

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ANTİVİRAL ve ANTİNEOPLASTİK İLAÇ  
ETKEN MADDELERİNİN DNA ile ETKİLEŞİMİ  
ve  
ELEKTROKİMYASAL ANALİZLERİ**

Burcu DOĞAN TOPAL

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Bu tez, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından G8-2006 proje numarası ile desteklenmiştir.

2011 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Analitik Kimya Doktora Programı  
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02.02.2011

Prof.Dr. Feyyaz ONUR  
Ankara Üniversitesi  
Eczacılık Faköltesi  
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Sibel A. ÖZKAN  
Ankara Üniversitesi  
Eczacılık Faköltesi

Prof.Dr. Nilgün G. GÖĞER  
Gazi Üniversitesi  
Eczacılık Faköltesi

Prof.Dr. Sinan SÜZEN  
Ankara Üniversitesi  
Eczacılık Faköltesi

Prof.Dr. Bengi USLU  
Ankara Üniversitesi  
Eczacılık Faköltesi  
(Raportör)

## İÇİNDEKİLER

|                                                                              |          |
|------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Kabul ve Onay                                                                | ii       |
| İçindekiler                                                                  | iii      |
| Önsöz                                                                        | ix       |
| Simgeler ve Kısaltmalar                                                      | x        |
| Şekiller                                                                     | xi       |
| Çizelgeler                                                                   | xviii    |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                              | <b>1</b> |
| <b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                    | <b>8</b> |
| 2.1. Elektrokimya                                                            | 8        |
| 2.1.1. Elektrokimyasal Hücreler ve Tepkimeler                                | 8        |
| 2.1.2. Elektrokimyasal Tabakalar                                             | 11       |
| 2.1.3. Elektrokimyasal Çift Tabaka                                           | 12       |
| 2.1.4. Elektrokimyasal Bir Olayda Akımlar                                    | 13       |
| 2.1.5. Elektrokimyasal Bir Olayda Faradayik İşlemler                         | 14       |
| 2.1.6. Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları                      | 15       |
| 2.1.7. Elektrot Tepkime Hızını ve Akımını Etkileyen İşlemler ve Polarizasyon | 17       |
| 2.1.8. Elektroanalitik Yöntemler                                             | 19       |
| 2.1.8.1. Voltametri                                                          | 21       |
| 2.1.8.2. Polarografi                                                         | 23       |
| 2.1.8.3. Voltametrik Cihazlar                                                | 26       |
| 2.1.8.4. Voltametrik Elektrokimyasal Analizde Kullanılan Elektrotlar         | 28       |
| 2.1.8.4.1. Referans Elektrotlar                                              | 28       |
| 2.1.8.4.2. Çalışma Elektrotları                                              | 30       |
| 2.1.8.4.3. Yardımcı Elektrot                                                 | 49       |
| 2.1.8.5. Voltametrizde Kullanılan Elektrotlara Yapılan Ön İşlemler           | 50       |
| 2.1.8.6. Voltametrizde Kullanılan Uyarma Sinyalleri                          | 50       |
| 2.1.8.6.1. Doğrusal Taramalı Voltametri                                      | 52       |
| 2.1.8.6.2. Dönüşümlü Voltametri                                              | 52       |
| 2.1.8.6.3. Puls Polarografisi                                                | 71       |
| 2.1.8.7. Voltametrinin Yeri ve Önemi                                         | 80       |
| 2.1.8.8. Sıyırma Voltametrisi                                                | 82       |
| 2.1.8.8.1. Sıyırma Voltametrisinin Çeşitleri                                 | 83       |
| 2.1.8.8.2. Sıyırma Voltametrisinin Basamakları                               | 87       |
| 2.1.8.8.3. Yöntemin Teorisi                                                  | 89       |
| 2.1.8.8.4. Sıyırma Voltametrisinde Kullanılan Elektrotlar                    | 90       |
| 2.1.8.8.5. Sıyırma Voltametrisinin Uygulama Alanları                         | 91       |
| 2.2. Biyosensör                                                              | 93       |
| 2.2.1. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikleri               | 94       |

|                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.2. Çevirici Türüne Göre Biyosensör Çeşitleri                                               | 96  |
| 2.2.3. Elektrokimyasal Biyosensörler                                                           | 98  |
| 2.2.3.1. Elektrokimyasal Biyosensörlerin Çevirici Ölçüm Türüne Göre Sınıflandırılması          | 98  |
| 2.2.4. Analizlenecek Madde-Biyoaktif Bileşen İlişkisine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması | 100 |
| 2.2.5. Biyosensörlerin Uygulama Alanları                                                       | 103 |
| 2.2.6. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Yapıları                                | 107 |
| 2.2.7. DNA Biyosensörleri                                                                      | 116 |
| 2.2.7.1. DNA veya Prob Dizilerinin Elektrot Yüzeyine İmmobilize Edilme Yöntemleri              | 118 |
| 2.2.7.2. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile DNA Dizi Algılanması                           | 120 |
| 2.2.7.3. İlaç-DNA Etkileşmesinin Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri İle Algılanması            | 125 |
| 2.3. Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlik Testleri)                                    | 129 |
| 2.3.1. Validasyonun Genel İşlemleri                                                            | 130 |
| 2.3.2. Tipik Validasyon Karakteristikleri                                                      | 131 |
| 2.3.2.1. Doğruluk (Geri Kazanım)                                                               | 131 |
| 2.3.2.2. Kesinlik                                                                              | 134 |
| 2.3.2.3. Seçicilik                                                                             | 135 |
| 2.3.2.4. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (TS)                                            | 137 |
| 2.3.2.5. Tayin Alt Sınırı (TAS)                                                                | 138 |
| 2.3.2.6. Doğrusallık                                                                           | 139 |
| 2.3.2.6.1. Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği)                                                       | 140 |
| 2.3.2.7. Duyarlılık                                                                            | 141 |
| 2.3.2.8. Çalışma Aralığı                                                                       | 141 |
| 2.3.2.9. Sağlamlık                                                                             | 142 |
| 2.3.2.10. Tutarlılık                                                                           | 142 |
| 2.3.2.11. Stabilitate                                                                          | 143 |
| 2.3.3. Yöntem Validasyonu İle İlgili Çalışmaların Sunumu                                       | 144 |
| 2.4. Analiz Yöntemleri                                                                         | 145 |
| 2.4.1. Efavirenz için                                                                          | 145 |
| 2.4.1.1. Kromatografik Yöntemler                                                               | 145 |
| 2.4.1.2. Voltametrik Yöntemler                                                                 | 148 |
| 2.4.2. Löprolid için                                                                           | 149 |
| 2.4.2.1. Kromatografik Yöntemler                                                               | 149 |
| 2.5. Kullanılan Araç ve Gereçler                                                               | 151 |
| 2.5.1. Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler                                                  | 152 |
| 2.5.1.1. BAS 100 W ve AUTOLAB 30 Elektrokimyasal Analizör                                      | 153 |
| 2.5.1.2. Kullanılan Elektrotların Hazırlanışı                                                  | 156 |
| 2.5.1.2.1. Bor ile Dope Edilmiş Elmas Elektrot (BDEE)                                          | 156 |
| 2.5.1.2.2. Kalem Grafit Elektrot (KGE) Hazırlanışı                                             | 156 |
| 2.5.1.3. Deney Hücresi                                                                         | 157 |
| 2.5.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler                                                 | 157 |
| 2.5.2.1. Deneylerde Kullanılan Etken Maddeler Hakkında Genel Bilgi                             | 160 |
| 2.5.2.1.1. Efavirenz Hakkında Bilgi                                                            | 160 |
| 2.5.2.1.2. Löprolid Asetat Hakkında Bilgi                                                      | 162 |
| 2.5.2.1.3. Fulvestrant Hakkında Bilgi                                                          | 164 |

|                                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.5.2.2. Voltametrik Analizlerde Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması                                                                                                                            | 166 |
| 2.5.2.2.1. Destek Elektrolitleri                                                                                                                                                                   | 166 |
| 2.5.2.2.2. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları                                                                                                                                                     | 166 |
| 2.5.2.2.3. Oligonükleotit Çözeltilerinin Hazırlanışı                                                                                                                                               | 167 |
| 2.5.2.3. Standart Maddelerin Saflık Verileri                                                                                                                                                       | 167 |
| 2.5.3. Deneylerde Kullanılan Yöntemler                                                                                                                                                             | 168 |
| 2.5.3.1. Guanin Sinyali için Optimum Şartların Belirlenmesi                                                                                                                                        | 168 |
| 2.5.3.1.1. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen Farklı Derişimlerdeki dsDNA'ya Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini                                                                                     | 168 |
| 2.5.3.1.2. KGE Yüzeyine Farklı Zamanlarda İmmobilize Edilen dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini                                                                                     | 169 |
| 2.5.3.1.3. Çözelti Ortamındaki Farklı Derişimlerdeki dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini                                                                                            | 169 |
| 2.5.3.1.4. Çözelti Ortamındaki Farklı Zamanlarda dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini                                                                                                | 170 |
| 2.5.3.2. Efavirenz'in Boş Kalem Grafit Elektrotta Yükseltgenme Mekanizmasının ve dsDNA Modifiye Edilmiş Elektrotta Guanin Sinyali Üzerinden İlaç-DNA Etkileşiminin İncelenmesi                     | 170 |
| 2.5.3.2.1. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi                                                                                                                                                      | 170 |
| 2.5.3.2.2. Voltametrik Yöntemin Tabletler Uygulanması                                                                                                                                              | 171 |
| 2.5.3.2.3. Efavirenz İçin Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları                                                                                                                                         | 171 |
| 2.5.3.2.4. Efavirenz ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi                                                                          | 172 |
| 2.5.3.2.4.1. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA ile Farklı Derişimde Efavirenz Etkileşmesinin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesi                                     | 172 |
| 2.5.3.2.4.2. Elektroda Tutturulmuş dsDNA'nın Efavirenz ile Zamana Göre Etkileşmesinin İncelenmesi                                                                                                  | 173 |
| 2.5.3.3. Löprolid'in Boş Kalem Grafit Elektrotta Yükseltgenme Mekanizmasının ve dsDNA Modifiye Edilmiş Elektrotta ve Çözelti Ortamında Guanin Sinyali Üzerinden İlaç-DNA Etkileşiminin İncelenmesi | 174 |
| 2.5.3.3.1. Standart Maddenin Stok Çözeltisi                                                                                                                                                        | 174 |
| 2.5.3.3.2. Voltametrik Yöntemlerin Enjeksiyon Çözeltisine Uygulanması                                                                                                                              | 174 |
| 2.5.3.3.3. Löprolid İçin Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları                                                                                                                                          | 174 |
| 2.5.3.3.4. Löprolid ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi                                                                           | 175 |
| 2.5.3.3.4.1. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA ile Farklı Derişimlerde Löprolid Etkileşmesinin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesi                                   | 175 |
| 2.5.3.3.4.2. Elektroda Tutturulmuş dsDNA'nın Löprolid ile Zamana Göre Etkileşmesinin İncelenmesi                                                                                                   | 176 |
| 2.5.3.3.4.3. Löprolid ile dsDNA'nın Çözelti Ortamında Etkileşmesinin Guanin Yükseltgenme Sinyali Üzerinden İncelenmesi                                                                             | 177 |
| 2.5.3.4. Fulvestrant'ın Bor ile Dope Edilmiş Elmas Elektrotta Yükseltgenme Mekanizmasının ve dsDNA Modifiye Edilmiş Kalem Elektrotta Guanin Sinyali Üzerinden İlaç-DNA Etkileşiminin İncelenmesi   | 177 |
| 2.5.3.4.1. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi                                                                                                                                                      | 177 |
| 2.5.3.4.2. Voltametrik Yöntemin Enjeksiyonluk Preparatlara Uygulanması                                                                                                                             | 178 |

|                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.5.3.4.3. Fulvestrant İçin Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları                                                                                                             | 178 |
| 2.5.3.4.4. Fulvestrant Serum Stok Çözeltisi                                                                                                                              | 179 |
| 2.5.3.4.5. Fulvestrant ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği İle Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi                                              | 179 |
| 2.5.3.4.5.1. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA ile Farklı Derişimlerde Fulvestrant Etkileşmesinin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesi      | 180 |
| 2.5.3.4.5.1. Elektroda Tutturulmuş dsDNA'nın Fulvestrant ile Zamana Göre Etkileşmesinin İncelenmesi                                                                      | 181 |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                                                                                                       | 182 |
| 3.1. dsDNA'nın Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrotta ve Çözelti Ortamında Yükseltgenme Sinyallerine Ait Bulgular                                           | 182 |
| 3.1.1.KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen Farklı Derişimlerdeki dsDNA'nın Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular                       | 182 |
| 3.1.2. KGE Yüzeyine Farklı Zamanlarda İmmobilize Edilen dsDNA'nın Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular                          | 184 |
| 3.1.3. Çözelti Ortamında Farklı Derişimlerdeki dsDNA' ya ait Guanin Yükseltgenme Sinyaline Ait Bulgular                                                                  | 185 |
| 3.1.4. Çözelti Ortamında Farklı Zamanlarda dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular                                    | 187 |
| 3.2. Efavirenz Üzerindeki İncelemeler                                                                                                                                    | 189 |
| 3.2.1. Efavirenz Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar                                                                                                                       | 190 |
| 3.2.1.1. Efavirenz'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Diferansiyel Puls Voltametri Çalışmaları                                                                  | 190 |
| 3.2.1.2. Efavirenz'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları                                                                          | 194 |
| 3.2.1.3. Geliştirilen Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları                                                                                                 | 200 |
| 3.2.1.4. Efavirenz İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları                                                                                                | 207 |
| 3.2.1.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışmaları                                                                 | 207 |
| 3.2.2. Efavirenz ile dsDNA Etkileşiminin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular                                      | 210 |
| 3.2.2.1.KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA ile Farklı Derişimde Efavirenz Etkileşmesinin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular | 210 |
| 3.2.2.2. Elektroda Tutturulmuş dsDNA'nın Efavirenz ile Zamana Göre Etkileşmesinin İncelenmesine ait Bulgular                                                             | 211 |
| 3.2.2.3. Optimize Edilen dsDNA-Efavirenz Etkileşiminin Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları                                                                | 212 |
| 3.2.2.4. Efavirenz-dsDNA Etkileşimi İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları                                                                               | 216 |
| 3.2.2.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışmaları                                                                 | 216 |
| 3.2.3. İki Yöntemin Analiz Çalışmalarının Karşılaştırılması                                                                                                              | 219 |
| 3.3. Löprolid Üzerindeki İncelemeler                                                                                                                                     | 220 |
| 3.3.1. Löprolid Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar                                                                                                                        | 220 |

|                                                                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3.1.1. Löprolid'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları                                                                          | 221 |
| 3.3.1.2. Geliştirilen Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları                                                                                                | 231 |
| 3.3.1.3. Löprolid İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları                                                                                                | 238 |
| 3.3.1.3.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışmaları                                                                | 238 |
| 3.3.2. Löprolid ile dsDNA'nın Elektrot Yüzeyinde Etkileşiminin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular               | 241 |
| 3.3.2.1. dsDNA İmmobilize Edilen KGE Yüzeyinde Farklı Derişimlerde Löprolid Etkileşiminin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular | 241 |
| 3.3.2.2. Löprolid Etkileşim Süresindeki Değişimin Guanin Yükseltgenme Sinyali Üzerine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular                                              | 242 |
| 3.3.2.3. Optimize Edilen dsDNA-Löprolid Çalışmasının Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları                                                                 | 243 |
| 3.3.2.4. Löprolid İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları                                                                                                | 247 |
| 3.3.2.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması                                                                                            | 247 |
| 3.3.3. Löprolid ile dsDNA'nın Çözelti Ortamında Etkileşiminin Guanin Yükseltgenme Sinyali Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular                                          | 248 |
| 3.3.3.1. Çözelti Ortamında dsDNA-Löprolid Çalışmasının Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları                                                               | 249 |
| 3.3.3.2. Löprolid İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları                                                                                                | 254 |
| 3.3.3.2.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması                                                                                            | 254 |
| 3.3.4. Üç Yöntemin Analiz Çalışmalarının Karşılaştırılması                                                                                                              | 256 |
| 3.4. Fulvestrant Üzerindeki İncelemeler                                                                                                                                 | 257 |
| 3.4.1. Fulvestrant Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar                                                                                                                    | 257 |
| 3.4.1.1. Fulvestrant'ın Adsorptif Sıyırma Diferansiyel Puls Voltametri Çalışmaları                                                                                      | 258 |
| 3.4.1.1.1. Fulvestrant'ın BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Adsorptif Sıyırma Diferansiyel Puls Voltametri Çalışmaları                                           | 258 |
| 3.4.1.1.2. Fulvestrant'ın Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan AdSDPV Çalışmaları                                                                               | 260 |
| 3.4.1.1.3. Fulvestrant'ın Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan AdSDPV Çalışmaları                                                                               | 262 |
| 3.4.1.1.4. Fulvestrant'ın Sülfirik Asit Çözeltileri İçerisinde Yapılan AdSDPV Çalışmaları                                                                               | 263 |
| 3.4.1.2. Fulvestrant'ın Sülfirik Asit Destek Elektroliti İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları                                                            | 267 |
| 3.4.1.2.1. Fulvestrant İçin Elde Edilen Mekanizma Verilerinin Değerlendirilmesi                                                                                         | 272 |
| 3.4.2. Geliştirilen Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları                                                                                                  | 275 |
| 3.4.3. Fulvestrant İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları                                                                                               | 282 |
| 3.4.3.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışmaları                                                                  | 282 |
| 3.4.3.2. Geliştirilen Yöntemlerin İnsan Serumuna Uygulanması ve Serumda % Geri Kazanım Çalışmaları                                                                      | 285 |
| 3.4.4. Fulvestrant ile dsDNA Etkileşiminin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular                                   | 290 |

|                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4.4.1. dsDNA İmmobilize Edilen KGE Yüzeyinde Farklı Derişimlerde Fulvestrant Etkileşiminin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular | 290 |
| 3.4.4.2. Fulvestrant Etkileşim Süresindeki Değişimin Guanin Yükseltgenme Sinyali Üzerine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular                                              | 291 |
| 3.4.4.3. Optimize Edilen dsDNA-Fulvestrant Çalışmasının Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları                                                                 | 292 |
| 3.4.4.4. Fulvestrant İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları                                                                                                | 296 |
| 3.4.4.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması                                                                                               | 296 |
| 3.4.5. İki Yöntemin Analiz Çalışmalarının Karşılaştırılması                                                                                                                | 299 |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                                                                                                                         | 300 |
| <b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                                                                                                                                                | 315 |
| <b>ÖZET</b>                                                                                                                                                                | 319 |
| <b>SUMMARY</b>                                                                                                                                                             | 320 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                                                                                                           | 321 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                                                                            | 338 |



## ÖNSÖZ

Tez kapsamında, antiviral ilaçlardan efavirenz, antikanser ilaçlardan löprolid ve fulvestrant ile çift sarmal DNA (dsDNA)'nın etkileşimleri elektrokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Etkileşimlerin belirlenebilmesi için elektrokimyasal tayin tekniklerinden diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği ile tek kullanımlık kalem grafit elektrot (KGE) çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Deneysel parametrelerdeki farklılık (incelenen ilaç derişimi, DNA derişimi, madde-DNA etkileşme süresi) DPV tekniğiyle ölçüm yapılarak incelenmiştir.

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında, çalışmalarımın bilimsellik dahilinde yürümesi için bana kıymetli bilgi ve engin tecrübelerini zaman kavramı gözetmeksizin esirgmeden aktarmaya çalışan ve bilimsel gelişimimde mevcut tüm olanaklardan faydalanmam için en yüksek gayreti gösteren, çağdaş bilim insanlığıyla ve çalışma azmiyle örnek aldığım, desteğini her an hissettiğim değerli hocam Prof.Dr. Sibel Özkan'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam boyunca gerek bilimsel gerekse entellektüel birikiminini her koşulda bana aktaran ve en az bilimsel tecrübesi kadar dostluğu ve samimiyetiyle desteğini bulduğum Prof Dr. Bengi USLU'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Değerli hocalarım Prof. Dr. Nevin ERK'e, Prof. Dr. Feyyaz ONUR'a ve diğer Anabilim Dalımız hocalarına öğrenim hayatımdaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımın başında bana Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya laboratuvarında çalışma imkanı veren Prof. Dr. Mehmet Şengün ÖZSÖZ'e ve deneysel çalışmalarda hoşgörü ve sabırla yardımcı olan Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerine şükranlarımı sunarım.

Okul içi ve okul dışı her konuda içtenlikle yardım eden çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Burçin BOZAL ve Araş. Gör. Mehmet GÜMÜŞTAŞ'a çok teşekkür ederim. Öğrenim hayatımda desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. Özgür ÜSTÜNDAĞ'a, Araş. Gör. Murat PALABIYIK'a ve Araş Gör. Gökhan ÇAĞLAYAN'a teşekkür ederim

Her zaman yanımda olup benden güvenlerini ve desteklerini esirgemeyen, ideallerimin gerçekleşmesi için bana güç ve enerji veren babama ve anneme, her sıkıntıda beni bıkmadan dinleyen dostum kardeşime, beni benden çok düşünen eşime ve hayatımın anlamı kızıma çok teşekkür ederim.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|         |                                                  |
|---------|--------------------------------------------------|
| AdSDPV  | Adsorptif Sıyırma Diferansiyel Puls Voltametrisi |
| AA (AC) | Alternatif Akım                                  |
| BDEE    | Bor ile Dope edilmiş Elmas Elektrot              |
| BRT     | Britton-Robinson Tamponu                         |
| DV (CV) | Dönüşümlü Voltametri                             |
| DA (DC) | Doğru Akım                                       |
| DNA     | Deoksiribonükleik asit                           |
| DPP     | Diferansiyel Puls Polarografisi                  |
| DPV     | Diferansiyel Puls Voltametrisi                   |
| dsDNA   | Çift sarmal deoksiribonükleik asit               |
| DTV     | Doğrusal Taramalı Voltametri                     |
| EFV     | Efavirenz                                        |
| FLV     | Fulvestrant                                      |
| KDV     | Kare Dalga Voltametrisi                          |
| KGE     | Kalem grafit elektrot                            |
| LPR     | Löprolid                                         |
| ssDNA   | Tek sarmal deoksiribonükleik asit                |
| UV      | Ultraviole                                       |
| IR      | Infrared                                         |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1.</b> Genel elektrokimyasal hücre şeması                                                                                                                                                                              | 9  |
| <b>Şekil 2.2.</b> Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik olarak gösterilmesi                                                                                                                                                    | 11 |
| <b>Şekil 2.3.</b> Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka                                                                                                                                                               | 13 |
| <b>Şekil 2.4.</b> Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırma şeması                                                                                                                                                                | 20 |
| <b>Şekil 2.5.</b> 1M HCl içerisinde $5 \times 10^{-4}$ M $\text{Cd}^{+2}$ 'nin indirgenmesine (B) ve 1M HCl çözeltisine ait polarogram                                                                                            | 25 |
| <b>Şekil 2.6.</b> Çeşitli çalışma elektrotlarına ait çalışma potansiyeli aralıkları                                                                                                                                               | 31 |
| <b>Şekil 2.7.</b> Karbon pastası elektrotunun şematik olarak gösterimi                                                                                                                                                            | 38 |
| <b>Şekil 2.8.</b> Camsı karbon elektrodun amorf yapısı                                                                                                                                                                            | 40 |
| <b>Şekil 2.9.</b> Perde baskılı karbon elektrotun şematik olarak gösterimi                                                                                                                                                        | 42 |
| <b>Şekil 2.10.</b> Karbon-fiber elektrotun şematik olarak gösterimi                                                                                                                                                               | 43 |
| <b>Şekil 2.11.</b> Kalem grafit elektrotun şematik olarak gösterimi                                                                                                                                                               | 44 |
| <b>Şekil 2.12.</b> BDE elektrodun yapısı                                                                                                                                                                                          | 46 |
| <b>Şekil 2.13.</b> Üçlü elektrot sisteminin potansiyostata yerleşiminin şematik olarak gösterimi                                                                                                                                  | 49 |
| <b>Şekil 2.14.</b> Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri                                                                                                                                                            | 51 |
| <b>Şekil 2.15.</b> (a) Dönüşümlü voltametrde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği ; (b) Dönüşümlü voltametrde elde edilen akım-gerilim eğrisi                                                                       | 53 |
| <b>Şekil 2.16.</b> Yavaş potansiyel değişiminde katı elektrot voltamogram                                                                                                                                                         | 55 |
| <b>Şekil 2.17.</b> Potansiyel tarama tekniğinde elde edilen potansiyel – zaman eğrisi                                                                                                                                             | 56 |
| <b>Şekil 2.18.</b> Farklı potansiyel tarama hızlarında elde edilen akım – potansiyel eğrisi                                                                                                                                       | 58 |
| <b>Şekil 2.19.</b> Geri dönüşümlü bir olayın dönüşümlü voltamogramı                                                                                                                                                               | 60 |
| <b>Şekil 2.20.</b> Geri dönüşümlü bir olayın hızla değişimini gösteren dönüşümlü voltamogram                                                                                                                                      | 62 |
| <b>Şekil 2.21.</b> Geri dönüşümsüz bir sistem için çeşitli hızlarda üst üste kaydedilmiş dönüşümlü voltamogram                                                                                                                    | 64 |
| <b>Şekil 2.22.</b> Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri; (a) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali; (b) Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram | 71 |
| <b>Şekil 2.23.</b> Diferansiyel puls polarografisinde uygulanan potansiyel dalgasının şekli                                                                                                                                       | 73 |
| <b>Şekil 2.24.</b> Bir kare-dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu [(a) daki uyarma sinyali (b)'deki puls taraması ile (c)'deki kare-dalga uyarma sinyalinin elde edecek şekilde toplanıyor]                             | 76 |
| <b>Şekil 2.25.</b> Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu. Akım cevabı $\Delta i$ , 1 potansiyelindeki akımdan 2 potansiyelindeki akımı çıkarılarak bulunur                                                     | 77 |
| <b>Şekil 2.26.</b> Geri dönüşümlü bir reaksiyon için kare dalga voltamogramı. A : ileri doğru akım B : geriye akım C : net akım                                                                                                   | 78 |
| <b>Şekil 2.27.</b> Biyosensörün yapısı ve bileşenleri                                                                                                                                                                             | 93 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 2.28.</b> Çevirici türüne göre biyosensör çeşitleri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 96  |
| <b>Şekil 2.29.</b> Nükleotitin yapısı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 107 |
| <b>Şekil 2.30.</b> Primer yapıdaki 5' → 3' yönünde ssDNA' nın yapısı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 108 |
| <b>Şekil 2.31.</b> DNA çift sarmal yapısı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 109 |
| <b>Şekil 2.32.</b> Nükleik asitte bulunan organik bazların kimyasal yapısı ve Sınıflandırılması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 111 |
| <b>Şekil 2.33.</b> Nükleik asitte bulunan şekerlerin kimyasal yapısı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 112 |
| <b>Şekil 2.34.</b> İnterkalasyon                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 114 |
| <b>Şekil 2.35.</b> Nükleik asit hibridizasyonu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 115 |
| <b>Şekil 2.36.</b> İnterkalatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 122 |
| <b>Şekil 2.37.</b> DNA bazlarından biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 123 |
| <b>Şekil 2.38.</b> İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 124 |
| <b>Şekil 2.39.</b> Guanin bazının yükseltgenmesi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 126 |
| <b>Şekil 2.40.</b> İlaç-DNA etkileşmesine dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (genosensörlerin) tasarımının şematik olarak gösterilmesi: <b>A)</b> Çalışma elektrodu yüzeyinde etkileşimin <b>a)</b> DNA tutturulmuş elektrot, <b>b)</b> ilaç tutturulmuş elektrot kullanılması ile tayin; <b>B)</b> Çözelti fazında etkileşim. Etkileşim basamağından sonra izlenen basamaklar: Elektrodun yıkanması ve voltametrik teknikler kullanılarak elektrokimyasal ölçümlerin yapılması ve sinyallerin kıyaslanması; etkileşim öncesi ve/veya sonrası ilaç ve/veya DNA'nın voltametrik sinyalindeki artma veya azalmanın bulunması | 128 |
| <b>Şekil 2.41.</b> Teşhis sınırını hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 138 |
| <b>Şekil 2.42.</b> Tayin alt hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 139 |
| <b>Şekil 2.43.</b> Kalibrasyon doğrusu (grafığı) ve eşitliği                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 140 |
| <b>Şekil 2.44.</b> Genel elektrokimyasal analiz cihazının şeması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 155 |
| <b>Şekil 2.45.</b> Elektrokimyasal analizör deney hücresi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 157 |
| <b>Şekil 2.46.</b> Efavirenz'in kimyasal yapısı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 160 |
| <b>Şekil 2.47.</b> Löprolid'in kimyasal yapısı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 162 |
| <b>Şekil 2.48.</b> Fulvestrant'ın kimyasal yapısı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 164 |
| <b>Şekil 3.1.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde dsDNA'nın bazı derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyallerinin AdSDPV eğrileri<br>a) 0,20 µg/mL; b) 0,50 µg/mL; c) 1,00 µg/mL;<br>d) 2,00 µg/mL; e) 3,00µg/mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 183 |
| <b>Şekil 3.2.</b> 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 5,00; 10,00 µg/mL derişimlerdeki dsDNA' ya ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 183 |
| <b>Şekil 3.3.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde 2,00 µg/mL dsDNA'nın farklı karıştırma hızlarındaki guanin yükseltgenme sinyallerinin AdSDPV eğrileri a) 30 sn; b) 60 sn; c) 120 sn; d) 240 sn; e) 300 sn                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 184 |
| <b>Şekil 3.4.</b> 2,00µg/mL dsDNA'nın 30; 60; 90; 120; 180; 240; 300 saniye değişen sürelerde karıştırılmasına ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 185 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 3.5.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde dsDNA'nın bazı derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyallerinin AdSDPV eğrileri a) 0,20 µg/mL; b) 1,00 µg/mL; c) 3,00 µg/mL; d) 5,00 µg/mL; e) 10,00 µg/mL                                                                                                                | 186 |
| <b>Şekil 3.6.</b> 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 5,00; 10,00 µg/mL derişimlerdeki dsDNA' ya ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri                                                                                                                                                                        | 187 |
| <b>Şekil 3.7.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde 5,00 µg/mL dsDNA'nın farklı karıştırma hızlarındaki guanin yükseltgenme sinyallerinin AdSDPV eğrileri a) 60 sn; b) 120 sn; c) 180 sn; d) 300 sn                                                                                                                           | 188 |
| <b>Şekil 3.8.</b> 5,00 µg/mL dsDNA ile farklı sürelerde (30; 60; 90; 120; 180; 240 s) karıştırılmasına ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri                                                                                                                                                            | 188 |
| <b>Şekil 3.9a.</b> 2,00 µg/mL efavirenz pH 2,00 – 6,00 arası BR tamponları içerisindeki voltamogramları. a) pH 2,00; b) pH 3,00; c) pH 4,00; d) pH 5,00; e) pH 6,00                                                                                                                                                           | 191 |
| <b>Şekil 3.9b.</b> 2,00 µg/mL efavirenz'in pH 7,00 – 10,00 arası BR tamponları içerisindeki voltamogramları. a) pH 7,00 b) pH 8,00; c) pH 9,00; d) pH 10,00                                                                                                                                                                   | 192 |
| <b>Şekil 3.10.</b> pH 3,00 BRT içerisinde 30,00 µg/mL efavirenz içeren çözeltinin altı devirli dönüşümlü voltamogramı (a); 2. ve daha büyük devirlerde görülen ilave akımlar (b)                                                                                                                                              | 194 |
| <b>Şekil 3.11.</b> 30,00 µg/mL efavirenz'in 3,00 BRT içerisinde A) 5 – 75 mVs <sup>-1</sup> ; B) 100 – 1000 mVs <sup>-1</sup> tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramları. 1) 5 ; 2) 10 ; 3) 25 ; 4) 50 ; 5) 75; 6) 100; 7) 250; 8) 500; 9) 750; 10) 1000 mVs <sup>-1</sup>                                       | 196 |
| <b>Şekil 3.12.</b> 30,00 µg/mL efavirenz'in 3,00 BRT içerisinde 5 – 1000 mVs <sup>-1</sup> tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a) v – ip ve b) log v – log i grafikleri                                                                                                                                                 | 198 |
| <b>Şekil 3.13.</b> 2,00 µg/mL efavirenz'e ait Ep – pH (a) , İp – pH (b) eğrileri. (○) : BRT                                                                                                                                                                                                                                   | 199 |
| <b>Şekil 3.14.</b> AdSDPV tekniğiyle 2,00 µg/mL efavirenz'in %20 metanollü pH 3,00 BRT çözeltisi içerisinde a) ip (µA) – Ep (Biriktirme Potansiyeli) b) ip (µA) – t (dk) (Biriktirme Zamanı) grafikleri                                                                                                                       | 202 |
| <b>Şekil 3.15.</b> pH 3,00 BRT içerisinde efavirenz'in bazı derişimlerdeki AdSDPV eğrileri (a) destek ; (b) 0,08 µg/mL; (c) 0,16 µg/mL ; (d) 0,32 µg/mL                                                                                                                                                                       | 204 |
| <b>Şekil 3.16.</b> 0,018 – 2,56 µg/mL derişim aralığında pH 3,00 BRT içerisinde efavirenz'in (%20 metanollü ortam) AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği                                                                                                                                                         | 204 |
| <b>Şekil 3.17.</b> Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; sırasıyla 2,00 µg/mL dsDNA ile efavirenz etkileşmeden önce; metanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 2,00; 4,00; 8,00; 16,00; 24,00; 32,00 µg/mL derişimlerde efavirenz ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri | 210 |

- Şekil 3.18.** Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; 2,00µg/mL dsDNA ile 24,00µg/mL efavirenz'in farklı sürelerde (sırasıyla 2,00µg/mL dsDNA ile efavirenz etkileşmeden önce; etanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 30; 60; 120; 180; 240; 300 µg/mL etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri 211
- Şekil 3.19.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde **A)** 2,00 µg/mL efavirenz ile 2,00 µg/mL dsDNA etkileşmesine ait grafikler; etkileşmeden önce guanin sinyali ( - - - - ); dsDNA ile etkileştikten sonra efavirenz sinyali ( ——— ) and etkileşmeden önce efavirenz sinyali ( - - - - ). **B)** 2,00 µg/mL dsDNA'nın guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikleri; a) 2,00 µg/mL dsDNA ile efavirenz etkileşmeden önce; b) metanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; c) 2,00 ; d) 8,00 e) 24,00 µg/mL derişimlerde efavirenz ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri 213
- Şekil 3.20.** 2,00 – 24,00 µg/mL derişim aralığında pH 4,80 asetat tamponu içerisinde efavirenz'in (%20 metanollü ortam) AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği 214
- Şekil 3.21a** 4,00µg/mL löprolid'in pH 2,00 – 6,00 arası BR tamponları içerisindeki voltamogramları. a) pH 2,00 ; b) pH 3,00; c) pH 4,00; d) pH 5,00; e) pH 6,00 222
- Şekil 3.21b** 4,00µg/mL löprolid'in pH 7,00 – 10,00 arası BR tamponları içerisindeki voltamogramları. a) pH 7,00 b) pH 8,00; c) pH 9,00; d) pH 10,00 223
- Şekil 3.22.** pH 2,00 BRT içerisinde 4,00µg/mL löprolid içeren çözeltinin altı devirli dönüşümlü voltamogramı 225
- Şekil 3.23.** 4,00µg/mL löprolid'in pH 2,00 BRT içerisinde **A)** 5 – 75 mVs<sup>-1</sup> ; **B)** 100 – 1000 mVs<sup>-1</sup> tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramları. 1) 5 ; 2) 10 ; 3) 25 ; 4) 50 ; 5) 75; 6) 100; 7) 250; 8) 500; 9) 750; 10) 1000 mVs<sup>-1</sup> 227
- Şekil 3.24.** 4,00µg/mL löprolid'in pH 2,00 BRT içerisinde 5 – 1000 mVs<sup>-1</sup> tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a)  $v - i_p$  ve b)  $\log v - \log i$  grafikleri 229
- Şekil 3.25.** 4,00µg/mL löprolid'in  $E_p - pH$  (a) ,  $i_p - pH$  (b) eğrileri. (○) : BRT 230
- Şekil 3.26.** AdSDPV tekniğiyle 1,00µg/mL löprolid'in pH 2,00 BRT çözeltisi içerisinde a)  $i_p (\mu A) - E_p$  (Biriktirme Potansiyeli) b)  $i_p (\mu A) - t$  (dk) (Biriktirme Zamanı) grafikleri 231
- Şekil 3.27.** pH 2,00 BRT içerisinde löprolid'in bazı derişimlerdeki AdSDPV eğrileri (a) destek ; (b) 0,01 µg/mL; (c) 0,05 µg/mL ; (d) 0,10 µg/mL 235
- Şekil 3.28.** 0,005 – 0,20 µg/mL derişim aralığında pH 2,00 BRT içerisinde löprolid'in AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği 235

- Şekil 3.29.** Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; sırasıyla 2,00µg/mL dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; saf su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 0,20; 0,40; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00 µg/mL derişimlerde löprolid ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri 241
- Şekil 3.30.** Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; 2,00µg/mL dsDNA ile 6µg/mL löprolid'in farklı sürelerde (sırasıyla 2,00µg/mL dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; saf su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 30; 60; 90; 120; 180; 360sn) etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri 242
- Şekil 3.31.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde (A) KGE yüzeyinde 2,00 µg/mL dsDNA ile 1,00 µg/mL löprolid etkileşiminine ait grafikler; etkileşimden önce guanin sinyali (- - - - -); dsDNA ile etkileşiminden sonra löprolid sinyali(——) ve etkileşimden önce löprolid sinyali (- - - - -) (B) 2,00 µg/mL dsDNA'nın guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikleri; a) 2,00µg/mL dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; b) Su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; c) 0,40 µg/mL; d) 2,00 e) 6,00 µg/mL derişimlerde löprolid ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri 244
- Şekil 3.32.** 0,20 – 6,00 µg/mL derişim aralığında pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid'in AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği 245
- Şekil 3.33.** Çözelti fazında etkileşen guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; sırasıyla 5,00µg/mL dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00µg/mL derişimlerde löprolid ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri 248
- Şekil 3.34.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde (A) Çözelti ortamında 5,00 µg/mL ds-DNA ile 1,00 µg/mL löprolid etkileşiminine ait grafikler; etkileşimden önce guanin sinyali (- - - - -); dsDNA ile etkileşiminden sonra löprolid sinyali(——) ve etkileşimden önce löprolid sinyali (- - - - -) (B) pH 4,80 asetat tamponu içerisinde 2,00 µg/mL dsDNA'nın Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikleri; a) 5,00µg/mL dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; b) Su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; c) 0,08 µg/mL; d) 0,16 µg/mL e) 0,32 µg/mL derişimlerde löprolid ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri 250
- Şekil 3.35.** 0,20 – 1,00 µg/mL derişim aralığında pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid'in AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği 251
- Şekil 3.36.**  $2 \times 10^{-5}$  M fulvestrant'ın pH 2,00 – 6,00 arası BR tamponları içerisindeki AdSDPV voltamogramları. 1) pH 2,00 ; 2) pH 4,00; 3) pH 6,00 259

