok çeşitli malzemelerle KPE'nin modifikasyonu mümkün olmakla birlikte, bu tez çalışmasında, çok duvarlı karbon nanotüpler (ÇDKNT), TiO₂ nanoparçacıkları ve sepiyolit kili kullanılmıştır. Tezin bu kısmında ise, bu maddelerle ilgili birtakım bilgilere yer verilmiştir.

Karbon nanotüpler (KNT)

Japonya bilim adamı Iijima tarafından 1993 yılında keşfedilmiş olan çok duvarlı ve tek duvarlı karbon nanotüpler eşsiz yapıları, elektriksel ve mekanik özelliklerinden dolayı müthiş derecede ilgi görmektedirler. Karbon nanotüpler, yüksek kimyasal ve termal kararlılığa, yüksek elastikiyete sahiptirler. Ayrıca çekmeye karşı dayanıklı olup, bazı karbon nanotüpler metallik iletkenlik sergilemektedirler.

Kavramsal olarak anlamaya çalışıldığında, karbon nanotüpler, sp² hibritleşmesi yapmış karbon atomlarının grafen levhaları şeklinde düzenlendiğini ve kusursuz bir şekilde katlanarak silindirik bir hal alması şeklinde düşünülebilir. KNT'ler 2 grupta incelenmektedirler. Bunlar: tek bir silindirik halkadan meydana gelen tek duvarlı karbon nanotüpler (TDKNT) ve birden fazla silindirik halkanın üst üste bindiği çok duvarlı

karbon nanot plerdir (ÇDKNT) ( ekil 2.17). TDKNT'lerin boyutları 0,5 - 1,5 nm aralığındayken, ÇDKNT'lerin boyutları ise 2,0 - 100 nm aralığındadır (Gooding 2005).



Şekil 2.17 çok duvarlı (ÇDKNT) ve tek duvarlı (TDKNT) karbon nanotüplerin şematik gösterimi

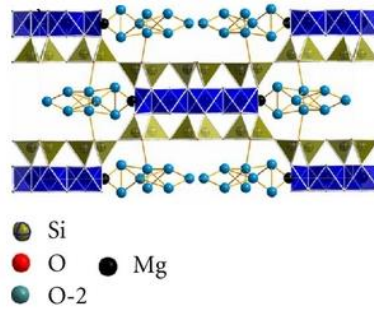
KNT'lerin elektrokimyada, elektrot modifikasyonunda kullanımları birçok avantaj sağlamaktadır. Bunlar arasında; analizlerde yüksek duyarlılık sağlaması, küçük boyuta sahip olmasına rağmen elektrot yüzey alanını arttırması, hızlı cevap vermesi ve elektron aktarım hızını arttırması sayılabilir. Bu özelliklerden dolayı KNT'ler sensör tasarımı ve elektrokimyasal analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Uslu vd. 2007).

Killer ve sepiyolit kili

Kil doğada bol miktarda bulunan bir malzemedir. Fakat saf kil bulmak oldukça zordur. Kilin içerisinde en çok kalker, silis, mika, demir oksit mineralleri bulunur. Killer, illit, kaolinit, montmorillonit ve diğer killer olmak üzere 4 ana grupta incelenir. Genellikle 0,002 mm'den daha küçük taneli malzemeye kil adı verilmektedir. Kil sarımtırak, kırmızımtırak, esmer gibi renklerde bulunur. Bu özelliğini bileşiminde bulunan yanıcı maddeler verir. Kilin yapısı itibarıyla su çekme özelliği vardır. Bu nedenle kil daima

nemlidir. Kili meydana getiren maddeler sulu alüminyum silikatlardır. $m\text{Al}_2\text{O}_3$, $n\text{SiO}_2$, $p\text{H}_2\text{O}$ genel kimyasal bileşim formülü ile ifade edilen kil, çok saf olduğu zaman hidrat Alümin Silikat (kaolinit) adını alır. Kaolinit'in kimyasal formülü, $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dur (wikipedia.org. 2016).

Sepiyolit, Sepiyolit-Paligorskit grubuna ait, magnezyum hidrosilikattan oluşan doğal bir kil mineralidir. Tetrahedral ve oktahedral oksit tabakalarının istiflenmesi sonucu oluşan lifsi bir yapısı vardır ve lif boyunca devam eden kanal boşluklarına sahiptir (Rodriguez vd. 1994).



Sepiyolit'in kimyasal formülü, Brauner ve Preisinger (1956) modeline göre $\text{Si}_{12}\text{Mg}_8\text{O}_{30}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ şeklinde tanımlanmıştır. Kaygan görünümlü, ince taneli, toprağımsı bir yapıya sahip tabakalı sepiyolit, genellikle beyaz, krem, gri veya pembe renkli olabilmektedir (Sabah vd. 1999).

Bilindiği üzere, elektrokimyada yüksek kalitede ve mükemmel yüzeye sahip elektrotlar elde etme üzerine yapılan çalışmalar neticesinde modifiye elektrotlar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalardan bir tanesi olan, Glosch ve Bard'ın 1983 yılında yapmış oldukları çalışmada, ilk defa kil ile modifiye edilmiş elektrodu kullanmışlardır. Bu çalışma, kil modifiye edilmiş elektrot yüzeyinde elektrokimyasal mekanizma belirleme ve analiz çalışmalarını başlatmıştır. Sonrasında ise, 1987 yılında Hernández vd. karbon pasta elektrotu doğal zeolit kili ile modifiye ederek karbon pasta elektrot yüzeyinin kil ile modifiye edildiği ilk çalışmayı yayınlamıştır (Hernandez vd. 1987). Yine aynı grup,

1988 yılında ilk defa sepiyolit kilini kullanarak karbon pasta elektrodu modifiye etmişler ve Tertametrin'in voltametrik tayininde kullanmışlardır (Hernandez vd. 1988).

Killerin, geniş yüzey alanına sahip olması, iyon-değişim özelliğinin bulunması, organik türleri adsorbe ve interkale edebilmesi gibi özellikleri sayesinde elektrokimyasal çalışmalarda, elektrotların modifiye edilmesi amacıyla kullanım alanı bulmaktadırlar.

Karbon pasta elektrodun kil ile modifiye edilmesi oldukça kolaydır. Boyutları genellikle 10 μm 'den daha küçük olan kil mineralleri uygun bileşimdeki grafit tozu ile homojen bir şekilde karıştırılır ve bağlayıcı ajan olarak parafin yağı eklenerek pasta haline getirilir. Burada önemli olan nokta, kil-grafit tozunun kütlece birleşme oranıdır. Bu oran genellikle % 5 - 20 aralığında değişmektedir. % 20'nin üzerindeki miktarlar pek kullanılmamaktadır (Navratilova vd. 2003).

TiO₂ nanoparçacıkları

Metal yarı iletken ve magnetik parçacıklar elektroanalitik kimyada işlevsel olarak kullanılmaktadırlar. Metal nanoparçacıklar elektrokimyada 3 önemli fonksiyona sahiptir. Bunlar:

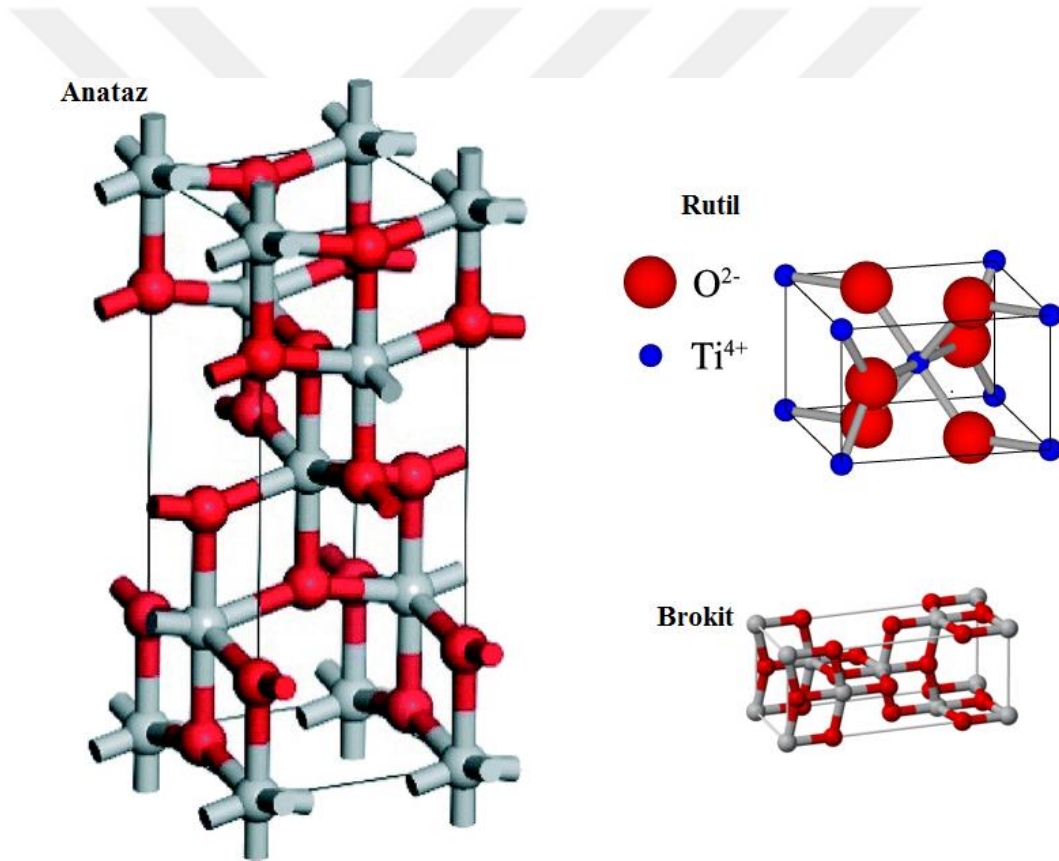
- ✓ İletken elektrot-çözelti ara yüzeyinin porozitesini arttırarak elektrodun yüzey alanının artmasını sağlarlar.
- ✓ Katalitik özellikleri sayesinde elektrot-çözelti ara yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonu hızlandırarak katalitik etki yapabilirler.
- ✓ Elektrodun iletkenliğini arttırabilirler.

Bu emsalsiz özellikleri sayesinde nanoparçacıklar elektrokimyada gaz sensörü, moleküler sensör, enzim sensörü, DNA biyosensörü ve immünosensör geliştirme çalışmalarında kullanılmaktadır (Mazloun-Ardakani vd. 2010).

TiO₂, düşük maliyeti, yüksek kararlılığı, doğaya ve insan vücuduna zararlı olmamasından dolayı ideal bir yarı iletken olarak nitelendirilir. Ayrıca biyoyumumluluğunun yüksekliği ve 3,2 eV boşluk enerjisine (iletkenlik bandı ile değerlik

bandı arasındaki enerji) sahip olmasıyla bilinen en iyi yarı iletkenidir (Gupta vd. 2010, Derkuş 2012). TiO_2 geçiş metal oksitleri sınıfındandır. Bilinen 3 farklı kristal şekli mevcuttur (ekil 2.19). Bunlar: anataz, brokit ve rutil'dir.

Diğer nanoparçacıklar gibi TiO_2 de yüzey alanını arttırmakta, elektrot yüzeyinde aktif bölgeler oluşturmakta ve böylelikle yöntemin seçicilik ve duyarlılığını arttırmaktadırlar. Bu materyal grafit, karbon nanotüpler gibi diğer modifiyer malzemelerle kolaylıkla birleştirilebilmekte ve kompozit elektrotlar hazırlanabilmektedir (Erden vd. 2016). Tüm bu avantajlarından dolayı TiO_2 nanoparçacıkları elektroanalitik kimyada sıklıkla kullanım alanı bulmaktadır.

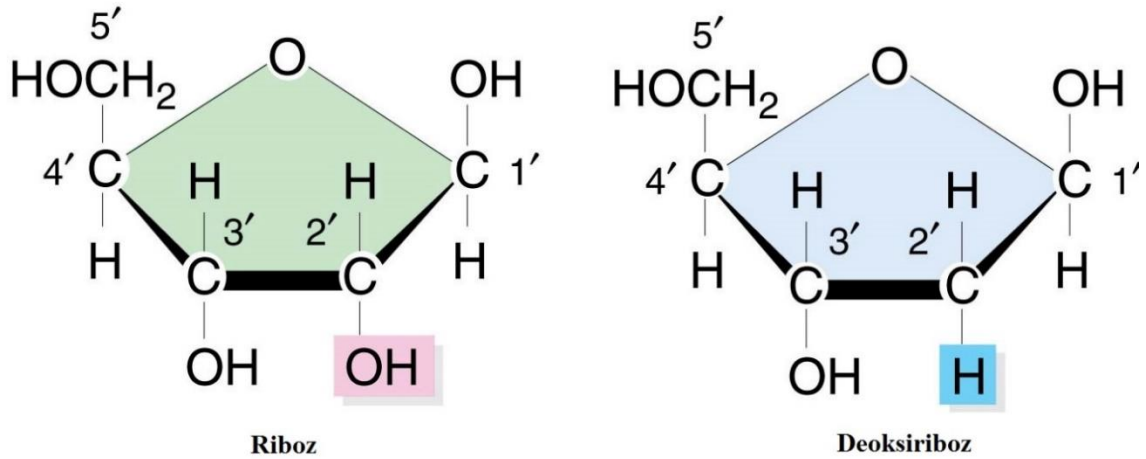


Şekil 2.19 TiO_2 'in kristal yapıları

2.3 DNA ve DNA-İlaç Etkileşimleri

2.3.1 DNA nedir?

DNA, genetik bilgiyi depolayan, genetik bilginin nesilden nesile aktarımını sağlayan canlı organizmaların yapısında bulunan bir nükleik asittir. Nükleik asitler nükleotidlerden oluşur. Bu nükleotidler iki uzun polimerden oluşur. Bu polimerin omurgaları ester bağları ile bağlı şeker, fosfar ve baz gruplarından oluşur. DNA'da bulunan bazlar; adenin, sitozin, guanin ve timin olarak adlandırılır. Nükleik aside adını veren taşıdığı 5 karbonlu pentoz şekeridir. Ribonükleik asitlerde (RNA) Riboz, deoksiribonükleik asitlerde (DNA) ise deoksiriboz bulunur (Şekil 2.20).



Şekil 2.20 DNA ve RNA'daki riboz ve 2-deoksiribozun kimyasal yapıları

Bir molekül eğer pürin veya pirimidin bazı ve bir pentoz şekeri içeriyorsa bu kimyasal birime nükleozit, nükleozite fosfat grubunun takılmasıyla oluşan yapıya ise nükleotid adı verilir.

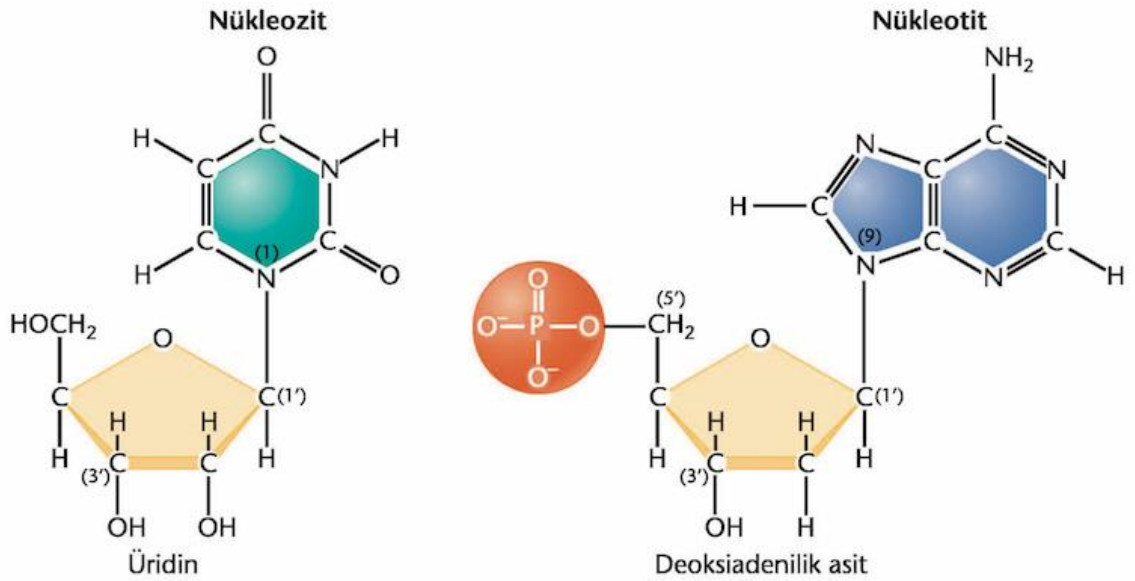
1940-1953 yılları arasında birçok araştırmacı, DNA'nın yapısını aydınlatmaya çalışmışlardır. Bu araştırmacılar arasında Erwin Chargaff, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin, Linus Pauling, Francis Crick ve James Watson'un yer aldığı araştırmacılar

biyoloji tarihinin en önemli sorusu olan “DNA canlı temelini nasıl oluşturmaktadır?”ın cevabını aramışlardır.

1953’de ise Francis Crick ve James Watson, DNA’nın yapısının çift sarmal şeklinde olduğunu önermişlerdir. Önerdikleri bu model, Nature dergisinde yayınlanmış ve Watson-Crick modeli olarak literatürlere geçmiştir (Şekil 2.22) (Klug 2011).

Bu modelin özellikleri ise şöyledir:

1. İki uzun polinükleotid zinciri, bir merkez etrafında kıvrılarak, sağ el ikili sarmal yapısını oluşturur.



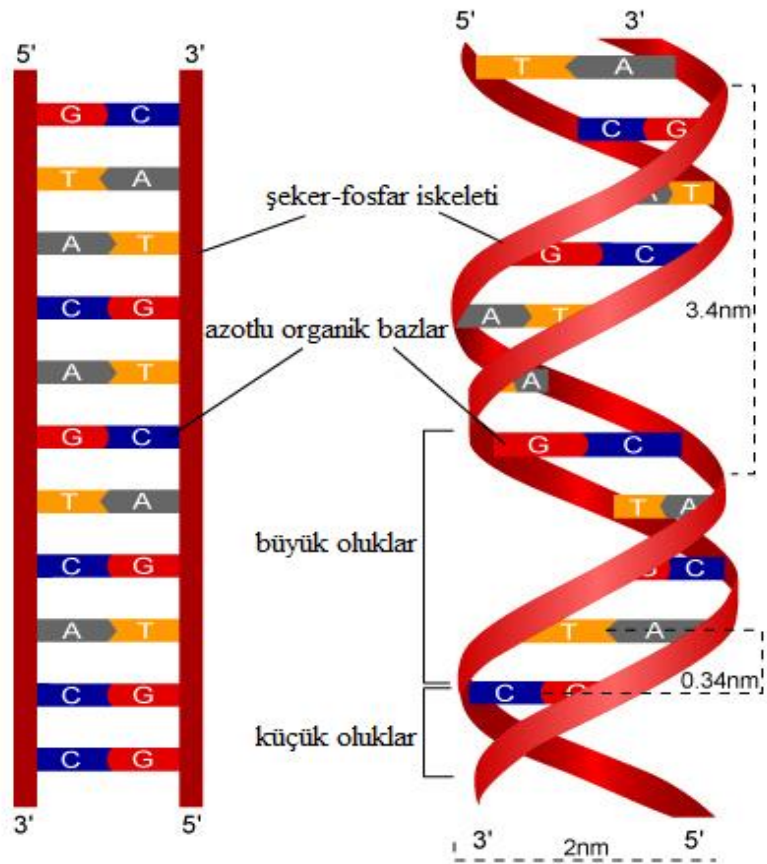
Şekil 2.21 RNA ve DNA’nın nükleozit ve nükleotidlerinin yapıları ve adları

2. İki zincir birbirine paralel değildir. Yani iki zincirin C-5’ ucundan C-3’ ucuna doğru olan yönleri birbirine terstir.
3. Her iki zincirin bazları düzlemsel yapıdadır. Bu düzlemler ise eksene diktir.
4. Karşı zincirdeki bazlar, hidrojen bağları ile birbirleriyle eşleşirler
5. Sarmalın bir tam dönüşü 3,4 nm’dir. Yani her bir dönüşte 10 baz yer alır.

6. DNA ekseninde, daha geniş olan büyük oluklar ve daha küçü olan dar oluklar mevcuttur.
7. DNA çift sarmalının çapı ise 2 nm'dir.
4. DNA'da yer alan baz eşleşmesi, bu modelin genetik açıdan en önemli özelliğini teşkil etmektedir.

2.3.2 DNA-ilaç etkileşimi ve önemi

DNA, canlıların yaşamında çok önemli bir yere sahiptir çünkü yaşayan hücreler için kalıtım bilgisini taşımakta, hücre içindeki gen ekspersyonu ve protein sentezini kontrol ederek hücre fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlamaktadır. Tüm bu özelliklerinden dolayı antiviral, antikanser ve antibiyotik ilaçların ana hedefi haline gelmiştir (Sirajuddin vd. 2013, Radi vd. 2014).



Şekil 2.22 Watson ve Crick'in önerdiği DNA çift sarmalının şematik görünümü

Son yıllarda küçük moleküllerin DNA'ya bağlanmasının incelenmesi önem arz etmektedir. DNA-ilaç etkileşimin incelenmesi, DNA'nın yapısal özelliklerinin aydınlatılmasına, gen mutasyonunun incelenmesine, bazı gen hasarlarının kaynaklarına ulaşılmasına ve bazı antikanser ve antiviral ilaçların etki mekanizmalarının aydınlatılmasına ciddi katkılar sağlamaktadır. Ayrıca, ilaç-DNA etkileşimlerin aydınlatılması, DNA hedefli daha güçlü ve daha seçici yeni ilaçların tasarımına da katkı sağlayacağı için önem arz etmektedir (Chaires vd. 1998, Rauf vd. 2005, Temerk vd. 2016).

2.3.2.1 DNA-ilaç etkileşim türleri

DNA ile ilaç moleküllerinin etkileşimleri iki farklı şekilde olmaktadır.

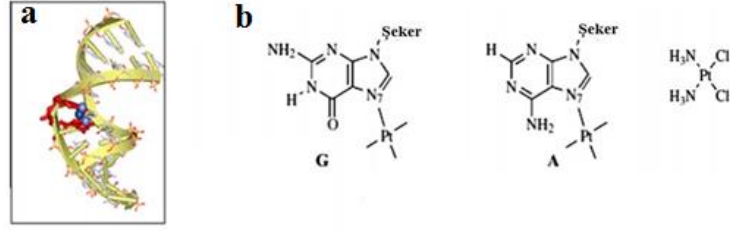
Kovalent bağlanma

- Alkilleyici ilaçların DNA ile etkileşimi

Kovalent olmayan bağlanma

- İnterkalasyon
- DNA'da oluklara bağlanma
- Elektrostatik bağlanma

bu etkileşimler arasında sayılabilir (Rauf vd. 2005, Radi vd. 2014). Küçük yapıli moleküllerin DNA'ya kovalent olarak bağlanmaları alkilasyon ile ya da DNA'nın içinde veya dışında yer alan zincir uzantılarına çarpaz bağlanma şeklinde yürümektedir. Bu bağlanma modu genellikle tersinmezdir ve hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır. Kovalent bağlayıcı ajanların sağladığı en büyük avantaj ise, yüksek bağlanma gücüne sahip olmalarıdır. En yaygın kullanılan kovalent bağlayıcı ajan Sisplatindir. Sisplatin'in DNA ile bağlanmasının şematik gösterimi şekil 2.23'de verilmiştir (Sirajuddin vd. 2013).



Şekil 2.23. a. Sisplatin'in DNA'ya kovalent bağlanması, b. Sisplatin'in Guanin (G) ve Adenin'e (A) bağlanması

Yukarıda yer alan kovalent olmayan etkileşim türleri arasında en yaygın olarak karşılaşılan DNA-ilaç etkileşim türü interkalasyondur. İnterkalasyon kelime anlamı olarak, bir molekül veya grubun iki molekül arasına tersinir şekilde girmesi olarak tanımlanır (tr.wikipedia.org.2016). İlaç moleküllerinin DNA çift sarmalı arasında tersinir olarak girmesi ise ilaç moleküllerinin DNA çift sarmalına interkale olduğu şeklinde tanımlanır (Şekil 2.24).

Bir diğer bağlanma şekli olan, DNA molekülü üzerinde yer alan küçük veya büyük oluklara da ilaç moleküllerinin bağlanmaları mümkün olabilmektedir. Bu bağlanma hidrojen bağı veya van der Waals etkileşimleri ile gerçekleşmektedir. Şekil 2.25'de şematik olarak DNA üzerindeki herhangi bir oluğa bağlanma şekli görülmektedir.

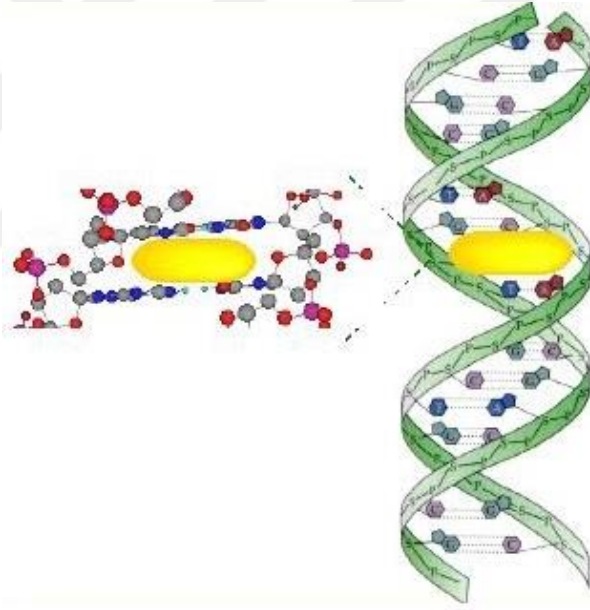
DNA'da bulunan negatif yüklü fosfat grupları ile bazı yüklü moleküller elektrostatik olarak etkileşebilmektedirler (Şekil 2.26). Bazı metal kompleksleri, özellikle de Rutenyum kompleksleri DNA'ya elektrostatik olarak bağlanmaktadır (Sirajuddin vd. 2013).

DNA ve ilaç etkileşimlerinin incelenmesinde farklı teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında: Floresans Spektroskopisi, Ultra Viyole-Görünür Alan Spektroskopisi, Raman Spektroskopisi, Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi, İnfrared Spektroskopisi, Kapiler Elektroferez ve Elektrokimyasal Teknikler sayılabilir (Radi vd. 2014, Gooding vd. 2004). Bu tez çalışmasında, bazı antikanser ilaçlarının

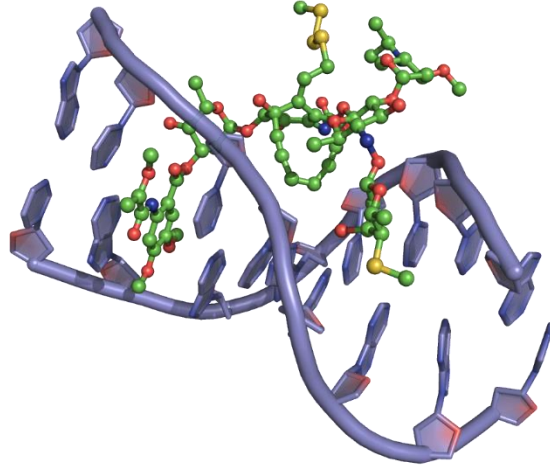
DNA ile etkileşimleri voltametrik tekniklerle incelenmiştir. Bu nedenle bu bölümde DNA-ilaç etkileşimlerinin voltametrik yöntemlerle incelenmesi hakkında kısaca bilgi verilecektir.

2.3.2.2 DNA-ilaç etkileşiminin voltametrik yöntemlerle incelenmesi

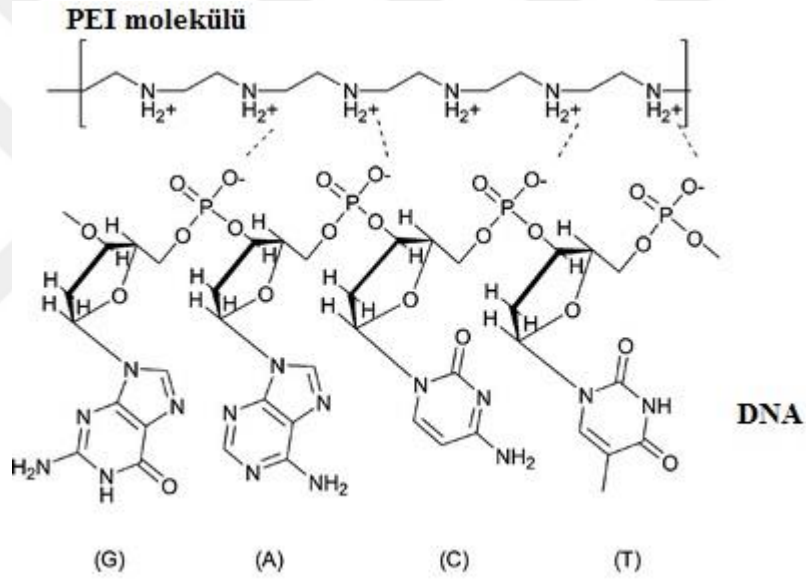
Molekül-DNA etkileşimlerinin elektrokimyasal olarak incelenmesi, spektroskopik yöntemlerle yapılan çalışmalara tamamlayıcı niteliğinde olmuştur. Ayrıca, ilaç-DNA etkileşim mekanizmasının açıklanması elektrokimyasal tekniklerle mümkün olabilmektedir. Bu mekanizmanın açıklanması ise yeni antikanser ilaç tasarımında önemli bir basamaktır (Temerk vd. 2016).



Şekil 2.24 İnterkalasyon ile ilaç-DNA etkileşiminin şematik gösterimi



Şekil 2.25 DNA'daki oluklara bağlanma ile ilaç-DNA etkileşiminin şematik gösterimi



Şekil 2.26 İlaç-DNA etkileşiminin elektrostatik olarak gerçekleşmesinin şematik olarak gösterimi

Son yıllarda antikanser ilaçlarının DNA ile etkileşimlerinin elektrokimyasal tekniklerle incelenmesi çalışmaları hız kazanmıştır. Bu yöntemlerle ilaç-DNA etkileşiminin incelenmesi genel olarak antikanser ilacının, DNA'nın bulunduğu ve bulunmadığı ortamdaki elektrokimyasal davranışına bağlı olarak incelenmektedir. Kullanılan antikanser ilacı elektroaktif ise, bu etkileşim ilaç sinyali üzerinden incelenebilir. Kullanılan antikanser ilaç elektroaktif değil ise, bu etkileşim uygun şartlar sağlandığında DNA üzerinde bulunan ve elektroaktif özellik gösteren Guanin veya Adenin bazları üzerinden de incelenebilmektedir (Rauf vd. 2005, Aydoğdu vd. 2014).

Antikanser ilaçlarının DNA ile etkileşimlerinin incelenmesinde çok çeşitli elektrotlar kullanılabilmektedir. Bunlar arasında, karbon pasta elektrot (Wang vd. 1998, Kara vd. 2002, Bayraktepe vd. 2013), damlayan civa elektrot (Gherghi vd. 2003b), altın elektrot (Mehdinia vd. 2009), kalem grafit elektrot (Eksin vd.. 2013), camı karbon elektrot (Nawaz vd. 2006, Aydoğdu vd. 2014) ve perde baskılı elektrotlar (Lapuda vd. 2000, Radi vd. 2014) sayılabilir. Genel olarak, çalışmaların başından sonuna kadar çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrodu içeren üçlü elektrot sistemi kullanılmakta olup, DV, DPV, KDV ve kronopotansiyometri gibi birçok voltametrik teknik yardımıyla DNA-ilâç etkileşimleri incelenmektedir.

Voltametrik yöntemlerle DNA-ilâç etkileşim mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar üç farklı şekilde uygulanmaktadır. Bunlar:

DNA'nın elektrot yüzeyine modifiye edilmesi ile incelenmesi

Bu yöntemde, DNA elektrot yüzeyine elektrostatik etkileşim, kovalent bağlama veya pasif adsorpsiyon yöntemlerinden biri yardımıyla tutturulur. DNA ile etkileşeceği düşünülen hedef molekül ise çözelti ortamına eklenir. Elektrot yüzeyinde, DNA üzerinde bulunan elektroaktif özellik gösteren Adenin ve Guanin bazlarının yükseltgenmesi gerçekleşir ve bir akım okunur. Çözelti ortamında bulunan molekül ile elektrot yüzeyindeki DNA'nın etkileşmesi durumunda, elektrot yüzeyinde tutunmuş olan DNA'dan elde edilen akım-potansiyel sinyalinde veya çözeltide bulunan ilâcın akım-potansiyel sinyalinde düşme meydana gelir. Buna göre, ilgili etkileşimin mekanizması, DNA-ilâç bağlanma sabiti gibi bazı değişkenler hesaplanabilmektedir (Brett vd. 1996, Tian vd. 2008, Tajik vd. 2015).

İlacın elektrot yüzeyine modifiye edilmesi ile incelenmesi

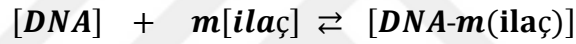
DNA'nın elektrot yüzeyine modifiye edilmesine benzer şekilde burada da, ilâç elektrot yüzeyine modifiye edilir ve sinyalleri okunur. DNA bulunan çözelti ortamında ilâç

modifiye elektrodun daldırılması ve DNA ile etkileşimi neticesinde elde edilen sinyaller tekrar değerlendirilir (Brett vd. 2002).

DNA-ilaç etkileşiminin çözelti ortamında incelenmesi

DNA-ilaç etkileşiminin çözelti ortamında incelenebilmesi için hem DNA hem de ilaç molekülünün aynı çözelti ortamında ilave edilip belirli bir süre etkileştikten sonra, ilaç-DNA kompleksinin voltametrik sinyali okunur ve daha önce okunmuş olan DNA sinyali veya ilaç sinyali ile karşılaştırılarak ilgili hesaplamalar yapılır (Wang vd 2006, Temerk vd. 2016, Baytak vd. 2017).

DNA ve ilaç molekülleri etkileştiğinde, aşağıdaki reaksiyona göre bir kompleks oluşturduğu düşünülürse;



Bu kompleksin kompleks oluşum sabiti (K) ise;

$$K = \frac{[DNA-m(ilaç)]}{[DNA][ilaç]^m}$$

şeklinde verilebilir. Buradaki K sabitine, DNA ve ilaç arasındaki bağlanma sabiti adı verilir. Yukarıda yer alan yöntemlerden herhangi biri kullanılarak yapılan DNA-ilaç etkileşim çalışmalarında, bahsedildiği üzere ilaç veya DNA derişimi sabit tutularak diğer türün derişimi değiştirilmektedir. Burada sabit tutulan türü ev sahibi, derişimi değiştirilen türü de misafir molekül olarak tanımladığımızda, değişen akım sinyallerinden yararlanarak eşitlik 2.12'ye göre K bağlanma sabiti hesaplanabilir.

$$\log\left(\frac{1}{[DNA]}\right) = \log K + \log\left(\frac{i_{E-M}}{i_E - i_{E-M}}\right) \quad (2.12)$$

Bu eşitliğe göre, başlangıçta (hiç DNA veya ilaç eklenmeden) okunan sinyal ve artan DNA veya ilaç derişimi ile birlikte okunan sinyallerden hesaplanan $\log\left(\frac{i_{E-M}}{i_E - i_{E-M}}\right)$ değerine karşılık $\log\left(\frac{1}{[DNA]}\right)$ değeri grafiğe geçirilir. Bu grafiğin kesim noktasından yararlanılarak K bağlanma sabiti hesaplanır (Temerk vd. 2013, Sirajuddin vd. 2013, Temerk vd. 2015, Temerk vd. 2016).

K bağlanma sabitinin hesaplanmasının ardından, DNA-ilac etkileşimine dair bazı termodinamik değişkenler de hesaplanabilir. Bu değişkenlerden en önemlisi Standart Gibbs serbest enerji (ΔG^0) değeridir. Hesaplanmış olan bağlanma sabiti yardımıyla eşitlik 2.13 kullanılarak ΔG^0 hesaplanabilir. Bu değerin negatif olması DNA ve ilaç etkileşiminin kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir (Temerk vd. 2016).

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (2.13)$$

2.4 Kaynak Araştırması

Bu bölümde, tez çalışmasında kullanılmış olan ilaç etken maddeleri ile ilgili literatürde yer alan çalışmaların özetlerine yer verilmiştir.

2.4.1 Şikonin ile ilgili yapılan çalışmalar

Şikonin ile ilgili literatürde voltametrik yöntemlerle yapılmış olan yalnızca beş çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmaların özetleri aşağıda kısaca verilmiştir.

Wu vd. (2015), 3,4-etilendioksitiyofenin β -siklodekstrin substratı varlığında $FeCl_3$ 'ün yükseltgenmesi ile nano yapıları poli(3,4-etilendioksitiyofen)/ β -siklodekstrin (PEDOT/ β -CD) hazırlanmıştır. Yeni sentezlenmiş olan bu kompozidin özelliklerini incelemek amacıyla Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi, X-ışınları kırınım (XRD) ve elektrokimyasal empedans

spektroskopi yöntemi (EIS) kullanılmıştır. Oluşturulmuş olan bu süspansiyon camsı karbon elektrot yüzeyine damlatılarak yüzey modifikasyonu sağlanmıştır. Geliştirilmiş olan bu yeni elektrot ile bu iki maddenin differansiyel puls voltametrisi tekniği ile fosfat tampon ortamı pH 4,0'de elektrokimyasal tayinleri gerçekleştirilmiş olup doğrusal çalışma aralığı Şikonin için 7,0 – 5000 nM, hiperosid için 3,0 – 10000 nM aralığında bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı ise; Şikonin için 2,3 nM Hiperosid için; 1,0 nM olarak bulunmuştur. Geliştirilen bu yöntemle her iki ilaç etken maddesinin serum numunesine yapılan uygulama çalışmaları neticesinde %100 civarında geri kazanım değerlerinin elde edildiği görülmüştür.

Gao vd. (2015), Şikonin'in elektroanalitik olarak tayinini gerçekleştirmek amacıyla β -siklodekstrin ile fonksiyonlandırılmış ÇDKNT'lerle modifiye edilmiş camsı karbon elektrot kullanılmıştır. Geliştirilmiş olan bu yeni elektrotun yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniği ile yapılmış ve β -siklodekstrin'in kullanılmasıyla yüzeyin daha homojen olduğu gözlenmiştir. Şikoninin elektrokimyasal sinyali için en iyi cevabın pH 5,0 fosfat tampon ortamında ÇDKNT/ β -CD/CKE'de elde edildiği görülmüştür. Bu elektrot ve Differansiyel puls voltametrisi tekniği kullanılarak geliştirilmiş olan yöntemin doğrusal çalışma aralığı 5,0 - 10000 nM, gözlenebilme sınırı ise 1,0 nM olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin uygulaması ise idrar numunelerine yapılmış olup sonuçlar %100'e oldukça yakın değerlerde bulunmuştur. Ayrıca geliştirilmiş olan yöntem K^+ , Na^+ , Ni^{2+} , Al^{3+} , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} 'ün 100 kata kadar, folik asit, sitrik asit, ascorbik asit ve ürik asidin 20 kata kadar ortamda bulunmasının girişim yapmadığı %5'in altındaki akım farkları ile kanıtlanmıştır.

An vd. (2013), Şikonin'in elektrokimyasal yükseltgenme davranışı, poli(dialildimetilamonyum klorür) ile fonksiyonlandırılmış grafen levhalarla modifiye edilmiş camsı karbon elektrot yüzeyinde incelenmiştir. (PDDA-GS/CKE). Söz konusu elektrot yüzeyinde, fosfat tampon ortamı pH 2,0'de doymuş kalomel elektroda karşı, Şikonin'e ait 0,681 V'da bir yükseltgenme piki ve geri potansiyel döngüsünde 0,662 V'da bir indirgenme pikinin olduğu görülmüştür. Bununla birlikte Şikonin'in akımının yeni modifiye edilmiş olan PDDA-GS/CKE elektrot yüzeyinde CKE'a kıyasla fark edilir derecede arttığı görülmüştür. PDDA-GS/CKE yüzeyinde Şikonin'in yükseltgenme

pikinin $2e^-/2H^+$ yer ile gerçekleştiği görülmüştür. Modifiye elektrot yüzeyinde Şikonin'in α -elektron transfer katsayısı, n-elektron transfer sayısı ve elektrot reaksiyonunun hız sabiti (k_s) değerleri hesaplanmış ve sırasıyla, 0,53, 2,18 ve $3,6 \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Hazırlanmış olan modifiye elektrotla DPV yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemin doğrusal çalışma aralığı $9,472 \times 10^{-8} - 3,789 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, gözlenebilme sınırı ise $3,157 \times 10^{-8} \text{ molL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca, yeni geliştirilmiş olan modifiye elektrodun kararlılığı, seçiciliği ve tekrar üretilebilirliğinin Şikonin'i gerçek numunelerden analiz etmek için uygun olduğu görülmüş olup *Lithospermum erythrorhizon* adlı bitkiden Şikonin'i %100'e yakın geri kazanım değerleri ile tayin etmişlerdir.

Wu vd. (2013), Geniş bir kullanım alanına sahip antikanser ilacı olan Şikonin tayini için nano yapılı poli(hidroksimetillenmiş-3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT-MeOH) ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotla (CKE) kullanılmıştır. bu elektrot yüzeyinde Şikonin'e ait anodik ve geri taramada ise anodik pike ait bir katodik pikin olduğu görülmüştür. Her iki pik için en uygun pH fosfat tampon ortamında pH 3,0 olarak belirlenmiş ve diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemi geliştirilmiştir. PEDOT-MeOH/CKE'un yalın CKE ile kıyaslandığında Şikonin'in akım sinyalinin ciddi şekilde arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, modifiye elektrot kullanılarak geliştirilmiş olan DPV yönteminin $1,0 \text{ nmolL}^{-1}$ ile $10,0 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$ arasında geniş bir doğrusal çalışma aralığı verdiği ve gözlenebilme sınırının ise $0,3 \text{ nmolL}^{-1}$ olduğu görülmüştür. Ayrıca, PEDOT-MeOH/GCE elektrodunun, yüksek kararlılık, yüksek duyarlılık ve iyi bir tekrar üretilebilirliğe sahip olduğu görülmüştür. Geliştirilmiş olan bu yeni yöntem ile Şikoninin idrar numunelerinden geri kazanım çalışmaları başarı ile yapılmış olup elde edilen geri kazanım değerleri %100'e oldukça yakın bulunmuştur.

Zhou vd. (2010), Şikoninin elektrokimyasal davranışı camı karbon elektrot yüzeyinde, 0,16 M asetik asit – sodyum asetat tampon ortamında (pH 3,98) dönüşümlü voltametri, kare dalga voltametrisi ve kronokulometri teknikleri ile incelenmiştir. Bu koşullarda, Şikoninin $E_p^k = 0,698 \text{ V}$ and $E_p^a = 0,632 \text{ V}$ civarlarında, yarı tersinir ve adsorpsiyon kontrollü bir çift redoks pikinin olduğu gözlenmiştir. Yapılan dönüşümlü voltametri çalışmaları neticesinde elde edilen $2e^-$ ve $2H^+$ verilerine göre mekanizması açıklanmış

ayrıca yüzeye adsorbe olan molekül sayısı (Γ), yük transfer katsayısı (α) ve elektrokimyasal reaksiyonun hız sabiti (k_s) değerleri hesaplanmıştır. Bunlara ek olarak, Şikonin tayini için kare dalga voltametri tekniği geliştirmek amacıyla bazı deneysel koşullar optimize edilmiş olup elde edilen akım değerlerinin Şikonin derişimiyle doğrusal olarak değiştiği sonucuna varılmıştır (doğrusal çalışma Aralığı $2,08 \times 10^{-8}$ - $1,82 \times 10^{-6}$ M, $R^2 = 0,998$). Yöntemin gözlenebilme sınırı ise $7,8 \times 10^{-9}$ M olarak bulunmuştur. Geliştirilmiş olan bu yeni yöntem ile herhangi bir ön işleme tabi tutmadan Gromwell-root ilacı içerisinde bulunan Şikoninin tayini gerçekleştirilmiş olup geri kazanım değerleri oldukça yüksek bulunmuştur.

2.3.2 Mitoksantron ile ilgili yapılan çalışmalar

Brett vd. (1998), yılında yapmış oldukları bir çalışmada MTK'nın çift sarmal DNA ve tek sarmal DNA ile etkileşimini voltametrik olarak incelemek amacıyla camısı karbon elektrot yüzeyini DNA ile modifiye etmişlerdir. MTK'nın analitik olarak tayin edilmesi ve DNA ile etkileşiminin incelenmesi amacıyla KDV ve DPV yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, pH 4,5 asetat tampon ortamında, MTK'nın DNA ile Adenin veya Guanin bazı üzerinden interkalasyon yolu ile etkileştiğini, etkileşiminin kinetiğinin yavaş olduğunu ve zamana bağlı olarak değiştiği sonucunu bulmuşlardır.

Brett vd. (1999), yılında yapmış oldukları bir çalışmada camısı karbon elektrodu kullanarak MTK'nın elektrokimyasal davranışını aydınlatmışlardır. Bu çalışmada MTK'nın yükseltgenme davranışının pH'a bağlı, tersinmez ve karmaşık yapıda olduğu yorumunu yapmışlardır. MTK'nın yükseltgenme ürünlerinin elektrot yüzeyini zehirlediğini ve bu problemin üstesinden gelmek için %30 oranında alkol içeren ortamda çalışılması gerektiğini öne sürmüşlerdir. DPV yöntemi ile farklı pH değerlerinde almış oldukları voltamogramlardan yaptıkları yoruma göre, MTK'ya ait olan 2 adet yükseltgenme pikinin $2e^-/2H^+$ ile gerçekleştiğini düşünmüşlerdir. Daha düşük potansiyel değerlerinde gözlenen pikin 5,8-hidroksil grubundan kaynaklandığını, daha pozitif potansiyel değerlerinde gözlenen pikin ise yapıda yer alan alifatik zincirdeki azot atomlarının $2e^-/2H^+$ vererek halkalaşmasından kaynaklandığını öne

sürmüşlerdir. Ayrıca, KDV tekniği ile MTK'nın analitik tayini için geliştirdikleri yöntemin doğrusal çalışma aralığını 0,1 - 1,0 µM, gözlenebilme sınırını ise 0,1 µM olarak bulmuşlardır.

Mao vd. (2000), MTK tayini için yapmış oldukları bir çalışmada, pH 7,10'da 0,05 M Tris tampon ortamında MTK'nın indirgenme piki üzerinden doğrusal taramalı voltametri ile Co-karbon fiber modifiye ultramikro elektrot yüzeyinde bir voltametrik tayin yöntemi geliştirmişlerdir. Doymuş kalomel elektroda karşı -0,798 V'da gözlenen indirgenme pikinin akımının MTK derişimi ile doğrusal olarak değıştiğı aralığı $2,0 \times 10^{-7}$ - $6,0 \times 10^{-6}$ M olarak, gözlenebilme sınırını ise $4,2 \times 10^{-8}$ M olarak bulmuşlardır. Geliştirdikleri bu yöntemi MTK'nın direkt olarak idrar numunelerinden tayininde kullanmışlar ve elde edilen geri kazanım değerlerinin % 95,4 - % 105,8 aralığında olduğu görölmüştür. Ayrıca geliştirmiş oldukları elektrot yüzeyinde MTK'nın elektrokimyasal davranışının adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucuna varmışlar ve MTK için elektron transfer hız sabiti (ks) ve elektron transfer katsayısı (α) değerlerini Laviron eşitliği ile hesaplamışlardır. Bu değerler sırasıyla $4,4 \text{ s}^{-1}$ ve 0,48 olarak bulunmuştur. Geliştirilmiş olan elektrodun yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla da Auger elektron spektroskopisi kullanılmış ve deney sonuçları Co'n karbon fiberler üzerinde bulunduğunu göstermiştir. Son olarak söz konusu elektrodun kararlılık ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmış ve oldukça iyi sonuçlar elde edildiğı görölmüştür.

Erdem vd. (2001), MTK'nın buzağı timüsünden elde edilmiş olan çift sarmal (ds-DNA) ve tek sarmal (ss-DNA) ile etkileşimini karbon pasta elektrot yüzeyinde hem DV hem de DPV teknikleri ile fosfat tamponu pH 7,4'de incelemişlerdir. Bazı deneysel değişkenler (DNA derişimi, MTK derişimi ve MTK'nın birikme süresi) DPV ile optimize edilmiştir. Optimize edilmiş olan şartlar altında her iki yöntemle de incelenen DNA etkileşim çalışmaları neticesinde, MTK'nın yükseltgenme sinyali en yüksek iken, karbon pasta elektrot yüzeyi ds-DNA ile modifiye edildiğinde bu sinyalin düştüğü görölmüştür. Aynı çalışma ss-DNA ile de yapılmış ve sonuç olarak MTK'nın ds-DNA ile daha çok etkileştiğı sonucuna varılmıştır.

Wang vd. (2003), MTK'nın buzağının timüs bezinden elde edilen DNA ile etkileşimini 0,05 M Tris-HCl ortamında pH 7,4'de DV yöntemi ile çözelti ortamında incelemişlerdir. DNA ile etkileşmiş halde bulunan ve serbest haldeki MTK'ya ait difüzyon katsayıları, MTK – DNA kompleksinin bağlanma sabiti (K) ve bağlanma sayısını (s) hesaplamışlardır. Buna göre serbest haldeki MTK'nın difüzyon katsayısını $3,76 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bulurken MTK-DNA kompleksinin difüzyon katsayısını $2,73 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplamışlardır. Bulunan bu değerlere göre çözelti ortamında MTK'nın DNA ile bağlandığı ve bu nedenle elektrot yüzeyine difüzlenen MTK moleküllerinin sayısının azaldığı yorumunu yapmışlardır. İlgili bağlanmaya ait K sabitini ve bağlanması sayısını da hesaplamışlar ve sırasıyla $8,7 \times 10^9 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, 2,8 bulmuşlardır. Elde edilen bu sonuçlara göre MTK'nın yapısında yer alan düzlemsel antrokinon yapısının DNA'ya interkale olduğunu, 2 adet aminoetilamino gruplarının ise DNA'da yer alan oluklara bağlandığı yorumunu yapmışlardır.

Li vd. (2005), MTK'nın DNA ile etkileşimi pH 4,8'de asetat tamponu ortamında DV, UV-Vis ve Raman spektroskopisi teknikleri ile incelenmiştir. MTK'ya ait pik akımındaki azalma ve maksimum absorpsiyon bantlarındaki hipokromik ve batachromik kaymaların sonucu olarak MTK'nın DNA ile interkalasyon yolu ile etkileştiği sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu sonuçlar Raman spektroskopisi ile desteklenmiştir.

2.3.3 Etoposid ile ilgili yapılan çalışmalar

Holthuis vd. (1985), ETP'nin sulu çözelti ortamında camı karbon elektrot yüzeyinde yükseltgenme mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaya göre, ETP'nin iki adet yükseltgenme pikinin olduğundan, birinci yükseltgenme pikinin $1,0 \text{ e}^-$ transferi ile oluşan kararlı bir radikalın oluşması ile sonuçlandığını, ikinci yükseltgenme pikinin ise ikinci elektronun verilmesi ile oluştuğunu belirtmişlerdir. Son ürünün 2,0 elektron transferi ile olduğunu, bu ürünün kararsız bir katyon olduğunu ve hemen hızlı bir dönüşümle ortokinona dönüştüğünü söylemişlerdir. Elde ettikleri bu ürünü izole ederek UV, kütle ve IR spektroskopisi teknikleri ile karakterize etmişlerdir.

Radi vd. (2007), ETP tayini için yapmış oldukları bir çalışmada, ETP'nin BR tamponu ortamında pH 3,0'de yaklaşık olarak 0,5 V civarında gözlenen yükseltgenme pikinden yararlanarak DPV yöntemi ile karbon pasta elektrot yüzeyinde yöntem geliştirme çalışmaları yapmışlardır. Geliştirmiş oldukları yöntemin doğrusal çalışma aralığını $2,5 \times 10^{-7}$ - $2,5 \times 10^{-5}$, gözlenebilme sınırını ise $1,0 \times 10^{-7}$ M olarak bulmuşlardır. Geliştirilen bu yöntem ile ETP'nin serum ortamında tayini, %90,0'ın üzerinde geri kazanımlarla yapılmıştır.

Palabıyık vd. (2013), ETP tayini için yapmış oldukları elektroanalitik yöntem geliştirme çalışmasında, ÇDKNT ile modifiye ettikleri camı karbon elektrot yüzeyinde AdsDPV yöntemini kullanmışlardır. Modifiye edilmiş elektrot yüzeyini taramalı elektron mikroskopunu tekniği ile karakterize etmişlerdir. ETP'nin pik akımına pH, biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi, tarama hızı ve ÇDKNT miktarı gibi değişkenlerin etkisi incelenmiş ve belirlenmiş olan en uygun koşullarda AdsDPV yöntemi ile oluşturdukları kalibrasyon eğrisinin doğrusal çalışma aralığını $2,0 \times 10^{-8}$ - $2,0 \times 10^{-6}$ M, gözlenebilme sınırını ise $5,4 \times 10^{-9}$ M olarak bulmuşlardır. Geliştirilmiş olan elektrodun tekrar üretilebilirliğinin 1,55'lik % Bağıl standart sapma ile oldukça iyi olduğu gözlenmiştir. Geliştirilmiş olan söz konusu yöntemin uygulaması ilaç preperatlarından %95,55'lik geri kazanım değeri ile yapılmıştır. Yöntem geliştirme çalışmalarına ek olarak, ETP'nin olası yükseltgenme mekanizması hakkında çeşitli yorumlar yapılmış ve ETP'ye ait 2 yükseltgenme pikinin olduğu ve toplamda 2 e⁻un verilmesi ile yükseltgenmenin gerçekleştiğini söylemişlerdir.

Radi vd. (2013), yapmış oldukları bir çalışmada ETP'nin somon balığının sperminden izole edilen çift sarmal DNA ile etkileşimi perde basklı elektrot ile çözelti ortamında DV, DPV ve UV-Vis spektroskopisi yöntemleri ile incelenmiştir. ETP'nin fosfat tampon ortamında (pH 4,5 ve 7,4) iki yükseltgenme pikinin olduğunu ve bu piklerin DNA içeren ve DNA içermeyen ortamlardaki davranışları DV ve DPV yöntemleri ile incelenmiştir. ETP'nin çözelti ortamında serbest halde iken hesaplanan difüzyon katsayısı $4,2 \times 10^{-6}$ cm²s⁻¹ iken, ortama DNA ileave edildiğinde ETP-DNA kompleksi için hesaplanan difüzyon katsayısı $3,8 \times 10^{-7}$ cm²s⁻¹ olarak bulunmuştur. ETP-DNA kompleksinin bağlanma sabiti ise her iki pH değerinde de 10^5 M⁻¹ mertebesinde

bulunmuştur. Elde edilen deneysel bulgular ışığında ETP'nin DNA ile etkileşiminin hem elektrostatik hem de interkalasyonla gerçekleşebileceğini düşünmüşlerdir. Çözelti ortamında yapılan çalışmalara ek olarak DNA elektrot yüzeyine modifiye edilmiş ve modifiye elektrot yüzeyinde DPV yöntemi ile ETP tayini için yöntem geliştirilmiştir. geliştirilen yöntemin gözlenebilirlik sınırı (LOD) $5,0 \times 10^{-9}$ M, tayin sınırı ise $5,0 \times 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur. Geliştirilmiş olan yöntemin serum numunelerine uygulaması başarıyla gerçekleştirilmiştir.

2.3.4 Bikalutamid ile yapılan çalışmalar

Bikalutamid ile ilgili yapılan literatür araştırmasında, söz konusu madde ile ilgili voltametrik olarak yapılmış yalnızca iki tane çalışma olduğu görülmüş olup, özetleri aşağıda sunulmuştur.

Pandit vd. (2015), bir antikanser ilacı olan BİKA'nın elektrokimyasal davranışı tek duvarlı karbon nanotüplerle modifiye edilmiş olan karbon pasta elektrot yardımıyla DPV ve DV teknikleri ile incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda fosfat tampon ortamı pH 7,0'de tersinmez bir indirgenme pikinin olduğunu ve bu pikin modifiye elektrot yüzeyinde difüzyon şartları altında adsorpsiyon kontrollü olduğunu söylemişlerdir. Tarama hızı çalışmaları neticesinde ilacın söz konusu elektrot yüzeyinde $4e^-/4H^+$ ile tersinmez olarak indirgendiği sonucuna varmışlar ve olası indirgenme mekanizmasını önermişlerdir. Mekanizma belirleme çalışmalarına ek olarak optimize edilmiş şartlarda BİKA tayini için DPV yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin doğrusal çalışma aralığı 0,01 - 1,0 μ M aralığında iken, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,052 ve 0,174 μ M olarak bulunmuştur. Geliştirilmiş olan bu yöntemin biyolojik ortama ve ticari ilaç formülasyonlarına uygulaması %100'e yakın geri kazanım değerleriyle gerçekleştirilmiştir.

Raghu vd. (2010), BİKA'nın elektrokimyasal davranışı ilk olarak sulu çözelti ortamında ve camı karbon elektrot yüzeyinde DV ve DPV yöntemleri ile incelenmiştir. BR tampon ortamında pH 2,0 ile 10,0 aralığında tersinmez ve difüzyon kontrollü bir

indirgenme pikine rastlamışlardır. pH 6,4’de en iyi pik akımı ve şekline sahip olan BİKA için bu pH değerinde DPV yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-8} - 2,6 \times 10^{-5}$ M aralığında iken LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla $8,0 \times 10^{-8}$ ve $1,0 \times 10^{-7}$ M’dir. Geliştirilmiş olan bu yöntemin uygulaması ise piyasada bulunan ilaç formülasyonlarında başarıyla gerçekleştirilmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tezin bu bölümünde, deneysel çalışmalar esnasında kullanılan elektrokimyasal ölçme sistemleri ve elektrotlar, kullanılan ilaç etken maddelerinin ve diğer tüm maddelerin analize hazırlanmaları ve kullanımlarıyla ilgili bilgiler sunulmuştur.

3.1 Kullanılan Elektrokimyasal Sistem ve Elektrotlar

Tez çalışmasında yer alan ve antikanser özellik gösteren maddelerin elektrokimyasal analizleri ve empedans ölçümleri CHI 760B model elektrokimyasal analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 CHI 760B elektrokimyasal analiz sistemi

Ölçümlerin alınması esnasında ise; üçlü elektrot sistemi bağlantısı içeren BAS C3 marka çalışma ünitesi kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 BAS C3 çalışma ünitesi

Şekil 3.2’de görüldüğü gibi tüm voltametrik ölçümlerde üçlü elektrot sistemi kullanılmış olup, çalışma elektrotu olarak BASi MF2050 marka ve el yapımı karbon pasta elektrotlar kullanılmıştır. Referans elektrot olarak BAS MF2021 marka Ag/AgCl (3,0 M NaCl), karşıt elektrot olarak ise BASi MW1032 marka platin tel elektrot kullanılmıştır. Voltametrik çalışmalara başlamadan önce ve çalışmalar bittikten sonra karşıt ve referans elektrotlar saf su ile yıkanmıştır.

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Diğer Cihazlar ve Malzemeler

Deneysel çalışmalar esnasında kullanılan çözeltiler, Human Power I⁺ marka ultra saf su sisteminden sağlanan bidestile su ile hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin çözünmelerini sağlamak ve karbon pasta elektrotları temizlemek amacıyla Ultrasonic LC 30 H marka ultrasonik banyo kullanılmıştır.

Deneysel çalışmalar esnasındaki pH ölçümleri HANNA marka HI2211 model pH/ORP metre ile ölçülmüştür. pH metrenin kalibrasyonu, oda sıcaklığında pH 4,0; 7,0 ve 10,0 olan ticari tampon çözeltiler ile yapılmıştır.

Hazırlanan tüm ilaç stok çözeltileri ve tampon çözeltilerin karışmasını sağlamak amacıyla WiseStir marka MSH-20A model magnetik karıştırıcı kullanılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan maddelerin tartımları 0,01 mg (0,00001 g) hassasiyete sahip Shimadzu marka AUW220D model hassas terazi ile gerçekleştirilmiştir.

Stok DNA çözeltisinin molar derişimi hesaplamak amacıyla Shimadzu UV-1700 PharmaSpec spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışması kapsamında kullanılmış olan kimyasal maddelerin temin edildikleri firma ve saflık derecelerini içeren bilgiler çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Madde	Firma	Saflık derecesi, %
Şikinin	Sigma – Aldrich	98,0
Mitoksantron	Sigma – Aldrich	97,0
Bikalutamid	Sigma – Aldrich	98,0
Etoposid	Sigma – Aldrich	98,0
Sepiyolit kili	Sigma - Aldrich	Saf
Çok duvarlı Karbon Nanotüp (ÇDKNT)	DropSens	Saf
Titanyum dioksit nanoparçacıkları (TiO ₂)	Sigma - Aldrich	99,5
Grafit tozu	Sigma - Aldrich	99,99
Mineral yağı	Sigma - Aldrich	Saf
ds-DNA sodyum tuzu	Sigma - Aldrich	Saf
Etanol	Sigma - Aldrich	99,8
Metanol	Sigma - Aldrich	99,7
Sodyum hidroksit	Sigma - Aldrich	98,0-100,5
Hidroklorik asit	Sigma - Aldrich	36,7-38,0
Sülfirik asit	Sigma - Aldrich	95,0-97,0
Asetik asit	Sigma - Aldrich	99,8-100,5
Borik asit	Sigma - Aldrich	99,5
Fosforik asit	Sigma - Aldrich	85,0-88,0
Disodyum monohidrojen fosfat hepta hidrat (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Sigma – Aldrich	98,0-100,5
Sülfirik asit	Sigma – Aldrich	95,0-97,0
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	Riedel-de Haen	Saf
Ürik asit	Sigma - Aldrich	99,0
Askorbik asit	Carlo Erba Reagents	Saf
Glikoz	Sigma - Aldrich	99,6

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler (devam)

L - sistein	Merk	Saf
L- glutamik asit	Merk	Saf
Dopamin	Sigma - Aldrich	Saf
Sodyum klorür	Sigma - Aldrich	Saf
Potasyum klorür	Sigma - Aldrich	99,0-100,5
Azot gazı	Oksan Koll. ŞTİ.	99,99

3.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1 İlaç etken maddelerinin stok çözeltilerinin hazırlanması

Tez çalışmasında kullandığımız dört adet antikanser özellik gösteren maddelerin stok çözeltileri, her biri için uygun çözücülerle derişimi $1,0 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler ölçülü balon içerisinde ve buzdolabında $+4$ °C’de saklanmıştır. Deney esnasında kullanılan çözeltiler stok çözeltilerin uygun destek elektrolit çözeltisiyle seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

$1,0 \times 10^{-3}$ M Şikonin stok çözeltisi: Şikonin standardından 7,20 mg tartılarak etanol ile 25,0 mL ye tamamlanmıştır.

$1,0 \times 10^{-3}$ M Mitoksantron stok çözeltisi: Mitoksantron standardından 12,9 mg tartılarak saf su ile 25,0 mL’ye tamamlanmıştır.

$1,0 \times 10^{-3}$ M Bikalutamid stok çözeltisi: Bikalutamid standardından 10,8 mg tartılarak etanol ile toplam hacim 25,0 ml’ye tamamlanmıştır.

$1,0 \times 10^{-3}$ M Etoposid stok çözeltisi: Etoposid standardından 14,71 mg tartılarak metanol ile toplam hacim 25,0 mL’ye tamamlanmıştır.

3.4.2 0,04 M Britton Robinson (BR) tampon çözeltisinin hazırlanması

1,15 mL asetik asit, 1,24 g borik asit ve 1,35 mL % 85,0'lik fosforik asit karıştırılarak toplam hacim 0,5 L'ye ultra saf su ile tamamlanarak 0,04 M BR tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu tampon çözeltinin pH'sı 0,100 M HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak 2,0 ile 12,0 aralığında değiştirilmiştir.

3.4.3 0,1 ve 0,2 M H₂SO₄ çözeltisinin hazırlanması

Yoğunluğu 1,98 g/cm³ ve kütlece yüzdesi % 98 olan H₂SO₄ çözeltisinden 0,3 mL alınıp toplam hacmin 50,0 mL'ye tamamlanması ile 0,1 M H₂SO₄ çözeltisi hazırlanmıştır. 0,2 M H₂SO₄ ise benzer şekilde, 0,6 mL derişik H₂SO₄'den alınıp toplam hacmin 50,0 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır.

3.4.4 0,1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması

Molekül kütlesi 40,0 g/mol⁻¹ olan NaOH katısından hassas terazi yardımıyla 0,40 g tartılmış ve az bir miktar ultra saf su ile çözme işlemi tamamlandıktan sonra çözelti hacmi 100 mL olan bir ölçülü balona aktarılmış ve son hacim 100 mL' ye ultra saf su ile tamamlanmıştır.

3.4.5 0,1 M HCl çözeltisinin hazırlanması

Yoğunluğu 1,2 g/mL ve kütlece yüzdesi % 37,0 olan derişik hidroklorik asit çözeltisinden 1,2 mL alınarak içerisinde bir miktar saf su bulunan ve toplam hacmi 100 mL olan ölçülü balona yavaşça aktarılmış ve toplam hacim ultra saf su ile 100 mL ye tamamlanmıştır.

3.4.6 1,0 M Asetik asit/sodyum asetat tampon çözeltisinin hazırlanması

Derişik asetik asit çözeltisinden 5,0 mL alınıp bir miktar saf suyun bulunduğu behere yavaşça ilave edilip bu çözeltinin içerisinde yaklaşık olarak 4-5 tane NaOH peleti atılmıştır. pH yaklaşık olarak 4,8 olduktan sonra toplam hacim 100,0 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

3.4.7 0,05 M Fosfat tamponunun hazırlanması

0,52 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 0,37 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ tuzlarından tartılmış ve toplam hacmi 100,0 mL olacak şekilde saf su ile çözülmüştür.

3.4.8 Stok ds-DNA çözeltisinin hazırlanması

Sigma – Aldrich firmasından temin edilen çift sarmal DNA'nın sodyum tuzu, derişimi 1000 ppm olacak şekilde DNA'nın sodyum tuzundan 5,0 mg tartılmış ve 5,0 mL'lik ölçülü balonda saf suda çözümlenerek hazırlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar neticesinde, hazırlanan DNA stok çözeltisi +4 °C'de buzdolabında saklandığında, 3 gün boyunca kararlılığını koruduğu tespit edilmiştir. 3 gün sonunda stok DNA çözeltisi tekrar hazırlanarak kullanılmıştır.

Stok DNA çözeltisinden saf su ile seyreltilerek hazırlanan 100,0 ppm DNA çözeltisinin derişiminin belirlenmesi amacıyla, bu çözeltinin UV-Vis spektrofotometresi ile 260 nm'deki absorbansı ölçülmüş ve derişimi $2,0 \times 10^{-4}$ M bulunmuştur (Radi vd. 2014).

3.4.9 Girişim çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

$1,0 \times 10^{-3}$ M glikoz çözeltisinin hazırlanması: 9,9 mg glikoz tartılıp, toplam hacim 50,0 mL olacak şekilde saf su ile çözümlenerek hazırlanmıştır.

$1,0 \times 10^{-3}$ M askorbik asit çözeltisinin hazırlanması: 8,81 mg askorbik asit tartılıp, toplam hacim 50,0 mL olacak şekilde saf su ile çözülerek hazırlanmıştır.

$1,0 \times 10^{-3}$ M ürik asit çözeltisinin hazırlanması: 8,40 mg ürik asit tartılıp, uygun miktardaki LiCO_3 eklenerek saf su ile toplam hacmin 50,0 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır.

$1,0 \times 10^{-3}$ M L-sistein çözeltisinin hazırlanması: 12,0 mg glikoz tartılıp, toplam hacim 50,0 mL olacak şekilde saf su ile çözülerek hazırlanmıştır.

$1,0 \times 10^{-3}$ M L-glutamik asit çözeltisinin hazırlanması: 7,36 mg L-glutamik asit tartılıp, toplam hacim 50,0 mL olacak şekilde saf su ile çözülerek hazırlanmıştır.

$1,0 \times 10^{-3}$ M dopamin çözeltisinin hazırlanması: 9,48 mg dopamin tartılıp, toplam hacim 50,0 mL olacak şekilde saf su ile çözülerek hazırlanmıştır.

3.5 Yalın ve Modifiye Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda sekiz adet farklı modifiye karbon pasta elektrotlar (KPE) kullanılmıştır. Bu elektrotlar, miktarları çizelge 3.2'de verilmiş olan sepiyolit kili, TiO_2 nanoparçacıkları ve çok duvarlı karbon nanotüpler (ÇDKNT)'in belirtilen miktarda grafit tozu, 10,0 μL mineral yağının petri kabında karıştırılıp pasta haline getirilmesi ve elde edilen pastanın da şekil 3.3'de gösterilmiş olan elektrot gövdesinin uç kısmındaki çapı ve derinliği 3,0 mm olan deliğin içine yerleştirilmiştir. Elektrodun yüzeyi ise, parafilm kâğıdı ile parlatılmıştır.

Çizelge 3.2'de verilen oranlardaki modifiye karbon pasta elektrotlar, her bir ilaç etken maddesinin elektrot yüzeyindeki davranışını ve hangi modifiye elektrotta daha iyi cevap vereceğini görmek amacıyla hazırlanmış olup, her bir madde için uygun elektrot belirlendikten sonra elektrot bileşimlerinin optimizasyonu çalışması yapılarak uygun modifiyer bileşimi/bileşimleri belirlenmiştir (Bölüm 4). Hazırlanan bu elektrotlar elektrokimyasal çalışma ünitesinin çalışma elektrotu kısmına bağlanarak voltametrik ölçümler kaydedilmiştir. Tekrarlanabilir ölçümler elde etmek amacıyla, her bir ölçüm arasında hazırlanmış olan elektrotlar, maddelerin uygun çözücüleri ve saf suyun 1:1

(v/v) oranında karıştırılmasıyla elde edilen çözeltide yıkanmış ve her ölçüm arasında 30,0 s ile 60,0 s arasında azot gazı geçirilmiştir.



Şekil 3.3 Karbon pasta elektrot gövdesi

Çizelge 3.2 Modifiye karbon pasta elektrotlar ve % bileşim oranları

	Grafit tozu, %	Sepiyolit kili, %	TiO ₂ , %	ÇDKNT, %
KPE	100	-	-	-
Kil/KPE	97,0	3,0	-	-
TiO₂/KPE	97,0	-	3,0	-
ÇDKNT/KPE	97,0	-	-	3,0
Kil/ÇDKNT/CPE	94,0	3,0	-	3,0
TiO₂/ÇDKNT/KPE	94,0	-	3,0	3,0
Kil/TiO₂/KPE	94,0	3,0	3,0	
Kil/TiO₂/ÇDKNT/KPE	91,0	3,0	3,0	3,0

3.6 Farmasötik Numunelerin Analize Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında kullanılan anti kanser özellik gösteren maddelerden ilaç olarak kullanılan ve ticari olarak piyasada bulunanlar;

- ✓ Etosit flakon (20 mg/mL Etoposid içerir)
- ✓ Mitoksantron flakon (2,0 mg/mL Mitoksantron içerir)
- ✓ Casodex tablet (50,0 mg Bikalutamat/tablet içerir)

Etoposid için derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde stok flakon çözeltisi, Etoposid adlı flakondan 0,029 mL alınıp, toplam hacim metanol ile 10,0 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Benzer şekilde, $1,0 \times 10^{-3}$ M Mitoksantron stok flakon çözeltisi aynı adı taşıyan flakondan 5,56 mL alınıp toplam hacmin saf su ile 25 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır.

Bikalutamat piyasada tablet formunda yer aldığı için, tablet stok çözeltisi hazırlamak amacıyla bir takım ön işlemler yapılmıştır. Bu amaçla; 5 ayrı Casodex tabletleri ayrı ayrı tartılmış ve bir tabletin ortalama kütlesi belirlenmiştir. Bu 5 tablet porselen bir havanda iyice öğütülerek toz haline getirilmiş ve bu karışımdan bir tabletin kütlesine eşit miktarda tartılarak 100 mL'lik ölçülü balona aktartılmıştır. Balon joyeye yaklaşık olarak 70-80 mL civarında etanol koyularak 2 saat boyunca etken maddenin çözünmesini sağlamak amacıyla ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Daha sonra toplam hacim 100 mL'ye etanol ile tamamlanmış olup bir gece boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında, çözünmeyen destek maddelerinin çökmesi için bekletilmiştir. Bu çözeltiye stok tablet çözeltisi adı verilmiştir. Analizlerde, stok tablet çözeltisinden uygun hacimlerde alınarak destek elektroliti içeren ortamda seyreltilerek kullanılmıştır.

3.7 Serum ve İdrar Örneklerinin Analize Hazırlanması

Serum örneklerinden alınan 1,0 mL’lik bir kısım üzerine yine aynı hacimde asetonitril ilave edilerek içeriğindeki proteinin çökmesi sağlanmıştır. Proteinsiz serumu ayırmak amacıyla 2000 rpm de 20 dk santifrüj yapılmış ve üstteki berrak çözeltiden uygun hacimde alınan kısım, destek elektroliti içeren analiz ortamına eklenmiştir.

İdrar örnekleri deneysel çalışmalardan hemen önce alınmış ve herhangi bir ön işlem uygulanmaksızın direk olarak destek elektrolit ve ilaç etken maddesini içeren analiz ortamına uygun hacimlerde ilave edilmiştir.

3.8 Elektrokimyasal Deneylerin Yapılışı

3.8.1 Voltametrik ölçümlerin yapılışı

Tüm voltametrik ölçümler (dönüşümlü voltametri, kare dalga voltametrisi, differansiyel puls voltametrisi, ve sıyırma voltametrisi yöntemleri) şekil 3.2’de gösterilen BAS C3 katı elektrot ünitesi kaydedilmiştir. Hücreye toplam hacim 10,0 mL olacak şekilde destek elektrolit + ilaç etken maddesini içeren çözelti koyulmuş olup referans, karşıt ve çalışma elektrotları daldırılmıştır. Her bir deney başlangıcında 1,0 dakika ve ölçüm aralarında da 30’ar saniye süreyle yüksek saflıkta azot gazı geçirilmiştir. İlaç etken maddeleri eklenmeden önce zemin sinyallerini kaydetmek amacıyla destek elektrolitin voltamogramları alınmıştır. Dönüşümlü voltametri çalışmalarında, etken madde ilave edildikten sonra geniş bir potansiyel aralığında voltamogramlar kaydedilmiş olup maddelerin sinyal verdiği potansiyele göre her bir madde için uygun potansiyel penceresi belirlenmiştir. Diğer tüm voltametrik ölçümler bu potansiyel aralığında kaydedilmiştir.

3.8.1.1 pH ve destek elektrolit ortamının etkisi

Tez çalışması kapsamında elektrokimyasal davranışı incelenecek ve sonrasında yöntem geliştirme çalışmaları yapılacak olan maddelerin en iyi sinyal verdiği elektrolit ortamı ve pH değerini belirlemek amacıyla BR tamponu, asetat tamponu, fosfat tamponu ve farklı derişimlerde sülfürik asit çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir ilaç etken maddesinin öncelikle geniş bir pH aralığında çalışma imkanı sunan BR tampon ortamında, pH 2,0 – 12,0 aralığındaki sinyalleri kaydedilmiştir. Bu sinyaller göz önüne alınarak her bir maddenin en iyi sinyal verdiği pH aralığı belirlenmiş ve o pH aralığında farklı elektrolit ortamları tampon kapasiteleri kapsamında denenerek birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Böylece bu maddelerin, en yüksek pik akımı ve en iyi pik şekline sahip olduğu destek elektrolit ortamı ve pH değeri belirlenmiştir.

3.8.1.2 Biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresinin etkisi

Tez çalışmamızın öncelikli amaçlarından biri, dört farklı antikanser özellik gösteren ilaç etken maddeleri için adsorptif sıyırma voltametrisi tekniklerinden faydalananarak duyarlı bir tayin yöntemi geliştirmektir. Bu amaç doğrultusunda kalibrasyon çalışmalarına başlamadan önce hem AdsKDV hem de AdsDPV tekniklerinde, biriktirme potansiyeli değerleri, her bir madde için uygun biriktirme potansiyeli DPV ve KDönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir. Benzer şekilde, en uygun biriktirme süresini belirlemek amacıyla, belirlenmiş olan en uygun ortam şartlarında, biriktirme süresi 0 – 300 s aralığında değiştirilmiş olup; her bir maddenin en iyi pik şekline ve en yüksek pik akımına sahip olduğu biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi belirlenmiştir.

3.8.1.3 Kalibrasyon çalışmaları

Uygun koşullarda DPV, KDV, AdsDPV ve AdsKDV yöntemleri yardımıyla, söz konusu ilaç etken maddelerinin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin akım değerleri okunmuş ve elde edilen akım değerleri ilgili ilacın derişimine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

3.8.1.4 Girişim yapan türlerin etkisi

Destek elektrolit ve ilgili ilaç etken maddesini içeren ortama, ilaç etken madde derişiminin 100 katı olacak şekilde girişim etkisi incelenecek olan türün bölüm 3.4.9’da bahsedildiği şekilde hazırlanan çözeltilerinden ilave edilmiştir. Daha sonra DPV, KDV, AdsDPV ve AdsKDV yöntemleri ile akımlar, girişim etkisi incelenen tür eklenmeden önce ve eklendikten sonra en az 3’er kez okunarak kaydedilmiş ve akımlar karşılaştırılarak % Akım Farkı (Δi_p) değerleri her bir tür için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Bölüm 4.2).

3.8.1.5 DNA ile etkileşim çalışmalarının yapılışı

DNA etkileşim çalışmaları 2 farklı fizyolojik pH değerlerinde yürütülmüştür. Bu amaçla pH 4,8’de asetat tampon çözeltisi ve pH 7,4’de fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Her iki ortamda da her bir ilaç etken maddesinin pikinin net olarak gözleendiği bir derişim değerinde (yaklaşık olarak 10^{-5} M) çözeltileri hazırlanmıştır. Bu ortama bölüm 3.4.8’de anlatıldığı şekilde hazırlanan stok DNA çözeltisinden DNA derişimi 1,0; 3,0; 5,0; 15,0; 25,0; 35,0; 45,0; 60,0 ve 75,0 ppm olacak şekilde eklemeler yapılmıştır. Her bir ekleme sonrasında DPV yöntemi ile voltamogramlar kaydedilmiş ve en az üçer kez tekrarlanmıştır.

3.8.1.5 Elektrotların tekrar üretilebilirlik ve ömür çalışmalarının yapılışı

Her bir madde için geliştirilmiş olan modifiye eletrotların tekrar üretilebilirliklerinin tayin edilmesi amacıyla aynı şekilde 5 farklı modifiye elektrot hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrotlar ilgili ilaç etken maddesinin belli derişimdeki çözeltisine daldırılarak geliştirilmiş olan yöntemlerle akımları her bir elektrot için en az beş kez okunmuş ve elde edilen akım verileri değerlendirilmiştir.

Her bir modifiye elektrodun ömrünün tayin edilmesi amacıyla ise, bir defa hazırlanmış olan modifiye elektrot birer hafta ara ile aynı derişimde ilaç etken maddesini içeren

çözelti ortamına daldırılarak geliştirilmiş olan yöntemlerle akım değerleri en az 10 kez tekrarlanarak kaydedilmiştir.

3.8.2 Empedans ölçümlerinin yapılışı

Çizelge 3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan modifiye karbon pasta elektrotların EIS ölçümleri, 5,0 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ ve 0,1 M KCl içeren ortama referans, karşıt ve her bir modifiye elektrot ayrı ayrı daldırıldıktan sonra frekans $1,0 - 10^5$ aralığında değiştirilmiştir. Başlangıç potansiyeli olarak her bir elektrot için ölçülen açık devre potansiyeli ve 0,005 V genlik uygulanarak ölçümler kaydedilmiştir.

3.9 Taramalı Elektron Mikroskobu Ölçümlerinin Yapılışı

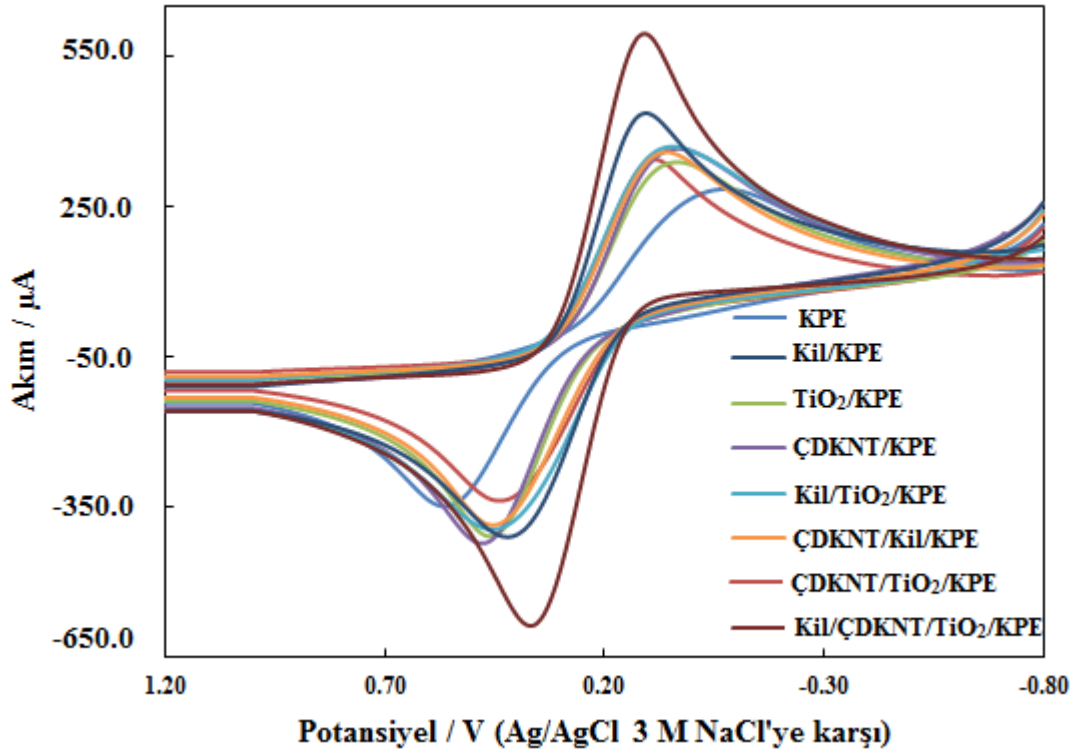
Analizin hemen öncesinde, çizelge 3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan 7 modifiye ve yalın karbon pasta elektrodun SEM görüntüleri Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü’nde bulunan ZEISS EVO marka cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Her bir elektrot için hazırlanmış olan pastalar cihazının numune bölmesine ayrı ayrı koyularak 200 nm’lik kesitler 30000 KX büyütme ile görüntüler kaydedilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Modifiye KPE’lerin Yüzey Morfolojilerinin DV, EIS ve SEM ile incelenmesi

Bölüm 3.4’de anlatıldığı şekilde kil, TiO_2 naoparçacıkları ve ÇDKNT’ler kullanılarak hazırlanmış olan 7 farklı modifiye karbon pasta elektrodun (Kil/KPE, TiO_2 /KPE, ÇDKNT/KPE, Kil/ÇDKNT/KPE, TiO_2 /ÇDKNT/KPE, Kil/ TiO_2 /KPE ve Kil/ÇDKNT/ TiO_2 /KPE) ve yalın karbon pasta (KPE) elektrodun yüzey özellikleri incelenmiştir. Hazırlanmış olan modifiye karbon pasta elektrotların yüzey alanlarının hesaplanması ve DV sinyallerinin incelenmesi amacıyla, standart bir redoks probu olan 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ /0,1 M KCl çözelti ortamına daldırılan elektrotların 50 mV/s tarama hızında DV yöntemiyle voltamogramları (-0,2 V) - (+1,2 V) potansiyel aralığında

kaydedilmiştir (Şekil 4.1). Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrodunun diğer elektrotlara göre hem anodik hem katodik yöndeki akımının yüksek olması bu elektrot yüzeyindeki elektron transfer hızının da yüksek olduğunu göstermektedir (Bard ve Faulkner 2001). Ayrıca i_p^k/i_p^a oranının 1,0’e yakın olması da elektron transfer hızının ve bu elektrot yüzeyindeki tersinirliğin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca katodik pik potansiyeli ile anodik pik potansiyeli arasındaki farkın (ΔE_p) KPE’de 0,48 V iken Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE 0,26 V olduğu dikkat çekmektedir. Bu sonuç da yine, Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE’nin yüzeyinde tersinirliğin ve elektron aktarım hızının daha yüksek olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1 Modifiye KPE’ların 5,0 mM K₄Fe(CN)₆^{3-/4-}/0,1 M KCl çözelti ortamında kaydedilmiş dönüşümlü voltamogramları (v : 0,050 V/s)

50,0 mV/s’de elde edilen DV sonuçlarına göre Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE’un akım değerlerinin yüksek olması sebebiyle, yine 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-}/0,1 M KCl çözelti ortamında 9 farklı düşük tarama hızlarında (5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 75,0 ve 100,0 mV/s) dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiş, her bir tarama hızındaki akım

değerleri ve Randles - Sevcik (Eşitlik 2.2) eşitliği ile tüm modifiye ve yalın karbon pasta elektrot için yüzey alanları (A) hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4-}$ türleri için $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, $n=1,0$ olarak alınmıştır).

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere KPE’un yüzey alanı 0,066 iken, modifiye edilmiş tüm KPE’ların yüzey alanları KPE’ye göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE’un yüzey alanının KPE’a göre yaklaşık olarak 2 kat daha yüksek olduğu görülmektedir. Çizelge 4.2’de dikkat çeken diğer bir modifiye elektrot ise Kil/KPE’dir. Bu elektroda bakıldığında KPE’a göre yüzey alanının yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla olduğu görülmektedir.

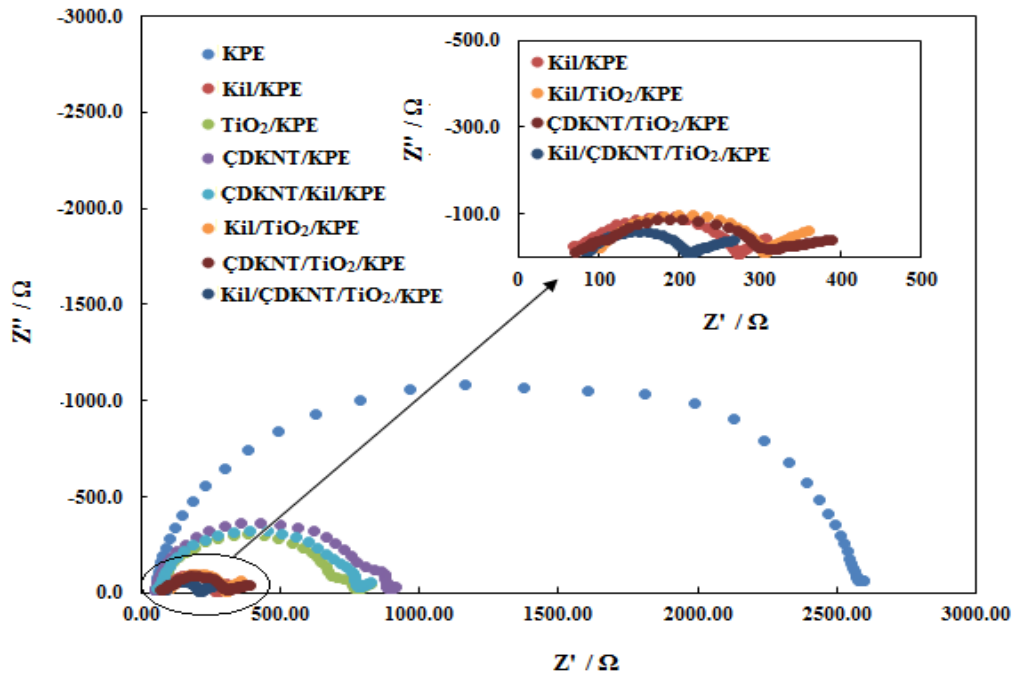
Çizelge 4.1 Modifiye KPE’lerin 5,0 mM K₄Fe(CN)₆^{3-/4-}/0,1 M KCl çözelti ortamındaki elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

Elektrot	E_p^a / V	E_p^k / V	$\Delta E_p / \text{V}$	$i_p^a / \mu\text{A}$	$i_p^k / \mu\text{A}$	i_p^k / i_p^a
KPE	0,558	0,078	0,48	311,8	283,1	0,91
Kil/KPE	0,409	0,104	0,30	376,2	342,9	0,91
TiO ₂ /KPE	0,479	0,047	0,43	380,5	337,8	0,89
ÇDKNT/KPE	0,459	0,017	0,44	422,1	365,7	0,87
Kil/TiO ₂ /KPE	0,443	0,041	0,40	373,7	366,1	0,98
Kil/ÇDKNT/KPE	0,494	0,071	0,42	344,8	360,9	1,05
TiO ₂ /ÇDKNT/KPE	0,429	0,086	0,34	310,2	338,1	1,09
Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	0,367	0,108	0,26	421,5	451,6	1,07

Çizelge 4.2 KPE ve Modifiye KPE’lerin 5,0 mM K₄Fe(CN)₆^{3-/4-}/0,1 M KCl çözelti ortamında DV yöntemi ile hesaplanan ortalama yüzey alanı değerleri

Elektrot	Yüzey Alanı (A), cm ²
KPE	0,066 (±0,0012)
Kil/KPE	0,090 (±0,0004)
TiO ₂ /KPE	0,068 (±0,0006)
ÇDKNT/KPE	0,072 (±0,0040)
Kil/TiO ₂ /KPE	0,081 (±0,0017)
Kil/ÇDKNT/KPE	0,076 (±0,0021)
ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	0,083 (±0,0031)
Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	0,112 (±0,0033)

DV yöntemi ile elde edilen sonuçları desteklemek amacıyla KPE, Kıl/KPE, TiO_2/KPE , ÇDKNT/KPE , Kıl/ ÇDKNT/KPE , $\text{TiO}_2/\text{ÇDKNT/KPE}$, Kıl/ TiO_2/KPE ve Kıl/ $\text{ÇDKNT/TiO}_2/\text{KPE}$ yüzeyleri farklı bir elektrokimyasal yöntem olan EIS ile incelenmiştir. Bölüm 3.8.2’de anlatıldığı gibi her bir modifiye KPE ve KPE’un Nyquist eğrileri kaydedilmiştir (Şekil 4.2). Nyquist eğrilerinde, yüksek frekanslarda kaydedilmiş olan yarım dairenin çapının artması elektrot yüzeyindeki elektron aktarm hızının yavaş, çapın azalması ise yüzeydeki elektron aktarım hızının yüksek olduğunu göstermektedir (Wang 2006). Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, KPE’un yarım daire çapının diğer elektrotlara göre çok yüksek olduğu, KPE modifiye edildikçe bu çapın bariz bir şekilde küçüldüğü görülmektedir. Şekil 4.2 A’da ise 4 farklı modifiye elektroda ait Nyquist eğrileri görülmektedir. Buna göre, Kıl/ $\text{ÇDKNT/TiO}_2/\text{KPE}$ ’da yarım daire çapının bu elektrotlar arasında en düşük olduğu dikkat çekmektedir. Bu sonuçlara göre de Kıl/ $\text{ÇDKNT/TiO}_2/\text{KPE}$ yüzeyinin direncinin düşük ve buna bağlı olarak da iletkenliğinin daha yüksek olduğu yorumu yapılabilir.



Şekil 4.2 Modifiye KPE’ların 5,0 mM $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ /0,1 M KCl çözelti ortamındaki Nyquist diyagramları

(Frekans aralığı 1,0 - 10^5 Hz)

4.1.1 Modifiye elektrotların SEM ile incelenmesi

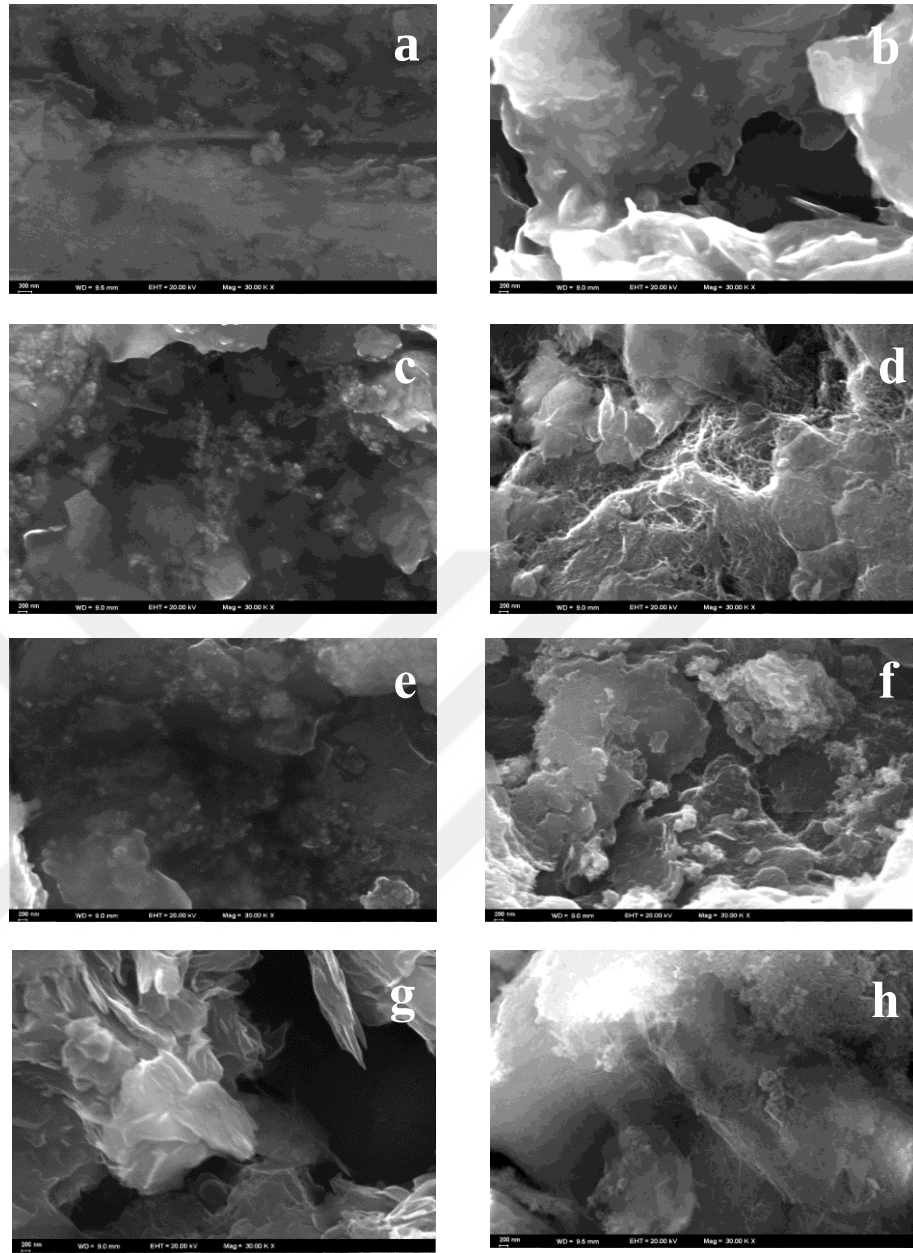
Modifiye KPE'ların yüzey morfolojileri hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla her bir elektrot yüzeyinin Taramalı elektron mikroskobu tekniği ile yüzey görüntüleri farklı kesitlerde alınmıştır. Ancak modifiyer olarak kullanılan nanoparçacıkların boyutlarının 100 nm'den küçük olması sebebiyle 200 nm'de alınmış olan SEM görüntüleri kullanılmıştır. Şekil 4.3 A'daki görüntüye bakıldığında yalın karbon pasta elektrodun yüzeyinin diğer modifiye karbon pasta elektrotlara nazaran daha düz bir yapıda olduğu görülmektedir. KPE, kil ile modifiye edildiğinde ise elektrot yüzeyinde sepiyolit kilinin bulunmasından kaynaklanan ve yaklaşık olarak 2,0 - 3,0 μm çapındaki boşlukların olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.3 B) (Eskiköy Bayraktepe vd. 2016). Yüzeye diğer modifiyer maddelerin (TiO_2 nanoparçacıkları ve ÇDKNT'ler) girmesi ile KPE'un yüzeyinin değiştiği ve daha düzensiz bir hal aldığı dikkat çekmektedir. Son olarak yüzeyin TiO_2 nanoparçacıkları, kil ve ÇDKNT ile modifiye edilmesi ile elde edilmiş olan 3 bileşenli elektroda ait SEM fotoğrafında ise sepiyolit kilinde bulunan boşlukların olduğu dikkat çekmektedir.

DV, EIS ve SEM sonuçlarına göre Kil/ÇDKNT/ TiO_2 /KPE'un en uygun elektrot olduğu sonucuna varılmıştır. Bundan sonraki kısımda öncelikle kinon - hidrokinon grubuna sahip olan etken maddelerin elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. Sonrasında ise modifiye KPE ve karşılaştırmak amacıyla KPE yüzeylerinde voltametrik yöntem geliştirme çalışmaları yapılmıştır.

4.2 Şikonin (ŞKN) ile İlgili Yapılan Voltametrik Çalışmalar

4.2.1. ŞKN'in elektrokimyasal davranışının DV ile incelenmesi

ŞKN'nin elektrokimyasal davranışı bölüm 4.1'de elektrokimyasal özellikleri incelenmiş olan Kil/KPE, Kil/ÇDKNT/ TiO_2 /KPE ve KPE elektrot yüzeylerinde pH 2,5 (0,2 M H_2SO_4) ortamında incelenmiştir. Bu amaçla -0,6 ile 1,0 V'luk potansiyel aralığında ve sadece 0,1 V/s tarama hızında $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN'in votamogramları kaydedilmiştir.



Şekil 4.3.a. KPE, b. Kıl/KPE c. TiO_2/KPE , d. $\text{ÇDKNT}/\text{KPE}$ e. $\text{Kıl}/\text{TiO}_2/\text{KPE}$ f. $\text{ÇDKNT}/\text{TiO}_2/\text{KPE}$ g. $\text{Kıl}/\text{ÇDKNT}/\text{KPE}$ h. $\text{Kıl}/\text{ÇDKNT}/\text{TiO}_2/\text{KPE}$ elektrotlarına ait SEM fotoğrafları (200 nm)

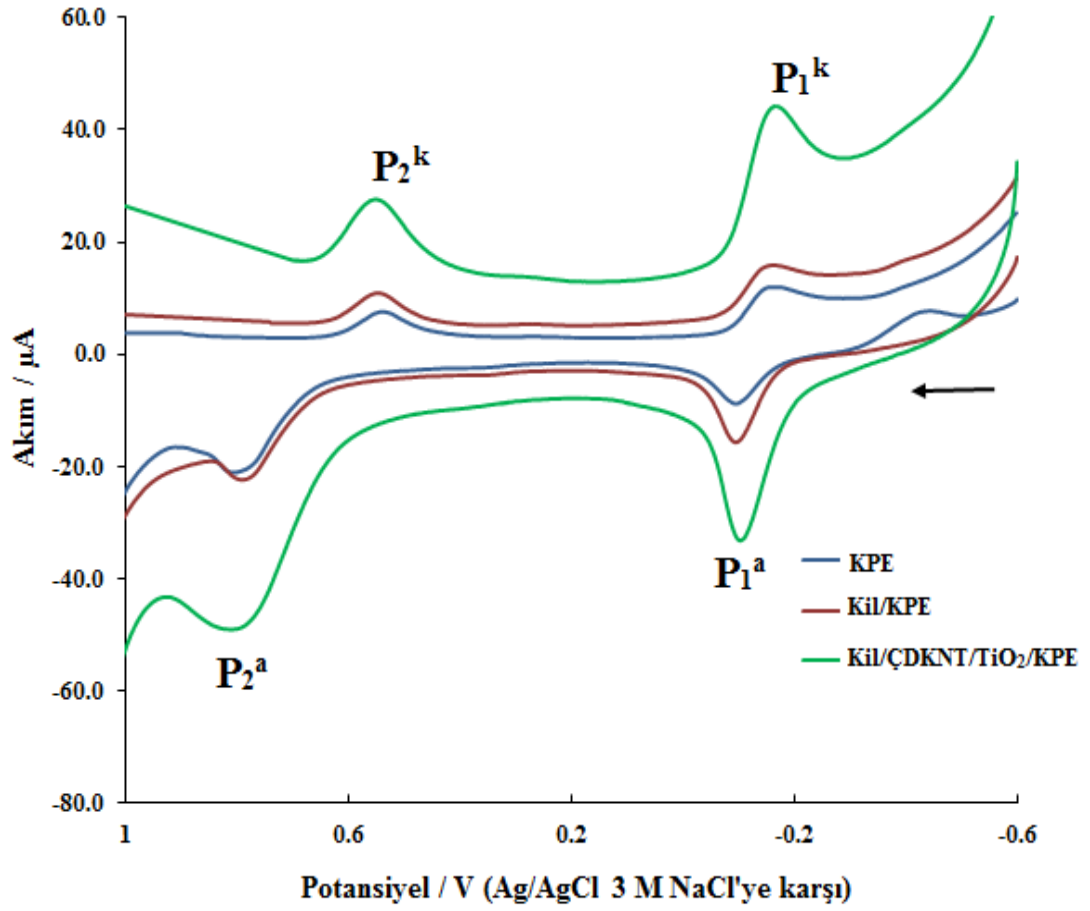
Şekil 4.4’de görüldüğü gibi, ŞKN’in yükseltgenmesine ait yaklaşık olarak -0,1 V’da birinci yükseltgenme piki (P_1^a) ve yaklaşık olarak 0,7 V civarında ikinci yükseltgenme piki (P_2^a), geri potansiyel taramasında ise (1,0 ile -0,6 V) bu yükseltgenme piklerine ait 2 adet indirgenme pikine rastlanmıştır. Bu piklere ait akım, potansiyel, ΔE_p ve i_p^k/i_p^a değerleri çizelge 4.3’de verilmiştir. Şekil 4.4 ve çizelge 4.3’e göre ŞKN’ye ait her iki

pikin pik akımlarının en yüksek Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde elde edildiği görülmektedir. Ayrıca bu elektrot yüzeyindeki ΔE_p ve i_p^k/i_p^a değerleri incelendiğinde ŞKN'ye ait her iki pikin de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyindeki tersinirliğinin, elektron aktarım hızının Kil/KPE ve KPE'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE'un ŞKN'ye ait her iki pik için de en uygun elektrot olduğunu söylemek mümkündür.

P₁ ve P₂'ye bakıldığında ise, P₁'in P₂'ye göre daha tersinir ve daha kesin bir pik şekline sahip olduğu da yine şekil 4.4 ve çizelge 4.3'e bakarak söylenebilir. Bu nedenle bundan sonraki kısımlarda yapılan yöntem geliştirme ve en uygun şartların belirlenmesi çalışmaları P₁ üzerinden yürütülmüştür.

En uygun modifiye elektrodun 3 bileşenli olması sebebiyle, ŞKN'in elektrokimyasal yükseltgenme piki üzerine elektrot bileşiminin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla modifiyerlerin herbirinin bileşim yüzdesi %3,0 (1,0 mg/30,0 mg pasta) ile %13,0 (4,0 mg/30,0 mg pasta) arasında değiştirilmiştir (Navratilova vd. 2002, Uslu vd. 2007). Her bir bileşenin yüzde miktarları ise çizelge 4.4 - 4.6'da verilmiştir.

İlk olarak elektrot bileşenlerinden (diğerleri sabit tutulmak üzere) kilin miktarı değiştirilmiş ve her bir farklı kil miktarlarında $1,0 \times 10^{-5}$ M ŞKN içeren ortamda P₁'in Dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.5). Şekil 4.5 incelendiğinde ŞKN'in yükseltgenmesine ait pik akımının % 3,0 ile % 6,0 arasında çok hafif bir düşme, % 8,3'de ani bir artış ve %13'e doğru ise keskin bir azalış gösterdiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre 8,3 kilin en uygun miktar olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4 $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN'in Kıl/KPE, Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE ve KPE elektrotlarında kaydedilmiş Dönüşümlü voltamogramları (pH: 2,5, v : 0,1 V/s)

Çizelge 4.3 Modifiye KPE'lerin $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN çözelti ortamındaki elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

Pik	Elektrot	$i_p^k, \mu A$	$i_p^a, \mu A$	E_p^k, V	E_p^a, V	$\Delta E_p, V$	i_p^k/i_p^a
P₁	KPE	12,11	6,82	-0,165	-0,095	-0,07	1,78
	Kıl/KPE	11,90	8,68	-0,160	-0,095	-0,07	1,37
	Kıl/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	43,58	34,92	-0,167	-0,103	-0,06	1,25
P₂	KPE	7,38	20,57	0,536	0,801	-0,27	0,36
	Kıl/KPE	7,02	20,91	0,536	0,804	-0,27	0,34
	Kıl/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	27,74	49,30	0,551	0,799	-0,25	0,56

Çizelge 4.4 Kil miktarı optimizasyonunda her bir bileşenin % bileşim oranları

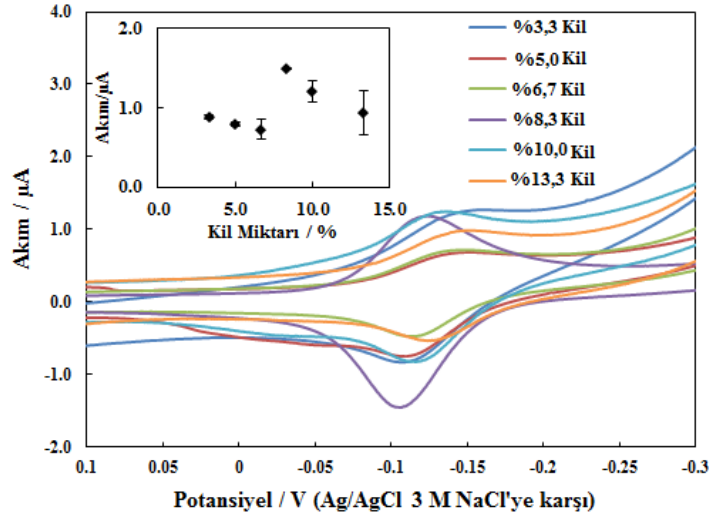
Grafit tozu, %	Kil, %	TiO ₂ , %	ÇDKNT, %
91,0	3,0	3,0	3,0
87,0	5,0	3,0	3,0
88,0	6,0	3,0	3,0
85,7	8,3	3,0	3,0
84,0	10,0	3,0	3,0
81,0	13,0	3,0	3,0

En uygun kil miktarı belirlendikten sonra, diğer bir bileşen olan TiO₂ nanoparçacıklarının miktarı da yine aynı bileşim aralığında değiştirilmiş olup elde edilen grafikler ve voltamogramlar şekil 4.6’da verilmiştir.

Şekil 4.6 iç grafikte görüldüğü gibi TiO₂’nin bileşimi % 3,0 olduğunda ŞKN’in yükseltgenme pik akımı yaklaşık 0,9 µA civarında iken, bileşim % 5,0 olduğunda akımın yaklaşık olarak 2 kat arttığı ve % 6,0 ile %13,0 aralığında ise pik akımında ani bir düşüşün olduğu dikkat çekmektedir. Elde edilen bu verilere göre en uygun TiO₂ miktarı % 5,0 olarak belirlenmiştir.

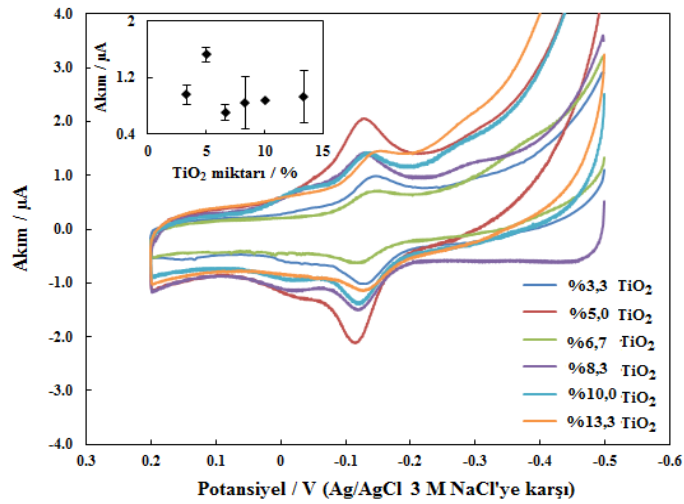
En uygun ÇDKNT miktarını belirlemek amacıyla ÇDKNT bileşimi % 1,7 ile % 13,0 arasında değiştirilerek modifiye elektrotlar hazırlanmış, diğer bileşenlerin oranları ise çizelge 4.6’da görüldüğü şekilde sabit tutulmuştur. Söz konusu modifiye elektrotlar kullanılarak yine $1,0 \times 10^{-5}$ ŞKN içeren ortamda Dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4,7). % 1,7 bileşim oranına sahip elektrot yüzeyinde ŞKN’in pik akımı çok düşük iken, %3,0’de akımda ani bir sıçrama gözlenmiştir. Diğer yüzde bileşimlere bakıldığında ise pik akımı düşmekte ve hemen hemen aynı değerlerde seyretmektedir. Sonuç olarak en uygun ÇDKNT miktarı % 3,0 olarak belirlenmiştir.

Böylece üç bileşenli elektrot olan Kil/ÇDKN/TiO₂/KPE'nin en uygun % bileşimi belirlenmiş ve bu oranlar çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.5 $1,0 \times 10^{-5}$ ŞKN içeren ortamda farklı kil yüzdelğinde elde edilen P₁'in DV voltamogramları

İç grafik: % Kil miktarı- i_p (pH: 2,5, 0,2 M H₂SO₄)

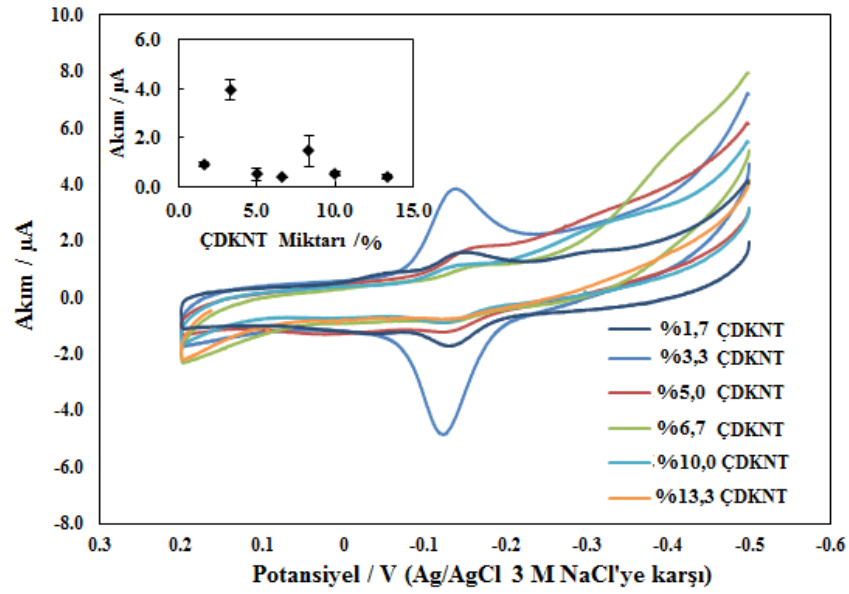


Şekil 4.6 $1,0 \times 10^{-5}$ ŞKN içeren ortamda farklı TiO₂ yüzdelğinde elde edilen P₁'in dönüşümlü voltamogramları

İç grafik: % TiO₂ miktarı- i_p (pH 2,5, 0,2 M H₂SO₄)

Çizelge 4.5 TiO₂ miktarı optimizasyonunda her bir elektrot bileşeninin % oranları

Grafite tozu, %	Kil, %	TiO ₂ , %	ÇDKNT, %
85,7	8,3	3,0	3,0
83,7	8,3	5,0	3,0
82,7	8,3	6,0	3,0
80,4	8,3	8,3	3,0
78,7	8,3	10,0	3,0
75,7	8,3	13,0	3,0



Şekil 4.7 $1,0 \times 10^{-5}$ ŞKN içeren ortamda farklı ÇDKNT yüzdelerinde elde edilen P₁'in dönüşümlü voltamogramları İç grafik: % ÇDKNT miktarı- i_p (pH 2,5, 0,2 M H₂SO₄)

Çizelge 4.6 ÇDKNT miktarı optimizasyonunda her bir bileşenin % bileşim oranları

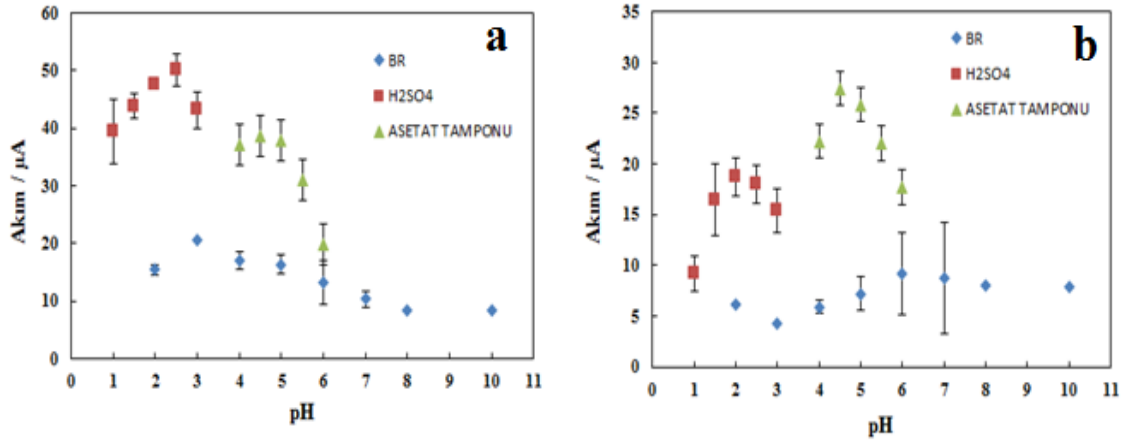
Grafit tozu, %	Kil, %	TiO ₂ , %	ÇDKNT, %
85,0	8,3	5,0	1,7
83,7	8,3	5,0	3,0
81,7	8,3	5,0	5,0
80,7	8,3	5,0	6,0
78,4	8,3	5,0	8,3
76,7	8,3	5,0	10,0
73,7	8,3	5,0	13,0

Çizelge 4.7 Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE için en uygun bileşim yüzdeleri

Grafit tozu, %	Kil, %	TiO ₂ , %	ÇDKNT, %
83,7	8,3	5,0	3,0

Bu amaçla ilk olarak geniş bir pH çalışma aralığına sahip olan (2,0 - 12,0) universal BR tamponu kullanılmış ve $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN'in 1,0'er pH birimi aralığında dönüşümlü voltamogramları kaydedilerek pik akımları okunmuştur (Şekil 4.8). Şekil 4.8'de görüldüğü gibi en yüksek pik akımı ve pik şekli dikkate alındığında P₁ yükseltgenme piki için pik akımında, pH 2,0'den 3,0'e bir yükselme, pH 3,0'den 8,0'e kadar ise düşme gözlenmiştir. BR tamponu çalışmaları ışığında yüksek akımların gözlemlendiği pH 2,0 ile 6,0 aralığında farklı bileşimde tamponlar hazırlanmıştır. pH 1,0-3,0 aralığında H₂SO₄ çözeltisi, pH 4,0 ile 6,0 aralığında ise asetat tamponu hazırlanmış, pH taraması yapılmış ve sonuçlar 4.8.a'da verilmiştir. BR ve asetat tamponuna göre, ŞKN'in birinci yükseltgenme piki (P₁) için en yüksek pik akımı H₂SO₄ ortamında elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre de ŞKN'ye ait P₁ için en uygun pH'ın H₂SO₄ ortamında 2,5 olduğu belirlenmiştir.