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 3.37.</b> $2 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın pH 2,00 – 7,00 arası fosfat tamponları içerisindeki AdSDPV voltamogramları. 1) pH 2,00 ;2) pH 6,00                                                                                                                                                                              | 261 |
| <b>Şekil 3.38.</b> $2 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın pH 3,50 – 5,50 arası asetat tamponları içerisindeki AdSDPV voltamogramları. 1) pH 3,50 ;<br>2) pH 4,50; 3) pH 5,50                                                                                                                                                              | 262 |
| <b>Şekil 3.39.</b> $2 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın 0,1M (1) ve 0,5M (2) $\text{H}_2\text{SO}_4$ destek elektroliti içerisindeki voltamogramı                                                                                                                                                                                       | 264 |
| <b>Şekil 3.40.</b> $1 \times 10^{-3} \text{M}$ Fulvestrant'ın $E_p - \text{pH}$ (a) , $I_p - \text{pH}$ (b) eğrileri.<br>( $\circ$ ) : $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; ( $\diamond$ ) : BRT ; ( $\Delta$ ) : Asetat ; ( $\square$ ) : Fosfat                                                                                                        | 265 |
| <b>Şekil 3.41.</b> 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde $8 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant içeren çözeltinin 2 devirli dönüşümlü voltamogramı                                                                                                                                                                                         | 267 |
| <b>Şekil 3.42.a.</b> 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde $4 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın 100 – 1000 $\text{mVs}^{-1}$ tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları. 1) 1000 ; 2) 750 ; 3) 500 ;<br>4) 250 ; 5) 100 $\text{mVs}^{-1}$                                                                                   | 269 |
| <b>Şekil 3.42.b.</b> 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde $4 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın 5 – 100 $\text{mVs}^{-1}$ tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları.1) 75 ; 2) 50 ; 3) 25 ; 4) 10 ; 5) 5 $\text{mVs}^{-1}$                                                                                                 | 269 |
| <b>Şekil 3.43.</b> 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde $4 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın 5 – 1000 $\text{mVs}^{-1}$ tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a) $v - i_p$ ve<br>b) $\log v - \log i$ grafikleri                                                                                                                 | 271 |
| <b>Şekil 3.44.</b> $1 \times 10^{-4} \text{M}$ fulvestrant'ın 5 $\text{mVs}^{-1}$ tarama hızında 0,1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde elde edilen Tafel eğrisi                                                                                                                                                                            | 273 |
| <b>Şekil 3.45.</b> AdSDPV tekniğiyle $2 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın % 30 asetonitrilli 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde a) $I_p (\mu\text{A}) - E_p$ (Biriktirme Potansiyeli)<br>b) $i_p (\mu\text{A}) - t$ (sn) (Biriktirme Zamanı) grafikleri                                                                            | 277 |
| <b>Şekil 3.46.</b> % 30 asetonitrilli 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde fulvestrant'ın bazı derişimlerdeki AdSDPV eğrileri (1) destek ; (2) $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ;<br>(3) $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ; (4) $4 \times 10^{-5} \text{M}$                                                                                          | 279 |
| <b>Şekil 3.47.</b> $1 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5} \text{M}$ derişim aralığında 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde fulvestrant'ın (%30 asetonitrilli ortam) AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği                                                                                                                      | 279 |
| <b>Şekil 3.48.</b> 0,1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ destek elektroliti içerisinde fulvestrant'ın bazı serum derişimlerdeki AdSDPV eğrileri (1) : destek ; (2) $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ;<br>(3) $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ; (4) $4 \times 10^{-5} \text{M}$                                                                                 | 286 |
| <b>Şekil 3.49.</b> $1 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-5} \text{M}$ serum derişim aralığında fulvestrant'ın 0,1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ destek elektroliti içerisinde (%30 asetonitrilli ortam) AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği                                                                                            | 286 |
| <b>Şekil 3.50.</b> Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; sırasıyla 2,00 $\mu\text{g/mL}$ dsDNA ile fulvestrant etkileşmeden önce; etanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 5,00; 10,00; 20,00;<br>40,00 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde fulvestrant ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri | 290 |
| <b>Şekil 3.51.</b> Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; 2,00 $\mu\text{g/mL}$ dsDNA ile 10,00 $\mu\text{g/mL}$ fulvestrant'ın farklı sürelerde (sırasıyla 2,00 $\mu\text{g/mL}$ dsDNA ile fulvestrant etkileşmeden önce; etanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra;                                                      |     |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 30; 60; 180; 300; 420 sn) etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 291 |
| <b>Şekil 3.52.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde (A) KGE yüzeyinde 2, 00µg/mL ds-DNA ile 10,0 µg/mL fulvestrant etkileşiminine ait grafikler; etkileşimden önce guanin sinyali (- - - - ); dsDNA ile etkileşiminden sonra fulvestrant sinyali(——) ve etkileşimden önce fulvestrant sinyali(— — — —) (B) 2,00 µg/mL dsDNA’nın Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikleri; a) 2,00 µg/mL dsDNA ile fulvestrant etkileşmeden önce; b) Etanol/asetat (30/70) tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; c) 2,00 µg/mL; d) 10,00 e)20,00 µg/mL derişimlerde fulvestrant ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri | 293 |
| <b>Şekil 3.53.</b> 1,00 – 20,00 µg/mL derişim aralığında pH 4,80 asetat tamponu içerisinde fulvestrant’ın AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 294 |

## ÇİZELGELER

|                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 2.1.</b> Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları                                                                                                                                                           | 105 |
| <b>Çizelge 2.2.</b> Kullanılan Standart Maddeler                                                                                                                                                                                  | 158 |
| <b>Çizelge 2.3.</b> Tayinlerde üzerinde çalışılan ilaç dozaj formu ve birim doz içeriği                                                                                                                                           | 158 |
| <b>Çizelge 2.4.</b> Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler                                                                                                                                                     | 158 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> BRT çözeltileri içerisinde kaydedilen 2,00µg/mL efavirenz'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri                                       | 193 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> 30,00µg/mL efavirenz'in pH 3,00 BRT çözeltisi içerisinde 5-1000mVs <sup>-1</sup> tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (Ep) ve akım (ip) değerleri                                                   | 195 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> 2,00µg/mL efavirenz'in % 20 metanollü pH 3,00 BRT içerisinde AdSDPV yöntemi ile potansiyel ve zamana göre akımdaki değişiklik                                                                                 | 201 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> pH 3,00 BRT içerisinde efavirenz için (%20 metanollü ortam) elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları                                                                                     | 205 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> pH 3,00 BRT içerisinde efavirenz için AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri                                              | 206 |
| <b>Çizelge 3.6.</b> Efavirenz içeren (600 mg) Stocrin® tabletlerin pH 3,00 BRT destek elektroliti içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları                              | 208 |
| <b>Çizelge 3.7.</b> Efavirenz içeren tabletlerden pH 3,00 BRT içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları                                                                                                                     | 209 |
| <b>Çizelge 3.8.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde efavirenz ile etkileşen guanin sinyali için (%20 metanollü ortam) elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları                                             | 214 |
| <b>Çizelge 3.9.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde efavirenz-dsDNA etkileşimi için guanin üzerinden AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri | 215 |
| <b>Çizelge 3.10.</b> Efavirenz içeren (600 mg) Stocrin® tabletlerin pH 4,80 asetat tamponu içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları                                     | 217 |
| <b>Çizelge 3.11.</b> Efavirenz içeren tabletlerden pH 4,80 asetat tamponu içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları                                                                                                         | 218 |
| <b>Çizelge 3.12.</b> dsDNA tutturulmuş ve boş kalem grafit elektrot ile Stocrin® tabletlerden elde edilen analiz bulgularının karşılaştırmalı sonuçları                                                                           | 219 |
| <b>Çizelge 3.13.</b> BRT çözeltileri içerisinde kaydedilen 4,00µg/mL löprolid'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri                                       | 224 |
| <b>Çizelge 3.14.</b> 4,00µg/mL löprolid'in pH 2,00 BRT çözeltisi içerisinde                                                                                                                                                       |     |

|                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5-1000mVs <sup>-1</sup> tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (Ep) ve akım (ip) değerleri                                                                                                                                | 226 |
| <b>Çizelge 3.15.</b> 1,00µg/mL löprolid'in pH 2,00 BRT içerisinde AdSDPV tekniğiyle potansiyel ve zamana göre akımdaki değişiklik                                                                                                 | 232 |
| <b>Çizelge 3.16.</b> pH 2,00 BRT içerisinde löprolid için elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları                                                                                                           | 236 |
| <b>Çizelge 3.17.</b> pH 2,00 BRT içerisinde löprolid için AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri                                              | 237 |
| <b>Çizelge 3.18.</b> Löprolid içeren Lucrin <sup>®</sup> enjeksiyonluk çözeltilerinin pH 2,00 BRT destek elektroliti içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları           | 239 |
| <b>Çizelge 3.19.</b> Löprolid içeren tabletlerden pH 2,00 BRT içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları                                                                                                                     | 240 |
| <b>Çizelge 3.20.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid için elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları                                                                                                | 245 |
| <b>Çizelge 3.21.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid-dsDNA etkileşimi için guanin üzerinden AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri | 246 |
| <b>Çizelge 3.22.</b> Löprolid içeren (5 mg/mL) Lucrin <sup>®</sup> enjeksiyonluk preparatından pH 4,80 asetat tamponu içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları          | 247 |
| <b>Çizelge 3.23.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid için elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları                                                                                                | 252 |
| <b>Çizelge 3.24.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid-dsDNA etkileşimi için guanin üzerinden AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri | 253 |
| <b>Çizelge 3.25.</b> Löprolid içeren (5 mg/mL) Lucrin <sup>®</sup> enjeksiyonluk preparatların pH 4,80 asetat tamponu içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları          | 255 |
| <b>Çizelge 3.26.</b> Boş kalem grafit elektrotta (KGE), çözelti ortamında ve elektrot üzerinde etkileşimde Lucrin <sup>®</sup> enjeksiyonluk çözeltisinden elde edilen analiz bulgularının karşılaştırmalı sonuçları              | 256 |
| <b>Çizelge 3.27.</b> BRT çözeltileri içerisinde kaydedilen 2x10 <sup>-5</sup> M fulvestrant'ın değişik pH değerlerinde AdSDPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri                      | 260 |
| <b>Çizelge 3.28.</b> Fosfat tampon çözeltileri içerisinde kaydedilen 2x10 <sup>-5</sup> M fulvestrant'ın değişik pH değerlerinde AdSDPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri            | 261 |
| <b>Çizelge 3.29.</b> Asetat tamponu çözeltileri içerisinde kaydedilen 2x10 <sup>-5</sup> M                                                                                                                                        |     |

|                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| fulvestrant'ın değişik pH değerlerinde AdSDPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri                                                                                                              | 263 |
| <b>Çizelge 3.30.</b> Sülfirik asit çözeltileri içerisinde kaydedilen $2 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın değişik pH değerlerinde AdSDPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri             | 264 |
| <b>Çizelge 3.31.</b> pH 2,00 – 12,00 arası pH'a karşı okunan potansiyel değerleri                                                                                                                                                         | 266 |
| <b>Çizelge 3.32.</b> 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde $4 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın 5-100mVs <sup>-1</sup> tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (Ep) ve akım (ip) değerleri                                 | 268 |
| <b>Çizelge 3.33.</b> 0,1 M Sülfirik asit'te 5 mVs <sup>-1</sup> tarama hızında potansiyele karşılık pik akımı değerleri                                                                                                                   | 274 |
| <b>Çizelge 3.34.</b> $2 \times 10^{-5} \text{M}$ fulvestrant'ın % 30 asetonitril içeren 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ çözeltisinde AdSDPV tekniğiyle potansiyel ve zamana göre akımdaki değişiklik                                         | 276 |
| <b>Çizelge 3.35.</b> 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde fulvestrant için (%30 asetonitrilli ortam) elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları                                                                     | 280 |
| <b>Çizelge 3.36.</b> 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde fulvestrant için (%30 asetonitrilli ortam) AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri        | 281 |
| <b>Çizelge 3.37.</b> Fulvestrant içeren (250 mg/ 5 mL) Faslodex® enjeksiyonluk çözeltisinin pH 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ destek elektroliti içerisinde BDEE elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları | 283 |
| <b>Çizelge 3.38.</b> Fulvestrant içeren farmasötik preparattan 0,1M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları                                                                                               | 284 |
| <b>Çizelge 3.39.</b> Fulvestrant'ın 0,1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ destek elektroliti içerisinde (%30 asetonitrilli ortam) elde edilen serum derişim – pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları                                           | 287 |
| <b>Çizelge 3.40.</b> 0,1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ destek elektroliti AdSDPV ile elde edilen serum kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri                                               | 288 |
| <b>Çizelge 3.41.</b> AdSDPV ile 0,1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ destek elektroliti içerisinde insan serumunda elde edilen geri kazanım sonuçları                                                                                            | 289 |
| <b>Çizelge 3.42.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde fulvestrant için elde edilen derişim-pik akımı                                                                                                                                     | 294 |
| <b>Çizelge 3.43.</b> pH 4,80 asetat tamponu içerisinde fulvestrant-dsDNA etkileşimi için guanin üzerinden AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri         | 295 |
| <b>Çizelge 3.44.</b> Fulvestrant içeren (250 mg/5mL) Faslodex® enjeksiyonluk preparatından pH 4,80 Asetat tamponu içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen DPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları                         | 297 |

|                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 3.45.</b> Fulvestrant içeren enjeksiyonluk preparatlardan pH 4,80 asetat tamponu içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları                                         | 298 |
| <b>Çizelge 3.46.</b> Boş BDEE ve dsDNA modifiye kalem elektrot üzerinde etkileşimde Faslodex® enjeksiyonluk çözeltisinden elde edilen analiz bulgularının karşılaştırmalı sonuçları | 299 |

## 1. GİRİŞ

Algılayıcılar fiziksel ortam ile endüstriyel amaçlı elektrik/elektronik cihazları birbirine bağlayan bir köprü görevi görürler. Bu cihazlar endüstriyel işlem sürecinde kontrol, koruma ve görüntüleme gibi çok geniş bir kullanım alanına sahiptirler.

Günümüzde üretilmiş yüzlerce tip algılayıcıdan söz edilebilir. Mikro elektronik teknolojisindeki inanılmaz hızlı gelişmeler bu konuda her gün yeni bir buluş ya da yeni bir uygulama tipi geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Teknik terminolojide Sensor ve Transducer terimleri birbirlerinin yerine sık sık kullanılan terimlerdir. Transducer genel olarak enerji dönüştürücü olarak tanımlanır. Sensor ise çeşitli enerji biçimlerini elektriksel enerjiye dönüştüren cihazlardır. Ancak 1969 yılında ISA (Instrument Society of America) bu iki terimi eş anlamlı olarak kabul etmiş ve “ölçülen fiziksel özellik, miktar ve koşulları kullanılabilir elektriksel miktara dönüştüren bir araç” olarak tanımlamıştır (<http://www.obitet.gazi.edu.tr>). Yoğunlaşma, içerik, oksidasyon/redüksiyon, reaksiyon hızı, pH gibi büyüklükleri ölçen sensörler kimyasal sensörler olarak adlandırılmaktadır. Bir kimyasal sensör; kimyasal tanıma sistemi (reseptör) ve fizikokimyasal çevirici (transistör) olmak üzere genel olarak iki temel unsurdan meydana gelir.

Kimyasal sensörler yaşamı ve canlı organizmaların sağlığını koruma açısından gerekli olmuştur. Çoğu zaman sensörler, çok düşük derişimdeki kimyasal bileşenleri çok fazla girişim yapan diğer bileşenler yanında tayin edebilme yeteneğine sahiptir. Gelecekte, istediğimiz her şeyi taşınabilir, küçük ve akıllı algılayıcı cihazlarla izlemek büyük bir olasılıkla mümkün olacaktır. Kimyasal sensörlerin çok önemli bir alt sınıfı olan elektrokimyasal sensörler de kimyasal tanıma sistemi, kimyasal bileşikler ya da iyonlar ile seçici ve tersinir bir şekilde etkileşerek onları tanır ve bu tanıma sonucu oluşan kimyasal değişiklikler, fizikokimyasal çevirici tarafından derişime bağımlı

elektriksel sinyallere dönüştürülür. (Camman ve ark., 1991; Gronow ve ark., 1992; Sharma ve Rogers, 1994)

Bir elektrokimyasal sensörün yapısına enzim, hücre, doku, antikor, nükleik asit gibi biyolojik maddelerin katılmasıyla biyosensörler elde edilir (Turner, 1987). Biyosensörler, biyolojik yanıtları elektriksel sinyallere çeviren analitik aletlerdir. Biri elektrokimyasal diğeri biyokimyasal iki çevirici sistemden oluşurlar. Biyokimyasal çevirici, analizi yapılacak maddeyle etkileşerek onu tanıırken, elektrokimyasal kısım bu etkileşimi okunabilir sayısal bir değere çevirir. Biyosensörde en önemli nokta sistemde mutlaka bir biyolojik materyal kullanılıyor olmasıdır. Bu biyolojik materyaller kullanılarak, çok seçici, hassas, çoğu zaman da daha hızlı ölçüm yapmak mümkündür. Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin invitro kullanımı için temel oluşturmuştur. Genel anlamda biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden multidisipliner bir anlayış çerçevesinde yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilirler. Son yıllarda bilim ve teknolojiadaki hızlı gelişmeler biyosensör kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere yol açmıştır. Canlı yaşamın önemli unsurlarından olan görme, işitme, koklama, tad alma, dokunma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler olarak düşünüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar. (<http://www.scribd.com>).

Deoksiribonükleik asit'in (DNA), analizi yapılacak maddeyle etkileşerek onu tanıyan biyolojik materyal olarak kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörü denir. Son yıllarda DNA biyosensörlerine olan ilgi oldukça artmıştır (Cai ve ark, 1997; Carter and Bard, 1987; Carter ve ark 1989; Deforce ve ark 1996; Mascini, 2001; Mikkelsen, 1996; Palecek, 1996; Service, 1998; Wang ve ark 1998a; Wang ve ark 1998b). Bu gelişme ile elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin gelecekte hasta başında yapılacak

doktor gözetimindeki analizlerde çok önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir (Wang ve ark 1998c).

Nükleik asitlerin tayin edilmesi moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve diğer birçok bilimsel alanda oldukça büyük bir öneme sahiptir (Kubik ve ark., 2005; Hayashizaki ve Kanamori, 2004). 1960'lı yılların başında nükleik asitlerin elektroaktifliklerinin keşfedilmesi ile birlikte bu moleküllerin tayinine yönelik pek çok elektrokimyasal inceleme gerçekleştirilmiştir (Palecek, 2002). Elektrokimyasal ya da optik transistörler ile birleştirilen nükleik asit tabakaları, küçük molekül ağırlığındaki moleküller için yeni bir çeşit afinite biyosensörü oluştururlar. Bu yöndeki aktivite, DNA ile ilgili hedef moleküller arasındaki etkileşimin açıklanmasıyla ilişkilidir. (Palecek, 1988; Wang ve ark., 1997a; Erdem ve Ozsoz, 2002; Drummond ve ark., 2003; Rauf ve ark., 2005; Tian ve ark., 2008). DNA biyosensörleri, DNA hedefli bazı ilaçların, toksinlerin, mutajenik çevre kirleticilerinin ve karsinojenlerin DNA' ya olan etkilerinin aydınlatılmasında, bu maddelerin etkileşim mekanizmalarının belirlenmesinde ya da nokta mutasyonların tayininde kullanılabilir. Ayrıca DNA hibridizasyonunda veya DNA hasarlarının belirlenmesinde de kullanılır. (Erdem ve ark 2000; Erdem ve ark 1999; Kelley ve Barton 1997; Labuda ve ark 2002; Lukasova ve ark 1982; Mikkelsen 1996; Millan ve Mikkelsen 1993; Millan ve ark 1994; Millan ve ark 1992; Wang ve ark 1996a; Wang ve ark 2001; Wang ve ark 1998b; Wang ve ark 1996b; Wang ve ark 1997b; Wang ve ark 1997c). Hastalık nedeni olan patojenler, bakteriler ve virüsler de DNA baz dizilerinin bilinmesinden dolayı kolaylıkla tayin edilebilecektir. Modern DNA teşhis ve nükleik asit araştırmalarında özellikle guanin yükseltgenme sinyalinin izlenmesi temeline dayalı sıyırma voltametrisi kullanımıyla elektroanalizin bu alanda kullanımı artmıştır (Mascini ve ark., 2006; Liu ve ark., 2007). DNA'daki elektroaktif bazlara ait sinyallerdeki değişiklikler ya da analizi yapılacak maddeye ait elektrokimyasal sinyaldeki değişiklikler, analit ile DNA arasındaki etkileşimleri güvenilir bir şekilde ortaya koymaktadır (Johnston ve ark 1995; Johnston ve Thorp, 1996; Johnston ve ark 1996; Ju ve ark 1995; Liu ve ark 1996; Marin ve ark 1998; Molinier-Jumel ve ark 1978; Palecek, 1996; Perez ve ark 1999; Takenaka ve ark 1990; Teijeiro ve ark 1995; Tuite ve Norden, 1994; Wang ve ark 1998d; Wang ve ark 1996c; Wang ve ark 1996d; Xia ve ark 1999).



Basit tasarımı, yüksek duyarlı ve seçicilik özelliğine sahip aletlerin analitiksel gereksinimleri karşılamaından bu yana analitik kimyanın çok önemli bir uygulama alanını oluşturan biyosensörler, bu bilim dalında son yılların en önemli gelişmelerinden biri olan minyatürizasyona da olanak sağlamaktadırlar. (Nakamura ve Karube, 2003; Abad-Valle ve ark., 2005).

DNA testleri için immunoassay yöntemler ve elektroforetik ayırma yöntemleri kullanılmaktadır. Polimeraz zincir tepkimesine (PCR) dayalı bu yöntemler hasta başında gerçekleştirilecek hızlı ve kesin cevap alınması gereken rutin analizler için uygun olmamaktadır. Bu yöntemler örnek hazırlanması uzun zaman aldığından ve sonuçların alınması geç olduğundan çok fazla tercih edilmemektedir.

Bilinen bu yöntemlere alternatif yöntem olarak günümüzde DNA mikroçiplerinin tasarımı gündeme gelmiştir. İnsan genom projesi de tamamlandığından sağlık sisteminin çok hızlı ve ucuz DNA testlerine olan ilgisi de artmıştır. Elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörleri, elektrokimyasal DNA çiplerinin bir ön basamağı olarak tasarlanmıştır (Liu ve ark., 1996; Palecek, 1995)

Biyochip teknolojisi ile binlerce gen analizi paralel olarak, etkin yüzey alanı yaklaşık birkaç  $\text{cm}^2$  olan bir kredi kartı boyutlarında chip üzerinde yapılabilmektedir.

Son yıllarda dünyada Chip Üzerinde Laboratuvar Teknolojisi (Laboratory on a Chip) olarak adlandırılan teknik üzerinde önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu yeni teknolojinin amacı; tek bir chipde tüm genomun izlenmesini ve binlerce gen arasındaki etkileşmenin aynı zamanda belirlenmesini sağlayabilmektir. Bu teknolojinin esası biyosensörlere dayanmaktadır ve bu çipler küçültülmüş DNA biyosensörleridir.

Klinikte kullanım için küçük boyutlarda kullanılacak bu cihazların tasarımına ait ilk çalışmalar, Amerika Birleşik Devletlerindeki Clinical Micro Sensors (CMS) adlı Amerikan şirketi S. Mikkelsen'in kullandığı teknolojinin lisansını alması ile başlamıştır. Böylece DNA mikroçiplerinin klinikte kullanımının ilk adımları atılmış ve hizmete sunulmuştur.

Clinical Micro Sensors ile birlikte yine bir Amerikan şirketi olan Motorola'nın hazırlamış olduğu Affymetrix ve Thorp ve arkadaşlarının kurduğu Xanthon Inc. firmalarında DNA mikroçiplerinin ön çalışmaları bitmiş ve bu çipler klinikte kullanıma hazır hale getirilmiştir. Tüm bu çalışmalar çok yakın bir süre sonra elektrokimyasal DNA mikroçiplerinin kullanıma uygun bir şekilde geçeceğini göstermektedir.

DNA çipleri ile "Genomics" kapsamındaki çalışmaların hemen hemen hepsini yapmak mümkündür. Özellikle kriminolojik çalışmalarda çok hızlı olarak DNA testi ile suçlu belirlemesi yapılabilir. Hastalık durumunda ortaya çıkabilecek mutasyonları izleyip, hastalık tanısını koyup, gen ekspresyon profilinin zamanla nasıl değiştiğine bakıp hastalığın gelişmesi/gerilemesi izlenebilir. Yeni ilaç adaylarının olası toksik etkilerini çok hızlı bir şekilde izleyip eliminasyonu çok kolaylıkla yapılabilir. Potansiyel ilaçların farmakolojik etkileri çip üzerinde bulunabilir.

Günümüzde tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörler, genetik ve bulaşıcı hastalıkların hızlı bir şekilde teşhis edilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca DNA ile etkileşerek ona hasar veren maddelerin saptanmasını da mümkün kılmaktadır. Özellikle antikanser ve antiviral özellik taşıyan ilaç moleküllerinin DNA ile etkileşimlerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenmesi, ilaç geliştirme çalışmaları için oldukça önem taşımaktadır. (Kelley ve ark 1997; Kolakowski ve ark 1996; Liu ve ark 1998; Jelen ve ark 2002; Erdem ve ark 2005a; Krizkova ve ark 2007; Karadeniz ve ark 2003; Zhou ve ark 2005; Palaska ve ark 2007; Oliveria-Brett ve ark 2006).

Çalışmamızda, madde ve DNA etkileşmesini incelemek amacıyla bir elektrokimyasal DNA biyosensörü (genosensör) tasarımı gerçekleştirildi. Bu amaçla yüzeyine çift sarmal DNA (dsDNA) tutturulmuş kalem grafit elektrodu (KGE) kullanılarak, potansiyel antiviral etkili madde efavirenz (EFV) ve antikanser ilaçlar löprolid (LPR) ve fulvestrant (FLV)'ın dsDNA ile etkileşmesi elektrokimyasal olarak incelendi. Elektrokimyasal tayin yöntemi olarak diferansiyel puls voltametri tekniği (DPV) kullanıldı. Çalışma sırasında; kullanılan madde ile DNA'nın etkileşme süresi, madde ve DNA derişimindeki değişimin yanıtı etkisi ve tekrarlanabilirlik gibi bazı deneysel parametreler incelendi.

Katı elektrotlarla yapılan voltametrik analizler maddenin farmakolojik aktivitesi ve biyotransformasyonu hakkında bilgi vermesinin yanında; (a) Modifiye elektrot geliştirilmesiyle o maddeye duyarlı analiz sağladığı için, (b) Katı elektrotlarla yapılan çalışmalar, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi için dedektör geliştirilmesine yardımcı olduğu için, (c) Bu elektrotlarla geliştirilen yöntemlerin daha sonra mikro elektrotlarla in-vivo tayinlerde kullanılabileceği için ayrıca önem taşımaktadır. Daha önceki çalışmalardan farklı olarak kullandığımız kalem grafit elektrot (KGE) ile gerçekleştirdiğimiz çalışmanın getirdiği en önemli yarar; KGE'nin tek kullanımlık olması ve daha tekrarlanabilir sonuçlar vermesidir.

Madde-DNA etkileşiminin genosensörlerle tayinine dayalı ilk bölümünde, potansiyel antiviral etkili madde EFV'in dsDNA ile etkileşmesinin elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiş olup, bu çalışma dünya literatürüne girmiştir (Dogan-Topal ve ark., 2009). EFV'in DNA ile etkileşim öncesi ve sonrası, DNA'daki elektroaktif baz guaninin yükseltgenme sinyallerindeki değişiminden yola çıkarak, elektrot olarak KGE ve yöntem olarak DPV'nin kullanılmasıyla incelendi. EFV ile yüzeye tutturulmuş DNA'nın etkileşme süresi, EFV ve DNA derişiminindeki değişimin yanıt etkisi ve tekrarlanabilirlik gibi bazı deneysel parametreler de incelendi. Ayrıca EFV'in boş KGE kullanılarak, DPV yöntemi ile elektrokimyasal davranışlarının: pH, destek elektroliti, tarama hızı ve derişim ile değişiminin incelenmesi ve bu sonuçlara göre en iyi koşulların saptanabilmesi amaçlanmıştır. Her iki yöntemle de saptanan en iyi koşullarda voltametrik miktar tayini yapılması ve geliştirilecek bu yöntemlerin farmasötik dozaj formlarına uygulanması planlanmıştır. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Madde-DNA etkileşimine dayalı diğer çalışmamızda antikanser ilaç löprolid, KGE kullanılarak iki ayrı yolla, hem dsDNA immobilize edilmiş elektrotta hem de çözelti ortamında dsDNA ile etkileşmesi DNA'nın elektroaktif bazlarından biri olan guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden incelendi. Bu çalışma dünya literatürüne girmiştir (Dogan-Topal ve Ozkan, 2011). LPR ile yüzeye tutturulmuş DNA'nın etkileşme süresi, LPR ve DNA derişiminindeki değişimin yanıt etkisi ve

tekrarlanabilirlik gibi bazı deneysel parametreler iki yöntemle de incelendi. Ayrıca LPR'nin boş KGE kullanılarak, DPV yöntemi ile elektrokimyasal davranışlarının: pH, destek elektroliti, tarama hızı ve derişim ile değişiminin incelenmesi ve bu sonuçlara göre en iyi koşulların saptanabilmesi amaçlanmıştır. Her üç yöntemle de saptanan en iyi koşullarda voltametrik miktar tayini yapılması ve geliştirilecek bu yöntemlerin farmasötik dozaj formlarına uygulanması planlanmıştır. Her üç yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Madde-DNA etkileşiminin genosensörlerle tayinine dayalı üçüncü bölümünde, potansiyel antikanser etkili madde fulvestrant'ın dsDNA ile etkileşim öncesi ve sonrası, DNA'daki elektroaktif baz guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim, elektrot olarak KGE ve yöntem olarak DPV'nin kullanılmasıyla incelendi. FLV ile yüzeye tutturulmuş DNA'nın etkileşme süresi, FLV ve DNA derişimindeki değişimin yanıtı etkisi ve tekrarlanabilirlik gibi bazı deneysel parametreler incelendi. Ayrıca FLV'nin boş bor ile dope edilmiş elmas elektrot (BDEE) kullanılarak, DPV yöntemi ile elektrokimyasal davranışlarının: pH, destek elektroliti, tarama hızı ve derişim ile değişiminin incelenmesi ve bu sonuçlara göre en iyi koşulların saptanabilmesi amaçlanmıştır. Her iki yöntemle de saptanan en iyi koşullarda voltametrik miktar tayini yapılması ve geliştirilecek bu yöntemlerin farmasötik dozaj formlarına uygulanması planlanmıştır. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılacaktır.

Sonuç olarak çalışmamızda tasarımı yapılan tek kullanımlık elektrokimyasal genosensör kullanılarak, DNA hedefli maddelerin DNA ile etkileşmesi incelenerek, gelecekte yeni antikanser ve antiviral ilaç hedefleme çalışmalarına yeni bir boyut getirilmesi ve yakın gelecekte piyasaya sürülecek DNA biyoçiplerinin teknolojisini (Hodgson, 1998) oluşturacak olan elektrokimyasal genosensörlerin bir prototipinin geliştirmesi hedeflenmiştir.

## **2. GEREÇ ve YÖNTEM**

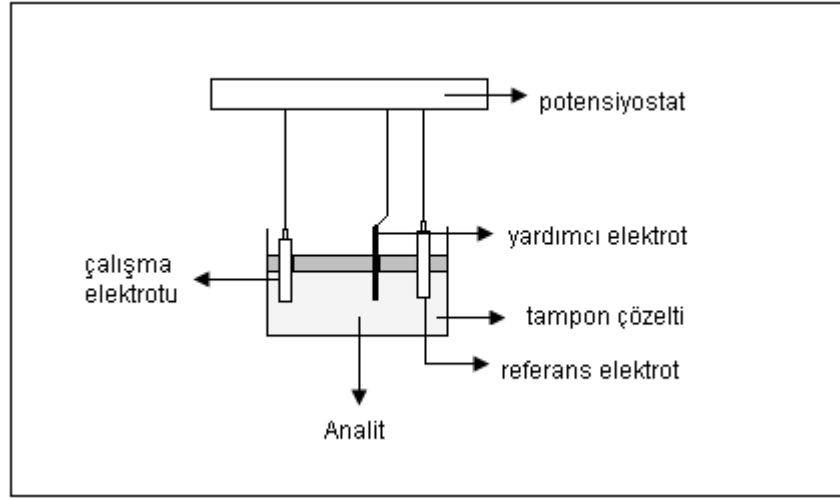
### **2.1. Elektrokimya**

Elektrokimya; maddenin elektriksel davranışını ve elektrik enerjisi ile kimyasal tepkime arasındaki ilişkiyi inceleyen bilim dalıdır. Elektrokimyasal tepkimeler yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri olup, elektron geçişi veya elektron aktarımı ile sağlanır. Elektrokimyasal tepkimeler, elektronların bir yerden başka bir yere geçişiyle, elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede gerçekleşir. Elektrokimyasal tepkimelerin gerçekleşebilmesi için; analizi yapılacak maddeyi içeren bir çözelti (Elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla tampon çözelti kullanılır), maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı genellikle üçlü olan elektrot sistemi, elektrotları birbirine bağlayan çevirim sistemi gereklidir.

#### **2.1.1. Elektrokimyasal Hücreler ve Tepkimeler**

Kimyasal sistemlerdeki elektrokimyasal ölçümler, elektrot çözelti ara yüzeyinin elektriksel özelliklerini ve elektrot tepkimelerinin temel ilkelerini anlamayı gerektiren uygulamalardır. Elektrokimya, kimyasal fazlar arasındaki ara yüzey boyunca oluşan yük aktarımını etkileyen nedenleri ve bu süreci inceler. Kimyasal fazlardan biri, iyonların hareketi ile yükün taşındığı (sıvı çözeltiler, erimiş katılar ya da iyonik olarak iletken katılardan oluşan) elektrolit olarak adlandırılan kısımdır. İkinci faz ise elektronik hareketle (elektron hareketi) yükün taşındığı (metaller, yarı iletkenlerden oluşan) elektrot olarak adlandırılan kısımdır.

Elektrot – elektrolit arasında oluşan ara yüzeyin toplam özelliklerinin çalışıldığı sisteme elektrokimyasal hücre denir. Bir elektrokimyasal hücre, analit ile birlikte destek elektroliti adı verilen ve belirteç olmayan bir elektrolitin aşırısını da içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan (çalışma, karşılaştırma, yardımcı) olmuştur. Voltametrik ölçümlerde kullanılan elektrokimyasal bir hücrenin bileşenleri Şekil 2.1.'de verilmiştir.



**Şekil 2.1.** Genel elektrokimyasal hücre şeması. (Yalçın, 2007)

**Çalışma elektrodu:** Üzerinde ilgili tepkimenin olduğu ve zamanla gerilimi doğrusal olarak değişen elektrottur.

**Karşılaştırma elektrodu:** Çalışma elektrodunun geriliminin kıyaslandığı elektrot olup, analit bileşiminden bağımsız olarak tekrar edilebilir, kararlı ve sabit bir gerilim sağlar.

**Yardımcı elektrot:** Sinyal kaynağından çıkan elektriğin çözelti içerisinde geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlayan (akım taşıyıcı elektrot) ve tepkimeye girmeyen (inert) bir iletken materyalden oluşan elektrottur.

Elektrokimyasal ölçümler genellikle bir destek elektroliti içeren çözelti ortamında yürütülür. Çözücü seçiminde; analitin çözünürlüğü ve redoks aktivitesinin yanı sıra çözücünün elektrik iletkenliği, elektrokimyasal aktivitesi ve kimyasal reaktivitesi de önemlidir. Çözücü, analit ile tepkimeye girmemeli ve geniş bir gerilim

aralığında elektrokimyasal inert olmalıdır. Su, en çok kullanılan çözücü olup genellikle iki kez arıtılmış olması yeterlidir. Organik çözücülerden ise metanol, asetonitril, dimetilformamid (DMF) ve dimetil sülfoksit (DMSO) sıklıkla kullanılır. Bazı uygulamalar için çözücü karışımları da kullanılabilir.

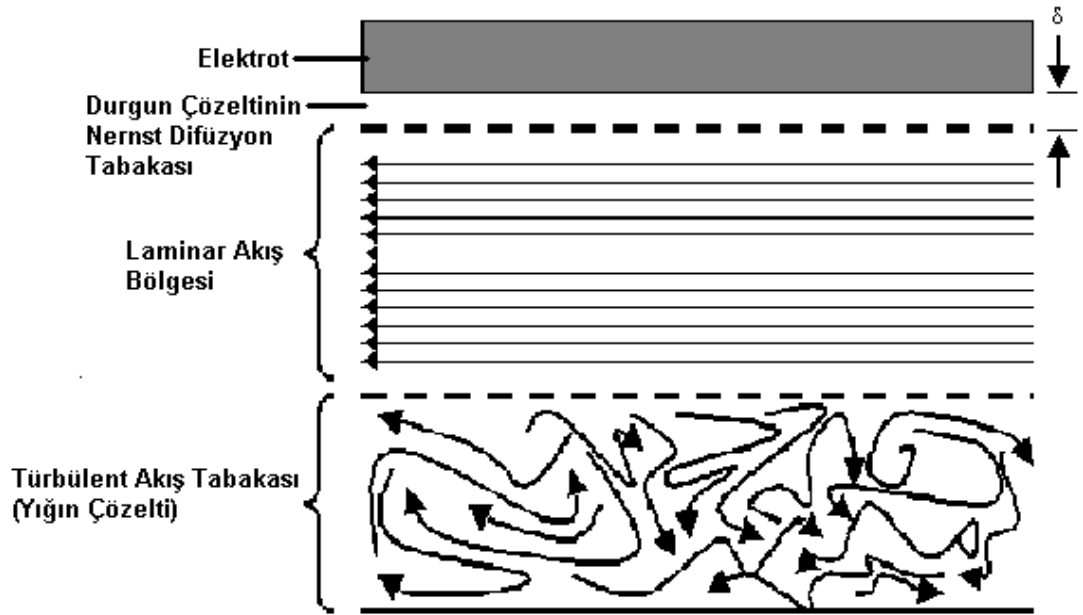
Gerilimin kontrol edildiği deneylerde destek elektroliti kullanılması gereklidir. Destek elektroliti; çözeltinin direncini azaltır, elektriksel migrasyon (elektriksel göç) etkisini ortadan kaldırır ve sabit bir iyonik güç sağlar. İnert destek elektroliti olarak inorganik tuzlar, mineral asitler ya da pH kontrolü gerekli olduğu zaman tampon sistemleri kullanılabilir. Destek elektroliti olarak kullanılacak kimyasal bileşiklerin saflığı yüksek olmalı ve kolaylıkla yükseltgenip indirgenmemelidir. Destek elektroliti derişimi, diğer tüm elektroaktif (elektrot tepkimesine katılan) türlerin derişiminden büyük olmalıdır. Genel olarak 0.1 – 1 M arasındaki çözelti derişimlerinde hazırlanır.

Elektrokimyasal hücrelerde karşılaştırma elektrodunun gerilimi sabit olduğundan, hücredeki değışikliğin çalışma elektrodundan kaynaklandığı söylenebilir. Elektrokimyasal hücrede karşılaştırma elektroduna göre çalışma elektrodunun gerilimi diğer bir deyişle çalışma elektrodundaki elektronların enerjileri kontrol edilir ya da gözlemlenir (Wang, 2000; Skoog ve ark., 1998)

Elektroda negatif gerilimlerin uygulanması ile elektronların enerjisi artar; elektrolizdeki türlerin değeriilik durumundaki enerji düzeyine ulaşıldığında elektronlar, elektrottan çözelteye akar ve indirgenme akımı meydana gelir. Benzer bir şekilde elektroda pozitif gerilim uygulandığında elektronların enerjisi düşer; çözelti ortamındaki enerji düzeyi uygun olan elektronlar elektroda akar ve yükseltgenme akımı meydana gelir. Bu süreçte etkili olan kritik gerilim değeri, türlerin standart gerilimi ( $E^0$ ) ile ilgilidir (Bard ve Faulkner, 1980)

### 2.1.2. Elektrokimyasal Tabakalar

Elektrokimyasal ölçüm yapılırken elektrot yüzeyi ile analit çözeltisi arasında heterojen tabakalar meydana gelmektedir. Bunun nedeni; elektrodun kendisine bitişik olan çözelti tabakasındaki bir türe elektron verebilmesi ya da o tabakadan elektron alabilmesidir. Genel olarak hareketli (karıştırılan) sistemlerdeki heterojen tabakaların bileşimi Şekil 2.2’te görülmektedir.



**Şekil 2.2.** Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik olarak gösterilmesi  
(Karadeniz, 2004)

Türbülent akış tabakası: Elektrottan uzak çözelti yığnında gözlenir; sıvı hareketinin düzenli bir akış modeli yoktur.

Laminar akış bölgesi: Yüzeye yaklaşıldığında laminar akışa geçiş olur; sıvı tabakaları elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbiri üzerine kayarlar.