ŞKN'in ikinci yükseltgenme piki olan P₂ için de benzer çalışmalar yapılmış olup P₂ için en uygun destek elektrolitin asetat tamponu olduğu şekil 4.8.b'de görülmüş ve en uygun pH 4,5 olarak seçilmiştir (Şekil 4.8.b). En uygun destek elektrolit ortamlarında her iki pik için farklı pH değerlerinde elde edilen voltamogramlar ise şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.8 A. $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN'in farklı elektrolit ortamlarında pH- i_p grafikleri

a. ŞKN'ye ait 1. yükseltgenme piki (P₁) b. ŞKN'ye ait 2. yükseltgenme piki (P₂)

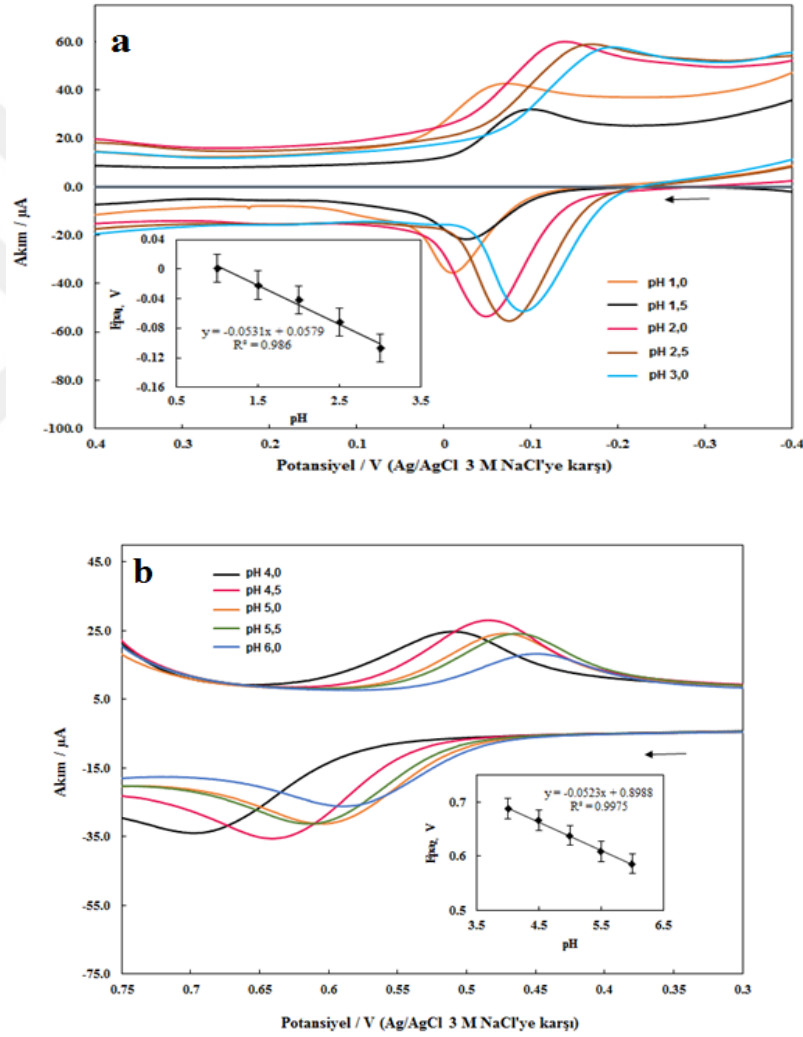
4.2.3 Tarama hızı çalışması

ŞKN'ye ait olan P₁ ve P₂ pikleri için en uygun elektrolit ve pH değerleri belirlendikten sonra her iki pik için de DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında yapılan çalışmalar yardımıyla ŞKN'in Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde elektrokimyasal davranışı (tersinirlik, yarı tersinirlik, tersinmezlik ve adsorpsiyon özellikleri) ayrıntılı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre de ŞKN'ye ait elektrot yükseltgenme mekanizması önerilmiştir. Bu çalışmalar için $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN içeren ortamda 0,005-0,300 V/s aralığında tarama hızı çalışması yapılmıştır. Bu aralıkta P₁ ve P₂ yükseltgenme pikleri için kaydedilmiş olan voltamogramlar sırasıyla şekil 4.10 – 4.11'de verilmiştir. Bu voltamogramlardan elde edilen elektrokimyasal değişkenler çizelge 4.8 - 4.9'da sunulmuştur.

Çizelgeden, ŞKN'in birinci yükseltgenme pikinin (P₁) anodik pik potansiyelinin daha pozitif değerlere kaydığı katodik pik potansiyeli ise daha negatif değerlere kaydığı

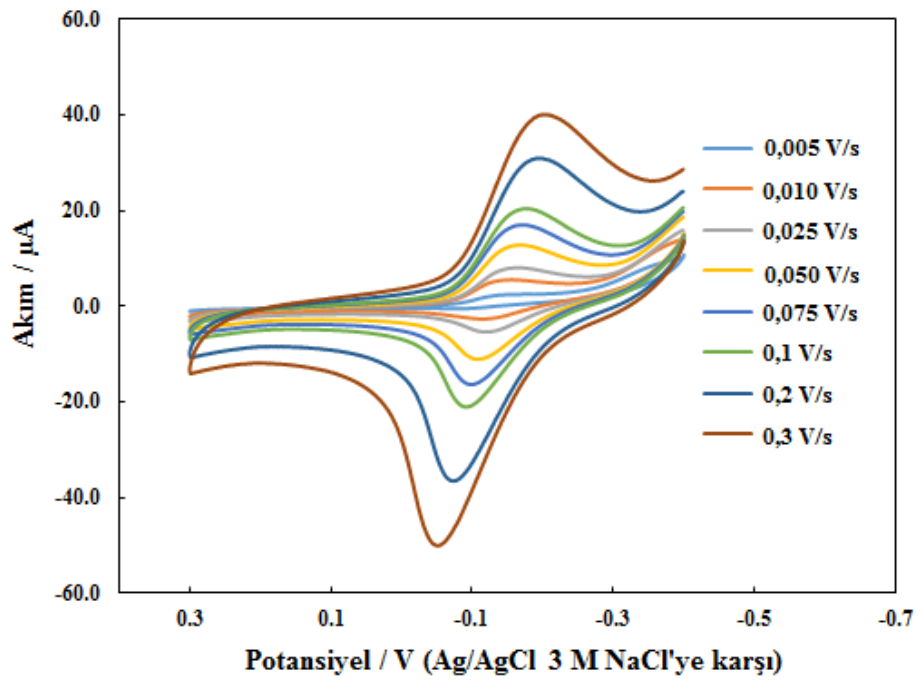
görülmektedir. Bu, pik potansiyelleri arasındaki farkın (ΔE_p) tarama hızıyla değişmesine, i_p^k/i_p^a oranı ise, tarama hızıyla sabit kalmasına sebep olmaktadır (Şekil 4.10, Çizelge 4.8).

Benzer şekilde, ŞKN'ye ait ikinci yükseltgenme piki olan P₂'nin tarama hızı ile değişimi incelendiğinde P₁ ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.11, Çizelge 4.9). Elde edilen bu sonuçlara göre ŞKN'ye ait olan her iki yükseltgenme pikinin de yarı tersinir bir redoks davranışı gösterdiği söylenebilir.

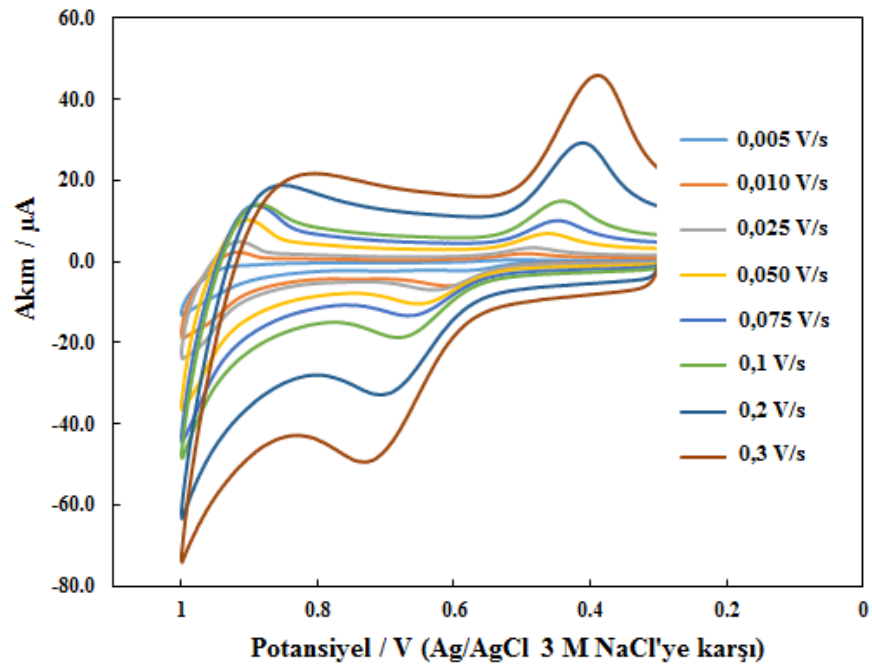


Şekil 4.9 $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN'in H_2SO_4 ortamında farklı pH'lardaki dönüşümlü voltamogramları

a. ŞKN'ye ait birinci yükseltgenme piki (P₁) b. ŞKN'ye ait ikinci yükseltgenme piki (P₂) (v : 0,1 V/s)



Şekil 4.10 $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN ortamında P_1 'in DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları (pH 2,5)



Şekil 4.11 $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN ortamında P_2 'nin DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları (pH 4,5)

Çizelge 4.8 ŞKN'in birinci yükseltgenme piki olan P₂'in tarama hızı değişimi ile elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

Tarama hızı, V/s	E_p^a , V	E_p^k , V	ΔE_p , V	i_p^a , μ A	i_p^k , μ A	i_p^k/i_p^a
0,005	-0,093	-0,135	0,04	0,51	2,15	4,21
0,010	-0,121	-0,156	0,04	3,06	4,82	1,58
0,025	-0,123	-0,164	0,04	5,38	6,98	1,30
0,050	-0,111	-0,168	0,06	10,46	11,19	1,07
0,075	-0,102	-0,172	0,07	15,07	14,78	0,98
0,100	-0,094	-0,175	0,08	18,95	17,59	0,93
0,200	-0,074	-0,196	0,12	30,72	25,86	0,84
0,300	-0,053	-0,203	0,15	39,75	33,02	0,83

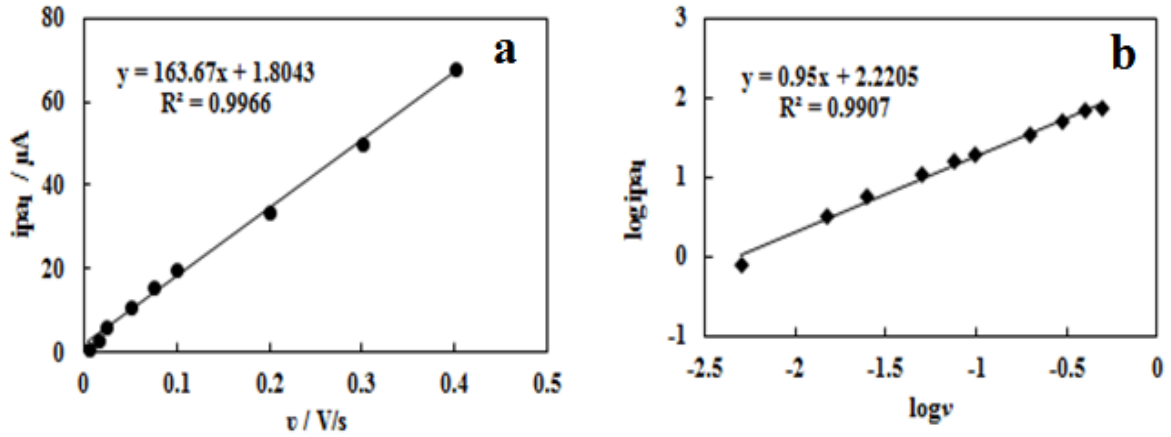
Çizelge 4.9 ŞKN'in ikinci yükseltgenme piki olan P₂'in tarama hızı değişimi ile elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

Tarama hızı, V/s	E_p^a , V	E_p^k , V	ΔE_p , V	i_p^a , μ A	i_p^k , μ A	i_p^k/i_p^a
0,005	0,575	0,511	0,06	0,95	0,7739	0,82
0,010	0,602	0,492	0,11	3,39	1,554	0,46
0,025	0,625	0,484	0,14	4,00	2,230	0,56
0,050	0,645	0,462	0,18	5,31	3,965	0,75
0,075	0,657	0,446	0,21	6,16	5,568	0,90
0,100	0,672	0,440	0,23	8,65	9,074	1,05
0,200	0,691	0,412	0,28	13,60	18,21	1,34
0,300	0,714	0,389	0,32	19,96	29,85	1,50

ŞKN'in modifiye elektrot (Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE) yüzeyine taşınmasının adsorpsiyon ve/veya difüzyon ile olup olmadığı, DV ile yine aynı aralıkta (0,005 - 0,300 V/s) yapılan tarama hızı çalışmaları ile elde edilen pik akımlarının tarama hızıyla değişim grafikleri ($i_p - v$ ve $\log i_p - \log v$) çizilerek incelenmiştir. İlk olarak ŞKN'in birinci yükseltgenme pikinin (P_1) tarama hızı ile değişiminden elde edilmiş olan $i_p - v$ ve $\log i_p - \log v$ grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.12). Şekil 4.12.a'dan da görüleceği üzere pik akımın tarama hızı ile doğrusal olarak değişmesi maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olabileceğini düşündürmektedir (Wang vd. 2006, Bayraktepe vd. 2016). Bu davranışı desteklemek amacıyla pik akımının logaritması ve tarama hızının logaritması ($\log i_p - \log v$) grafiği çizilmiş olup bu grafikten elde edilen eğimin 0,95 civarında olduğu görülmektedir (Şekil 4.12.b). $\log i_p - \log v$ grafiğinden elde edilen eğim değeri teorik olarak 0,5 ile 1,0 aralığında değişmektedir. Eğimin 1,0'e yakın olması maddenin elektrot yüzeyine adsorpsiyon ile taşındığını göstermektedir (Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006, Taşdemir 2011). Elde edilen bu sonuçlar ise ŞKN'ye ait olan P_1 'in adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucunu desteklemektedir.

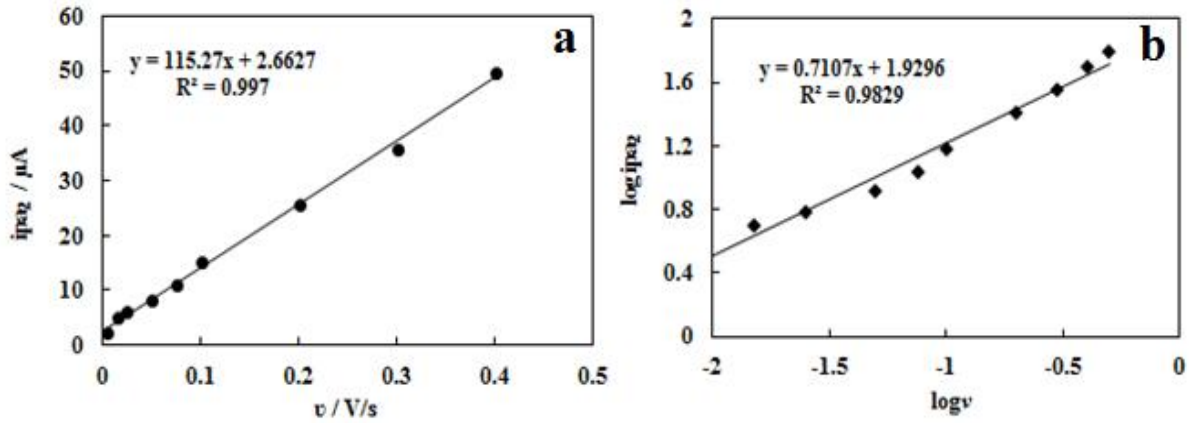
Benzer şekilde P_2 için de aynı şekilde yapılan tarama hızı verilerinden elde edilen $i_p - v$ ve $\log i_p - \log v$ grafikleri Şekil 4.13.a,b'de verilmiştir. Şekil 4.13.a'dan da görüleceği üzere pik akımın tarama hızı ile doğrusal olarak değişmesi maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olabileceğini düşündürmektedir. Bu davranışı desteklemek amacıyla $\log i_p - \log v$ grafiği çizilmiş olup bu grafikten elde edilen eğimin 0,71 civarında olduğu görülmektedir (Şekil 4.13.b). Elde edilen bu sonuçlar ise ŞKN'ye ait olan P_2 'nin de adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucunu desteklemektedir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde P_1 in P_2 'ye göre yüzeye daha fazla adsorbe olduğunu söylemek mümkündür.

Adsorpsiyon kontrollü olduğu belirlenen P_1 ve P_2 piklerinin yükseltgenme mekanizmasında aktarılan elektron sayısının belirlenmesi amacıyla adsorpsiyon şartlarında geçerli olan Laviron eşitliği (Eşitlik 2.9) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mekanizmalarda yer alan elektron sayıları sırasıyla P_1 için $1,96 \pm 0,46$ P_2 için ise $2,19 \pm 0,60$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12 $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN'in birinci yükseltgenme pikinin tarama hızı çalışmasında elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri

v : 0,0050 - 0,300 V/s



Şekil 4.13 $1,0 \times 10^{-4}$ M ŞKN'in ikinci yükseltgenme pikinin tarama hızı çalışmasında elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri

(v : 0,0050 - 0,300 V/s)

Elektron sayısı belirlendikten sonra ŞKN'in yükseltgenme mekanizmasında yer alan proton sayısının belirlenmesi amacıyla şekil 4.9.a,b'de iç grafiklerde verilen $pH - E_p$ grafiklerinden elde edilen doğru denklemi her iki pik için sırasıyla şu şekildedir;

$$P_1 \text{ için; } E_p = -0,0531pH + 0,0579$$

$$P_2 \text{ için; } E_p = -0,0523pH + 0,8988$$

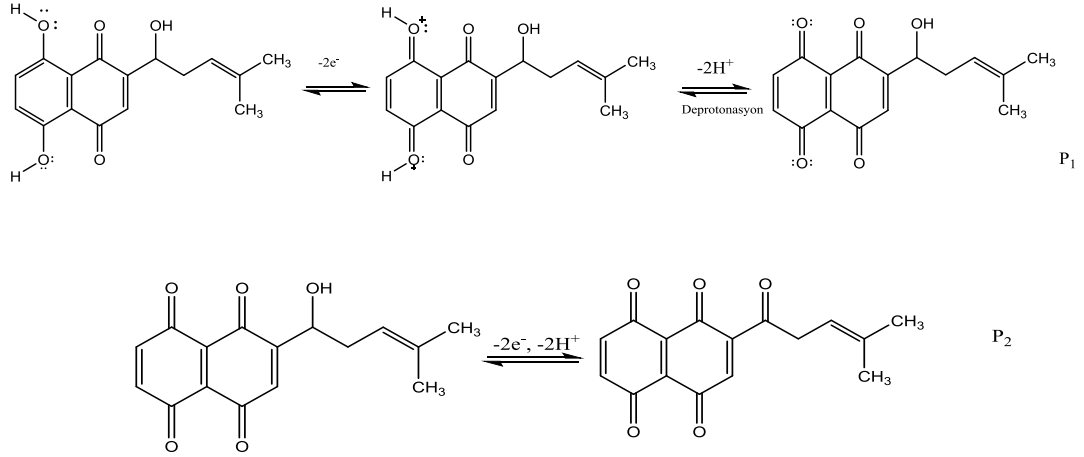
Bu doğru denklemlerinin eğimlerine bakıldığında, P_1 için 53,1 mV/pH, P_2 için ise 52,3 mV/pH olduğu görülmektedir. Bu değerler teorik Nerstian değeri olan 59 mV/pH değerine oldukça yakındır. Bu sonuç ise, ŞKN'in her iki pikine ait redoks mekanizmasında aktarılan proton sayısı ve elektron sayısının birbirine eşit olduğunun göstergesi olarak yorumlanmıştır (David vd. 2016, Bayraktepe vd. 2016, Honeychurch vd. 2016). Bu veriler ışığında, ŞKN'in her iki yükseltgenme piki için de aktarılan elektron sayısı ve proton sayısının $2e^-/2H^+$ (asidik ortam) söylenebilir.

Buraya kadar yapılan çalışmalar sonucunda -0,2 V ve +0,7 V'da iki yükseltgenme olduğu belirtilmişti. Daha negatif potansiyelde gözlenen P_1 'in ŞKN'in yapısında bulunan hidrokinon $\rightleftharpoons$ kinon dönüşümüne ait olduğu düşünülmüştür. Çünkü yapılan literatür araştırmaları, kinon/hidrokinon yapısının alifatik alkol grubuna göre daha düşük potansiyellerde yani daha kolay yükseltgendiğini göstermektedir (Casella vd. 1993, Zheng vd. 2010). Buna göre ŞKN'in yapısında bulunan hidrokinon $2e^-$ vererek hızlı bir şekilde kinon yapısına dönüşmekte ve sonrasında $2H^+$ 'un yapıdan uzaklaştığı düşünülmüştür. Daha önce söylendiği gibi ŞKN'ye ait daha pozitif potansiyelde (0,7 V) gözlenen P_2 yükseltgenme pikinin ise, alifatik hidroksil grubunun yapıda yer alan alifatik alkol grubunun $2e^-$ ve $2H^+$ ile ketona yükseltgenmesinden kaynaklandığı söylenebilir (Şekil 4.14).

4.2.4 ŞKN'nin AdsKDV ve AdsDPV ile tayini

Yukarıda ŞKN için yapılmış olan elektrokimyasal davranış ve mekanizma belirleme çalışmaları neticesinde iki adet yarı tersinir yükseltgenme pikine rastlanmıştır. Söz konusu maddenin tayini için yöntem geliştirmek amacıyla birinci yükseltgenme piki (P_1) seçilmiştir. Bunun sebepleri şu şekilde açıklanabilir:

- P_2 ile kıyaslandığında optimize edilmiş ortam şartlarında elektrot yüzeyine adsorbe olabilme özelliği daha yüksektir.



Şekil 4.14 ŞKN moleküllerinin Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde gerçekleşen yükseltgenme tepkimesi için önerilen yükseltgenme mekanizmaları

- P₂'ye göre yine optimize edilmiş ortam şartlarında daha yüksek pik akımına ve daha belirgin pik şekline sahiptir.
- P₁'in yükselttiği potansiyel değerinde (yaklaşık olarak -0,1 V) yükseltgenme özelliği bulunan askorbik asit, ürik asit gibi moleküllerin girişim yapması gibi bir durum söz konusu değildir. Ancak P₂'nin yükselttiği potansiyelde (0,6 - 0,7 V) söz konusu türlerin girişim yapması kaçınılmazdır.

Tüm bu sebepler değerlendirildiğinde, yöntem geliştirme çalışmalarının P₁ yükseltgenme piki üzerinden yürütülmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE ve karşılaştırmak amacıyla KPE yüzeyinde hem AdsKDV hem de AdsDPV yöntemleri geliştirilmiştir. H₂SO₄ ortamı ve pH 2,5'da yöntem değişkenlerinin optimizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kalibrasyon grafikleri çizilmiş olup idrar ve serum örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

4.2.4.1 AdsKDV yöntemi için en uygun değişkenlerinin bulunması

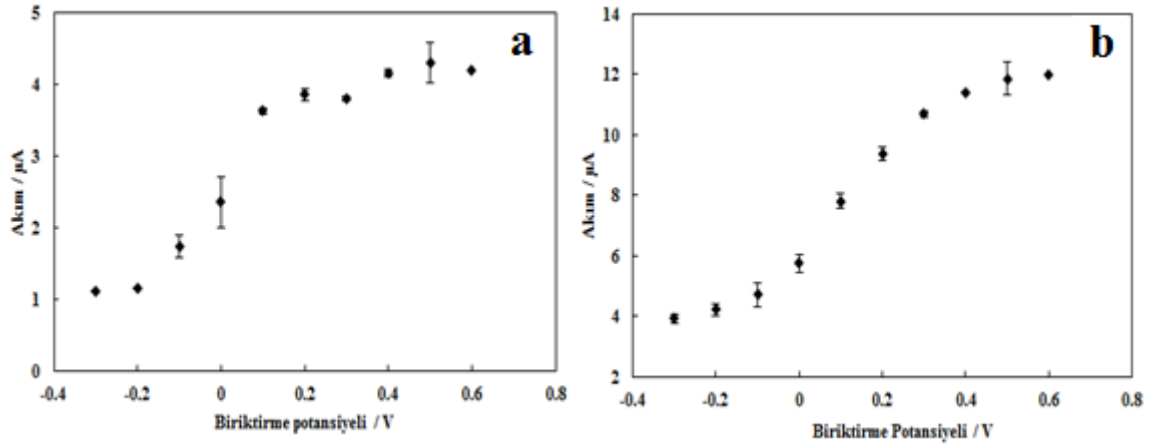
Adsopritif sıyırma yöntemi geliştirmede sıyırma ve adsorpsiyonu etkileyen değişkenler biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresidir. Bu amaçla her iki yöntem için en uygun değişkenler aşağıda verilmiştir.

En uygun biriktirme potansiyelinin araştırılması

ŞKN tayini için AdsKDV yöntemi geliştirmek amacıyla hem KPE hem de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrotları yüzeyinde en uygun biriktirme potansiyelini tespit etmek için çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla daha önceden belirlenmiş olan uygun ortam şartlarında $1,0 \times 10^{-6}$ M ŞKN çözeltisi hazırlanmış, 15,0 s'de sabit tutulan biriktirme süresinde, biriktirme potansiyeli -0,3 ile 0,6 V değerleri arasında 0,1'er V'luk artışlarla değiştirilmiştir. Şekil 4.15.a'da KPE Şekil 4.15 B'de ise Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeylerinde değiştirilen biriktirme potansiyeline karşı akımın değişimi verilmiştir. Her bir potansiyelde akımlar üçer kez okunarak ortalama değerler elde edilmiştir. Şekil 4.15.a'da görüldüğü gibi biriktirme potansiyeli -0,3 V ve -0,2 V değerlerinde sabit olup -0,1 V'dan 0,1 V'a kadar artış göstermiştir. 0,1 V ile 0,6 V değerleri arasında çok fazla artış göstermemiş olup en yüksek akım değeri 0,5 V'da elde edilmiştir. Bu nedenle KPE yüzeyinde AdsKDV yöntemi geliştirmek amacıyla en uygun biriktirme potansiyeli 0,5 V olarak belirlenmiştir. Şekil 4.15.b incelendiğinde ise ŞKN'in akım değerleri -0,3 ile -0,1 V değerleri arasında sabit kalmış olup 0,1 - 0,4 V aralığında artış göstermiş ve bu değerden sonra hemen hemen sabit kalmıştır. Bu nedenle Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde de biriktirme potansiyeli 0,5 V olarak seçilmiştir.

En uygun biriktirme süresinin araştırılması

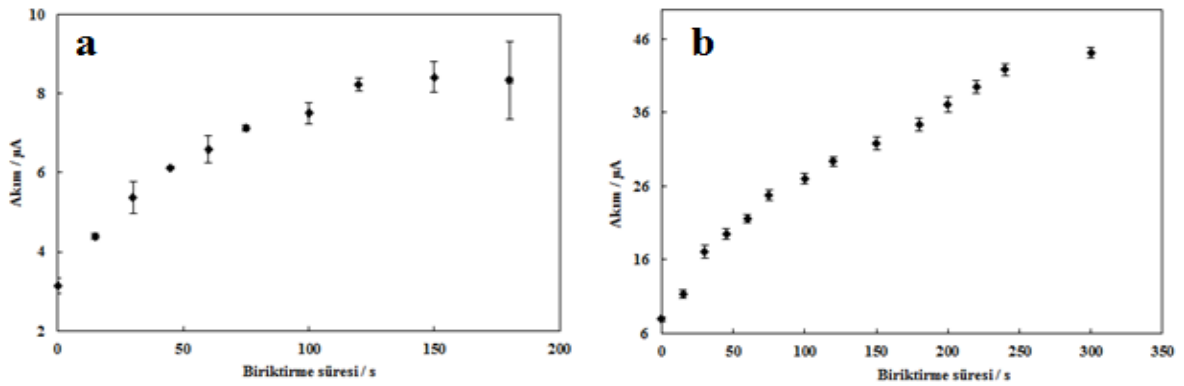
Optimize edilmiş olan biriktirme potansiyeli, uygun ortam şartları ve $1,0 \times 10^{-6}$ M ŞKN içeren ortamda, AdsKDV yöntemi geliştirmek amacıyla biriktirme süresi her iki elektrot yüzeyinde de 0,0 ile 180 s aralığında değiştirilmiştir.



Şekil 4.15 1,0 × 10⁻⁶ M ŞKN'in biriktirme potansiyeli-akım grafikleri

a.KPE b. Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE (0,2 M H₂SO₄ ortamı pH 2,5, biriktirme süresi 15 s, AdsKDV)

Şekil 4.16.a'ya göre KPE yüzeyinde ŞKN'in akımı 0,0 ile 120 s aralığında artış göstermiştir. 120 s ile 180 s arasında neredeyse doygunluğa ulaşmıştır. Bu nedenle 120 s en uygun biriktirme süresi olarak belirlenmiştir. Şekil 4.16.b'de ise Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde aynı ortam şartlarında biriktirme süresi 0,0 - 300 s aralığında değiştirilmiştir. Değiştirilen biriktirme süresine karşı akım 240 s değerine kadar sürekli bir artış göstermiş olup 240 ile 300 s değerlerinde ise doygunluğa ulaşmıştır. Bu nedenle 240 s Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE için en uygun biriktirme süresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16 1,0 × 10⁻⁶ M ŞKN'in biriktirme süresi-akım grafikleri

a. KPE b. Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE (0,2 M H₂SO₄ ortamı pH: 2,5, AdsKDV)

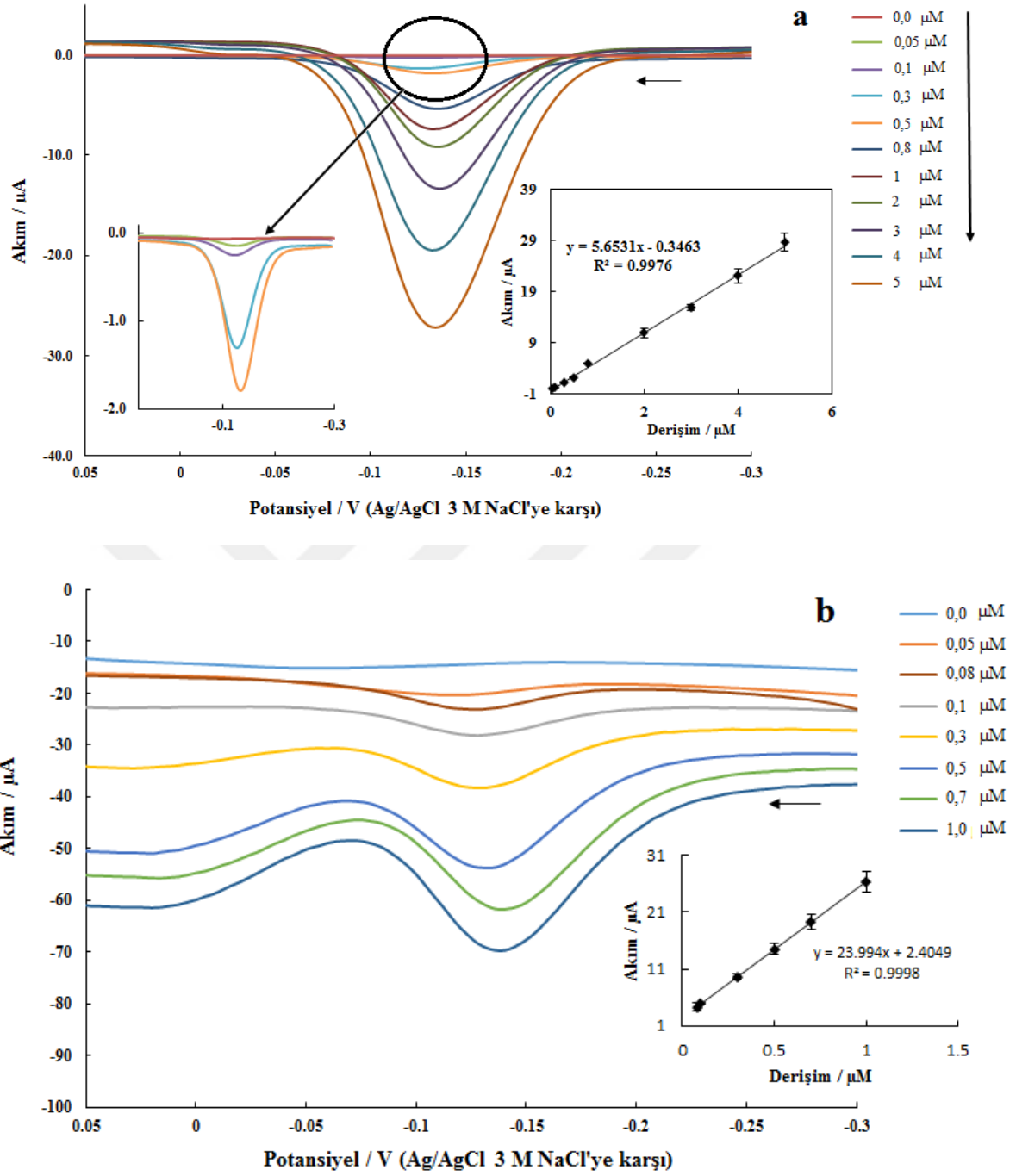
AdsKDV yöntemi ile kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Belirlenmiş olan en uygun ortam şartları, biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi değerleri kullanılarak AdsKDV yönteminde ŞKN derişimi $1,0 \times 10^{-9}$ ile $1,0 \times 10^{-5}$ M aralığında değiştirilmiş ve elde edilen akımlar ŞKN derişimine karşı grafiğe geçirilerek hem yalın KPE hem de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeylerinde kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Voltamogramlar ve kalibrasyon grafikleri Şekil 4.17.a ve 4.17.b’de verilmiştir.

4.2.4.2 AdsDPV için yöntem değişkenlerinin optimizasyonu

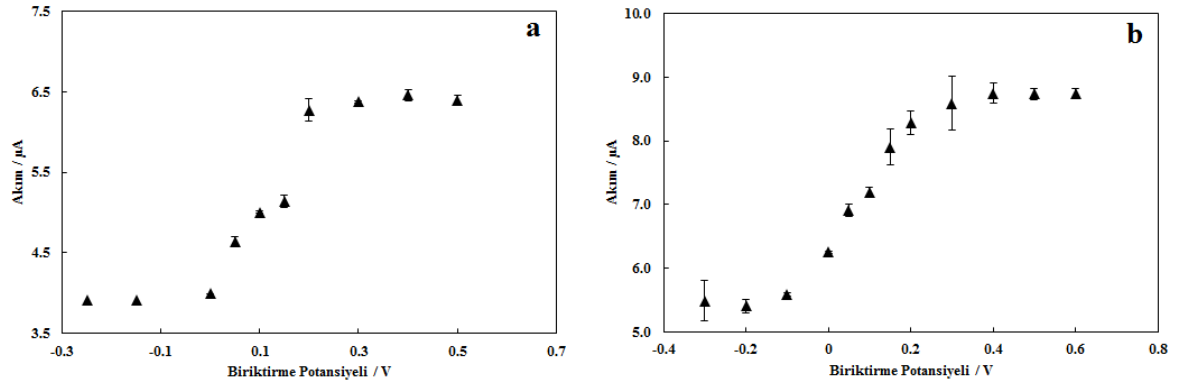
En uygun biriktirme potansiyelinin optimizasyonu

ŞKN tayini için AdsDPV yöntemi geliştirmek için, hem KPE hem de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrotları yüzeyinde biriktirme potansiyeli değişkeni optimize edilmiştir. Bu amaçla, belirlenmiş olan en uygun ortam şartlarında $1,0 \times 10^{-6}$ M ŞKN çözeltisi hazırlanmış olup 15,0 s’de sabit tutulan biriktirme süresinde, biriktirme potansiyeli -0,2 ile 0,6 V değerleri arasında 0,1 V arttırılarak değiştirilmiştir. Şekil 4.18.a’da KPE Şekil 4.18.b’de ise Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeylerinde değiştirilen biriktirme potansiyeline karşı akım değişimi verilmektedir. Şekil 4.18.a’ya bakıldığında, pik akımı biriktirme potansiyeli -0,3 ile 0,0 V aralığında hemen hemen sabit iken 0,0 V’dan 0,2 V’a kadar artış göstermiştir ve bu değerden sonra akım sabit kalmıştır. Bu nedenle KPE yüzeyinde AdsDPV yöntemi geliştirmek amacıyla en uygun biriktirme potansiyeli olarak 0,3 V seçilmiştir. Şekil 4.18.b incelendiğinde ise ŞKN’in akım değerleri -0,3 ile -0,1 V değerleri arasında sabit kalmış olup 0,1 - 0,3 V aralığında artış göstermiş sonrasında hemen hemen sabit kalmıştır. Bu nedenle Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde en uygun biriktirme potansiyeli 0,4 V olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17 ŞKN'in farklı derişimlerdeki AdsKDV voltamogramları

a. KPE b. Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE (iç grafik: kalibrasyon grafiği)



Şekil 4.18 $1,0 \times 10^{-6}$ M ŞKN'in biriktirme potansiyeli-akım grafikleri

a.KPE b. Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE (0,2 M H₂SO₄ ortamı pH 2,5, biriktirme süresi 15 s, AdsDPV)

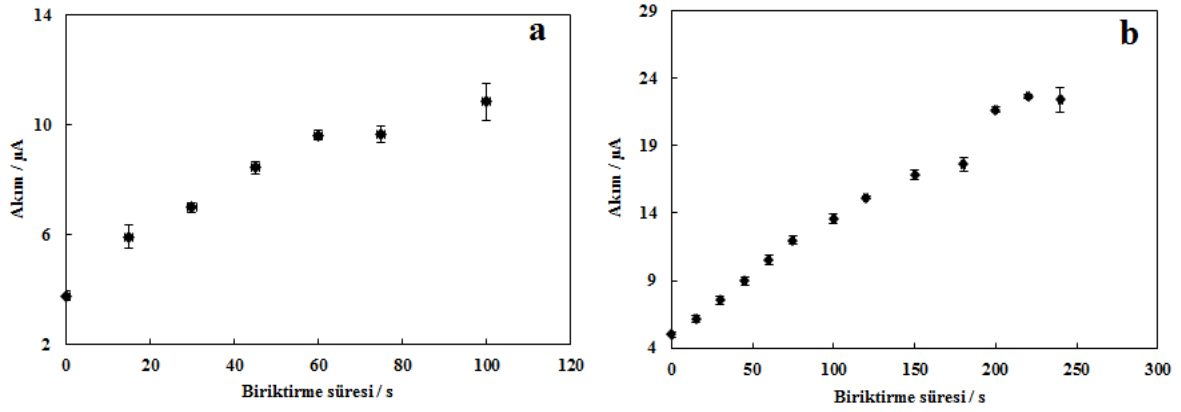
En uygun biriktirme süresinin optimizasyonu

En uygun biriktirme potansiyeli, uygun ortam şartları ve $1,0 \times 10^{-6}$ M ŞKN içeren ortamda, AdsDPV yöntemi geliştirmek amacıyla biriktirme süresi her iki elektrot yüzeyinde de 0,0 ile 100 s aralığında değiştirilmiştir. Şekil 4.19.a'ya bakıldığında KPE yüzeyinde ŞKN'in akımı 0,0 ile 60,0 s aralığında artış göstermiş ve sonrasında yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Bu nedenle KPE yüzeyinde 60,0 s AdsDPV yöntemi için en uygun biriktirme süresi olarak belirlenmiştir. Şekil 4.19.b'de ise Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde aynı ortam şartlarında 0,0 – 300 s aralığında değiştirilen biriktirme süresine karşılık akım değerleri grafiğe geçirilmiş ve akım 200,0 s değerine kadar sürekli bir artış göstermiş, 200 ile 240 s değerlerinde ise hemen hemen sabit kalmıştır. Bu nedenle Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyine en uygun biriktirme süresi 220 s olarak belirlenmiştir.

AdsDPV yöntemi ile kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Belirlenmiş olan en uygun ortam şartları, biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi değerleri kullanılarak AdsDPV yönteminde ŞKN derişimi $1,0 \times 10^{-9}$ ile $1,0 \times 10^{-5}$ aralığında değiştirilmiş ve elde edilen akımlar ŞKN derişimine karşı grafiğe geçirilerek

hem yalın KPE hem de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeylerinde kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Voltamogramlar ve kalibrasyon grafikleri Şekil 4.20.a,b’de verilmiştir.



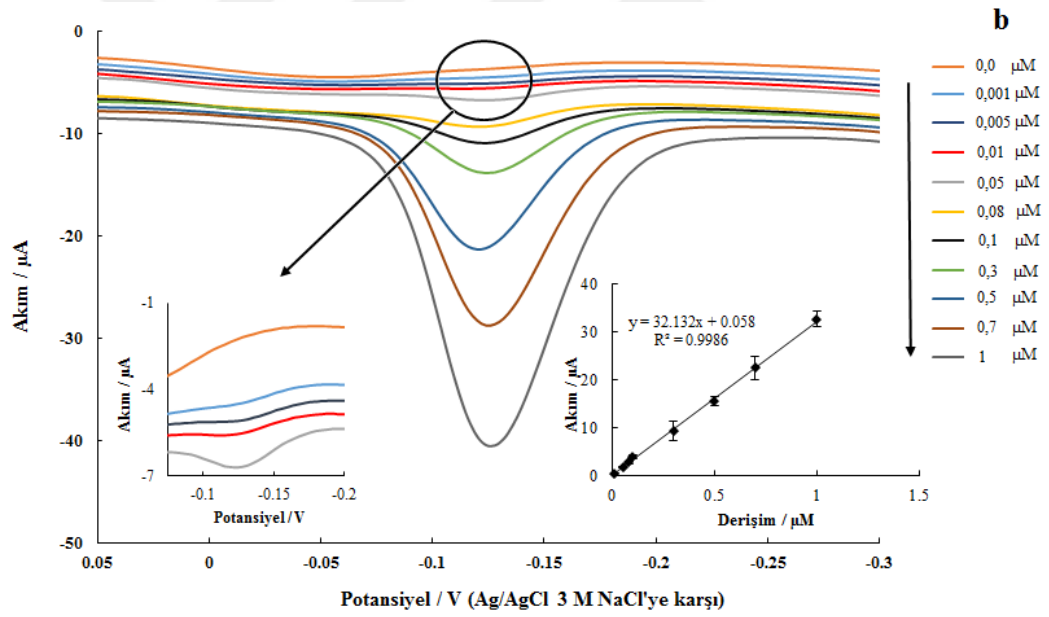
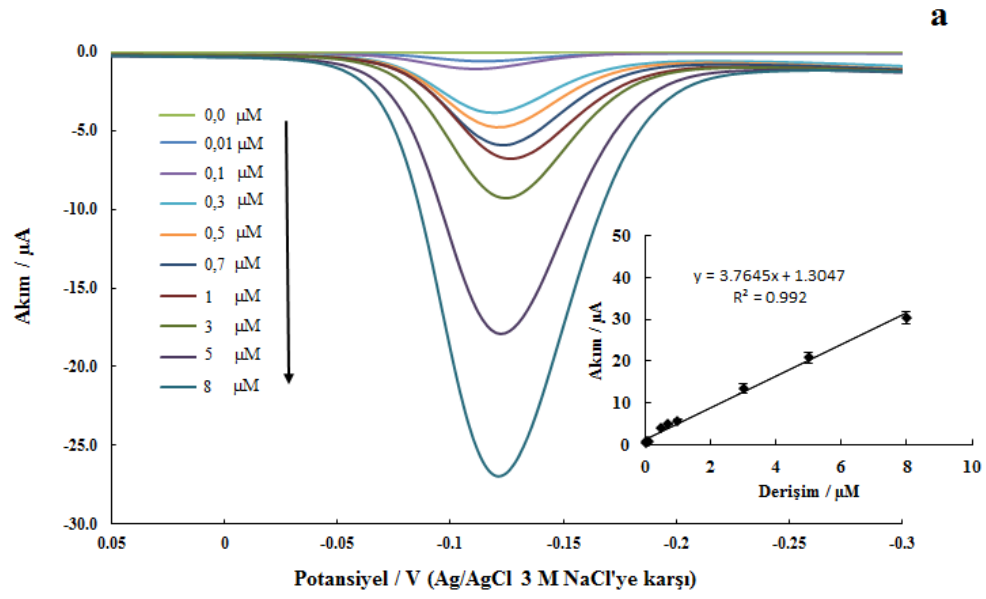
Şekil 4.19 1,0 × 10⁻⁶ M ŞKN'in biriktirme süresi-akım grafikleri

a. KPE b. Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE (0,2 M H₂SO₄ ortamı pH: 2,5, AdsDPV)

Her iki elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsKDV ve AdsDPV yöntemlerinin regresyon değişkenleri Çizelge 4.10'da sunulmuştur.

ŞKN için hem KPE hem de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrot yüzeylerinde yapılan sıyırma voltametrisi yöntemi geliştirme çalışmalarında, şekil 4.17, 4.20 ve çizelge 4.10'da görüleceği üzere;

- ŞKN derişimi arttıkça pik akımlarının hem KPE hem de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde doğrusal olarak değiştiği görülmüştür.
- Doğrusal çalışma aralığının regresyon katsayısının her iki elektrot ve her iki yöntem için de 0,99'dan büyük olduğu görülmektedir. Bu durum her iki yöntemin de doğrusallığının yüksek olduğunu göstermektedir.
- Her iki elektrot ve her iki yöntemde elde edilen pik akımı ve pik potansiyellerinin tekrarlanabilirlik değerleri %10'luk BSS değerinden küçük olduğundan dolayı her iki yöntemin de tekrarlanabilirliklerinin iyi olduğu söylenebilir (Penalver vd. 2002).



Şekil 4.20 ŞKN'in farklı derişimlerdeki AdsDPV voltamogramları

A. KPE B. Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE (iç grafik: kalibrasyon grafiği)

Çizelge 4.10 KPE ve Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrotları yüzeyinde geliştirilen yöntemlerin regresyon değişkenleri

Regresyon değişkeni	KPE		Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	
	<u>AdsKDV</u>	<u>AdsDPV</u>	<u>AdsKDV</u>	<u>AdsDPV</u>
Pik potansiyeli, V	-0,132	-0,112	-0,128	-0,124
Doğrusal çalışma aralığı, nM	27,45 - 5000	19,00–8000	1,30–1000	0,44–1000
Kalibrasyon eğrisinin eğimi, $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	5,65	3,76	23,99	32,13
Kalibrasyon eğrisinin kesim noktası, μA	0,35	1,30	2,40	0,058
Gözlenebilme sınırı (LOD), nM	8,20	5,70	0,39	0,13
Tayin sınırı (LOQ), nM	27,45	19,00	1,30	0,44
Regresyon katsayısı (R^2)	0,9976	0,9920	0,9998	0,9986
Gün içi akım tekrarlanabilirliği (%BSS)	3,14	1,87	4,94	5,31
Gün içi potansiyel tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,65	2,04	2,45	1,08
Günler arası akım tekrarlanabilirliği (%BSS)	4,99	3,44	5,94	7,76
Günler arası potansiyel tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,71	2,48	2,48	1,64

- ŞKN için KPE yüzeyine geliştirilen bu iki yöntemin doğrusal çalışma aralığı sırasıyla AdsKDV için 27,45 - 5000 nM, AdsDPV için ise 19,00–8000 nM'dır. Modifiye elektrot yüzeyinde ise bu çalışma aralıkları sırasıyla 1,3–1000 ve 0,44–1000 nM'dır. Bu sonuçlara göre modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilen AdsDPV yönteminin daha geniş bir doğrusal çalışma aralığına sahip olduğu belirlenmiştir.
- Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilen AdsDPV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğiminin (32,13 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$) geliştirilen diğer yöntemlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuca göre modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsDPV yönteminin daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Eşitlik 4.1 ve 4.2 ve kalibrasyon eğrilerinin eğimleri yardımıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (Pandit vd. 2015). Hesaplanan değerler çizelge 4.10'da görülmektedir. Bu sonuçlara göre modifiye elektrot yüzeyinde

geliştirilen AdsDPV yönteminin diğer yöntemlere göre daha düşük gözlenebilme (0,13 nM) ve tayin (0,44 nM) sınırlarına sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

$$\begin{aligned} LOD \\ &= \frac{3s}{m} \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned} LOQ \\ &= \frac{10s}{m} \end{aligned} \quad (4.2)$$

m: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

s: Kalibrasyon eğrisinin doğrusal çalışma aralığında yer alan ve en düşük derişime yakın bir derişimde elde edilen akımların standart sapması

Çizelge 4.10’da yer alan regresyon değişkenlerinin yanı sıra geliştirilmiş olan Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE’unun ömrü ve tekrar üretilebilirliği de çalışılmıştır. Elektrodun kararlılığının belirlenmesi amacıyla hazırlanmış olan elektrodun $1,0 \times 10^{-7}$ M ŞKN içeren çözelti ortamında AdsDPV yöntemi ile her hafta akım değerleri en az 5 kez okunmuştur. Elde edilen ortalama akım değerlerine göre, 10 hafta sonunda ilk hafta okunan akım değerinin % 95,03 oranında korunduğu gözlenmiştir. Buna göre geliştirilmiş olan elektrodun en az 2 ay 10 gün kararlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE’unun tekrar üretilebilirliğinin tayin edilmesi amacıyla aynı bileşimde ve aynı şartlarda 5 farklı modifiye elektrot hazırlanmıştır. Elektrotların, $1,0 \times 10^{-7}$ M ŞKN içeren ortamdaki akımları AdsDPV yöntemiyle en az 5 defa okunmuştur. Her bir elektrot için okunan ortalama akım değerlerinin % BSS değeri 7,54 olarak bulunmuştur. Bu değerinin %10’dan küçük olması, geliştirilmiş olan yeni elektrodun tekrar üretilebilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

4.2.4.3 Girişim etkisi

ŞKN tayini için Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yardımıyla geliştirilmiş olan voltametrik yöntemlere, biyolojik ortamda bulunması muhtemel olan bazı türlerin girişim etkisi araştırılmıştır. Askorbik asit, ürik asit, dopamin, L-sistein, L-glutamik asit ve glikoz gibi elektroaktif özelliği bulunan türlerin girişim etkisi araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, ŞKN'in belli bir derişimde bulunduğu ortama girişim yapan türün derişimi ŞKN'in derişiminden 100 kat fazla olacak şekilde ilave edilmiş ve AdsDPV ile elde edilen pik akımları eşitlik 4.3 yardımıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 4.11'de sunulmuştur.

$$\Delta i_p = \frac{i_{\text{ŞKN}} - i_{\text{ŞKN(girişim yapan tür varken)}}}{i_{\text{ŞKN}}} \times 100 \quad (4.3)$$

Bu sonuçlara bakıldığında % Δi_p değerlerinin % 1,0 ile % 4,4 arasında değiştiği görülmektedir. Bu durum ise ortamda bulunan türlerin ŞKN tayinine girişim yapmadığını göstermektedir (Yan vd. 2015).

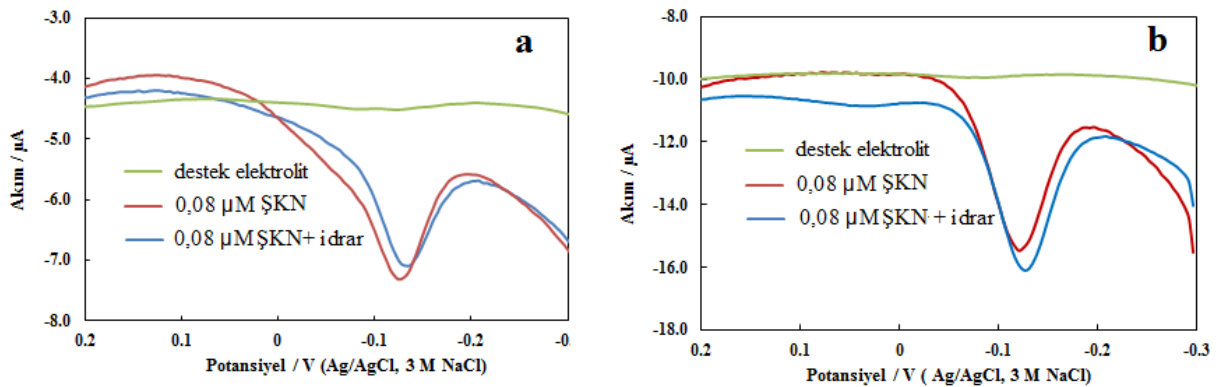
Çizelge 4.11 ŞKN'in AdsDPV ile tayinine girişim yapması muhtemel türlerin etkisi

Girişim yapabilecek tür	% Δi_p
Askorbik asit	4,41
Ürik asit	4,05
Dopamin	1,76
L-sistein	2,67
L-glutamik asit	1,42
Glikoz	3,75

4.2.4.4 Geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelere uygulamaları

Geliştirilen yöntemlerin kalibrasyon ve girişim çalışmalarından elde edilmiş olan sonuçlardan yola çıkarak (Bölüm 4.2.4.1, 4.2.4.2 ve 4.2.4.3), Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyi ve ilgili yöntemler yardımıyla ŞKN'nin idrar ve serum örneklerinde tayini gerçekleştirilmiştir. Henüz piyasada ŞKN içeren bir ilaç olmadığı için ilaç formülasyonlarında ŞKN tayini yapılamamıştır. İdrar ve serum örnekleri bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde analize hazırlanmıştır. Daha sonra ŞKN, ŞKN + idrar, ŞKN + serum ve destek elektrolit numunelerin voltamogramları, doğrusal çalışma aralığına denk gelecek şekilde farklı derişimlerde kaydedilmiş ve şekil 4.20-4.21'de verilmiştir.

Şekil 4.21'de idrar içeren ve içermeyen ortamda voltamogramları verilen ŞKN'in idrar ortamında, çizelge 4.12'de görüleceği üzere üç farklı derişimde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Buna göre AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri için hesaplanan ortalama geri kazanım değerlerinin % 100 civarında olduğu görülmektedir. (Çizelge 4.12) Bu sonuçlar, ŞKN için geliştirilen her iki yöntemin de idrar numunelerine başarıyla uygulandığını göstermektedir.



Şekil 4.21 ŞKN tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin idrar içeren ortamda ve idrar içermeyen ortamda kaydedilmiş olan voltamogramları

a. AdsDPV b. AdsKDV

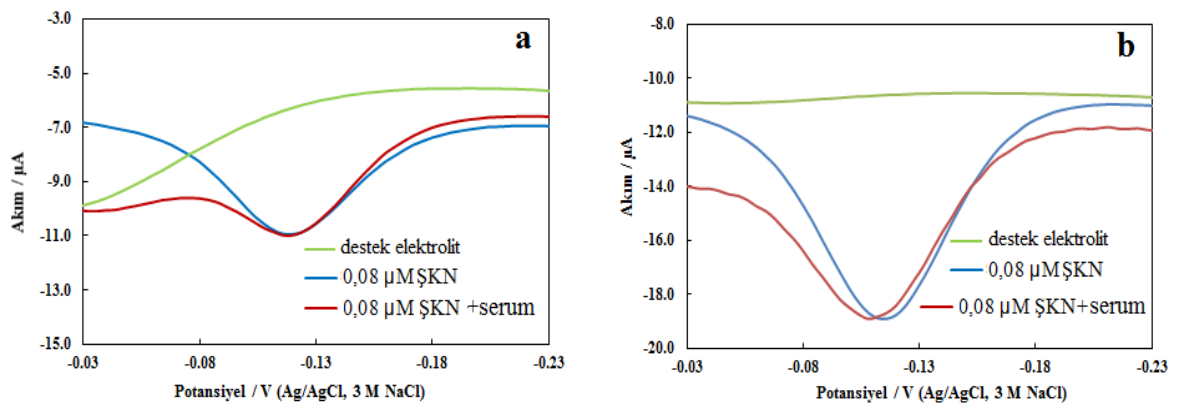
Serum numunelerinde de benzer şekilde 3 farklı derişimde geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar yaklaşık olarak %100 civarında bulunmuştur (Çizelge 4.13). Serum içeren ve serum içermeyen ortamlarda her iki yöntemle de kaydedilmiş olan voltamogramlar ise şekil 4.22’de verilmiştir. Bu sonuçlar, ŞKN için geliştirilen her iki yöntemin de serum numunelerine başarıyla uygulandığını göstermektedir.

Çizelge 4.12 AdsKDV ve AdsDPV yöntemlerinde idrar içeren ortamda ŞKN için yapılan geri kazanım verileri

Yöntem	Eklenen Derişim, μM	Bulunan Derişim, μM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
AdsKDV	0,030	0,026; 0,029; 0,027	90,00	4,76
	0,050	0,046; 0,050; 0,046	94,77	4,93
	0,080	0,078; 0,086; 0,075	99,57	7,00
AdsDPV	0,030	0,026; 0,030; 0,030	95,56	7,70
	0,050	0,049; 0,054; 0,055	105,33	6,43
	0,080	0,071; 0,078; 0,083	96,67	7,79

* Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**hesaplanmış olan geri kazanım değerleri için verilen bağıl standart sapma



Şekil 4.22 ŞKN tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin serum içeren ortamda ve serum içermeyen ortamda kaydedilmiş olan voltamogramları

A. AdsDPV B. AdsKDV

ŞKN tayini için Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsDPV ve AdsKDV yöntemleri, literatürde ŞKN için geliştirilmiş olan diğer voltametrik yöntemlerle çizelge 4.14’de karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.14’e bakıldığında ŞKN için geliştirmiş olduğumuz AdsDPV yönteminin diğer tüm voltametrik yöntemlere göre en düşük gözlenebilme sınırına sahip olduğu, AdsKDV yönteminin gözlenebilme sınırının ise birçok voltametrik çalışmaya göre daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.13 AdsKDV ve AdsDPV yöntemlerinde serum içeren ortamda ŞKN için yapılan geri kazanım verileri

Yöntem	Eklenen Derişim, µM	Bulunan Derişim, µM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
AdsKDV	0,030	0,032; 0,033; 0,033	109,29	1,98
	0,050	0,049; 0,045; 0,047	93,61	4,77
	0,080	0,081; 0,084; 0,086	104,73	3,40
AdsDPV	0,030	0,033; 0,032; 0,033	108,89	1,77
	0,050	0,045; 0,045; 0,046	90,67	1,27
	0,080	0,078; 0,085; 0,089	105,00	6,63

* Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**hesaplanmış olan geri kazanım değerleri için verilen bağıl standart sapma

4.2.5 ŞKN’in ds-DNA ile etkileşimin DV ve DPV yöntemleri ile incelenmesi

Şikonin’in DNA ile etkileşimi Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde iki fizyolojik pH olan 4,8 (Asetat tamponu) ve 7,4 (Fosfat tamponu) ortamlarında DPV ve DV yöntemleriyle ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

4.2.5.1 DPV yöntemi ile elde edilen bulgular

ŞKN-dsDNA etkileşiminin pH 4,8 ve 7,4’de incelenmesi

Bir antikanser ilacı olan ŞKN'in DNA ile etkileşiminin incelenmesi önemlidir. Bu etkileşimi çözelti ortamında incelemek amacıyla 5,0 µM ŞKN içeren ortamlara bölüm 3.4' de anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan stok DNA çözeltisinden belli derişimlerde (5,0; 10,0; 15,0; 25,0; 35,0; 45,0; 60,0; 75,0 ppm) eklemeler yapılmıştır.