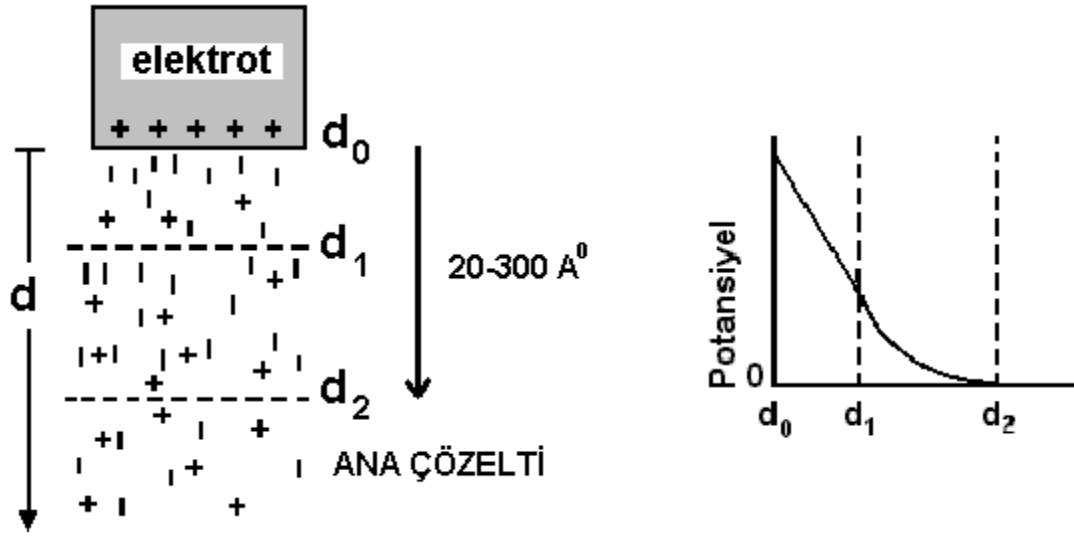
Nernst difüzyon tabakası: Elektrot yüzeyinden  $\delta$  cm uzakta laminar akımının hızı, sıvı ile elektrot arasındaki sürtünmeden dolayı sıfıra yaklaşır ve bunun sonucunda elektrot çevresinde ince, durgun bir çözelti tabakası oluşur. Genellikle bu çözelti tabakası,  $10^{-2} - 10^{-3}$  cm kalınlığında olabilir (Skoog ve ark., 1998).

### 2.1.3. Elektrokimyasal Çift Tabaka

Elektrokimyasal ölçümler yapılırken elektrodun kendisine bitişik çözelti tabakasındaki bir türe elektron vermesi ya da ondan elektron alması nedeniyle heterojen sistemler oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle, bu tabakanın bileşimi çözeltinin diğer kısımlarının bileşiminden önemli ölçüde farklı olabilir. Elektroda pozitif bir gerilim uygulandıktan hemen sonra elektrodun yüzeyinde tepkimeye girecek aktif bir tür yoksa hızla sıfıra düşecek anlık bir akım dalgası oluşacaktır. Bu akım, her iki elektrodun da yüzeyinde bir negatif yük fazlalığı (ya da eksikliği) yaratan bir yükleme akımıdır. Fakat iyonik hareketliliğin bir sonucu olarak elektroda bitişik olan çözelti tabakalarında derhal bir zıt yüklenme oluşur. Bu etkileşim Şekil 2.3’de gösterilmektedir. Elektrodun yüzeyinde, uygulanan pozitif gerilimin bir sonucu olarak pozitif yük fazlalığı oluşmuştur. Yüklü çözelti tabakası iki kısımdan oluşmaktadır:

1- Yoğun iç tabaka ( $d_0$  ‘dan  $d_1$ ’ e), bu tabakada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan gerilim mesafe ile doğru orantılı olarak azalır. Bu tabaka, çözücü moleküllerinden ve bazen özel olarak adsorblanmış diğer türlerden (iyonlar ya da moleküller) oluşur.

2- Difüze tabaka ( $d_1$  ‘dan  $d_2$ ’ e), burada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel üstel olarak azalır. Elektrot yüzeyindeki ve yüzeye bitişik çözeltideki bu yük topluluğu bir elektriksel çift tabaka olarak adlandırılır (Bard ve Faulkner, 1980; Skoog ve ark., 1998; Şahinci, 2005). Şekil 2.3’de elektriksel çift tabakanın görünümü ve elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça gerilim değişimi gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka (Karadeniz, 2004)

#### 2.1.4. Elektrokimyasal Bir Olayda Akımlar

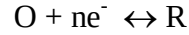
Elektrot sistemine gerilim uygulandığında kapasitif akım ve faradayik akım olmak üzere 2 çeşit akım oluşur.

1-Kapasitif akım ( $i_c$ ) : Bir elektrodun bir elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yükle yüklenmesiyle çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin ara yüzeyin iki tarafında birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Oluşan bu çift tabaka, bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa dahi bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir; sistemden kaynaklanır ki bu akıma kapasitif akım denir. Ne kadar düşük olursa, o kadar doğru ölçüm yapılır. Kapasitif akım fon akımın oluşmasına neden olan etkenlerden biridir.

2-Faradayik akım ( $i_f$ ): Elektrot tepkimesinden kaynaklanan (analiz edilecek maddeden) akımdır. Elektrot-Elektrolit ara yüzeyi boyunca yükün (örneğin elektronların) aktarımıyla bir yükseltgenme/indirgenme meydana geldiği ve Faraday Yasalarına (elektrotlarda değişikliğe uğrayan madde miktarı, elektrolitin içinden geçen elektrik miktarı ile doğru orantılıdır) uyduğu için faradayik akım adını alır.

### 2.1.5. Elektrokimyasal Bir Olayda Faradayik İşlemler

Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir. Bu reaksiyonlarda;



O ve R'nin, sırasıyla, redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği tepkime ile gösterilmektedir. Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli, elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin [ $C_o(0,t)$  ve  $C_R(0,t)$ ], Nernst Denkleminde (eşitlik 1.1) göre saptanmasında kullanılabilir.

$$E = E^0 + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{C_o}{C_R} \quad (1.1)$$

$E^0$  = Redoks tepkimesi için standart potansiyel

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

T = Sıcaklık ( $^0\text{K}$ )

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96487 coulombs)

Elektrot ara yüzeyinde meydana gelen redoks tepkimesi sırasında akım, elektronların doğrudan aktarımı yoluyla iletilir. Bir elektrottaki kimyasal madde miktarının geçen akımla doğru orantılı olduğunu ifade eden bu tip işlemlere, faradayik işlemler, bu şekilde oluşan akımlara da faradayik akımlar adı verilir.

Analizlenecek madde ve ürünlerin derişimleri yalnızca elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak ve Nernst tabakası içinde değişir. (Bard ve Faulkner, 1980; Wang, 2000; Meriç, 2001).

### **2.1.6. Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları**

Kütle aktarımı, çözelti içinde bulunan bir maddenin bir yerden başka bir yere hareketi olarak tanımlanır. Bu hareket, iki bölge arasında elektriksel ya da kimyasal gerilim farkı varsa hızlanır. Bir elektrot, yalnızca elektrot yüzeyindeki çok ince bir çözelti tabakasında etkili olabildiğinden faradayik akım, ana çözeltiden elektrot yüzeyine doğru tepkimeye giren türlerin devamlı kütle aktarımını gerektirir.

Elektroaktif maddeler elektrokimyasal bir olayda üç şekilde taşınabilir:

- a) Bir elektrik alan etkisi altında Göç/ Migrasyon,
- b) Karıştırma veya titreşim sebebiyle Konveksiyon,
- c) Derişim farkından kaynaklanan Difüzyon.

Migrasyon, yüklü taneciklerin elektriksel alanın etkisi ile zıt yüklü kutba doğru çekilmesinden kaynaklanan bir hareket türüdür. Burada anyonlar anoda, kasyonlar katoda doğru hareket ederler. Migrasyona yol açan kuvvetler sadece elektrostatik güçlerdir. Elektroaktif tür yüklü olduğu sürece zıt yüklü elektrot tarafından çekilecektir. Ancak derişime bağılı olmadığı için, ilgilenilen türün bu yolla aktarımını tümüyle sıfırlayamazsak da en aza indirmek için ortama aşırı miktarda aktif olmayan destek

elektrolit ilavesi yapılır. Bu çözeltideki iyonlar iyonik göçü önemli ölçüde üstleneceğinden analitin çok az bir kesimi migrasyonla taşınır hale gelecektir. Böylece çözeltideki yükler herhangi bir iyon tarafından taşınabilir; analitin zıt yüklü elektroda göç etme hızı uygulanan potansiyelden bağımsız hale gelir. İyonik göç ortama destek elektroliti ilavesiyle engellenebilir.

Konveksiyon sıcaklık ve yoğunluk farkından oluşur. Konveksiyonun akım yoğunluğu üzerinde büyük etkisi vardır. Bunu önlemek için çözelti ya karıştırılır ya da elektrot hızla döndürülür.

Asıl istenen, ana çözeltideki elektroaktif maddenin elektrot yüzeyine sadece difüzyonla taşınmasıdır. Difüzyon kontrollü elektrokimyasal olaylarda madde derişiminin fazla olduğu bölgeden derişimi az olan bölgeye doğru difüzlenir. Böylece elektrolit çözeltisi ile elektrot yüzeyi arasındaki derişim farkından bir difüzyon akısı doğar.

Bu akı;

$$J = - D (dc/dx)$$

Formülü ile verilir. Bu ilişki Fick'in 1. yasasıdır.

Burada J, difüzyon akısı ( $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ );  $dc/dx$  derişim gradienti ( $\text{mol m}^{-4}$ ) ve D difüzyon katsayısı ( $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ )'dir. Fick'in 1. yasasında kararlı hal difüzyonu göz önüne alınmıştır. (Bocris ve Reddy, 1970). Yani difüzlenen partiküllerin derişimi ve akı zamanla değişmemektedir. Bu yasa elektrot olaylarına uygulandığında, elektroda bitişik difüzyon tabakası denilen bir bölgede elektroaktif maddenin elektrota ulaşmasını açıklar. Bu taktirde elektroda difüzlenen maddenin eşdeğer gram sayısı difüzyon akısına eşit olur. Yani;

$$I / nF = J = - D (dc/dx)$$

Eğer bu kavramlar değişiyorsa bu halde;

$$(\delta c / \delta t) = D (\delta^2 C / \delta x^2)$$

denklemini elde edilir. Bu denklem Fick'in 2. Yasası adını alır. Yani derişim hem zamana, hem uzaklığa bağıdır. Böylece kısmi diferansiyel denklemle gösterilen yukarıdaki Fick'in 2. yasasının formülü elde edilir.

### 2.1.7. Elektrot Tepkime Hızını ve Akımını Etkileyen İşlemler ve Polarizasyon

Elektrokimyasal hücrelerde akım ya da elektrot tepkime hızı genelde aşağıdaki işlemlerin hızları tarafından yönlendirilir:

- 1- Kütle aktarımı (Örneğin bir A molekül veya  $A^-$  iyonunun ana çözeltiden elektrot yüzeyine aktarımı)
- 2- Elektrot yüzeyinde oluşan elektron aktarımı
- 3- Elektron aktarımının öncesi ve sonrası oluşan kimyasal tepkime
- 4- Diğer yüzey tepkimeleri (adsorpsiyon, desorpsiyon, kristalizasyon)

Birçok önemli elektroanalitik yöntem, hücredeki akımın değişiminin bir fonksiyonu olarak ölçülen akım-gerilim eğrilerine dayanır.

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

Yukarıdaki eşitlik, sabit elektrot geriliminde, hücre gerilimi ile akım arasında doğrusal bir ilişkinin geçerli olduğunu göstermektedir. Uygulamada doğrusallıktan uzaklaşan durumlara sık rastlanır. Bu koşullarda hücre polarize olmuştur denir ve polarizasyon derecesi aşırı gerilim ( $\eta$ ) ile verilir. Aşırı gerilimden etkilenen bir elektrolitik hücre için gerilim aşağıdaki eşitlikle verilir:

$$E_h = E_k - E_a - IR - \eta$$

Bir yarı hücrede polarizasyonun gerçekleşebileceği elektrot, elektroda hemen bitişik çözelti tabakası ve ana çözelti olmak üzere üç bölge bulunmaktadır;

Elektrokimyasal yarı hücrede bulunan elektroaktif türün elektrot yüzeyine hareketi; kütle aktarımı, kimyasal tepkime, fiziksel hal değişimi ve elektron aktarımı ara basamaklarından geçerek gerçekleşir. Bu ara basamaklardan biri toplam tepkimenin hızını ve böylece akımın büyüklüğünü sınırlayabilir. Kütle aktarımı elektroaktif türün ana çözeltiden yüzey tabakasına hareketini içerir. Bu basamak toplam tepkimenin ve devamında akımın hızını sınırladığından derişim polarizasyonunun varlığından sorumludur. Bazı yarı hücre tepkimelerinde elektroaktif türün yükseltgenme ve indirgenme formlarının bulunduğu bir ara kimyasal tepkime de yer alır. Bu ara basamak daha sonra elektron aktarım işleminde etkin bir rol oynar. Böyle bir ara basamak tepkimesinde ürünlerin oluşum ya da bozunma hızı akımı sınırlarsa tepkime polarizasyonunun varlığından söz edilebilir. Bazı durumlarda ise adsorpsiyon, desorpsiyon ya da kristallenme gibi fiziksel işlemlerin hızı akımı sınırlar. Bu durumda adsorpsiyon, desorpsiyon, kristallenme polarizasyonu oluşur. Sonuçta yük aktarım polarizasyonu ile karşılaşılır ki bu durumda yüzey tabakada elektrottan yükseltgenmiş türlerle ya da indirgenmiş türlerden elektroda doğru olan elektron aktarımı hızının yavaş olması nedeniyle akımın sınırlanması söz konusudur.

Voltametrik yöntemlerde tam derişim polarizasyonunun olduğu koşullar altında çalışılmak istenir. Genel olarak derişim polarizasyonu koşullarını sağlamak için;

- Analit derişimleri düşük tutulur.
- Elektrolit derişimleri yüksek tutulur.
- Elektrodun yüzey alanı küçük tutulur (mikro elektrotlarla çalışmak idealdir)

Elektrotların birinde ya da ikisinde birden yükseltgenme ya da indirgenme tepkime hızı teorik olarak gerekli olan akım oluşturabilecek kadar hızlı değilse yük aktarım polarizasyonu oluşur. Yük aktarım polarizasyonu ile ortaya çıkan aşırı gerilim aşağıdaki özelliklere sahiptir:

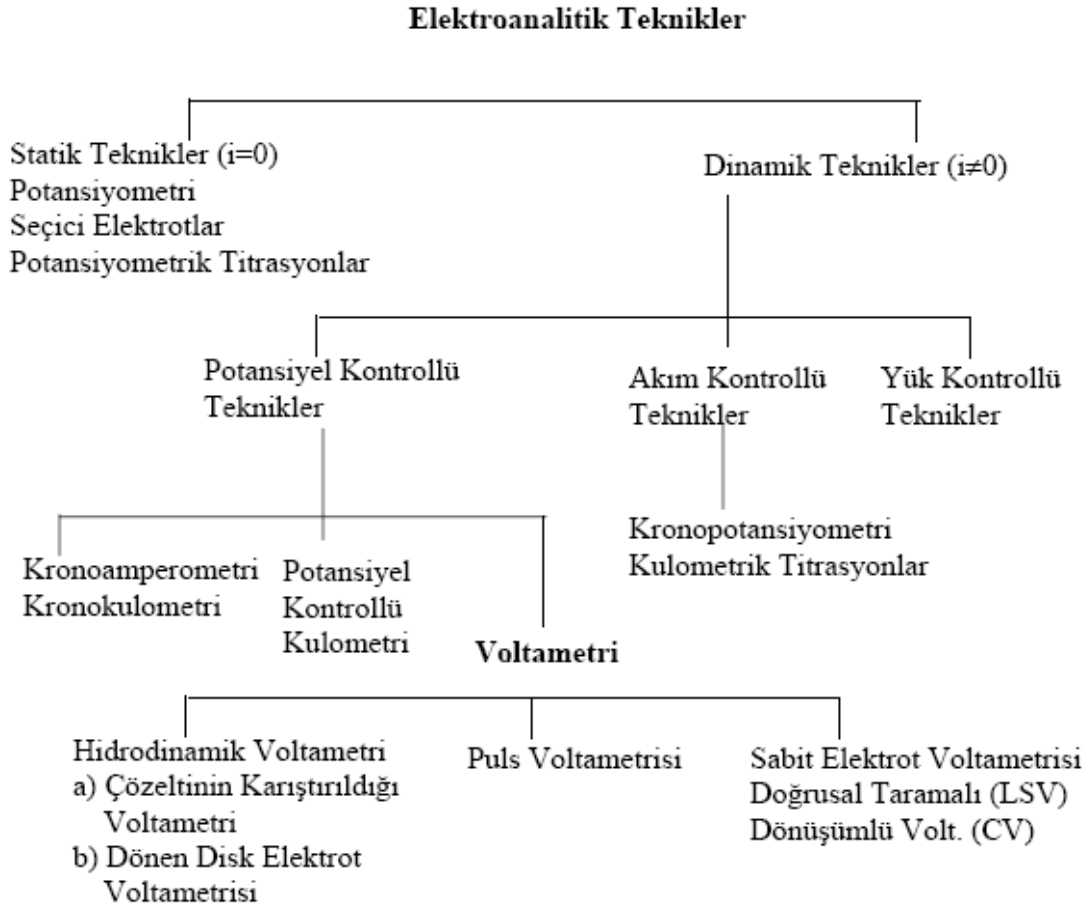
- Aşırı gerilim akım yoğunluğu ile artar.
- Aşırı gerilim genellikle sıcaklık arttıkça azalır.
- Elektrodun kimyasal bileşimine göre değişir.

Aşırı gerilimler  $H_2$  ve  $O_2$  gibi gaz ürünlerin oluştuğu elektrot işlemleri için çok önemlidir. (Bard ve Faulkner, 1980; Skoog ve ark., 1998; Meriç, 2001)

#### **2.1.8. Elektroanalitik Yöntemler**

Elektroanalitik metotların çok çeşitli sınıflandırma yolları vardır. En yaygın kabul görmüş olan sınıflandırma metodu Şekil 2.4’de şema halinde verilmiştir. Şemadan görüldüğü gibi elektroanalitik metotlar genelde net akımın sıfır olduğu denge durumundaki statik metotlar ve denge durumundan uzakta net akımın gözlemlendiği dinamik metotlar olmak üzere ikiye ayrılır. Dinamik metotlar çoğunlukla ya potansiyel kontrollü veya akım kontrollüdür. Potansiyel veya akımın kontrol edildiği tekniklerde bu parametreler büyük genlikli veya küçük genlikli olarak uygulanır. Büyük genlikli teknikler diğerlerine göre daha yaygın olarak kullanılır.





**Şekil 2.4.** Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırma şeması (Gökmeşe, 2004)

Elektroanalitik yöntemler, hücrenin elektrokimyasal özelliklerinin izlenmesine dayanan yöntemlerdir. Elektroanalitik yöntemler bilimsel çalışmalarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel materyallere, farmasötik maddelere, biyolojik örneklerle ( ya da sıvılara ) uygulanabilmektedir.

Elektroanalitik teknikler ile çok düşük tayin sınırına ulaşabilir (yaklaşık  $10^{-10}$  M) ve mekanizma tayinine olanak veren yöntemlerdir. Çoğu kez, bir elementin özel bir yükseltgenme basamağı için spesifiktir. Kullanılan cihazlar nispeten ucuzdur. Kimyasal türlerin derişiminden çok, aktiviteleri hakkında bilgi verir. Ayrıca ara yüzeydeki yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon ve kemisorpsiyon

derecesi, kimyasal tepkimelerin hızı ve denge sabitleri gibi konularda da bilgi verir. Bu özelliklerinden dolayı, elektrokimyasal yöntemler diğer yöntemlerden daha avantajlıdır.

Elektroanalitik yöntemler; ara yüzeyde ya da çözelti ortamının tamamında gerçekleşen değişimlerin incelendiği yöntemler olarak da ikiye ayrılır. Ara yüzey yöntemlerinde; kimyasal ve fiziksel dönüşümler, elektrot yüzeyi ile çok ince çözelti tabakaları arasında gerçekleşir. Ara yüzeyde gerçekleşen yöntemlerden olan potansiyometri ve voltametri; duyarlılık, seçicilik ve uygulanabilirlik gibi özellikleriyle yaygın bir kullanım alanı bulmuşlardır (Yıldız ve ark., 1997; Skoog ve ark., 1998; Wang, 2000).

Voltametri ve polarografi, elektroanalitik yöntemlerin en yaygın kullanılan türleridir.

#### **2.1.8.1.Voltametri**

Çalışmamızda uygulanan yöntem olan voltametri; inorganik, fiziko ve biyokimyacılar tarafından çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenebilen ve/veya indirgenebilen (elektroaktif, elektrot tepkimesine giren) organik ve inorganik maddelerin çeşitli ortamdaki çözeltilerinden uygun koşullarda elde edilen akım şiddeti-gerilim eğrilerinin (voltamogram) karakteristiklerini inceleyen ve değerlendiren analiz tekniğidir. (Bockris J.O.M. ve ark.1970; Yıldız ve Genç, 1993). Ayrıca voltametri, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan amaçlar için de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Voltametri 1922 yılında Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından bulunan polarografiden geliştirilmiştir. Voltametrimin hala önemli bir dalı olan polarografi, diğer voltametri tiplerinden çalışma mikroeletrodu olarak damlayan cıva elektrodu kullanılması bakımından farklılık gösterir (Bond, A.M., 1980). Heyrovsky

polarografi keşfinden ve geliştirilmesinden dolayı 1959 yılında Nobel Kimya Ödülünü kazanmıştır

Voltametrde kullanılan mikro elektrot, iç çapı 0,03-0,05 mm olan cam bir kapiller borudan akarak büyüyen ve belli bir büyüklüğe geldiği zaman koparak düşen bir cıva damlası ise, yöntem ‘polarografi’ ve elde edilen akım-gerilim eğrisi ise ‘polarogram’ olarak adlandırılır.

Polarografik yöntem damlayan cıvanın kolayca yükseltgenmesi nedeniyle daha çok indirgenme olaylarının, voltametri ise katı elektrotlar yardımı ile yükseltgenme olaylarının incelenmesinde kullanılmaktadır. Karbon elektrotlarla yapılan voltametri ise hem yükseltgenme, hem de indirgenme bölgesinde geniş bir çalışma aralığına imkân tanımaktadır.(~ -1.8V - +1.8V (sulu ortamda)). (Tunçel ve ark., 1984)

Voltametrik çalışmalarda kullanılan elektrotlar kısaca; platin, altın, rutenyum gibi inert metaller (Biryol ve ark.,1989) pirolitik grafit ve camsı karbon (Panzer, 1972; Shearer ve ark., 1972; Tjaden ve ark., 1976; Özkan ve ark.,1998; Şentürk ve ark.,1998), çinko oksit, iridyum oksit gibi yarı iletken elektrotlardır. Tel, levha, disk biçiminde olan katı elektrotların sabit, döner veya titreşen tipleri vardır. (Biryol ve ark., 1989)

1960’lı yılların ortalarında klasik voltametrik tekniklerle yapılan pek çok değişiklik, yöntemin duyarlılığını ve seçiciliğini büyük ölçüde arttırmış ve özellikle tıp, eczacılık, biyokimya ve çevre çalışmalarında yönteme geniş ve giderek artan bir uygulama alanı sağlanmıştır. (Patriarche, 1979; Brezina ve ark., 1958; Greef ve ark.,1990; Şentürk ve ark., 1996 ; Özkan ve ark., 1997; Yılmaz ve ark.,1998; Özkan ve Uslu, 2002; Uslu ve ark., 2006; Tian ve ark., 2008; Dogan-Topal ve ark., 2009).

### 2.1.8.2. Polarografi

Polarografi, ilk bulunan ve kullanılan voltametri tipidir ve elektrot olarak damlayan civa elektrodu kullanılmaktadır. Destek elektrolite ait polarogramın incelenmesi ile ortamda analizlenecek madde yokken bile hücrede artık akım adı verilen küçük bir akımın oluştuğunu gösterir. (Skoog ve ark., 1996; Yıldız ve Genç, 1993)

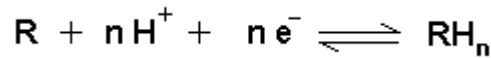
Sınır akımları, akımın büyüklüğü analizlenecek maddenin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı olduğu zaman gözlenir. Difüzyonla kütle aktarımı olduğu için polarografik sınır akımlarına genellikle difüzyon akımları denir ve  $i_d$  ile gösterilir. Bu, difüzyon akımı ile artık akımlar arasındaki farktır. Difüzyon akımı analizlenecek madde derişimi ile doğru orantılıdır.

Artık akımların oluşma sebeplerinden biri olarak safsızlıkların indirgenmesi ve bu safsızlıkların içinde az miktarda çözünmüş oksijen, damıtık sudan gelen ağır metal iyonları ve destek elektrolit olarak kullanılan tuzdaki safsızlıklar sayılabilir.

Polarografik yöntemlerde doğruluk ve duyarlık, faradayik olmayan artık akımın büyüklüğüne bağlıdır ve doğru bir sonuç elde etmek için artık akımın etkisini giderme yoluna gidilir.

*Polarografide pH'nın etkisi: (1)*

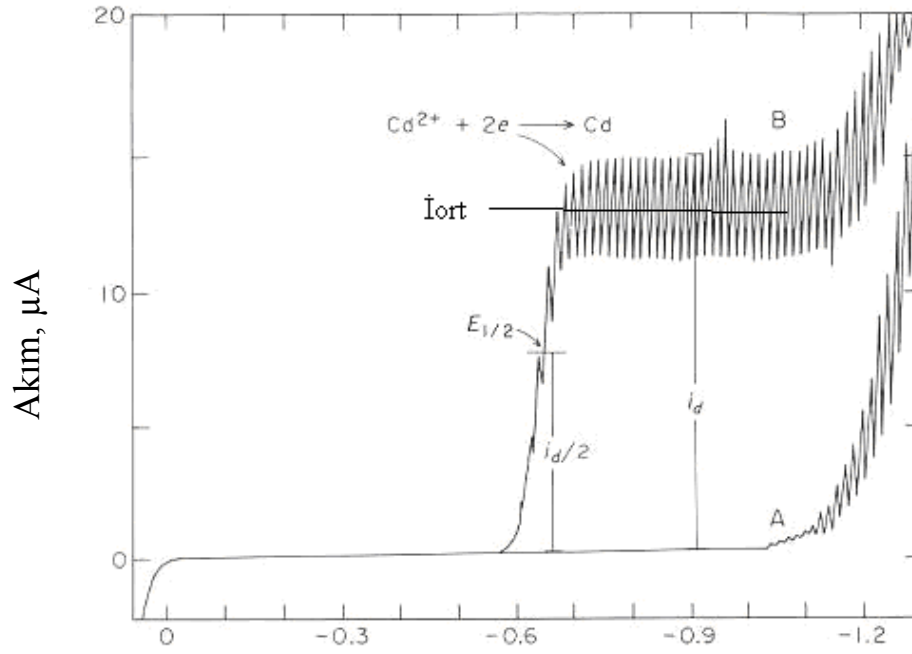
Bazı organik ve inorganik madde reaksiyonları aşağıdaki gibi ifade edilir:



R, analitin yükseltgenmiş şekli ve  $RH_n$  de indirgenmiş şeklini göstermektedir. Bu tip bileşiklerin yarı-dalga potansiyelleri denklemden de anlaşılacağı gibi önemli ölçüde pH' ya bağlıdır; pH'nın değişimi, reaksiyon sonucunda oluşan ürününün değişmesine bile sebep olabilir. Bu nedenle analit çözelti çok iyi şekilde tamponlanmalıdır. Eğer bu işlem yapılmazsa, elektrot yüzeyindeki çözeltinin pH' sı büyük oranda

değişebilmektedir. Bu değişimler, reaksiyonun indirgenme potansiyelini etkiler ve iyi bir görünümü olmayan yayvan eğrilerinin elde edilmesine neden olur. Ayrıca, özellikle organik maddelerle yapılan polarografide tekrarlanabilir yarı-dalga potansiyelleri ve difüzyon akımları elde etmek için iyi bir tamponlama yapmak genellikle çok önemlidir.

Polarografide akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir. Belli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı bir plato bölgesine ulaşılır. Bu akıma sınır akımı adı verilir. Elektrot üzerinde henüz reaksiyon olmadığı zaman küçük de olsa bir akım gözlenir. Bu akıma artık akım denir. Sınır akımı ile artık akım arasındaki yükseklik dalga yüksekliğidir. Dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin derişimi ile doğrusal olarak artar. Bu özellik nedeniyle polarografi kantitatif analizlerde kullanılabilir. Akımın, sınır akımı değerinin yarısına eşit olduğu potansiyel yarı dalga potansiyeli olarak tanımlanır. Yarı dalga potansiyeli  $E_{1/2}$  ile gösterilmektedir.  $E_{1/2}$  değeri genellikle elektroaktif maddenin derişiminine bağlı değildir ve standart yarı hücre potansiyeli ile yakından ilişkilidir. Yarı dalga potansiyelinin her madde için karakteristik olması özelliğinden dolayı polarografi kalitatif analizlerde de kullanılabilir.



Potansiyel, V, DKE'ye karşı

**Şekil 2.5.** 1M HCl içerisinde  $5 \times 10^{-4}$  M  $\text{Cd}^{+2}$ 'nin indirgenmesine (B) ve 1M HCl çözeltisine ait polarogram

Fick kanunları olarak ifade edilen diferansiyel denklemlerin genişleyen küresel elektrot için çözülmesi ile ortalama akım için aşağıdaki Ilkoviç eşitliği elde edilir.

$$(\bar{I}_d)_{\text{ort}} = 607 \text{ nCD}^{1/2} \text{ m}^{2/3} \text{ t}^{1/6}$$

Bu eşitlikteki terimlerin açıklamaları aşağıdaki gibidir:

$i$  : damla ömrü sonundaki akım, A;

$n$ : aktarılan elektron sayısı, eq/mol;

$C$ : ana çözeltideki depolarizer derişimi, mol/cm<sup>3</sup>;

$D$ : difüzyon katsayısı, cm<sup>2</sup>/s;

$m$ : cıvanın akış hızı, g/s;

$t$  : damla ömrü, s.

Bir polarografik deneyde cıva sütunun yüksekliği (h) sabit tutulursa cıvanın akış hızı (m) ve damla ömrü (t) de sabit kalır. Deney sabit sıcaklıkta yapılırsa difüzyon katsayısı da sabit olacağından Ilkoviç eşitliği aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$i_d = kC$$

Bu eşitlikte C, ana çözelti derişimi olduğu için polarografi, kantitatif analizlerde kullanılabilir. Yukarıda verilen eşitlik, koordinat sisteminin sıfır noktasından geçen bir doğru denklemdir.

Polarografide difüzyon kontrollü sınır akımından başka kinetik ve adsorpsiyon kontrollü akımlara da rastlanır. Kinetik akım, elektroaktif maddenin bir kimyasal reaksiyon sonucu oluşması ile gözlenir. Elektroaktif maddenin derişimi kimyasal reaksiyonunun hızı ile kontrol edildiği için bu akıma kinetik akım adı verilir. Bazen de akım, elektrot yüzeyine elektroaktif maddenin, ürünün veya ortamda bulunan diğer maddelerin adsorpsiyonu ile kontrol edilir. Bu akıma da adsorpsiyon akımı adı verilir.

### 2.1.8.3. Voltametrik Cihazlar

Voltametrik analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır.

Tanım olarak;

1) Çalışma elektrodu; tasarımı yapılacak bir biyosensör bu üçlü sistemlerde kullanılabilir. Bu elektrot, yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur.

2) Referans elektrot; Referans elektrot, potansiyeli deney süresince sabit kalan bir elektrottur. Ag / AgCl veya doygun kalomel elektrot (DKE) kullanılabilir.

3)Yardımcı elektrot; Pt bir tel veya bir civa havuzu şeklinde olan ve elektriğin çözelti içinden çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan karşıt elektrottur. Bu elektrot, çalışma elektrotu ile bir çift oluşturan fakat ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tayininde rol oynamayan bir elektrottur.

Mikroelektrotlardaki hızlı ilerlemeler ve özellikle elektroanalitik cihazlara kullanıma hazır amplifikatörlerin yerleştirilmesi ile bu alandaki araştırmalarda önemli değişiklikler meydana geldi. Bu tür aletler iki akımdan oluşurlar, hücreye gerilim uygulayan bir polarize akım ve hücre akımının izlenmesi ile ölçülen akım. Modern voltametrik analizlerin karakteristiği, hücre direncinden kaynaklanan hataları en aza indirgeyen çalışma elektrodunun potansiyostatik kontrolüdür. Potansiyostatik kontrollü üç elektrot sistemi ile hücre direncinin büyük bölümü ortadan kaldırılmıştır. Burada karşılaştırma elektrodu çalışma elektroduna mümkün oldukça yakındır. Yardımcı elektrot ise akım yolunun tamamlanması için çözeltiye yerleştirilmiş akım taşıyıcı elektrottur. Böylece akım yardımcı elektrot ve çalışma elektrot arasında çözelti boyunca akar. Çalışma elektrodundaki bütün noktalarda akım yolunun eşit olması için bu elektrotların simetrik olarak hücreye yerleştirilmesi önemlidir. Karşılaştırma elektrodunun çalışma elektroduna çok yakın olması nedeniyle karşılaştırma elektrodundan hiçbir akım geçmez; bu da hücre direncinin dolayısıyla ohmik gerilimin (IR) en aza inmesini sağlar. Yalnız tüm çalışmalara karşın hücre direnci tam olarak yok edilmediğinden ölçülen gerilimlerde IR'nin de katkısı bulunmaktadır. Bilgisayar kontrollü aletler tüm analiz cihazlarında olduğu gibi voltametrik cihazlarda da vazgeçilmez bir unsur olmuştur. Bilgisayar kontrollü cihazlar ile analizlerde kesinlik, hız, kolaylık artmıştır (Skoog ve ark., 1998; Wang, 2000)



#### **2.1.8.4. Voltametrik Elektrokimyasal Analizde Kullanılan Elektrotlar**

##### **2.1.8.4.1. Referans Elektrotlar**

Elektrokimyasal analizler sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyen ve analiz süresince sabit kalan elektrotlardır. Referans elektrotlar çalışılan maddelere karşı duyarsızdırlar.

İdeal bir referans elektrotta aranan özellikler aşağıdaki gibidir;

- Kolay hazırlanabilmeli
- Tersinirdir ve Nernst eşitliğine uyar
- Potansiyeli zamanla sabit kalır
- Çok küçük akımlara maruz bırakıldıklarında eski orijinal potansiyellerine geri dönerler

Referans elektrotlar, sıcaklık değişimlerine karşı ufak değişimler gösterir.

(Skoog ve ark., 1996; Yıldız ve Genç, 1993; Evans A. 1991; Pietrzyk ve Frank, 1979; Tomschik, M., ve ark., 1999)

## Referans Elektrot Çeşitleri

### *Standart hidrojen elektrot (SHE)*

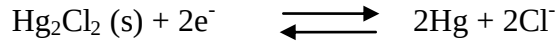
Elektrokimyada ilk olarak standart hidrojen elektrotlar kullanılmıştır. Hazırlanması güç olduğundan pratik çalışmalarda diğer referans elektrotlar öncelikle tercih edilir.

### *Kalomel referans elektrot*

Doygun kalomel elektrotun hazırlanması oldukça kolay olduğundan çalışmalarda pratiklik sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak kullanımı tüm sistemler için elverişli değildir. En büyük sakıncası büyük sıcaklık katsayılarına sahip olmalarıdır.

Doygun kalomel elektrotun elektrot potansiyeli 25 °C’ de standart hidrojen elektrotuna göre +0,244 V ‘ dur.

Oluşan elektrot tepkimesi şu şekildedir;

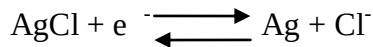


### *Gümüş – gümüş klorür referans elektrot*

Gümüş – gümüş klorür referans elektrotları da doymuş kalomel elektrotlar gibi oldukça yaygın kullanılırlar. Gümüş – gümüş klorür elektrotu doymuş kalomel elektrotu göre daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilirler. Ayrıca gümüş iyonları civa (I) iyonlarına göre daha az sayıda analitle reaksiyona girerler.

Bir gümüş – gümüş klorür referans elektrot gümüş bir telin, elektrolitik yoldan AgCl ile kaplanarak Cl<sup>-</sup> iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilir. Doymuş KCl çözeltisi kullanıldığı zaman 25 °C’ de standart hidrojen elektrotu göre potansiyeli +0,222 V’ dur.

Oluşan tepkime şu şekildedir;



#### *Civa – civa (I) sülfat referans elektrot*

Doygun kalomel elektrota benzer. Elektrot potansiyeli sülfat iyonlarının aktifliği ile bulunur.

#### **2.1.8.4.2. Çalışma Elektrotları**

Zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişen, yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği mikroelettrotlardır.

Voltametik tekniklerin performansı çalışma (indikatör) elektrotuna bağlıdır. Çalışma elektrotunun yüzeyinin kimyasal yapısı ve fiziksel özellikleri performansı etkilemektedir. Elektroanalitik yöntemler gelişmeye devam ederken çalışma elektrotlarını geliştirme çabaları da halen devam etmektedir. Elektroanalitik yöntemlerin verimini arttırabilmek için çalışma elektrotları şekil ve kimyasal yapıları bakımından geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Yapımında platin veya altın gibi iletken bir metal, pirolitik grafit ya da camsı karbon; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal kullanılabilir. Çalışma elektrotları biyosensör tasarımına uygun bir şekilde geliştirilebilir.

Çalışma elektrodu tekrarlanabilir yanıtlar kadar sinyal/ gürültü karakteristiği de sağlar. Çalışma elektrodunun seçimi temel olarak iki faktör üzerine kurulur:

- Hedef analitin redoks davranışları.
- Ölçüm için gerekli gerilim aralığının üstündeki artık akım

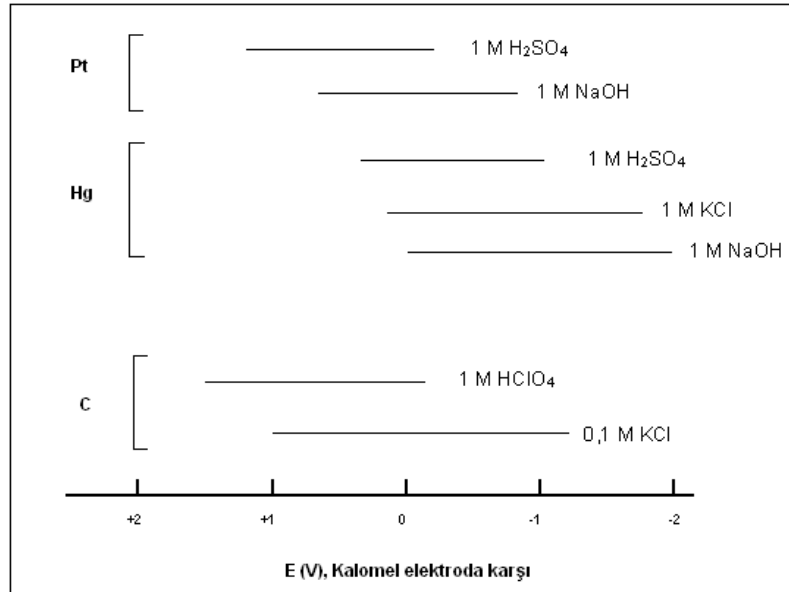
Çalışma elektrodu seçerken dikkate alınacak diğer faktörler; gerilim penceresi, elektrik iletkenliği, yüzey tekrarlanabilirliği, mekanik özellikler, fiyat, bulunabilirlik ve

toksiklik sayılabilir. Bu tür elektrotların kullanıldığı gerilim aralığının saptanması çok önemlidir. Özellikle de bu gerilim aralığı, sulu çözeltilerde yalnızca elektrot malzemesine değil, aynı zamanda bu elektrotların daldırıldığı çözeltinin bileşimine bağlı olarak da değişir. Pozitif gerilim sınırları genellikle moleküler oksijen verecek şekilde, suyun yükseltgenmesi sonunda oluşan hidrojenden kaynaklanır.