Çizelge 4.14 ŞKN tayini için geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerin literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması

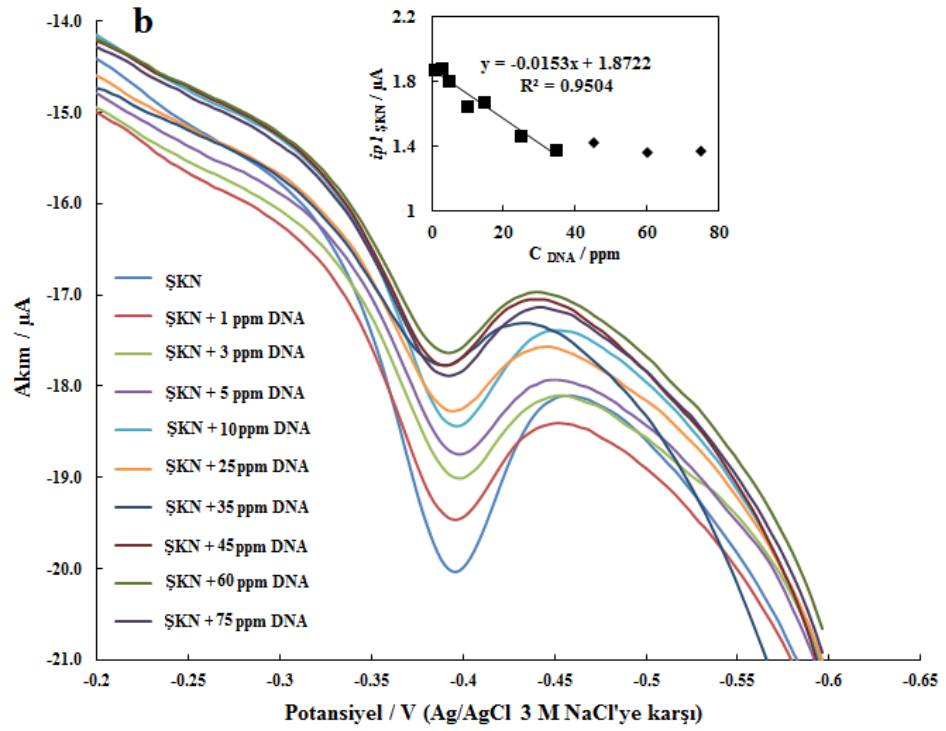
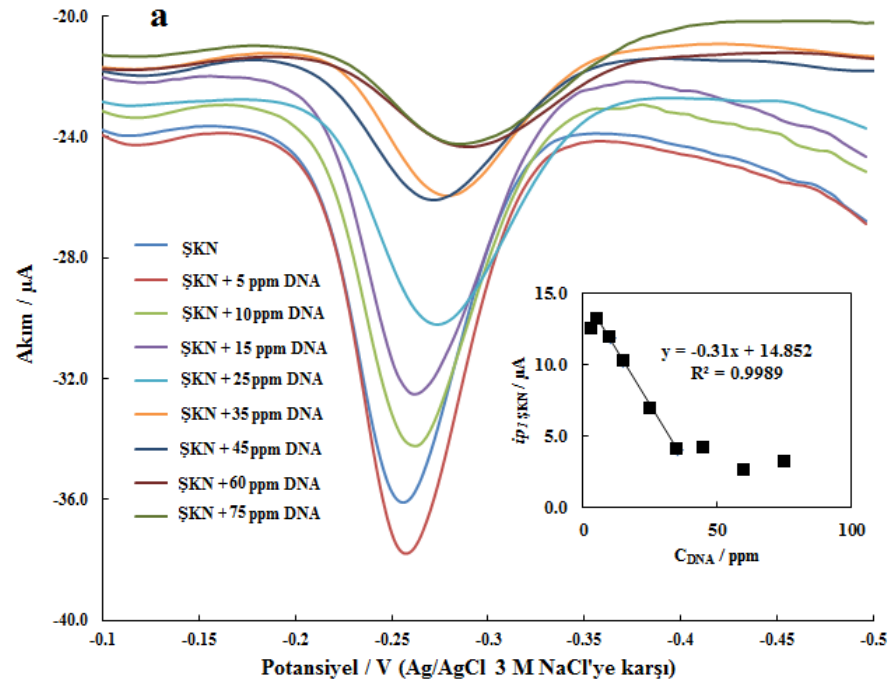
Elektrot	Yöntem	Doğrusal çalışma aralığı, nM	LOD, nM	Uygulaması	Kaynak
CKE	KDV	20,8 – 1820	7,80	Gromwell root (bitki)	Zhou vd. 2010
PEDOT – MeOH/CKE	DPV	1,0 – 10000	0,30	İdrar	Wu vd. 2013
PDDA-GS/CKE	DPV	94,7 – 3789	31,57	Lithospermum erythrorhizon (Bitki ekstraktı)	An vd. 2013
ÇDKNT/β-CD/CKE	DPV	50,0 – 10000	1,00	İdrar	Gao vd. 2015
PEDOT/β-CD/CKE	DPV	70,0 – 5000	2,30	Serum	Wu vd. 2015
Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	AdsDPV	0,44–1000	0,13	Serum ve idrar	Tez çalışması
	AdsKDV	13,00–1000	0,39		

ŞKN'nin pik potansiyeli ve akımındaki değişimler DPV yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlar ve grafikler şekil 4.23.a, b'de verilmiştir. Bu voltamogramların içerisindeki akım ve potansiyel değişimine ait grafikler incelendiğinde, 5,0 ile 35,0 ppm aralığında eklenen DNA derişimine paralel olarak ŞKN'in pik akımının her iki pH'da da doğrusal bir şekilde azaldığı ve DNA derişimi artmaya devam ettikçe okunan akım değerinin hemen hemen sabit kaldığı dikkat çekmektedir. Yine eklenen DNA derişimine karşı pik potansiyelindeki değişmeye bakıldığında, P₁'in pik potansiyelinin artan DNA derişimiyle bir miktar negatife kaydığı, 35,0 ppm DNA eklenmesinden sonra ise hemen hemen sabit kaldığı söylenebilir. Bu verilere göre ŞKN'nin her iki fizyolojik pH değerinde de DNA ile etkileşim içinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Yukarıda anlatıldığı üzere, ŞKN'in DNA derişimi ile her iki ortamda da potansiyeli bir miktar kaymaktadır. Yapılan literatür araştırmasında bu potansiyel değişiminin (negatife kayma) olması DNA ile ilaç etkileşiminin elektrostatik olabileceğini belirtmektedir (Gherghi vd. 2003a).

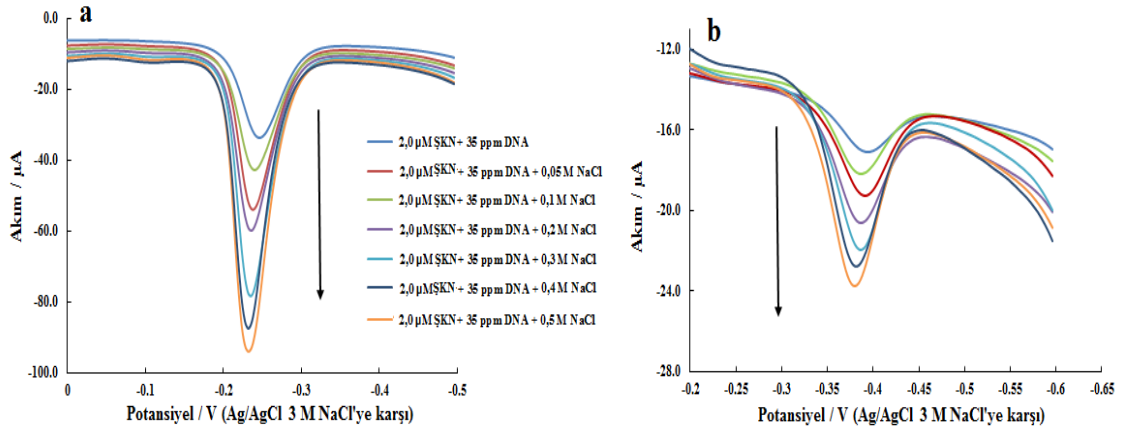
Bu amaçla 35 ppm DNA ve $2,0 \times 10^{-5}$ M ŞKN'in bulunduğu çözelti ortamına farklı derişimlerde (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 M) NaCl ilaveleri yapılarak DPV voltamogramları her iki fizyolojik pH değerlerinde alınmıştır (Şekil 4.24.a,b). Literatürde bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde, NaCl derişiminin artmasıyla Na⁺ iyonları ilaç yerine DNA'nın yapısında yer alan negatif yüklü fosfat gruplarına elektrostatik olarak bağlanabileceği ve DNA ile ilaç molekülleri arasındaki etkileşimin azalacağı belirtilmektedir. Böylece Na⁺ iyonlarının derişimi arttıkça ilaç ile DNA molekülleri arasındaki çekim kuvveti azalacak ve ilacın akım-potansiyel sinyali ise artacaktır (Hua Shi vd. 2015, Tığ vd. 2016). Bu bilgiler ışığında, yapılan deneysel çalışmalarda her iki ortamda da ŞKN'in akım-potansiyel sinyali NaCl derişimi ile artmaktadır. Bu durum ise ŞKN ile DNA etkileşiminin elektrostatik olabileceğini düşündürmüştür.

Elektrostatik etkileşimin yanı sıra, ŞKN moleküllerinin DNA'nın yapısında bulunan Guanin bazlarına hidrojen bağlarıyla bağlanarak etkileşebileceği de olasılık dahilindedir.



Şekil 4.23 ŞKN'in DPV sinyaline artan DNA derişiminin etkisi

(iç grafik: $C_{\text{DNA}} - i_{p\text{ŞKN}}$ grafiğı a. pH:4,8 b. pH 7,4; 5,0 μM ŞKN)

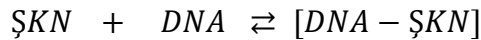


Şekil 4.24 ŞKN'in DNA içeren ortamına farklı derişimlerdeki NaCl'nin ilavesiyle elde edilen DPV voltamogramları

a. pH: 4,8 b. pH: 7,4.

4.2.5.2 ŞKN - DNA etkileşiminin bağlanma sabitinin (K) DPV ile hesaplanması

ŞKN ve DNA arasındaki etkileşimin bağlanma sabitinin hesaplanması amacıyla her iki fizyolojik pH değerinde (4,8 ve 7,4) DPV yöntemi ile elde edilen akım verilerden yararlanılmıştır. Bu amaçla artan DNA derişimi ile ŞKN'nin pik akımındaki değişimlerden ve bölüm 2.3.2'de verilmiş olan eşitlik 2.12'dan yararlanılarak DNA ve ŞKN arasındaki bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. Burada DNA ve ŞKN'in çözelti ortamında aşağıdaki reaksiyona göre bir kompleks oluşturduğu düşünülmüştür;



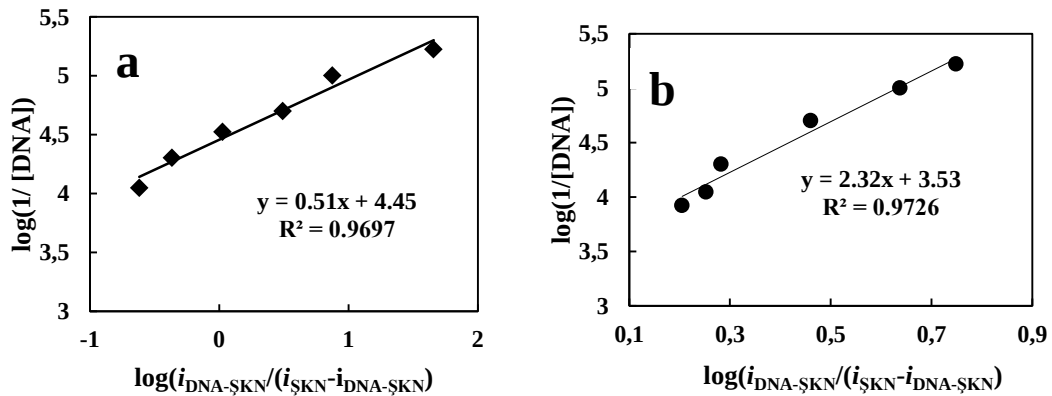
Burada ev sahibi ŞKN, misafir ise eklenen DNA molekülleridir (Temerk vd. 2013, Sirajuddin vd. 2013, Temerk vd. 2015, Temerk vd. 2016). Buna göre, her bir DNA eklenmesinden önce ve eklenmesinden sonra hesaplanan $\log\left(\frac{i_{\text{ŞKN-DNA}}}{i_{\text{ŞKN}} - i_{\text{ŞKN-DNA}}}\right)$ değerine karşılık $\log(1/\text{DNA})$ derişimleri grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.25 A ve B'de verilmiştir. Şekil 4.25.a'da elde edilen grafiğin kesim noktası 4,45 ve şekil 4.25.b'de elde edilen grafiğin kesim noktası ise 3,53'tür. Bu değerden yararlanarak DNA ile ŞKN arasındaki

oluşum sabitleri her iki ortamda da (pH 4,8 ve 7,4) hesaplanmıştır. Bu değerler pH 4,8’de $2,86 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ iken, pH 7,4’de $3,38 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ’dir (Çizelge 4.15). Bu sonuçlara göre asidik ortamdaki bağlanma sabitinin nötral ortamdaki bağlanma sabitine göre daha yüksek olduğu söylenebilir.

DNA ile ŞKN arasında oluşan kompleksin Standart Gibbs serbest enerjisi (ΔG°), yukarıda bulunan K bağlanma sabiti değerlerinin Eşitlik 2.13’de yerine koyulması ile hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir. Burada ΔG° değerlerinin her iki ortamda da negatif değerde olması, DNA ile ŞKN arasındaki etkileşimin kendiliğinden yürüdüğünü göstermektedir.

4.2.5.3 DV yöntemi ile elde edilen bulgular

ŞKN’nin DNA ile etkileşimi DV yöntemi ile de yine iki farklı fizyolojik pH değerinde (4,8 ve 7,4) $2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ŞKN içeren ortamlarda incelenmiş olup DNA içermeyen ve 35 ppm DNA içeren ortamlarda yapılmış olan tarama hızı çalışması ile ŞKN ve ŞKN-DNA kompleksinin difüzyon katsayısı (D), ŞKN’in yüzey derişimi (I) ve reaksiyonun standart heterojen hız sabiti (k_s) değişkenleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Hesaplamalara ilişkin ayrıntılar aşağıda sunulmuş olup sonuçlar çizelge 4.15’de listelenmiştir.



Şekil 4.25 $\log(\frac{i_{ŞKN-DNA}}{i_{ŞKN}-i_{ŞKN-DNA}})$ - $\log(1/[DNA])$ grafikleri

A. pH 4,8 B. pH 7,4

Difüzyon katsayısının (D) hesaplanması

Yapılan tarama hızı çalışması sonuçlarından elde edilen $i_p-v^{1/2}$ grafiğinin eğimi, tersinmez ve yarı tersinir sistemler için geçerli olan eşitlik 2.4'den yararlanarak, ŞKN'in serbest halde iken ve ortama belli derişimde DNA ilavesi yapılarak difüzyon katsayıları hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.15'de sunulmuştur. Çizelge 4.15'de görüldüğü gibi ŞKN'in pH 4,8'de, çözelti ortamında tek başınayken hesaplanan difüzyon katsayısı $2,76 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ iken, DNA ilave edildiğinde $1,10 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e düşmektedir. Bu sonuçlara göre ortamda DNA bulunduğunda ŞKN'in elektrot yüzeyine olan difüzyonunun bir miktar da olsa azaldığı görülmektedir. Çizelge 4.15'de, pH 7,4 ortamındaki difüzyon katsayısı değerleri incelendiğinde ise benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Bu durum ise DNA ile ŞKN'in çözelti ortamında etkileştiğini göstermektedir.

Standart heterojen hız sabitinin (k_s) hesaplanması

Tarama hızı verilerinden hareket edilerek çizilmiş olan $\ln v-E_p$ grafiğinin eğimi ve eşitlik 2.5'den yararlanarak DNA içeren ve DNA içermeyen ortamlarda ŞKN'in k_s değerleri hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.15'de sunulmuştur. Çizelge 4.15'de görüldüğü üzere ŞKN'in pH 4,8'de hesaplanan k_s değeri, ŞKN serbest halde iken $0,90 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $0,88 \text{ s}^{-1}$ olmaktadır. pH 7,4'de ise tek başına ŞKN için k_s değeri $0,86 \text{ s}^{-1}$ iken DNA eklendiğinde ise $0,92 \text{ s}^{-1}$ olduğu görülmektedir. Bu değerlerin birbirine yakın olması ŞKN'in elektrokimyasal özelliğinde herhangi bir değişiklik olmadığı ve ŞKN'in DNA ile oluşturduğu kompleksin elektroaktif özellik göstermediği şeklinde yorumlanabilir (Jiao vd. 2005).

ŞKN'in elektrot yüzey derişimin (Γ) hesaplanması

Tarama hızı çalışması ile elde edilen akım değerlerinin tarama hızına karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen eğim ve eşitlik 2.7 yardımıyla ŞKN için her iki ortamda da Γ değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.15'de verilmiştir. Çizelge 4.15'de görüldüğü gibi pH

4,8’de ŞKN’in tek başına iken bulunan I değeri $5,19 \times 10^{-10}$ mol cm⁻² iken ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $1,10 \times 10^{-10}$ mol cm⁻²,ye düşmektedir. pH 7,4’de ise bu değerler sırasıyla $1,0 \times 10^{-10}$ mol cm⁻² ve $8,9 \times 10^{-11}$ mol cm⁻²’dir.

Çizelge 4.15 ŞKN-DNA etkileşimi için her iki ortamda hesaplanan Difüzyon katsayısı (D), heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (I), bağlanma sabiti (K) ve standart Gibbs serbest enerji (ΔG°) değerleri

pH	Ortam bileşimi	D (cm ² s ⁻¹) ×10 ⁻⁵	k_s (s ⁻¹)	I (mol cm ⁻²) ×10 ⁻¹⁰	K (mol ⁻¹ L) ×10 ³	ΔG° kJ mol ⁻¹
4,8	ŞKN	2,76(±0,17)	0,90(±0,09)	5,19(±0,8)		
	ŞKN + DNA	1,10(±0,12)	0,88(±0,00)	1,10(±1,3)	28,6	-25,42
7,4	ŞKN	0,56(±0,02)	0,86(±0,03)	1,00(±0,3)		
	ŞKN + DNA	0,41(±0,01)	0,92(±0,27)	0,89(±0,04)	3,38	-20,13

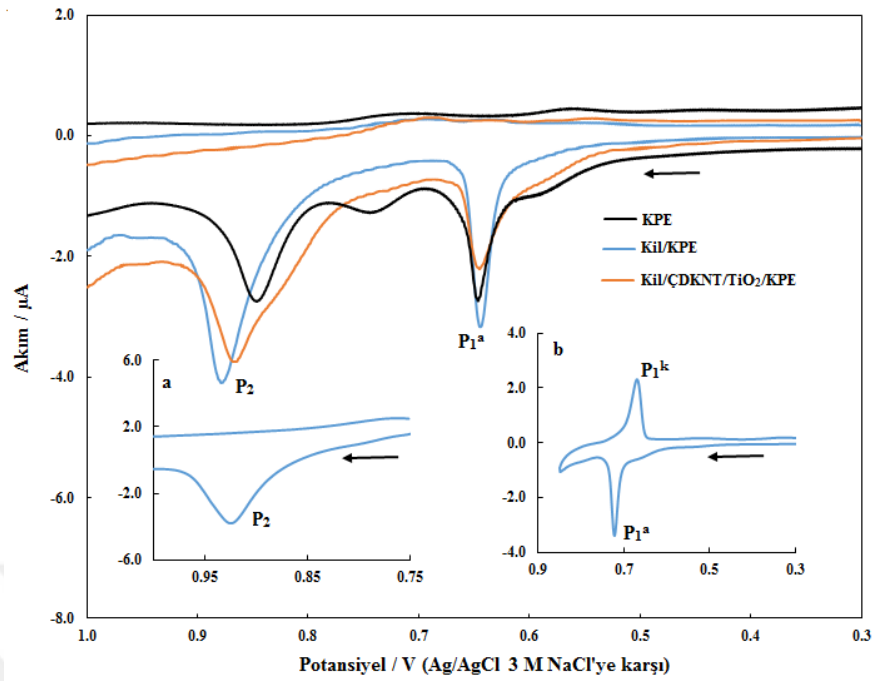
4.3 Mitoksantron (MTK) ile İlgili Yapılan Voltametrik Çalışmalar

4.3.1. MTK’nın elektrokimyasal davranışının DV ile incelenmesi

MTK’nın elektrokimyasal davranışı, bölüm 4.1’de elektrokimyasal özellikleri incelenmiş olan Kıl/KPE, Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE ve KPE elektrot yüzeylerinde pH 1,0 (0,1 M H₂SO₄) ortamında incelenmiştir. Bu amaçla 0,3 ile 1,0 V’luk potansiyel aralığında ve 0,1 V/s tarama hızında $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK’nın votamogramları kaydedilmiştir. Şekil 4.26’da görüldüğü gibi, MTK’nın yükseltgenmesine ait yaklaşık olarak 0,6 V’da birinci yükseltgenme piki (P_1^a) ve yaklaşık olarak 0,8 V’da ikinci yükseltgenme piki (P_2^a), geri potansiyel taramasında (1,0 ile 0,3 V) ise herhangi bir indirgenme pikine rastlanmamıştır. Fakat, her bir pik daha dar potansiyel aralıklarında tarandığında, 0,3 ile 0,75 V arasında yine bir yükseltgenme piki gözlenirken, geri taramada ise (0,75-0,3 V) P_1 ’e ait bir indirgenme pikine rastlanmıştır (Şekil 4.26.a).

Benzer şekilde 0,7 ile 1,0 V'luk potansiyel aralığında P_2^a için her iki yönde tarama yapılmıştır (Şekil 4.26b). Elde edilen sonuçlara göre, bu potansiyel aralığında da P_2 'ye ait herhangi bir indirgenme pikine rastlanmamıştır. Şekil 4.26'ya göre, MTK'ya ait her iki pikin pik akımlarının en yüksek Kil/KPE yüzeyinde elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle Kil/KPE'un MTK'ya ait her iki pik için de en uygun elektrot olduğunu söylemek mümkündür.

MTK için en uygun elektrodun Kil/KPE olması sebebiyle, MTK'nın elektrokimyasal yükseltgenme pik akımlarına elektrot bileşiminin (sepiyolit kili) etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla kilin bileşim yüzdesi % 1,7 (0,5 mg kil/30,0 mg pasta) ile % 13,3 (4,0 mg kil/30,0 mg pasta) arasında değiştirilmiştir (Navratilova vd. 2002, Uslu vd. 2007). Her bir bileşimde elde edilen voltamogramlar ve her iki pik için % kil- i_p grafikleri şekil 4.27'de verilmiştir. Bu voltamogramdan da görüleceği üzere MTK için %10,0 kil miktarının üzerine çıkıldığında artık akımın ciddi şekilde arttığı ve P_1 için pik akımının düştüğü göze çarpmaktadır (4.27.c). Şekil 4.27.a,b'de gösterilen grafikler ve voltamogramlar dikkate alındığında, MTK'ya ait her iki pik için de en uygun elektrot bileşiminin % 1,7 (0,5 mg kil/30 mg pasta) oranında kil içeren elektrot olduğu görülmektedir.

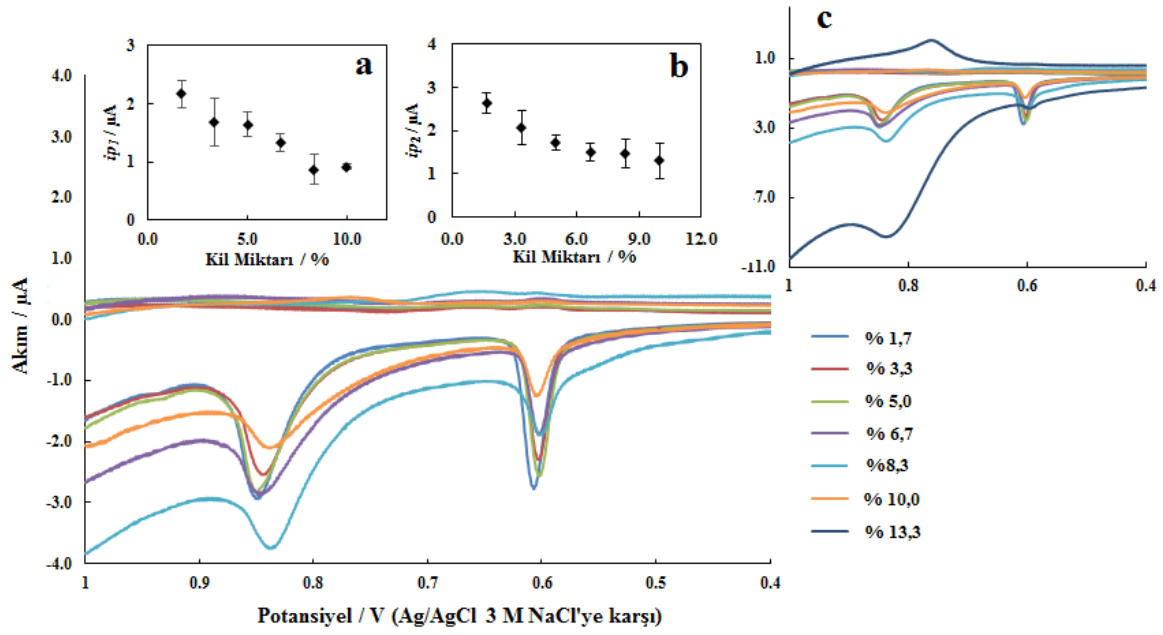


Şekil 4.26 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK'nın KIL/KPE, KIL/ÇDKNT/TiO₂/KPE ve KPE elektrotlarında kaydedilmiş dönüşümlü voltamogramları

- a. $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK'ya ait P₂'nin KIL/KPE elektrodunda 0,75-1,0 V arasındaki dönüşümlü voltamogramı
b. $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK'ya ait P₁'nin KIL/KPE elektrodunda 0,3-0,80 V arasındaki Dönüşümlü voltamogramı (pH: 1,0, v : 0,1 V/s)

4.3.2 Destek elektrolit seçimi ve pH'ın belirlenmesi

MTK'nın KIL/KPE yüzeyinde elektrokimyasal davranışını ayrıntılı olarak incelemek için her iki yükseltgenme pik akımı ve pik potansiyeline pH'nın ve elektrolit ortamının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla ilk olarak geniş bir pH çalışma aralığına sahip olan (2,0 - 12,0) universal BR tamponu kullanılmış ve $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK'nın 1,0'er pH birimi aralığında Dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.28). Şekil 4.28'de görüldüğü gibi en yüksek pik akımı ve pik şekli dikkate alındığında P₁ yükseltgenme piki için pH 2,0'de en yüksek pik akımı gözlenirken pH 5,0'den sonra akım düşmüştür.



Şekil 4.27 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK ortamında farklı bileşimdeki kil yüzdelерinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları

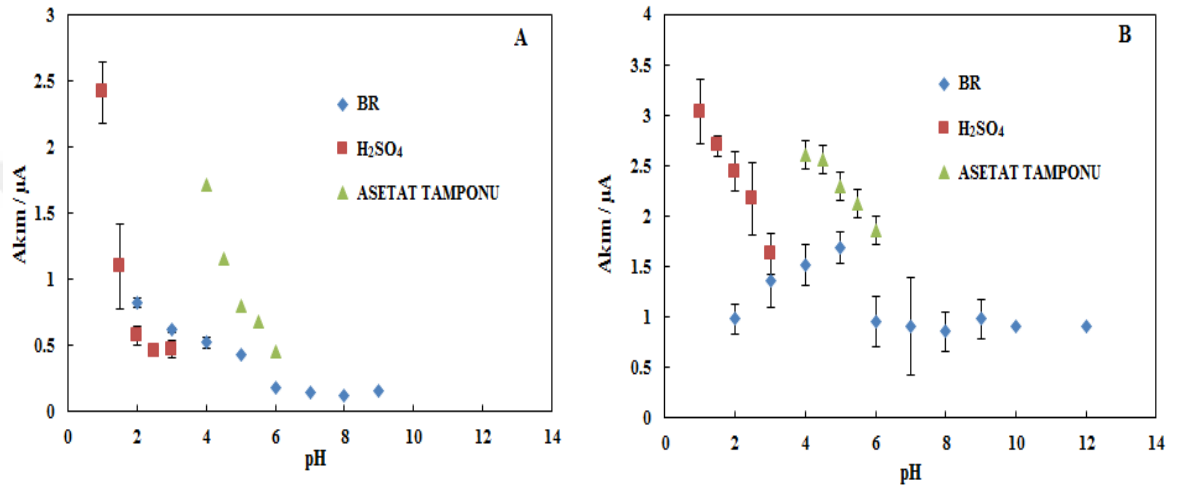
İç grafik: a. % Kil miktarı – i_{p1} b. % Kil miktarı – i_{p2} (pH:1,0, 0,1 M H_2SO_4)

BR tamponu çalışmaları ışığında yüksek akımların gözleendiği pH 2,0 ile 5,0 aralığında farklı bileşimde tamponlar hazırlanmıştır. pH 1,0-3,0 aralığında H_2SO_4 çözeltisi, pH 4,0 ile 6,0 aralığında ise asetat tamponu hazırlanmış ve sonuçlar 4.28.a'da verilmiştir. BR ve asetat tamponuna göre kıyaslandığında MTK'nın birinci yükseltgenme piki (P_1) için en yüksek pik akımı, pH'ın 1,0 olduğu H_2SO_4 ortamında elde edilmiştir. MTK'nın ikinci yükseltgenme piki olan P_2 için de benzer çalışmalar yapılmıştır. Hem P_1 hem de P_2 için en uygun ortamın H_2SO_4 ortamı ve en uygun pH'ın 1,0 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.28.b). P_1 ve P_2 için Bu ortam şartlarında farklı pH'larda kaydedilen voltamogramlar ise Şekil 4.29'da verilmiştir.

4.3.3 Tarama hızı çalışması

MTK'ya ait olan P_1 ve P_2 pikleri için en uygun elektrolit ve pH değerleri belirlendikten sonra her iki pik için de, DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında yapılan çalışmalar yardımıyla MTK'nın Kil/KPE yüzeyinde elektrokimyasal davranışı (tersinirlik, yarı

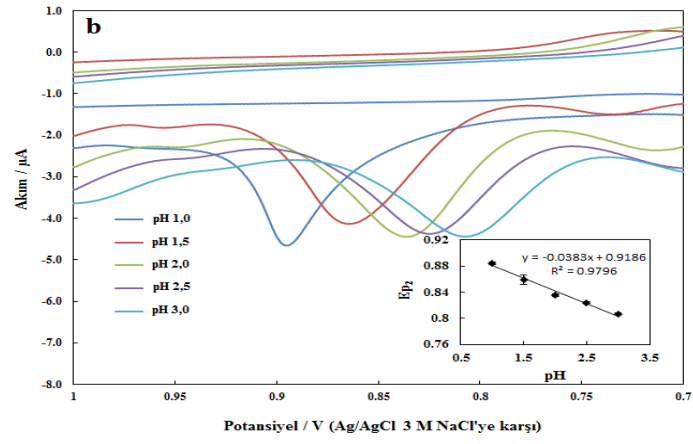
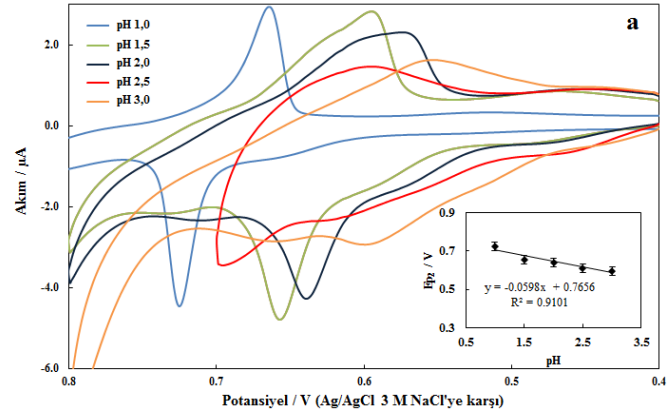
tersinirlik, tersinmezlik ve adsorpsiyon özellikleri) ayrıntılı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MTK'ya ait elektrot yükseltgenme mekanizması önerilmiştir. Bu çalışmalar için $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK içeren ortamda tarama hızı 0,005-0,500 V/s aralığında değiştirilmiştir. Bu aralıkta P_1 ve P_2 yükseltgenme pikleri için kaydedilmiş olan voltamogramlar sırasıyla Şekil 4.30 ve 4.31'de verilmiştir. Bu voltamogramlardan elde edilen elektrokimyasal değişkenler çizelge 4.16 - 4.17'de sunulmuştur.



Şekil 4.28 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK'nın farklı elektrolit ortamlarında i_p -pH grafikleri

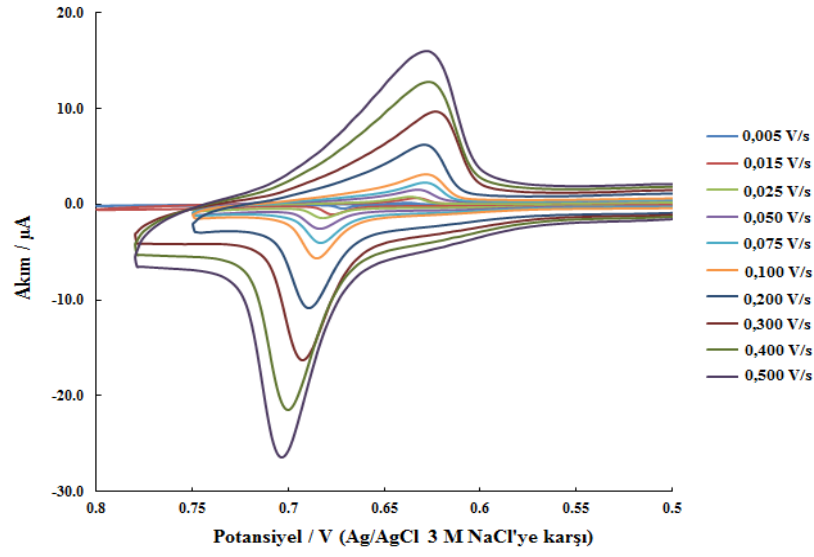
a. MTK'nın birinci yükseltgenme piki b. MTK'nın ikinci yükseltgenme piki (v:0,1 V/s)

Bu veriler incelendiğinde tarama hızının değişimiyle MTK'nın birinci yükseltgenme pikinin (P_1) anodik pik potansiyeli daha pozitif değerlere kayarken, katodik pik potansiyeli ise daha negatif değerlere kaymaktadır. Bu durum ise pik potansiyelleri arasındaki farkın (ΔE_p) tarama hızıyla değişmesine sebep olmaktadır. i_p^k/i_p^a oranı ise, tarama hızıyla değişmektedir (Şekil 4.30, Çizelge 4.16). Elde edilen bu sonuçlara göre MTK'nın birinci yükseltgenme pikinin yarı tersinir bir redoks davranışı gösterdiği söylenebilir. MTK'ya ait ikinci yükseltgenme piki olan P_2 'nin, şekil 4.26 ve şekil 4.31'de görüldüğü gibi geri potansiyel taramasında herhangi bir indirgenme pikine raslanmamıştır. Tarama hızı ile değişimi incelendiğinde ise pik potansiyelinin tarama hızıyla daha pozitif değerlere kaydığı çizelge 4.17'den görülmektedir. Bu sonuçlara göre MTK'nın ikinci yükseltgenme pikinin tersinmez bir redoks davranışı gösterdiği söylenebilir.



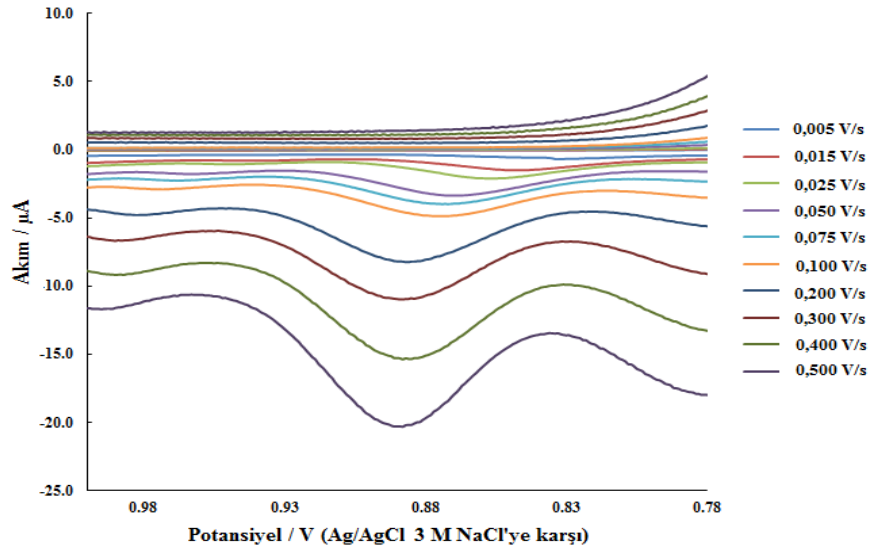
Şekil 4.29 1.0×10^{-5} M MTK'nın 0.1 M H_2SO_4 ortamında farklı pH değerlerindeki dönüşümlü voltamogramları

a. P_1 b. P_2 ($v: 0.1$ V/s)



Şekil 4.30 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK ortamında P_1 'in DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları

0,1 M H_2SO_4 , pH: 1,0



Şekil 4.31 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK ortamında P_2 'nin DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları

0,1 M H_2SO_4 , pH: 1,0

Çizelge 4.16 MTK'nın birinci yükseltgenme piki olan P₁'in tarama hızı değişimi ile elde edilen elektrokimyasal değişkenler

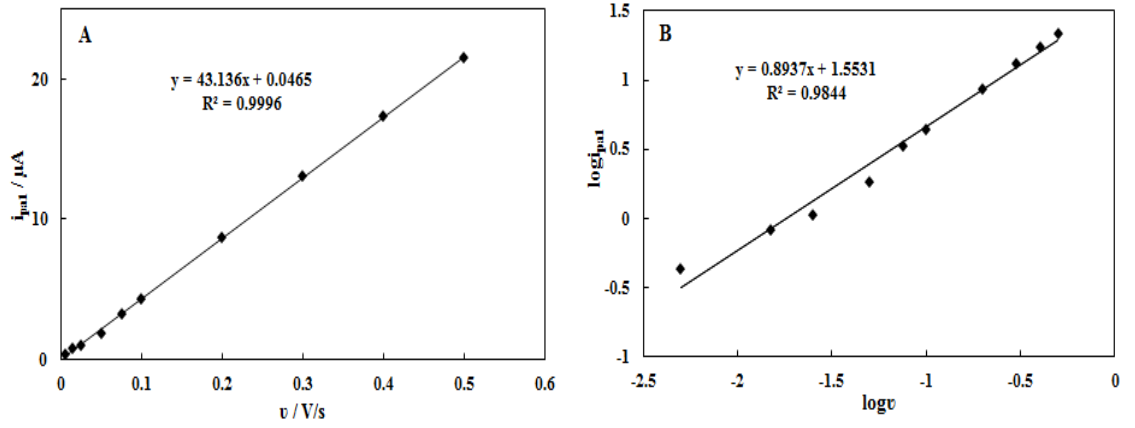
Tarama hızı, V/s	E _p ^a , V	E _p ^k , V	ΔE _p , V	I _p ^a , μA	I _p ^k , μA	I _p ^k /I _p ^a
0,005	0,672	0,638	0,035	0,44	0,219	0.497
0,015	0,677	0,633	0,044	0,64	0,847	1.323
0,025	0,682	0,636	0,046	1,039	0,850	0.818
0,050	0,681	0,632	0,049	1,447	1,078	0.745
0,075	0,683	0,628	0,055	3,176	2,280	0.718
0,100	0,685	0,628	0,057	4,461	3,117	0.699
0,200	0,689	0,629	0,060	8,406	6,277	0.747
0,300	0,693	0,623	0,070	12,85	9,661	0.752
0,400	0,700	0,626	0,074	17,04	12,83	0.753
0,500	0,703	0,627	0,076	21,38	16,040	0.750

MTK'nın modifiye elektrot (Kil/KPE) yüzeyine taşınmasının adsorpsiyon ve/veya difüzyon ile olup olmadığı DV ile yine aynı aralıkta (0,0050 - 0,500 V/s) yapılan tarama hızı çalışmaları ile elde edilen pik akımlarının tarama hızıyla değişim grafikleri ($i_p - v$ ve $\log i_p - \log v$) çizilmiştir. (Şekil 4.32). Şekil 4.32.a'dan da görüleceği üzere pik akımın tarama hızı ile doğrusal olarak değişmesi maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olabileceğini düşündürmektedir (Wang vd 2006, Bayraktepe vd 2016). Bu davranışı desteklemek amacıyla pik akımının logaritması ve tarama hızının logaritması ($\log i_p - \log v$) grafiği çizilmiş olup bu grafikten elde edilen eğimin 0,89 olduğu görülmektedir (Şekil 4.32.b).

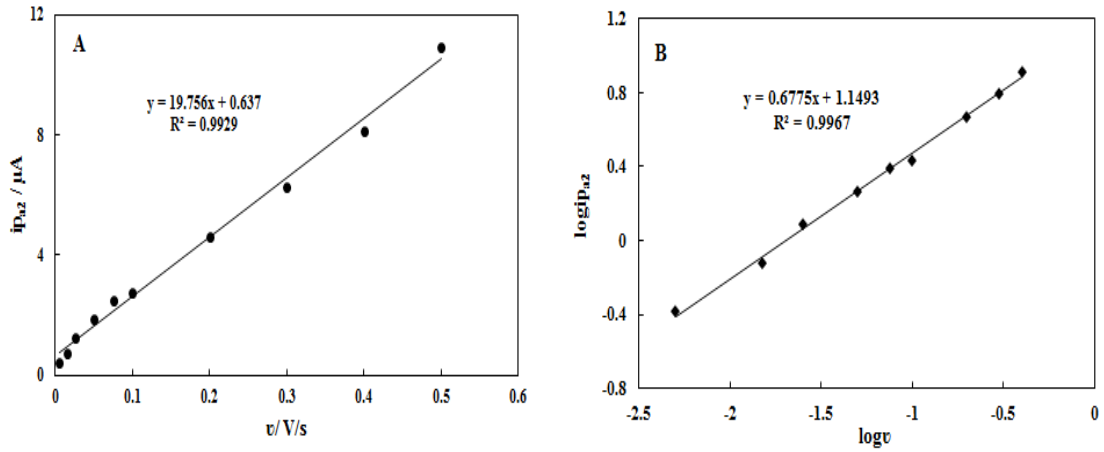
Çizelge 4.17 MTK'nın ikinci yükseltgenme piki olan P₁'in tarama hızı değişimi ile elde edilen elektrokimyasal değişkenler

Tarama hızı, V/s	E _p ^a , V	i _p ^a , µA
0,005	0.834	0.412
0,015	0.848	0.751
0,025	0.857	1.222
0,050	0.872	1.844
0,075	0.872	2.480
0,100	0.874	2.734
0,200	0.886	4.620
0,300	0.887	6.248
0,400	0.886	8.122
0,500	0.889	10.930

$\log i_p - \log v$ grafiğinden elde edilen eğim değeri teorik olarak 0,5 ile 1,0 aralığında değişmektedir. Eğimin 1,0'e yakın olması maddenin elektrot yüzeyine adsorpsiyon ile taşındığını göstermektedir (Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006, Taşdemir 2011). Elde edilen bu sonuçlar ise MTK'ya ait olan P₁'in adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucunu desteklemektedir. Benzer şekilde P₂ için de aynı şekilde yapılan tarama hızı çalışmalarından elde edilen $i_p - v$ ve $\log i_p - \log v$ grafikleri Şekil 4.33.a,b'de verilmiştir. Şekil 4.33.a'dan da görüleceği üzere pik akımın tarama hızı ile doğrusal olarak değişmesi maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olabileceğini düşündürmektedir. Bu davranışı desteklemek amacıyla $\log i_p - \log v$ grafiği çizilmiş olup bu grafikten elde edilen eğimin 0,68 civarında olduğu görülmektedir (Şekil 4.33.b). Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde P₁ in P₂'ye göre yüzeye daha fazla adsorbe olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 4.32 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK'nın birinci yükseltgenme pikinin tarama hızı çalışmalarından elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri (tarama hızı 0,0050 - 0,500 V/s)



Şekil 4.33 $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK'nın ikinci yükseltgenme pikinin tarama hızı çalışmalarından elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri (tarama hızı 0,0050 - 0,500 V/s)

Adsorpsiyon kontrollü olduğu belirlenen P_1 ve P_2 piklerinin yükseltgenme mekanizmasında aktarılan elektron sayısının belirlenmesi amacıyla adsorpsiyon şartlarında geçerli olan Laviron Eşitliği (Eşitlik 2.9) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yükseltgenme mekanizmalarında yer alan elektron sayıları sırasıyla P_1 için $2,08 \pm 0,30$ P_2 için ise $1,94 \pm 0,42$ olarak hesaplanmıştır.

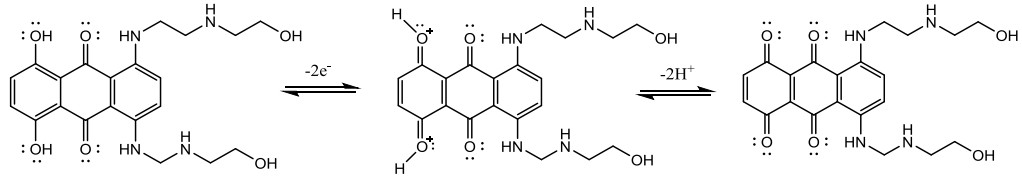
Elektron sayısı belirlendikten sonra MTK'nın yükseltgenme mekanizmasında yer alan proton sayısının belirlenmesi amacıyla şekil 4.29.a,b'de iç grafiklerde verilen $pH - E_p$

grafiklerinden elde edilen doğru denklemi kullanılmıştır. Bu değerler her iki pik için sırasıyla, $E_{p1} = -0,0598\text{pH} + 0,76$, $E_{p2} = -0,0383\text{pH} + 0,92$ 'dir. Bu doğru denklemlerinin eğimlerine bakıldığında, P_1 için 59,8 mV/pH, P_2 için ise 38,3 mV/pH olduğu görülmektedir. P_1 için bulunan bu değer teorik Nerstian değeri olan 59 mV/pH değerine eşittir. Bu sonuç ise, MTK'nın birinci yükseltgenme pikine ait redoks mekanizmasında aktarılan proton sayısı ve elektron sayısının birbirine eşit olduğunun göstergesi olarak yorumlanmıştır (David vd. 2016, Bayraktepe vd. 2016, Honeychurch vd. 2016). P_2 için bulunan değer ise $2e^-/H^+$ aktarımı için geçerli olan 30 mV/pH teorik değerine oldukça yakındır. Buna durum ise, MTK'nın ikinci yükseltgenme pikine ait redoks mekanizmasında aktarılan proton sayısının, elektron sayısının yarısına eşit olduğunun göstergesi olarak yorumlanmıştır (David vd. 2016).

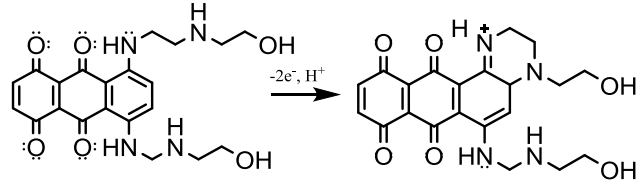
Bu veriler ışığında, MTK'nın birinci ve ikinci yükseltgenme pikleri için (P_1 ve P_2) aktarılan elektron sayısı ve proton sayısının sırasıyla $2e^-/2H^+$ (asidik ortam) ve $2e^-/H^+$ (asidik ortam) olduğu söylenebilir.

Buraya kadar yapılan çalışmalar sonucunda MTK'ya ait 2 adet yükseltgenme pikinin olduğu (+0,6 V ve +0,8 V) görülmüştür. Bulardan daha düşük potansiyelde gözlenen (+0,6 V) ve yarı tersinir olduğu düşünülen pikin (P_1) MTK'nın yapısında bulunan hidrokinon fonksiyonlu grubunun $2e^-/2H^+$ vererek yükseltgenmesi ile oluşabileceği düşünülmüştür.

Şekil 4.26'ya bakıldığında geniş potansiyel taraması neticesinde gözlenen her iki yükseltgenme pikinin geri potansiyel taramasında herhangi bir indirgenme piki gözlenmezken, P_1 'in gözlemediği potansiyel aralığında (0,3 - 0,75 V) bir potansiyel taraması yapıldığında P_1 'e ait bir indirgenme pikinin olduğu görülmektedir. Daha sonra ikinci pikin de yükseltgendiği daha pozitif potansiyellere gidildiğinde ikinci pikin ortaya çıktığı görülmüştür. Ancak geri potansiyel taramasında hem ikinci hem de birinci pike ait indirgenmenin gözlenmediği görülmüştür (Şekil 4.26). Bu sonuçlara göre ikinci yükseltgenme pikinin, yapıda yer alan amino grubunun tersinmez yükseltgenmesinden ($2e^-, 2H^+$) kaynaklandığı düşünülmektedir. Her iki pike ait önerilmiş olan mekanizmalar şekil 4.34'de verilmiştir.



P₁



P₂

Şekil 4.34 MTK'nın Kıl/KPE elektrot yüzeyinde gerçekleşen olası yükseltgenme mekanizmaları

4.3.4 MTK'nın AdsKDV ve AdsDPV ile tayini

Yukarıda MTK için yapılmış olan elektrokimyasal davranış ve mekanizma belirleme çalışmaları neticesinde bir adet yarı tersinir, bir adet de tersinmez yükseltgenme pikine rastlanmıştır. Söz konusu maddenin tayini için adsorpsiyon sıyırma voltametriyi yöntemi geliştirmek amacıyla daha düşük potansiyel değerlerinde gözlenen P₁ seçilmiştir. Bu pikin seçilmesinin sebebi şu şekilde açıklanabilir:

- P₂ ile kıyaslandığında en uygun ortam şartlarında elektrot yüzeyine adsorbe olabilmek özelliği daha yüksektir.
- P₂'ye göre yine en uygun ortam şartlarında daha yüksek pik akımına ve daha kesin pik şekline sahiptir.

Tüm bu sebepler değerlendirildiğinde, yöntem geliştirme çalışmalarının P₁ üzerinden yürütülmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, Kıl/KPE ve karşılaştırmak amacıyla KPE yüzeyinde hem AdsKDV hem de AdsDPV yöntemleri geliştirilmiştir. H₂SO₄ ortamı ve pH 1,0'de yöntem değişkenlerinin optimizasyonu yapılmıştır. Daha sonra belirlenen en uygun değişkenler yardımıyla kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş olup bu yöntemler

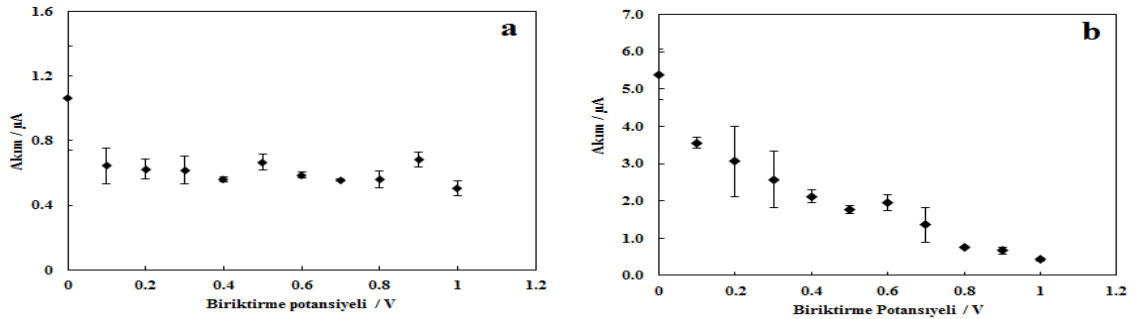
piyasada yer alan MİTOKSANTRON adlı flakon ve serum örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

4.3.4.1 AdsKDV için yöntem değişkenlerinin belirlenmesi

Adsorptif sıyırma yöntemi geliştirmede sıyırma ve adsorpsiyonu etkileyen değişkenler biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresidir. Bu amaçla her iki yöntem için bu değişkenlerin en iyi sonuçları verecek koşulları belirlenmiştir.

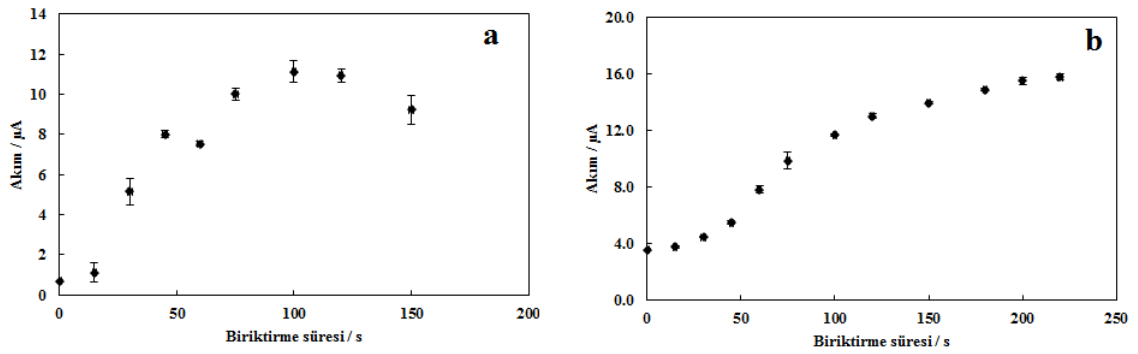
En uygun biriktirme potansiyelinin optimizasyonu

MTK tayini için AdsKDV yöntemi geliştirmek amacıyla hem KPE hem de Kil/KPE elektrotları yüzeyinde biriktirme potansiyeli çalışması yapılmıştır. Bu amaçla daha önceden belirlenmiş olan uygun ortam şartlarında $1,0 \times 10^{-6}$ M MTK çözeltisi hazırlanmış olup 15,0 s’de sabit tutulan biriktirme süresinde, biriktirme potansiyeli 0,0 ile 1,0 V değerleri arasında 0,1’er birim arttırılarak değiştirilmiştir. Şekil 4.35.a KPE, Şekil 4.35.b ise Kil/KPE elektrot yüzeylerinde biriktirme potansiyelinin pik akımı ile değişimini vermektedir. Her bir potansiyelde akımlar üçer kez okunarak ortalama değerler elde edilmiştir. Şekil 4.35.a ve 4.35.b incelendiğinde, her iki grafikte de MTK’ya ait akımların 0,0 V değerinden sonra düştüğü görülmektedir. Bu nedenle her iki elektrot yüzeyinde de en uygun biriktirme potansiyeli 0,0 V olarak kabul edilmiştir.



En uygun biriktirme süresinin belirlenmesi

En uygun değeri belirlenmiş biriktirme potansiyeli ve uygun ortam şartları altında $1,0 \times 10^{-6}$ M MTK'nın içeren ortamda, AdsKDV yöntemi ile biriktirme süresinin pik akımına etkisi hem KPE hem de Kil/KPE elektrot yüzeylerinde çalışılmıştır. Sonuçlar 4.36.a,b'de verilmiştir. Şekil 4.36.a'da görüldüğü gibi KPE elektrot yüzeyinde MTK'nın pik akımı 0,0 ile 100,0 s aralığında artış göstermiş ve sonrasında düşmeye başlamıştır. Bu nedende KPE elektrot yüzeyinde en uygun biriktirme süresi 100,0 s olarak belirlenmiştir. Şekil 4.36.b'de ise Kil/KPE elektrot yüzeyinde değiştirilen biriktirme süresine karşılık elde edilen MTK'nın pik akımının 0,0 s'den 200 s'ye kadar artış göstermekte olduğu ve sonrasında (220 s) elektrot yüzeyinin doygunluğa ulaştığı gözlenmektedir. Bu verilere göre en uygun biriktirme potansiyeli 200,0 s olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.36 $1,0 \times 10^{-6}$ M MTK'nın biriktirme süresi - akım grafikleri

A. KPE B. Kil/KPE (pH: 1,0)

Kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Yukarıda belirlenmiş olan en uygun şartlarda MTK için AdsKDV yöntemi ile kalibrasyon grafikleri her iki elektrot yüzeyinde de oluşturulmuştur (Şekil 4.37.a,b).

4.3.4.2 AdsDPV için yöntem değişkenlerinin belirlenmesi

MTK tayini için AdsDPV yöntemi de geliştirilmiştir. Bu amaçla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

En uygun biriktirme potansiyelinin belirlenmesi

$1,0 \times 10^{-6}$ M MTK çözeltisi kullanılarak biriktirme potansiyeli 0,0 ile 1,0 V değerleri arasında 0,1'er birim arttırılarak değiştirilmiştir. Şekil 4.38.a KPE, Şekil 4.38.b ise Kıl/KPE yüzeylerinde değiştirilen biriktirme potansiyeline karşı akımın değişimini vermektedir. Şekil 4.38 incelendiğinde, her iki grafikte de MTK'ya ait akımların 0,0 V değerinden sonra düştüğü görülmektedir. Bu nedenle AdsDPV yöntemi geliştirmek için her iki elektrot yüzeyinde en uygun biriktirme potansiyeli 0,0 V olarak belirlenmiştir.

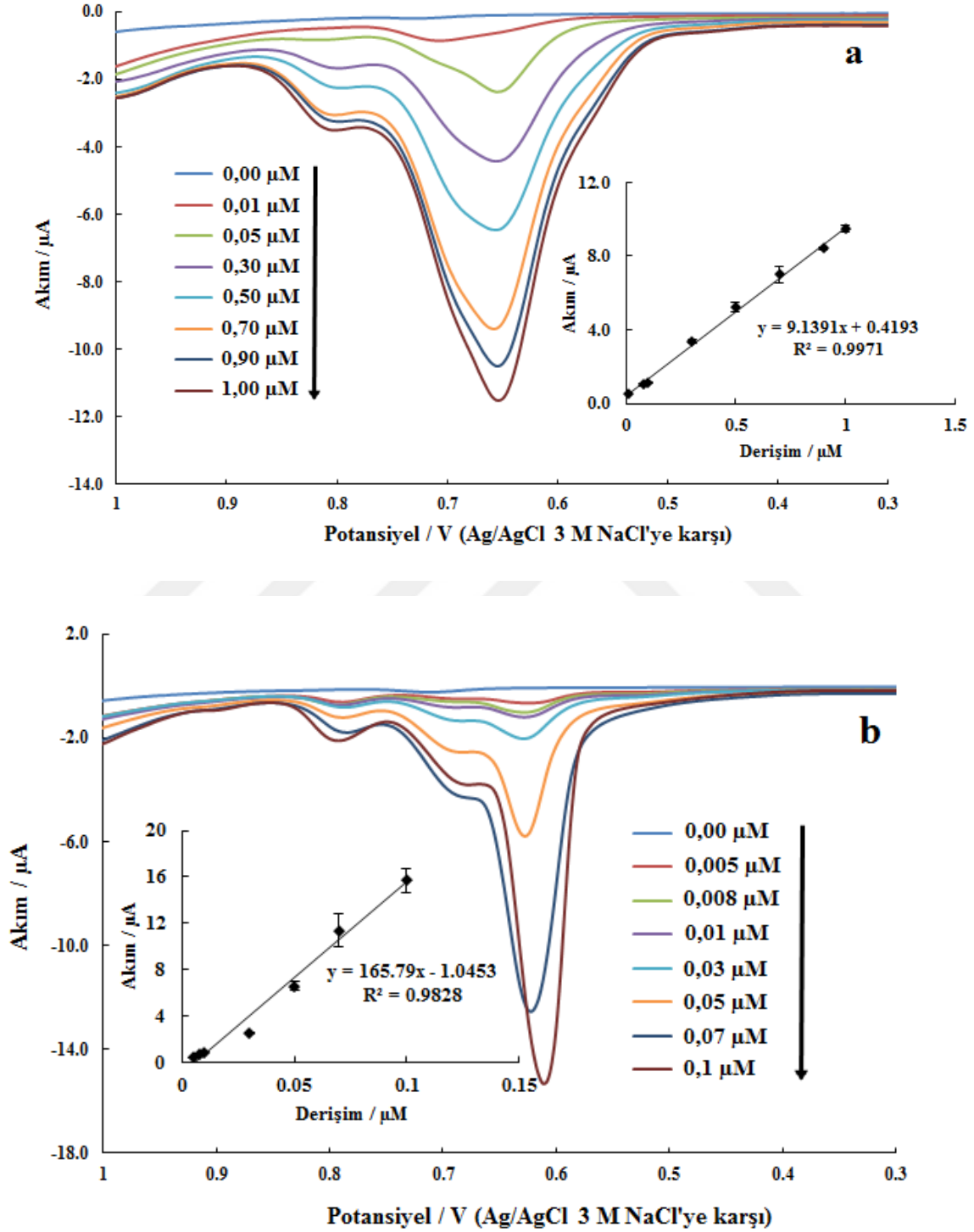
En uygun biriktirme süresinin belirlenmesi

En uygun biriktirme potansiyeli, uygun ortam şartları altında $1,0 \times 10^{-6}$ M MTK içeren ortamda, AdsDPV yöntemi ile biriktirme süresinin pik akımına etkisi hem KPE hem de Kıl/KPE elektrot yüzeylerinde çalışılmıştır. Sonuçlar 4.39.a,b'de verilmiştir. Şekil 4.39.a'da görüldüğü gibi KPE elektrot yüzeyinde MTK'nın pik akımı 0,0 ile 120,0 s aralığında artış göstermiş ve sonrasında (150 -180 s) doygunluğa ulaşmıştır. Bu nedende KPE elektrot yüzeyinde en uygun biriktirme süresi 120,0 s olarak belirlenmiştir. Şekil 4.39.b'de ise Kıl/KPE elektrot yüzeyinde değiştirilen biriktirme süresine karşılık MTK'nın pik akımı 0,0 s'den 180,0 s'ye kadar artış göstermekte ve sonrasında (180-240 s) elektrot yüzeyinin doygunluğa ulaştığı gözlenmektedir. Bu verilere göre en uygun biriktirme potansiyeli 180,0 s olarak belirlenmiştir.

Kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

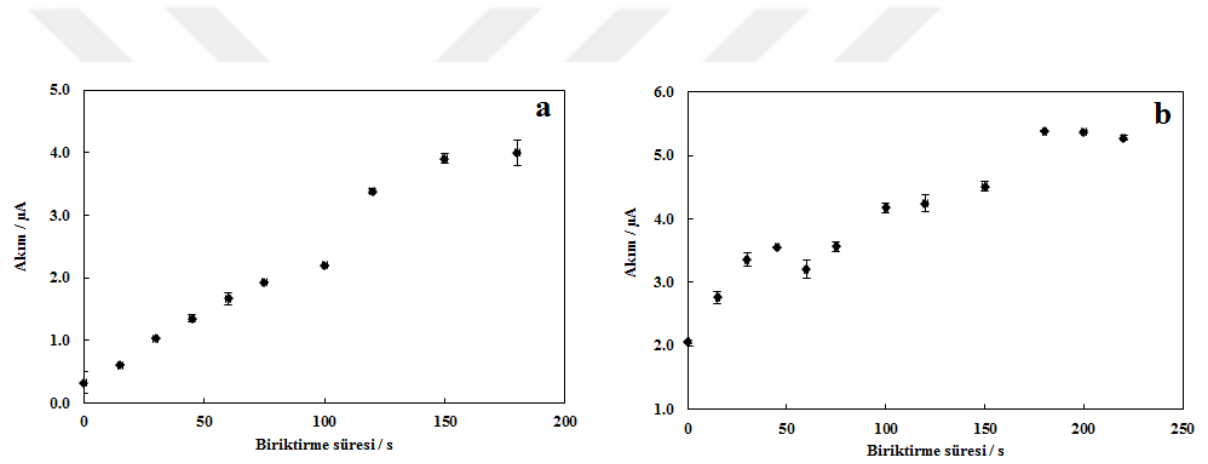
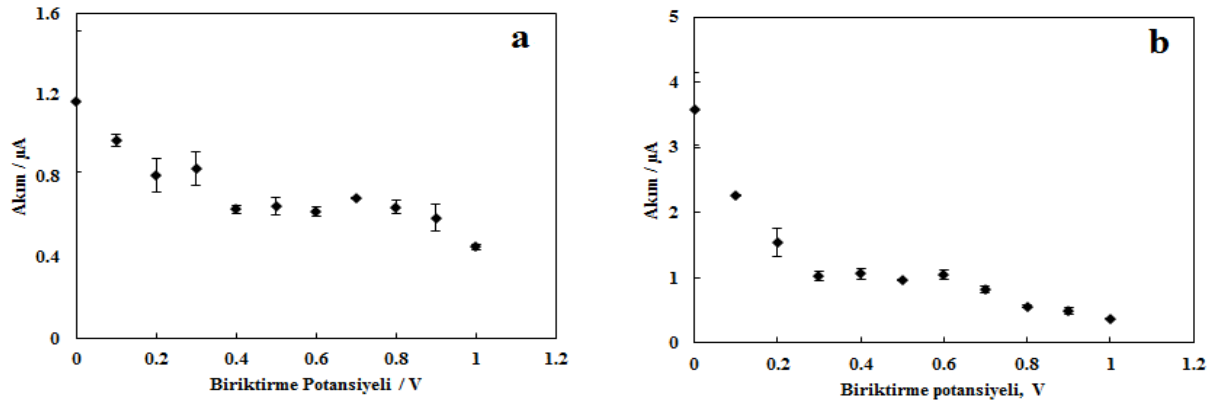
Yukarıda belirlenmiş olan en uygun şartlarda, MTK için AdsDPV yöntemi ile kalibrasyon grafikleri her iki elektrot yüzeyinde de oluşturulmuştur (Şekil 4.40.a,b).

Her iki elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsKDV ve AdsDPV yöntemleriyle ilgili regresyon değişkenleri çizelge 4.18’de sunulmuştur.



Şekil 4.37 MTK'nın farklı derişimlerdeki AdsKDönüşümlü voltamogramları

a. KPE b. Kıl/KPE iç grafik: kalibrasyon grafiği



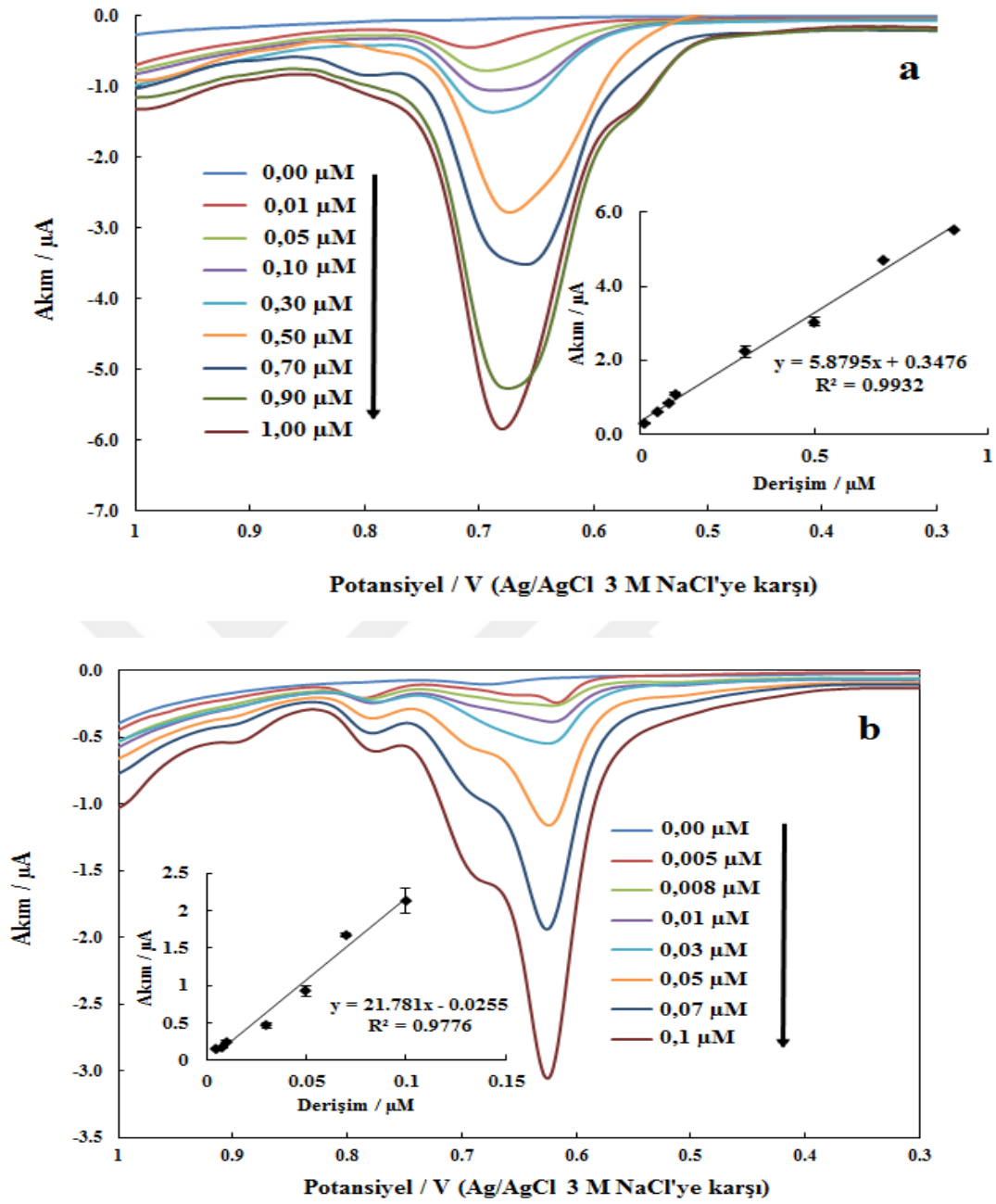
MTK için hem KPE hem de Kıl/KPE elektrot yüzeylerinde yapılan sıyırma voltametrisi yöntemi geliştirme çalışmalarında, şekil 4.37, 4.40 ve çizelge 4.18'de görüleceği üzere;

- MTK derişimi arttıkça pik akımlarının hem KPE hem de Kıl/KPE elektrot yüzeylerinde doğrusal olarak değiştiği görülmüştür.
- Doğrusal çalışma aralığının regresyon katsayısının her iki elektrot ve her iki yöntem için de 0,98'den büyük olduğu görülmektedir. Bu durum her iki yöntemin de doğrusallığının yüksek olduğunu göstermektedir.

- Her iki elektrot ve her iki yöntemde elde edilen pik akımı ve pik potansiyellerinin tekrarlanabilirlik değerleri %10'luk BSS değerinden küçük olduğundan dolayı her iki yöntemin de tekrarlanabilirliklerinin iyi olduğu söylenebilir.
- MTK için KPE yüzeyine geliştirilen bu iki yöntemin doğrusal çalışma aralığı sırasıyla AdsKDV için 1,59 - 1000 nM, AdsDPV için ise 5,92–1000 nM'dır. Modifiye elektrot yüzeyinde ise bu çalışma aralıkları sırasıyla 0,17–100 ve 2,4–100 nM'dır.
- Ayrıca çizelge 4.18'de görüldüğü gibi modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilen AdsKDV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğimi (165,79 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$) diğer yöntemlere ve diğer elektrotlara göre daha yüksektir. Bu sonuca göre modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsKDV yönteminin daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Eşitlik 4.1 ve 4.2 ve kalibrasyon eğrilerinin eğimleri yardımıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (Pandit vd. 2015). Hesaplanan değerler Çizelge 4.18'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilen AdsKDV yönteminin diğer yöntemlere göre daha düşük gözlenebilme (0,053 nM) ve tayin (0,18 nM) sınırlarına sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.18'de yer alan regresyon değişkenlerinin yanı sıra geliştirilmiş olan Kıl/KPE'unun ömrü ve tekrar üretilebilirliği de çalışılmıştır. Elektrodun kararlılığının belirlenmesi amacıyla hazırlanmış olan elektrodun $1,0 \times 10^{-7}$ M MTK içeren çözelti ortamında AdsKDV yöntemi ile her hafta akım değerleri en az 5 kez okunmuştur. Elde edilen ortalama akım değerlerine göre 5 hafta sonunda ilk hafta okunan akım değerinin % 94,52 oranında korunduğu gözlenmiştir. Buna göre geliştirilmiş olan elektrodun en az 1 ay 10 gün kararlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kıl/KPE'unun tekrar üretilebilirliğinin tayin edilmesi amacıyla aynı bileşimde ve aynı şartlarda 5 farklı modifiye elektrot hazırlanmıştır. Elektrotların $1,0 \times 10^{-7}$ M MTK içeren ortamdaki akımları AdsKDV yöntemiyle en az 5 defa okunmuştur. Her bir elektrot için okunan ortalama akım değerlerinin % BSS değeri 9,21 olarak bulunmuştur. Bu değerinin %10'dan küçük olması, geliştirilmiş olan yeni elektrodun tekrar üretilebilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.40 MTK'nın farklı derişimlerdeki AdsKDönüşümlü voltamogramları

A. KPE B. Kil/KPE iç grafik: kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.18 KPE ve Kil/KPE elektrotları yüzeyinde geliştirilen yöntemlerin regresyon değişkenleri

Regresyon değişkeni	KPE		Kil/KPE	
	<u>AdsKDV</u>	<u>AdsDPV</u>	<u>AdsKDV</u>	<u>AdsDPV</u>
Pik potansiyeli, V	0,648	0,672	0,628	0,624
Doğrusal çalışma aralığı, nM	1,59 - 1000	5,92 - 1000	0,17 - 100	2,4 - 100
Kalibrasyon eğrisinin eğimi, $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	9,1391	5,8795	165,79	21,781
Kalibrasyon eğrisinin kesim noktası, μA	0,4193	0,3476	1,0453	0,0255
Gözlenebilme sınırı (LOD), nM	0,48	1,76	0,0411	0,7261
Tayin sınırı (LOQ), nM	1,59	5,92	0,1371	2,4203
Regresyon katsayısı (R^2)	0,9971	0,9932	0,9828	0,9776
Gün içi akım tekrarlanabilirliği (%BSS)	4,38	1,20	3,57	2,72
Gün içi potansiyel tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,11	1,02	0,29	0,35
Günler arası akım tekrarlanabilirliği (%BSS)	2,18	8,30	2,19	5,29
Günler arası potansiyel tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,38	4,14	3,08	0,60

4.3.4.3 Girişim etkisi

MTK tayini için Kil/KPE elektrodu yardımıyla geliştirilmiş olan voltametrik yöntemlere, biyolojik ortamda bulunması muhtemel olan bazı türlerin girişim etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla askorbik asit, ürik asit, dopamin, L-sistein, L-glutamik asit ve glikoz gibi elektrotaktif özelliği bulunan türlerin girişim etkisi araştırılmıştır. MTK'nın belli bir derişimde bulunduğu ortama, girişim yapan türün derişimi MTK'nın derişiminden 100 kat fazla olacak şekilde ilave edilmiş ve AdsKDV ile elde edilen pik akımları eşitlik 4.3 yardımıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 4.19'da sunulmuştur.

Çizelge 4.19’da görüldüğü gibi ürik asit dışındaki diğer türlerin derişimlerinin MTK’nın derişiminden 100 kata kadar fazla olmasının, MTK’nın yükseltgenme sinyaline herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ancak ürik asidin voltametrik yükseltgenmesine ait olan pik potansiyeli MTK’nın yükseltgenme pik potansiyeli ile üst üste çakışmakta ve MTK’nın akımını arttırmaktadır (Şekil 4.41). Bu durum ise ürik asitin MTK’nın geliştirilen yöntemlerle tayinine girişim yaptığını göstermektedir.

Çizelge 4.19 MTK’nın AdsKDV ile tayinine girişim yapması muhtemel türlerin etkisi

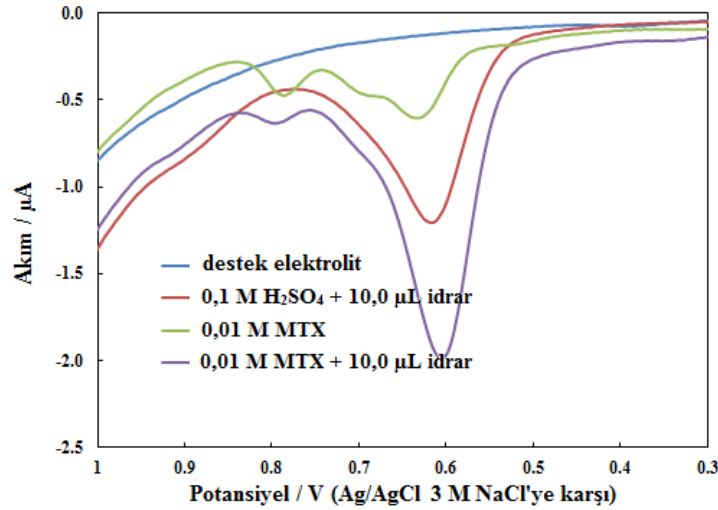
Girişim yapabilecek tür	% Δi_p
Askorbik asit	4,21
Ürik asit	-85,14
Dopamin	-2,58
L-sistein	13,39
L-glutamik asit	5,16
Glikoz	3,52

4.3.4.4 Geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelere uygulamaları

MTK için yapılmış olan kalibrasyon ve girişim çalışmalarından (Bölüm 4.3.4.1, 4.3.4.2 ve 4.3.4.3) elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, Kıl/KPE yüzeyi ve ilgili yöntemler yardımıyla MTK’nın serum ve flakon örneklerinde tayini gerçekleştirilmiştir. Serum ve flakon örnekleri bölüm 3.6 ve 3.7’de anlatıldığı şekilde analize hazırlanmıştır.

Bölüm 4.3.4.3’de görüldüğü gibi MTK için geliştirilmiş olan yöntemlere idrar ortamında yüksek derişimlerde bulunan ürik asitin girişim yaptığı görülmüştür. Şekil 4.41’de görüldüğü üzere ortama idrar örneği ilave edildiğinde idrarın içeriğinde bulunan ürik asit ile MTK’ya ait P_1 ’in hemen hemen aynı potansiyel değerinde yükseltgenme

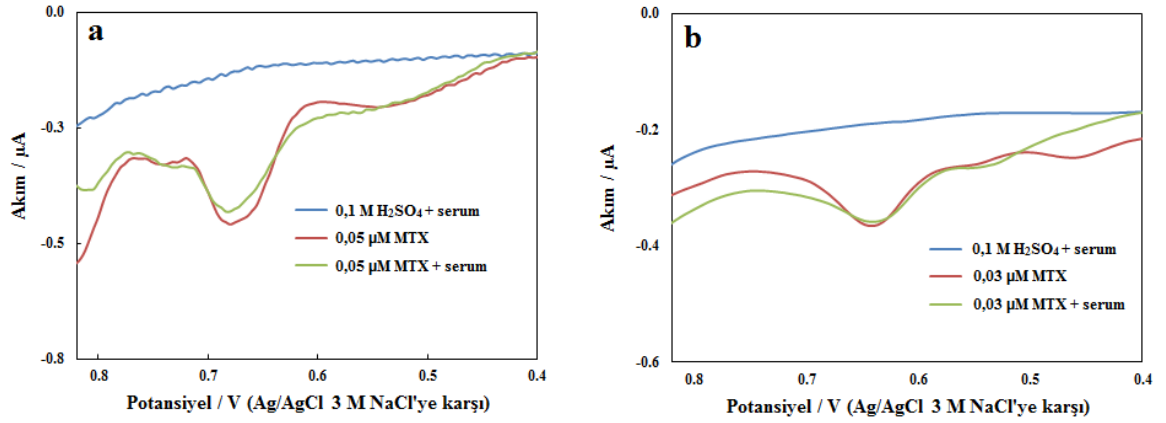
piki verdiği görülmektedir. Bu durum ise, MTK için geliştirilmiş olan ortam şartlarında idrar içeren numunelerde tayin edilemeyeceğini göstermektedir.



Şekil 4.41 MTK'nın idrar içeren ve idrar içermeyen ortamlarındaki AdsKDV voltamogramları

Geliştirilen yöntemlerin serum ortamında geri kazanım çalışmalarının yapılması amacıyla, MTK'nın serum içeren ve serum içermeyen ortamlarda her iki yöntemle voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.42). Serum numunelerinde geri kazanım çalışmaları üç farklı derişimde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar yaklaşık olarak %100 civarında bulunmuştur (Çizelge 4.20). Bu geri kazanım sonuçlarına göre, serum içeren ortamda MTK'nın tayini başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Serum içeren ortamlarda olduğu gibi, piyasada MİTOKSANTRON adıyla bulunan flakon örneği ile geri kazanım çalışmaları yapılarak geliştirmiş olduğumuz yöntemlerin doğruluğu teyid edilmiştir. Bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan numunelerden elde edilen sonuçların doğrudan kalibrasyon eğrileri yardımıyla % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.21). Standart MTK ve flakon örneklerinin aynı derişimlerdeki çözeltilerinden her iki yöntemle kaydedilmiş voltamogramları ise şekil 4.43'de verilmiştir.



Şekil 4.42 MTK tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin serum içeren ve serum içermeyen ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları

a. AdsDPV b. AdsKDV

Çizelge 4.20 MTK tayini için serum ortamında AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri

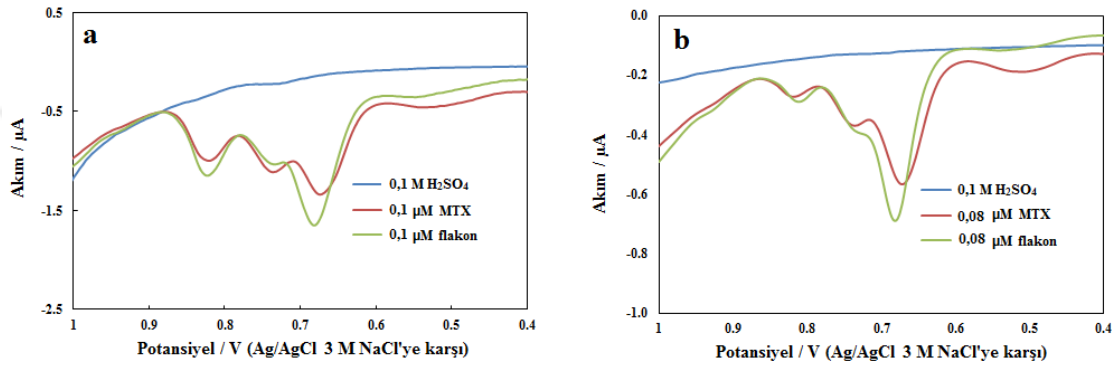
Yöntem	Eklenen Derişim, μM	Bulunan Derişim, μM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
AdsKDV	0,030	0,0317; 0,0318; 0,0334	107,68	2,99
	0,050	0,0504; 0,0465; 0,0483	96,77	4,06
	0,080	0,0790; 0,0782; 0,0846	100,79	4,34
AdsDPV	0,010	0,0122; 0,0106; 0,0112	113,61	6,88
	0,030	0,0281; 0,0288; 0,0327	94,82	1,72
	0,050	0,0530; 0,0549; 0,0540	107,94	1,70

* Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**hesaplanmış olan geri kazanım değerleri için verilen bağıl standart sapma

Çizelge 4.21’de görüldüğü üzere, MTK’nın flakon örneklerinden geri kazanım değerleri her iki yöntem için % 102,86 ile % 115,19 aralığında değişmektedir. Bu geri kazanım sonuçlarına göre, geliştirilen voltametrik yöntemlerle MTK’nın flakon örneklerinden voltametrik tayininin başarıyla gerçekleştirildiği görülmektedir.

MTK tayini için Kil/KPE elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsDPV ve AdsKDV yöntemleri, literatürde MTK için geliştirilmiş olan diğer voltametrik yöntemlerle çizelge 4.22’de karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.22’ye bakıldığında MTK için geliştirmiş olduğumuz AdsKDV yönteminin MTK için geliştirilmiş diğer tüm voltametrik yöntemlere göre en düşük gözlenebilme sınırına ve geniş bir doğrusal çalışma aralığına sahip olduğu, AdsDPV yönteminin gözlenebilme sınırının ise birçok voltametrik çalışmaya göre daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.43 MTK tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin flakon ve standart ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları

a. AdsDPV b. AdsKDV

Çizelge 4.21 MTK tayini için flakon örneklerinden AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri

Yöntem	Eklenen μM	Derişim,	Bulunan Derişim, μM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
AdsKDV	0,0140		0,0141; 0,0142; 0,0147	104,00	2,18
	0,0800		0,0791; 0,0817; 0,0890	104,10	6,21
	0,1000		0,1218; 0,1128; 0,1109	115,19	5,07
AdsDPV	0,0140		0,0136; 0,0148; 0,0147	102,86	4,67
	0,0800		0,0869; 0,0843; 0,0795	104,46	4,47
	0,1000		0,1091; 0,1052; 0,1011	105,14	3,79

* Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**hesaplanmış olan geri kazanım değerleri için verilen bağıl standart sapma

Çizelge 4.22 MTK tayini için geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerin literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması

Elektro t	Yöntem	Doğrusal çalışma aralığı, nM	LOD, nM	Uygulaması	Kaynak
Hg-CFUME	AdsV	0,5 -20,0	0,50	Serum ve idrar	Pozo vd. 1993
KPE	AdsV	0,05 – 0,7	-	idrar	Villar vd. 1993
Hg	AdsV	-	0,05	idrar	Villar vd. 1993
Hg/C-ME	AdsDPV	1,3 - 10000	0,10	-	Mandong 1995
CKE	KDV	100,0 - 1000	100,0	-	Brett vd. 1999
Co-C-MUME	DV ve DTV	200,0 - 6000	42,0	idrar	Mao vd. 2000
Ni/CKE	LSV		18,0	idrar	Bo vd. 2001
Pt/C-MME	DTV	70 – 900	40,0	idrar	Qian vd. 2004
	CV	1000 - 10000			
ÇDKNT/ME	-	28,0 - 1100	5,60	MTK içeren flakon	Yang vd. 2006
CS/Grafen/CKE	DPV	0,6 - 1000	0,20	idrar	Hong vd. 2012
Kil/KPE	AdsKDV	0,13 - 100	0,04	Serum, idrar ve flakon	Tez çalışması
Kil/KPE	AdsDPV	2,4 - 100	0,73	Serum, idrar ve flakon	Tez çalışması

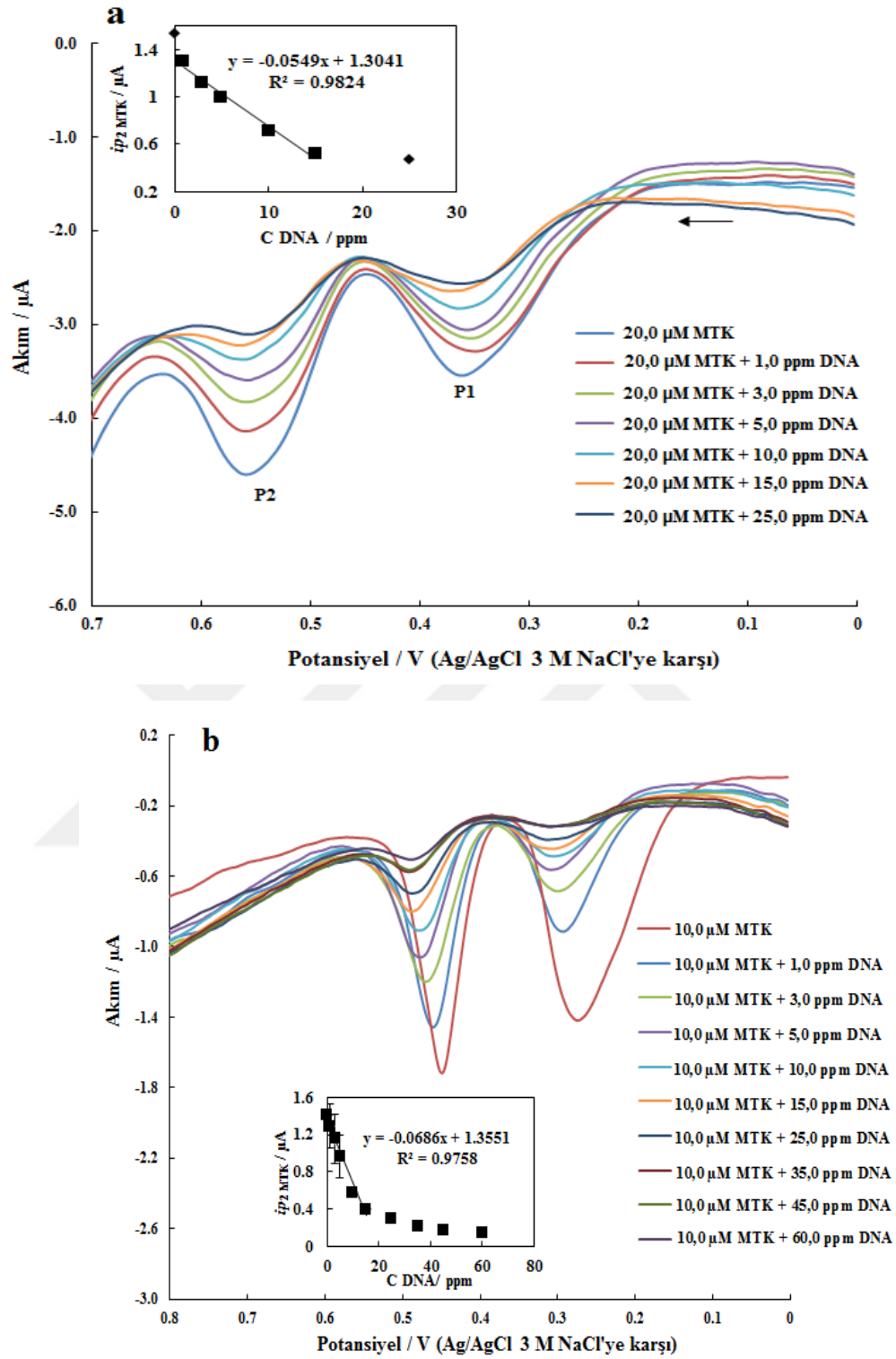
4.3.5 MTK'nın ds-DNA ile etkileşiminin DV ve DPV yöntemleri ile incelenmesi

MTK-DNA etkileşimi, çözelti ortamında iki fizyolojik pH olan 4,8 (Asetat tamponu) ve 7,4 (Fosfat tamponu) ortamlarında DPV ve DV yöntemleriyle ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

4.3.5.1 DPV yöntemi ile elde edilen bulgular

MTK-dsDNA etkileşiminin pH 4,8 ve 7,4'de incelenmesi

Meme kanseri, bazı lenfoma ve lösemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan MTK'nın DNA ile etkileşiminin incelenmesi önem arz etmektedir. Bu etkileşimi çözelti ortamında incelemek amacıyla 10,0 μ M MTK içeren ortamlara bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan stok DNA çözeltisinden belli derişimlerde (1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0; 35,0; 45,0; 60,0 ppm) eklemeler yapılmıştır. MTK'nın pik potansiyeli ve akımındaki değişimler DPV yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlar ve grafikler şekil 4.44.a,b'de verilmiştir. Şekil 4.44.a incelendiğinde, 1,0 ile 15,0 ppm aralığında eklenen DNA derişimine paralel olarak MTK'nın pik akımının doğrusal bir şekilde azaldığı ve DNA derişimi artmaya devam ettikçe okunan akım değerinin hemen hemen sabit kaldığı dikkat çekmektedir. Yine eklenen DNA derişimine karşı pik potansiyelindeki değişmeye bakıldığında, P_1 ve P_2 'nin pik potansiyellerinin bir miktar pozitif kaydığı görülmektedir. Şekil 4.44.b'deki (pH 7,4'de) voltamogramlar incelendiğinde ise, MTK'nın her iki pikine ait DPV pik akımlarının eklenen DNA derişimi ile doğrusal bir şekilde azaldığı ve 25,0 ppm DNA eklenmesinden sonra ise hemen hemen sabit kaldığı görülmektedir. Her iki pike ait pik potansiyellerinin ise artan DNA derişimi ile belirgin bir şekilde daha pozitif değerlere kaydığı görülmektedir. Bu verilere göre MTK'nın her iki fizyolojik pH değerinde de DNA ile etkileşim içinde olduğu sonucuna varılmıştır (Li vd. 2005).



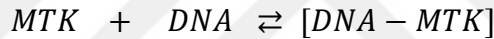
Şekil 4.44 MTK'nın pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları

iç grafik: $C_{\text{DNA}} - i_{p2\text{MTK}}$ grafiği a. pH 4,8 b. pH 7,4

Yukarıda anlatıldığı üzere MTK'nın potansiyeli, artan DNA derişimi ile her iki ortamda da bir miktar pozitive kaymaktadır. Yapılan literatür araştırmasında bu potansiyel değişiminin olması DNA ile ilaç etkileşiminin interkalasyon ile olabileceğini belirtmektedir (Li vd. 2005, Enache vd. 2015).

4.3.5.2 MTK - DNA etkileşiminin bağlanma sabitinin (K) DPV ile hesaplanması

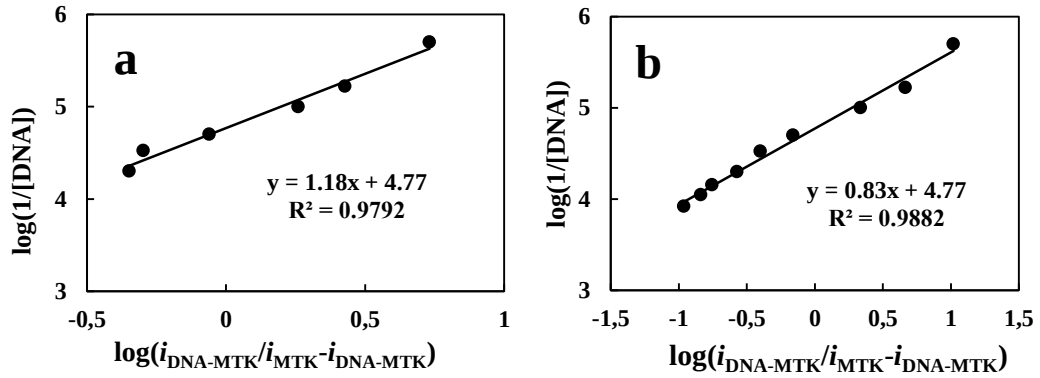
MTK ve DNA arasındaki etkileşimin bağlanma sabitinin hesaplanması amacıyla her iki ortamda DPV yöntemi ile elde edilen akım verilerden yararlanılmıştır. Bu amaçla artan DNA derişimi ile MTK'nın pik akımındaki değişimlerden ve bölüm 2.3.2'de verilmiş olan eşitlik 2.12'den yararlanılarak DNA ve MTK arasındaki bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. Burada DNA ve MTK'nın çözelti ortamında aşağıdaki reaksiyona göre bir kompleks oluşturduğu düşünülmüştür;



Burada ev sahibi MTK, misafir ise eklenen DNA molekülleridir. Buna göre, her bir eklemekten sonra hesaplanan $\log(\frac{i_{MTK-DNA}}{i_{MTK}-i_{MTK-DNA}})$ değerine karşılık $\log(1/DNA)$ derişimleri grafiğe geçirilmiş ve şekil 4.45.a,b'de verilmiştir. Şekil 4.45'deki grafiklerin kesim noktaları yardımıyla DNA ile MTK arasında oluşan kompleksin bağlanma sabiti hesaplanmış ve Çizelge 4.23'de vermiştir. Literatürde DNA ve ilaç molekülleri arasındaki etkileşimin bağlanma sabiti değerleri 10^4 - 10^6 M⁻¹ aralığında olduğunda ilaç moleküllerinin DNA ile interkalasyon yoluyla etkileştiği belirtilmiştir (Temerk vd. 2016). Buna göre bu tez çalışmasında MTK için belirlenen K sabitinin (Çizelge 4.23) yukarıda bahsedilen aralıkta olması, MTK-DNA arasındaki etkileşimin interkalasyon yolu ile olabileceğini düşündürmüştür.

DNA ile MTK arasında oluşan kompleksin Standart Gibbs serbest enerjisi (ΔG^0), yukarıda bulunan K bağlanma sabiti değeri eşitlik 2.13'de yerine koyularak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.23'de verilmiştir. Burada, ΔG^0

değerlerinin her iki ortamda da negatif değerde olması, DNA ile MTK arasındaki etkileşimin kendiliğinden yürüdüğünü göstermektedir (Temerk vd. 2016).



Şekil 4.45 $\log(\frac{i_{MTK-DNA}}{i_{MTK} - i_{MTK-DNA}})$ - $\log(1/[DNA])$ grafikleri

a. pH: 4,8 b. pH: 7,4

4.3.5.3 DV yöntemi ile elde edilen bulgular

MTK'nın DNA ile etkileşimi DV yöntemi ile de yine iki farklı fizyolojik pH değerinde (4,8 ve 7,4) $1,0 \times 10^{-5}$ M MTK içeren ortamlarda incelenmiştir. DNA içermeyen ve 35 ppm DNA içeren ortamlarda yapılmış olan tarama hızı çalışması ile MTK ve MTK-DNA kompleksinin difüzyon katsayısı (D), MTK'nın elektrot yüzey derişimi (I) ve reaksiyonun standart heterojen hız sabiti (k_s) değişkenleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Hesaplamalara ilişkin ayrıntılar aşağıda sunulmuş olup sonuçlar çizelge 4.23'de listelenmiştir.

Difüzyon katsayısının (D) hesaplanması

Yapılan tarama hızı çalışması sonuçlarına göre, elde edilen $i_p-v^{1/2}$ grafiğinin eğimi, tersinmez ve yarı tersinir sistemler için geçerli olan eşitlik 2.4'den yararlanarak MTK'nın DNA içermeyen çözelti ortamında ve bu ortama belli derişimde DNA ilavesi

yapılarak difüzyon katsayıları hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 4.23’de sunulmuştur. Çizelge 4.23’de görüldüğü gibi MTK’nın pH 4,8’de, çözelti ortamında serbest haldeyken hesaplanan difüzyon katsayısı $1,39 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ iken, DNA ilave edildiğinde $5,8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ’e düşmektedir. pH 7,4 ortamındaki difüzyon katsayısı değerleri incelendiğinde ise, DNA içermeyen ortamda MTK için hesaplanan difüzyon katsayısı $3,1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ iken, ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $8,0 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ’e düşmektedir. Bu sonuçlara göre, ortamda DNA bulunduğunda MTK’nın elektrot yüzeyine olan difüzyonunun azaldığı ve DNA ile MTK’nın çözelti ortamında etkileştiğini söylenebilir.

Standart heterojen hız sabitinin (k_s) hesaplanması

Tarama hızı verilerinden hareket edilerek çizilmiş olan $\ln v - E_p$ grafiğinin eğimi ve Eşitlik 2.5’den yararlanarak DNA içeren ve DNA içermeyen ortamlarda MTK’nın k_s değerleri hesaplanmış olup sonuçlar çizelge 4.23’de sunulmuştur. Çizelge 4.23’de görüldüğü üzere MTK’nın pH 4,8’de hesaplanan k_s değeri, MTK serbest halde iken $0,78 \text{ s}^{-1}$ ’dir. Ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $0,80 \text{ s}^{-1}$ olmaktadır. pH 7,4’de ise serbest halde MTK için k_s değeri $0,80 \text{ s}^{-1}$ iken DNA eklendiğinde ise $0,78 \text{ s}^{-1}$ olduğu görülmektedir. Bu değerlerin birbirine yakın olması MTK’nın elektrokimyasal özelliğinde herhangi bir değişiklik olmadığı ve MTK’nın DNA ile oluşturduğu kompleksin elektroaktif özellik göstermediği şeklinde yorumlanabilir (Jiao vd. 2005).

MTK’nın elektrot yüzey derişimin (Γ) hesaplanması

Tarama hızı çalışması ile elde edilen akım değerleri tarama hızına karşı grafiğe geçirilerek elde edilen eğim ve Eşitlik 2.7 yardımıyla MTK için her iki ortamda da Γ değerleri hesaplanmış ve çizelge 4.23’de verilmiştir. Çizelge 4.23’de görüldüğü gibi pH 4,8’de MTK serbest halde iken bulunan Γ değeri $7,82 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ iken ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $4,31 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ ’ye düşmektedir. pH 7,4’de ise bu değerler sırasıyla $3,32 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ ve $5,90 \times 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2}$ ’dir.

Bu sonuçlara göre, daha önce belirtildiği üzere MTK ile DNA'nın çözelti ortamında etkileşim içinde olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.23 MTK-DNA etkileşimi için hesaplanan Difüzyon katsayısı (D), heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (Γ), bağlanma sabiti (K) ve standart Gibbs serbest enerji ΔG^0 değerleri

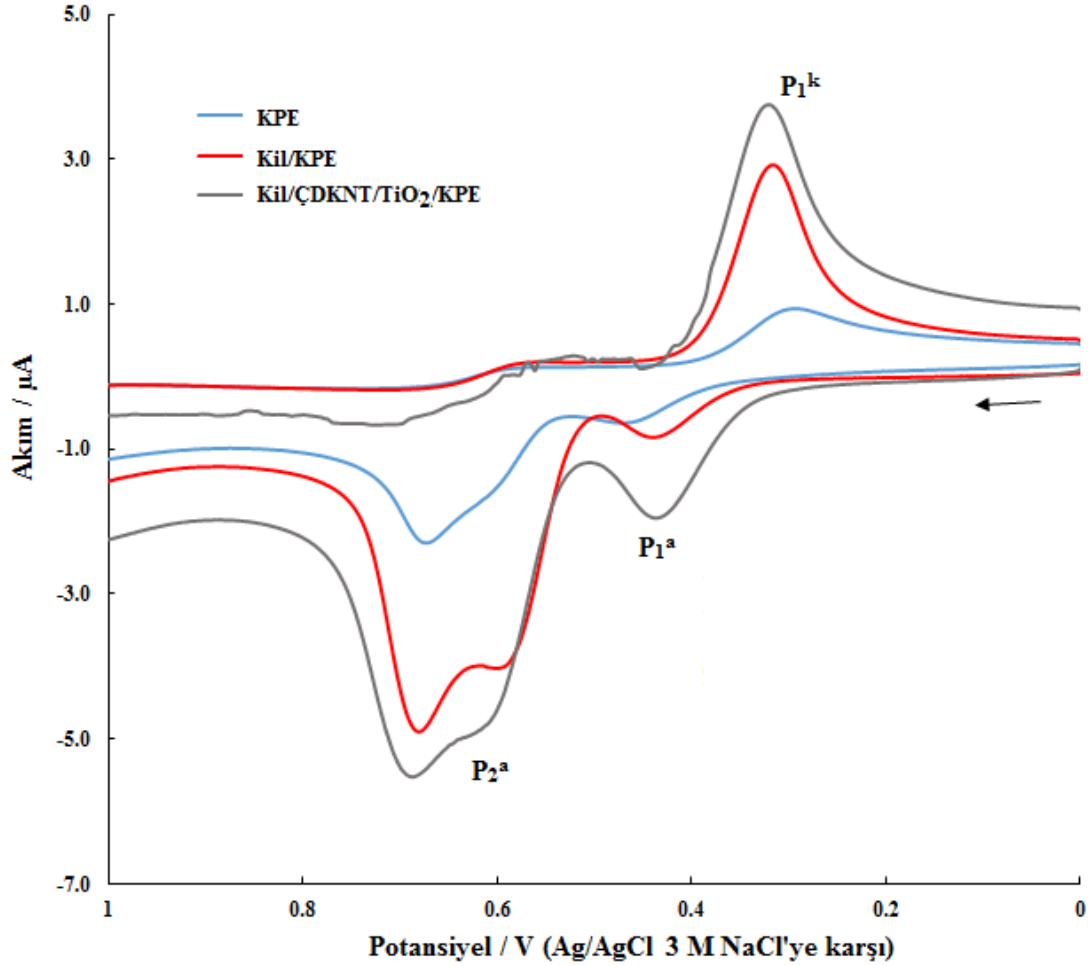
pH	Ortam bileşimi	D (cm ² s ⁻¹) ×10 ⁻⁶	k_s (s ⁻¹)	Γ (mol cm ⁻²) ×10 ⁻¹²	K (mol ⁻¹ L) ×10 ⁴	ΔG^0 kJ mol ⁻¹
4,8	MTK	13,9(±8,0)	0,78(±0,06)	7,82(±0,97)	5,37	-26,98
	MTK + DNA	5,8(±0,7)	0,80(±0,06)	4,31(±0,78)		
	MTK	3,1(±0,4)	0,80(±0,19)	3,32(±0,76)		
7,4	MTK + DNA	0,08(±0,01)	0,78(±0,13)	0,56(±0,76)	5,37	-26,98

4.4 Etoposid (ETP) ile İlgili Yapılan Voltametrik Çalışmalar

4.4.1. ETP'nin elektrokimyasal davranışının DV ile incelenmesi

ETP'nin elektrokimyasal davranışı, bölüm 4.1'de elektrokimyasal özellikleri incelenmiş olan Kıl/KPE, Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE ve KPE elektrot yüzeylerinde pH 2,0 (BR tamponu) ortamında incelenmiştir. Bu amaçla 0,0 ile 1,0 V'luk potansiyel aralığında ve 0,1 V/s tarama hızında $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP'nin votamogramları kaydedilmiştir. Şekil 4.46'da görüldüğü gibi, ETP'nin yükseltgenmesine ait yaklaşık olarak 0,4 V'da birinci yükseltgenme piki (P_1^a) ve yaklaşık olarak 0,7 V'da ikinci yükseltgenme pikine (P_2^a) rastlanmıştır. Geri potansiyel taramasında (1,0 ile 0,0 V) ise yaklaşık olarak 0,340 V civarında 1. yükseltgenme pikine ait bir indirgenme pikine (P_1^k) rastlanmıştır. Bu piklere ait akım, potansiyel, ΔE_p ve i_p^k/i_p^a değerleri Çizelge 4.24'de verilmiştir. Şekil 4.46 ve çizelge 4.24'e göre ETP'ye ait her iki pikin pik akımlarının en yüksek Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde elde edildiği görülmektedir. Ayrıca ETP'nin birinci yükseltgenme piki için bu elektrot yüzeyindeki ΔE_p ve i_p^k/i_p^a değerleri incelendiğinde üç bileşenli modifiye elektrot yüzeyindeki tersinirliğinin, elektron aktarım hızının Kıl/KPE

ve KPE'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE'un ETP'ye ait her iki pik için de en uygun elektrot olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 4.46 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP'nin Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE, Kil/KPE ve KPE elektrotlarında kaydedilmiş dönüşümlü voltamogramları

(pH: 2,0, v : 0,1 V/s)

En uygun modifiye elektrodun 3 bileşenli olması sebebiyle, ETP'nin elektrokimyasal yükseltgenme piki üzerine elektrot bileşiminin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla modifiyerlerin herbirinin bileşim yüzdesi % 3,0 (1,0 mg/30,0 mg pasta) ile % 13,0 (4,0

mg/30,0 mg pasta) arasında değiştirilmiştir. Her bir bileşenin yüzde miktarları ise çizelge 4.25-4.27’de verilmiştir.

Çizelge 4.24 Modifiye KPE’lerin $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP ortamındaki elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

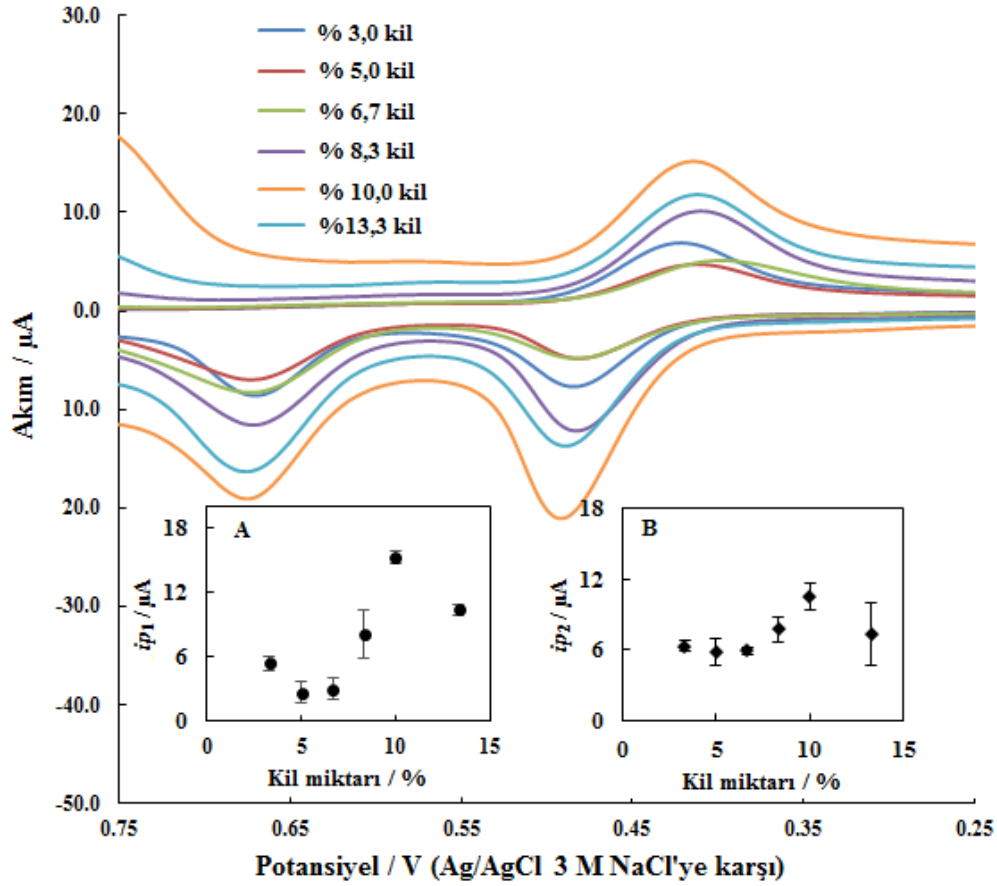
Pik	Elektrot	$i_p^k, \mu A$	$i_p^a, \mu A$	E_p^k, V	E_p^a, V	$\Delta E_p, V$	i_p^k/i_p^a
P₁	KPE	0,77	0,15	0,29	0,46	0,17	5.13
	Kil/KPE	2,72	0,77	0,32	0,44	0,12	3.53
	Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	3,51	1,30	0,32	0,43	0,11	2.70
P₂	KPE	-	1,824	-	0,624	-	-
	Kil/KPE	-	3,980	-	0,680	-	-
	Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	-	4,170	-	0,686	-	-

İlk olarak elektrot bileşenlerinden (diğerleri sabit tutulmak üzere) sepiyolit kilin miktarı değiştirilmiş ve her bir farklı kil miktarlarında $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP içeren ortamda Dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.47). Şekil 4.47 incelendiğinde % 10,0 oranında kil içeren 3 bileşenli modifiye elektrot yüzeyinde en yüksek pik akımının elde edildiği görülmektedir. Bu sonuca göre en uygun kil miktarının % 10,0 olduğuna karar verilmiştir.

Kil miktarı belirlendikten sonra, diğer bir modifiyer olan TiO₂ nanoparçacıklarının miktarı da yine aynı bileşim aralığında değiştirilmiş olup elde edilen grafikler ve voltramogramlar şekil 4.48’de verilmiştir.

Şekil 4.48 iç grafikte görüldüğü gibi TiO₂’nin bileşimi % 3,0’den % 10,0 kadar arttırıldığında ETP’nin her iki pikine ait pik akımlarının da sürekli olarak arttığı görülmektedir. TiO₂ miktarı % 10,0’dan % 13,0’e çıkarıldığında ise ETP’nin pik akımlarında hemen hemen %50,0 civarında bir düşüşün olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre en uygun TiO₂ miktarı %10,0 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.26).

En uygun ÇDKNT miktarını belirlemek amacıyla, ÇDKNT bileşimi de yine aynı aralıkta değiştirilmiş ve DV yöntemi ile voltamogramlar kaydedilmiştir. Diğer bileşenlerin oranları ise çizelge 4.27’de görüldüğü şekilde sabit tutulmuştur. İlgili voltamogramlar ve grafikler şekil 4.49’da verilmiştir.

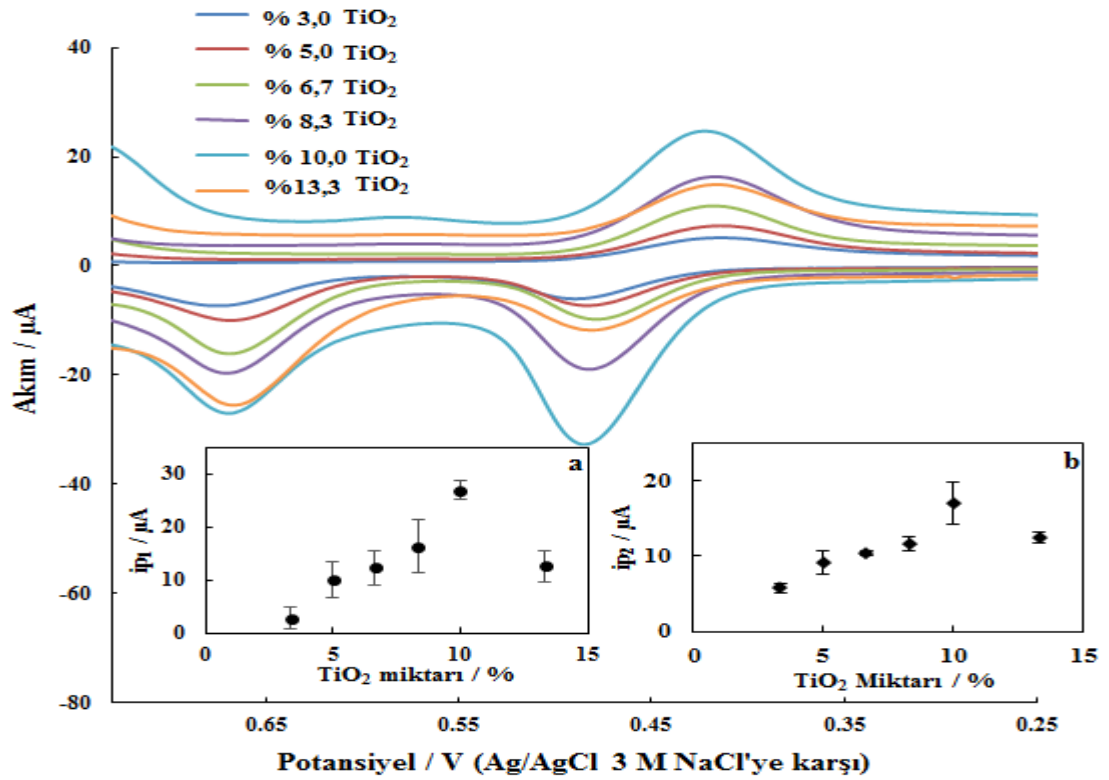


Şekil 4.47 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP farklı yüzelerde kil içeren elektrot yüzeylerindeki dönüşümlü voltamogramları

İç grafik: A. % Kil miktarı - i_{p1} B. % Kil miktarı - i_{p2}

Çizelge 4.25 Kil miktarı optimizasyonunda elde edilen her bir bileşenin % oranları

Grafit tozu, %	Kil, %	TiO ₂ , %	ÇDKNT, %
91,0	3,0	3,0	3,0
89,0	5,0	3,0	3,0
87,3	6,7	3,0	3,0
85,7	8,3	3,0	3,0
84,0	10,0	3,0	3,0
80,7	13,3	3,0	3,0



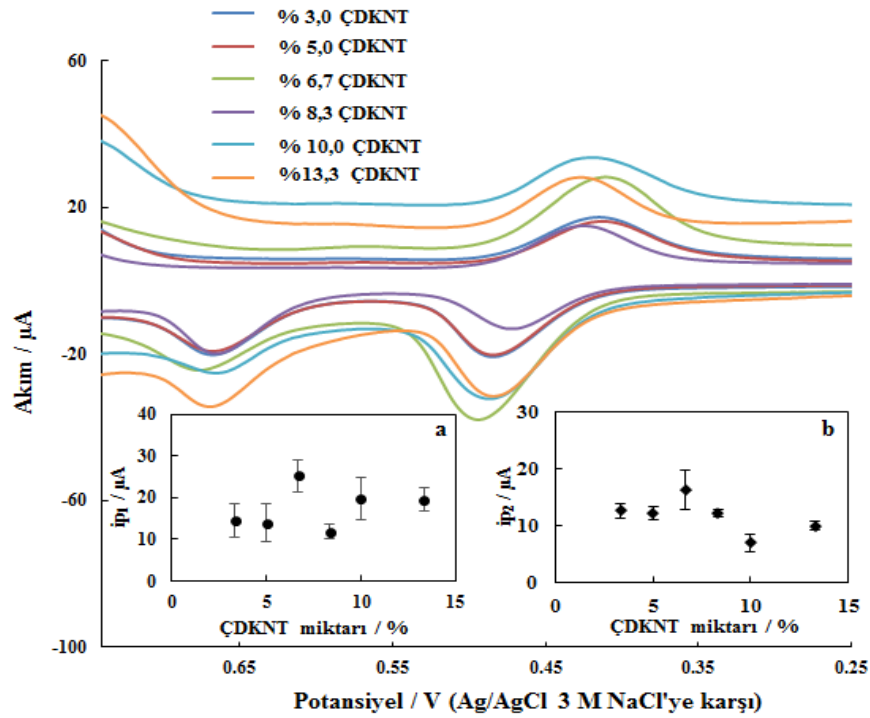
Şekil 4.48 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP içeren ortamda farklı TiO₂ yüzdelерinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları

İç grafik: a. % TiO₂ miktarı - i_{p1} b. % TiO₂ miktarı - i_{p2}

Şekil 4.49'daki voltamogramlar ve grafikler incelendiğinde, ÇDKNT miktarı % 6,7 olduğunda her iki pik için de en yüksek pik akımı elde edilmiştir. Bu sonuca göre, en uygun ÇDKNT miktarı % 6,7 (2,0 mg ÇDKNT/30,0 mg pasta) olarak belirlenmiştir. Böylece üç bileşenli elektrot olan Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE'un en uygun % bileşimleri belirlenmiş ve bu oranlar çizelge 4.28'de verilmiştir.