Elektroanaliz için geniş bir materyal aralığı çalışma elektrodu olarak kullanım olanağı bulunmaktadır. Civa, karbon ve soy metaller (özellikle platin ve altın) en çok kullanılanlardır (Wang, 2000)

Voltametrde sıklıkla kullanılan çalışma elektrotları aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

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



**Şekil 2.6.** Çeşitli çalışma elektrotlarına ait çalışma potansiyeli aralıkları (Yalçın, 2007)

Çalışma elektrotları çeşitleri;

### 1.Civa Elektrot

Civa elektrotlar elektrokimyasal analizde oldukça yaygın kullanılmaktadır. Büyük negatif potansiyel aralıklarında çalışılmasına imkân sağlar. Bunun yanında civa kolayca yükseltgenebilir. Bu özelliğinden dolayı anot olarak kullanılabildiği potansiyel aralığı oldukça düşüktür. En büyük üstünlüklerinden bir tanesi her seferinde yeni bir metal yüzeyi oluşturulmasıdır. Bunun yanında civa toksik bir metal olduğu için kullanımı zahmetlidir. Civa elektrotunun; disk elektrot, asılı civa damla elektrot, damlayan civa elektrot, durgun civa damla elektrot gibi çeşitleri vardır.

Önceki yıllarda damlayan civa elektrot bazı üstünlükleri nedeniyle voltametrik çalışmalarda sıkça kullanılmaktaydı. Bu üstünlükleri ise; her yeni damla ile yeni ve temiz bir metal yüzeyi oluşturulduğundan elde edilen akım önceki damlalardaki elektroliz olaylarının etkisinde kalmaz, bu nedenle de tekrar edilebilir sonuçlar elde edilir. Elektrot yüzeyi pratikçe her zaman aynı kalır. Yine, civanın kimyasal açıdan inert oluşu ve civanın hidrojen indirgenmesine karşı gösterdiği yüksek aşırı gerilimden dolayı bağıl olarak büyük negatif gerilimlerde kullanılabilir ve bu elektrotla birçok indirgenme tepkimesi incelenebilir (Birçok metal iyonu civa elektrot üzerinde tersinir olarak indirgenir. Civa, protondan hidrojen gazı oluşmasına karşı büyük bir aşırı gerilim oluşturur. Bu nedenle, birçok madde asit ortamda dahi protondan önce indirgenebilir.). Elektrodun pasifleşmesi veya zehirlenmesi gibi olaylar meydana gelmez. Başka bir deyişle reaksiyonlar tekrarlanabilir türdendir.

Bütün bu üstün özelliklerine karşın bu elektrotun bazı sınırlamaları da vardır. Metalik civanın düşük pozitif gerilimde bile kolayca yükseltgenebilmesi, ( $\sim +0.4V$ ) ve kalomel oluşturması civa elektrodun kullanılmasını sınırlayan en önemli özelliklerden birisidir. Ayrıca kullanılan civanın temizlenmesinin oldukça zahmetli olması, damlama süresinin ayarlanmasının zorluğu, civanın damlatılmasında kullanılan kılcalların kolayca

tıkanabilmesi, cıva buharlarının toksik olması ve bu nedenle tekniğin doğrudan dokuya uygulanamaması bu elektrotun kullanılmasındaki başlıca sorunlardır. Ayrıca kullanılan cıvanın çok saf olması istenir; ancak, bunun her zaman bulunması oldukça güçtür. Damlayan cıvanın başka bir mahsuru, klasik yöntemin duyarlılığını yaklaşık  $10^{-5}$  M'a sınırlayan faradaik olmayan artık akım veya yükleme akımı oluşmasıdır. Damlayan cıva elektrodun diğer dezavantajı da akım maksimumları vermesidir.

Damlayan cıva elektrotu yukarıda belirtilen sorunları ortadan kaldırmak için 1940'lı yılların sonunda Skobets ve arkadaşları tarafından başlatılan ve günümüze kadar süren katı elektrot çalışmaları bu yönteme geniş bir uygulama alanı sağlamıştır. (Adams ve ark. 1958; Skoog ve ark.1996)

#### *Damlayan Cıva Elektrodu:*

Bu elektrotla çok uzun bir damlama süresi elde etmek zordur. Ancak damlama süresi 18 dakika olan elektrotlar geliştirilmiştir. (Bond,1980)

#### *Asılı Cıva Damla Elektrotu (ACDE)*

Genelde bu elektrotun yapısında mikroiğne yer alır. Bu iğneye yardımıyla damla büyüklüğü kontrol edilebilmektedir. Bazı ticari firmaların daha farklı elektrotları bulunmaktadır (Solak ve ark.,1988; Kır ve ark.,1990; Altınöz ve Temizer, 1990a ; Altınöz ve ark.,1990b; Altınöz ve ark.,1992) ACDE, hem basit, hem ekonomik, hem de istenilen tekrar edilebilirliğe sahiptir. Bu elektrotla elde edilen eğriler de katı ve duran elektrotlarla elde edilen eğrilere benzemektedir. Burada Hg damlaları, bir cam çubuğa kaynatılmış Pt telin ucuna asılabilir. Bu Hg elektrodun rutin analizlerde kullanımı mikroiğneliye oranla daha zordur.

### *Film Elektrotlar(Civa ince film elektrot) (CİFE)*

Yüzey/hacim oranının büyük olması avantaj sağlar, duyarlılığı artırır. Eğer hacim büyük olursa, Hg yüzeyine difüzenme zaman alır ve ayırmagücü düşer. Elektrotun geometrik yapısı da duyarlılıkta rol oynayan önemli bir faktördür. CİFE'un yüzey alanının hacmine oranının çok büyük olması üstünlük sağlamaktadır.

Hg filmin içinden dışarıya doğru difüzenme son derece hızlıdır. Bu da civa film elektrotun asılı civa elektrota üstünlüğüdür.

Film elektrodun bazı tiplerinde tekrar edilebilirliğin az olması bu elektrotun dezavantajıdır. Film elektrotlarının metaller arası bileşik oluşturma özellikleri vardır. İlk çalışmalarda Ag, Pt, Ni tel elektrotlar kullanılmıştır, bu elektrotlarda yüzey oksit filmi oluşmakta ve tekrar edilebilirlik az olmaktadır.

Hg filmleri iki aşamada hazırlanır (Christian, 1969). İlk olarak Hg -0,2V'da (kalomel elektrota karşı) elektrot materyali üzerine kaplanır. Daha sonra potansiyel daha negatif yapılarak tayin edilecek diğer metaller bu film üzerine kaplanır (Matson ve ark.1965). Bazen de tayini yapılacak çözeltiye Hg katılır ve elektroliz sırasında hem Hg hem de madde elektrot yüzeyine kaplanır.

## **2.Katı Elektrotlar**

Katı elektrotlar, değişik voltametrik tekniklerde çalışma elektrotu olarak yıllardır kullanılmaktadır. Elektroanalitik çalışmalarda katı elektrotlar genellikle cam elektrotlardan geliştirilir.

Katı elektrotlar 50 yıl önce elektroanalitik kimyada kullanılmaya başlanmış ve birçok değişik katı materyal çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. En sık kullanılanlar: karbon yapılı olanlar, Pt, Au'dır. Bazı özel çalışmalarda; Ag, Ni, Cu, Bi da

kullanılmaktadır. Bunlar değişik şekillerde hazırlanmış olabilir: tubular (boru biçiminde), ring (halka biçiminde), makro ya da mikro şekilde...

Katı elektrotlar, elektrokimyasal yönden inert bir potansiyel aralığına sahiptir. Yüksek sıcaklık ve basınca dayanıklıdır. Elektriksel iletkenlikleri iyidir. Uygulaması kolay, geliştirilebilir, nispeten ucuz ve az toksiktir. Bunlar da katı elektrotlara kullanım avantajı kazandırmaktadır. Küçük yapıları ve toksisitelerinin az olması nedeniyle vücut içi uygulamalarda da kullanılabilmektedir ve zarar minimum düzeyde olmaktadır.

Katı elektrot yüzeyinin deneye hazırlanmasının tekrar edilebilirlik açısından önemi büyüktür. Deney süresince elektrot yüzeyine adsorblanmış veya birikmiş safsızlıklardan dolayı katı elektrotlar son derece düzensiz davranış gösterirler. Katı elektrotlarda, civa elektrotta olduğu gibi elektrot yüzeyinin yenilenmesi söz konusu olmadığından tekrar edilebilir sonuçların alınabilmesi için katı elektrotların yüzeyinin her ölçümden önce temizlenmesi gerekir. Ön işlem adı verilen bu işlemler her metal için kendine özgü olmaktadır. (Wang ve Hutchins, 1985a; Fagan D.T. ve ark. 1985; Özkan S. ve ark. 1994)

Voltametri değişik tipte katı elektrotlar kullanılmaktadır. Örneğin soy metal elektrotlar, çeşitli karbon elektrotlar, modifiye elektrotlar gibi.

#### ***a)Metal Elektrotlar***

Çeşitli soy metaller bu elektrotların yapımında seçilebilir. En yaygın kullanıma altın ve platin sahiptir. Bazı özel uygulamalarda bakır, nikel, gümüş de kullanılabilir. Ayrıca çinko, indiyum, iridyum, rutenyum oksit gibi metal oksitlerinden de yararlanılmaktadır. Metal elektrotlar, istenilen bir elektron aktarım kinetiği ve geniş bir anodik gerilim aralığında çalışma sağlarlar. Düşük hidrojen aşırı gerilimine sahip olmaları, bu elektrotların katodik gerilim aralığında çalışmalarını sınırlamıştır. Ancak çalışma ortamının pH değerine bağlı olarak  $-0.2$  V ve  $-0.5$  V aralığındaki daha az negatif gerilimlerde kullanılabilir. Yüzey tabaka sorunlarının küçük olması nedeniyle



susuz ortam çalışmalarında bu elektrotların kullanımı idealdir. Metal elektrotlar elektrokimyasal ya da kimyasal işlemlere sokularak modifiye edilebilir. Tiyol gruplarının özellikle altın ve platine ilgisi ve yüksek akım yanıtı nedeniyle son yıllarda biyosensör teknolojisinde kullanımını artırmıştır (Wang, 2000).

### **b) Karbon Elektrotlar**

Karbon temelli katı elektrotlar; geniş bir gerilim aralığında çalışmaya olanak tanınması, zengin yüzey kimyasının olması, ucuzluğu, kimyasal inertliği, düşük artık akım vermesi, yüksek duyarlılığı nedeniyle elektrokimyasal analizlerde sık olarak kullanılır. Elektron aktarım hızları metal elektrotlardan daha yavaştır. Karbon, yüksek yüzey aktivitesi olması nedeniyle organik bileşikler tarafından kolayca kirletilebilir. Grafit tozundaki aromatik halkaların aktif oksijen grupları içermesine bağlı olarak çeşitli fonksiyonel gruplar (hidrojen, hidroksil, karboksil grupları ve hatta kinonlar) karbon yüzeyinde bağlar oluşturabilmektedir. Bu fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle karbon yüzeyine birçok değişik madde tutturulabilir (Wang, 2000; Kadayıfçılar, 2003). Katı elektrotların kullanıldığı voltametri, özellikle indirgenme olaylarına oranla az incelenmiş olan yükseltgenme tepkimelerindeki rolü ile biyoloji alanında ve dolayısıyla fizyolojik önemi olan pek çok bileşiğin farmakolojik etki mekanizmalarının açıklanmasında da başarıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla geliştirilen ultramikroelektrotlar canlı organizmada *invivo* çalışmaların yapılmasına olanak sağlamaktadır. (Lane R.F ve ark. 1976; Tunçel N. ve ark. 1984). Bu yöntemdeki en önemli gelişmelerden biri de, biyosensörlerle biyolojik ortamda reaksiyona giren ve oluşan ürünlerin analizlerinin yapılabilmesidir. Bunlara örnek olarak; glikoz elektrotu, üre elektrotu v.b. verilebilir. Son yıllarda özellikle ilaç–DNA etkileşmelerinin incelenebilmesi ve yeni elektrot tasarımlarının yapılabilmesi için elektrokimyasal DNA biyosensörleri üzerindeki çalışmalar hızla artmaktadır. (Erdem ve Özsöz 2002; Palecek ve Jelen, 2002; La-Scalea

ve ark., 2002; Kerman ve ark., 2001; Ibrahim ve ark., 2002; Özkan ve ark. 2004; Rauf ve ark 2005)

Karbon elektrotlar ikiye ayrılır (Uslu ve Özkan, 2007).

1. Homojen olanlar; camısı karbon, grafit, elmas, fullerens, karbon-fiber, perde baskılı karbon (Panzer, 1972)

2. Heterojen olanlar; karbon pasta ve modifiye karbon pasta elektrotlar,

Elmas elektrik akımını iletmez. Bor ile dope edilmiş elmas elektrodun zemin akımının düşük olması gibi üstünlükleri vardır ve ilaç analizlerinde son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Grafit, yumuşak ve gözenekli bir materyal olduğu için yüksek adsorbsiyon kapasitesi vardır. Camısı karbon ise mekanik olarak iyi bir iletkenliğe sahiptir. Camısı karbon elektrokimyasal dedektör olarak en çok kullanılan dedektör tipidir. Fullurens, camısı karbon veya grafit  $sp^2$  tipinde hibritleşmiş karbonlardır. Bütün bu grup karbon materyalleri elektrot hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

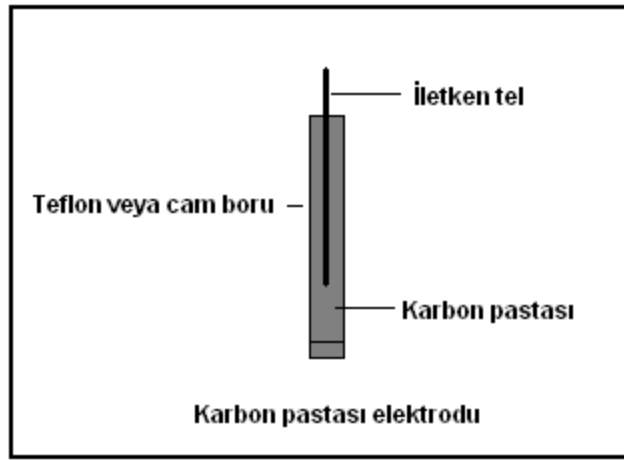
Performanslarında dört kriter önemlidir:

- Geniş potansiyel aralığına sahip olmaları,
- Elektron transfer mekanizmaları,
- Stabilite ve geliştirilebilirlikleri,

-Adsorbsiyon (Analitik işlemlerde adsorbsiyon nadiren istenen bir durumdur; ancak, genellikle istenmez. Elektrot yüzeyine adsorbsiyon istenen bir durum olduğunda elektrotun modifikasyonu için kullanılır. Ancak bazen istenmeyen adsorbsiyon elektrot yüzeyinin kirlenmesine neden olmaktadır.)

### c) Karbon Pastası Elektrotu

Karbon pastası elektrotu; %70 grafit ve % 30 bağlayıcı maddeden (bu oran sabit değildir, araştırmacılara bağlı olarak değişebilir) homojen olarak elde edilen karışımın, 2 – 4 mm. çapında camdan ya da teflondan yapılmış borulara sıkıştırılmasıyla hazırlanır. Elektriksel iletkenlik, bir ucundan iletken bir telin borunun 2/3' üne kadar uzatılmasıyla sağlanır.



**Şekil 2.7.** Karbon pastası elektrotunun şematik olarak gösterimi.

(Yalçın, 2007)

Karbon pastasının hazırlanmasında bağlayıcı madde olarak mineral yağ, parafin yağı, silikon yağı, bromonaftalen kullanılabilir. Bağlayıcı madde ve grafit karışımının elektrot etkinliği üzerine etkisi vardır. Örneğin bağlayıcı olarak kullanılan maddenin karışımdaki oranı arttıkça, elektrotun elektron transfer hızı azalmaktadır.

Karbon pastası elektrotu; hazırlanan karışıma, çalışmaya uygun maddelerin eklenmesiyle modifiye edilebilir. Ayrıca hazırlanmasının pratik ve ucuz olması, yüzey yenilenmesinin kolay olması gibi nedenlerden dolayı çalışmalarda sıklıkla tercih edilir.

#### ***d)Camsı Karbon Elektrot***

Mikrometre boyutlu grafit tozu partiküllerinin, sert ve yapıştırıcı madde ile inert malzemeden yapılmış elektrot gövdesi içerisine sıkıştırılmasıyla elde edilir. Çalışmalarda genellikle tekrarlanabilir yüzeyler sağlanır. Kimyasal tepkimelere girmez. Geniş bir potansiyel aralığında çalışılmasına olanak sağlar. Karbon pastası elektrotlarına göre daha düzgün ve pürüzsüz elektrot yüzeyleri elde edilir. Fiziksel dayanıklılığı daha fazladır.

Camsı karbon elektrotlar, karbon yapılı elektrotlar arasında en yaygın olarak kullanılanlardır. Camsı karbon diğer karbon yapılarından farklı fiziksel özellikler taşır. Yüzeyinde daha ufak gözenekler bulunur ve bu özelliğinden dolayı diğer karbon türlerine göre daha çok kullanılır.

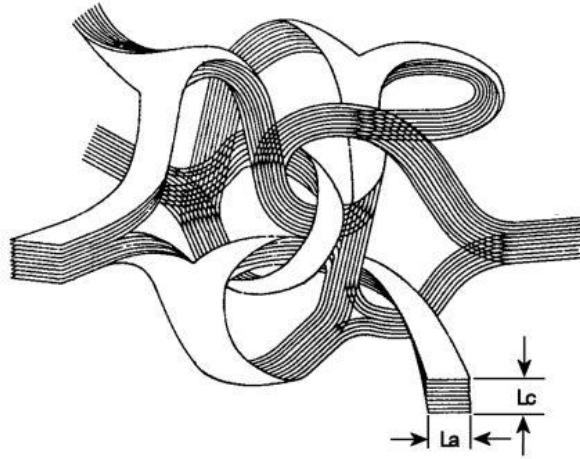
Yapılan pek çok çalışmada camsı karbon elektrottaki elektron transferinin metal elektrottakinden daha yavaş olduğu bulunmuştur. Camsı karbon elektrodun yapısı ve özellikleri ile elektroanalitik kimyadaki kullanımı Van der Linden ve Dieker tarafından hazırlanan bir derlemede açıklanmıştır (Van Der Linden ve Dieker, 1986).

Camsı karbon elektrot materyali ilk defa Yamada ve Sato tarafından 1962 yılında geliştirilmiştir. Bu araştırmacılar, camsı karbon elektrodu inert bir gaz içerisinde fenol formaldehit reçinesini çok dikkatli bir şekilde ısıtma (300-1200°C) sonucunda elde etmişlerdir. Ayrıca camsı karbon elektrot; poliakrilonitrilin 1000-3000 °C sıcaklık aralığında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile de elde edilebilir.

Camsı karbon yapısının, rastgele yerleşmiş ve karışık aromatik şerit moleküllerinden oluştuğu saptanmıştır. Diğer katı elektrotlarda olduğu gibi camsı karbon elektrotla da aktivasyonu sağlamak ve tekrar edilebilir sonuçları elde edebilmek için çeşitli ön işlemler geliştirilmiştir. Bu işlemler parlatma (Rusling, 1984; Thornton ve ark.1985; Hu ve ark., 1985) kimyasal ve elektrokimyasal (Taylor ve Humpffay, 1973; Wang ve Hutchins, 1985), radyo frekans (Evans ve Kuwana, 1977), düşük basınç altında sıcaklık uygulaması (Stutts ve ark., 1983; Wightman ve ark., 1984) vakum-sıcaklık

uygulaması (Fagan ve ark., 1985), laser ışını ile uyarılma (Hershenhart ve ark., 1984) ve metal oksit filmlerinin elektrot yüzeyinde kaplanması (Cox ve ark., 1988) olarak sınıflandırılabilir. Standart bir aktivasyon işlemi henüz saptanamamıştır. Çünkü aktivasyon işlemi kullanılan çözeltiye ve incelenecek maddeye bağlı olarak değişmektedir (Shearer ve ark., 1972; Tjaden ve ark., 1976; Özkan ve ark., 1998; Şentürk ve ark., 1998 ; Yılmaz ve ark., 1998; Özkan ve ark., 2000).

Elektron transferi açısından aktivasyon işleminin amacı (Hu ve ark., 1985), yüzey kirliliklerinin uzaklaştırılması, yüzeydeki fonksiyonel grupların oluşturulması ve yüzey alanının büyütülmesi, serbest keskin uçlar oluşturulması ve mikro partikül oluşumunu sağlamaktır. Yüzeydeki fonksiyonel gruplar yükseltgenme derecesine göre değişir, az oksitlenirse hidroksil, kuvvetli oksitlenirse karboksil veya kinolik yapılar oluşabilir. Şekil 2.8.'de camsı karbonun yapısı görülmektedir (Pravda, 1998).



**Şekil 2.8.** Camsı karbon elektrodun amorf yapısı

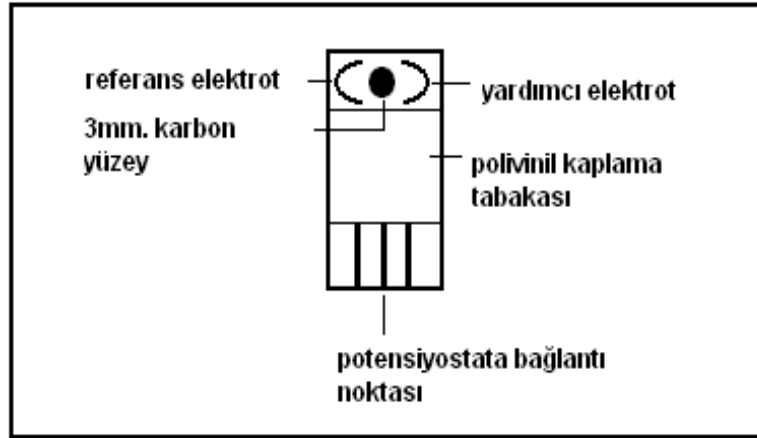
### ***e) Perde Baskılı Karbon Elektrotlar***

Perde baskılı elektrotlar tek kullanımlık elektrokimyasal sensörlerin üretimi için hızlı bir metottur. Perde baskılı elektrotların kullanım kolaylığı, taşınabilirliği ve ucuz üretim teknikleri nedeniyle tercih edilir. En önemlisi ucuzdur ve yüksek derece kesinlik elde edilir. Gelişen DNA mikroçip teknolojisine uygunluğu açısından oldukça etkin olan perde baskılı karbon elektrotlar elektrokimyasal analizlerde son yıllarda oldukça tercih edilmektedirler. (Lucarelli ve ark., 2002; Marazza ve ark., 1999)

Perde baskı teknolojisi; çeşitli mürekkeplerin, poliester esnek film, seramik ya da plastik materyaller üzerine baskısından oluşur. Karbon ve platin mürekkep formülasyonları, çalışma elektrodunun baskısında, gümüşe dayalı formülasyon ise karşılaştırma elektrodunun baskısında sıklıkla kullanılmaktadır. Karbon mürekkepleri, ucuz olmaları ve ölçümlerin düşük fon akımında ve geniş gerilim aralığında yapılmasını sağlamaları nedeniyle perde baskılı karbon elektrot hazırlamada sıklıkla kullanılmaktadır.

Tek kullanımlık perde baskılı elektrotlar kirlilikten kaçınma, enzimin yapısının bozulması ve elektrotun kirlenmesinden dolayı kaybolan yanıt problemlerini giderme gibi bazı avantajlara sahiptir. Perde baskılı elektrotların en önemli avantajı sadece bir kez kullanımdan dolayı devam eden yüzey problemleri ve yüzey kirlenmesini azaltmasıdır. Bu elektrot deneyimsiz kişilerin analitik çalışmalarında da ekonomik fayda sağlar. Bununla birlikte küçük taşınabilir araçla laboratuvar dışında da kullanılabilir

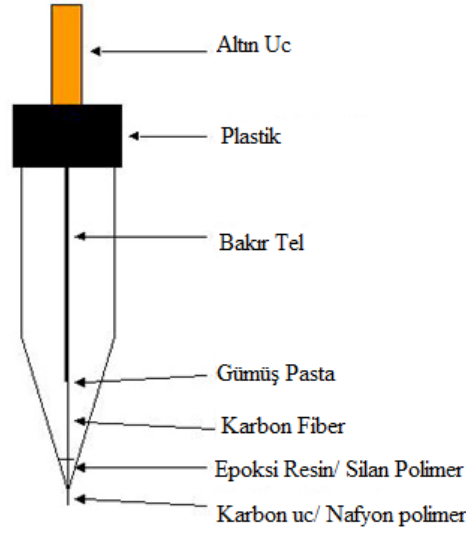
Uygulamada önemli bir kullanım alanına sahip olmalarına karşın, karmaşık yüzeylerde meydana gelen elektrot tepkimelerinin mekanizması hakkında yeterli bilgi vermemektedir. (Hart, 1997; Prudenziati, 1994; Meriç, 2001).



**Şekil 2.9.** Perde baskılı karbon elektrotun şematik olarak gösterimi  
(Yalçın, 2007)

#### ***f) Karbon-fiber Elektrot***

Ultramikro elektrotlara artan ilgi, elektrokimyasal analizlerde karbon fiberlerin geniş bir alanda kullanılmasına yol açmıştı. Bu tür materyaller, polimer tekstil prolizlerinin yüksek sıcaklığa dayanıklı bileşiklere katalitik kimyasal gaz biriktirilmesi yoluyla bağlanmasıyla üretilmektedir. Birçok analitik uygulamada çapları 5–20  $\mu\text{m}$  fiberler kullanılmakta ve bunlar istenilen radyal difüzyona olanak sağlamaktadır. Karbon-fiber elektrodun en önemli üstünlüğü, küçük ölçütleri nedeniyle çeşitli mikro çevresel (beyin gibi) ölçümlere olanak sağlamalarıdır (Wang, 2000).



KF: Çapı 7 - 30 mikrometre arasında

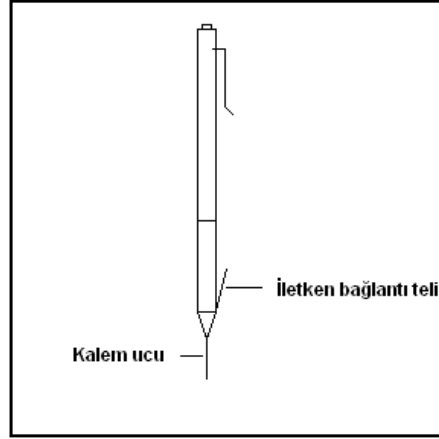
**Şekil 2.10.** Karbon-fiber elektrotun şematik olarak gösterimi

#### **g) Kalem Grafit Elektrot**

Tüm katı elektrotlarla çalışılırken en bilinen sorun; analiz sırasında bazı bileşiklerin yükseltgenme ürünlerinin elektrot üzerinde ince bir film olarak birikmesi sonucu analitik yanıtın büyüklüğünün azalması, elektrot temizleme işlemleri uygulansa bile tekraredilebilirlik kayıplarının oluşmasıdır. Bu nedenle elektrot temizliği, elektrokimyasal tekniklerin analizlerde geniş çapta kullanılmasını kısıtlayıcı en önemli sorundur. 1990'lı yılların sonunda başlayarak el-yapımı kalem grafit (kalem ucu) elektrotlar (KGE) camsı karbon ve karbon pasta elektrotlara tek kullanımlık özelliklerinin yanısıra çok düşük maliyetlerinden dolayı alternatif olmuşlardır (Bond ve ark., 1997; Wang ve ark., 2000; Wang ve Kawde, 2001). Elektrot olarak farklı sertlik ve çapta her yerde bulunabilen ticari mekanik kurşun kalem uçlarından yararlanılır. Kalem uçları, doğal grafitin kil ve balmumu karışımı içerisine dispersiyonu ve ardından ısıt



işlem uygulanması ile üretilir. Kil yerine selüloz gibi organik temelli materyal kullanılıp oksijensiz atmosferde yakıldığı zaman selüloz karbon şekline dönüşür. Oluşan yapı son derece elastiktir. KG elektrotlar, ne karbon pasta ve pirolitik karbon kadar kırılğan, ne de camsı karbon kadar serttir. Tek kullanımlık ve hazırlanmasının zahmetsiz ve ucuz olmasından dolayı son yıllarda kalem grafit elektrotuna olan ilgi daha fazla artmaktadır (Erdem ve ark., 2005b, Karadeniz ve ark., 2003; Masawat ve ark., 2002; Gao ve ark., 2005; Wang ve ark., 2001). Ayrıca bu elektrot ile alınan sonuçlar daha tekrarlanabilir. Analizi yapılacak maddelerin, uygun elektrokimyasal teknikler kullanılarak daha düşük tayin sınırlarına ulaşılabilir. Kalem ucunun sertlik ve siyahlığı ticari olarak grafit ve kil oranlarının ve sıcaklığının değiştirilmesi ile modifiye edilmektedir.



**Şekil 2.11.** Kalem grafit elektrotun şematik olarak gösterimi

#### ***h) Fullerene Elektrotlar:***

Fullerenes (C60, C70) karbon allotropları ailesindendir. Camsı karbon ve grafit gibi  $sp^2$  hibrit karbon yapısına dayanır. Fullerenlerin yapısı boşluklu, küre, elips ya da tüp şeklindedir.  $sp^2$  karbonlarının, birleşen hexagonal yapılar karşı koymasına rağmen, fullerenler grafitte benzemez ve grafit gibi düzlemsel yapılar oluşturmazlar.

Karbon nanotüpleri silindirik fullerenlerdir ve iyi elektrik iletkenliği, mekanik dayanıklılığı ve geniş kullanım potansiyel aralığı nedeniyle oldukça kullanışlı bir elektrotur. Bu karbon tüpler çoğunlukla sadece birkaç nanometre genişliğindedir. Boru şeklinde yapıları birkaç nm çapında ve birkaç “µm” uzunluğundadır. Bu eşsiz moleküler yapı eşsiz makroskopik özellikleri, yüksek gerilme kuvvetini, yüksek elektrik iletkenliğini, ısıya karşı yüksek direnci de beraberinde getirir. Karbon nanotüplerin daha geniş yüzeyde daha küçük boyut, yüksek seçicilik, hızlı yanıt gibi avantajları vardır

#### ***ı)Elmas Elektrotlar:***

Elmas materyalleri karbon materyallerinin yeni bir sınıfını temsil eder ve elektrokimyasal uygulamalar için geleceğin umut verici materyalidir. Elmas (yoğunluğu 3,5) renksiz, saydam ve bilinen en sert maddedir, iletken değildir, kimyasal ve dış etkenlere karşı dayanıklıdır. Elmas bor karbür hariç diğer hiçbir cisim tarafından çizilemez. Elmasın saf karbondan meydana geldiğini 1814 yılında Davy bulmuştur. Elmas karbonun diğer çeşitlerinin çok yüksek basınç ve sıcaklık altında kalması sonucu meydana gelir.

Elmas; sertlik, en yüksek atomik yoğunluk, kimyasal reaksiyonlara girmeme, optik özellikler, ısı iletkenliği, elektriksel karakteristik gibi pek çok özelliğinden dolayı yüksek performanslı materyaller arasında özel bir yere sahiptir. Bor ile dope edilmiş elmas (BDE); geniş elektrokimyasal potansiyel aralığı, düşük gürültü sinyali, elektroanalitik uygulamalarda mekanik sağlamlık gibi özelliklere sahiptir. (Uslu ve Özkan, 2007a; Uslu ve Özkan, 2007b)

Elmas elektrotlar, kimyasal stabiliteleri nedeniyle elektroanalitik kimyada ilaç analizlerinde oldukça sık kullanılmaktadır. 2008 yılında Uslu, B., ve ark., Bor ile dope edilmiş elmas ve camsı karbon elektrot kullanarak pefloxacin'in elektrokimyasal davranışını incelemişler ve geliştirdikleri yöntemi farmasötik preparatlara ve insan

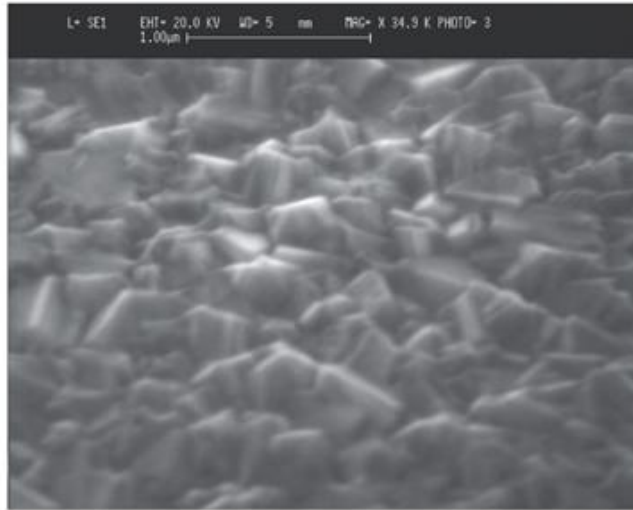
serumuna uygulamışlardır. Elmas elektrotların performansı yüksektir, kimyasal açıdan inerttir. Yüksek atomik dansiteleri vardır. Optik özellikleri, öz iletkenlikleri ve elektriksel karakterleri kullanımlarında avantaj sağlar. (Uslu ve ark., 2008)

İnertliği ve stabil oluşları nedeniyle güçlü asidik ortamda dahi kullanılabilirler. Bu yönüyle klasik karbon elektrotlar ve diğer metal elektrotlardan daha üstündür. Geniş elektrokimyasal potansiyel aralığına sahip olmaları nedeniyle kimyasal çalışmalarda oldukça kullanışlıdır. Diğer elektrotlardan üstün yönleri şu şekilde sıralanabilir:

- Daha düşük derişimli maddeler dahi analiz edilebilir.
- Daha kısa sürede daha kesin sonuçlar verir.
- Sonuç stabildir.

Amorf elmas elektrotlar, nispeten daha ucuzdur ve kristal elmas elektrotlara göre bu yönüyle daha avantajlıdır.

Elmas elektrotlar düzlemsel dinamik aralığın süresi, belirme sınırı, yanıt zamanı, yanıt kesinliği, yanıt kararlılığı gibi diğer elektrotlardan daha çok avantaja sahiptir. (Siangproh W ve ark, 2003; <http://www.chm.bris.ac.uk>; Zhang J ve Oyama M 2004). Elektro katalitik aktivitesi ve oldukça düşük seçiciliği elmasın dezavantajlarıdır



**Şekil 2.12.** BDE elektrodun yapısı (Martínez-Huitle ve ark., 2008)

### 3.Modifiye Elektrotlar

Modifiye elektrotları; elektrot yüzeyinde molekül ve iyonların toplanmalarını sağlayacak bir tabakanın yer almasıyla oluşurlar (Özkan ve ark., 1993). Elektrodun modifikasyonunun anlamı;

- Hızlandırılmış elektron transfer tepkimelerini
- Elektrot yüzeyinin adsorbsiyon nedeniyle zehirlenmesinin önlenmiş olması
- Biyokataliz
- Seçimli geçirgenliğin sağlanması gibi konuları kapsar.

Modifiye elektrotları şöyle sınıflandırabiliriz.

a) Kimyasal Modifiye Elektrotlar : 1) Oksit Kaplı Elektrotlar

2) Polimer Kaplı Elektrotlar

b) Biyolojik Modifiye Elektrotlar : 1) Enzim Elektrotlar

a) Doğal izole enzim elektrotlar

b) Yapay enzim elektrotlar

2) Doku Elektrotlar

a) Hayvan Dokusu Elektrotlar

b) Bitki Dokusu

3) Bakteri Elektrotlar (mikroorganizmaları)

#### a) Kimyasal Modifiye Elektrotlar

- 1) *Oksit Kaplı Elektrotlar*: İlk yapılan çalışmalarda oksit kaplı metalik elektrotlar anot olarak kullanılmış ve böylece oksijen ve klor çıkışı

tepkimelerinin katalizlendiği bulunmuştur. Bu tip elektrotlarda elektrot olarak seçilecek olan metalin üzerine kimyasal veya elektrokimyasal yolla oksit kaplama yapılmaktadır. Seçilecek metal kullanılacak elektrokimyasal olayın niteliğine göre değişir. Örneğin NaBr ve HBr çözeltilerinin hidrolizinde Titan, talyum, Nb (nibidyum) gibi metaller üzerine Rutenyumdioksit ve titandioksit kaplanmaktadır. Metallerin elektrokimyasal olarak saflaştırılmasında Titan-palladyum alaşımı elektrot olarak kullanılmakta, üzerine  $\text{RuO}_2 + \text{IrO}_2$ ,  $\text{RuO}_2 + \text{TiO}_2$ ,  $\text{Ir} + \text{IrO}_2$  gibi katalizörler kaplanmaktadır. Günümüzde bu elektrotların kristallerinin belirli yüzeyleri üstte kalacak biçimde yönlendirilerek ‘yönlendirilmiş elektrot’ denen şekilleri de kullanılmaya başlanmıştır.

- 2) *Polimer Kaplı Elektrotlar*: Elektrot yüzeyine bir polimerle kaplayarak modifiye etmek voltametrik bir ölçümün seçimliliğini ve duyarlılığını ve tekraredilebilirliğini arttırma amacına yöneliktir. Elektrot iyonik bir polimerle kaplandığında redox özelliği gösteren maddeler polimer filmindeki iyonik bölgelerle elektrostatik etkileşme sonucunda film üzerinde yoğunlaşırlar. Bu açıdan bu teknikle sıyırma voltametri arasında benzerlik vardır. Yoğunlaşma sonucu tayin sınırı düşerek duyarlılık artar. Eğer bu tabakada incelenen madde yoğunlaşıyorsa bu aynı zamanda seçimliliğin de artması demektir. Yoğunlaşma işlemi metal iyonları için film içerisinde bir kompleksleştirici madde yerleştirip metalle kompleksleştirmek yoluyla da yapılabilir.

Polimer elektrotların en önemli üstünlükleri bu filmler içerisinde enzim ve mediatörlerin sabitleştirilmesi ve kararlılıklarının arttırılmasıdır.

## **b) Biyolojik Modifiye Elektrotlar**

Bu tip elektrotlarla biyolojik ortam tepkimelerinin reaktant ve ürünleri ölçülerek biyolojik önemi olan bileşiklerin uygun seçicilik ve duyarlılıkta tayini yapılabilir. Çoğu zaman amperometrik ve potansiyometrik sistemler

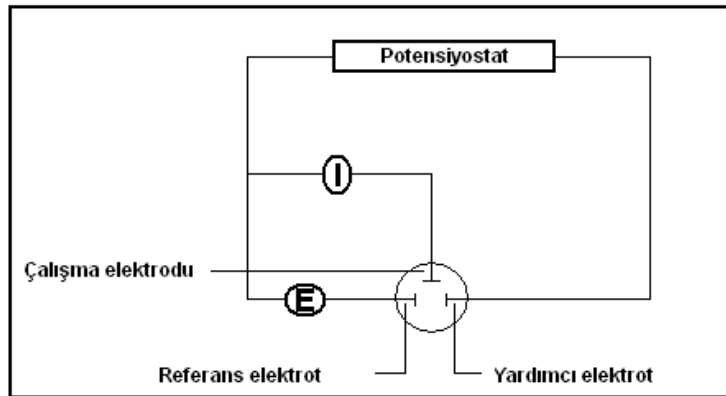
elektrokimyasal biyosensörlerle birlikte kullanılır. Bu elektrotlardan ileriki konularda ayrıntılı bahsedilecektir.

#### 4. Mikroelektrotlar

Elektrot çapı 25  $\mu\text{m}$ 'den daha büyük olmayan elektrotlar için kullanılmaktadır. Minyatürizasyona analitik kimyada artan bir ilgi vardır. Bu elektrotların uygulamadaki üstünlüğü; mikroskobik alanların incelenmesinde, bölgesel derişim profillerinin ölçülmesinde, elektroforez kapillerinin içindeki mikroakım sistemlerinin belirlenmesinde ve çok küçük hacimli örneklerin analizinde kullanılmaları sayılabilir (Wang, 2000).

##### 2.1.8.4.3. Yardımcı Elektrot

Karşıt elektrot olarak da adlandırılır. Platin tel ya da civa havuzu yardımcı elektrot olarak kullanılabilir. Sinyal kaynağından alınan elektriğin çözelti içinden geçip çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlar.