Çizelge 4.26 TiO₂ miktarı optimizasyonunda elde edilen her bir bileşenin % oranları

Grafite tozu, %	Kil, %	TiO ₂ , %	ÇDKNT, %
84,0	10,0	3,0	3,0
82,0	10,0	5,0	3,0
80,3	10,0	6,7	3,0
78,7	10,0	8,3	3,0
77,0	10,0	10,0	3,0
73,7	10,0	13,3	3,0



Şekil 4.49 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP içeren ortamda farklı ÇDKNT yüzdelerinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları

İç grafik: a. %ÇDKNT miktarı - i_{p1} b. % ÇDKNT miktarı - i_{p2}

Çizelge 4.27 ÇDKNT miktarı optimizasyonunda elde edilen her bir bileşenin % oranları

Grafit tozu, %	Kil, %	TiO ₂ , %	ÇDKNT, %
77,0	10,0	10,0	3,0
75,0	10,0	10,0	5,0
73,3	10,0	10,0	6,7
71,7	10,0	10,0	8,3
70,0	10,0	10,0	10,0
66,7	10,0	10,0	13,3

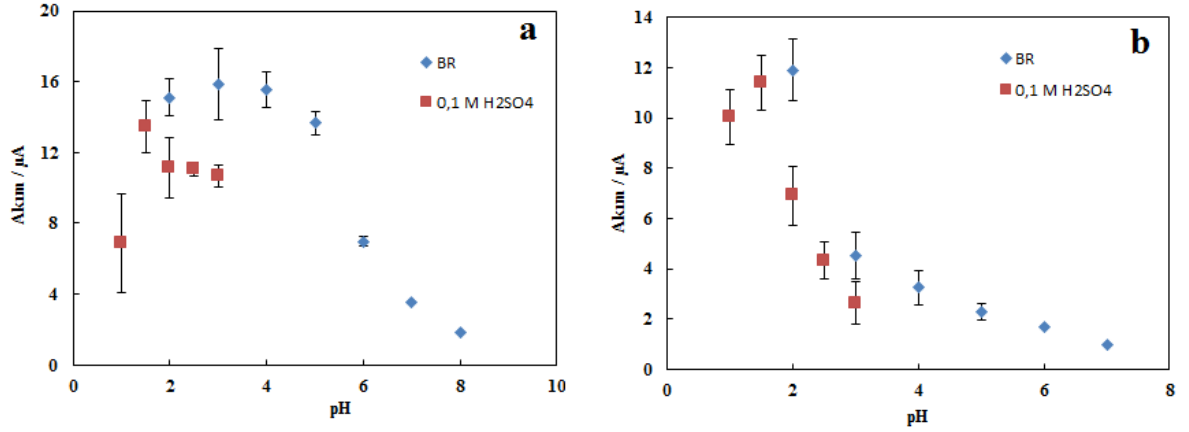
Çizelge 4.28 Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE için en uygun bileşim yüzdeleri

Grafit tozu, %	Kil, %	TiO ₂ , %	ÇDKNT, %
73,3	%10,0	%10,0	%6,7

4.4.2 Destek elektrolit seçimi ve pH'ın belirlenmesi

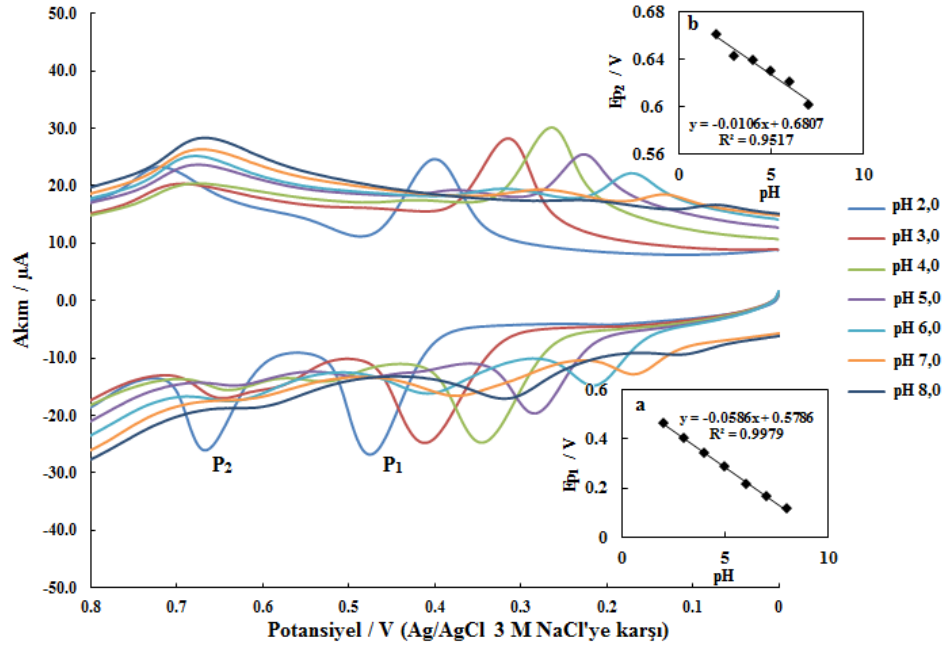
ETP'nin Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde elektrokimyasal davranışını ayrıntılı olarak incelemek için her iki yükseltgenme pik akımı ve pik potansiyeline pH'nın ve elektrolit ortamının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla ilk olarak geniş bir pH çalışma aralığına sahip olan (2,0 - 12,0) universal BR tamponu kullanılmış ve $5,0 \times 10^{-5}$ M ETP'nin 1,0'er pH birimi aralığında Dönüşümlü voltamogramları kaydedilerek pik akımları okunmuştur (Şekil 4.50). Şekil 4.50.a'da görüldüğü gibi en yüksek pik akımı ve pik şekli dikkate alındığında, P₁ yükseltgenme piki için pik akımlarının pH 2,0 ile 4,0 arasında hemen hemen aynı olduğu, pH 4,0'den sonra ise düşmeye başladığı görülmüştür. P₂ yükseltgenme pik akımı için ise, pH 2,0'den 3,0'e doğru ani bir düşüş olduğu ve sonra pH 7,0'ye kadar düşmeye devam ettiği görülmektedir (Şekil 4.50.b). Bu çalışmalar ışığında her iki pikin de asidik bölgede yüksek akımlar vermesinden dolayı 0,1 M H₂SO₄ ile pH taraması yapılmıştır (Şekil 4.50.a,b). H₂SO₄ ortamında ETP için elde edilen akımların BR tamponuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Buna göre, her

iki pik için de en uygun pH'nın BR tamponunda 2,0 olduğu sonucuna varılmıştır. BR ortamında farklı pH değerlerinde elde edilen voltamogramlar şekil 4.51'de verilmiştir.



Şekil 4.50 $5,0 \times 10^{-5}$ M ETP için pH- i_p grafikleri

a. P_1 , b. P_2 (v : 0,1 V/s)

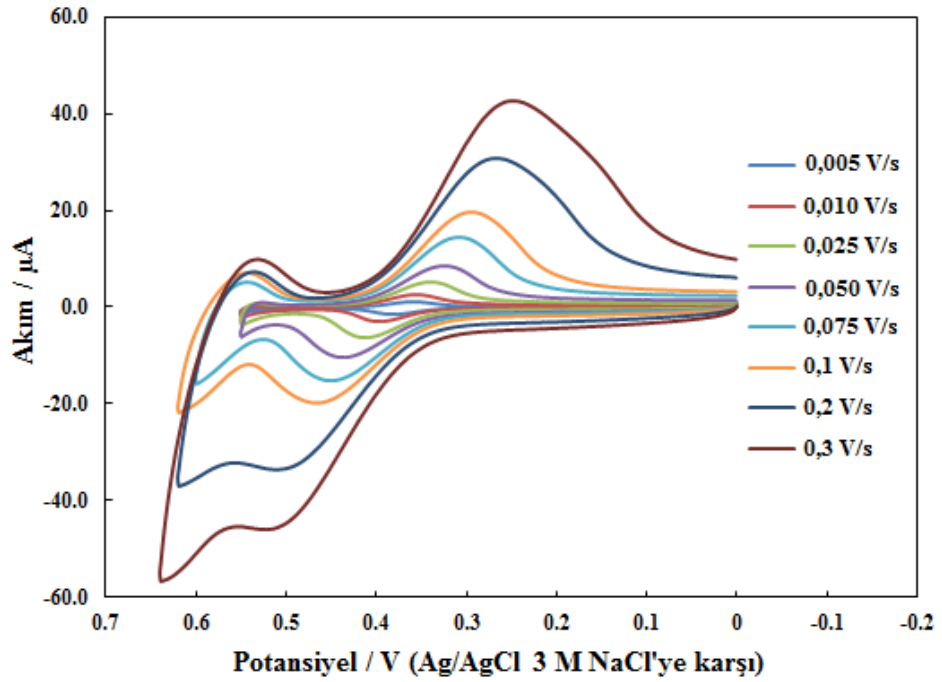


Şekil 4.51 ETP'ye ait P_1 ve P_2 yükseltgenme piklerinin pH ile değişimini veren dönüşümlü voltamogramları

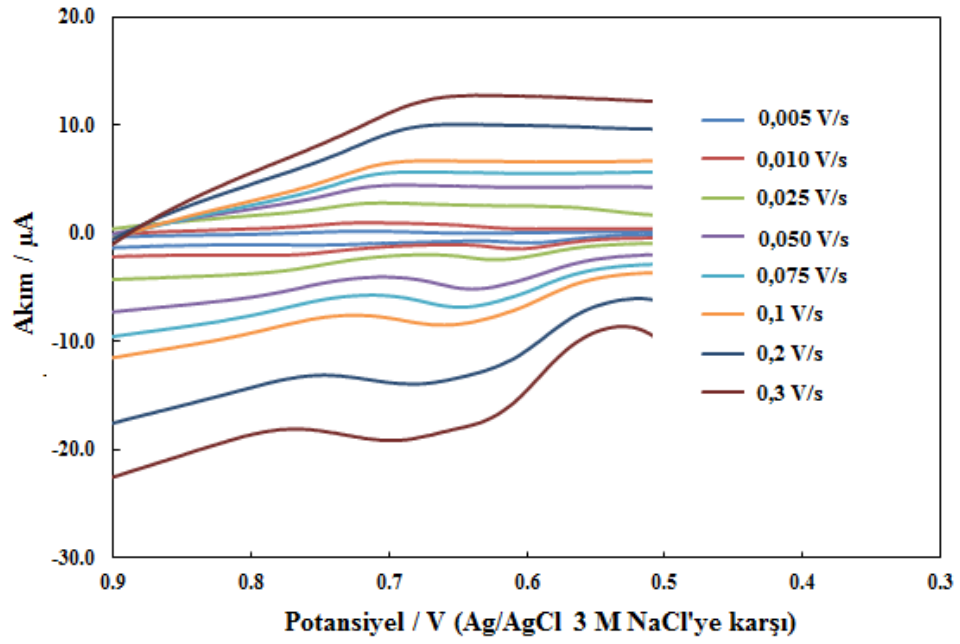
a. $pH - E_{p1}$, b. $pH - E_{p2}$

4.4.3 Tarama hızı çalışması

ETP'ye ait olan P_1 ve P_2 pikleri için en uygun elektrolit ve pH değerleri belirlendikten sonra her iki pik için de DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında yapılan çalışmalar yardımıyla ETP'nin Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde elektrokimyasal davranışı (tersinirlik, yarı tersinirlik, tersinmezlik ve adsorpsiyon özellikleri) ayrıntılı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre de ETP'ye ait elektrot yükseltgenme mekanizması önerilmiştir. Bu çalışmalar için $5,0 \times 10^{-5}$ M ETP içeren ortamda 0,005-0,3 V aralığında tarama hızı çalışması yapılmıştır. Bu aralıkta P_1 ve P_2 yükseltgenme pikleri için kaydedilmiş olan voltamogramlar sırasıyla şekil 4.52-53'de verilmiştir. Bu voltamogramlardan elde edilen elektrokimyasal değişkenler çizelge 4.29-30'da sunulmuştur.



Şekil 4.52 $5,0 \times 10^{-5}$ M ETP ortamında P_1 'in DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları



Şekil 4.53 $5,0 \times 10^{-5}$ M ETP ortamında P_2 'in DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramları

Çizelge 4.29 ETP'nin birinci yükseltgenme piki olan P_1 'in tarama hızı değişimi ile elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

Tarama hızı, V/s	E_p^a , V	E_p^k , V	ΔE_p , V	i_p^a , μA	i_p^k , μA	i_p^k/i_p^a
0,005	0,38	0,36	0,02	1,25	1,06	0,85
0,010	0,40	0,36	0,04	2,55	2,22	0,87
0,025	0,41	0,34	0,07	5,65	4,82	0,85
0,050	0,44	0,32	0,11	8,97	7,95	0,89
0,075	0,45	0,31	0,14	13,50	13,15	0,97
0,1	0,47	0,29	0,17	17,15	17,85	1,04
0,2	0,50	0,27	0,23	28,55	29,71	1,04
0,3	0,52	0,25	0,27	35,82	39,16	1,09

Çizelge 4.30 ETP'nin ikinci yükseltgenme piki olan P₂'in tarama hızı değişimi ile elektrokimyasal karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

Tarama hızı, V/s	E_p^a , V	E_p^k , V	i_p^a , μ A	i_p^k , μ A
0,005	0,59	-	0,42	-
0,010	0,60	-	0,65	-
0,025	0,62	-	0,86	-
0,050	0,63	-	1,91	-
0,075	0,64	-	2,16	-
0,1	0,64	-	2,38	-
0,2	0,64	-	3,72	-
0,3	0,66	-	5,29	-

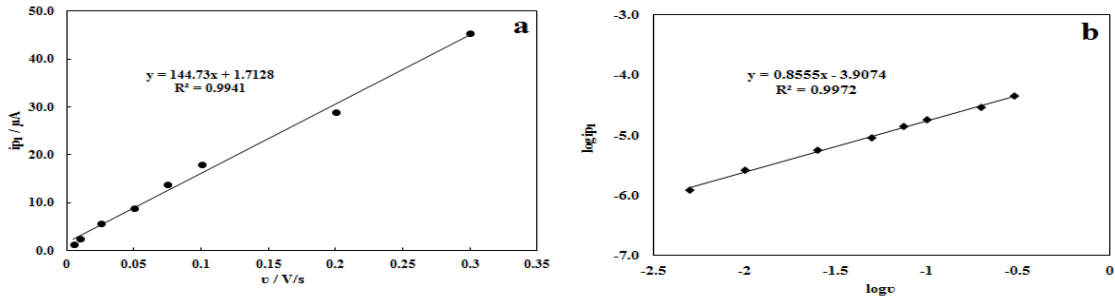
Bu veriler incelendiğinde tarama hızının değişmesiyle, ETP'nin birinci yükseltgenme pikinin (P₁) anodik pik potansiyeli daha pozitif değerlere kayarken katodik pik potansiyeli ise daha negatif değerlere kaymakta olup, bu da pik potansiyelleri arasındaki farkın (ΔE_p) değişmesine sebep olmaktadır. i_p^k/i_p^a oranı ise, tarama hızıyla sabit kalmamaktadır (Şekil 4.52, Çizelge 4.29). Bu sonuçlara göre ise, ETP'ye ait birinci yükseltgenme pikinin (P₁) yarı tersinir bir redoks davranışı gösterdiğini söylemek mümkündür (Bard ve Faulkner 2001).

ETP'nin ikinci yükseltgenme piki olan P₂'nin, şekil 4.46 ve şekil 4.53'de görüldüğü gibi geri potansiyel taramasında herhangi bir indirgenme pikine raslanmamıştır. Tarama hızı ile değişimi incelendiğinde ise, pik potansiyelinin tarama hızıyla daha pozitif değerlere kaydığı Çizelge 4.30'da görülmektedir. Bu sonuçlara göre ETP'nin ikinci yükseltgenme pikinin (P₂) tersinmez bir redoks davranışı gösterdiği söylenebilir (Bard ve Faulkner 2001).

ETP'nin modifiye elektrot (Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE) yüzeyine taşınmasının adsorpsiyon ve/veya difüzyon ile olup olmadığı DV ile yine aynı aralıkta (0,0050 - 0,3 V/s) yapılan tarama hızı çalışmaları ile elde edilen pik akımlarının tarama hızıyla değişim grafikleri ($i_p - v$ ve $\log i_p - \log v$) çizililerek incelenmiştir. İlk olarak ETP'nin ilk yükseltgenme

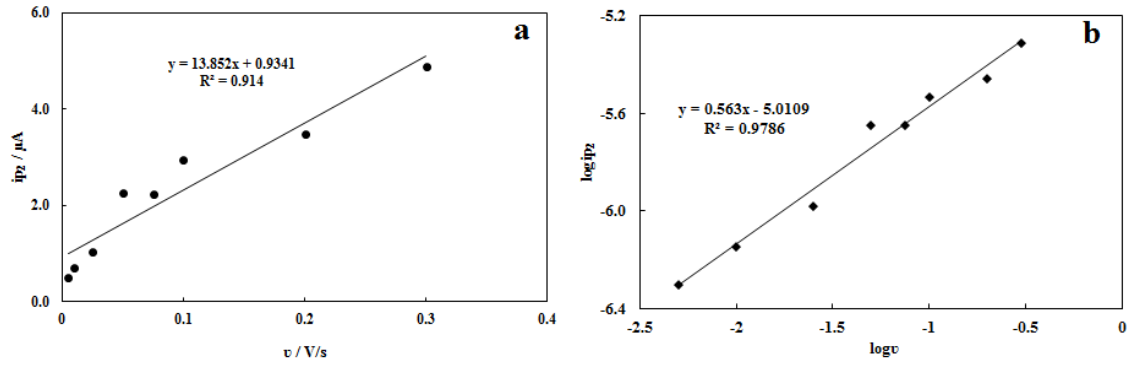
pikinin (P_1) tarama hızı ile değişiminden elde edilmiş olan $i_p - v$ ve $\log i_p - \log v$ grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.54). Şekil 4.54.a'dan da görüleceği üzere pik akımın tarama hızı ile doğrusal olarak değişmesi maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olabileceğini düşündürmektedir (Wang 2006, Bayraktepe vd. 2016). Bu davranışı desteklemek amacıyla pik akımının logaritması ve tarama hızının logaritması ($\log i_p - \log v$) grafiği çizilmiş, bu grafikten elde edilen eğimin 0,86 civarında olduğu görülmektedir (Şekil 4.54.b). $\log i_p - \log v$ grafiğinden elde edilen eğim değeri teorik olarak 0,5 ile 1,0 aralığında değişmektedir. Eğimin 1,0'e yakın olması maddenin elektrot yüzeyine adsorpsiyon ile taşındığını göstermektedir (Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006, Taşdemir 2011). Elde edilen bu sonuçlar ise ETP'ye ait olan P_1 'in adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucunu desteklemektedir.

Benzer şekilde P_2 için de aynı şekilde yapılan tarama hızı verilerinde elde edilen $i_p - v$ ve $\log i_p - \log v$ grafikleri Şekil 4.55.a,b'de verilmiştir. Şekil 4.55.a'dan da görüleceği üzere pik akımın tarama hızı ile doğrusal olarak değişmediği görülmektedir. Bu durum ise ETP'nin ikinci yükseltgenme piki olan P_2 'nin Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyindeki yükseltgenme davranışının difüzyon kontrollü olduğunu düşündürmüştür. Bu davranışı desteklemek amacıyla $\log i_p - \log v$ grafiği çizilmiş olup bu grafikten elde edilen eğimin 0,56 civarında olduğu görülmektedir (Şekil 4.55.b). Elde edilen bu sonuçlar ise ETP'ye ait olan P_2 'nin difüzyon kontrollü olduğu sonucunu desteklemektedir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde ETP'nin birinci yükseltgenme pikinin söz konusu elektrot yüzeyine adsorbe olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 4.54 ETP'ye ait P_1 'in DV ile yapılan tarama hızı verilerinden elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri

$5,0 \times 10^{-5}$ M ETP, tarama hızı 0,005 - 0,3 V/s



Şekil 4.55 ETP'ye ait P_2 'in DV ile yapılan tarama hızı verilerinden elde edilen a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri

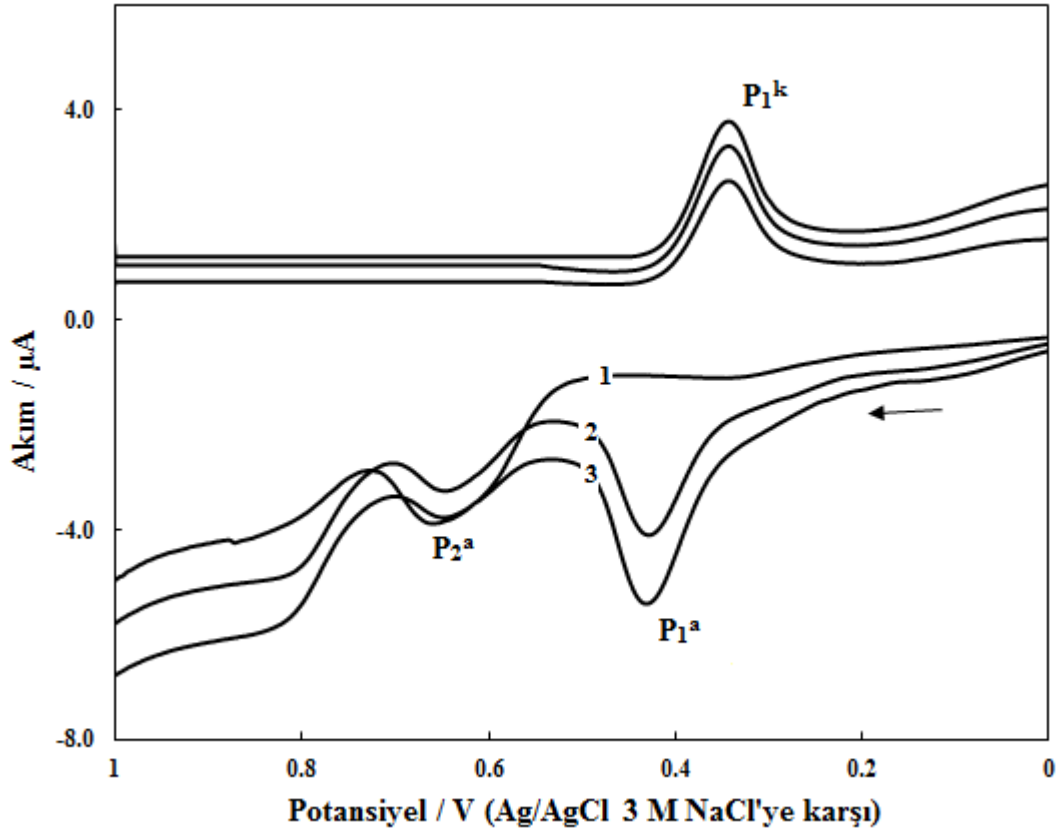
$5,0 \times 10^{-5}$ M ETP, tarama hızı 0,005 - 0,3 V/s

Adsorpsiyon kontrollü olduğu belirlenen P_1 ve difüzyon kontrollü olduğu belirlenen P_2 piklerinin yükseltgenme mekanizmasında aktarılan elektron sayısının belirlenmesi amacıyla P_1 için adsorpsiyon şartlarında geçerli olan Laviron eşitliği (Eşitlik 2.9), P_2 için ise tersinmez sistemlerde ve difüzyon şartlarında geçerli olan eşitlik 2.6 kullanılarak elektrot sayıları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mekanizmalarda yer alan elektron sayıları sırasıyla P_1 için $1,90 \pm 0,59$ P_2 için ise $2,19 \pm 0,69$ olarak hesaplanmıştır.

ETP'nin E_p -pH çalışmaları incelendiğinde (Şekil 4.51) E_{p1} -pH eğiminin Nernstian eğim olan 59,0 mV/pH değerine, E_{p2} -pH eğiminin ise bu değerine yarısına yakın olduğu görülmüştür. Bu durum ETP'nin birinci yükseltgenmesinde (kinon/hidrokinon) aktarılan elektron sayısının proton sayısına eşit olduğunu gösterirken, ikinci yükseltgenme pikinde ise proton sayısının aktarılan elektron sayısının yarısına eşit olduğunu göstermektedir. (David vd. 2016).

ETP'nin elektrot yüzeyindeki yükseltgenme mekanizmasını aydınlatmak amacıyla çok döngülü Dönüşümlü voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.56). Bu voltamogramlarda, iki yükseltgenme piki ve bir indirgenme piki gözlenmiştir. İlk döngüde sadece +0,6 V'da tek bir yükseltgenme piki (P_2^a), indirgenme yönündeki potansiyel taramasında ise +0,35 V'da tek bir indirgenme pikine rastlanmıştır. İkinci döngüde ise, pozitif yöndeki potansiyel taramasında iki yükseltgenme pikinden biri olan +0,4 V'da yeni bir

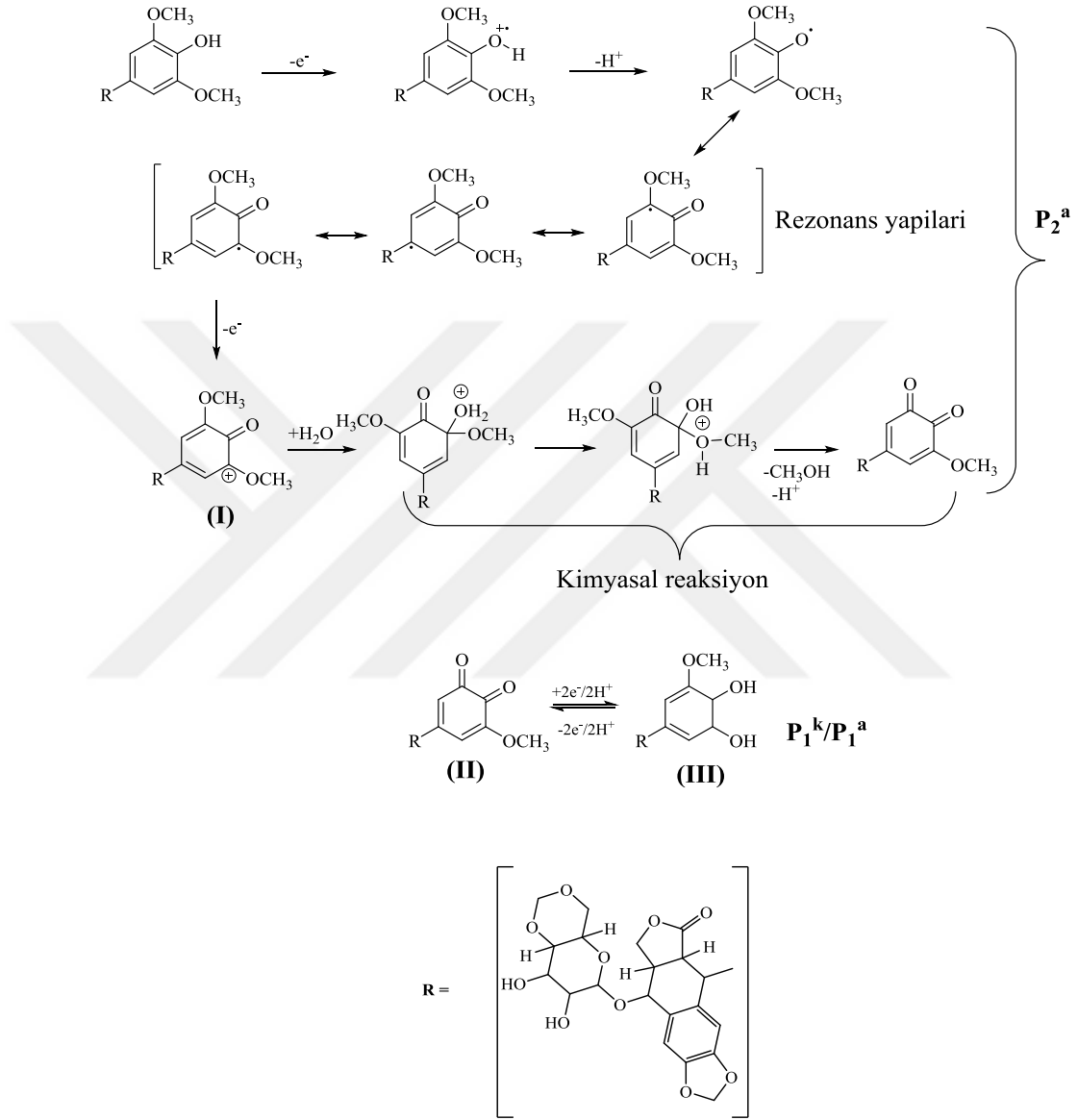
yükseltgenme piki (P_1^a) ortaya çıkmıştır. İlk döngüde gözlenen yükseltgenme pikinin akımı azalırken, negatif yöndeki taramada 0,35 V'daki indirgenme pikinin akımının arttığı ve üçüncü döngüdeki P_1^a/P_1^k redoks çiftinin pik akımlarının arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.56 $1,0 \times 10^{-4}$ M ETP'nin Kıl/KPE elektrot yüzeyindeki çok döngülü DV'leri
pH:2,0; v : 0,1 V/s

Bu durum şu şekilde açıklanabilir: İlk döngüde 0,6 V'da gözlenen ikinci yükseltgenme pikinin (P_2^a) ETP'nin yapısındaki fenolün $2e^-/H^+$ (I) nolu fenil katyonuna ve bu bileşiğin de bir kimyasal reaksiyon ile o-kinoid yapıya dönüştüğü düşünülmüştür. İkinci döngüde gözlenmeye başlanan P_1^a/P_1^k redoks çiftinin (II/III) ise birinci döngüde oluşan kinoid yapının indirgenmesi/yükseltgenmesine ($2e^-/2H^+$) karşılık geldiği sonucuna varılmıştır. İki yükseltgenme pikinin elektron sayıları ve proton sayıları da burada verilen yükseltgenme mekanizması ile uyum içerisindedir. Sonuç olarak, ETP'nin elektrokimyasal yükseltgenme mekanizmasıyla ilgili çalışmalara literatürlerde rastlanmıştır.

ancak mekanizması ayrıntılı olarak verilmemiştir (Holthuis vd. 1985, Palabıyık vd. 2013). Bu çalışmada ise, oldukça detaylı bir yükseltgenme mekanizması önerilmiştir (Şekil 4.57).



Şekil 4.57 ETP moleküllerinin Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde gerçekleşen olası yükseltgenme mekanizması

4.4.4 ETP'nin AdsKDV ve AdsDPV ile tayini

ETP'nin voltametrik adsorptif sıyırma voltametrisi ise tayini için adsorpsiyon kontrollü olan P₁ seçilmiştir. Bu pikin seçilmesinin nedeni şu şekilde açıklanabilir:

- P₂ ile kıyaslandığında en uygun ortam şartlarında elektrot yüzeyine adsorbe olabilme özelliği daha yüksektir.
- P₂'ye göre yine en uygun ortam şartlarında daha yüksek pik akımına ve daha kesin pik şekline sahiptir.
- P₁'in yükseltgendiği potansiyel değerinde (yaklaşık olarak 0,3 V) yükseltgenme özelliği bulunan ve girişim yapabilecek olan askorbik asit, ürik asit gibi moleküllerin girişim yapması gibi bir durum söz konusu değildir. Ancak P₂'nin yükseltgendiği potansiyelde (0,7 V) söz konusu türlerin girişim yapması kaçınılmazdır.

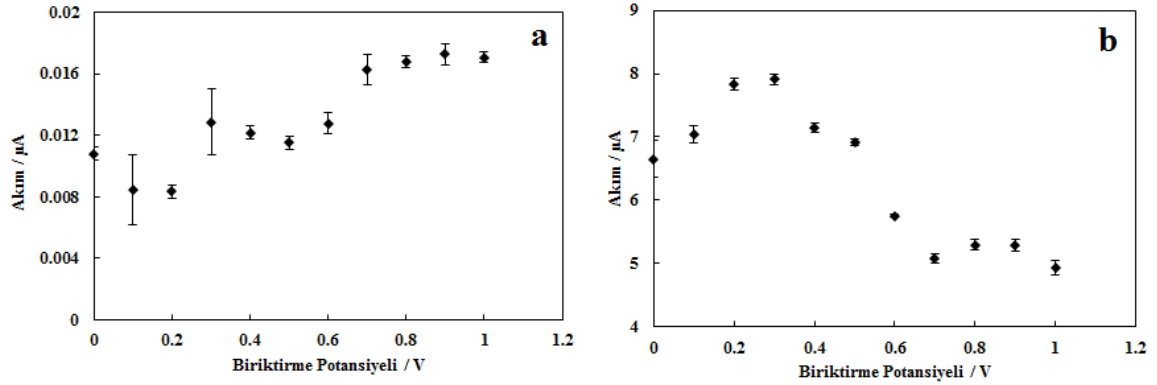
Tüm bu sebepler değerlendirildiğinde, yöntem geliştirme çalışmalarının P₁ yükseltgenme piki üzerinden yürütülmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE ve karşılaştırmak amacıyla KPE yüzeyinde hem AdsKDV hem de AdsDPV yöntemleri geliştirilmiştir. BR tampon ortamı ve pH 2,0'de yöntem değişkenlerinin optimizasyonu yapılmıştır. Daha sonra belirlenen en uygun değişkenler yardımıyla kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş olup geliştirilen yöntemler idrar, serum ve Etosid adlı flakon örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

4.4.4.1 AdsKDV için yöntem değişkenlerinin belirlenmesi

En uygun biriktirme potansiyelinin belirlenmesi

ETP tayini için AdsKDV yöntemi geliştirmek amacıyla hem KPE hem de Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrotları yüzeyinde biriktirme potansiyeli çalışması yapılmıştır. Bu amaçla daha önceden belirlenmiş olan uygun ortam şartlarında $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP çözeltisi hazırlanmış olup 15,0 s'de sabit tutulan biriktirme süresinde, biriktirme potansiyeli 0,0 ile 1,0 V değerleri arasında 0,1'er V'luk artışlarla değiştirilmiştir. Şekil

4.58.a'da KPE şekil 4.58.b'de ise Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeylerinde değiştirilen biriktirme potansiyeline karşı akımın değişimi verilmiştir. Her bir potansiyel değerinde akımlar üçer kez okunarak ortalama değerler elde edilmiştir. Şekil 4.58.a'da görüldüğü gibi biriktirme potansiyeli 0,0 V ile 0,7 V değerleri arasında düzensiz bir artış göstermiş 0,7 V ile 1,0 V arasında ise hemen hemen sabit kalmıştır. Bu nedenle KPE yüzeyinde AdsKDV yöntemi geliştirmek amacıyla en uygun biriktirme potansiyeli 0,8 V olarak belirlenmiştir. Şekil 4.58.b incelendiğinde ise ETP'nin akım değerleri 0,0 ile 0,3 V değerleri arasında artış göstermiş, 0,3 ve 0,4 V arasında hemen hemen sabit kalmıştır. 0,4 V'dan sonra ise düşmeye devam etmiştir. Bu nedenle Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde biriktirme potansiyeli 0,3 V olarak belirlenmiştir.



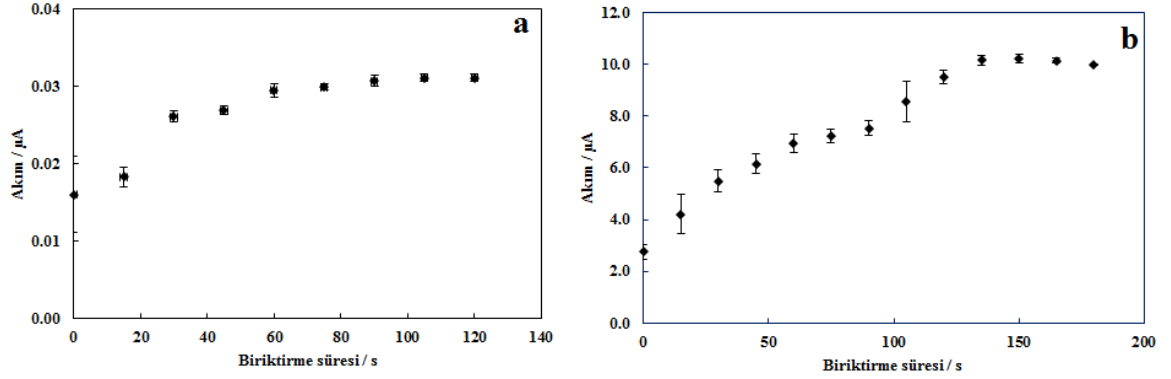
Şekil 4.58 $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP'nin biriktirme potansiyeli - akım grafikleri

a. KPE b. Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE (pH: 2,0, biriktirme süresi 15 s)

En uygun biriktirme süresinin belirlenmesi

En uygun biriktirme potansiyeli, uygun ortam şartları ve $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP içeren ortamda, AdsKDV yöntemi geliştirmek amacıyla biriktirme süresi her iki elektrot yüzeyinde de 0,0 ile 180 s aralığında değiştirilmiştir. Şekil 4.59.a'ya göre KPE yüzeyinde ETP'nin akımı 0,0 ile 60,0 s aralığında artış göstermiş ve sonrasında doygunluğa ulaşmıştır. Bu nedenle 60,0 s en uygun biriktirme süresi olarak belirlenmiştir. Şekil 4.59.b'de ise Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde ETP'nin yükseltgenme pik akımı 0,0 ile 135,0 s aralığında artış göstermiş ve sonrasında elektrot

yüzeyi doygunluğa ulaşmıştır. Bu nedenle Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde en uygun biriktirme süresi olarak 135,0 s belirlenmiştir.



Şekil 4.59 $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP'nin biriktirme süresi - akım grafikleri

a. KPE b. Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE (pH: 2,0)

AdsKDV yöntemi ile kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

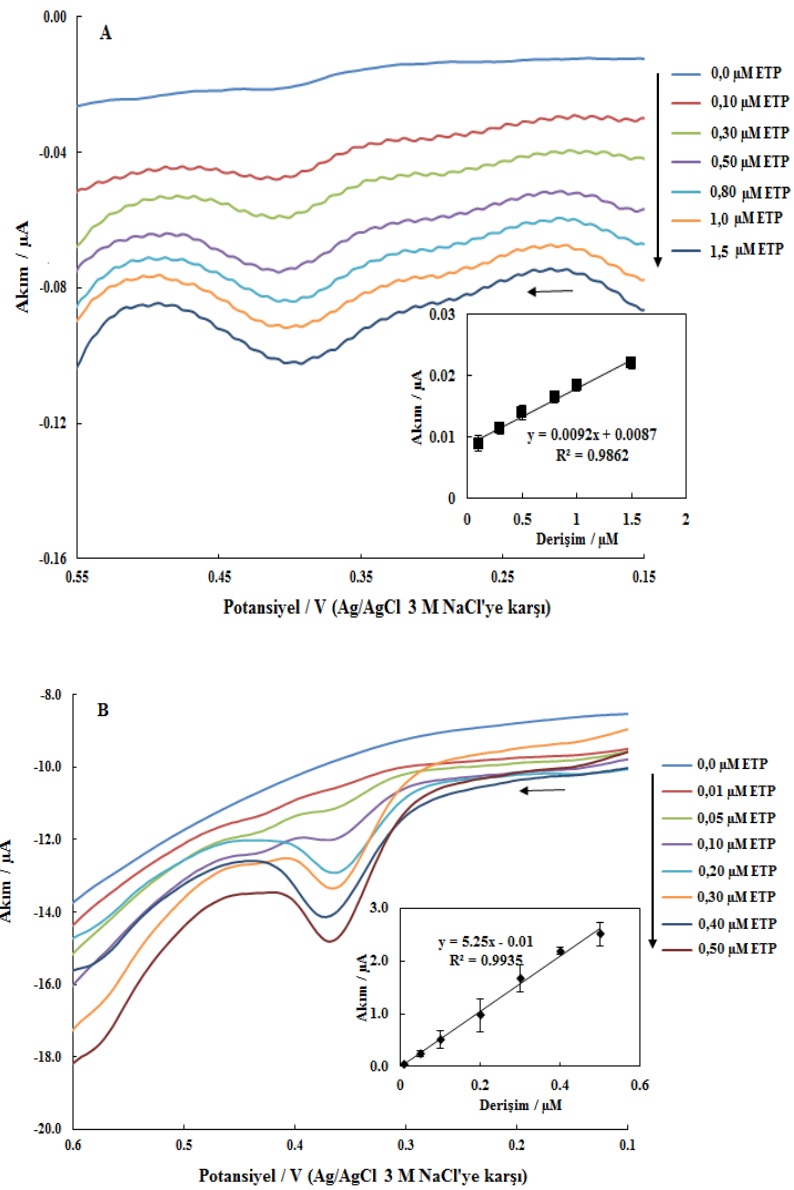
Yukarıda belirlenmiş uygun ortam şartlarda ETP için AdsKDV yöntemi ile kalibrasyon grafikleri her iki elektrot yüzeyinde de oluşturulmuştur (Şekil 4.60.a,b).

4.4.4.2 AdsDPV için yöntem değişkenlerinin belirlenmesi

En uygun biriktirme potansiyelinin belirlenmesi

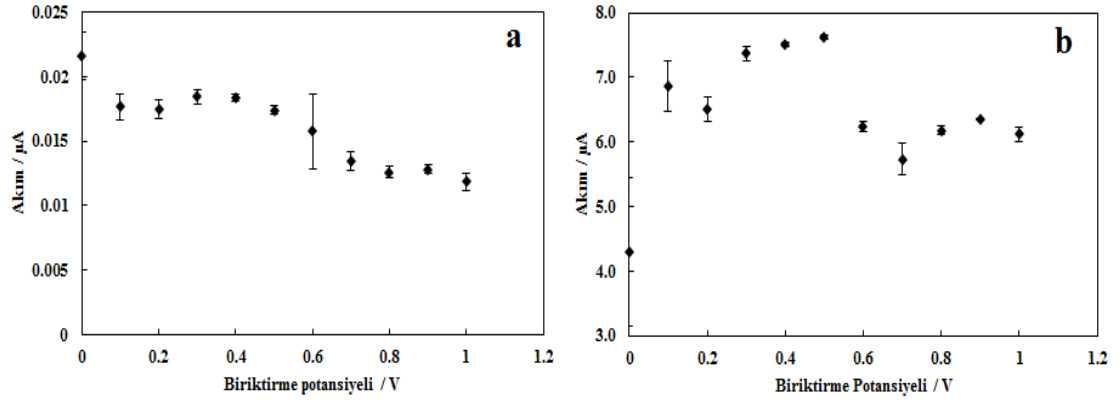
ETP tayini için AdsDPV yöntemi geliştirmek için, hem KPE hem de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrotları yüzeyinde biriktirme potansiyeli değişkeni için en uygun değer belirlenmiştir. Bu amaçla, belirlenmiş olan en uygun ortam şartlarında $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP çözeltisi hazırlanmış olup 15,0 s'de sabit tutulan biriktirme süresinde, biriktirme potansiyeli 0,0 V ile 1,0 V değerleri arasında 0,1 birim arttırılarak değiştirilmiştir. Şekil 4.61.a'da KPE Şekil 4.61.b'de ise Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeylerinde değiştirilen biriktirme potansiyeline karşı akım değişimi verilmektedir.

Şekil 4.61.a'ya bakıldığında biriktirme potansiyeli 0,0 V olduğunda en yüksek akım değeri elde edilmiş ve sonrasında düşmeye başlamıştır. Bu nedenle KPE yüzeyinde AdsDPV yöntemi geliştirmek amacıyla en uygun biriktirme potansiyeli olarak 0,0 V seçilmiştir. Şekil 4.61.b incelendiğinde ise ETP'nin akım değerleri 0,0 V ile 0,3 V değerleri arasında artış göstermiştir. 0,3 ile 0,5 V arasında hemen hemen sabit kalmış ve sonrasında düşmeye başlamıştır. Bu nedenle Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde en uygun biriktirme potansiyeli 0,3 V olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.60 ETP'nin farklı derişimlerdeki AdsKDV voltamogramları

A. KPE B. Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE iç grafik: kalibrasyon grafiği



Şekil 4.61 $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP'nin biriktirme potansiyeli - akım grafikleri

a. KPE b. Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE (pH: 2,0, biriktirme süresi 15 s)

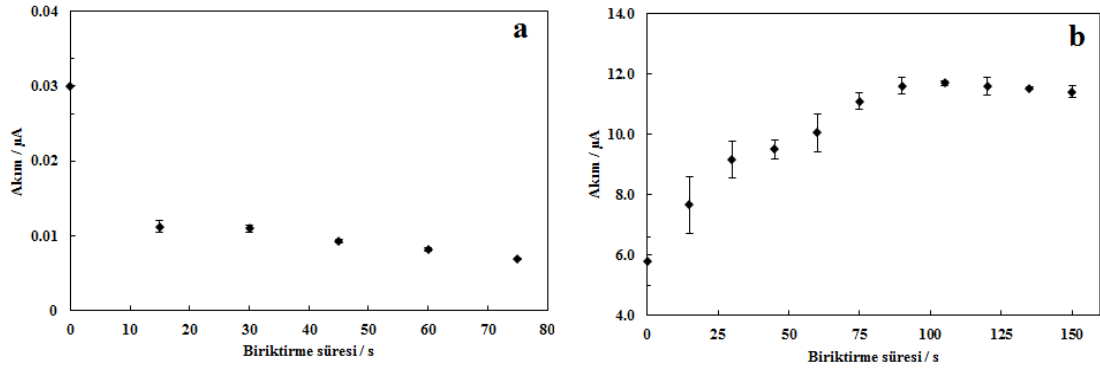
Biriktirme süresinin optimizasyonu

En uygun biriktirme potansiyeli, uygun ortam şartları ve $1,0 \times 10^{-6}$ M ETP içeren ortamda, AdsDPV yöntemi geliştirmek amacıyla biriktirme süresi her iki elektrot yüzeyinde de 0,0 ile 150 s aralığında değiştirilmiştir. Şekil 4.62.a'ya göre KPE yüzeyinde ETP'nin akımı 0,0 s ile 15,0 s arasında ani bir düşme göstermiş ve sonrasında hemen hemen sabit kalmıştır. Şekil 4.62.b'de ise Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde aynı ortam şartlarında 0,0 – 150 s aralığında değiştirilen biriktirme süresine karşılık akım değerleri grafiğe geçirilmiş akım 90,0 s değerine kadar sürekli bir artış göstermiş ve sonrasında elektrot yüzeyi doyumluğa ulaşmıştır. Bu nedenle Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyine en uygun biriktirme süresi 90,0 s olarak belirlenmiştir.

AdsDPV yöntemi ile kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Yukarıda yapılan en uygun yöntem değişkenlerinin belirlenmesi çalışmalarına göre KPE yüzeyinde AdsDPV yöntemi geliştirmek amacıyla optimize edilen şartların 0,0 V ve 0,0 s olduğu görülmektedir (Şekil 4.61.a ve 4.62.a). Bu sonuçlara göre, ETP'nin aynı derişimini içeren çözeltisinde KPE yüzeyinde klasik DPV ve optimize edilmiş şartlarda alınan AdsDPV voltamogramları karşılaştırılmıştır. Klasik DPV ile elde edilen akımların daha iyi olması sebebiyle KPE elektrot yüzeyinde DPV yöntemi geliştirilmiş

ve Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrot yüzeyinde geliştirilen AdsDPV yöntemi ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.63.a,b).



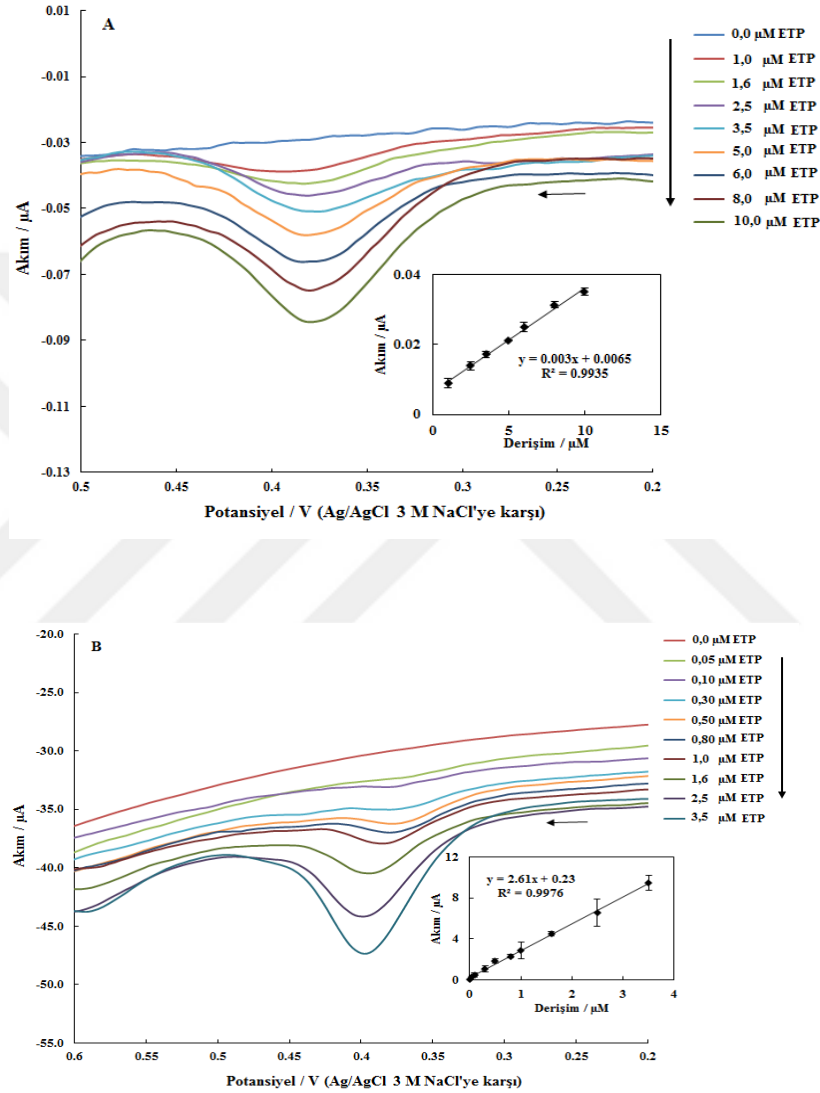
Şekil 4.62 1,0 × 10⁻⁶ M ETP'nin biriktirme süresi - akım grafikleri
a. KPE b. Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE (pH: 2,0)

Her iki elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsKDV, AdsDPV ve DPV yöntemlerinin regresyon değişkenleri çizelge 4.31'de sunulmuştur.

ETP için hem KPE hem de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrot yüzeylerinde yapılan sıyırma voltametrisi yöntemi geliştirme çalışmalarında, Şekil 4.60, 4.63 ve Çizelge 4.31'de görüleceği üzere;

- ETP derişimi arttıkça pik akımlarının hem KPE hem de Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde doğrusal olarak değiştiği görülmüştür.
- Doğrusal çalışma aralığının regresyon katsayısının her iki elektrot ve her iki yöntem için de 0,98'den büyük olduğu görülmektedir. Bu durum her iki yöntemin de doğrusallığının yüksek olduğunu göstermektedir.
- Her iki elektrot ve her iki yöntemde elde edilen pik akımı ve pik potansiyellerinin tekrarlanabilirlik değerleri % 5,0'lık BSS değerinden küçük olduğundan dolayı her iki yöntemin de tekrarlanabilirliklerinin oldukça iyi olduğu söylenebilir.
- ETP için yalın KPE yüzeyine geliştirilen bu iki yöntemin doğrusal çalışma aralığı sırasıyla AdsKDV için 0,03 - 1,5 µM, DPV için ise 0,74 - 10,0 µM'dır. Modifiye

elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri için bulunan doğrusal çalışma aralıkları ise sırasıyla 0,003 - 0,5 ve 0,009 - 3,5 μM 'dır. Bu sonuçlara göre modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilen AdsDPV yönteminin daha geniş bir doğrusal çalışma aralığına sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.63.a. ETP'nin KPE elektrot yüzeyinde farklı derişimlerdeki DPV voltamogramları b. ETP'nin Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde farklı derişimlerdeki AdsDPV voltamogramları

iç grafik: kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.31 KPE ve Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrotları yüzeyinde geliştirilen yöntemlerin regresyon değişkenleri

Regresyon değişkeni	KPE		Kıl/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	
	<u>AdsKDV</u>	<u>DPV</u>	<u>AdsKDV</u>	<u>AdsDPV</u>
Pik potansiyeli, V	0,404	0,380	0,368	0,376
Doğrusal çalışma aralığı, µM	0,03 - 1,5	0,74 - 10,0	0,003 - 0,5	0,009 - 3,5
Kalibrasyon eğrisinin eğimi, µA/µM	0,009	0,003	5,25	2,61
Kalibrasyon eğrisinin kesim noktası, µA	0,009	0,006	0,01	0,23
Gözlenebilme sınırı (LOD), µM	0,010	0,22	0,00088	0,0026
Tayin sınırı (LOQ), µM	0,030	0,74	0,0029	0,0087
Regresyon katsayısı (R ²)	0,9862	0,9935	0,9935	0,9976
Gün içi akım tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,04	2,60	1,70	1,12
Gün içi potansiyel tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,58	1,78	0,95	0,92
Günler arası akım tekrarlanabilirliği (%BSS)	3,84	7,44	3,30	2,62
Günler arası potansiyel tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,70	0,92	0,53	0,54

- Çizelge 4.31’de görüldüğü gibi modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilen AdsKDV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrişinin eğiminin (5,25 µA/µM) geliştirilen diğer yöntemlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuca göre modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsKDV yönteminin daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.
- Eşitlik 4.1 ve 4.2 ve kalibrasyon eğrilerinin eğimleri yardımıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış ve çizelge 4.31’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre modifiye elektrot yüzeyinde ETP tayini için geliştirilen AdsKDV yönteminin diğer yöntemlere göre daha düşük gözlenebilme (0,9 nM) ve tayin (3,0 nM) sınırlarına sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

ETP tayini için geliştirilmiş olan Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE’unun ömrü ve tekrar üretilebilirliği de çalışılmıştır. Elektrodun kararlılığının belirlenmesi amacıyla hazırlanmış olan elektrot, $1,0 \times 10^{-7}$ M ETP içeren çözelti ortamında AdsDPV yöntemi

ile her hafta akım değerleri en az 5 kez okunmuştur. Elde edilen ortalama akım değerlerine göre 4 hafta sonunda ilk hafta okunan akım değerinin % 77,76 oranında korunduğu gözlenmiştir. Buna göre geliştirilmiş olan elektrodun en az 28 gün kararlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE'unun tekrar üretilebilirliğinin tayin edilmesi amacıyla aynı bileşimde ve aynı şartlarda 5 farklı modifiye elektrot hazırlanmıştır. Elektrotların $1,0 \times 10^{-7}$ M ETP içeren ortamdaki akımlar AdsDPV yöntemiyle en az 5 defa okunmuştur. Her bir elektrot için okunan ortalama akım değerlerinin % BSS değeri % 4,96 olarak bulunmuştur. Bu değerinin %10'dan küçük olması, geliştirilmiş olan yeni elektrodun tekrar üretilebilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

4.4.4.3 Girişim etkisi

ETP tayini için Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE yardımıyla geliştirilmiş olan voltametrik yöntemlere, biyolojik ortamda bulunması muhtemel olan bazı türlerin girişim etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla askorbik asit, ürik asit, dopamin, L-sistein, L-glutamik asit ve glikoz gibi elektroaktif özelliği bulunan türlerin girişim etkisi araştırılmıştır. ETP'nin belli bir derişimde bulunduğu ortama girişim yapan türün derişimi ETP'nin derişiminden 100 kat fazla olacak şekilde ilave edilmiş ve hesaplanan Δi_p değerleri çizelge 4.32'da sunulmuştur.

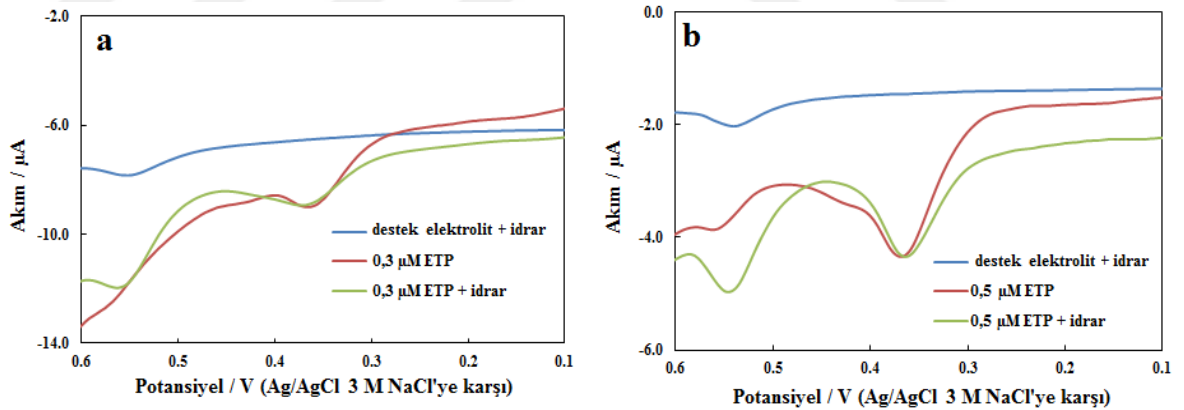
Çizelge 4.32 ETP'nin AdsKDV ile tayinine girişim yapması muhtemel türlerin etkisi

Girişim yapabilecek tür	% Δi_p
Askorbik asit	-0,26
Ürik asit	5,10
Dopamin	-9,40
L-sistein	3,09
L-glutamik asit	-6,59
Glikoz	-0,52

Bu sonuçlara bakıldığında % Δi_p değerlerinin % 5,10 ile %-9,40 arasında değiştiği görülmektedir. Bu durum ise ortamda bulunan türlerin derişiminin ETP'nin derişiminden 100 kata kadar fazla olması durumunda ETP tayinine girişim yapmadığını göstermektedir (Yan vd. 2015).

4.4.4.4 Geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelere uygulamaları

ETP için yapılan kalibrasyon ve girişim çalışmaları (Bölüm 4.4.4.1, 4.4.4.2 ve 4.2.4.3) elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE yüzeyinde ve ilgili yöntemler yardımıyla ETP'nin idrar, serum ve piyasada ETOSİD adıyla flakon şeklinde bulunan ilaç örneklerinden tayini gerçekleştirilmiştir. İdrar, serum ve flakon örnekleri bölüm 3.6-3.7'de anlatıldığı şekilde analize hazırlanmıştır. İlk olarak ETP, ETP + idrar ve destek elektrolit numunelerinin voltamogramları, doğrusal çalışma aralığındaki herhangi bir derişim değerinde kaydedilmiştir (Şekil 4.64). Geri kazanım sonuçları ise çizelge 4.33'de verilmiştir.



Şekil 4.64 ETP tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin idrar içeren ve idrar içermeyen ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları

a. AdsKDV b. AdsDPV

Çizelge 4.33'de görüleceği üzere, idrar içeren ortamda ETP tayini için 3 farklı derişimde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Buna göre, AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri için hesaplanan ortalama geri kazanım değerlerinin % 100 civarında olduğu

görülmektedir. Bu sonuçlar, ETP için geliştirilen her iki yöntemin de idrar numunelerine başarıyla uygulandığını göstermektedir.

Geliştirilen yöntemler aynı zamanda serum numunelerine de uygulanmıştır. Bunun için, serum içeren ve serum içermeyen ortamlarda da, her iki yöntemle kaydedilmiş olan voltamogramlar şekil 4.65’de verilmiştir. Bu numuneler için de benzer şekilde üç farklı derişimde geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar yaklaşık olarak % 100 civarında bulunmuştur (Çizelge 4.34). Elde edilen sonuçlar serum ortamında ETP’nin başarıyla tayin edilebileceğini göstermektedir.