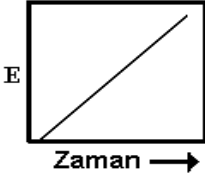
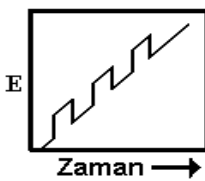
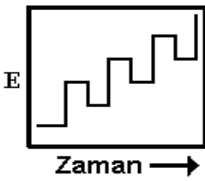
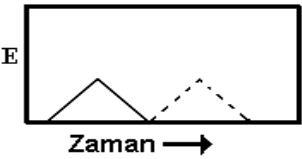
**Şekil 2.13.** Üçlü elektrot sisteminin potansiyostata yerleşiminin şematik olarak gösterimi (Yalçın, 2007)

#### **2.1.8.5. Voltametrیده Kullanılan Elektrotlara Yapılan Ön İşlemler**

Elektro yükseltgenme olayları, elektro indirgenme olaylarına oranla daha az incelenmiştir. Bunun nedeni polarografide damlayan cıvanın daima yenilenerek temiz bir yüzey sağlaması ve bu nedenle de tekrar edilebilir sonuçlar elde edilebilmesidir. Ancak bu elektrot pozitif potansiyellerde yükseltgendiği için elektro yükseltgenme olaylarının incelenmesi için uygun değildir. Katı elektrotlar da elektro yükseltgenmede kullanılabilmelerine karşın yüzey, adsorplanabilen maddelerle kaplandığından veya elektrotların kendileri yükseltgendiklerinden ve oksitle kaplandıklarından tekrar edilebilirliğin sağlanması için her deneyden önce aynı yüzey halinin oluşturulması gerekmektedir. Bu işleme ön işlem denilmektedir. Ön işlem hem elektrotun cinsine, hem deney çözeltisinin bileşimine bağlıdır. Kimyasal (Adams ve ark., 1958; Eggretsen ve Weiss, 1956; Fagan ve ark. 1985; Hershenhard ve ark. 1984; Kabasakalian ve Mc Glotten, 1958), elektrokimyasal (Ferret ve Philips, 1985; Dermiş ve Biryol, 1990; Özkan S.A. ve ark. 1994) ve hem kimyasal hem de elektrokimyasal (Kolthoff ve Tanaka, 1954; Biryol ve ark. 1989; Özkan ve ark. 1994) ya da mekanik (Yılmaz ve ark 2001; Özkan ve Uslu 2002; Uslu ve Özkan 2002; Demircigil ve ark. 2003; Doğan ve ark. 2004; Uslu ve Özkan 2004; Doğan ve ark 2005a; Doğan ve ark 2005b; Uslu ve ark. 2006; Uslu ve ark., 2008; Altun ve ark., 2009) ön işlemler olabilir.

#### **2.1.8.6. Voltametrیده Kullanılan Uyarma Sinyalleri**

Elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyelde sinyaller uygulanır. Bu uyarma sinyalleri, karakteristik akım cevaplarını oluşturur. Voltametrیده en çok kullanılan dört uyarma sinyalinin şekli, şekil 2.14.' de verilmiştir. Bunlar; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır. (Skoog ve ark, 1998)

| <u>İsim</u>           | <u>Dalga Şekli</u>                                                                  | <u>Voltametrinin tipi</u>                 |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| (a) Doğrusal taramalı |    | POLAROGRAFI<br>HİDRODİNAMİK<br>VOLTAMETRİ |
| (b) Diferansiyel puls |    | DİFERANSİYEL PULS<br>POLAROGRAFİSİ        |
| (c) Kare dalga        |   | KARE DALGA<br>VOLTAMETRİSİ                |
| (d) Üçgen             |  | DÖNÜŞÜMLÜ<br>VOLTAMETRİ                   |

**Şekil 2.14.** Voltametrizde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri  
(Karadeniz, 2004)



#### 2.1.8.6.1. Doğrusal Taramalı Voltametri

Doğrusal taramalı voltamogramlar, genelde ‘voltametrik dalga’ adı verilen sigmoidal şekilli (S şeklinde) eğrilerdir. Şekil 2.16. Dik bir artıştan sonra gelen sabit akıma difüzyon kontrollü akım ya da sınır akımı ( $i_s$ ) adı verilir. Çünkü bu akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları analizlenecek maddenin derişimi ile doğru orantılı olup

$$i_s = k C_A$$

eşitliği ile verilir. Burada,  $C_A$  analit derişimi,  $k$  ise bir sabittir. Nicel doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır. Difüzyon tabakasını aşırı basitleştiren varsayımlara dayanarak türetilmiş bu eşitlik; hareketli ve durgun tabakalar arasındaki arayüzeyin, konveksiyonla taşınmanın son bulduğu, difüzyonla taşınmanın başladığı keskin bir kenar olduğu varsayımı temeline dayandırılmıştır.

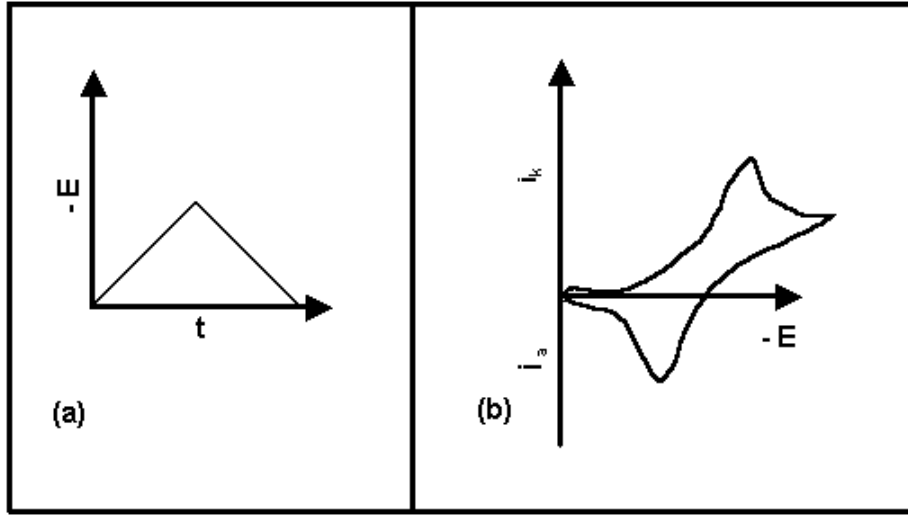
Yarı-dalga gerilimi, akımın sınır akımının yarısına eşit olduğu gerilime denir ve  $E_{1/2}$  ile gösterilir. Yarı-dalga gerilimi, yarı-tepkimenin standart gerilimi ile yakından ilgili olmakla birlikte ona eşit değildir.

#### 2.1.8.6.2. Dönüşümlü Voltametri

Normal polarografide potansiyel tarama hızı damla ömrüne göre çok yavaştır. Örneğin 5 mV/s tarama hızında damla süresi 1 s ise bir damla ömrü esnasında potansiyeldeki değişme 5 mV kadardır. Tarama hızı bir damla ömrü için 100-200 mV/s civarında tutulursa ve belli bir potansiyelden sonra ilk taramanın tersi yönde tarama yapılırsa bu voltametrik metot dönüşümlü voltametri (DV) adını alır.

İlk olarak Nicholson ve Shain (1964) tarafından geliştirilen dönüşümlü (sıklık) voltametri elektrokimyasal olayların incelenmesinde kullanılan önemli yöntemlerden

birisidir (Nicholson ve Shain, 1964). Bu teknikle, gerilimin bir fonksiyonu olarak akım ölçülür. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli bir aralıkta akımdaki değişim grafiğe geçirilerek Dönüşümlü Voltamogram elde edilir. Yöntemde, karıştırılmayan bir çözeltideki elektrodun akım cevabı, üçgen şekilli dalga potansiyeli ile uyarılır. Bu uygulamada, potansiyel iki değer arasında devreder. Önce bir maksimuma doğru doğrusal olarak artar ve sonra aynı eğimle orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Bu işlem, akım zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilirken defalarca tekrarlanabilir. Bir tam devir 100 ve/veya daha fazla saniye sürebilir ve/veya 1 saniyeden daha az sürede de tamamlanabilir. İleri ve geri yöndeki gerilim hızları aynı tutulabildiği gibi farklı tarama hızları da kullanılabilir.



**Şekil 2.15.** (a) Dönüşümlü voltametrde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği ; (b) Dönüşümlü voltametrde elde edilen akım-gerilim eğrisi.

Doğru akımdaki gibi kapasitif akımın en küçük olduğu bölgede çalışılır. Duyarlılık  $10^{-5}$  M ile sınırlıdır. Dönüşümlü voltametri, miktar tayinine dayalı bir yöntem değildir ama analizlenecek maddenin hangi potansiyelde nasıl davrandığı hakkında bilgi verir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda o maddenin hangi potansiyelde optimum cevabı verebileceğini gösterir.

Dönüşümlü voltamogramların şekli ve yapısında seçilen potansiyel aralığının yanısıra, seçilen tarama hızının, kaç defa tarama yapıldığının da etkisi vardır. Tarama hızı pratikte 10 mV/s'den birkaç yüz V/s ye kadar değiştirilebilir. Çok yüksek tarama hızlarında (birkaç bin V/s) çift tabaka yüklenmesi ve IR problemleri ortaya çıkar. Ancak mikroelettrot kullanıldığı zaman bu tür problemler minimuma indirilir.

DV'de tarama hızı değiştirilerek pik yüksekliklerinin tarama hızı ile değişmesinden adsorpsiyon, difüzyon ve elektron aktarım reaksiyonuna eşlik eden kimyasal reaksiyon olaylarının varlığı ve tabiatı belirlenebilir. Ayrıca ileri ve geri tarama piklerinden elettrot reaksiyon mekanizması hakkında fikir edinilebildiği gibi kinetik veriler de bulunabilir. Bu özelliklerinden dolayı dönüşümlü voltametri ilk defa çalışılan bir sistem için tercih edilen bir teknik olmuştur.

### **Voltametrimin Kuramı:**

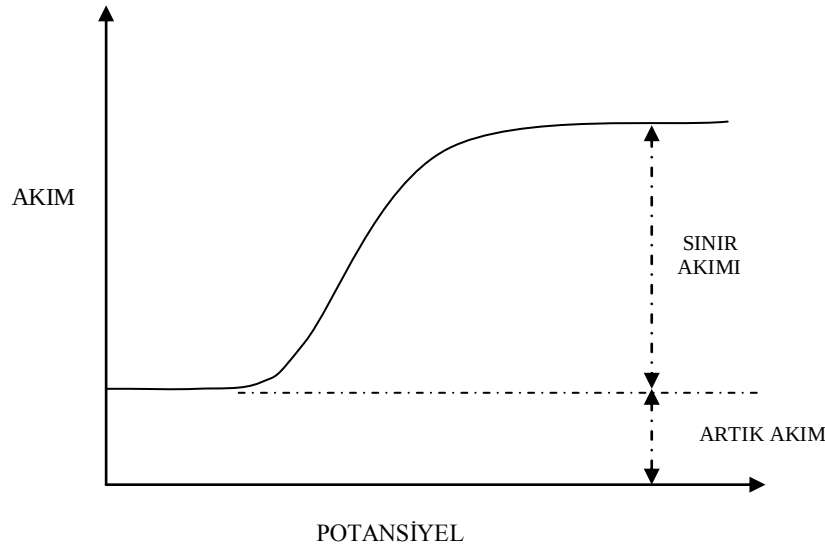
Bu yöntemde genel prensip; elektrokimyasal hücrede bulunan, polarize olabilen bir çalışma elettrotu ile karşılaştırma elettrotu arasında değeri zamanla değiştirilen gerilim uyarma sinyali uygulanarak üç elettrotlu hücrelerde çalışma elettrotu ile yardımcı elettrot, iki elettrotlu hücrelerde ise çalışma elettrotu ile karşılaştırma elettrotu arasındaki akımın ölçülmesine dayanır. (Yıldız ve Genç, 1993; Bond, 1980). Dengedeki bir elektrokimyasal hücreye dışarıdan denge geriliminden farklı bir gerilim uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır. Bu sırada bir elettrot tepkimesi olur yani akım geçer. Voltametrde, uygulanan ve değeri zamanla değiştirilen gerilime karşı hücreden geçen akım ölçülür. Uygulanan gerilimin, ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine ise voltamogram denir.

Analizi yapılacak çözelti içindeki elektroaktif maddelerin yükseltgenebilme, indirgenebilme özelliklerine göre elektroliz tepkimesi, çalışma elettrotuna ait gerilim aralığının belirli bir noktasında olur. Bu yüzden voltamogram, çözeltideki elektroaktif maddelerin nitel ve nicel özelliklerini yansıtır.

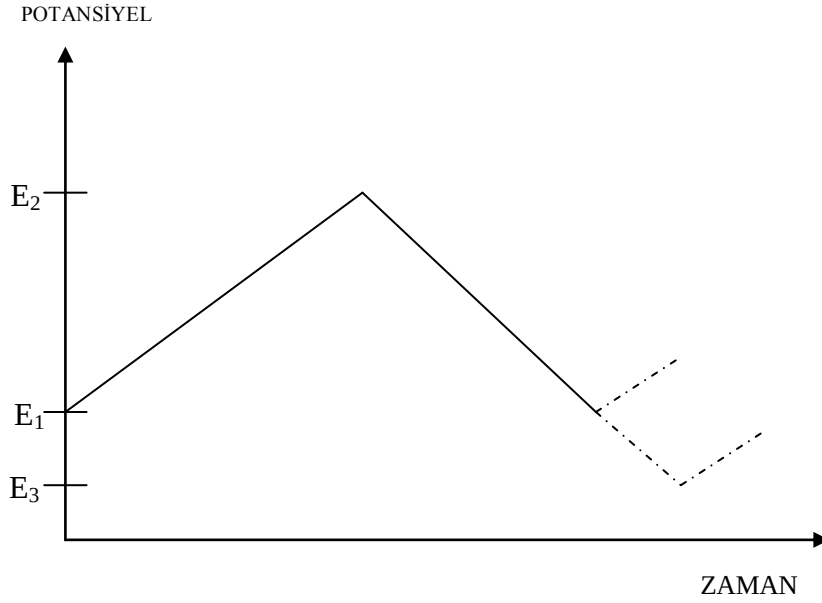
Voltametrde en çok kullanılan gerilim uyarma sinyallerinden biri, elektrokimyasal hücreye uygulanan gerilimin zamanın bir fonksiyonu olarak doğrusal olarak arttığı Şekil 2.16' da gösterilen bir doğrusal tarama olup, hücrede oluşan akım uygulanan gerilimin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Bu yönteme doğrusal taramalı voltametri (Yıldız ve Genç, 1993) denir.

Potansiyel değişme hızının  $100 \text{ mVs}^{-1}$ 'den daha büyük olduğu yöntem, hızlı tarama yöntemi olarak adlandırılır. Bu yöntemle, yük geçişi reaksiyonunda yüzeyde oluşan adsorblanmış ara ürün belirlenir. Bütün bunlara ilaveten literatürlerde yavaş ve hızlı tarama yöntemleri için değişik hız aralıklarına rastlanmaktadır. (Ross 1977)

Potansiyel tarama tekniğindeki potansiyel-zaman ilişkisi Şekil 2.17'deki gibidir. Burada potansiyel  $E_1$  ve  $E_2$  sınırları arasında belirli, bir tarama hızıyla ( $\text{mVs}^{-1}$ ) değiştirilir.



**Şekil 2.16.** Yavaş potansiyel değişiminde katı elektrot voltamogram



**Şekil 2.17.** Potansiyel tarama tekniğinde elde edilen potansiyel – zaman eğrisi

En yaygın olarak kullanılan yöntemler dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametridir. Her iki yöntem de başlangıçta aynıdır. Yalnız dönüşümlü voltametrde  $E_2$  potansiyeline erişilince  $E_1$  potansiyeline geri dönülür ya potansiyel bir süre burada tutulur sonra  $E_2$  potansiyeline geri dönülür veya  $E_3$  potansiyeline doğru devam edilir. Dönüşümlü voltametrde genellikle gidiş ve dönüş hızı aynıdır. Doğrusal taramalı voltametrde ise sadece belli bir hızda  $E_1$  potansiyelinden  $E_2$  potansiyeline ulaşılır. Hem dönüşümlü voltametrde, hem de doğrusal taramalı voltametrde akım, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Genel olarak bu deneylerde kullanılan hız birkaç  $\text{mVs}^{-1}$ 'den birkaç yüz bin  $\text{mVs}^{-1}$ 'ye kadar değişir (Şekil 2.18). Birkaç yüz bin  $\text{mVs}^{-1}$  hızları çok büyük olduğu için deneysel güçlüklerle sahiptir. Çift tabaka yüklenmesi ve IR düşüşü etkileri çok büyük olur. Yakın zamanlarda, hızlı tarama yapıldığında iyi sonuçlar alabilmek için mikroelettrotların kullanılması gerektiği bulunmuştur. Böylece yük akımı ve direnç küçültülmüş olur. Voltamogramların kaydı için bugün XY kaydedicisi veya osiloskoplar yerine bilgisayar kullanılmaktadır.

Dönüşümlü voltametri bir sistemi ilk kez incelemek amacıyla kullanılıyorsa önce kalitatif, sonra yarı kalitatif ve en son kantitatif deneyler yapılabilir.

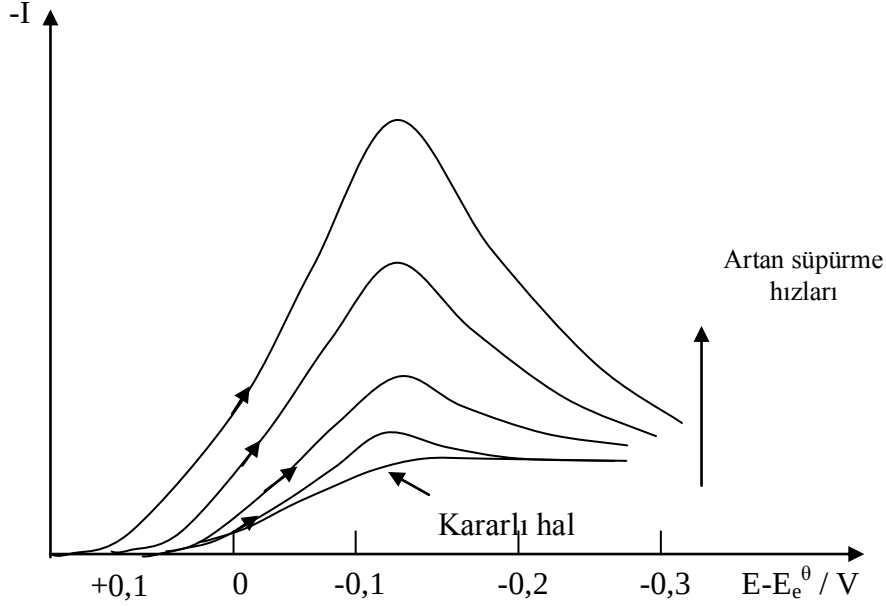
Gerilimin doğrusal taramada olduğu gibi sabit bir hızla bir değere kadar çıkarılmasından sonra tekrar aynı hızla ilk değere döndürülmesi ile dönüşümlü voltamogramlar elde edilir. Bu sistemlere Şekil 2.17'deki potansiyelin ikizkenar üçgen şeklindeki gerilimi uygulanırsa dönüşümlü voltamogramlar elde edilir (Şekil 2.19 ve 2.20). İleri yöndeki gerilim taraması sırasında bir yükseltgenme olmuşsa, gerilim taraması tersine çevrildiğinde yükseltgenme sırasında oluşan ürünün elektrotta yeniden indirgenmesi ile bu yönde de bir pik gözlenebilir. Geri dönüşümlü bir elektrokimyasal tepkimede anodik pik gerilimi ( $E_{pa}$ ) ile katodik pik gerilimi ( $E_{pk}$ ) arasında en fazla  $59/n$  mV'luk bir gerilim farkı olmalı ve aynı zamanda anodik pik akımı ( $I_{pa}$ ) katodik pik akımı ( $I_{pk}$ ) birbirine eşit olmalıdır. Elektrot tepkimesinin geri dönüşümlülüğü azaldıkça anodik ve katodik pikler birbirinden daha farklı gerilimlerde ve daha yayvan olarak gözlenir. Tam geri dönüşümsüz bir elektrot tepkimesinde ise ürünün çok hızlı bir şekilde tüketilmesinden dolayı geri pik tamamen kaybolur.

Kalitatif analiz için, değişik hızlarda eğriler çizdirilir. Değişik potansiyel aralıkları seçilir. Genel olarak pik veya dalga gözlenir ve bunların hızla nasıl değiştiği incelenir. Bu eğriler indirgenme ve yükseltgenme pik akımı ve potansiyelleri gibi elektrokimyasal parametrelerin yanında reaksiyon hızı, aktarılan elektron sayıları, derişim gibi parametrelerin bulunmasında da kullanılır. İlk ve son eğrilerin arasındaki değişimin incelenmesinden pik akımlarının hıza bağıllığı ölçülür. Buradan adsorbsiyon, difüzyon, eşleşmiş kimyasal reaksiyonlar hakkında fikir edinilebilir. Ara vermeksizin üst üste çizdirilen dönüşümlü voltametrde ilk ve son voltamogramlar arasındaki fark mekanizma hakkında bilgi verir. Mekanizma tayininde ayrıca döner halka disk elektrot ve sabit potansiyel kulonometrisi ve çeşitli spektroskopik yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Kinetik amaçla yapılan çalışmalarda ise ilk taramadaki eğriler kullanılır.

Dönüşümlü voltametrde anodik ve katodik tarama hızları genel olarak aynı seçilir. Hızlı kimyasal reaksiyonlar için ise, değişik hızlarda çalışılmalıdır.

### Geri Dönüşümlü Sistemler :

$O + n e \rightleftharpoons$  gibi bir geri dönüşümlü olay için çok yavaş bir tarama uygulandığı zaman, potansiyel değişme hızı arttırıldıkça eğri değişip pik şeklini alır.



**Şekil 2.18.** Farklı potansiyel tarama hızlarında elde edilen akım – potansiyel eğrisi.

O maddesinin derişim profili potansiyelin fonksiyonu olarak incelenirse, eğrinin neden sigmoidal veya pik şeklinde görüldüğü anlaşılabilir. Kararlı hal şartlarında elektrottan belirli uzaklıktaki derişimler doğal konveksiyonla sabit tutulmaktadır. Elektroda bitişik tabakada ise (Nernst Difüzyon Tabakası) derişim gradienti doğrusaldır. Nernst denkleminde potansiyelin negatif olabilmesi için O maddesinin yüzey derişiminin az olması gerekir.

$$\left[ E = E_o + \frac{RT}{nF} + \ln \frac{a_o}{aR} \right]$$

Burada  $a_o$  ve  $aR$ , O ve R maddelerinin yüzey derişimlerini göstermektedir.

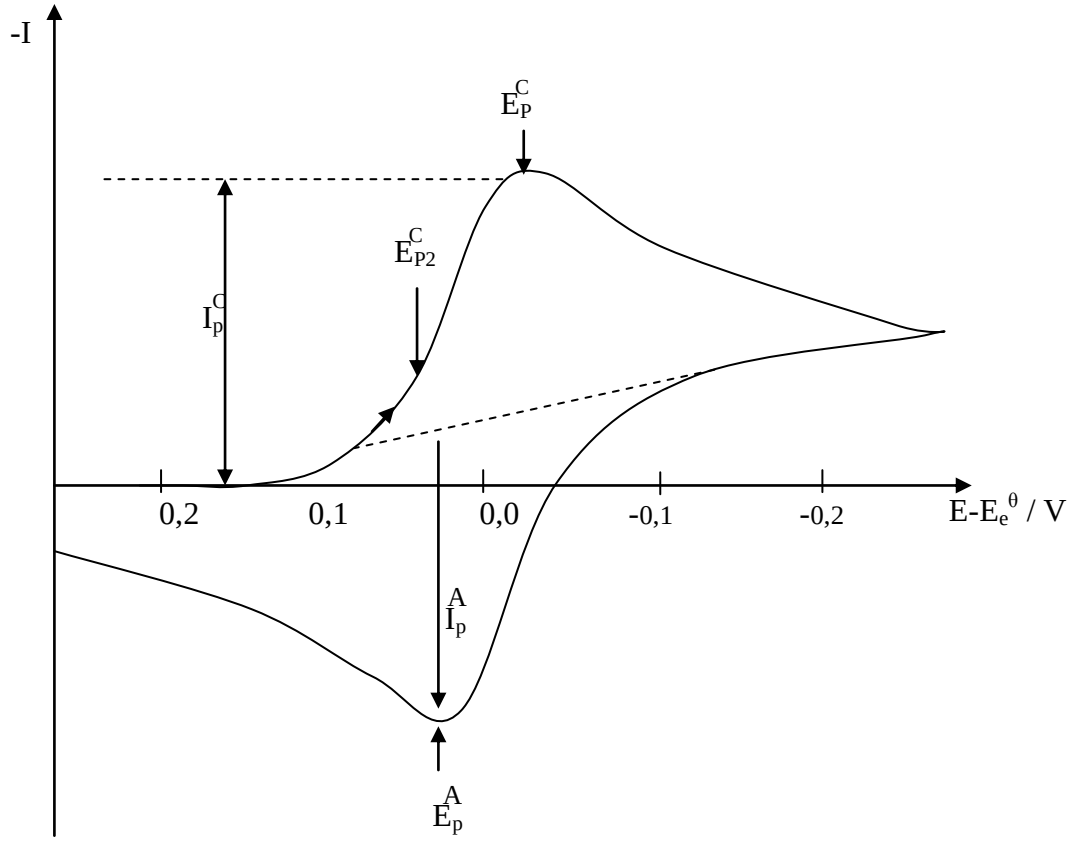
Bu durumda derişim gradienti arttıkça akım artacaktır. Çünkü difüzyon hızı artar. Sonunda yüzey derişimi sifıra yaklaşır ve derişim profili artık değişmez. Bu noktada akım limit değerine ulaşmıştır. Tarama hızı arttıkça difüzyon tabakası denge durumuna ulaşmak için yeterli zaman bulamaz ve çözeltiye kadar ulaşamaz. Derişim profili de artık doğrusal değildir. Potansiyel değeri O maddesinin indirgenebileceği değere ulaştığı zaman O'nun yüzey derişimi çözelti derişiminden Nernst denkleminin gerektirdiğı değere düşer (Şekil 2.18). Sonuçta bununla orantılı olan bir akım devreden geçer. Bu gradient bir defa kurulunca sabit kalmaz, difüzyon nedeniyle düşer. Bu arada elektrot potansiyeli de değişir. Bu yüzden O maddesinin yüzey derişimi düşer (b ve c eğrileri) Sonuçta bu değer sifıra iner (e eğrisi). Bu eğrilere göre herhangi bir potansiyelde yüzeydeki derişim gradienti kararlı halden daha büyük olduğı zaman akım da büyük olur. Yüzey derişimi sifıra erişince derişim gradienti artık azalmaya başlar. Bunun sonucunda da eğri pik şeklini alır. Bu yöntemde hız arttıkça akım da artmaktadır. (Greef ve ark. 1990)

Potansiyel ters döndüğü zaman yavaş tarama hızlarında (kararlı hale benzer değerlerde) akım aynı yolu izleyerek geri döner. Daha hızlı taramalarda ise gidiş dönüş eğrileri aynı değildir. Çünkü tarama geri çevrildiğı zaman elektrot yüzeyinde ve yakınında R maddesinin önemli derişimi vardır ve R maddesi aynı zamanda oluşmaya da devam eder (denge potansiyeline ulaşılıncaya kadar). E denge potansiyelinden sonra ters akım geçmeye başlar. Elektrot potansiyeli değistikçe R maddesinin yüzey derişimi de sifıra erişir ve oksidasyon dalındaki gibi bir pik oluşur. Böyle bir dönüşümlü voltamogram Şekil 2.18'de görölmektedir.

Bu eğride ölçülebilen toplam dört parametre vardır:

- Katodik pik potansiyeli ( $E_{pk}$ )
- Anodik pik potansiyeli ( $E_{pa}$ )
- Katodik pik akımı ( $I_{pk}$ )
- Anodik pik akımı ( $I_{pa}$ )





**Şekil 2.19.** Geri dönüşümlü bir olayın dönüşümlü voltamogramı

Bu tip eğrilerde olaydaki yük değişikliği katodik olaydakine göre daha küçüktür. Çünkü R maddesinin çoğu elektrottan difüzlenmiştir. Bu yüzden yeniden yükseltgenemez (Greef ve ark. 1990). Geri dönüşümlü bir dönüşümlü voltamogramın şeklini veren matematiksel denklemi ifade etmek için;

( $O + ne^- \rightleftharpoons R$ ) olayı ile ilgili Fick'in ikinci yasasını veren denklem uygun sınır koşulları için çözülür ve

$$I_{p_c} = -0,4463 nF \left[ \frac{nF}{RT} \right]^{1/2} \cdot Co^{\infty} \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad (2.1) \quad \text{denklemini elde edilir.}$$

25°C için denklem düzenlenirse;

$$I_{p_c} = - (2.69 \times 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot Co^{\infty} \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad \text{denklemini elde edilir.}$$

$n$  : Reaksiyonda alınıp verilen elektron sayısı

$D$ : Difüzyon katsayısı

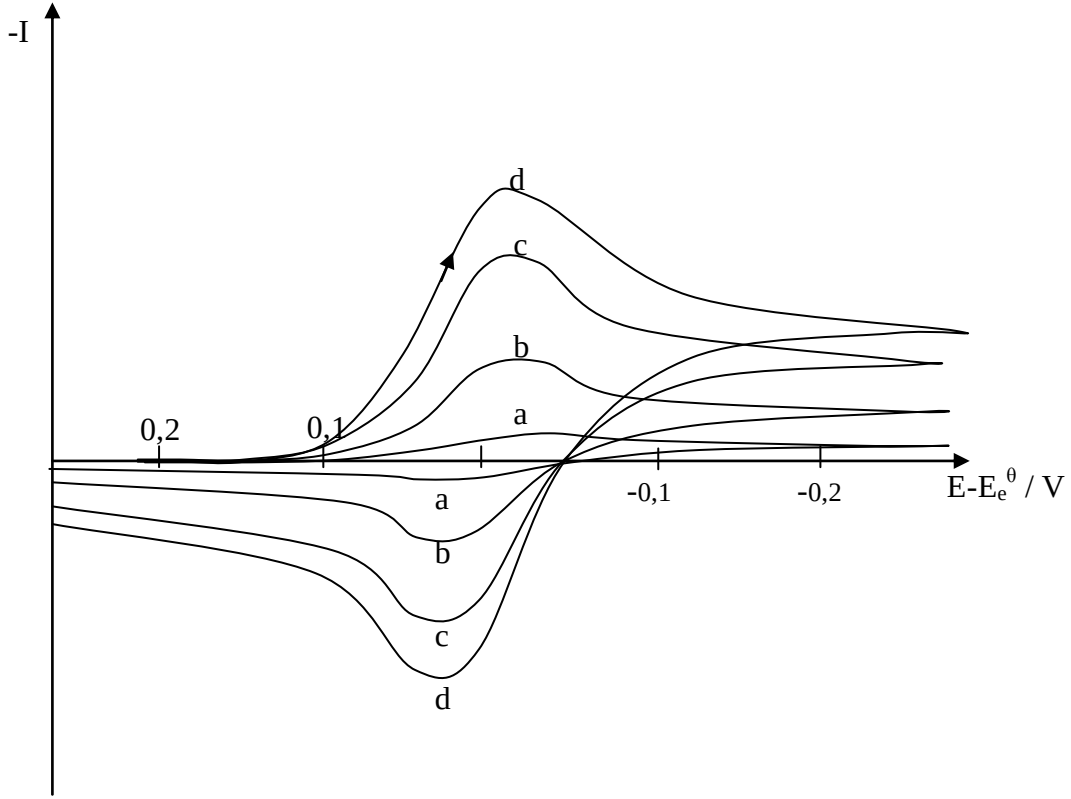
$Co^{\infty}$  : O maddesinin çözelti içindeki derişimi

$v$  : Potansiyel değışme hızı'dır.

Bu denkleme Randles – Sevcik denklemi de denir. Bu denklemden de anlaşılabilceğı gibi pik akımı hızın kareköküyle doğru orantılıdır.

Dönüşümlü voltamogramın hızla değışimi Şekil 2.20'de görölmektedir.  $I_p - v^{1/2}$  ifadesinin doğrusal oluşu olayın difüzyon kontrollü olduğunu gösterir. Çünkü Randles – Sevcik denklemi olayın difüzyon kontrollü olduğu hal için çıkarılmıştır.

Geri dönüşümlü bir voltamogram ancak hem O hem de R maddeleri kararlıysa geçerlidir ve elektron transferi hızlı ise söz konusudur. Bu durumda bütün hızlarda ve potansiyellerde elektron transferi yüzeyde denge halindedir. Yani yüzey derişimi Nernst denkleminde uymaktadır.



**Şekil 2.20.** Geri dönüşümlü bir olayın hızla değişimini gösteren dönüşümlü voltamogram.

Bir sistemin geri dönüşümlü olup olmadığı;

$$1. \Delta E_p = E_p^A - E_p^C = 59 / n \text{ mV}$$

$$2. [ E_p - E_{p/2} ] = 59 / n \text{ mV}$$

$$3. [ I_p^A / I_p^C ] = 1$$

$$4. I_p \propto v^{1/2}$$

$E_p$ 'nin tarama hızı ile değişmemesinden

$E_p$ 'nin üzerindeki değerlerde,  $1 / \sqrt{I}$  'nin zamanla orantılı olmasından anlaşılır.

### Geri Dönüşümsüz Sistemler:

Geri dönüşümlü sistemlerde elektron transfer hızı bütün potansiyellerde kütle taşıma hızından önemli ölçüde büyüktür. Bu yüzden de Nernst denklemi elektrot yüzeyinde daima geçerlidir. Eğer elektron transfer hızı yavaşsa bu durumda yüzeydeki denge sağlanamaz ve voltamogram değişir. Bu halde düşük tarama hızlarında elektron transfer hızı kütle transfer hızından fazladır. Voltamogram geri dönüşümlüdür. Tarama hızı arttığı zaman kütle taşıma hızı artar ve elektron transfer hızıyla karşılaştırılabilir büyüklüğe gelir. Bunun en güzel gözlenen etkisi pikler arasındaki ayrılığın büyümesidir. Bu tip verileri incelemek için yararlı bir yol, akımı difüzyon hızındaki değişimin kareköküne göre uyarlamaktır. Yani akım yerine  $I / v^{1/2}$ , birim hızdaki akım – potansiyel eğrisi çizmektir. Şekil 2.21’ de geri dönüşümsüz bir sistem için çeşitli hızlarda üstüste alınmış voltamogramlar görülmektedir. Burada anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki farkın geri dönüşümlü sistemlerden fazla olduğu ve pik yüksekliklerinin geri dönüşümlü sistemlerden daha az olduğu görülmektedir.

Geri dönüşümsüz sistemler için kullanılan bağıntı :

$$I_p = - (2.99 \times 10^5) \cdot n \cdot (\alpha_c n_\alpha)^{1/2} \cdot C_o \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad (2.2.)$$

$n$  : Reaksiyonda alınıp verilen elektron sayısı

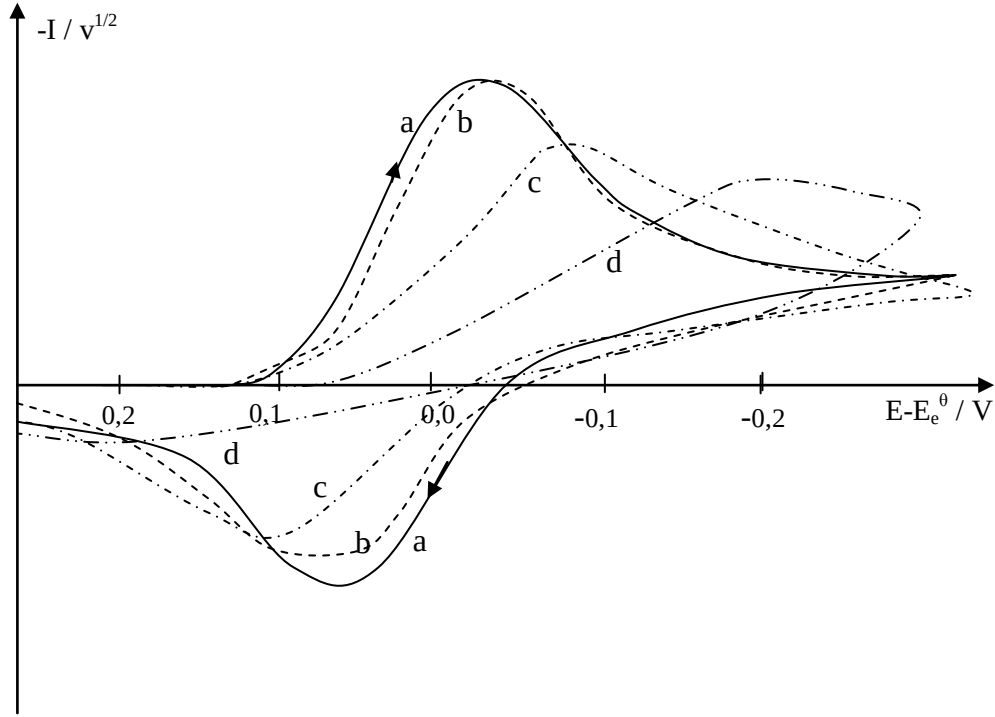
$n_\alpha$ : Hız tayin edici basamağa kadar alınıp verilen elektron sayısı

$\alpha_c$ : Transfer katsayısı

$D$ : Difüzyon katsayısı

$C_o$ : O maddesinin çözelti içindeki derişimi

$v$  : Potansiyel değişme hızıdır



**Şekil 2.21.** Geri dönüşümsüz bir sistem için çeşitli hızlarda üst üste kaydedilmiş dönüşümlü voltamogram

Geri dönüşümsüz bir reaksiyon için belirleyici şartlar da şunlardır:

1. Ters pik yoktur.
2.  $I_p \propto v^{1/2}$  ile orantılıdır.
3.  $E_{p_c} - 30 / \alpha_c n \alpha$  mV kadar kayar (hızdaki her 10 kat artış için).
4.  $|E_p - E_{p/2}| = 48 / \alpha_c n \alpha$  mV'dur.

Düşük tarama hızlarında geri dönüşümlü olan sistem, tarama hızı arttığında geri dönüşümsüz hale gelir. Bu arada sistem yarı geri dönüşümlü bir halden geçmiştir. Bu geçiş elektron transfer hızı kütle transfer hızına göre yavaşladığında, yani elektrot yüzeyinde Nernst denklemi geçersiz hale geldiğinde olur. Bütün bu tarama çeşitleri sonunda elde edilen bu eğrilere voltamogram denilmektedir. Voltamogramlar analizi

yapılacak çözelti içindeki elektroaktif maddelerin (elektrot tepkimesine giren madde) sürekli değişen potansiyelde gösterdikleri davranışların kaydedilmiş şeklidir. Potansiyel taraması, referans elektroda karşı çalışma elektrodunun potansiyelinin değiştirilmesi ile gerçekleştirilecek akım – potansiyel eğrileri, yani voltamogramlar elde edilir. Her madde için karakteristik olan bu eğriler elektroaktif maddelerin nitel ve nicel özelliklerini yansıtır.

Eğer dönüşümlü voltamogramın şekli teoride beklenenden farklı çıkıyorsa bu bir yüzey olayının varlığını gösterir. Örneğin faz oluşması veya uzaklaşması reaksiyona giren maddenin veya ürünün adsorbsiyonu gibi. Değişik adsorbsiyon izotermeleri vardır (Greef ve ark. 1990). Henry, Virial, Langmuir, Frumkin ve Temkin gibi. Örnek olarak Langmuir izotermine uyan bir reaksiyona giren maddenin adsorbsiyonu durumunda;

$$|I_p^c| = \frac{n^2 f^2 \tau^o}{4RT} v \quad (2.3)$$

$\Gamma^o$  : O maddesinin potansiyel taraması başlamadan önceki yüzey fazlası

$v$  : potansiyel tarama hızı

$n$  : transfer edilen elektron sayısı

$F$  : Faraday sabiti

$R$  : gaz sabiti

$T$  : mutlak sıcaklık

denklemleri ile verilen bir pik akımı gözlenir. Görüldüğü gibi adsorbsiyon kontrollü pik akımı tarama hızıyla doğru orantılıdır.  $\log I_p^c - \log v$  eğrisinin eğiminin  $\frac{1}{2}$  çıkması olayın difüzyon kontrollü, 1 çıkması ise adsorbsiyon kontrollü olduğunu gösterir. (Denklem 2.1 ; 2.2 ; 2.3)

### Kararlı Hal Kinetiğinin İncelenmesi:

Kararlı halde kinetik verilerin incelenmesi için Tafel denkleminde yararlanılır. (Greef ve ark. 1990) Tafel denklemi katodik bir reaksiyon için;

$$\text{Log } |I_c| = \text{Log } I_o - \frac{\alpha_c n F \eta}{2.3 RT} \quad (2.4)$$

Anodik bir reaksiyon için ise;

$$\text{Log } |I_a| = \text{Log } I_o + \frac{\alpha_a n F \eta}{2.3 RT} \quad (2.5)$$

Şeklinde verilir. Burada,

I : Akım yoğunluğu

$I_o$ : Yük değişimi akım yoğunluğu. Bu değer dengedeki bir sistemin, yani dış çevreden akım geçmezken ileri ve geri reaksiyonların hızının ölçüsüdür.

$\alpha_a$ : Anodik transfer katsayısı

$\alpha_c$ : Katodik transfer katsayısı

n : Alınıp verilen elektron sayısı

$\eta$  : Aşırı gerilim [ $E - E^0 = \eta$ ]

F : Faraday sabiti

R : Gaz sabiti

T : Mutlak sıcaklık

$\alpha$  transfer katsayısı tek basamaklı basit reaksiyonlarda  $\beta$  sembolü ile gösterilir ve bu katsayı elektrot – elektrolit ara yüzeyinde yük transferi reaksiyonunun bir

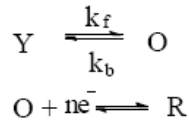
karakteristiğini verir. Bu kavram yüzeyin denge potansiyelinden ayrılmasıyla oluşan elektriksel enerjinin ne kadarının elektrokimyasal reaksiyonun hızını etkilediğini gösterir. Basit ve tek elektronlu reaksiyonlarda bu değer 0.5 dolayındadır (Bocris ve Reddy,1970).

### **Elektrot mekanizmasının DV ile incelenmesi**

Elektron transferine eşlik eden kimyasal reaksiyonların varlığının tespitinde DV çok önemli bir metottur. Genellikle ilk mekanizma araştırmaları DV ile yapılır. DV ile mekanizma çalışmalarında mümkün olduğu kadar geniş potansiyel tarama hızı aralıklarında çalışılır.

### ***CE mekanizması***

Bir elektrot reaksiyonunda elektron aktarım basamağından önce elektroaktif maddenin oluşmasına yol açan bir kimyasal reaksiyonun bulunması CE mekanizması olarak adlandırılır.



Böyle bir mekanizmada C basamağının hızı çok yavaş ve E basamağı tersinir ise DV de pik gözlenmez. Bunun yerine kararlı haldeki gibi DC polarogramına benzer bir voltamogram gözlenir. Burada gözlenen sınır akımından, kimyasal reaksiyonun hız sabitleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanır.



$$I_l = -nFC_y D^{1/2} K(k_f + k_b)^{1/2}$$

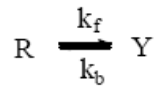
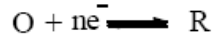
Bu eşitlikte K, kimyasal basamağın denge sabitidir. Kimyasal reaksiyonun hızının çok yüksek olması durumunda DV voltamogramı, normal difüzyon kontrollü durum ile aynıdır.

Bir elektrot reaksiyonu CE mekanizmasına göre yürüyorsa aşağıdaki kriterler geçerli olur.

1. Tarama hızı arttıkça  $I_p^k / v^{1/2}$  azalır.
2.  $I_p^a / I_p^k$  oranı  $v$  ile artar ve bu oran  $\geq 1$  dir.

### ***EC mekanizması***

EC mekanizmasında elektron aktarım basamağını (E) bir kimyasal basamak (C) takip eder.



Bu tür bir mekanizmada E basamağının tamamen tersinmez olması durumunda kimyasal basamağın voltamogramda hiç bir etkisi bulunmayacağı için kinetik verileri incelenemez. E basamağının tersinir olduğu durumlarda C basamağının hız sabiti büyük ise anodik pik yine gözlenemez. Fakat hız sabiti küçük ise anodik pik gözlenir. EC mekanizmasının tersinirlik kriterleri aşağıdaki gibidir.

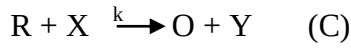
1.  $|I_p^a / I_p^k| < 1$  dir. Ancak  $v$  arttıkça 1'e yaklaşır.
2.  $I_p^k / v^{1/2}$  oranı  $v$  arttıkça çok az da olsa azalır.

3.  $E_p^k$ , tersinir durumdakinden daha pozitifdir.

4. Artan  $v$  ile  $E_p^k$  negatif bölgeye kayar ve saf kinetik bölge için  $v$ 'deki 10 kat artış (reaksiyon birinci dereceden ise)  $30/n$  mV kaymaya neden olur. Reaksiyon ikinci dereceden ise kayma  $19/n$  mV'dur.

### ***EC<sub>katalitik</sub> mekanizması***

Katalitik mekanizma EC mekanizmasının özel bir halidir. Bu mekanizmada reaktif indirgendikten (veya yükseltgendikten) sonra bir kimyasal reaksiyonla tekrar oluşur.

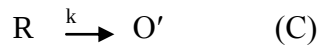
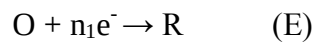


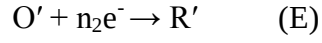
Bu mekanizma tarama hızının azalmasıyla  $I_p^k/v^{1/2}$  oranı artan tek mekanizmadır.

1.  $|I_p^k/v^{1/2}|$  oranı  $v$  arttıkça azalır.
2.  $I_p^k$ , düşük tarama hızlarında sınır değere ulaşabilir.
3.  $I_p^k$  değeri Randles-Sevcik eşitliğinden beklenenden daha büyüktür.
4.  $|I_p^a/I_p^k| < 1$ 'dir.

### ***ECE mekanizması***

Bu mekanizmada ilk indirgenmeyi takiben, oluşan R maddesi bir kimyasal reaksiyonla yine indirgenebilen O' maddesine dönüşür.





Bir elektrot reaksiyonunun ECE mekanizması olabilmesi için aşağıdaki kriterleri taşımaları gerekir.

1.  $\left| I_p^k / v^{1/2} \right|$  değeri tarama hızı ile değişir. Ancak yüksek ve düşük tarama hızlarında limit değere ulaşır ve  $\left| I_p^k / v^{1/2} \right|$  (düşük v)  $>$   $\left| I_p^k / v^{1/2} \right|$  (yüksek v) dir.
2.  $I_p^a / I_p^k$  oranı, artan tarama hızı ile artar ve yüksek tarama hızlarında 1'e yaklaşır.

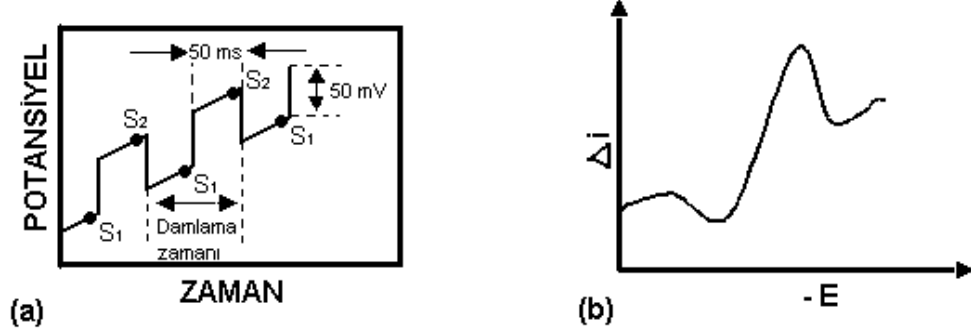
### 2.1.8.6.3. Puls Polarografisi

#### Diferansiyel Puls Polarografisi

Bu teknikle, yarı-dalga potansiyelleri 0,04-0,05 V kadar farklı olan maddeler için bile pik maksimumları elde edilebilmektedir. Diferansiyel puls polarografisi, çok duyarlı bir yöntemdir ve tayin sınırı  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  M arasındadır.

10 mV' luk veya 50 mV' luk bir puls civa damlasına uygulanır. Uygulanan pulsun belli bir zaman öncesi ve sonrasında, puls başına elde edilen akımdaki fark ( $\Delta i$ ), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir.

Gözlenen diferansiyel eğri pik şeklinde olup, yüksekliği konsantrasyonla doğru orantılıdır.



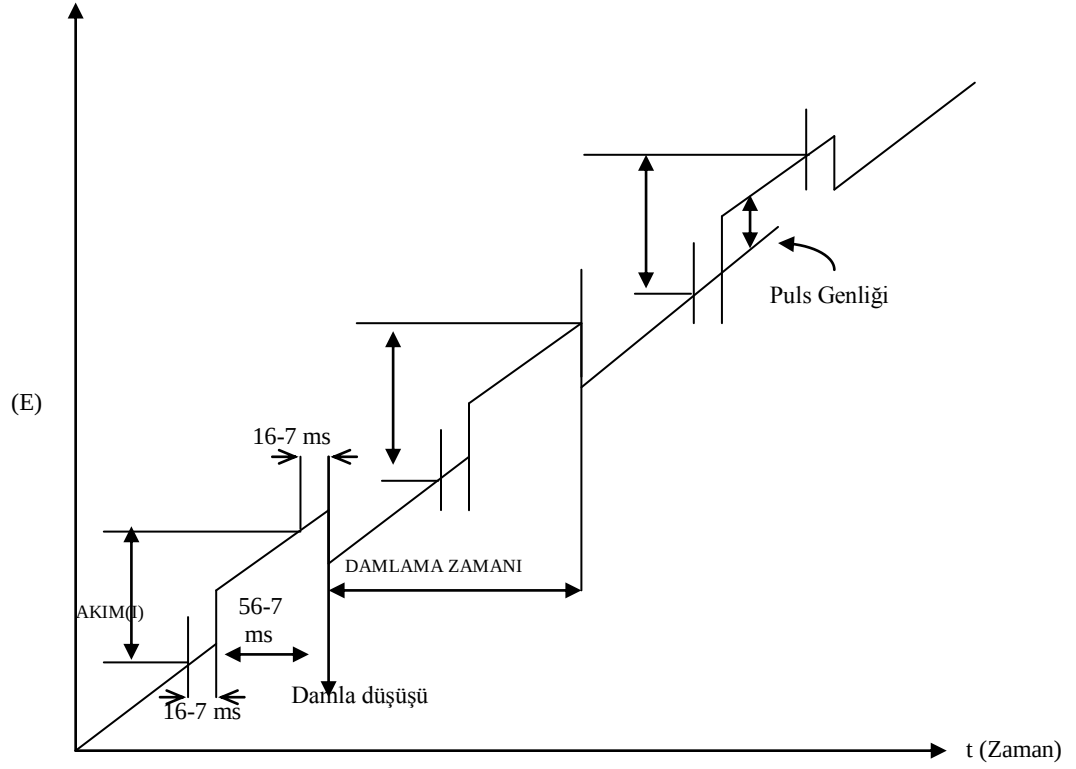
**Şekil 2.22.** Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri; (a) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali; (b) Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram. (Karadeniz, 2004)

Faradayik akımın yüksek, faradayik olmayan yükleme akımının ise düşük değerde olması duyarlılığın artmasıyla açıklanabilir. Örneğin potansiyel aniden 50 mV artırıldığında, elektrodu çevreleyen yüzey tabakasında, eğer elektroaktif bir tür varsa, analit konsantrasyonunu yeni potansiyel tarafından istenen seviyeye düşürecek bir akım

artışı gözlenir. Ancak bu potansiyel için gerekli olan denge konsantrasyonuna erişilince, akım difüzyonu karşılayacak bir seviyeye düşer ki buna difüzyon kontrollü akım denir. Puls polarografisinde akım ölçümü, bu akım artışı tamamen sona ermeden önce yapılır. Toplam akım, difüzyon akımından büyüktür. Damla değiştiğinde, çözelti yeniden analizlenecek madde yönünden homojen hale gelmektedir.

Gerilim pulsu ilk uygulandığı zaman damla üzerinde yük artışı nedeniyle faradayik olmayan akımda da bir dalgalanma olur. Bu akım zamanla azalır ve yüzey alanının çok az değiştiği damla ömrünün sonuna doğru sıfıra yaklaşır. Dolayısıyla akımı bu anda ölçmek suretiyle faradayik olmayan artık akım büyük oranda azaltılır ve sinyal / gürültü oranı artar. Bunun sonucunda duyarlılık da artar.

Puls akımının ölçüldüğü referans düzey, puls uygulamasından önceki akımdır. Pulsun başlangıcından akımın ölçülmesine kadar geçen süre (örneğin 50 msn) içerisinde yük akımı çok küçük bir değere düşer. Kalan faradaik akım kısa bir zaman periyoduna entegre edilerek ölçülür ve fark doğru akım potansiyeline karşı grafiğe alınır. Puls uygulama süresi ( $\approx 50$  ms) hızlı dc polarografisi veya voltametriye eşdeğer olduğundan puls yöntemleri analitik amaçlarla kullanıldığında elektrot kinetiğine kuvvetle bağlı olması beklenmez. Sonuç olarak puls polarografisi elektrokimyasal olarak geri dönüşümsüz olan sistemler için de yüksek bir duyarlılığa sahiptir (Bond, 1980 ; Greef ve ark. 1990). Diferansiyel puls polarografisinde potansiyel-zaman profili Şekil 2.23'da gösterilmiştir.



**Şekil 2.23.** Diferansiyel puls polarografisinde uygulanan potansiyel dalgasının şekli

Normal dc polarografisi için yazılmış olan Heyrovsky – Ilkovich denkleminin diferansiyeli alınıp bundan limit difüzyon akımı değeri çıkarılırsa;

$$\Delta_i = \frac{n^2 F^2}{RT} AC (-\Delta E) \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \frac{P}{(1+P)^2}$$

denklemini elde edilir.

Burada;

$\Delta_i$  : diferansiyel puls akımı

$\Delta E$  : puls genliğidir.

Bu denklem küçük genlikler için geçerlidir. Denklem  $\Delta E$ 'nin bütün değerleri için geçerli olacak şekilde çözülürse:

$$\Delta_i = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \frac{P_A \sigma^2 - P_A}{\sigma + P_A \sigma^2 + P_A + P_A^2 \sigma}$$

denkleminde ulaşılır. Burada;

$$P_A = \exp \frac{nF}{RT} \left[ \frac{E_1 + E_2}{2} - E^{r_{1/2}} \right]$$

$$\sigma = \exp \frac{nF}{RT} \left[ \frac{E_2 + E_1}{2} \right]$$

$E_2 - E_1$  :  $\Delta E$  puls genliği

$E_2$  : Puls uygulandıktan sonraki  $i_2$  akımının ölçüldüğü potansiyel

$E_1$  : Puls uygulanmadan önceki  $i_1$  akımının ölçüldüğü potansiyel

İndirgenme için  $\Delta E < 0$ 'dır.  $\Delta_i$  maksimum olduğunda  $P_A = 1$ 'dir.

$$(\Delta i)_{\max} = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \frac{\sigma - 1}{\sigma + 1} \quad (2.6)$$

Eğer  $-\Delta E / 2 < RT / nF$  ise bu denklem küçük genlik şeklini alır ve

$$(\Delta i)_{\max} = \frac{n^2 F^2}{4RT} AC (-\Delta E) - \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \quad \text{olur.}$$

Eğer  $-\Delta E / 2 \gg RT / nF$  ise  $(\sigma - 1) / (\sigma + 1) = 1$  olur ve  $(\Delta i)_{\max}$  Cottrell eşitliğindeki değerini alır.

$-\Delta E$  değeri büyüdükçe  $(\Delta i)_{\max}$  büyür. Fakat puls genliği büyüdükçe elde edilen pik yayvanlaşır, bu da ayırım gücünü azaltır.

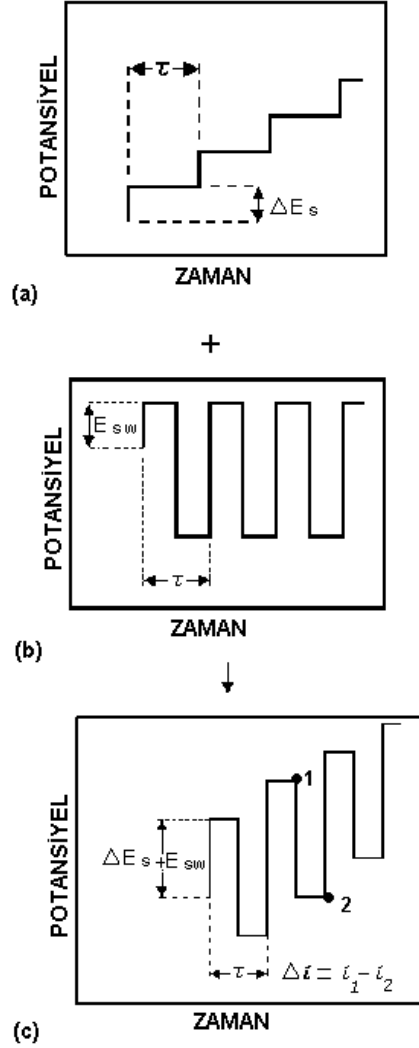
Denklem 2.6'dan anlaşıldığı gibi  $(\Delta i)_{\max}$ , derişimle doğru orantılıdır. Bu geri dönüşümlü olmayan haller için de geçerlidir. Ancak katalitik reaksiyonlarda ve benzeri karmaşık reaksiyonlarda bu doğrusal ilişki bozulur. Yarı geri dönüşümlü veya tamamen geri dönüşümsüz hallerde birim derişim başına düşen  $(\Delta i)_{\max}$  değeri geri dönüşümlü halden daha küçüktür.

Normal puls ve diferansiyel puls polarografisi teorileri damlayan cıva elektrot için geliştirilmiş olmakla birlikte puls deneylerinde zaman eşeli puls süresi ile tayin edildiğinden durağan elektrotlara da bu teori uygulanmaktadır. (Bond,1980)



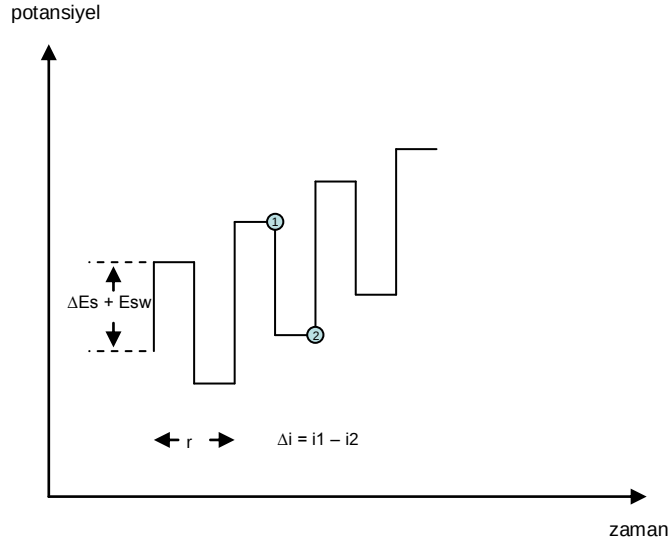
### Kare Dalga Polarografisi ve Voltametrisi:

Son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls polarografi tekniğidir. Bir kare-dalga voltametresinde uyarma sinyalinin oluşumu Şekil 2.24’de görülmektedir.



**Şekil 2.24.** Bir kare-dalga voltametresinde uyarma sinyalinin oluşumu [(a) daki uyarma sinyali (b)'deki puls taraması ile (c)'deki kare-dalga uyarma sinyalini elde edecek şekilde toplanıyor].

Voltamogramın tamamı 10 ms'den daha kısa bir sürede elde edilir. Damlayan cıva elektrodu ile tarama, bir damla ömrünün son birkaç saniyesi içinde, yükleme akımı hemen hemen sabitken gerçekleştirilir. Kare dalga voltametrisi asılı cıva damla elektrodu ve kromatografik dedektörler ile kullanılmaktadır.

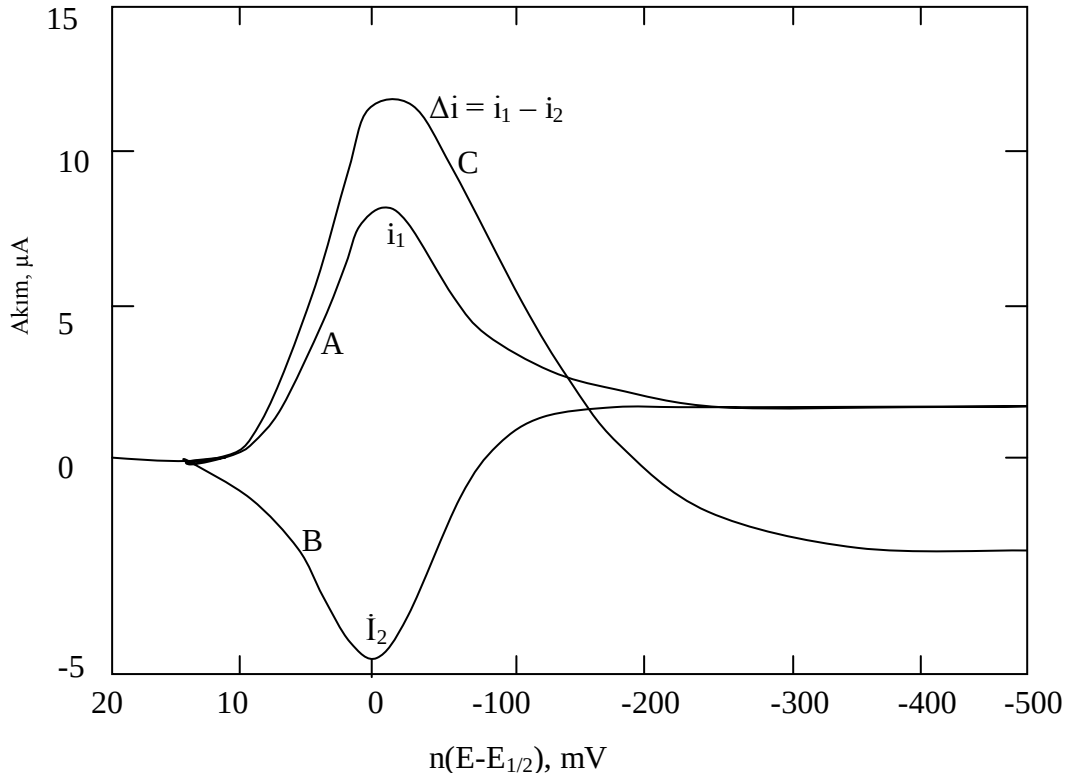


**Şekil 2.25.** Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu. Akım cevabı  $\Delta i$ , 1 potansiyelindeki akımdan 2 potansiyelindeki akımı çıkarılarak bulunur.

Şekil 2.25'de kare dalga voltametrisi yönteminde elde edilen basamaklı sinyal görülmektedir. Basamaklı sinyalde her basamağın boyu ve puls periyodu eşit olup, bu yaklaşık 5 ms civarındadır.

Basamaklı sinyalin potansiyel basamağı ( $\Delta E_s$ ) genellikle 10/n mV, pulsun büyüklüğü ( $2 E_{sw}$ ) ise genelde 50/n mV dur. Sistemin bu şartlar altında çalıştırılması 20 Hz'lik puls frekansına karşılık gelir ve bu durumda 1V'luk bir tarama 0,5 sn'de yapılır. Yöntemde akım pulsun pozitif (1) ve negatif (2) kısmının sonuna doğru iki kez ölçülmekte ve bunların farkı alınmaktadır. Tersinir bir indirgenme reaksiyonunda bir

pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. İleri puls bir katodik akımını ( $i_1$ ) geri puls da bir anodik akımını ( $i_2$ ) oluşturur. Genellikle voltamogramlarda bu akımların farkı ( $\Delta i$ ) grafiğe geçirilmektedir. Bununla ilgili voltamogram Şekil 2.26'da görülmektedir. Bu fark derişimle doğru orantılıdır. Elde edilen pik potansiyeli de dc'deki yarı dalga potansiyeline karşılık gelir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından, analizin kesinliğini arttırmak için birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınmalıdır. Bu yöntemde tayin sınırları  $10^{-7} - 10^{-8}$  M arasındadır. (Hart, 1990 ; Yıldız ve Genç, 1993 ; Skoog ve ark., 2000 ; Smyth ve Vos, 1992)



**Şekil 2.26.** Geri dönüşümlü bir reaksiyon için kare dalga voltamogramı.

A : ileri doğru akım B : geriye akım C : net akım

Bu yöntemde ölçülen difüzyon sınır akımı

$$I_d = \frac{nFAD^{1/2}c}{\pi^{1/2}}(t^1 - t_p)$$

eşitliği ile verilir.

Burada;

$t^1$  : Akım ölçümünün yapıldığı zaman

$t_p$  : Pulsun uygulanmaya başladığı zaman'dır.

Kare dalga yöntemleri temel olarak üç şekilde uygulanır. Bunlar Barker, Osteryoung ve Kalousek yöntemleridir. Barker kare dalga voltametrisi / polarografisi kare dalganın en basit şeklidir. Bu formda dalga bir rampa yada merdiven şeklinde olup simetrik bir kare dalga ile sinüzoidal alternatif akım voltametrisinin uygulanmasıyla oluşmuştur. Kalousek kare dalga voltametrisi / polarografisi (Heyrovsky tarafından isimlendirilmiştir) kare dalganın sadece ters yarı devirlerindeki akımın ölçülmesiyle elde edilen daha küçük frekanslı (5 Hz) yöntemleri için uygulanmaktadır. En çok kullanılan kare dalga yöntemi ise Osteryoung'tır. Bu yöntem diğerlerinden, uygulanan puls periyodunun ( $\lambda$ ), yarı puls yüksekliğinin ( $E_{sw}$ ) ve uygulanan her puls sonunda potansiyelin artması ile farklılık gösterir (Christie ve ark., 1977 ; Turner ve ark., 1977; Yılmaz ve ark. 2001; Uslu ve Özkan, 2002 ; Demircigil ve ark., 2002; Özkan ve Uslu, 2002; Uslu ve Özkan, 2004; Doğan ve ark. 2005a; Uslu ve ark. 2006).

### **Puls Polarografisinin Uygulamaları:**

Günümüzde yüksek duyarlılığı, kolaylığı ve seçiciliğinden dolayı, puls yöntemleri kantitatif uygulamalarda, genellikle pik yüksekliklerinin analizlenecek madde konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildiği kalibrasyon eğrileri çizilmesi çalışmalarında kullanılır.

#### **2.1.8.7. Voltametrinin Yeri ve Önemi**

Yeni elektrot şekil ve tasarımı (modifiye elektrotlar) (Wang ve ark. 1985; Biryol ve ark. 1996; Biryol ve ark. 1998; Özkan ve ark.1993), yeni yüzey temizleme teknikleri (Özkan ve ark. 1994) elektro analiz yöntemleri (puls dalga formları, adsorptif teknikler, sıyırma) (Yılmaz ve ark. 2001;Uslu ve ark. 2001; Özkan ve Uslu, 2002; Uslu ve ark. 2002; Uslu, 2002; Özkan ve ark. 2003a; Özkan ve ark. 2003b; Doğan ve ark.2004; Uslu ve Özkan, 2004; Doğan ve ark. 2005a; Doğan ve ark. 2005b; Uslu ve ark. 2005a; Uslu ve ark. 2005b; Doğan ve ark. 2006; Uslu ve ark. 2006; Ostatna ve ark 2006; Palaska ve ar., 2007; Krizkova ve ark., 2007; Altun ve ark. 2009; Martinez-Huitle ve ark., 2008; Dogan-Topal ve ark. 2009; Dogan-Topal ve Ozkan, 2011) sayesinde farmasötik preparatlarda ve vücut sıvılarındaki aktif bileşenler, safsızlıklar, ara ürünler ve metabolitler oldukça geniş tayin sınırlarıyla ( $\sim 10^{-11}M$ ), seçicilikte ve hızlı bir biçimde doğrudan analiz edilebilmektedir.

Bu nedenle ilaç analizlerinde kromatografik ve fotometrik yöntemlere alternatif yöntem olarak nitelendiren modern voltametri bu yöntemlerle yarışmalı olmaktan çok onları tamamlayıcı niteliktedir. Ayrıca yöntemin yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle birleştirilmesiyle, kompleks karışımların analizinde de başarıyla uygulanması sağlanmıştır. (Özkan ve ark. 1998)

Voltametrik ve polarografik yöntemlerin, eczacılık alanında ve klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmasının nedeni düşük derişimlerde farmasötik analizlerin yapılabilmesi,

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 elektro aktiviteleri bulunmadığı için herhangi bir ayırma işlemine gerek olmadan analizleri yapılabilmektedir. Ayrıca bu yöntemlerin diğer bir üstünlüğü de pahalı ve az miktardaki ilaçların analizinde de çok az miktarda numuneye ihtiyaç gösterdiği için kullanılabilmesidir. (Brezina ve Zuman, 1958; Zuman ve Brezina, 1962).

Bu yöntemlerle saf etken maddenin yanında çok kompleks bir karışım olsa bile (çözünmeyen ilaç katkı maddeleri, serum ya da plazmada bulunan endojen maddeler, v.b.) aktif maddelerin analizi duyarlılıkla ve herhangi bir girişim olmaksızın yapılabilmektedir. Pek çok ilaç etken maddesi ve vücutta bulunan fizyolojik aktif maddeler, polarografik veya voltametrik yöntemlere cevap vermektedir. Bu yöntemlerin diğer analitik yöntemlere üstünlüğü ise az miktarda maddenin analiz için yeterli olması sebebiyle ucuz olması, kolay uygulanabilirliği, analitlerin ön saflaştırma işlemlerine fazla ihtiyaç olmaması, fazla çözücü gerektirmemesi ve hassas bir yöntem olmasıdır. (Zuman ve Brezina, 1962; Kissinger ve Heineman, 1996)

#### 2.1.8.8. Sıyırma Voltametrisi

Alternatif akım voltametrisi, diferansiyel puls voltametrisi ve kare dalga voltametrisi gibi modern teknikler, arasında sıyırma voltametrisinin önemli bir yeri vardır. Çünkü sıyırma voltametrisinde duyarlılık, faradaik akımın diğer modern polarografik tekniklere oranla çok büyük olması, yük akımının o tekniklerdeki kadar olması nedeniyle çok artmıştır. Bu durum, tayin sınırını çok düşürmüştür (Bond,1980; Strobel,1973).

Örneğin, Eisner ve Mark, AgI ile çekirdeklendirilerek yağdırılan yağmur ve kar suyunda  $10^{-10}$  M düzeyinden daha duyarlı olarak sıyırma voltametrisi ile Ag miktarını tayin edebilmişler (Eisner ve Mark, 1970). Genel olarak sıyırma voltametrisinde tayin sınırı  $10^{-6}$  ve  $10^{-9}$  M arasındadır.

Nükleik asitlerin tayin edilmesi moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve diğer birçok bilimsel alanda büyük öneme sahiptir. Modern elektroanalitik tekniklerin bu alanda önemi büyüktür. Modern DNA teşhis ve nükleik asit araştırmalarında özellikle guaninin yükseltgenme sinyalinin izlenmesi temeline dayalı sıyırma voltametrisi kullanımıyla elektroanalizin bu alanda kullanımı artmıştır. (Wang, 2002; Mascini ve ark., 2006; Liu ve ark., 2007)

Sıyırma yöntemi basitçe şöyle tanımlanabilir; Bir ön deriştirme basamağında elektrot üzerinde biriktirilen maddenin sonra herhangi bir polarografik teknikle sıyırılması, yani çözeltiye geri verilerek ölçülmesidir.

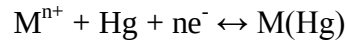
#### 2.1.8.8.1. Sıyırma Voltametrisinin Çeşitleri

4 tip sıyırma voltametrisi vardır:

- 1- Anodik sıyırma
- 2- Katodik sıyırma
- 3- Adsorptif sıyırma
- 4- Potansiyometrik

#### Anodik Sıyırma Voltametrisi:

Bir ön biriktirme basamağının voltametri ile birleştirilmesidir. Bu ön işlem basamağında, çözeltideki bir metal iyonu, potansiyel kontrollü elektroliz ile polarografik yarı dalga potansiyelinden daha negatif bir potansiyelde özellikle plato bölgesinde bir katı elektrot üzerinde (Hg elektrot üzerinde) amalgam verecek şekilde elektrolizlenir (Wang , 1988).



Sıyırma aşamasında potansiyel anodik yönde doğrusal veya diğer metodlarla hızla taranır ve iyonun yükseltgenerek çözeltiye geri difüzyonu gerçekleşir.



Elde edilen voltamogramdaki sıyırma piki, biriktirilen metalin yükseltgenmesine ilişkin olduğundan pik akımı metalin elektrottaki ve dolayısıyla çözeltideki derişimine ilişkin bilgi verir. Pik potansiyeli yardımıyla nitel analiz gerçekleştirilebilir.

Anodik sıyırma voltametrisinde duyarlılık üzerine etkili parametreler;



- metalin amalgamdaki konsantrasyonu,
- elektrodun şekli ve geometrisi,
- elektroliz basamağının süresi ve verimidir.

### **Katodik Sıyırma Voltametrisi:**

Katodik sıyırma voltametrisi analizi yapılacak maddenin elektrot üzerinde yükseltgenerek çözünmeyen bir film oluşturduğu ön konsantrasyon basamağı ile, sonradan bu maddenin negatif bölgede indirgenerek ölçümüne dayalı bir yöntemdir.



Kısaca anodik sıyırma voltametrisinin ayna görüntüsü de denir.

$\text{An}^-$  : Tek değerli ( $\text{Cl}^-$ ) veya iki değerli bir anyon,

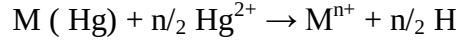
$\text{HgA}$  : Civa tuzlarını göstermektedir( $\text{HgCl}$ ).

Çeşitli organik ve inorganik maddeler, tiyoller, halojenürler, Hg ile çözünmeyen tuzlar oluştururlar ve bunlar katodik sıyırma voltametrisiyle ölçülürler (Booth, 1970). Hg damlası üzerinde yapılacak sıyırmada katodik dalga Hg'nin indirgenmesinin gözlenmeyeceği bir potansiyelde yapılmalı ve buna uygun bir sıyırma yöntemi seçilmelidir.(Bond, 1980)

### **Potansiyometrik Sıyırma Voltametrisi:**

Bu teknik biriktirme adımı yönüyle anodik sıyırma voltametrisi ile aynıdır ancak sıyırma aşamasında elektrot yüzeyinde toplanan metalik türün ortamda bulunan  $\text{Hg}^{2+}$

iyonları gibi bir yükseltgenle kimyasal olarak yükseltgenmesi sonucu elektrot potansiyelindeki değişimler zamana karşı kaydedilir. Yöntem kronopotansiyometrik sıyırma olarak da adlandırılır.



Potansiyometrik sıyırmada konsantrasyon basamağından sonra sabit potansiyel uygulamasına son verilir ve toplanmış metaller yükseltgen bir madde ile yükseltgenir. Bu madde çözeltide bulunmaktadır veya uygun değerinde bir sabit akım uygulanarak da bu işlem yapılır (Wang, 1988; Jagner ve Graneli, 1976; Jagner, 1982).

Bu yükseltgenme sırasında çalışma elektrodunun potansiyeli değişir bu potansiyel zamana karşı kayıt edilir. Bu eğri sıyırma platosudur. Redoks titrasyon eğrilerinde olduğu gibi iki eşdeğerlik noktası arasındaki süre bu zaman aralığında yükseltgenmiş olan maddenin konsantrasyonunun ölçüsüdür.

$$t_{\text{sıyırma}} \propto [M^{n+}] t_{\text{biriktirme}}$$

Wang, J., ve ark., (1996e) fenotiyazin grubu ilaçlardan; prometazin, fenotiyazin, klorpromazin, tioridazin ve proklorperazin ile dsDNA etkileşimlerini karbon pastası elektrot kullanarak potansiyometrik sıyırma analizi ve diferansiyel puls voltametrisi teknikleri ile incelemişlerdir. (Wang ve ark., 1996e)

### **Adsorptif Sıyırma Voltametrisi:**

Adsorpsiyon sıyırma yöntemleri, anodik ve katodik sıyırma yöntemlerine oldukça benzemektedir. Burada, en yaygın kullanılan;

- mikroelettrot
- asılı civa damla elektrotu

– karbon bazlı elektrotlar (camsı karbon, karbon pasta, bor ile dope edilmiş elmas, kalem grafit, vb)

analitin karıştırılan bir çözeltisine birkaç süre ile daldırılır. Sonra, elektrot yüzeyinde analitin birikmesi elektrolitik olarak değil, fiziksel adsorbsiyonla meydana gelir. Yeterince analit biriktirildikten sonra (bunu deneysel optimizasyonla belirliyoruz), birikmiş madde doğrusal taramalı veya değişik puls voltametrik yöntemlerle tayin edilir. Kantitatif analiz, numunelerle aynı şekilde işlemelere tabi tutulan standart çözeltilerle yapılan kalibrasyona dayanır.

Anodik sıyırma kolaylıkla indirgenip amalgam oluşturan metallerin tayinleri söz konusudur (Pb, Cd, Zn, Cu, Bi, Tl, In, Sb, Sn, Ni, Mn, Ga, gibi). Al, Fe, Co, MO, V, Cr, Ti, La, gibi metaller ise adsorptif sıyırma volametrisi ile tayin edilirler. Sıyırma basamağı herhangi bir polarografik teknikle olabilir.

Metaller dışında organik moleküllere de uygulanabilmektedir. Bu amaçla Hg elektrotlar yanında modifiye elektrotlar da kullanılmaktadır. Örnek: (Wax impregnated graphite electrode WIGE) mumla impegrene edilmiş elektrotla fenotiyazin grubu ilaçlar adsorptif sıyırma ile tayin edilmiştir (Jarbawi ve ark.,1982; Jarbawi ve ark,1986). Bu tayinde organik madde önce elektrot üzerine adsorplanmış ve mum içerisine ekstrakte olmuştur.

Değişik yöntemlerle elektrot yüzeyinde toplanan maddeler, doğrusal taramalı voltametri, normal puls polarografisi (pp), diferansiyel puls polarografisi(dpp), kare dalga, alternatif akım(ac) polarografisi ve kronopotansiyometri gibi yöntemler kullanılarak, elektrot yüzeyinden sıyrılarak tayin edilebilmektedir. Sıyırma voltametrisinde karbon elektrotlar kullanılırken, sıyırma yöntemi olarak, doğrusal taramalı voltametri yerine, pp, dpp, ac, kare dalga kullanıldığı zaman daha büyük duyarlılık sağlanabilmektedir (Greef ve ark.1990; Osteryoung ve Christie, 1974). Puls tekniğinin hassasiyeti, doğrusal taramalı voltametriden daha iyidir.

Diferansiyel puls anodik voltametrik yöntemi ile  $10^{-10}$  M tayin limitine ulaşılabilir (Schiavon ve ark.,1991).

Klinik ve farmasötik önemi olan birçok organik molekül, özellikle civa yüzeyi, civa üzerindeki yükün sıfır olduğu yaklaşık -0,4 V'a (DKE'ye karşı) ayarlanırsa, sulu çözeltilerden civa yüzeyine kuvvetle adsorplanırlar. İyi bir karıştırma ile, adsorpsiyon hızlanır ve analiz için yeterli miktar analit biriktirmek için,  $10^{-7}$ M çözeltilerde sadece 1-5 dakika,  $10^{-9}$ M çözeltilerde 10-20 dakika gerekir. Bu süre maddeye göre değişmektedir.

Adsorptif sıyırma voltametri, çok düşük derişimlerdeki çeşitli inorganik katyonların tayininde kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda, katyonlar genellikle dimetilglioksim, kateşol ve bipridin gibi yüzey-aktif kompleksleştiricilerle kompleksleri haline dönüştürülür. Yöntemin gözlenebilme sınırı  $10^{-10}$  ve  $10^{-11}$  M aralığındadır.

Palecek 1988 yılında, nükleik asitlerin elektrokimyasal olarak tayininde adsorptif sıyırma voltametri tekniğinin kullanılması ile duyarlılığın iki kat arttığını belirtmiştir. (Palecek, E., 1988)

#### **2.1.8.8.2. Sıyırma Voltametrisinin Basamakları**

##### **Elektrot Biriktirme Basamağı**

Normal olarak, elektrot biriktirme basamağı sırasında analitin yalnızca ufak bir kesri elektrot yüzeyinde birikir. Bu yüzden kantitatif sonuçlar;

- elektrot potansiyelinin kontrol edilmesi
- elektrot boyutu
- biriktirme süresi

-hem numunenin hem de kalibrasyonda kullanılan standart çözeltilerin karıştırma hızı gibi faktörlere bağlıdır.