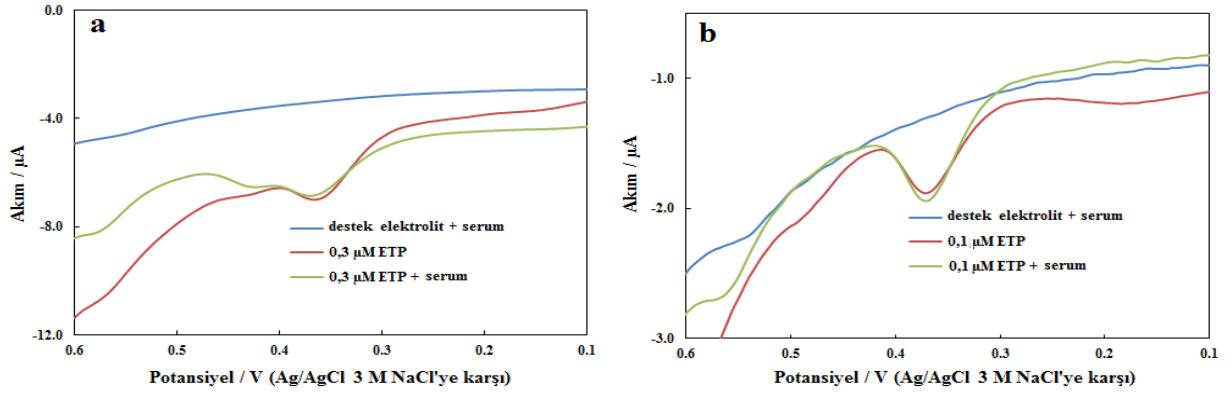
Çizelge 4.33 ETP tayini için idrar ortamında AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri

Yöntem	Eklenen Derişim, μM	Bulunan Derişim, μM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
AdsKDV	0,100	0,096; 0,099; 0,109	101,82	6,91
	0,200	0,202; 0,224; 0,188	102,58	8,83
	0,300	0,298; 0,310; 0,333	104,51	5,75
AdsDPV	0,200	0,026; 0,030; 0,030	99,48	7,58
	0,500	0,467; 0,493; 0,516	98,43	4,98
	0,800	0,722; 0,733; 0,743	91,58	1,46

*Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**Hesaplanmış olan geri kazanım değerleri için verilen bağıl standart sapma

İdrar ve serum içeren ortamlarda olduğu gibi, piyasada ETOSİD adıyla bulunan flakon örneği ile geri kazanım çalışmaları yapılarak geliştirmiş olduğumuz yöntemlerin doğruluğu teyid edilmiştir. Bölüm 3.6’da anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan numunelerden elde edilen sonuçların doğrudan kalibrasyon eğrileri yardımıyla % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.65 ETP tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin serum içeren ortamda ve serum içermeyen ortamda kaydedilmiş olan voltamogramları

a. AdsKDV b. AdsDPV

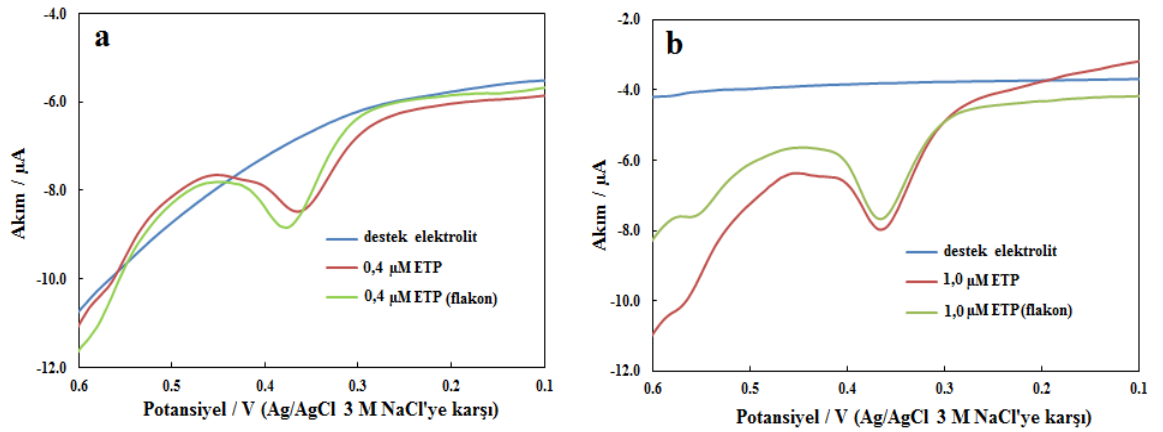
Çizelge 4.34 ETP tayini için serum ortamında AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri

Yöntem	Eklenen Derişim, µM	Bulunan Derişim, µM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
AdsKDV	0,100	0,104; 0,097; 0,113	104,93	7,46
	0,200	0,211; 0,206; 0,226	107,19	4,83
	0,300	0,296; 0,304; 0,305	100,54	1,64
AdsDPV	0,100	0,116; 0,111; 0,093	116,69	5,06
	0,500	0,519; 0,508; 0,547	104,90	3,88
	0,600	0,604; 0,601; 0,606	100,62	6,41

*Soniclar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**hesaplanmış olan geri kazanım değerleri için verilen bağıl standart sapma

(Çizelge 4.35). Çizelge 4.35’de görüldüğü üzere, ETP’nin flakon örneklerinden geri kazanım değerleri her iki yöntem için % 99,31 ile % 105,56 aralığında değişmektedir. Bu geri kazanım sonuçlarına göre, geliştirilen voltametrik yöntemlerin doğruluğu teyid edilmiştir.



Şekil 4.66 Etosid flakon ve ETP standardının voltamogramları
a. AdsKDV b. AdsDPV

Çizelge 4.35 ETP tayini için flakon örneklerinden AdsKDV ve AdsDPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri

Yöntem	Eklenen Derişim, μM	Bulunan Derişim, μM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
AdsKDV	0,200	0,180; 0,208; 0,223	101,96	10,76
	0,300	0,305; 0,318; 0,316	101,72	2,30
	0,400	0,420; 0,410; 0,431	103,70	2,54
AdsDPV	0,100	0,094; 0,108; 0,096	99,31	7,86
	1,000	1,023; 1,024; 1,120	105,56	5,28
	1,500	1,429; 1,616; 1,424	99,33	7,35

*Soniclar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**hesaplanmış olan geri kazanım değeri için verilen bağıl standart sapma

ETP tayini için Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan AdsDPV ve AdsKDV yöntemleri, literatürde ETP için geliştirilmiş olan diğer voltametrik ve yöntemlerle Çizelge 4.36'da karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.36'ya bakıldığında ETP için geliştirmiş olduğumuz AdsKDV yönteminin diğer tüm voltametrik yöntemlere göre en düşük gözlenebilirlik sınırına sahip olduğu, AdsDPV yönteminin gözlenebilirlik sınırının ise birçok voltametrik çalışmaya göre daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.36 ETP tayini için geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerin literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması

Elektrot	Yöntem	Doğrusal çalışma aralığı, μM	LOD, μM	Uygulaması	Kaynak
KPE	DPV	0,25-25,0	0,1	Serum	Radi vd. 2007
ÇDKNT/GCE	AdsDPV	0,02-2,0	0,0054	Flakon	Palabıyık vd. 2013
PBKE	DPV	-	0,0050	Serum	Radi vd. 2013
Kil/KPE	AdsKDV	0,01-10,0	0,003	-	Bayraktepe vd. 2015
Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	AdsKDV	0,003 - 0,5	0,0009	Serum, idrar, flakon	Tez çalışması
Kil/ÇDKNT/TiO ₂ /KPE	AdsDPV	0,009 - 3,5	0,003	Serum, idrar, flakon	Tez çalışması

4.4.5 ETP'nin ds-DNA ile etkileşiminin DV ve DPV yöntemleri ile incelenmesi

ETP-DNA etkileşimi, Kıl/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrot yüzeyinde ve çözelti ortamında iki fizyolojik pH olan 4,8 (Asetat tamponu) ve 7,4 (Fosfat tamponu) ortamlarında DPV ve DV yöntemleriyle ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

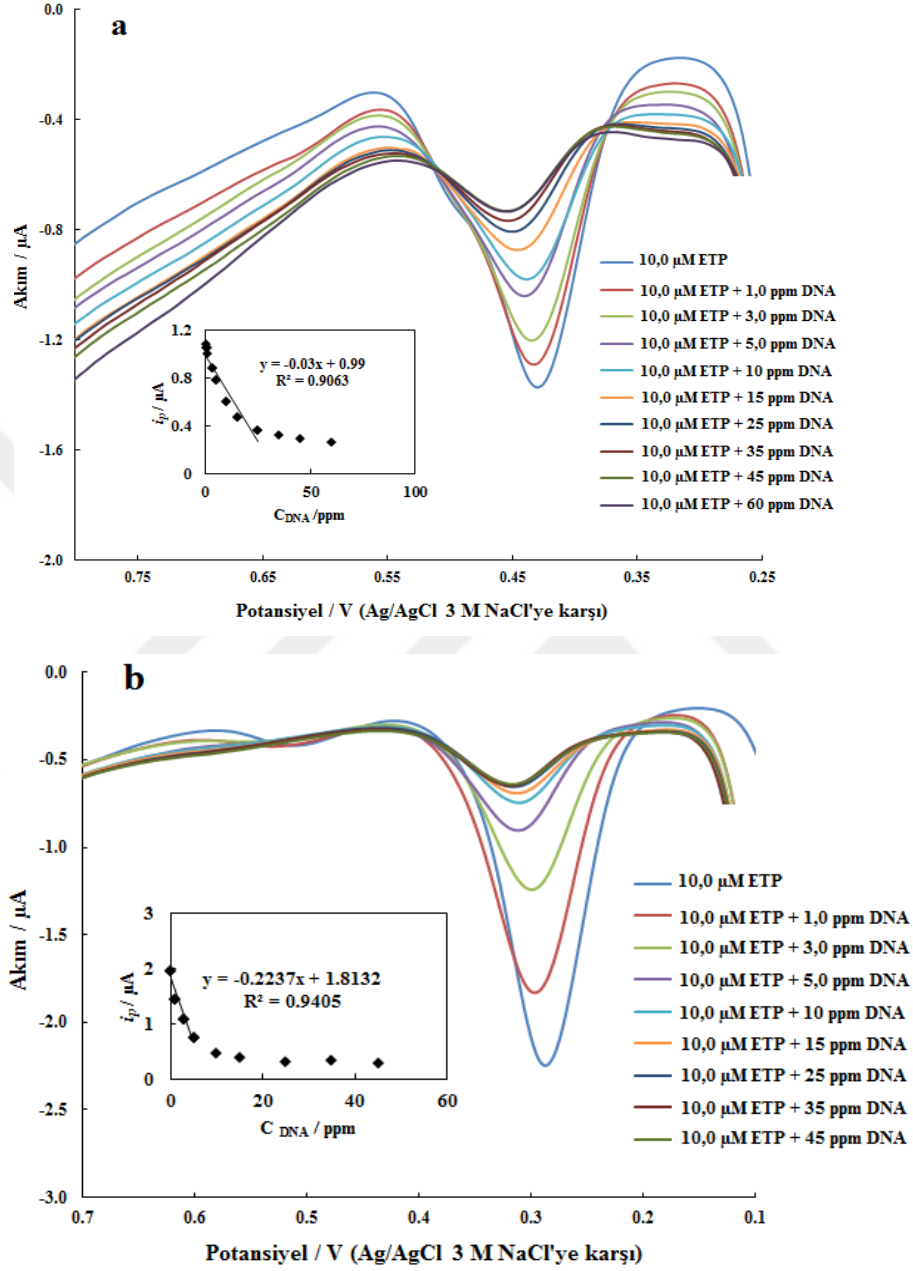
4.4.5.1 DPV yöntemi ile elde edilen bulgular

ETP-dsDNA etkileşiminin pH 4,8 ve 7,4'de incelenmesi

ETP'nin DNA ile etkileşiminin çözelti ortamında incelenmesi amacıyla, pH 4,8 ve pH 7,4'de, 10,0 µM ETP içeren ortamlara bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan stok DNA çözeltisinden belli derişimlerde (1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0; 35,0; 45,0; 60,0 ppm) eklemeler yapılmıştır. ETP'nin pik potansiyeli ve akımındaki değişimler DPV yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlar ve grafikler şekil 4.67.a,b'de verilmiştir. Şekil 4.67.a incelendiğinde, 1,0 ile 25,0 ppm aralığında eklenen DNA derişimine paralel olarak ETP'nin pik akımının doğrusal bir şekilde azaldığı ve DNA derişimi artmaya devam ettikçe okunan akım değerinin hemen hemen sabit kaldığı dikkat çekmektedir. Yine eklenen DNA derişimine karşı pik potansiyelindeki değişmeye bakıldığında pik potansiyellerinin bir miktar pozitive kaydığı görülmektedir. Şekil 4.6.b'deki (pH 7,4'de) voltamogramlar incelendiğinde ise, ETP'nin her iki pikine ait DPV pik akımlarının eklenen DNA derişimi ile doğrusal bir şekilde azaldığı ve 15,0 ppm DNA eklenmesinden sonra ise hemen hemen sabit kaldığı görülmektedir. Her iki pike ait pik potansiyellerinin ise artan DNA derişimi ile belirgin bir şekilde daha pozitif değerlere kaydığı görülmektedir. Bu verilere göre ETP'nin her ortamda da DNA ile etkileşim içinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Yukarıda anlatıldığı üzere ETP'nin potansiyeli DNA derişimi arttıkça her iki ortamda da bir miktar pozitive kaymaktadır. Yapılan literatür araştırmasında bu potansiyel

değişiminin olması DNA ile ilaç etkileşiminin interkalasyon yolu ile olabileceğini belirtmektedir (Liv vd. 2005, Enache vd. 2015).

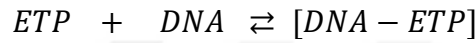


Şekil 4.67 ETP'nin pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları

iç grafik: $C_{DNA} - i_p$ grafiği a. pH 4,8 b. pH 7,4

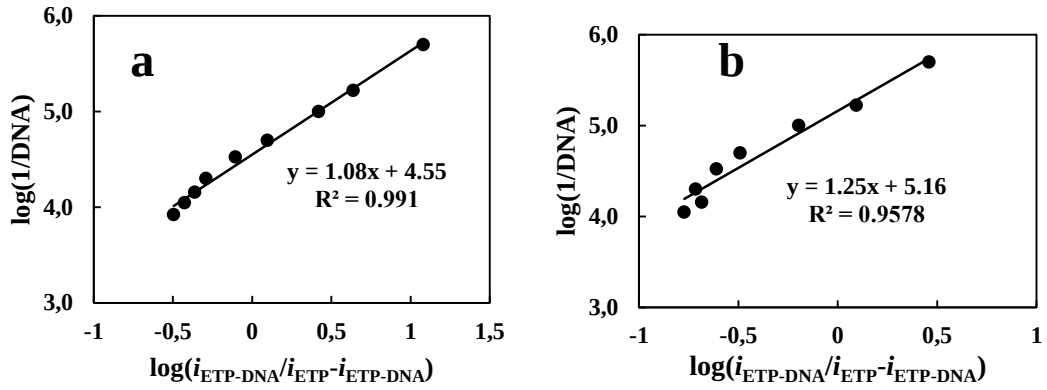
4.4.5.2 ETP - DNA etkileşiminin bağlanma sabitinin (K) DPV ile hesaplanması

ETP ve DNA arasındaki etkileşimin bağlanma sabitinin hesaplanması amacıyla her iki fizyolojik pH değerinde (4,8 ve 7,4) DPV yöntemi ile elde edilen akım verilerden yararlanılmıştır. Bu amaçla artan DNA derişimi ile ETP'nin pik akımındaki değişimlerden ve Bölüm 2.3.2'de verilmiş olan eşitlik 2.12'den yararlanılarak DNA ve ETP arasındaki bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. Burada DNA ve ETP'nin çözelti ortamında aşağıdaki reaksiyona göre bir kompleks oluşturduğu düşünülmüştür;



Burada ev sahibi ETP, misafir ise eklenen DNA molekülleridir. Buna göre, her bir eklemekten sonra hesaplanan $\log\left(\frac{i_{ETP-DNA}}{i_{ETP}-i_{ETP-DNA}}\right)$ değerine karşılık $\log(1/DNA)$ derişimleri grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.68 A ve B'de verilmiştir. Şekil 4.68'deki grafiklerin kesim noktaları yardımıyla DNA ile ETP arasında oluşan kompleksin bağlanma sabiti hesaplanmış ve çizelge 4.37'de vermiştir. Literatürde DNA ve ilaç molekülleri arasındaki etkileşimin bağlanma sabiti değerleri 10^4 - 10^6 M⁻¹ aralığında olduğunda ilaç moleküllerinin DNA ile interkalasyon yoluyla etkileştiği belirtilmiştir (Temerk vd. 2016). Buna göre bu tez çalışmasında ETP için belirlenen K sabitlerinin (Çizelge 4.37) yukarıda bahsedilen aralıkta olması, ETP-DNA arasındaki etkileşimin interkalasyon yolu ile olabileceğini düşündürmüştür.

DNA ile ETP arasında oluşan kompleksin standart Gibbs serbest enerjisi (ΔG^0), yukarıda bulunan K bağlanma sabiti değeri eşitlik 2.13'de yerine koyularak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.37'de verilmiştir. Burada, ΔG^0 değerlerinin her iki ortamda da negatif değerde olması, DNA ile ETP arasındaki etkileşimin kendiliğinden yürüdüğünü göstermektedir (Temerk vd. 2016).



Şekil 4.68 $\log(\frac{i_{ETP-DNA}}{i_{ETP} - i_{ETP-DNA}})$ 'ye karşılık $\log(1/DNA)$ grafikleri

a. pH 4,8 b. pH 7,4.

4.4.5.3 DV yöntemi ile elde edilen bulgular

ETP'nin DNA ile etkileşimi DV yöntemi ile de yine iki farklı fizyolojik pH değerinde (4,8 ve 7,4) $1,0 \times 10^{-5}$ M ETP içeren ortamlarda incelenmiştir. DNA içermeyen ve 35 ppm DNA içeren ortamlarda yapılmış olan tarama hızı çalışması ile ETP ve ETP-DNA kompleksinin difüzyon katsayısı (D), ETP'nin elektrot yüzey derişimi (I) ve reaksiyonun standart heterojen hız sabiti (k_s) değişkenleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Hesaplamalara ilişkin ayrıntılar aşağıda sunulmuş olup sonuçlar çizelge 4.37'de listelenmiştir.

Difüzyon katsayısının (D) hesaplanması

Yapılan tarama hızı çalışması sonuçlarına göre, düşük tarama hızlarında elde edilen $i_p-v^{1/2}$ grafiğinin eğimi ve tersinmez ve yarı tersinir sistemler için geçerli olan eşitlik 2.4'den yararlanarak ETP serbest halde iken ve bu ortama belli derişimde (35,0 ppm) DNA ilavesi yapılarak difüzyon katsayıları hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 4.37'de sunulmuştur. Çizelge 4.37'de görüldüğü gibi pH 4,8'de ETP serbest halde iken hesaplanan difüzyon katsayısı $7,55 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ iken, DNA ilave edildiğinde $1,27 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e düşmektedir. pH 7,4 ortamındaki difüzyon katsayısı değerleri incelendiğinde

ise, ETP'nin serbest haldeki difüzyon katsayısı $1,21 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ iken, ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $3,7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ 'ye düşmektedir. Bu sonuçlara göre, ortamda DNA bulunduğunda ETP'nin elektrot yüzeyine olan difüzyonunun azaldığı görülmektedir. Bu durum ise DNA ile ETP'nin çözelti ortamında etkileştiğini göstermektedir.

Standart heterojen hız sabitinin (k_s) hesaplanması

Tarama hızı verilerinden hareket edilerek çizilmiş olan $\ln v - E_p$ grafiğinin eğimi ve eşitlik 2.5'den yararlanarak DNA içeren ve DNA içermeyen ortamlarda ETP'nin k_s değerleri hesaplanmış olup sonuçlar çizelge 4.37'de sunulmuştur. Çizelge 4.37'de görüldüğü üzere ETP'nin pH 4,8'de hesaplanan k_s değeri, ETP tek başına iken $0,78 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $0,97 \text{ s}^{-1}$ olmaktadır. pH 7,4'de ise tek başına ETP için k_s değeri $0,90 \text{ s}^{-1}$ iken DNA eklendiğinde ise $0,88 \text{ s}^{-1}$ olduğu görülmektedir. Bu değerlerin birbirine yakın olması ETP'nin elektrokimyasal özelliğinde herhangi bir değişiklik olmadığı ve ETP'nin DNA ile oluşturduğu kompleksin elektroaktif özellik göstermediği şeklinde yorumlanabilir (Jiao vd. 2005).

ETP'nin elektrot yüzey derişimin (Γ) hesaplanması

Tarama hızı çalışması ile elde edilen akım değerleri tarama hızına karşı grafiğe geçirilerek elde edilen eğim ve eşitlik 2.7 yardımıyla ETP için her iki ortamda da Γ değerleri hesaplanmış ve çizelge 4.37'de verilmiştir. Çizelge 4.37'de görüldüğü gibi pH 4,8'de ETP'nin tek başına iken Γ değeri $4,92 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ iken ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $2,19 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ 'ye düşmektedir. pH 7,4'de ise bu değerler sırasıyla $2,43 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ ve $1,25 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ 'dir (Temerk vd. 2016).

Çizelge 4.37 ETP-DNA etkileşimi için hesaplanan Difüzyon katsayısı (D), heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (I), bağlanma sabiti (K) ve Gibbs serbest enerji (ΔG°) değerleri

pH	Ortam bileşimi	D (cm ² s ⁻¹) ×10 ⁻⁶	k_s (s ⁻¹)	I (mol cm ⁻²) ×10 ⁻¹²	K (mol ⁻¹ L)×10 ⁴	ΔG° kJ mol ⁻¹
4,8	ETP	7,55(±0,65)	0,78(±0,19)	4,92(±0,25)		
	ETP + DNA	1,27(±0,25)	0,97(±0,01)	2,19(±0,50)	3,54	-25,95
7,4	ETP	1,21(±0,20)	0,90(±0,06)	2,43(±0,17)		
	ETP + DNA	0,37(±0,03)	0,88(±0,13)	1,25(±0,19)	14,0	-29,35

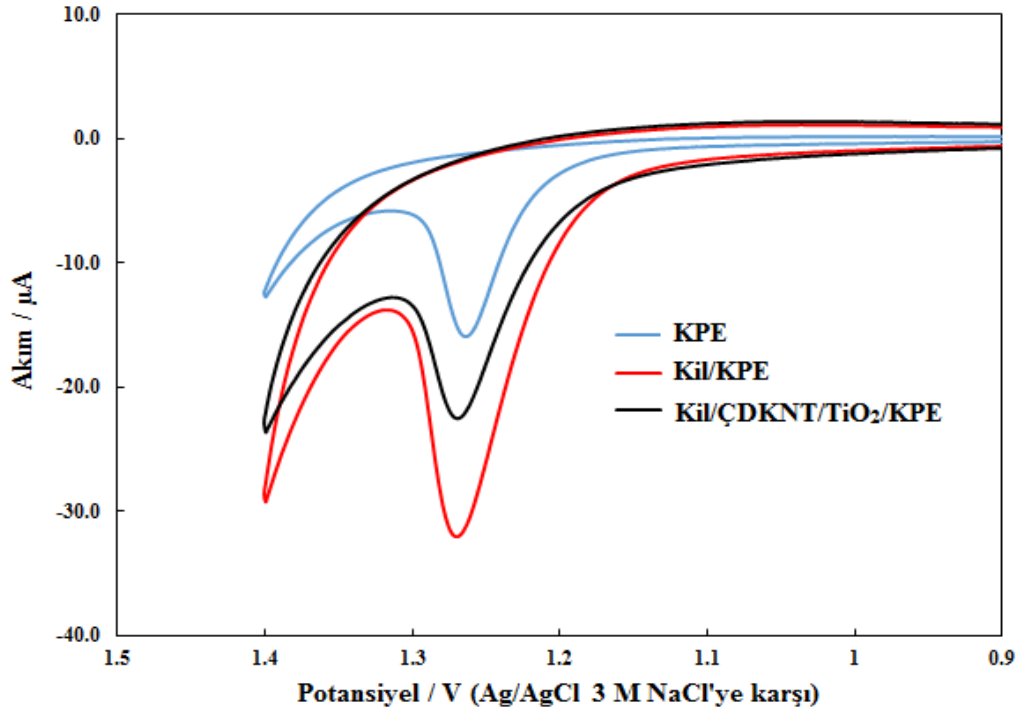
4.5 Bikalutamid (BİKA) ile İlgili Yapılan Voltametrik Çalışmalar

4.5.1. BİKA'nın elektrokimyasal davranışının DV ile incelenmesi

BİKA'nın elektrokimyasal davranışı, bölüm 4.1'de elektrokimyasal performans özellikleri incelenmiş olan Kil/KPE, Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE ve KPE elektrot yüzeylerinde pH 7,0 fosfat tamponu ortamında incelenmiştir. Bu amaçla 0,9 ile 1,5 V'luk potansiyel aralığında ve 0,1 V/s tarama hızında $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın votamogramları kaydedilmiştir. Şekil 4.69'da görüldüğü gibi, BİKA'nın yükseltgenmesine ait yaklaşık olarak 1,3 V'da bir yükseltgenme pikine rastlanmıştır. Geri potansiyel taramasında (1,5 ile 0,9 V) ise herhangi bir indirgenme pikine rastlanmamıştır. Şekil 4.69'a göre, BİKA'nın yükseltgenme pik akımının Kil/KPE yüzeyinde, KPE'ye göre yaklaşık olarak 2 kat, üç bileşenli modifiye elektroda göre ise yaklaşık olarak 1,5 kat daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle, Kil/KPE'un BİKA'ya ait yükseltgenme piki için en uygun elektrot olduğunu söylemek mümkündür.

BİKA için en uygun elektrodun Kil/KPE olması sebebiyle, BİKA'nın elektrokimyasal yükseltgenme pik akımına elektrot bileşiminin (sepiyolit kili) etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla kilin bileşim yüzdesi % 1,7 (0,5 mg kil/30,0 mg pasta) ile % 13,3 (4,0 mg kil

/30,0 arasında değiştirilmiştir (Navratilova vd. 2002, Uslu vd. 2007). Her bir bileşimde elde edilen voltamogramlar ve % kil miktarı- i_p grafikleri şekil 4.70’da verilmiştir.



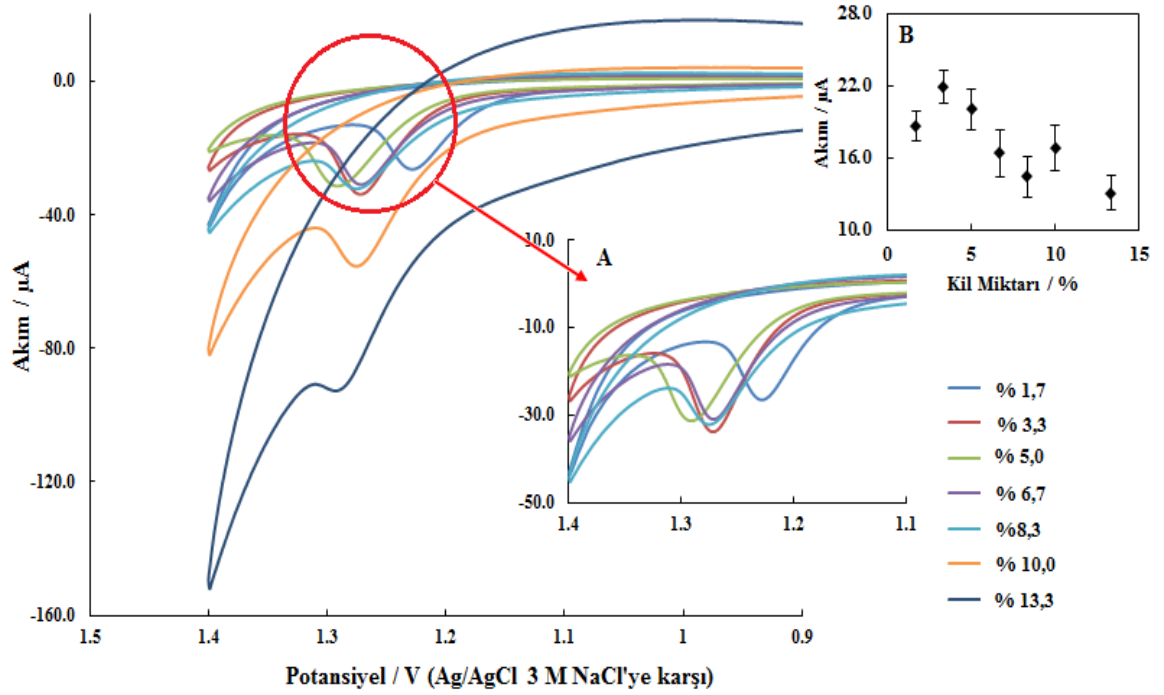
şekil 4.69 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA’nın KCl/KPE, KCl/ÇDKNT/TiO₂/KPE ve KPE elektrotlarında kaydedilmiş dññřümlü voltamogramları

Bu voltamogramdan da gñrñleceęi üzere BİKA için % 3,3 kil miktarının üzerine çıkıldığında pik akımının dñřmeye başladığı ve % 10,0’un üzerine çıkıldığında ise artık akımın ciddi şekilde arttığı gñrñlmektedir (şekil 4.70). şekil 4.70’de gñsterilen grafikler ve voltamogramlar dikkate alındığında, BİKA’ ya ait yükseltgenme piki için en uygun elektrot bileşiminin % 3,3 oranında (1,0 mg kil/30 mg pasta) kil içeren elektrodun olduğu sonucuna varılmıştır.

4.5.2 Destek elektrolit seçimi ve pH’ın belirlenmesi

BİKA’nın KCl/KPE yüzeyinde elektrokimyasal davranışını ayrıntılı olarak incelemek için yükseltgenme pik akımı ve pik potansiyeline pH’nın ve elektrolit ortamının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla ilk olarak geniş bir pH çalışma aralığına sahip olan (2,0 -

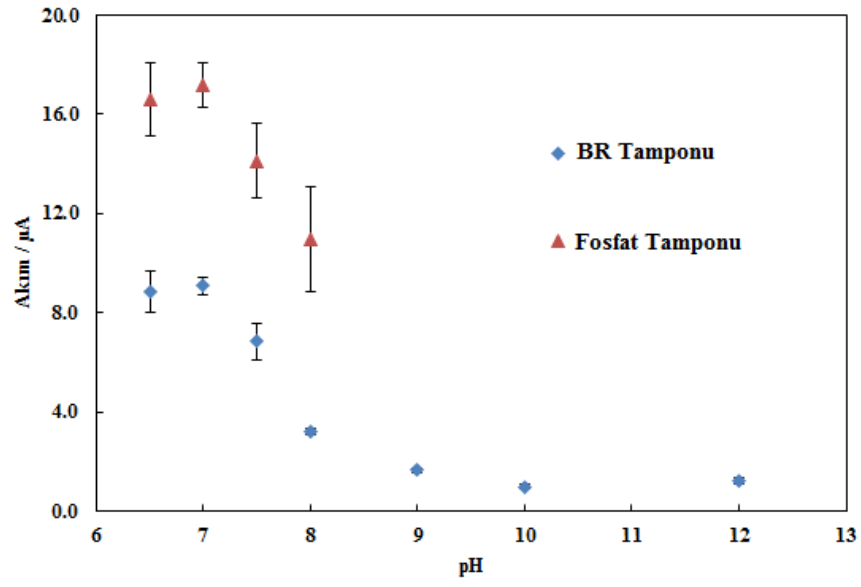
12,0) universal BR tamponu kullanılmış ve $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın 0,5'er pH birimi aralığında Dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.71).



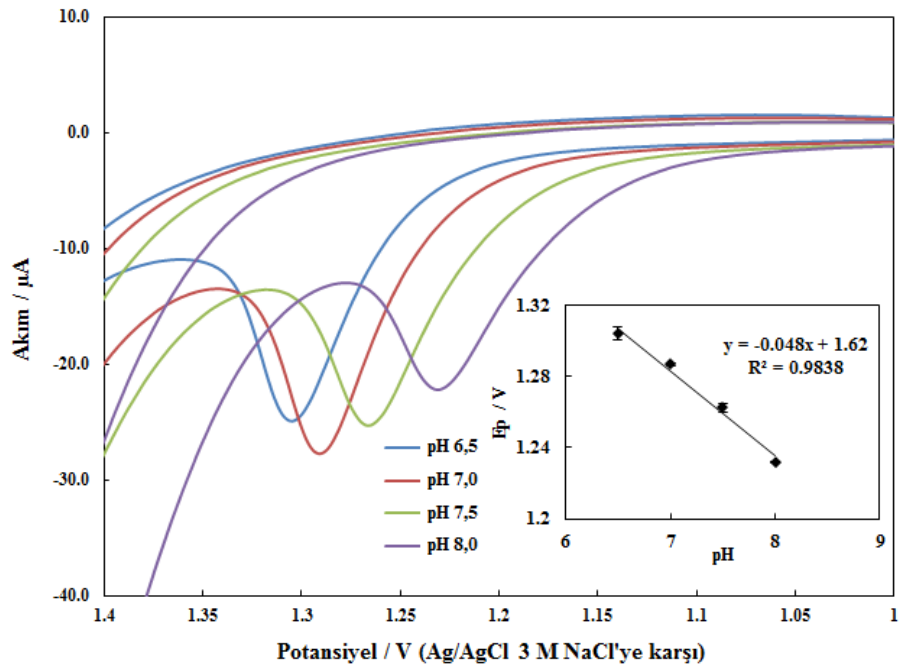
Şekil 4.70 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA ortamında farklı bileşimdeki kil yüzdelğinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları

İç grafik: a. % 1,7 - % 8,3 kil içeren elektrotlarda elde edilen Dönüşümlü voltamogramları b. % kil miktarı - i_p (pH:7,0)

BİKA'nın pH 6,5'dan önce yükseltgenme piki gözlenmemiştir. Şekil 4.71'de görüldüğü gibi en yüksek pik akımı ve pik şekli dikkate alındığında yükseltgenme piki için pH 7,0'de en yüksek pik akımı gözlenirken, pH 7,5'dan sonra akım düşmüştür. BR tamponu çalışmaları ışığında yüksek akımların gözlemlendiği pH 6,5 ile 8,0 aralığında karşılaştırmak amacıyla fosfat tamponu hazırlanmış ve bu ortamdaki Dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen akım verileri şekil 4.71'de verilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında BİKA'nın fosfat tamponu ortamında ve pH 7,0 elde edilen akımlarının yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle BİKA için en uygun elektrolit ortamı olarak fosfat tampon ortamı, en uygun pH ise 7,0 olarak belirlenmiştir. Bu ortamda farklı pH değerlerinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları ise şekil 4.72'de verilmiştir.



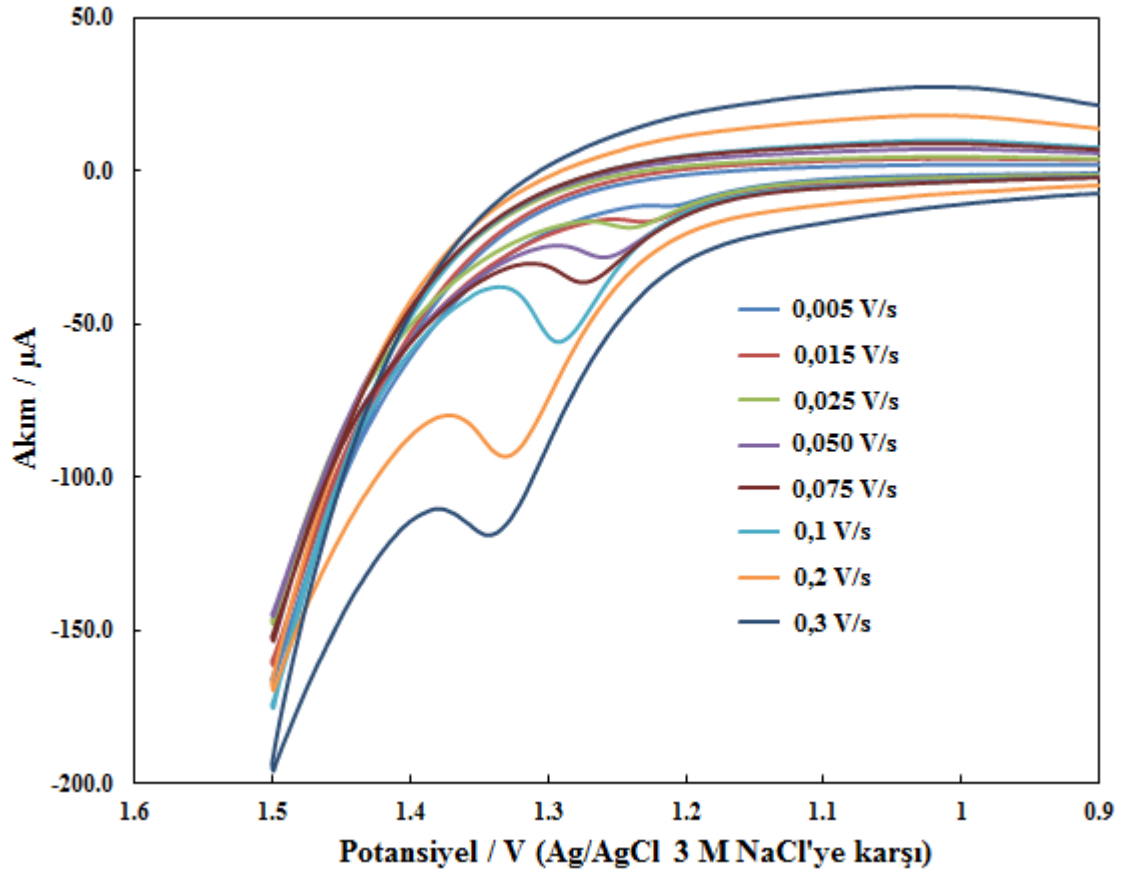
Şekil 4.71 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın farklı elektrolit ortamlarında i_p -pH grafikleri ($v:0,1$ V/s)



Şekil 4.72 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın fosfat tamponu ortamında farklı pH değerlerindeki dönüşümlü voltamogramları

4.5.3 Tarama hızı çalışması

BİKA'ya ait olan yükseltgenme piki için en uygun elektrolit ve pH değeri belirlendikten sonra DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında yapılan çalışmalar yardımıyla BİKA'nın Kıl/KPE yüzeyinde elektrokimyasal davranışı (tersinirlik, yarı tersinirlik, tersinmezlik ve adsorpsiyon özellikleri) ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu çalışmalar $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA içeren ortamda 0,005-0,3 V/s'lik tarama hızı aralığında yapılmıştır. Bu aralıkta kaydedilmiş olan voltamogramlar şekil 4.73'de verilmiştir. Bu voltamogramlardan elde edilen elektrokimyasal değişkenler çizelge 4.38'de sunulmuştur.



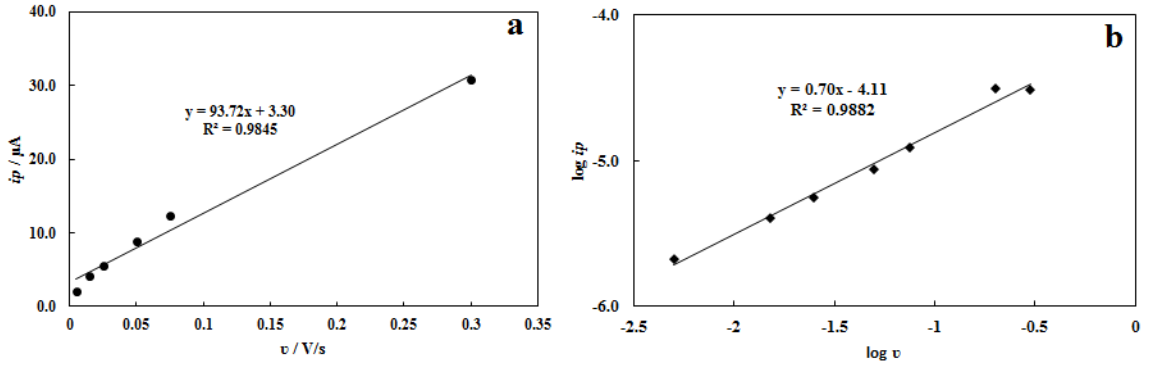
Şekil 4.73 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA ortamında DV yöntemi ile farklı tarama hızlarında kaydedilen voltamogramlar (Fosfat tamponu pH: 7,0)

Çizelge 4.38 BİKA'nın yükseltgenme pikinin tarama hızı değişimi ile elde edilen elektrokimyasal değişkenleri

Tarama hızı, V/s	E_p^a , V	i_p^a , μA
0,005	1,21	6,57
0,015	1,23	10,64
0,025	1,24	13,57
0,050	1,26	21,06
0,075	1,27	27,76
0,1	1,29	47,06
0,2	1,33	71,65
0,3	1,34	84,22

BİKA'nın 1,3 V civarında gözlenen yükseltgenme pikinin incelenmesi amacıyla öncelikle şekil 4.69 ve şekil 4.73 incelenmiştir. Bu şekillerde görüldüğü gibi geri potansiyel taramasında herhangi bir indirgenme pikine raslanmamıştır. Tarama hızı ile değişimi incelendiğinde ise pik potansiyelinin tarama hızıyla daha pozitif değerlere kaydığı çizelge 4.38'den görülmektedir. Bu sonuçlara göre BİKA'nın yükseltgenme pikinin tersinmez bir redoks davranışı gösterdiği söylenebilir (Bard ve Faulkner 2001).

BİKA'nın modifiye elektrot (Kil/KPE) yüzeyine taşınmasının adsorpsiyon ve/veya difüzyon ile olup olmadığı DV ile yine aynı aralıkta (0,0050 - 0,300 V/s) yapılan tarama hızı çalışmaları ile elde edilen pik akımlarının tarama hızıyla değişim grafikleri ($i_p - v$ ve $\log i_p - \log v$) çizilerek incelenmiştir (Şekil 4.74.a,b). Şekil 4.74.a'dan da görüleceği üzere pik akımın tarama hızı ile doğrusal olarak değişmesi maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olabileceğini düşündürmektedir (Wang 2006, Bayraktepe vd. 2016). Bu davranışı desteklemek amacıyla pik akımının logaritması ve tarama hızının logaritması ($\log i_p - \log v$) grafiği çizilmiş olup bu grafikten elde edilen eğimin 0,70 olduğu görülmektedir (Şekil 4.74.b). $\log i_p - \log v$ grafiğinden elde edilen eğim değeri teorik olarak 0,5 ile 1,0 aralığında değişmektedir. Eğimin 1,0'e yakın olması maddenin elektrot yüzeyine adsorpsiyon ile taşındığını göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar ise BİKA'nın yükseltgenme pikinin difüzyon şartları altında adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucunu desteklemektedir (Topal vd. 2013).



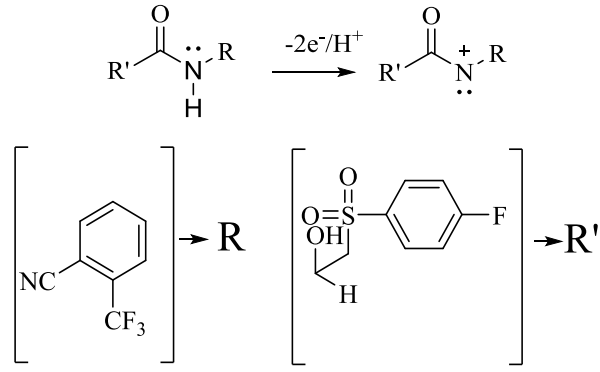
Şekil 4.74 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın tarama hızıyla pik akımının değişimi

a. $i_p - v$, b. $\log i_p - \log v$ grafikleri (tarama hızı 0,005 - 0,3 V/s)

BİKA'nın yükseltgenme mekanizmasında aktarılan elektron sayısının belirlenmesi amacıyla tersinmez sistemlerde geçerli olan eşitlik 2.6 kullanılarak elektron sayısı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mekanizmada yer alan elektron sayısı $1,87 \pm 0,60$ olarak bulunmuştur.

Elektron sayısı belirlendikten sonra şekil 4.72'de iç grafikte verilen eğim incelendiğinde, eğim değerinin teorik Nernstian eğimi olan 30,0 mV/pH değerine yakın olduğu görülmektedir. Buna göre, BİKA'nın elektrot yüzeyindeki redoks reaksiyonunda aktarılan proton sayısının elektron sayısının yarısına eşit olduğu şeklinde yorumlanabilir (Ardakani vd. 2010). Tüm bu veriler ışığında BİKA'nın yükseltgenme piki için aktarılan elektron sayısı ve proton sayısının $2e^-/H^+$ olduğu söylenebilir.

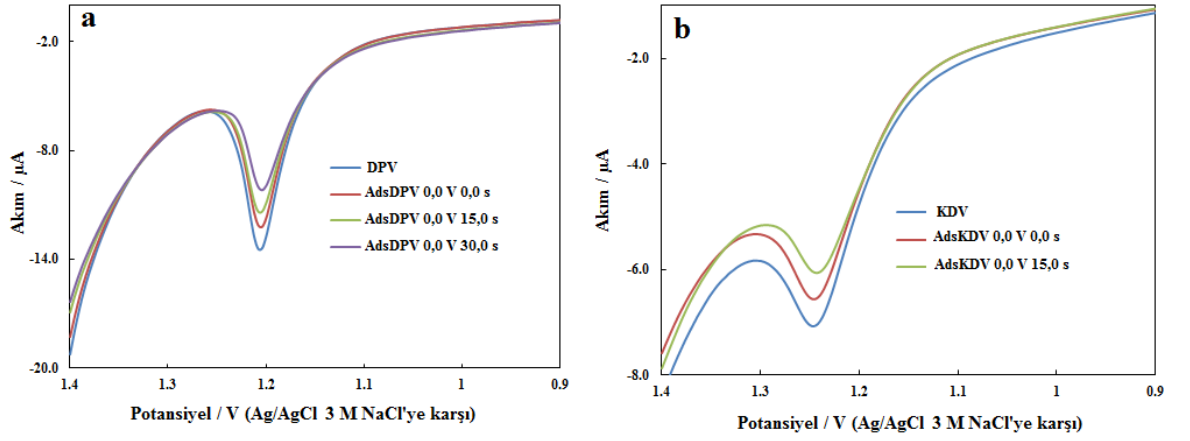
Buraya kadar yapılan çalışmalar sonucunda BİKA'nın bir adet tersinmez yükseltgenme pikinin olduğu (+1,2V) görülmüştür. Bu pikin BİKA'nın yapısında bulunan amin grubu üzerinden $2e^-/H^+$ 'un ayrılarak kararlı, pozitif yüklü yükseltgenme ürünü oluşturması ile açıklanabilir. BİKA'nın yükseltgenme pikine ait olası mekanizma şekil 4.75'de verilmiştir.



Şekil 4.75 BİKA'nın Kıl/KPE elektrot yüzeyinde gerçekleşen olası yükseltgenme mekanizması

4.5.4 BİKA'nın KDV ve DPV ile tayini

Yukarıda BİKA için yapılmış olan elektrokimyasal davranış ve mekanizma belirleme çalışmaları neticesinde bir adet tersinmez yükseltgenme pikine rastlanmıştır. Bu pik üzerinden hem AdsKDV hem de AdsDPV yöntemleri geliştirilmek istenmiş ancak her iki yöntemde ve her iki elektrot yüzeyinde (KPE ve Kıl/KPE) BİKA'nın yükseltgenme pik akımı, biriktirme potansiyeli 0,0 V, biriktirme süresi de 0,0 s olduğunda en yüksek değerlerine ulaşmıştır. Ayrıca AdsDPV ve AdsKDV yöntemiyle 0,0 V'luk potansiyel değerinde ve farklı biriktirme sürelerinde elde edilen voltamogramlarla klasik DPV ve KDV yöntemleriyle elde edilen voltamogramlar şekil 4.76'da karşılaştırılmıştır. Şekil 4.76'ya bakıldığında klasik DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen akımın daha yüksek olduğu ve biriktirme süresi arttıkça akımların düştüğü görülmüştür. Bu sonuçlar, BİKA için sıyırma tekniklerinden ziyade klasik KDV ve klasik DPV yöntemi geliştirilmesinin daha uygun olacağını düşündürmüştür. Bu amaçla, Kıl/KPE ve karşılaştırmak amacıyla KPE yüzeyinde fosfat tampon ortamında (pH 7,0) kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş olup geliştirilen yöntemler piyasada yer alan CASODEX adlı ilaç formülasyonlarına, serum ve idrar örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.



Şekil 4.76 $2,0 \times 10^{-5}$ M BİKA'nın a. Klasik DPV ve farklı biriktirme sürelerindeki AdsDPV voltamogramları b. Klasik KDV ve farklı biriktirme sürelerindeki AdsKDV voltamogramları

4.5.4.1 KDV ile kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

BİKA tayini için KDV yöntemi geliştirmek amacıyla fosfat tampon ortamı ve pH 7,0'de kalibrasyon grafikleri her iki elektrot yüzeyinde de oluşturulmuştur (Şekil 4.77.a,b).

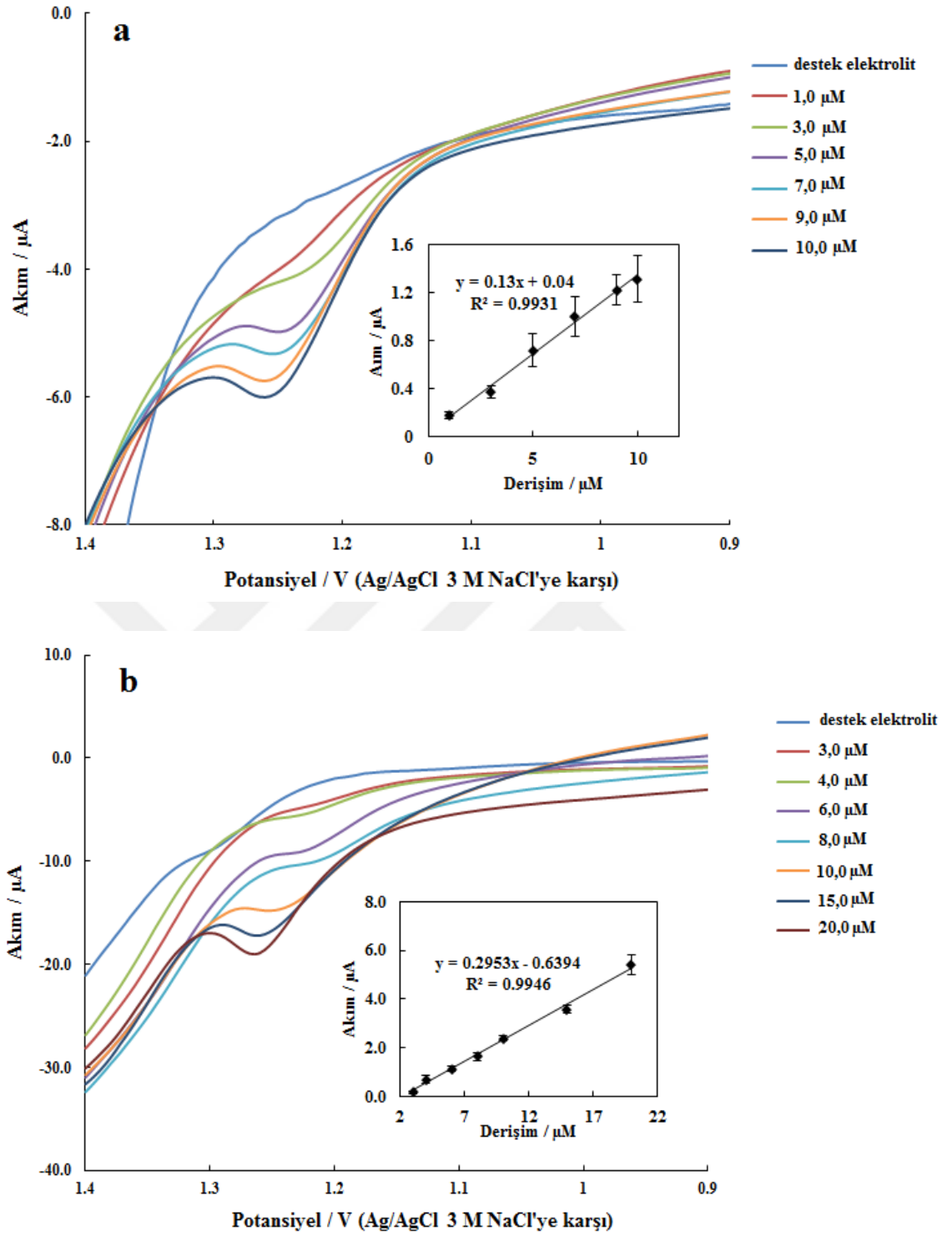
4.5.4.2 DPV ile kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

BİKA tayini için DPV yöntemi geliştirmek amacıyla fosfat tampon ortamı ve pH 7,0'de kalibrasyon grafikleri her iki elektrot yüzeyinde de oluşturulmuştur (Şekil 4.78.a,b).

Her iki elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan KDV ve DPV yöntemleriyle ilgili regresyon değişkenleri çizelge 4.39'da sunulmuştur.

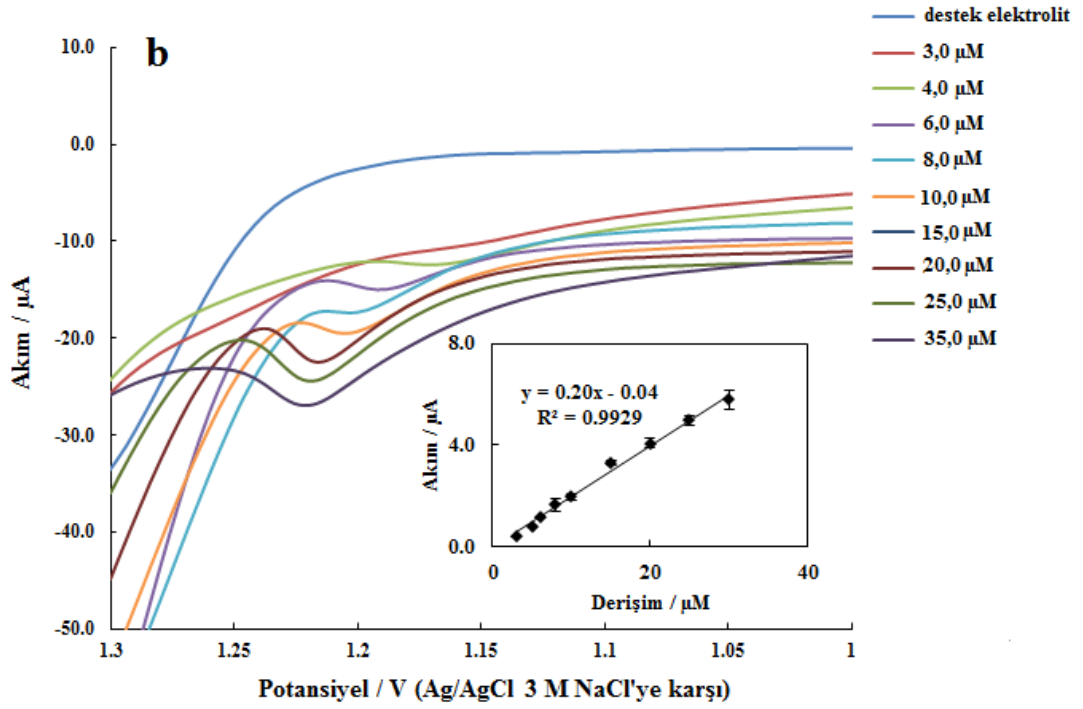
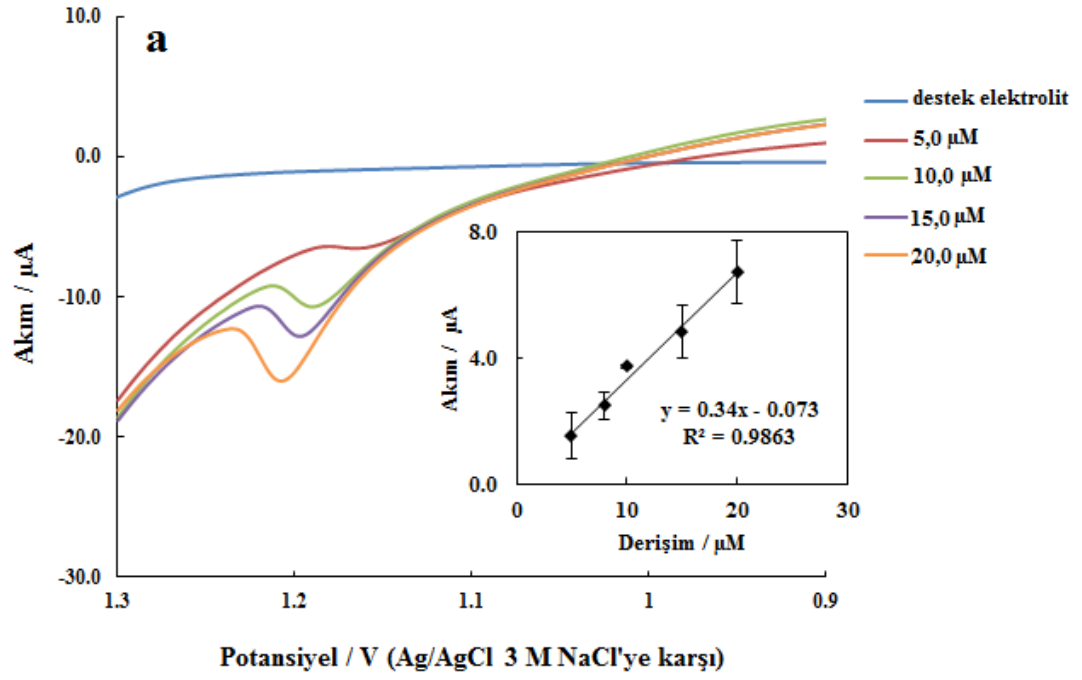
BİKA için hem KPE hem de Kil/KPE elektrot yüzeylerinde voltametrik yöntem geliştirme çalışmalarında, şekil 4.77, 4.78 ve çizelge 4.39'de görüleceği üzere;

- BİKA derişimi arttıkça pik akımlarının hem KPE hem de Kil/KPE elektrot yüzeylerinde doğrusal olarak değiştiği görülmüştür.