Sıyırma yöntemindeki mikroelettrotlar civa, altın, platin, gümüş ve çeşitli formlardaki karbon gibi değişik maddelerden yapılır. En çok kullanılan elektrot, asılı civa ve damla elektrotudur. Bu elektrot bir platin ile temasta olan asılı civa damlasından oluşur. Bu elektrotlar asılı damla boyutunun tam hassas bir şekilde kontrolünü sağlamak için çoğunlukla mikrometreli bir mikro şırıngadan ibarettir. Böylece şırınga ile kontrol edilen akıtma sistemlerinde, civanın yer değiştirmesi ile damla kapillerin ucunda oluşur.

Anodik sıyırma ile bir metal iyonunu tayin etmek için, önce taze bir asılı damla oluşturulur, karıştırmaya başlanır ve ilgili iyonun yarı dalga potansiyelinden 10-20mV daha negatif bir potansiyel uygulanır.  $10^{-7}$  M çözeltiler için bir dakika veya daha az süreden,  $10^{-9}$  M çözeltiler için 30 dakika veya daha fazla süreye kadar değişmek üzere, dikkatlice ölçülen bir süre için elektrotta biriktirme yapılır. Elektroliz süresi, analizin tamamlanması için seçilecek yöntemin duyarlılığı ile belirlenir.

### **Analizin Voltametrik Olarak Tamamlanması**

Asılı civa damla elektrodunda toplanan analit, birkaç voltametrik yöntemden herhangi biri ile tayin edilebilir. Örneğin, doğrusal anodik tarama işleminde, birikme tamamlandıktan sonra 30 saniye daha karıştırmaya devam edilir. Daha sonra potansiyel, sabit ve doğrusal bir şekilde başlangıç katodik değerinden itibaren azaltılır ve oluşan anodik akım uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilir.

Voltametrik işlemlerin çoğunda sıyırma basamağı vardır. Bunlar içinde en çok kullanılanı anodik diferansiyel puls tekniğidir. Bu yöntemle oluşan dar ve sivri pikler, karışımların analizinde büyük kolaylık sağlar. Keskin pik elde etmek için kullanılacak bir başka yöntem ise civa film elektrodu kullanmaktır. Burada camsı karbon gibi inert bir elektrot üzerine ince bir civa filmi elektrolitik olarak kaplanır. Normal olarak civa analitle birlikte biriktirilir. Burada filminden çözelti ara yüzeyine olan mesafesi civa damlasındakinden daha kısa olduğu için, analitin film tabakasından çözeltiye geçişi daha

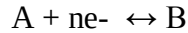
hızlı olur; bunun sonucu daha büyük duyarlılığa ve karışımdaki bileşenlerinin her birinin daha iyi tayinine yol açan, daha dar ve daha büyük voltametrik pikler elde edilir. Diğer taraftan asılı civa damla elektrodu, özellikle yüksek analit derişimlerinde çok daha tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Bu yüzden pek çok uygulamada asılı civa damla elektrodu kullanılır.

Sıyırma tekniğinin birçok şekli geliştirilmiştir. Örneğin çok sayıda katyon, bir platin katot üzerine elektro kimyasal biriktirme ile tayin edilebilmektedir. Daha sonra biriken miktarı uzaklaştırmak için gerekli elektrik miktarı kulometrik olarak ölçülür. Bu yöntem eser element analizleri için son derece kullanışlıdır. Ayrıca, halojenürlerin tayini için de, katodik sıyırma yöntemleri geliştirilmiştir. Burada halojenür iyonları civa üzerine civa tuzları halinde biriktirilir, daha sonra katodik bir akımla sıyırma yapılır.

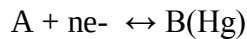
#### 2.1.8.8.3. Yöntemin Teorisi

Genel olarak sıyırma voltametrisi ile anodik sıyırma voltametrisinin teorisi aynıdır. Sıyırma voltametrisinde bir doğru akım (d.c.) potansiyel rampı söz konusudur. Hem dönüşümlü voltametride hem de doğru akım polarografisinde bu ramp üçgen şeklindedir. Böylece potansiyel sinyali uygulandığında potansiyel değişme bölgesi negatif ise önce katodik yönde indirgenme, potansiyel değişme bölgesi ters çevrildiğinde anodik yönde yükseltgenme piki veya pikleri gözlenir.

Olay eğer tersinir ise pik, anodik ve katodik dalda hemen hemen aynı potansiyellerde görülür ve pik yükseklikleri eşittir.



Tersinir olayının olabilmesi için, yani piklerin aynı bölgede görülebilmesi için, oluşan B maddesinin çözünüp, çözeltiye geçmesi gerekir.



Böyle bir tersinir olayda oluşan indirgenme ürünü Hg ile amalgam oluştuyorsa ve bu olay çok küçük hacimli bir asılı civa elektrodunda oluşuyorsa sonuçta gidiş yönünden daha büyük pikli bir dönüş yönü elde edilir. Çünkü amalgamdaki metal tekrar yükseltgenerek çözeltiye geçmiştir. Böylece amalgam oluşturmalarını kapsayan bir olayda geri dönüş ve analitik olarak istenen faradaik akım artışı sağlanmıştır.

Hg elektrotla yapılan anodik sıyırma voltametrisinde hesaplanması gereken önemli parametrelerden biri kontrollü potansiyel elektroliz basamağındaki amalgam konsantrasyonudur. Kontrollü potansiyelde elektroliz, anodik sıyırma voltametrisinde, polarografik yarı dalga potansiyelinden 300-400 mV daha negatif potansiyelinde yapılır. Bu sırada çözelti karıştırılır veya elektrot döndürülür. Bu potansiyelin tam değerinin bulunması için deney şartlarının optimize edilmesi gereklidir. Elektrotun dönme hızı veya çözeltinin karıştırılma hızı (W) elektroliz verimini etkileyen faktörlerdir.

#### **2.1.8.8.4. Sıyırma Voltametrisinde Kullanılan Elektrotlar**

Bu teknikte kullanılan hücre ve elektrotlar doğru akım polarografisindeki gibidir. Üç elektrotlu bir sistem kullanılır. Böylece çalışma, referans ve yardımcı elektrotlar arasındaki IR düşüşü minimuma indirilir. Çalışma elektrotu bu teknikte doğru akım polarografisinden farklı olabilir.

Asılı Civa Damla Elektrodu sıyırma voltametrisinde en sık kullanılan elektrotlardan biridir. (Solak ve ark.,1988; Kır ve ark.,1990; Altınöz ve Temizer, 1990a ; Altınöz ve ark.,1990b; Altınöz ve ark.,1992) Günümüzde Hg film elektrotlara destek olarak, karbon elektrotlar kullanılmaktadır. Çünkü karbon elektrotlar inert, dayanıklı ve elektrik iletkenliği yüksek elektrotlardır.

Bu amaçla kullanılan karbon elektrotlar arasında karbon pasta elektrot (Florence,1970), balmumu ile impegrene edilmiş (grafit) karbon elektrot (Christian,1969; Adams,1958; Convington ve ark.,1965), camsı karbon elektrot (Matson ve ark.,1965; Florence, 1980; Adeloju ve ark.,1991; Dogan ve Ozkan, 2005), kalem

grafit elektrot (Dogan-Topal ve ark, 2009) ve karbon fiber elektrot (Cushman,1981) sayılabilir. Değişik bir elektrot olarak grafit sprej elektrot da anodik sıyırma voltametrisinde kullanılmıştır (Kauffmann ve ark.,1982). Geliştirilen farklı bir elektrot da asılı bakır amalgam damla elektrottur ve bu elektrot yardımıyla Bilewicz ve Kublik iyodun eser miktarlarını tayin edebilmişlerdir (Blewicz ve ark.1983).

#### 2.1.8.8.5. Sıyırma Voltametrisinin Uygulama Alanları

**İlaç analizleri:** Pek çok ilaç analizi genelde adsorptif sıyırma voltametrisi kullanılarak yapılmıştır.

2004 yılında Doğan ve ark., Anodik Adsorptif Sıyırma Voltametri tekniği ile Hipertansiyonda kullanılan Kandesartan Sileksetil'i camsı karbon elektrotta analiz etmişlerdir. (Dogan ve ark., 2004)

2005 yılında Carapuça ve ark. Trimetoprimi adsorptif sıyırma voltametrisiyle asılı civa elektrotta analiz etmişlerdir. Tayin edilebilen en küçük konsantrasyon olarak  $1 \times 10^{-7}$  M' a kadar inmişler. (Carapuça ve ark., 2005)

2005 yılında Doğan, B., ve Özkan,S.A., adsorptif sıyırma voltametrisiyle camsı karbon elektrotta hipertansiyon hastalığında kullanılan Karvedilolün elektrokimyasal davranışlarını incelemişler ve geliştikleri yöntemi farmasötik dozaj formlarına ve insan serumuna uygulamışlardır. İnsan serumunda yakalama sınırını  $5,99 \times 10^{-8}$  M bulmuşlardır.

**Klinik uygulamaları:** Klinik uygulamalarda insan kanında, idrarında, doku ve organlarda, kan plazmasında çeşitli analizler yapılmıştır. Örneğin  $10^{-10}$  M seviyesinde bilirubin tayini Wang ve Luo tarafından 1985 yılında yapılmıştır. (Wang ve Luo, 1985b)

2005 yılında Kuo-Tang Liao ve Hsuan-Jung Huang 1.6 femtomolar seviyesinde, tavşandaki immunglobulin G miktarını tayin etmişler ve kare dalga sıyırma voltametrisini kullanmışlardır. (Liao ve Huang, 2005)



**Çevre analizleri:** Çevre analizlerinde numune olarak genellikle deniz suyu ve doğal sular kullanılmıştır. Deniz suyunda Fe, Cu, Bi, Pb, Cd ve Zn'nun eser miktarlarının doğrudan ve aynı zamanda tayinleri yapılmıştır. Doğal sulardan da Cu, Pb, Cd ve Zn tayini yapılabilmektedir (Brihaye ve ark 1983; Blutstein ve ark 1976). Kullanılmış motor yağlarından mikro molar düzeyinde ve sentetik Pb numunelerinden ppb düzeyinde Pb tayin edilmiştir (Kapanıca 1991).

**Diğer analizler :** Sıyırma voltametrisi ile yapılan diğer analizler ise genellikle kompleks tayinleridir. Bu yöntemlerle, Al, U, Co, Cd ve Zn'nun çeşitli komplekslerden tayinin (Stryjewska ve ark.1991; Dıaz-Cruz ve ark. 1991) ve anyonik yüzey aktif maddeler yardımıyla kompleks oluşturarak Tl, Pb, Cd, Cu ve In tayini yapılabilmektedir (Opydo 1992).

Ayrıca bu yöntemle çeşitli ilaç formlarından Selenyum (Se) (Stoica ve ark. 2002) analizi yapılmıştır.

Mikro elektrotlarla hızlı taramalı sıyırma voltametrisi (Namura ve ark., 1991) yöntemleri de kullanılmıştır. Bir çalışmada da özel bir tip ceketli elektrot kullanılarak Co ve Ni adsorptif sıyırma voltametrisi ile tayin edilmiştir (Breeff ve ark., 1991).

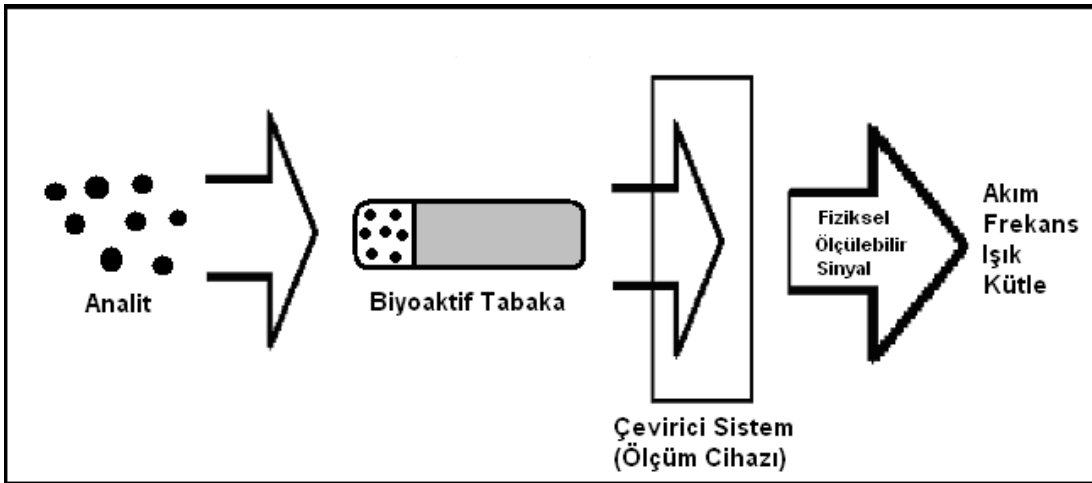
Modifiye elektrotların gelişmesine paralel olarak, sıyırma voltametrisi klinik, çevre, ilaç ve eser madde analizlerinde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

Bu yöntemden aynı zamanda organik moleküllerin tayininde de yararlanılmaktadır. Bu yöntemde tayin ve yakalama sınırının çok düşük olması, yöntemin en büyük üstünlüğünü oluşturmaktadır.

## 2.2. Biyosensör

Biyosensörler, biyolojik materyaller içeren ve/veya bunların çeşitli ortamlarda kalitatif ve/veya kantitatif tayin ve izlenmesinde kullanılan cihazlardır. Biyosensörlerde en önemli nokta sistemde mutlaka bir biyolojik materyal kullanılıyor olmasıdır. Bu biyolojik materyaller kullanılarak, çok seçici, çok hassas, çoğu zaman da çok daha hızlı ölçüm yapmak mümkündür.

Biyosensörler, birbiri içine geçmiş tanıyıcı bölüm ve tanıyan ile tanınan arasında iki etkileşmeyi elektrik sinyaline çeviren bir çevirici sistemden oluşan biyoanalitik aletlerdir. Birinci kısım hedef analit ile seçimli olarak etkileşime giren biyokimyasal kısımdır. İkinci kısım ise bu etkileşimi algılayan elektriksel kısımdır. Tanıyıcı kısımda immobilize edilmiş ligandlar bulunmaktadır (Coulet, 1991; <http://www.biyomedtek.com>; Pividori ve ark., 2000; Turner, 1987). Biyosensörlerde amaç örnek içinde bulunan bir kimyasalın derişimi ile doğru orantılı bir elektronik sinyal elde etmektir. Kısaca biyosensörler analizlenecek maddenin bilinmez değişimleri hakkında sürekli bilgi sağlar.



Şekil 2.27. Biyosensörün yapısı ve bileşenleri (Karadeniz, 2004)

### 2.2.1. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikleri

İdeal bir biyosensör aşağıda adı geçen özelliklere sahip olmalıdır (Hall, 1990; Söğüt ve Kayalı, 2005).

**Seçimlilik:** İdeal bir biyosensör öncelikle seçimli olmalıdır. Çalışma ortamında analit ile girişim yapabilecek çeşitli bileşenler olabilir. Seçimli olan biyosensör, analiti varlığı tespit edilmiş olan bu bileşenlerden farklı olarak ölçebilir. Seçimlilik yeterli değilse, bunu sağlamak için ek işlemler gerekir.

**Kullanım ömrü:** İdeal bir biyosensör, uzun kullanım ömrüne sahip olmalıdır. Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır.

**Kalibrasyon:** Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidir. İdeal bir biyosensörün kalibrasyona hiç gereksinim duymaması gerekse de, bu pratikte gerçekleşmemektedir. Bunun için biyosensör tasarımı için kullanılan cihazın kalibrasyon gereksiniminin mümkün olabilecek en az miktarda olması istenmektedir.

**Tekrarlanabilirlik:** İdeal bir biyosensör için, aynı koşullar altında, ardarda yapılan ölçümlerde, elektrodun yaklaşık olarak aynı sonuçları okuması istenir. Bu durum pratikte mümkün değildir. Bu noktada tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından, aynı koşullarda, sabit bir örnek ile belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin, kesinliği olarak tanımlanır. Biyolojik örnek için %15'ten fazla bağıl standart sapma ile kesinlik sağlanabilir. Tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir çünkü tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün de o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

**Stabilite:** Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlı olup, pH, ısı, nem, oksijen derişimi gibi faktörlere karşı elektrodun kararlılığını ifade etmektedir. İdeal bir biyosensör kararlı olmalıdır.

**Duyarlılık:** Duyarlılık, biyosensörün konsantrasyonda meydana gelen küçük değişimleri kaydetme kapasitesidir. Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin duyarlılığının yüksek olması gerekir.

**Tayin sınırı:** Analitin, analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonu tayin sınırını belirler. Tayin sınırının düşük olması kullanılan malzemenin de az olmasını sağlar. Tayin sınırı, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, elektrot yüzeyine tutturulan madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

**Ölçüm aralığı:** Ölçüm aralığı akım–konsantrasyon eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır. İdeal bir biyosensörde bu aralığın geniş olması istenir.

**Cevap zamanı:** Cevap zamanının kısa olması çalışmada zamandan tasarruf sağlar. Bu bakımdan ideal bir biyosensörün hızlı cevap zamanına sahip olması istenir. Elde edilen akım–zaman eğrileri cevap zamanı hakkında bilgi verir. Basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı yavaş, tersi söz konusu ise cevap zamanı hızlıdır.

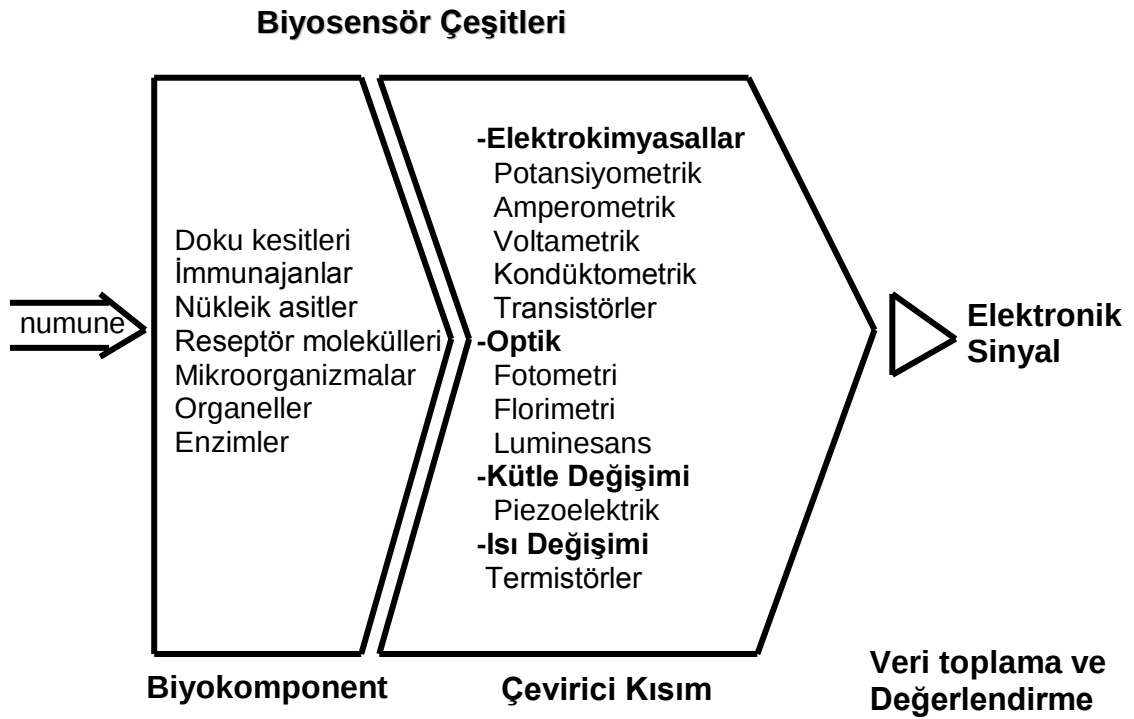
**Geriye dönme zamanı:** Geriye dönme zamanı, örneğin amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. İdeal bir biyosensör hızlı geriye dönme zamanı özelliği göstermelidir.

**Basitlik ve ucuzluk:** İdeal bir biyosensörün tasarımı basit, maliyeti ucuz ve kullanımı kolay olmalıdır.

**Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik:** Biyosensör yapısında bulunan materyallerin küçültülebilmesi, biyosensör tasarımı açısından oldukça önemlidir. Biyosensörün sterilizasyonu ise ikinci bir önemli noktadır, ancak biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan bir etmen olarak karşımıza çıkar.

### 2.2.2. Çevirici Türüne Göre Biyosensör Çeşitleri

Biyosensörün tanıyıcı tabakasına takılmış bulunan ligand (tanıyan) ile tayini gerçekleşecek olan analit (tanınan) arasında, sensör yüzeyinde bir etkileşme oluşur. Bu etkileşim, biyosensörlerde çoğu kez çok seçicidir. Etkileşmenin sonucunda oluşan değişiklik ortaya çıkan bir kimyasal madde veya başlangıçta ortamda bulunan ve etkileşme ile kaybolan bir kimyasal madde olabilir. Bu durum bazı değişikliklere sebep olur ve çevirici kısım bu değişiklikleri algılar ve elektrik sinyaline çevirir.



**Şekil 2.28.** Çevirici türüne göre biyosensör çeşitleri

## **Elektrokimyasal Biyosensörler**

Etkileşim sonucu ortaya çıkan değişim elektrokimyasal bir değişim ise (elektriksel potansiyel veya akım değişimi gibi), çevirici bölümün bu elektrokimyasal değişimleri algıladığı biyosensörlere elektrokimyasal biyosensörler adı verilir. Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili biyosensörlere rastlanmaktadır.

## **Optik Biyosensörler**

Biyosensörün çevirici bölümünün optik değişimleri algıladığı ve elektrik sinyaline çevirdiği aygıtlara optik biyosensörler denir. Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekül immobilize edilerek hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir ([http://www.biyomedtek.com](http://www.biyomedtek.com;); <http://www.kontrolkalemi.com>)

## **Kütle Hassas Biyosensörler**

Kütle hassas biyosensörlerde çevirici olarak piezoelektrik kristaller kullanılır. Rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetre-karede nanogram seviyesinde kütle değişimi ölçülür. Bu sebeple antikor–antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılır. Kütle

hassas biyosensörlere Kuartz Kristal Mikrobalans (Quartz Crystal Microbalance, QCM) örnek gösterilebilir. (<http://www.baskent.edu.tr>).

### **Isıl (Termal Sensörler)**

Sıcaklığın değişimi üzerine kurulmuş olan sensörlerdir. Genellikle reaksiyon sıcaklığı ve adsorpsiyon sıcaklığı ölçüm temeli üzerine kurulmuştur.

### **2.2.3. Elektrokimyasal Biyosensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler, özel biyolojik tanıma unsuru ile elektrokimyasal tekniklerin analitiksel gücünü birleştirir. Amaç; analitin derişimine bağı olarak biyolojik bir işlemle bir elektrik sinyali elde etmektir.

#### **2.2.3.1. Elektrokimyasal Biyosensörlerin Çevirici Ölçüm Türüne Göre**

##### **Sınıflandırılması**

Elektrokimyasal biosensörler, çevirici (transistor) ölçüm türüne göre üç ana başlık altında toplanabilir:

- Amperometrik
- Potansiyometrik
- Kondüktometrik

### *Amperometrik elektrokimyasal biyosensörler*

Karşılaştırma elektroduna göre sabit gerilimde işlev görürler. Bu biyosensörlerde ölçülen sinyal, biyosensör yüzeyinde indirgenen ya da yükseltgenen tür tarafından çalışma elektrodunda meydana gelen akımdır. Bir elektrokimyasal türün, elektrokimyasal indirgenmesi/ yükseltgenmesi ile meydana gelen akımın ölçülmesine dayanır. Genelde çalışma elektrodu üzerinde sabit gerilim değeri varken çalışılır. Amper değeri en az  $10^{-9}$  –  $10^{-6}$  amper olmalıdır.

Amperometrik ölçümler uygulanan tek bir gerilim değerinde hücredeki akım artışının kaydedilmesi ile yapılır. Elde edilen elektrik sinyalinin büyüklüğü elektroaktif türün derişimi ile doğru orantılıdır. Amperometrik biyosensörler oldukça duyarlı, hızlı ve ucuzluk üstünlüklerine sahiptirler.

### *Potansiyometrik elektrokimyasal biyosensörler*

Potansiyometrik ölçümler ya çalışma ve karşılaştırma elektrot arasındaki gerilim farkının ya da iki karşılaştırma elektrotu arasına geçirgen bir membranın yerleştirilmesi ile meydana gelen gerilim farkının ölçülmesine dayanır. Bu sistemlerde önemli bir akım yoktur. Potansiyometride sensör ara yüzeyinde bölgesel bir denge kurulur; ara yüzeydeki elektrot ya da membran gerilimi ölçülür. Gerilim farkından örnek bileşimi hakkında bilgi elde edilir.

### *Kondüktometrik elektrokimyasal biyosensörler*

Ana çözeltideki ya da ince film üzerindeki elektrik iletkenliğinin değışimi üzerine kurulmuştur. Bu iletkenlikte analitin bulunma miktarı etkilidir. Kondüktometrik yöntemler temel olarak seçici değillerdir; ancak yüzey modifikasyonu ve aletsel gelişmeler seçiciliğı artırmış ve sensör tasarımına bu yöntemin girmesini sağlamıştır (Thevenot ve ark., 1999; Stradiotto ve ark., 2003).



## 2.2.4. Analizlenecek Madde-Biyoaktif Bileşen İlişkisine Göre Biyosensörlerin

### Sınıflandırılması

Biyosensörler farklı bir bakış açısıyla Analizlenecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre aşağıdaki şekilde de sınıflandırılabilirler;

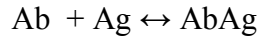
#### *1. Biyoaffinite Esaslı Biyosensörler*

Afinite biyosensörleri, belirli biyomoleküllerin (antikor, reseptör, polinükleotitler) özel hedef analitlere seçici bağlanmasında kullanılır. Bu sensörler, bağlanma sürecinin sonucu olarak oluşan elektrokimyasal sinyallerin ölçülmesine dayanır. Biyokimyasal bağlama tepkimelerinin afinitesi ve yüksek spesifikliğı oldukça duyarlı ve seçici aletlerin yapılmasına yol açmaktadır. Afinite biyosensörleri üç ana başlık altında toplanabilir.

- İmmünosensörler
- Reseptör temelli biyosensörler
- Nükleik asit temelli biyosensörler

#### *İmmünosensörler (antikor temelli sensörler):*

Antikor/antijen(AbAg) kompleksinin oluşumunu içeren immünojikal tepkimeler temeli üzerine dayandırılmıştır.



Antikor, yabancı molekülleri bağlaması için (antijen vb.) organizma tarafından üretilen proteinlerdir. İmmünosensörler bağlanma olayının ya da yer değiştirme olayının sonucunda antikor ya da antijen derişimindeki doğrudan değışikliğı kaydedilmesi

üzerine kurulmuştur. Bu sensörlerin büyük bir çoğunluluğunun tepkimesi tersinmez olduğundan yeniden kullanılamaz ve pahalıdır.

#### *Reseptör temelli biyosensörler:*

Yeni önerilen duyarlı bir yol, biyolojik tanıma elemanı olarak kemoreseptörlerin kullanılmasıdır. Reseptörler protein molekülleridir, hedef analiti özel olarak bağlayan hücresel membrana yerleştirilmişlerdir. Membran reseptör hedef analit arasındaki seçici bağlanma olayı sonucunda membrandaki iletkenliğin değişimi ölçülerek tayin yapılır. Membran reseptör ve hedef analit arasındaki basit ve seçici bir bağlanma olayı binlerce iyonu içine alan çevirici membranın iletkenliğindeki artmanın sonucundadır.

#### *Nükleik asit temelli biyosensörler:*

Nükleik asitler tanıma tabakası olarak elektrokimyasal bir çevirici ile birleştirilerek afinite biyosensörlerin önemli ve yeni bir türünü oluştururlar. RNA ve DNA temelli biyosensörlerdir. DNA biyosensörler ile hedef analitin belirlenmesinde iki yaklaşım geliştirilmiştir. Birincisi DNA'nın çift sarmal arasına analitin girmesi, ikincisi DNA yapısının en elektroaktif türü olan guaninin doğrudan ölçülmesi şeklindedir. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha hızlı ve ucuzdurlar. Bu analizlerle genetik bilgilere ışık tutulmaktadır (Thevenot ve ark., 1999; Wang, 2000; Stradiotto ve ark., 2003)

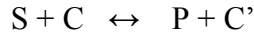
### **1. *Biyokatalitik Esaslı Biyosensörler***

Tanıma tabakası (reseptör) olarak enzim, doku, bakteri ve hücrelerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Enzim temelli elektrotlar ile doku ve bakteri elektrotlar olarak iki başlıkta incelenir.

### *Enzim temelli elektrotlar*

Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962 de Clark ve Lyons ve 1967 de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrodları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Enzimler canlı sistemlerde kimyasal tepkimeleri katalizleyen proteinlerdir. Bu tür katalizörler yalnızca etkili değil aynı zamanda oldukça seçicidirler. Böylece enzimler birçok duyarlı uygulama alanında tanıma yüzeyi olarak kullanılırlar. Enzim elektrotlar, uygun bir elektrotla enzim tabakasının birleştirilmesi temeli üzerine dayandırılmışlardır. Enzimler, substratlara (enzimle tepkimeye giren madde) oldukça yüksek seçicilikte yanıt verirler.

İmmobilize enzim tabakası bir tepkimeyi katalizlemek için seçilir ve bu tabaka analizlenecek türü üretir ya da tüketir.



S: Substrat, C: Koreaktif, P ve C' : Oluşan ürünler

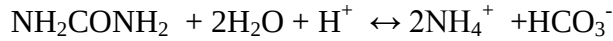
Uygun elektrodun seçimi, temel olarak enzimatik sistemin işleyişi üzerine dayandırılır. Enzim elektrotların en genel anlamıyla yapılış tarzı bir diyaliz membran ve elektrot arasına enzim çözeltisinin immobilizasyonudur.

Enzim temelli elektrotların sınıflandırılması;

*a. Glikoz biyosensörler:* Kanda glikoz miktarının belirlenmesi, diabetesin tanı ve tedavisinde önemli rol oynar. Glikoz için elektrokimyasal biyosensörler bu doğrultuda anahtar bir rol oynar. Amperometrik glikoz sensörlerde elektrot genel olarak platin çalışma elektrodu üzerine yarı geçirgen bir membran ve poliüretan arasına glikoz oksidaz enziminin (Gox) tutturulması esasına dayandırılmıştır.

*b. Etanol biyosensörler:* Etanol miktarının güvenle belirlenmesi birçok uygulamada çok önemlidir. Etanolun enzimatik tepkimesi alkol dehidrojenaz (ADH) varlığında, nikotin amid dinükleotit ( $\text{NAD}^+$ ) kofaktörü ile gerçekleştirilir. Sensör tepkimesi;  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{C}_2\text{H}_5\text{O}^- + \text{NADH}_2^+$  olarak verilir.

*c. Üre biyosensörler:* Üre, üreaz enziminin kataliz tepkimesi temeli üzerine dayandırılarak tayin edilebilir. Sensör tepkimesi aşağıdaki şekildedir.



Üre elektrot, üreaz enziminin amonyum iyon seçici elektrot üzerine immobilizasyonu üzerine yapılmıştır.

#### *Doku ve bakteri elektrotları:*

İzole edilen enzimlerin sınırlandırılmış kararlılığı, bazı enzimlerin saf halde bulunamamaları, bazı enzimlerin pahalı oluşu hücre materyallerin (bitki dokuları, bakteriyel hücreler vb.) kullanılmasına yol açmıştır. Bu biyokatalitik elektrotların fonksiyonu geleneksel enzim elektrotlar ile benzer tarz gösterir. Doku ya da hücrede bulunan enzim belirlenecek türü harcar ya da üretir. Örneğin muz dokuları, polifenol oksidaz enziminin zengindir; karbon pasta matrise karıştırılarak elektrot yüzeyine immobilize edilir.

### **2.2.5. Biyosensörlerin Uygulama Alanları**

Biyosensörler tıp, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespit ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180 ' den fazla farklı madde için biyosensör

hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörler için mümkün uygulama alanları şunlardır:

- Klinik diyagnostik, biyomedikal sektör
- Proses kontrolü:
  - Biyoreaktör kontrol ve analitik
  - Gıda üretim ve analizi
- Tarla tarımı, bağ bahçe tarımı ve veterinerlik
- Bakteriyal ve viral diyagnostik
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık su kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri
- Askeri uygulamalar

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler ilaçlar gibi organik maddeler, bazı organik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Bunların dışında toksisite ve mutajenite testlerinde de başarı ile uygulanmaktadırlar.

Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları aşağıdaki Çizelgede gösterilmektedir .

**Çizelge 2.1.** Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları

| BİYOSENSÖR GRUBU     | KAPSADIĞI ANALİZ ALANI                                                                                                            |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Enzim Sensörleri     | Küçük molekülü organik ve anorganik maddeler (metaboliler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pesdisitler vb. ) |
| Mikrobiyal Sensörler | Enzim sensörlerin kapsadığı alanlar + Toksisite, Mutajenite                                                                       |
| DNA - Sensörleri     | Virüsler, patojen mikroorganizmalar                                                                                               |
| İmmuno Sensörler     | Virüsler, patojen mikroorganizmalar + Ksenobiyotikler                                                                             |

Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz oksidaz elektrodudur. Bunu renal fonksiyon testleri için geliştirilen üre ve kreatinin elektroduları ile kas gücünü ölçmeye yönelik laktat elektrodu izlemiştir. İnsan vücuduna implante edilebilen biyosensörler de geliştirilmiş olup bunlar biyolojik sıvılar vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analiz imkanı verirler ki, özellikle ameliyat sırasında bu bilgilerin kesintisiz sağlanması çok önemlidir. Biyosensörlerin, ilaçların vücuttaki düzeylerinin ayarlanması ve kontrolünde kullanılması yakın bir gelecekte gerçekleştirilebilecektir. Yapay pankreas çalışmaları buna güzel bir örnektir.

Son yıllarda analizatörlere enzim elektroduları monte edilmiş ve yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Elektrolitlerin bileşimi, kan gazları ve anahtar metabolitler diyagnostik açıdan çok değerli bilgiler verir. Biyosensörlerin gelecekte önemli uygulamalarından biri superoksit ve nitrik oksit gibi kısa ömürlü ve hormonlar ve nörotransmitterler gibi düşük konsantrasyonlu maddelerin in vivo tayinidir. Ayrıca biyoproseslerin nükleik asit düzeyinde izlenmesi, ilaçların reseptörlere etkisi ve özellikle

transmitter – reseptör etkileşimi de biyosensörlerin gelecekteki önemli tıbbi uygulamaları olacaktır.

Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere birçok monosakkarid, amino asitler, organik asitler (laktik asit) Üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalardaki yabancı maddeler (pestisidler, toksinler ve yabancı hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks parametreler için de biyosensörler hazırlanabilir. Günümüzde gıda zehirlenmelerinin gittikçe artması toksik ve mikrobiyal kirleticilerin daha hızlı tayinini zorunlu kılmaktadır. Biyosensörler yardımı ile bu tayin iki şekilde başarılıdır.

I. Antigen – antikor reaksiyonu veya DNA hibridizasyonu vasıtası ile mikroorganizmaların doğrudan tayini (immuno sensörler + DNA sensörleri).

II. Mikrobiyal kontaminasyonun gıdanın metabolik değişimi üzerinden indirekt tayini ( Enzim sensörleri )

İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede biyosensörler kullanılabilir. Uyuşturucu arayan köpeklerin yerini biyosensörler alabilir. Böylece özellikle gümrüklerde, karakollarda zaman kazanılacaktır.

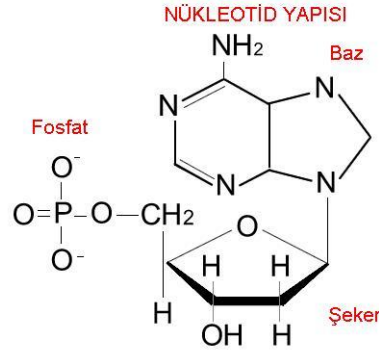
Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır. Savaş durumunda kimyasal ve bakteriyolojik silahlara karşı korunma olasılığı çok zordur. Çünkü bunların algılanması kolay değildir. Ancak biyosensörler sayesinde bu algılama mümkün olabilmektedir. Birçok kimyasal savaş maddesinde organofosfor bileşikler bulunur ve bunlar da kolinesteraz enzim sensörleri ile belirlenir. Bakteriyolojik silahlardaki virüs, bakteri ve toksik ajanlar diğer bazı biosensörler ile saptanabilmektedir. Biyosensör piyasası günden güne gelişmektedir. 2000 yılında 1.4 milyar dolarlık bir piyasaya ulaşacağı bunun % 45' i tıp , % 22 'si gıda , % 17 'si çevre koruma ve biyoteknoloji, kalan % 16 'sının ise diğer sektörlere yönelik olacağı beklenmektedir. (Telefoncu, 1999)

## 2.2.6. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Yapıları

### Nükleik asitler ve DNA

Nükleik asitler genetik bilgilerin kodlandığı makro moleküllerdir. Genetik bilginin nesilden nesile aktarılmasını sağlarlar. İki tip nükleik asit vardır. Bunlar DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit) olarak isimlendirilirler.

Genler, DNA'daki bazı kimyasal dizilimler olan nükleotidlerden meydana gelmiştir. Çoğunluk kromozomların içerisinde bulunurlar Bir nükleotidin yapısında şeker grubu, pürin veya pirimidin bazı ve fosfat grubu vardır. Belirli tür ve sayıdaki nükleotidlerin belirli bir diziliş sırasına göre 3'-5' fosfodiester bağları ile birbirlerine bağlanarak polinükleotid zinciri oluşturmaları sonucu nükleik asitlerin primer yapısı oluşur. Bu bağlanma şeker molekülünün 3' konumundaki karbonunun, kendinden sonra gelen nükleotidin şeker molekülünün 5' konumundaki karbonuna bağlanması ile gerçekleşir. Nükleik asit yapısındaki şekere göre deoksiribonükleik asit (DNA) ya da ribonükleik asit (RNA) adını alır.

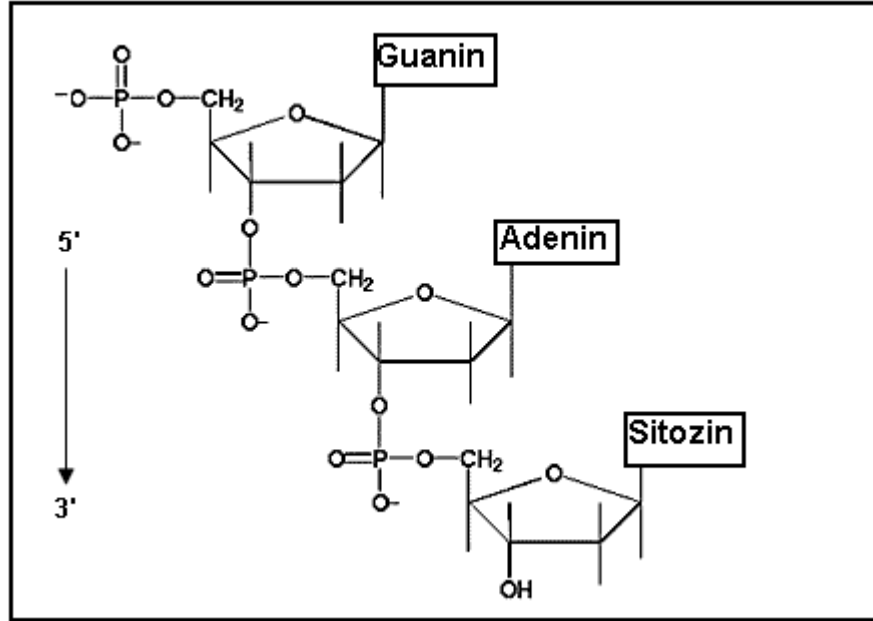


**Şekil 2.29.** Nükleotitin yapısı

Nükleik asitlerin organik bileşikler Pürin (Adenin, Guanin) ve Pirimidin (Urasil, Timin, Sitozin) bazlarıdır. Urasil pirimidin bazlarına dahil olup yalnızca RNA'da bulunur. Sekonder yapı; uygun pirimidin ve pürin bazları hidrojen bağları ile birbirine bağlanarak eşleşirler. Şeker grubu ise nükleik asitlerin ana omurgalarını oluşturduğu için



pürin ve pirimidin bazları kadar önemli moleküllerdir. Polinükleotidler omurgada bulunan fosfat gruplarından dolayı asidik karakterlidir.