Şekil 4.77 BİKA'nın farklı derişimlerdeki KDönüşümlü voltamogramları

a. KPE b. Kıl/KPE iç grafik: kalibrasyon grafiği



Şekil 4.78 BİKA'nın farklı derişimlerdeki DPV voltamogramları

a. KPE b. Kıl/KPE iç grafik: kalibrasyon grafiğı

Çizelge 4.39 KPE ve Kıl/KPE elektrotları yüzeyinde geliştirilen yöntemlerin regresyon değişkenleri

Regresyon değişkeni	KPE		Kıl/KPE	
	KDV	DPV	KDV	DPV
Pik potansiyeli, V	1,276	1,216	1,264	1,200
Doğrusal çalışma aralığı, μM	1,54 – 10,0	2,78 – 20,0	0,20 – 20,0	0,24–30,0
Kalibrasyon eğrisinin eğimi, $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,13	0,34	0,30	0,20
Kalibrasyon eğrisinin kesim noktası, μA	0,04	0,07	0,64	0,64
Gözlenebilme sınırı (LOD), μM	0,46	0,83	0,069	0,072
Tayin sınırı (LOQ), μM	1,54	2,78	0,223	0,240
Regresyon katsayısı (R^2)	0,9931	0,9863	0,9946	0,9929
Gün içi akım tekrarlanabilirliği (%BSS)	2,10	4,05	4,04	1,26
Gün içi potansiyel tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,40	0,19	1,63	0,34
Günler arası akım tekrarlanabilirliği (%BSS)	4,67	6,11	3,20	1,73
Günler arası potansiyel tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,69	0,89	0,18	0,94

- Doğrusal çalışma aralığının regresyon katsayısının her iki elektrot ve her iki yöntem için de 0,98'den büyük olduğu görülmektedir. Bu durum her iki yöntemin de doğrusallığının yüksek olduğunu göstermektedir.
- Her iki elektrot ve her iki yöntemde elde edilen pik akımı ve pik potansiyellerinin tekrarlanabilirlik değerleri %10'luk BSS değerinden küçük olduğundan dolayı her iki yöntemin de tekrarlanabilirliklerinin iyi olduğu söylenebilir.
- BİKA için KPE yüzeyinde geliştirilen bu iki yöntemin doğrusal çalışma aralığı sırasıyla KDV için 1,54 – 10,0 μM , DPV için ise 2,78–20,0 μM 'dır. Modifiye elektrot yüzeyinde ise bu çalışma aralıkları sırasıyla 0,20–20,0 ve 0,24–30,0 μM 'dır.
- Eşitlik 4.1, 4.2 ve kalibrasyon eğrilerinin eğimleri yardımıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (Pandit vd. 2015). Hesaplanan değerler çizelge 4.39'da görülmektedir. Bu sonuçlara göre modifiye elektrot yüzeyinde geliştirilen KDV

yönteminin diğer yöntemlere göre biraz daha düşük gözlenebilme (0,069 µM) ve tayin (0,223 µM) sınırlarına sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.39'da yer alan regresyon değişkenlerinin yanı sıra geliştirilmiş olan Kil/KPE'nun ömrü ve tekrar üretilebilirliği de çalışılmıştır. Elektrodun kararlılığının belirlenmesi amacıyla hazırlanmış olan elektrot, $1,0 \times 10^{-5}$ M BİKA içeren çözelti ortamında KDV yöntemi ile her hafta akım değerleri en az 5 kez okunmuştur. Elde edilen ortalama akım değerlerine göre, 4 hafta sonunda ilk hafta okunan akım değerinin % 95,80 oranında korunduğu gözlenmiştir. Buna göre geliştirilmiş olan elektrodun en az 28 gün kararlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kil/KPE'nun tekrar üretilebilirliğinin tayin edilmesi amacıyla aynı bileşimde ve aynı şartlarda 5 farklı modifiye elektrot hazırlanmıştır. Elektrotların $1,0 \times 10^{-5}$ M BİKA içeren ortamdaki akımları KDV yöntemiyle en az 5 defa okunmuştur. Her bir elektrot için okunan ortalama akım değerlerinin % BSS değeri % 8,10 olarak bulunmuştur. Bu değer % 10'dan küçük olması, geliştirilmiş olan yeni elektrodun tekrar üretilebilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

4.5.4.3 Girişim etkisi

BİKA tayini için Kil/KPE elektrodu yardımıyla geliştirilmiş olan voltametrik yöntemlere, biyolojik ortamda bulunması muhtemel olan bazı türlerin girişim etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla askorbik asit, ürik asit, dopamin, L-sistein, L-glutamik asit ve glikoz gibi elektroaktif özelliği bulunan türlerin girişim etkisi araştırılmıştır. BİKA'nın belli bir derişimde bulunduğu ortama girişim yapan türün derişimi BİKA'nın derişiminden 100 kat fazla olacak şekilde ilave edilmiş ve KDV ile elde edilen pik akımları eşitlik 4.3 yardımıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.40'da sunulmuştur.

Çizelge 4.40'da görüldüğü gibi girişim yapabilecek olan türlerin derişiminin 100 kata kadar ortamda bulunması durumunda voltametrik çalışmaların dayandırıldığı yükseltgenme potansiyeline herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak geliştirilen voltametrik yöntemlerin seçiciliğinin yüksek olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.40 BİKA'nın KDV ile tayinine girişim yapması muhtemel türlerin etkisi

Girişim yapabilecek tür	% Δi_p
Askorbik asit	4,44
Ürik asit	-4,23
Dopamin	1,31
L-sistein	-2,00
L-glutamik asit	3,03
Glikoz	2,97

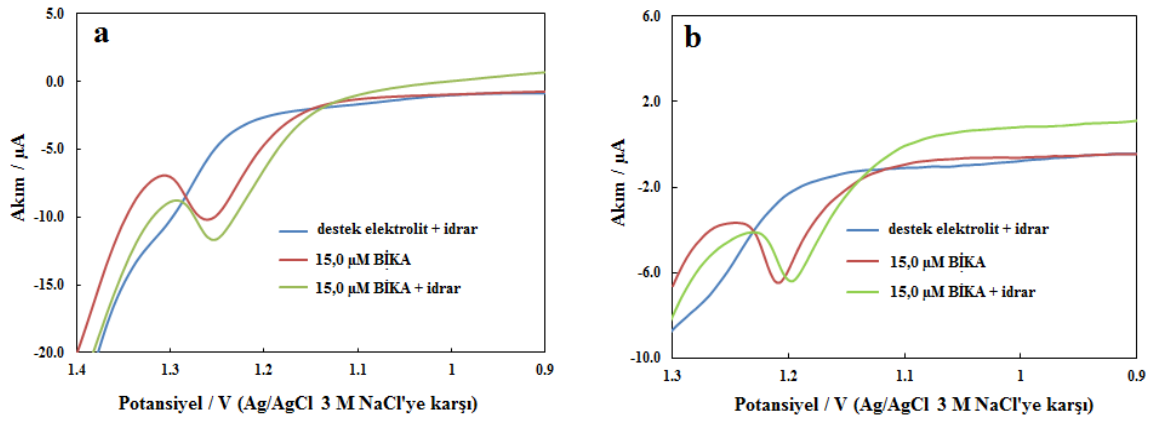
4.5.4.4 Geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelere uygulamaları

Geliştirilen yöntemlerin kalibrasyon ve girişim çalışmalarından elde edilmiş olan sonuçlardan yola çıkarak (Bölüm 4.5.4.1, 4.5.4.2 ve 4.5.4.3), Kıl/KPE yüzeyi ve ilgili yöntemler yardımıyla BİKA'nın idrar, serum ve piyasada CASODEX olarak bulunan tablet formülasyonlarından tayini gerçekleştirilmiştir. İdrar, serum ve tablet örnekleri bölüm 3.6-3.7'de anlatıldığı şekilde analize hazırlanmıştır. Daha sonra BİKA, BİKA + idrar, BİKA + serum, CASODEX ve destek elektrolit numunelerin voltamogramları, doğrusal çalışma aralığına denk gelecek şekilde farklı derişimlerde kaydedilmiş ve şekil 4.79-4.81'de verilmiştir.

Çizelge 4.41'de görüleceği üzere idrar içeren ortamda BİKA tayini için 3 farklı derişimde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Buna göre KDV ve DPV yöntemleri için hesaplanan ortalama geri kazanım değerlerinin % 100'e yakın olduğu görülmektedir. Bu durum ise BİKA'nın idrar içeren ortamdan başarıyla tayin edilebileceğini göstermektedir.

Serum içeren ve serum içermeyen ortamlarda her iki yöntemle de kaydedilmiş olan voltamogramlar şekil 4.80'de verilmiştir. Bu numuneler için de, benzer şekilde 3 farklı derişimde geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar yaklaşık olarak %100

civarında bulunmuştur (Çizelge 4.42). Elde edilen bu sonuçlar ise, BİKA'nın serum içeren ortamdan başarıyla tayin edilebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.79 BİKA tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin idrar içeren ve idrar içermeyen ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları

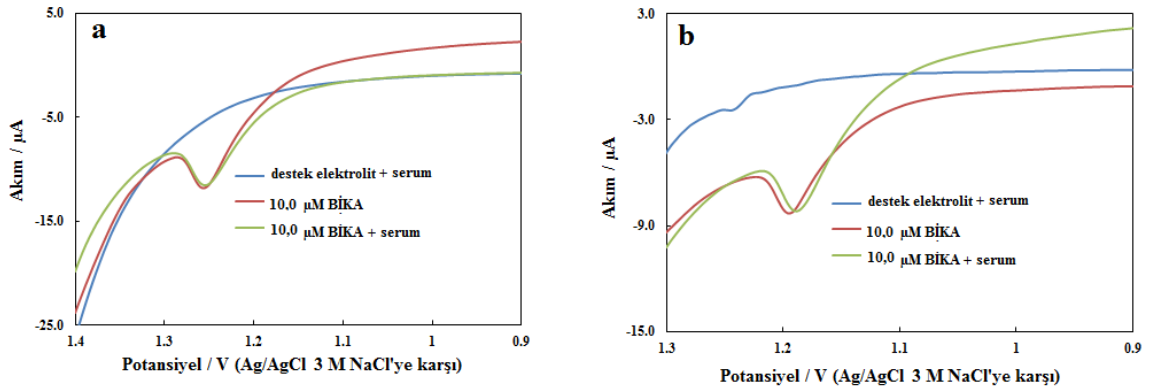
a. KDV b. DPV

Çizelge 4.41 KDV ve DPV yöntemlerinde idrar içeren ortamda BİKA için yapılan geri kazanım verileri

Yöntem	Eklenen Derişim, μM	Bulunan Derişim, μM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
KDV	8,0	8,24; 7,81; 8,40	104,62	5,95
	10,0	10,45; 8,54; 8,76	92,50	11,28
	15,0	14,10; 14,03; 15,5	95,96	3,94
DPV	8,0	7,21; 7,49; 6,45	88,14	7,64
	10,0	9,56; 9,30; 10,80	94,30	8,51
	15,0	15,83; 14,94; 14,80	102,10	3,66

*Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**Hesaplanmış olan geri kazanım değerleri için verilen bağıl standart sapma



Şekil 4.80 BİKA tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin serum içeren ve serum içermeyen ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları

a. KDV b. DPV

Çizelge 4.42 KDV ve DPV yöntemlerinde serum içeren ortamda BİKA için yapılan geri kazanım verileri

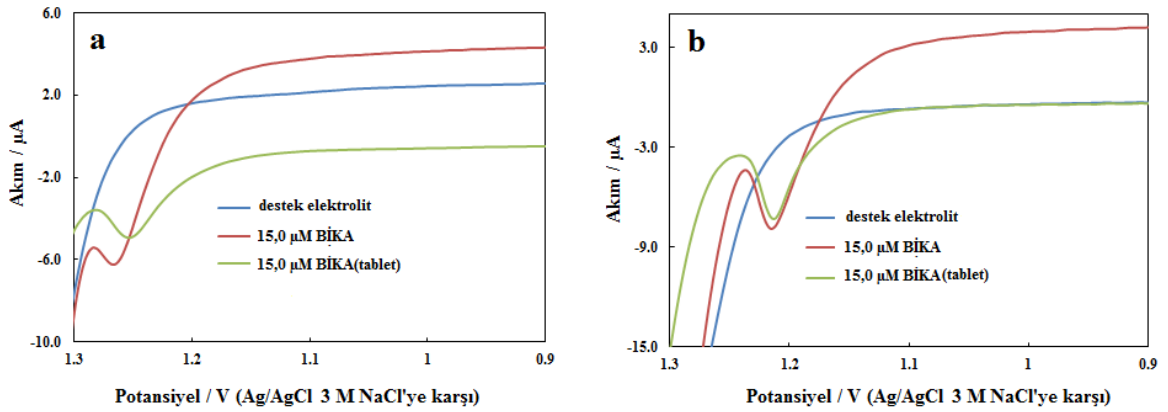
Yöntem	Eklenen Derişim, µM	Bulunan Derişim, µM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
KDV	8,0	8,57; 9,02; 6,84	101,81	14,15
	10,0	10,60; 11,59; 11,40	112,01	4,70
	15,0	14,93; 14,02; 14,19	95,87	3,38
DPV	8,0	7,27; 7,86; 7,79	95,49	4,20
	10,0	10,29; 9,60; 9,19	96,94	5,70
	15,0	14,56; 14,14; 14,32	95,60	1,45

*Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**hesaplanmış olan geri kazanım değerleri için verilen bağıl standart sapma

İdrar ve serum içeren ortamlarda olduğu gibi, piyasada CASODEX adıyla bulunan tablet örneği ile de geri kazanım çalışmaları yapılarak geliştirmiş olduğumuz yöntemlerin doğruluğu teyid edilmiştir. Bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan numunelerden elde edilen sonuçların doğrudan kalibrasyon yöntemi ile oluşturulmuş olan kalibrasyon eğrilerine ait doğru denklemiyle değerlendirilmesi sonucu hesaplanan % geri kazanım değerleri çizelge 4.43'de verilmiştir. Çizelge

4.43’de görüldüğü üzere, BİKA’nın tablet formülasyonlarından geri kazanım değerleri her iki yöntem için % 97,82 ile % 103,65 aralığında değişmektedir. Bu geri kazanım sonuçlarına göre, geliştirilen voltametrik yöntemlerle BİKA’nın tablet örneklerinden tayininin yüksek doğrulukla gerçekleştirilebileceği görülmektedir.



Şekil 4.81 BİKA tayini için geliştirilmiş olan yöntemlerin tablet ve standart ortamlarında kaydedilmiş olan voltamogramları

a. KDV b. DPV

BİKA tayini için Kil/KPE elektrot yüzeyinde geliştirilmiş olan DPV ve KDV yöntemleri, literatürde BİKA için geliştirilmiş olan diğer voltametrik yöntemlerle çizelge 4.44’de karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.44’e bakıldığında BİKA için sadece indirgenme yönünde geliştirilmiş olan iki çalışma bulunmaktadır. Tez çalışmasında ise, BİKA’nın yükseltgenme potansiyeline dayandırılan bir yöntem geliştirme çalışması yapılmıştır. Bugüne kadar yaptığımız literatür araştırmasına göre, daha önce böyle bir yöntem geliştirme çalışması yapılmamıştır (Çizelge 4.44). Çizelge 4.44’den de görüleceği üzere bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemlerin gözlenebilme sınırları daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırılabilir düzeydedir.

Çizelge 4.43 BİKA tayini için tablet örneklerinden KDV ve DPV yöntemleri ile hesaplanan geri kazanım verileri

Yöntem	Eklenen Derişim, μM	Bulunan Derişim, μM	Ortalama Geri Kazanım*, %	BSS**, %
KDV	10,0	10,85; 8,81; 10,58	100,81	11,02
	15,0	14,63; 15,29; 14,46	98,61	2,99
	20,0	19,72; 19,51; 20,76	99,98	3,33
DPV	10,0	10,34; 10,25; 10,50	103,65	1,19
	15,0	14,48; 14,75; 14,78	97,82	1,31
	20,0	19,73; 20,35; 20,01	100,05	1,55

*Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır.

**hesaplanmış olan geri kazanım değerleri için verilen bağıl standart sapma

4.5.5 BİKA'nın ds-DNA ile etkileşimin DV ve DPV yöntemleri ile incelenmesi

BİKA-DNA etkileşimi, Kıl/KPE elektrot yüzeyinde ve çözelti ortamında sadece pH 7,4'de (Fosfat tamponu) ortamında DPV ve DV yöntemleriyle ayrı ayrı incelenmiştir.

4.5.5.1 DPV yöntemi ile elde edilen bulgular

BİKA, ilerlemiş prostat kanseri tedavisinde kullanılan bir antikanser ilacıdır. Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olup DNA'ya etki ettiği bilinmektedir. Bu etkileşimi çözelti ortamında incelemek amacıyla, pH 7,4'de, 50,0 μM BİKA içeren ortama bölüm 3.6 da anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan stok DNA çözeltisinden belli derişimlerde (1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0 ppm) eklemeler yapılmıştır. BİKA'nın pik potansiyeli ve akımındaki değişimler DPV yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlar ve grafikler Şekil 4.82'de verilmiştir. Şekil 4.82 incelendiğinde, 1,0 ile 5,0 ppm aralığında eklenen DNA derişimine paralel olarak BİKA'nın yükseltgenme pik

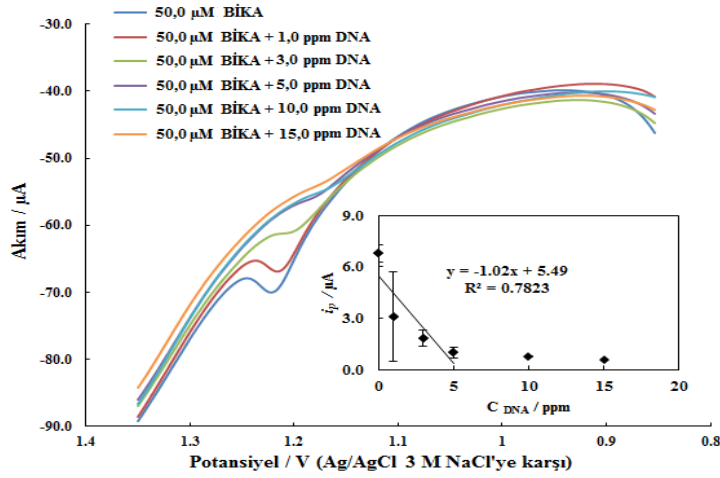
akımının azaldığı ve DNA derişimi artmaya devam ettikçe okunan akım değerin
hemen hemen sabit kaldığı dikkat çekmektedir. Artan



Çizelge 4.44 BİKA tayini için geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerin literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması

Elektrot	Yöntem	Doğrusal çalışma aralığı, μM	LOD, μM	Uygulaması	Kaynak
CKE	DPV	0,1-26,0	0,08	Tablet	Raghu vd. 2010
TDKNT/KPE	DPV	0,01-1,0	0,05	Serum, idrar, tablet	Pandit vd. 2015
<i>Kil/KPE</i>	<i>KDV</i>	<i>0,20 - 20,0</i>	<i>0,06</i>	<i>Serum, idrar, tablet</i>	<i>Tez çalışması</i>
<i>Kil/KPE</i>	<i>DPV</i>	<i>0,24-30,0</i>	<i>0,07</i>	<i>Serum, idrar, tablet</i>	<i>Tez çalışması</i>

DNA derişimine karşı BİKA'nın pik potansiyelinin yaklaşık olarak 100 mV civarında negatif potansiyellere kaydığı görülmektedir. potansiyeldeki bu negatife kayma, BİKA ile DNA arasındaki etkileşimin elektrostatik olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, elektrostatik etkileşimin yanı sıra, BİKA moleküllerinin DNA'nın yapısında bulunan Guanin bazlarına hidrojen bağlarıyla bağlanarak etkileşebileceği de olasılık dahilindedir.

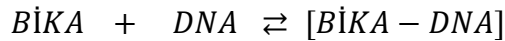


Şekil 4.82 BİKA'nın pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları

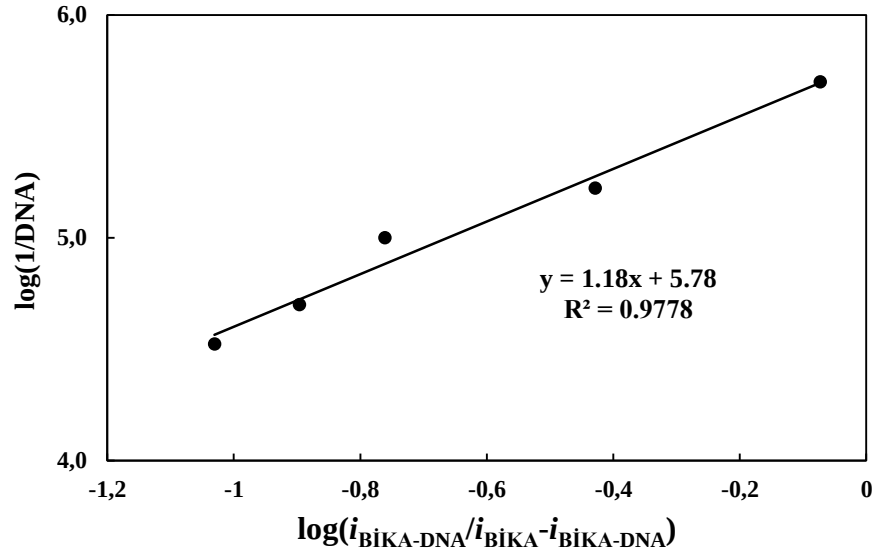
İç grafik: $C_{DNA} - i_p$ grafiği (pH 7,4)

4.5.5.2 BİKA - DNA etkileşiminin bağlanma sabitinin (K) DPV ile hesaplanması

BİKA ve DNA arasındaki etkileşimin bağlanma sabitinin hesaplanması amacıyla, DPV yöntemi ile elde edilen akım verilerden yararlanılmıştır. Bu amaçla artan DNA derişimi ile BİKA'nın pik akımındaki değişimlerden ve bölüm 2.3.2'de verilmiş olan eşitlik 2.12'dan yararlanılarak DNA ve BİKA arasındaki bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. Burada DNA ve BİKA'nın çözelti ortamında aşağıdaki reaksiyona göre bir kompleks oluşturduğu düşünülmüştür;



Daha önce bahsedildiği üzere, $\log(\frac{i_{BİKA-DNA}}{i_{BİKA}-i_{BİKA-DNA}})-\log(1/DNA)$ grafiği çizilmiş ve şekil 4.83’de verilmiştir. Şekil 4.83’deki grafiğin kesim noktasından bağlanma sabiti $6,02 \times 10^5$ olarak hesaplanmış ve çizelge 4.45’de verilmiştir.



Şekil 4.83 $\log(\frac{i_{BİKA-DNA}}{i_{BİKA}-i_{BİKA-DNA}})-\log(1/DNA)$ grafiği

DNA ile BİKA arasında oluşan kompleksin Standart Gibbs serbest enerjisi (ΔG^0), yukarıda bulunan K bağlanma sabiti değeri eşitlik 2.13’de yerine koyularak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.45’de verilmiştir. Burada ΔG^0 değerinin negatif olması, DNA ile BİKA arasındaki etkileşimin kendiliğinden yürüdüğünü göstermektedir

4.5.5.3 DV yöntemi ile elde edilen bulgular

BİKA’nın DNA ile etkileşimi DV yöntemi ile de pH 7,4’de $5,0 \times 10^{-5}$ M BİKA içeren ortamlarda incelenmiştir. DNA içermeyen ve 10,0 ppm DNA içeren ortamlarda yapılmış olan tarama hızı çalışması ile BİKA ve BİKA-DNA kompleksinin difüzyon katsayısı (D), ETP’nin yüzey derişimi (I) ve reaksiyonun standart heterojen hız sabiti

(k_s) değişkenleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Hesaplamalara ilişkin ayrıntılar aşağıda sunulmuş olup sonuçlar çizelge 4.45’de listelenmiştir.

Difüzyon katsayısının (D) hesaplanması

Yapılan tarama hızı çalışması sonuçlarına göre, düşük tarama hızlarında elde edilen $i_p-v^{1/2}$ grafiğinin eğimi, tersinmez ve yarı tersinir sistemler için geçerli olan eşitlik 2.8’den yararlanarak BİKA’nın serbest haldeki ve bu ortama belli derişimde DNA ilavesi yapılarak difüzyon katsayıları hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 4.45’de sunulmuştur. Çizelge 4.45’de görüldüğü gibi BİKA’nın tek başınayken hesaplanan difüzyon katsayısı $6,78 \times 10^{-4} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ iken, DNA ilave edildiğinde $2,45 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e düşmektedir. Bu sonuçlara göre, serbest haldeki BİKA’ya göre, ortama DNA ilave edildiğinde BİKA’nın elektrot difüzyon katsayısının düştüğü görülmektedir.

Standart heterojen hız sabitinin (k_s) hesaplanması

Tarama hızı verilerinden hareket edilerek çizilmiş olan $\ln v-E_p$ grafiğinin eğimi ve eşitlik 2.5’den yararlanarak DNA içeren ve DNA içermeyen ortamlarda BİKA’nın k_s değerleri hesaplanmış olup sonuçlar çizelge 4.45’de sunulmuştur. Çizelge 4.45’de görüldüğü üzere BİKA’nın k_s değeri, BİKA serbest halde iken $0,57 \text{ s}^{-1}$ ’dir. Ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $0,70 \text{ s}^{-1}$ olmaktadır. Bu değerlerin birbirine yakın olması BİKA’nın elektrokimyasal özelliğide herhangi bir değişiklik olmadığı ve BİKA’nın DNA ile oluşturduğu kompleksin elektroaktif özellik göstermediği şeklinde yorumlanabilir (Jiao vd. 2005).

BİKA’nın elektrot yüzey derişimin (Γ) hesaplanması

Tarama hızı çalışması ile elde edilen akım değerleri tarama hızına karşı grafiğe geçirilerek elde edilen eğim ve eşitlik 2.7 yardımıyla BİKA için her iki ortamda da Γ değerleri hesaplanmış ve çizelge 4.45’de verilmiştir. Çizelge 4.45’de görüldüğü gibi

BİKA tek başına iken bulunan Γ değeri $7,67 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ iken, ortama DNA ilave edildiğinde bu değer $1,61 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ 'ye düşmektedir.

Çizelge 4.45 BİKA-DNA etkileşimi için hesaplanan Difüzyon katsayısı (D), heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (Γ), bağlanma sabiti (K) ve Gibbs serbest enerji (ΔG°) değerleri

pH	Ortam bileşimi	D ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) $\times 10^{-6}$	k_s (s^{-1})	Γ (mol cm^{-2}) $\times 10^{-9}$	K (mol^{-1} $\text{L}) \times 10^5$	ΔG° kJ mol^{-1}
7,4	BİKA	678(± 151)	0,57($\pm 0,12$)	7,67($\pm 2,85$)		
	BİKA + DNA	2,45($\pm 1,19$)	0,70($\pm 0,19$)	1,61($\pm 0,6$)	6,02	-32,97

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında antikanser özellik gösteren şikonin (ŞKN), mitoksantron (MTK), etoposid (ETP) ve bikalutamid (BİKA)'ın sepiyolit kili, ÇDKNT ve TiO₂ nanoparçacıkları ve bunların uygun karışımları ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot yüzeyleride elektrokimyasal yükseltgenme mekanizmaları, voltametrik tayinleri ve DNA ile etkileşimleri araştırılmıştır. Bu amaçla, öncelikle yukarıda bahsi geçen modifiyer maddeler yardımıyla yalın karbon pasta ve yedi adet modifiye karbon pasta elektrot hazırlanmış ve elektrot yüzeylerinin analizi ve özellikleri DV, EIS ve SEM yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu sekiz adet modifiye karbon pasta elektrotlar DV, EIS ve SEM ile karşılaştırıldığında en iyi sonucun üç bileşenli olan (Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE) ve bunu takip eden elektrodun ise Kil/KPE olduğu sonucuna varılmıştır.

- ✓ En iyi sonucu veren elektrotların bileşiminde bulunan sepiyolit kilinin modifiyer olarak kullanıldığı voltametrik çalışmalara literatürde rastlanmakla birlikte, üç bileşenli modifiye karbon pasta elektrotla (Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE) yapılmış olan çalışmalara hiç rastlanmamıştır. Bu tez çalışması ile ilk defa hazırlanmış olan bu elektrot literatüre kazandırılmıştır (Bayraktepe vd. 2016).
- ✓ Şikonin adlı antikanser ilacına ait iki yükseltgenme piki gözlenmiştir. Her iki yükseltgenme pikinin yarı tersinir ve adsorpsiyon kontrollü olduğu belirlenmiştir.
- ✓ Şikonin'in her iki yükseltgenme piki ayrıntılı olarak incelenmiş olası yükseltgenme mekanizmaları ilk defa önerilmiştir.
- ✓ Şikonin için hem yalın karbon pasta elektrotta hem de modifiye edilmiş karbon pasta elektrotta AdsKDV ve AdsDPV voltametrik yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerden AdsDPV yönteminin daha duyarlı olduğu, diğer voltametrik yöntemlere göre de gözlenebilme sınırının daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

- ✓ Geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerle, Şikoninin modifiye elektrot yüzeyindeki yükseltgenme sinyaline ait pik potansiyeli ve pik akımlarının gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirlikleri çalışılmıştır. Çizelge 4.10'da, bu verilere ait olan % BSS değerlerine bakıldığında söz konusu elektrot yüzeyinde geliştirilmiş yöntemlerin tekrarlanabilirliklerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür.
- ✓ Şikonin için geliştirilmiş olan Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrodunun tekrar üretilebilirliğinin (düşük %BSS ile) oldukça iyi olduğu sonucuna varılmıştır.
- ✓ Geliştirilen yöntemlerle Şikonin pik potansiyeline biyolojik ortamda bulunması muhtemel bazı türlerin etkisi araştırılmış ve girişim etkilerinin olmadığı görülmüştür. Bu durum ise, geliştirilmiş olan voltametrik yöntemlerin seçiciliklerinin yüksek olduğunu göstermektedir.
- ✓ Şikonin için geliştirilen voltametrik yöntemlerin biyolojik numunelerde (serum ve idrar) geri kazanım çalışmaları yapılmış ve biyolojik numunelere başarıyla uygulanmıştır.
- ✓ Şikoninin ds-DNA ile etkileşimi iki farklı fizyolojik pH'da voltametrik yöntemlerle ilk defa incelenmiştir. Bu amaçla Şikonin - DNA etkileşimine ait difüzyon katsayısı (D), standart heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (I'), bağlanma sabiti ve Standart Gibbs serbest enerjisi değerleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Buna göre Şikonin - DNA etkileşimin elektrostatik yolla olduğu sonucuna varılmıştır.
- ✓ Mitoksantron adlı antikanser ilacına ait iki yükseltgenme piki gözlenmiştir. Bunlardan, birinci yükseltgenme pikinin yarı tersinir ve adsorpsiyon, ikinci yükseltgenme pikinin ise tersinmez ve adsorpsiyon kontrollü olduğu belirlenmiştir.
- ✓ Mitoksantronun her iki yükseltgenme piki ayrıntılı olarak incelenmiş ve olası yükseltgenme mekanizmaları ilk defa önerilmiştir.

- ✓ Mitoksantron için hem yalın karbon pasta elektrotta hem de modifiye edilmiş karbon pasta elektrotta (Kil/KPE) AdsKDV ve AdsDPV voltametrik yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerden AdsKDV yönteminin daha duyarlı olduğu, diğer voltametrik yöntemlere göre de gözlenebilme sınırının daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.
- ✓ Geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerle, Mitoksantronun modifiye elektrot yüzeyindeki yükseltgenme sinyaline ait pik potansiyeli ve pik akımlarının gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirlikleri çalışılmıştır. Çizelge 4.18’de, bu verilere ait olan % BSS değerlerine bakıldığında söz konusu elektrot yüzeyinde geliştirilmiş yöntemlerin tekrarlanabilirliklerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür.
- ✓ Mitoksantron için geliştirilmiş olan Kil/KPE elektrodunun tekrar üretilebilirliğinin (oldukça düşük %BSS ile) oldukça iyi olduğu sonucuna varılmıştır.
- ✓ Geliştirilen yöntemlerle Mitoksantronun pik potansiyeline biyolojik ortamda bulunması muhtemel bazı türlerin etkisi araştırılmış ve ürik asit dışındakilerin girişim etkilerinin olmadığı görülmüştür. Bu durum ise, geliştirilmiş olan voltametrik yöntemlerin seçiciliklerinin iyi olduğunu göstermektedir.
- ✓ Mitoksantron için geliştirilen voltametrik yöntemlerin serum ve ilaç formülasyonlarında geri kazanım çalışmaları yapılmış olup elde edilen geri kazanım sonuçlarına göre bu ortamlarda, Mitoksantronun yüksek doğrulukla tayin edilebileceği görülmüştür.
- ✓ Mitoksantronun ds-DNA ile etkileşimi iki farklı fizyolojik pH’da voltametrik yöntemlerle incelenmiştir. Bu amaçla Mitoksantron - DNA etkileşimine ait difüzyon katsayısı (D), standart heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (Γ), bağlanma sabiti ve Standart Gibbs serbest enerjisi değerleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen

sonuçlara göre Mitoksantron-DNA etkileşiminin interkalasyon yolu ile olduğu belirtilmiştir.

- ✓ Etoposid adlı antikanser ilacına ait iki yükseltgenme piki gözlenmiştir. Bunlardan birinci yükseltgenme pikinin yarı tersinir adsorpsiyon, ikinci yükseltgenme pikinin ise tersinmez ve difüzyon kontrollü olduğu belirlenmiştir.
- ✓ Etoposidin her iki yükseltgenme piki ayrıntılı olarak incelenmiş ve olası yükseltgenme mekanizmaları ilk defa önerilmiştir.
- ✓ Etoposid için hem yalın karbon pasta elektrotta hem de modifiye edilmiş karbon pasta elektrotta (Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE) AdsKDV ve AdsDPV voltametrik yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerden AdsKDV yönteminin daha duyarlı olduğu, diğer voltametrik yöntemlere göre de gözlenebilme sınırının daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.
- ✓ Geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerle, Etoposidin modifiye elektrot yüzeyindeki yükseltgenme sinyaline ait pik potansiyeli ve pik akımlarının gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirlikleri çalışılmıştır. Çizelge 4.31’de, bu verilere ait olan % BSS değerlerine bakıldığında söz konusu elektrot yüzeyinde geliştirilmiş yöntemlerin tekrarlanabilirliklerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, Etoposid için geliştirilmiş olan Kil/ÇDKNT/TiO₂/KPE elektrodunun tekrar üretilebilirliğinin de (oldukça düşük %BSS ile) oldukça iyi olduğu sonucuna varılmıştır.
- ✓ Geliştirilen yöntemlerle Etoposidin pik potansiyeline biyolojik ortamda bulunması muhtemel bazı türlerin etkisi araştırılmış ve girişim etkilerinin olmadığı görülmüştür. Bu durum ise, geliştirilmiş olan voltametrik yöntemlerin seçiciliklerinin iyi olduğunu göstermektedir.
- ✓ Etoposid için geliştirilen voltametrik yöntemlerin serum, idrar ve ilaç formülasyonlarından geri kazanım çalışmaları yapılmış ve elde edilen geri kazanım

sonuçlarına göre bu ortamlarda, Etoposidin yüksek doğrulukla tayin edilebileceği görülmüştür.

- ✓ Etoposidin ds-DNA ile etkileşimi iki farklı fizyolojik pH'da voltametrik yöntemlerle incelenmiştir. Bu amaçla Mitoksantron - DNA etkileşimine ait difüzyon katsayısı (D), standart heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (I), bağlanma sabiti ve Standart Gibbs serbest enerjisi değerleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Etoposid-DNA etkileşiminin interkalasyon yolu ile olduğu belirtilmiştir.
- ✓ Bikalutamid adlı antikanser ilacına ait bir adet yükseltgenme piki gözlenmiştir. Bu pikin tersinmez ve adsorpsiyon şartlarında difüzyon kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır.
- ✓ Bikalutamidin yükseltgenme piki ayrıntılı olarak incelenerek olası yükseltgenme mekanizması ilk defa önerilmiştir.
- ✓ Bikalutamid için hem yalın karbon pasta elektrotta hem de modifiye edilmiş karbon pasta elektrotta (Kil/KPE) yükseltgenme piki kullanılarak ilk defa KDV ve DPV voltametrik yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerden KDV yönteminin daha duyarlı olduğu, literatürdeki diğer voltametrik yöntemlere göre de gözlenebilme sınırının karşılaştırılabilir düzeyde olduğu görülmüştür.
- ✓ Geliştirilmiş olan voltametrik tekniklerle, Bikalutamidin modifiye elektrot yüzeyindeki yükseltgenme sinyaline ait pik potansiyeli ve pik akımlarının gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirlikleri çalışılmıştır. Çizelge 4.39'da, bu verilere ait olan % BSS değerlerine bakıldığında söz konusu elektrot yüzeyinde geliştirilmiş yöntemlerin tekrarlanabilirliklerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, Bikalutamid için geliştirilmiş olan Kil/ KPE elektrodunun tekrar üretilebilirliğinin de (düşük %BSS ile) oldukça iyi olduğu sonucuna varılmıştır.

- ✓ Geliştirilen yöntemlerle, Bicalutamidin pik potansiyeline biyolojik ortamda bulunması muhtemel bazı türlerin etkisi araştırılmış ve girişim etkilerinin olmadığı görülmüştür. Bu durum ise, geliştirilmiş olan voltametrik yöntemlerin seçiciliklerinin iyi olduğunu göstermektedir.
- ✓ Bicalutamit için geliştirilen voltametrik yöntemlerin serum, idrar ve ilaç formülasyonlarından geri kazanım çalışmaları yapılmış ve elde edilen geri kazanım sonuçlarına göre bu ortamlarda, Bicalutamidin yüksek doğrulukla tayin edilebileceği görülmüştür.
- ✓ Bicalutamidin ds-DNA ile etkileşimi iki farklı fizyolojik pH'da voltametrik yöntemlerle incelenmiştir. Bu amaçla Bicalutamid-DNA etkileşimine ait difüzyon katsayısı (D), standart heterojen hız sabiti (k_s), yüzey derişimi (Γ), bağlanma sabiti ve Standart Gibbs serbest enerjisi değerleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Bicalutamit-DNA etkileşiminin elektrostatik yolla olduğu belirtilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2008a. Web sitesi: <http://www.ilacprospektusu.com>, Erişim tarihi: 17 Ocak 2017
- Anonim. 2008b. Web sitesi: <http://www.ilacprospektusu.com>, Erişim tarihi: 17 Ocak 2017
- Anonim. 2008c. Web sitesi: <http://www.ilacprospektusu.com>, Erişim tarihi: 17 Ocak 2017
- Anonymous. 2016a. Web sitesi: <https://tr.wikipedia.org>, Erişim tarihi: 10 Ekim 2016
- Anonymous. 2016b. Web sitesi: <https://tr.wikipedia.org>, Erişim tarihi: 15 Ekim 2016
- Alvarez, A., 1984. Sepiolite: Properties and Uses. *Developments in Sedimentology* 37:253–287.
- An, J., Li, J. P., Chen, W. X., Yang, C. X., and Wang, C. M., 2013. Electrochemical study and application on shikonin at poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene sheets modified glass carbon electrode. *Chemical Research in Chinese Universities* 29: 798-805.
- Andújar, I., Ríos, J. L., Giner, R. M. and Recio M. C. 2013. Pharmacological properties of shikonin - A review of literature since 2002. *Planta Medica* 79:1685–1697.
- Aydoğdu, G., Günendi. G., Zeybek, D. K., Zeybek B. and Pekyardimci ř. 2014. A novel electrochemical DNA biosensor based on poly-(5-amino-2-mercapto-1, 3,4-thiadiazole) modified glassy carbon electrode for the determination of nitrofurantoin. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 197:211–219.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R. 2001. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Application*, 2nd edition, John Wiley and Sons inc. New York, USA.
- Bayraktepe, D. E., Yazan Z., and Polat K. 2016. Sensitive and selective voltammetric determination of anticancer agent shikonin on sepiolite clay/TiO₂ nanoparticle/MWCNTs composite carbon paste sensor and investigation of its electrooxidation mechanism. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 780:38–45.
- Baytak, A. K., Duzmen S., Teker T. and Aslanoglu M. 2017. Voltammetric determination of methylparaben and its DNA interaction using a novel platform based on carbon nanofibers and cobalt-nickel-palladium nanoparticles. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 239:330–337.
- Benvidi, A., Dalirnasab, S., Jahanbani, S., Tezerjani, M. D., Ardakani, M. M., Mirjalili, B. B. F., and Zare, R. 2016. Development of a Carbon Paste Electrode Modified with Reduced Graphene Oxide and an Imidazole Derivative for Simultaneous

- Determination of Biological Species of N-acetyl-L-cysteine, Uric Acid and Dopamine. *Electroanalysis* 28:1625–1633.
- Bozal-Palabiyik, B., Dogan-Topal, B., Uslu, B., Can, A. and Ozkan, S. A. 2013. Sensitive voltammetric assay of etoposide using modified glassy carbon electrode with a dispersion of multi-walled carbon nanotube. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 17(11):2815-2822.
- Bo, H. J. and Long, L. Q. 2001. Studies on the Voltammetric Behavior of Mitoxantrone and Its Application at the Ni/GC Modified Electrode [J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 3:009.
- Brett, A. M. O., Macedo T. R. A., Raimundo D., Marques M. H. and Serrano S. H. P. 1998. Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 13:861–867.
- Brett, A. O., Macedo, T. R. A., Raimundo, D., Marques, M. H., and Serrano, S. H. P. 1999. Electrochemical oxidation of mitoxantrone at a glassy carbon electrode. *Analytica chimica acta*, 385(1):401-408.
- Brown, E. R. and Sandifer, J. R. 1986. *Physical Methods in Chemistry: Electrochemical Methods*; Rossiter, BW, Hamilton, JH, Eds.
- Bu, J. L. M., and Jantová S. I. Š. 2000. Modified screen-printed electrodes for the investigation of the interaction of non-electroactive quinazoline derivatives with DNA 110:364–368.
- Chaires, J. B. 1998. Drug-DNA interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 8:314–320.
- Bayraktepe, D. E., Yanardağ, T., Yazan Z., and Aksüt, A. 2015. Voltammetric determination of etoposide by using sepiolite clay modified electrode and its interaction with DNA. *Rev. Roum. Chim*, 60(4):287-295.
- David, I. G., Popa D. E., Calin A. A., Buleandra M. and Iorgulescu E. E. 2016. Voltammetric determination of famotidine on a disposable pencil graphite electrode. *Turkish Journal of Chemistry* 40:125–135.
- Del Pozo, J. A., García, A. C., and Blanco, P. T. 1993. Adsorptive stripping voltammetry on mercury-coated carbon fibre ultramicroelectrodes. *Analytica chimica acta*, 273: 101-109.
- Dogan-Topal, B., Bozal-Palabiyik B., Uslu B. and Ozkan S. A. 2013. Multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a voltammetric nanosensor for the sensitive determination of anti-viral drug valganciclovir in pharmaceuticals. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 177:841–847.
- Eksin, E., Muti M. and Erdem A. 2013. Chitosan/ionic liquid composite electrode for electrochemical monitoring of the surface-confined interaction between mitomycin C and DNA. *Electroanalysis* 25:2321–2329.

- Erdem, A. and Özsöz M. 2001. Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA. *Turkish Journal of Chemistry* 25:469–475.
- Erden, S., Eskiköy Bayraktepe D., Yazan Z. and Dinç E. 2016. TiO₂ modified carbon paste sensor for voltammetric analysis and chemometric optimization approach of amlodipine in commercial formulation. *Ionics* 22:1231–1240.
- Gao, Y. S., Wu, L. P., Zhang, K. X., Xu, J. K., Lu, L. M., Zhu, X. F. and Wu, Y. 2015. Electroanalytical method for determination of shikonin based on the enhancement effect of cyclodextrin functionalized carbon nanotubes. *Chinese Chemical Letters* 26:613–618.
- Gherghi, I. C., Girousi, S. T., Voulgaropoulos, A. N. and Tzimou-Tsitouridou, R. 2003a. Study of interactions between actinomycin D and DNA on carbon paste electrode (CPE) and on the hanging mercury drop (HMDE) surface. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31:1065–1078.
- Gherghi, I. C., Girousi, S. T., Voulgaropoulos, A. N. and Tzimou-Tsitouridou, R. 2003b. Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE). *Talanta* 61:103–112.
- Gooding, J. J. 2005. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. *Electrochimica Acta* 50:3049–3060.
- Gupta, S. M. and Tripathi, M. 2011. A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Science Bulletin* 56:1639–1657.
- Hande, K. R. 1998. Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*.
- He, W., Li, Y., Tian, J., Liu, H., Hu, Z. and Chen, X. 2005. Spectroscopic studies on binding of shikonin to human serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 174:53–61.
- Hernandez, P., Vicente, J. and Hernandez, L. 1989. Determination of tetramethrin (neopynamin) by differential pulse voltammetry with a carbon paste electrode modified with sepiolite 550–553.
- Hernandez, L., Hernandez, P. and Sosa, Z. 1988. Determination of phenol by differential pulse voltammetry with a sepiolite-modified carbon paste electrode 525–527.
- Hernandez, P., Alda, E. and Hernandez, L. 1987. Determination of mercury (II) using a modified electrode with zeolite. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 327:676–678.

- Honeychurch, K. C., Brooks, J. and Hart, J. P. 2016. Development of a voltammetric assay, using screen-printed electrodes, for clonazepam and its application to beverage and serum samples. *Talanta* 147:510–515.
- Holthuis, J. J. M., Van Oort, W. J., Römken, F. M. G. M., Renema, J. and Zuman, P. 1985. Electrochemistry of podophyllotoxin derivatives: Part i. Oxidation mechanism of etoposide (vp 16–213). *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, 184:317-329.
- Hong, B. and Cheng, Q. 2012. Sensitive Voltammetric Determination of Mitoxantrone by Using CS-Dispersed Graphene Modified Glassy Carbon Electrodes. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 2:453.
- Huang, Y. I., Cheng, Y. H., Yu, C. C., Tsai, T. R. and Cham, T. M. 2007. Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin-acacia coacervation method: A formaldehyde-free approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58:290–297.
- Jiang, L. C. and Zhang, W. D. 2009. Electrodeposition of TiO₂ nanoparticles on multiwalled carbon nanotube arrays for hydrogen peroxide sensing. *Electroanalysis* 21:988–993.
- Jiao, K., Li, Q. J., Sun, W. and Wang, Z. Y. 2005. Studies on the Recognition Interaction of Rhodamine B and DNA by Voltammetry. *Chemical Research in Chinese Universities* 21:145–148.
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z. and Ozsoz, M. 2002. Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA. *Electrochemistry Communications* 4:705–709.
- Kissinger, P. T. 1996. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*: 76-84-716.
- Li, N., Ma, Y., Yang, C., Guo, L., and Yang, X. 2005. Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biophysical Chemistry* 116:199–205.
- Mandong, G. 1995. Study on Mitoxantrone Using Mercury Film Carbon Fiber Microelectrode by 1. 5 Order Differential Stripping Voltammetry [J]. *Journal Of Analytical Science*, 2.
- Mao, Y., Hu, J., Li, Q. and Xue, P. 2000. Study of the electrochemical behavior of mitoxantrone and its determination at a Co–C modified ultramicroelectrode. *Analyst*, 125:2299-2302.
- Mazloun-Ardakani, M., Rajabi, H., Beitollahi, H., Mirjalili, B. B. F., Akbari, A. and Taghavinia, N. 2010. Voltammetric Determination of Dopamine at the Surface of TiO₂ Nanoparticles Modified Carbon Paste Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci* 5:147–157.

- Mehdinia, A., Kazemi, S. H., Bathaie, S. Z., Alizadeh, A., Shamsipur, M. and Mousavi, M. F. 2009. Electrochemical DNA nano-biosensor for the study of spermidine-DNA interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49:587–593.
- Navrátilová, Z. and Kula, P. 2003. Clay modified electrodes: Present applications and prospects. *Electroanalysis* 15:837–846.
- Nawaz, H., Rauf, S., Akhtar, K. and Khalid, A. M. 2006. Electrochemical DNA biosensor for the study of ciprofloxacin-DNA interaction. *Analytical Biochemistry* 354:28–34.
- Ölgen, S., Biçak, I. and Nebioğlu, D. 2002. Angiogenesis ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 31:193–214.
- Oliveira-Brett, A. M., Vivan, M., Fernandes, I. R. and Piedade, J. A. P. 2002. Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. *Talanta* 56:959–970.
- Özkan, S. A., Uslu, B. and Aboul-Enein, H. Y. 2003. Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids Using Modern Electroanalytical Techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 33:155–181.
- Pandit, U. J., Khan, I., Wankar, S., Raj, K. K. and Limaye, S. N. 2015. Development of an electrochemical method for the determination of bicalutamide at the SWCNT/CPE in pharmaceutical preparations and human biological fluids. *Anal. Methods* 7:10192–10198.
- Penalver, A., Pocurull, E., Borrull, F. and Marce, R. M. 2002. Method based on solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*, 964:153-160.
- Qian, Y. G., Sun, Z. J., Hu, J. B., Lu, Y. Q. and Li, Q. L. 2004. Electrochemical Behavior of Mitoxantrone and Its Determination at a Pt/C Implanted Modified Microelectrode. *Chemical Research In Chinese Universities*, 20:103-107.
- Radi, A. E., Abd-Elghany, N. and Wahdan, T. 2007. Electrochemical study of the antineoplastic agent etoposide at carbon paste electrode and its determination in spiked human serum by differential pulse voltammetry. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55:1379-1382.
- Radi, A. E., El-Naggar, A. E. and Nassef, H. M. 2014. Electrochemical and Spectral studies on the Interaction of the Antiparasitic Drug Nitazoxanide with DNA. *Electrochimica Acta* 129:259–265.
- Radi, A. E., Nassef, H. M. and Eissa, A. 2013. Voltammetric and ultraviolet-visible spectroscopic studies on the interaction of etoposide with deoxyribonucleic acid. *Electrochimica Acta* 113:164–169.

- Raghu, K., Chandrasekar, A. and Sankaran, K. R. 2010. Electrochemical behavior and differential pulse voltametric determination of an antineoplastic drug bicalutamide and pharmaceuticals formulations using glassy carbon electrode 2:5-16.
- Rauf, S., Gooding, J. J., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A. and Khalid, A. M. 2005. Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37:205–217.
- Scholz, F. (2010). *Electroanalytical methods* (Vol. 1). Berlin-Heidelberg: Springer.
- Shi, J. H., Chen, J., Wang, J. and Zhu, Y. Y. 2015. Binding interaction between sorafenib and calf thymus DNA: Spectroscopic methodology, viscosity measurement and molecular docking. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 136:443–450.
- Sirajuddin, M., Ali, S. and 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.
- Švancara, I., Vytras, K., Kalcher, K., Walcarius, A. and Wang, J. 2009. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis* 21:7–28.
- Tajik, S., Taher, M. A., Beitollahi, H. and Torkzadeh-Mahani, M. 2015. Electrochemical determination of the anticancer drug taxol at a ds-DNA modified pencil-graphite electrode and its application as a label-free electrochemical biosensor. *Talanta* 134:60–64.
- Taşdemir, İ. 2011 *Hipertansiyon Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçlardaki Etken Maddelerin Tayini İçin Elektrokimyasal Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Analitik Uygulamaları*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 243, Ankara.
- Temerk, Y., Ibrahim, M., Ibrahim, H. and Kotb, M. 2015. Interactions of an anticancer drug Formestane with single and double stranded DNA at physiological conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 149:27–36.
- Temerk, Y., Ibrahim, M., Ibrahim, H. and Kotb, M. 2016. Interactions of an anticancer drug lomustine with single and double stranded DNA at physiological conditions analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 769:62–71.
- Temerk, Y. M., Ibrahim, M. S., Kotb, M. and Schuhmann, W. 2013. Interaction of antitumor flavonoids with dsDNA in the absence and presence of Cu(II). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405:3839–3846.

- Tian, X., Song, Y., Dong, H. and Ye, B. 2008. Interaction of anticancer herbal drug berberine with DNA immobilized on the glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry* 73:18–22.
- Tığ, G. A., Zeybek, B. and Pekyardımcı, Ş. 2016. Electrochemical DNA biosensor based on poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) modified glassy carbon electrode for the determination of anticancer drug gemcitabine. *Talanta* 154:312–321.
- Uslu, B. and Ozkan, S. A. 2007. Electroanalytical Application of Carbon Based Electrodes to the Pharmaceuticals. *Analytical Letters* 40:817–853.
- Uslu, B. and Ozkan, S. A. 2007. Solid electrodes in electroanalytical chemistry: present applications and prospects for high throughput screening of drug compounds. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 10:495–513.
- Vicente Rodriguez, M. A., de D Lopez Gonzalez, J. and Banares Munoz, M. A. 1994. Acid Activation of a Spanish Sepiolite: Physicochemical Characterization, Free Silica Content and Surface Area of Products Obtained. *Clay Minerals* 29:361–367.
- Villar, J. C. C., García, A. C. and Blanco, P. T. 1993. Adsorptive stripping behaviour of mitoxantrone on carbon paste electrodes. *Talanta*, 40(3):325–331.
- Villar, J. C. C., García, A. C. and Blanco, P. T. 1993. Adsorptive stripping voltammetric behaviour of mitoxantrone on mercury electrodes. *Talanta*, 40:333–339.
- Wang, H., Xie, K., Wang, L. and Han, Y. 2012. N-methyl-2-pyrrolidone as a solvent for the non-aqueous electrolyte of rechargeable Li-air batteries. *Journal of Power Sources* 219:263–271.
- Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D. H. and Paleček, E. 1998. Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45:33–40.
- Wang, J. 2000. *Analytical Electrochemistry*, John Wiley and Sons Inc. New York, USA.
- Wang, J. 2006. *Analytical Electrochemistry*. John Wiley and Sons Inc. New York, USA.
- Wiench, B., Eichhorn, T., Paulsen, M. and Efferth, T. 2012. Shikonin directly targets mitochondria and causes mitochondrial dysfunction in cancer cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012.
- Wu, L., Lu, L., Zhang, L., Xu, J., Zhang, K., Wen, Y. and Yang, F. 2013. Electrochemical determination of the anticancer herbal drug shikonin at a nanostructured poly(hydroxymethylated-3,4-ethylenedioxythiophene) modified electrode. *Electroanalysis* 25:2244–2250.
- Wu, L., Xu, J., Lu, L., Yang, T. and Gao, Y. 2015. Fabrication of nanostructured PEDOT clusters using β -cyclodextrin as substrate and applied for simultaneous

- determination of hyperoside and shikonin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 482:203-212.
- Yan, X., Zhou, C., Yan, Y. and Zhu, Y. 2015. A Simple and Renewable Nanoporous Gold-based Electrochemical Sensor for Bisphenol A Detection. *Electroanalysis* 27:2718–2724.
- Yang, P., Wang, H., Zhou, G., Fan, H. and Pan, J. 1996. The polarographic and voltammetric behaviour of mitoxantrone and analytical applications. *Polymer—Plastics Technology and Engineering*, 29:89-96.
- Ye, D., Luo, L., Ding, Y., Chen, Q. and Liu, X. 2011. A novel nitrite sensor based on graphene/polypyrrole/chitosan nanocomposite modified glassy carbon electrode. *The Analyst* 136:4563.
- Zhou, H., Wang, J. and Yea, B. 2010. Electrochemical investigation of redox reactions of herbal drug-shikonin and its determination in pharmaceutical preparations. *Journal of Analytical Chemistry* 65:749–754.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 11/11/1986

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara – Pursaklar Anadolu Lisesi (2005)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2009)

Birleştirilmiş Yüksek Lisans Doktora: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı (Eylül 2009 – Mart 2017)

Çalıştığı Kurum/Kuruluşlar

2009-2012: Düzce Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü – Araştırma
Görevlisi

2012-: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü – Kimyager

Yayınlar (SCI ve SCIE)

1. Eskiköy, D., Durmuş, Z., & Kiliç, E. (2012). Electrochemical oxidation of atorvastatin and its adsorptive stripping determination in pharmaceutical dosage forms and biological fluids. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 76(12), 1633-1649.
2. Gürler, N., **Bayraktepe, D. E.**, Durmuş, Z., & Dinç, E. (2013). Electrochemical characterization and voltammetric anodic stripping methods for the determination of valsartan. Rev. Chim.-Bucharest, 64(11), 1211-1217.

3. Erden, S., **Bayraktepe, D. E.**, Yazan, Z., & Dinç, E. (2016). TiO₂ modified carbon paste sensor for voltammetric analysis and chemometric optimization approach of amlodipine in commercial formulation. *Ionics*, 22(7), 1231-1240.
4. **Bayraktepe, D. E.**, Turan YANARDAĞ, Z. Y., & AKSÜT, A. (2015). Voltammetric determination of etoposide by using sepiyolite clay modified electrode and its interaction with DNA. *Rev. Roum. Chim*, 60(4), 287-295.
5. **Bayraktepe, D. E.**, Yazan, Z., & Polat, K. (2016). Sensitive and selective voltammetric determination of anti- cancer agent shikonin on sepiyolite clay/TiO₂ nanoparticle/MWCNTs composite carbon paste sensor and investigation of its electro- oxidation mechanism. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 780, 38-45.
6. Sağlam, E. G., Erden, S., Tutsak, Ö., **Bayraktepe, D. E.**, Durmuş, Z. Y., Dal, H., & Ebinç, A. (2016). Syntheses, characterization of and studies on the electrochemical behaviour of ferrocenyl dithiophosphonates and 4-methoxyphenyl dithiophosphonates. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 1-8.

Ulusal Kongre Sunum

1. **Eskiköy D.**, Durmuş Z. and Kılıç E., “Atorvastatin’in Elektrokimyasal Davranışı ve Adsorptif Sıyırma Yöntemleri ile Tayini” Zonguldak Karaelmas Üniversitesi 24. Ulusal Kimya Kongresi, AP027 (2010).
2. **Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE**, Zehra YAZAN, “Sepiyolit Kil Temelli Modifiye Elektrot ile Etoposidin Tayini ve DNA ile Etkileşiminin Araştırılması” Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, P.52 (2014)
3. Sevcan ERDEN, **Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE**, Zehra DURMUŞ, Erdal DİNÇ “TiO₂ Nanopartikül Temelli Modifiye Karbon Pasta Elektrot ile Amlodipinin Tayini” Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi

Uluslararası Kongre Sunum

1. Gürler N., **Eskiköy D.**, Durmuş Z. and Kılıç E., “Electrochemical Characterization and voltammetric anodic stripping methods for the determination of Valsartan” 9th International Electrochemistry Meeting in Turkey, Çeşme İzmir P. 138 (2011).

2. **Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE**, Dilek Şura ÖZDEN, Zehra YAZAN DURMUŞ “Electrochemical Characterization and Voltammetric Adsorptive Anodic Stripping Determination of Anticancer Drug Etoposide and Its DNA Binding” XVII European Conference on Analytical Chemistry, Warsaw, Poland, P. 0517 (2013)

3. **Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE**, Turan YANARDAĞ, Zehra YAZAN DURMUŞ, Ali Abbas AKSÜT, “Investigating the Interaction of DNA and Anticancer Drug Etoposide By Using Electrochemical Impedance Spectroscopy Methods” XVII European Conference on Analytical Chemistry, Warsaw, Poland, P. 0528 (2013).

4. **Dilek ESKIKOY BAYRAKTEPE**, Dilek Sura OZDEN, Zehra YAZAN DURMUS, “Voltammetric Adsorptive Stripping Determination and Investigating DNA Interaction of Carmustine” 10th International Electrochemistry Meeting in Turkey, Konya, P.87. (2013)

5. Dilek Sura OZDEN, **Dilek ESKIKOY BAYRAKTEPE**, Zehra YAZAN DURMUS, “Square- Wave Anodic Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Amlodipine and Valsartan” 10th International Electrochemistry Meeting in Turkey, Konya, P.158. (2013)

6. **Dilek ESKİKÖY BAYRAKTEPE**, Zehra YAZAN, “Sensitive and Selective Voltammetric Approach for Determination of AntiCancer Drug Etoposide Based on Sepiyolite Clay/TiO₂ Nanoparticles Modified Carbon Paste Sensor and Investigation of Its Interaction with DNA” 10th Aegean Analytical Chemistry Days 29 September – 2 October, 2016, Çanakkale, TURKEY, P4-19.

7. Melike PEKIN, **Dilek ESKIKÖY BAYRAKTEPE**, Zehra YAZAN, “Novel Electrochemical Sensor Based on Sepiolite Clay Modified Carbon Paste Electrode for Ascorbic Acid Detection” 10th Aegean Analytical Chemistry Days 29 September – 2 October, 2016, Çanakkale, TURKEY, P4-03