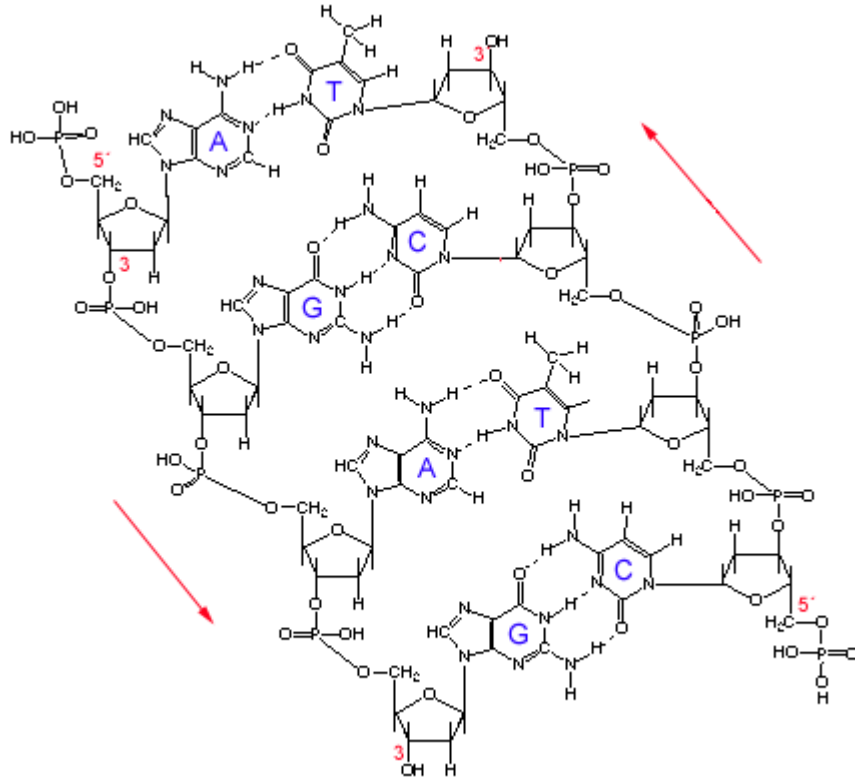


**Şekil 2.30.** Primer yapıdaki 5' → 3' yönünde ssDNA' nın yapısı

Chargaff tarafından ortaya konan DNA moleküllerine ait X-ışınları difraksiyon verileri, DNA molekülünde adenin (A) ve timin (T) miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğunu göstermektedir. Buna dayanarak yapılan çalışmalarda 1950 yıllarında Watson, Crick ve Wilkins DNA yapısının çift zincirli heliks şeklinde bir yapı olduğunu ortaya koymuştur. **Şekil 2.31** DNA çift sarmalını göstermektedir. Bu zincirler boyunca pürin ve pirimidin bazları bulunmaktadır ve bu bazlar karşılıklı hidrojen bağları ile bir arada tutulmaktadır. Bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından çift sarmal DNA molekülünün iki zinciri birarada tutulmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmal iç kısımda fosfat ve şeker omurgası ise dış kısımda yer aldığı için sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pirimidin bazları çift sarmal boyunca karşılıklı olarak birbirleriyle spesifik olarak bağlanırlar. Buna göre yapıda; Adenin (A) ile Timin (T), Guanin (G) ile de Sitozin (C) baz çiftlerini oluşturur.

Bu sayede, bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde ikinci zincirdeki baz dizisi de bulunabilmektedir. A–T baz çiftinde iki, G–C çiftinde üç hidrojen bağı bulunmaktadır. Bazlar arasında bulunan bu hidrojen bağları zayıf olduklarından DNA ısıtıldığında, heliks yapısı bozularak ikiye ayrılır. **Denatürasyon** adı verilen DNA heliks yapısının bozulması 260 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülerek gözlemlenebilmektedir. G ve C arasında üç hidrojen bağı ( $G \equiv C$ ) bulunduğundan yüksek derişimde G ve C içeren DNA iki hidrojen bağı taşıyan A ve T ( $A = T$ ) bulunduran DNA yapısına göre daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. Uygun şartlar altında çift zincirli DNA tekrar oluşabilir, bu işlem **renatürasyon** olarak isimlendirilir. (Devran, 1998; Sinden, 1994; Onat ve Emerk, 1997).

Molekül içerisindeki nükleotid bağlarını parçalayan nükleaz enzimlerine **endonükleaz**, iki uçtan parçalayanlara ise **ekzonükleaz** adı verilmektedir.

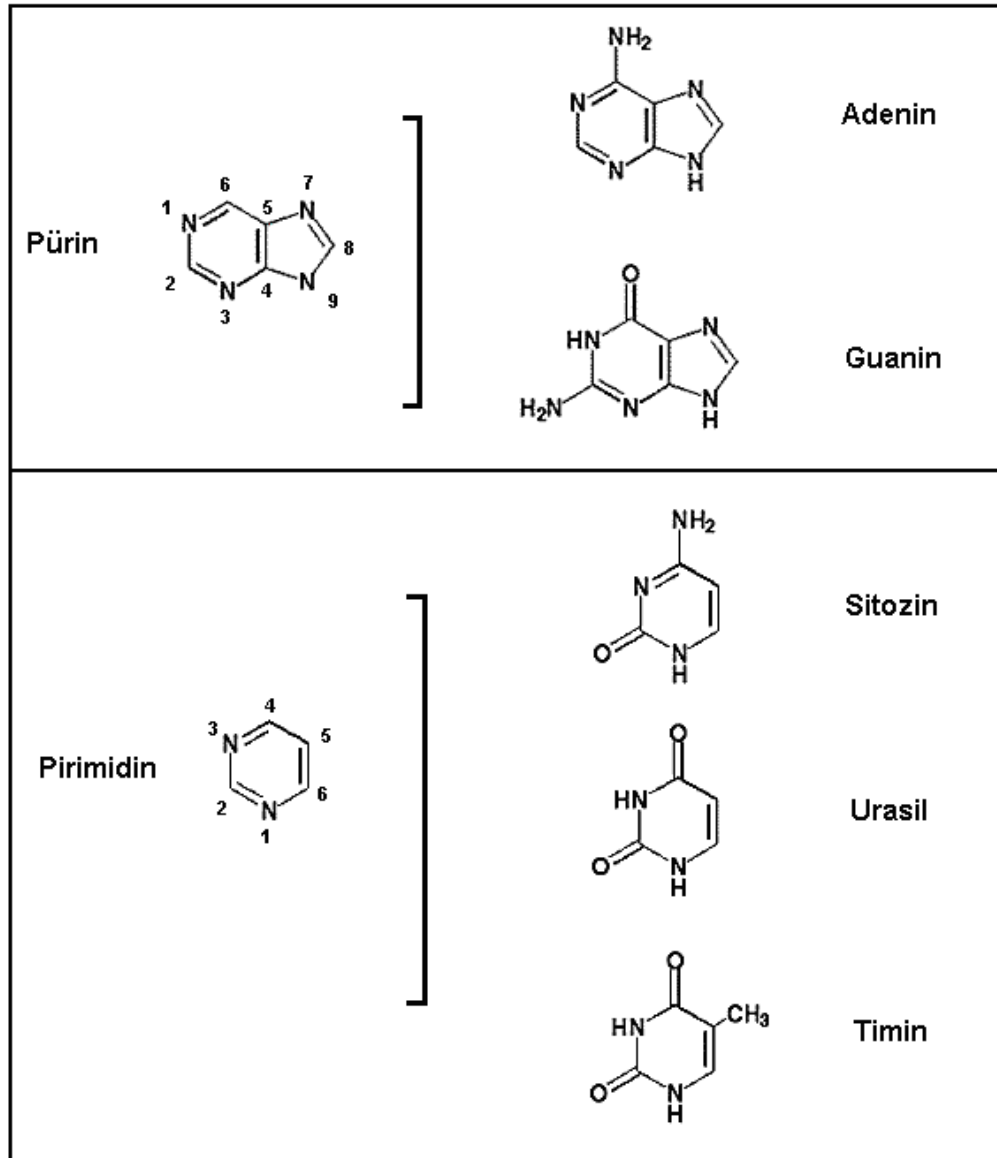


**Şekil 2.31.** DNA çift sarmal yapısı

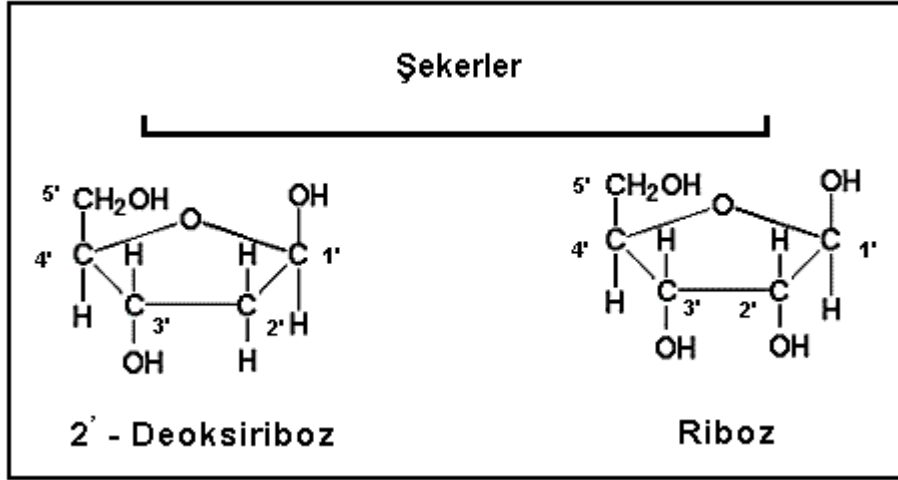
Çift sarmal şeklindeki molekülün bir zinciri  $5' \rightarrow 3'$  yönüne doğru, diğeri ise  $3' \rightarrow 5'$  yönüne doğrudur. Heliks içinde, iki zincirin arasındaki üç boyutlu sistemdeki ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük oluk (minör) oluşturmak şeklindedir. Çift sarmalın dış yüzeyinde zincirler bulunmaktadır.

Bu zincirlerden her biri kovalent bağlılığı sağlayan fosfodiester köprülerinin bulunduğu fosfat ve pentoz gruplarından oluşmuştur. DNA çift sarmalın her iki zinciri, pürin ve pirimidin bazlarının arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulmaktadır.

Watson ve Crick tarafından 1953 yılında önerilen ilk DNA yapısı, sağa doğru yönelmiş, her dönüşte 10 nükleotidi bulunan ve küçük oluğa mükemmel yerleşen bağlı su ile stabilize olabilen yapıya sahiptir. DNA dehidrate edildiği zaman, yapısal değişikliğe uğrayarak A-DNA adını almaktadır. A-DNA da sağa doğru yöneliktir ve her dönüşünde 11 nükleotid bulunmaktadır. Çift sarmalın çapı, pentoz gruplarının yapılanmasıyla genişlemektedir. Bu durumun bir sonucu olarak DNA'nın boyu kısalmaktadır (Brett ve ark, 1997).



**Şekil 2.32.** Nükleik asitte bulunan organik bazların kimyasal yapısı ve sınıflandırılması.



**Şekil 2.33.** Nükleik asitte bulunan şekerlerin kimyasal yapısı.

### **Peptik nükleik asitler (PNA)**

DNA'nın omurgasını oluşturan negatif yüklü deoksiriboz–fosfat omurgasının, amit bağları ile bağlı peptide benzer, nötral bir yapıyla değiştirilmesi sonucu PNA'lar elde edilir. PNA, bir DNA analogudur. Negatif yüklü iki DNA yapısı hibridizasyona dayalı çalışmalarda elektrostatik olarak birbirini iter. PNA nötral yüklü olduğu için bu dezavantajı ortadan kaldırır. Ayrıca PNA'lar sıcaklığa ve enzimlere dayanıklıdır. Yüksek ısılarda denatüre olmazlar.

## DNA ile İlgili Bazı Terimlerin Tanımlamaları

Aşağıda DNA baz dizilerinin yazılımı ve bazı terimler ile ilgili temel bilgiler hakkında kısa bilgiler verilmiştir (Devran, 1998; Sinden, 1994).

**Oligonükleotid:** Birden çok nükleotidin yanyana gelmesiyle oluşan yapıya oligonükleotid denir.

**Dinükleotid:** İki nükleotidin yanyana gelmesiyle oluşan yapıya denir.

**Trinükleotid:** Üç nükleotidin yanyana gelmesiyle oluşan yapıya denir.

**Tekrarlayan oligonükleotidler:** Polimer içerisinde, tekrarlanan tek bir nükleotid, iki nükleotid veya üç nükleotid, tekrarlayan oligonükleotidler ifade eder. Tekrarlayan mononükleotide poly (A), dinükleotide poly (AT), trinükleotide poly (GAT) örnek verilebilir.

**Çift sarmal tekrarlayan polimerler:** Tekrarlayan baz çiftlerinden oluşan ve 5'→3' polaritesine sahip polimerlerdir. Nokta ile ayrılarak ifade edilirler. Örneğin mononükleotid gösterilişine, poly(A).poly(T) (veya poly(dA).poly(dT) şeklinde gösterilebilir), dinükleotide poly(AT).poly(AT), trinükleotide poly(CAT).poly(ATG) örnek verilebilir.

**Baz çifti:** Baz çifti, birbirinin karşılığı olan iki baz anlamına gelir. Bazların arasına nokta konularak ifade edilir. Örneğin, A.T veya G.C baz çiftleri gibi.

**Prob:** Sahip olduğu baz dizilimi bilinen oligonükleotid.

**Hedef dizi (Target):** Prob dizisinin karşılığını içeren oligonükleotid.

**Yanlış eşleşen dizi (Mismatch):** Bir bazı veya birden fazla bazı hedef diziye karşılık gelmediği için, hedef diziyle tam olarak eşleşemeyen oligonükleotid.

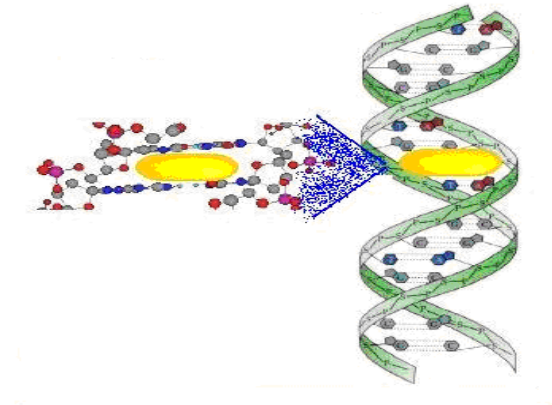
**Rasgele dizi (Non-complementary):** Tüm bazları hedef diziye karşılık gelmeyen oligonükleotid.

**Mutasyon:** Nükleik asitlerdeki baz dizilerinde tabii yollarla ya da kimyasal veya radyoaktif herhangi bir mutajen ajan vasıtasıyla meydana gelen değişimlere mutasyon adı verilir. Farklı insan genomlarında yaklaşık her 200 nükleotidte bir nükleotid farklıdır buna polimorfizm denir. DNA replikasyonu, fiziksel veya kimyasal etmenler ile DNA'da kalıcı hasarlar ortaya çıkmaktadır.

DNA'daki bir ya da birkaç baz ile ortaya çıkan mutasyona nokta mutasyonu adı verilir. Tek bir bazda oluşan nokta mutasyonu en yaygın görülen türüdür. Bu durum herhangi bir bazın kendi tamamlayıcısı olan baz dışındaki bir baz ile birleşmesi ile meydana gelir.

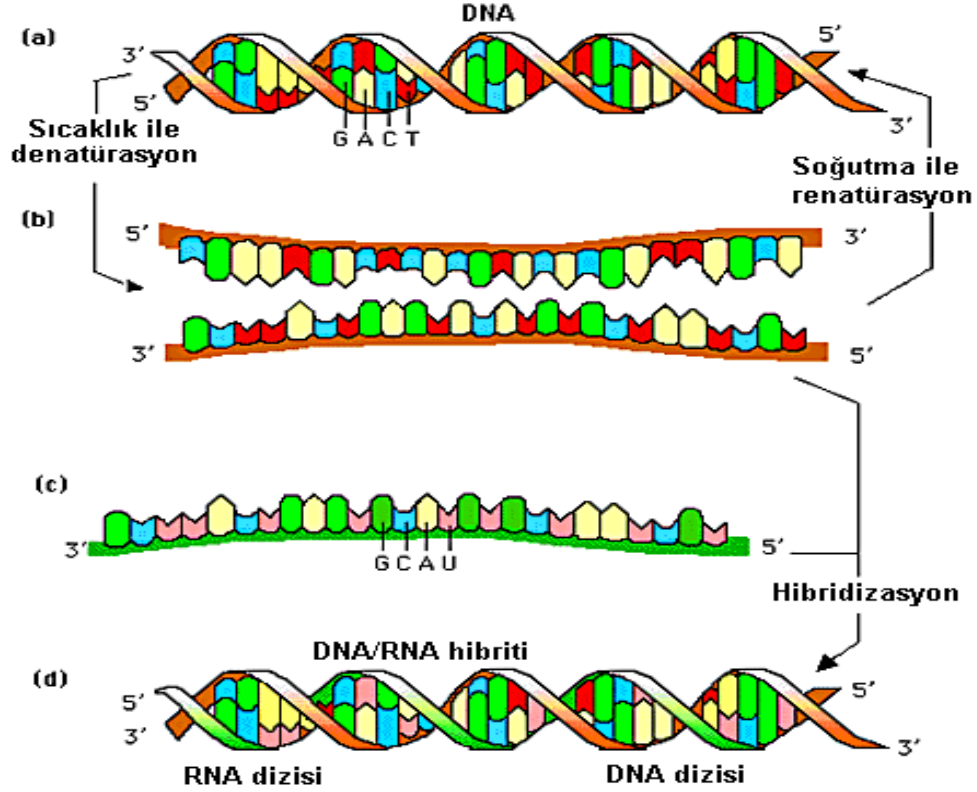
**Gen:** Kalıtımın temel, fiziksel ve işlevsel birimidir. Ortalama 1500 nükleotitten oluşmuş canlının kalıtsal özelliklerinden herhangi birini taşır. Her gen, protein veya RNA molekülü gibi özel bir işlev taşıyan kromozomların belli bir noktasındaki nükleotid dizilerinden oluşur.

**İnterkalasyon:** Düzlemsel bir halka sistemine sahip olan bazı maddelerin DNA baz çiftleri arasına yerleşerek, güçlü bir şekilde bağlanması olayıdır (Bertino, 1992; Dökmeci, 1992). Maddenin yapısına bağlı olarak, bu etkileşim tersinir ya da tersinmez şekilde gerçekleşmektedir (Wang ve ark., 1996c). İnterkalasyon, DNA'da zincir kırılmasına yol açarak ve DNA senteziyle DNA'ya bağımlı RNA sentezini bozmaktadır. Bu maddeler Topoizomeraz (II) enzimini inhibe ederler. İnterkale olabilen bazı ilaçların etki mekanizmaları, bu şekilde açıklanmaktadır.



**Şekil 2.34.** İnterkalasyon

### Nükleik asit (DNA) Hibridizasyonu



Şekil 2.35. Nükleik Asit Hibridizasyonu

Nükleik asit hibridizasyonu, karşılığı olan baz çiftlerinin, özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kararlı bir dubleks molekül oluşturması işlemidir (Bej, 1996).



### 2.2.7. DNA Biyosensörleri

Bir biyosensör, birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çevirici sistemden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısım, analizi yapılacak madde ile etkileşime girerek onu tanır. Biyosensör, biyokimyasal kısmını oluşturan biyolojik materyel DNA olduğunda, DNA biyosensörü adını alır (McGown ve ark., 1995; Mikkelsen, 1996; Palecek 1996; Steel ve ark, 1998; Wang ve ark 1998d). DNA biyosensörleri, dizisi bilinen hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (Mikkelsen, 1996; Wang ve ark, 1997a) veya bu yüzey ile etkileşime giren maddelerin tayininde kullanılabilir (Brett ve ark, 1998; Wang ve ark, 1997c).

Alışagelmiş bir tasarıma göre; tek sarmal prob (baz dizisi belli oligonükleotid) dizisi tanıma tabakasına (elektrot, kristal, çip) immobilize edilir, tanıma tabakasında baz çifti etkileşimi ile yüzeyde hedef DNA dizisi oluşturulur. (Drummond ve ark., 2003).

Genelde hedef DNA tanıma yüzeyine tutturulur, hibritleşme sonucu oluşan elektrik sinyalinin yararlanılarak analiz yapılır. DNA hibridizasyon biosensörler genelde tek sarmal bir oligonükleotid probunun çevirici yüzeye immobilizasyonu temeline dayanır. Burada amaç, hibritleşme ile hedef dizisinin belirlenmesidir (Tomschik ve ark., 1999; Molinier-Jumel ve ark., 1978).

DNA ve diğer moleküllerin arasındaki etkileşim; in-vivo DNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonu, genlerin ve türlerin mutasyonu, bazı DNA'ya hedeflenmiş ilaçların mekanizmaları, bazı hastalıkların tayini, bazı sentetik kimyasal nükleazların hareket mekanizmaları ile ilgili yaşam bilimlerinde çok önemli bir ana konudur. Moleküler biyoloji ve biyoteknolojideki son yıllarda görülen gelişmeler, DNA'ya dayalı elektrokimyasal biyosensörler için ümit verici ve heyecan verici olanakların bir basamağını oluşturmaktadır. DNA' ya dayalı elektrokimyasal biyosensörler alanındaki gelişmeler oldukça dikkat çekicidir (Brett ve ark., 1996; Palecek, 1995; Pividori ve ark, 2000; Richardson ve ark., 1981). Antikor ve enzimlerden farklı olan nükleik asit tanıma tabakası, çok kararlı olan, kolaylıkla oluşturulabilen ve tekrar kullanım için

yenilenebilen bir tabakadır. (Brett ve ark., 1997; Steinbach ve Hurtubise, 2000; Ozsoz ve ark., 2002; Wang ve ark., 2005)

DNA molekülünün dört nükleobazı arasında yüksek elektron yoğunluğu ve düşük yükseltgenme gerilimi nedeniyle guaninin üzerinden araştırmaların gerçekleştirilmesi tercih edilen bir durumdur. (Stenken ve Jovanovic, 1997) Birçok elektrokimyasal DNA biyosensörde çevirici (transistör) olarak geleneksel altın ve karbon elektrotlar kullanılmaktadır (Lucarelli ve ark., 2004). Çevirici olarak perde baskılı elektrotların kullanımının, yerinde (on-site) DNA analizlerini kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (Zen ve Kumar, 2003). Son zamanlarda tek kullanımlık kalem grafit elektrotların geleneksel karbon elektrotlarla kıyaslandığında ilgi çekici performansı rapor edilmiştir; ayrıca kalem grafit elektrotlarla oluşturulan biyosensörlerin mikro fabrikasyon perde baskılı elektrotlara bir alternatif olduğu belirtilmiştir. (Wang ve Kawde, 2001; Kara ve ark., 2007)

1981 yılında Brabec doğal ve sentetik nükleik asitlerin karbon elektrotlarla elektrokimyasal yükseltgenmelerini saptamıştır. Diferansiyel puls voltametri tekniği ile karbon elektrotlarda çift sarmal DNA yapısındaki adenin-timin ve guanin-sitozin baz çiftlerinin iyi ayrımlı yükseltgenme pikleri verdiğini belirtmiştir. (Brabec, 1981)

1988 yılında Palecek, nükleik asitlerin katodik sıyırma voltametrisi ile nanomolar derişimde tayin edilebileceğini belirtmiştir. Nükleik asitlerin tayininde akümülayon ve immobilizasyon basamağını içine alan adsorptif sıyırma voltametri tekniği ile duyarlılığın arttığını civa elektrotla göstermiş, bunun da DNA'nın yapısı ile etkileşim çalışmalarında modern bir yaklaşım olduğunu belirtmiştir. (Palecek E., 1988)

Wang ve ark., (1999), doğrudan ve güvenilir bir şekilde DNA'nın elektrokimyasal olarak tayin edilmesinin, DNA hasar ve etkileşimlerinde, nükleik asitlerin elektroforetik ayrımlarında, modern DNA hibridizasyon çiplerinin geliştirilmesinde oldukça önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Alette zemin düzeltmesinin yapılarak, adsorptif sıyırma voltametri tekniğinin DNA ve RNA'nın oldukça eser miktarda tayinlerine olanak tanıdığını, geleneksel katı elektrot voltametrisinin olumsuzluklarını yok ettiğini göstermişlerdir.

Oliveria-Brett ve ark., (2004), DNA'nın tüm monofosfat nükleotidlerinin geniş bir pH aralığında camı karbon elektrotta diferansiyel puls voltametri tekniği ile voltametrik yükseltgenmesini araştırmışlardır. Deneysel değişkenlerden olan elektrot çapı, destek elektroliti bileşimi ve pH; en iyi pik akımı ve pik gerilim ayrımının görüldüğü koşullara ayarlanmıştır. Geliştirdikleri yöntemin fizyolojik pH'da DNA'nın dört bazının eşzamanlı ve iyi bir ayırım sağladığını ve gözlenebilir sınırının nanomolar düzeyinde olduğunu belirtmişlerdir.

Tümör oluşumu, kanserojenik kimyasallar ve onların metabolitleri tarafından meydana gelen DNA katım ürünleri (addükt) ile doğrudan ilişkilidir. Bundan dolayı DNA etkileşim temellerinin araştırılması bazı DNA hasarlarının mekanizmalarının anlaşılması ve koruyucu önlemlerin geliştirilmesinde oldukça önemli olup (Baird ve ark., 2005; Poirier ve ark., 2000; Madden, 2003; Wogan ve ark., 2004), ayrıca bu etkileşim çevre, klinik ve gıda örneklerindeki tüm yaşayan organizmalar için tehlikeli olan bileşiklerin saptanmasında ve miktarının belirlenmesinde kullanılabilir (Mascini, 2001; Ohe ve ark., 2004; Jakubowski ve ark., 2005; Hyung ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2007).

#### **2.2.7.1. DNA veya Prob Dizilerinin Elektrot Yüzeyine İmmobilize Edilme**

##### **Yöntemleri**

DNA biyosensörlerinde analizi yapılacak maddenin en etkin bir şekilde tanınması için, tanımayı gerçekleştirecek biyolojik materyal DNA' nın elektrot yüzeyine sağlam bir şekilde tutturulması gerekmektedir. Eğer yüzeye probun en kolay ve sağlam şekilde tutturulması sağlanırsa, bu probun daha sonra hedefi ile hibritleşmesi daha kolay olacak ve oluşan hibritin çeşitli fiziksel ya da kimyasal etkenlerden etkilenip yüzeyden kopması gibi olumsuz etkiler de ortadan kalkacaktır. Tüm dünyada araştırmacılar bu teknik üzerinde deneyler yapmakta ve en düşük maliyetle ve en uygun özel bağlanmayı

sağlayacak tekniği bulmaya çalışmaktadırlar. DNA çiplerinde uygulanabilirliği araştırılan bu temel aşama çok büyük önem taşımaktadır.

Tutturma işlemi DNA biyosensörleri ile yapılan analizlerin temel aşamalarını oluşturmaktadır.

DNA elektrot yüzeyine üç teknikle tutturulur. Bunlar;

- Elektrostatik bağlanma
- Kovalent bağlanma (altın elektrot ve karbon elektrot için)
- Tiyol (-SH) grubu ile işaretli oligonükleotitin altın elektrot yüzeyine afinitesinden dolayı bağlanması' dır.

Elektrostatik bağlanmada; elektrot yüzeyine pozitif gerilim uygulanması, negatif yüklü fosfat omurgasına sahip olan DNA'nın yüzeye elektriksel çekim kuvvetleri sayesinde tutunmasını sağlar.

Kovalent bağlanmada, altın elektrotlar (tek kullanımlık perde baskılı altın elektrodlar da olmak üzere) altın nanopartiküller için ilk olarak 3-merkaptopropiyonik asit ya da *L*-sistein ile –SH gruplarının elektrod yüzeyine tutunması sağlanır. Burada –SH gruplarının altın metaline olan güçlü afinitesinden yararlanılır. Daha sonra *N*-hidroksisüksinimit (NHS) ve etil karbodiimmit (EDC) gibi kovalent ajanlar kullanılarak –NH<sub>2</sub> grubu ile işaretli probun yüzeyde güçlü şekilde tutunmasına olanak sağlayan zemin oluşturulur. Bu yöntem, özellikle de altın elektrot için özel olan yüzey kaplama yöntemidir. Eğer elektrot olarak altın değil de çeşitli karbon (grafit) elektrodlar kullanılırsa bu durumda 3-merkaptopropiyonik asit gibi bir ajana gereksinim duyulmamaktadır. Sadece kovalent ajanlarla yapılan kaplamada –NH<sub>2</sub> grubu ile işaretli prob yüzeye doğrudan güçlü şekilde bağlanmaktadır (Coulet, 1991; Erdem ve Ozsoz, 2001a, Gülmez, 2005)

### 2.2.7.2. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile DNA Dizi Algılanması

Çeşitli yöntemlerle biyolojik örneklerden özgün DNA dizisi saptanması biyomedikal alanda çok önemlidir. Hastalık tanısında insan, virüs ve bakteri baz diziliminin tayini ile pek çok kalıtsal hastalıklara neden olan mutasyonlar artık saptanabilmektedir.

Hibridizasyon tayinlerinde kullanılan çeşitli immünokimyasal ve voltametrik metodlar karşılaştırıldığında birkaç örneğin çalışıldığı durumda voltametrik yöntemlerin daha hızlı yanıt verdiği gözlenir, ancak büyük miktarda bir seri benzer örnek analizlenecekse, iyi bir otomasyona sahip EIA gibi immünokimyasal tekniklerin kullanılması daha uygun olmaktadır (Palecek, 1996).

Diziye özgün DNA biyosensörleri, bir çevirim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmuştur. DNA biyosensörlerinin esası, DNA bazlarının hibridizasyonuna dayanır (Wang ve ark, 1998a).

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, aranan hedefin baz dizisinin karşılığı olan 20-40 baz gibi kısa bir baz dizimine sahip olan sentetik tek sarmallı DNA (ssDNA) oligomerin (veya “PROB“ olarak isimlendirilir), elektrot yüzeyine bağlanmasına dayanmaktadır. Hedefi içeren bir örnek çözeltisine sensörün uygulanması, ile elektrot yüzeyinde hibrit oluşur. Elektrokimyasal ölçümlerde elektrot yüzeyinde oluşan hibrit iki yöntemle tayin edilir; bunlardan ilki bir elektroaktif indikatör aracılığıyla (örneğin bir redoks-aktif katyonik metal kompleksi) yapılan tayindir. Bu yöntemde yüzeyinde hibrit oluşan elektrot, indikatörü içeren çözeltiye daldırılır ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir (Erdem ve ark, 2000; Erdem ve ark, 1999; Gooding, 2002; Millan ve Mikkelsen, 1993; Wang ve ark, 1996c).

Diğer yöntem ise DNA bazlarından en elektroaktif olan Guanin bazının 1.0 V’ da verdiği yükseltgenme sinyalinin farklılanmasından yola çıkılarak yapılan tayindir (Wang ve ark, 1998a).

### **İndikatöre Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemleri:**

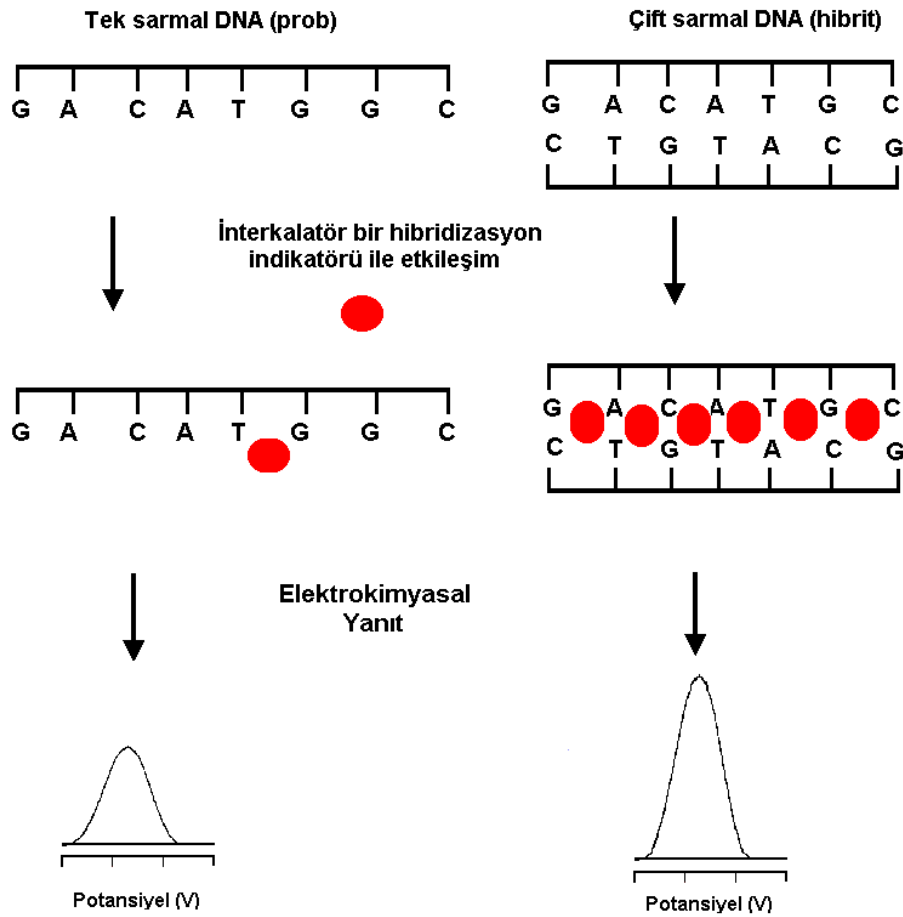
İndikatöre dayalı DNA dizi algılanması, ya DNA'ya interkale olabilen (metal kompleksleri, antibiyotikler) (Barton ve ark, 1986; Cai ve ark, 1997; Carter ve Bard, 1987; Carter ve ark, 1989; Johnston ve Thorp, 1996; Kolakowski ve ark, 1996; Millan ve Mikkelsen, 1993) veya DNA dizisindeki bazlarla özgün olarak etkileşen (MB,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ , vb.) elektroaktif maddeler (indikatör) ile tayin edilebilmektedir (Erdem ve ark, 1999; Takenaka ve ark, 1990). Elektrokimyasal çeviriciler, hibridizasyon olayını analitik sinyale çevirmede etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Carter ve Bard, 1987; Carter ve ark, 1989; Collins ve ark, 1998; Coulet, 1991; Devran, 1998).

Elektrot yüzeyinde oluşan hibrit ile etkileşen indikatörün neden olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır (Mikkelsen, 1996; Millan ve ark, 1994; Wang ve ark, 1996a).

Elektroaktif bir maddenin indikatör olarak kullanılabilmesi için ssDNA ve dsDNA ile etkileşimi sonucu alınan yanıtlar arasında anlamlı bir fark olması gerekmektedir.  $\text{Ru}(\text{II})$  (Barton ve ark, 1986; Johnston ve Thorp, 1996),  $\text{Co}(\text{III})$  (Cai ve ark, 1997; Carter ve Bard, 1987; Carter ve ark, 1989; Takenaka ve ark, 1990),  $\text{Os}(\text{II})$ ,  $\text{Os}(\text{IV})$  (Lukasova ve ark, 1982; Takenaka ve ark, 1990)'ün 1,10-fenantrolin ve 2,2'-piridin kelatları hibridizasyon indikatörü olarak sıklıkla kullanılan maddelerdir.

### İnterkalatör Madde ile DNA Dizi Algılama Yöntemi:

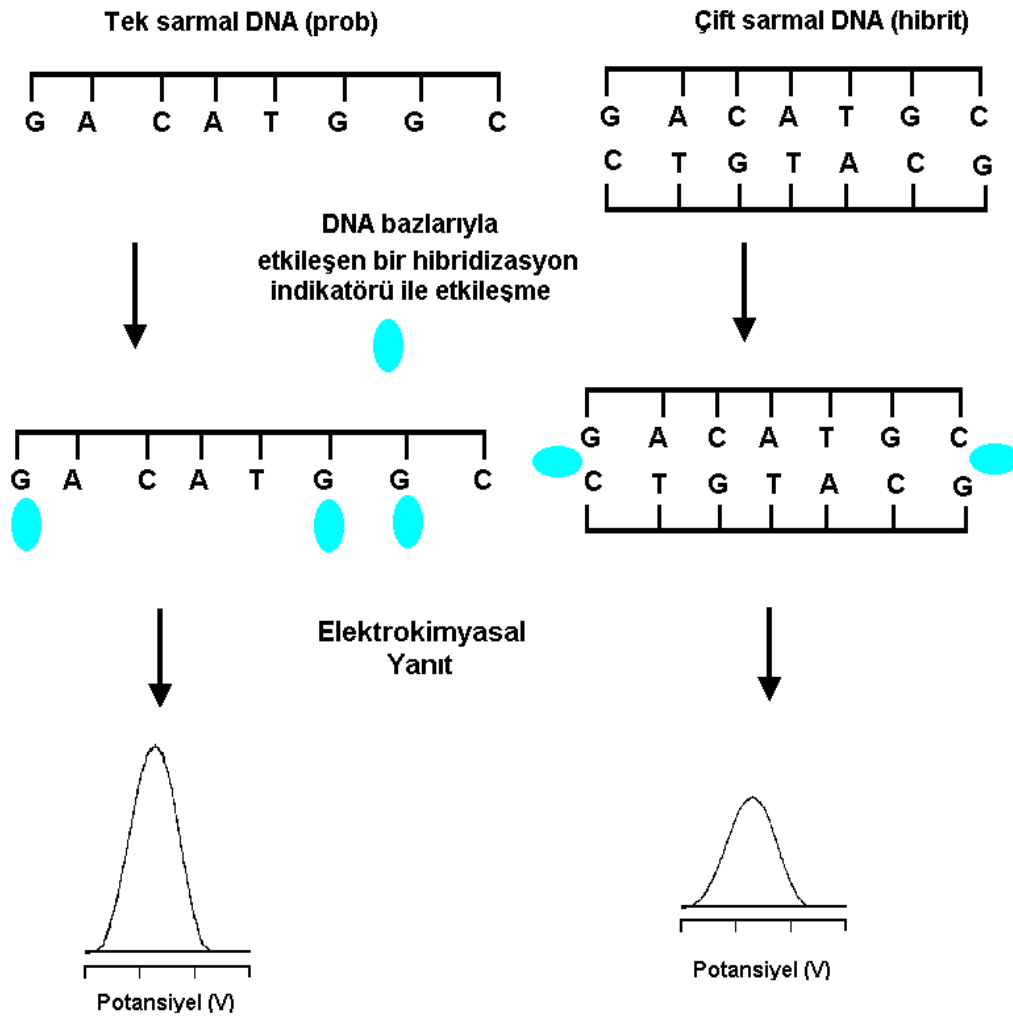
İnterkalasyon; bir maddenin DNA çift sarmalı arasına girip birikmesidir. Bu durumda; Şekil 2.36’ da görüldüğü gibi; çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşimden sonra alınan madde sinyali maddenin birikmesinden dolayı tek sarmal DNA (ssDNA) ile etkileşimden sonra alınan madde sinyaline göre oldukça yüksektir (Barton ve ark, 1986; Cai ve ark, 1997; Carter ve Bard, 1987; Carter ve ark, 1989; Johnston ve Thorp, 1996).



**Şekil 2.36.** İnterkalatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması

### DNA Bazlarının En Az Biriyle Etkileşen Bir İndikatör İle:

Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan madde DNA'nın bazlarından biriyle (özellikle Guanin) etkileşiyor olabilir. Bu durumda; Şekil 2.37 'da görüldüğü gibi; tek sarmal DNA (ssDNA) 'da bazlar açıkta olduğundan dolayı alınan madde sinyali, hibridizasyondan sonra oluşan çift sarmal DNA (dsDNA) 'da bazlar kapalı olduğundan dolayı alınan madde sinyaline oranla oldukça yüksektir (Millan ve Mikkelsen, 1993).

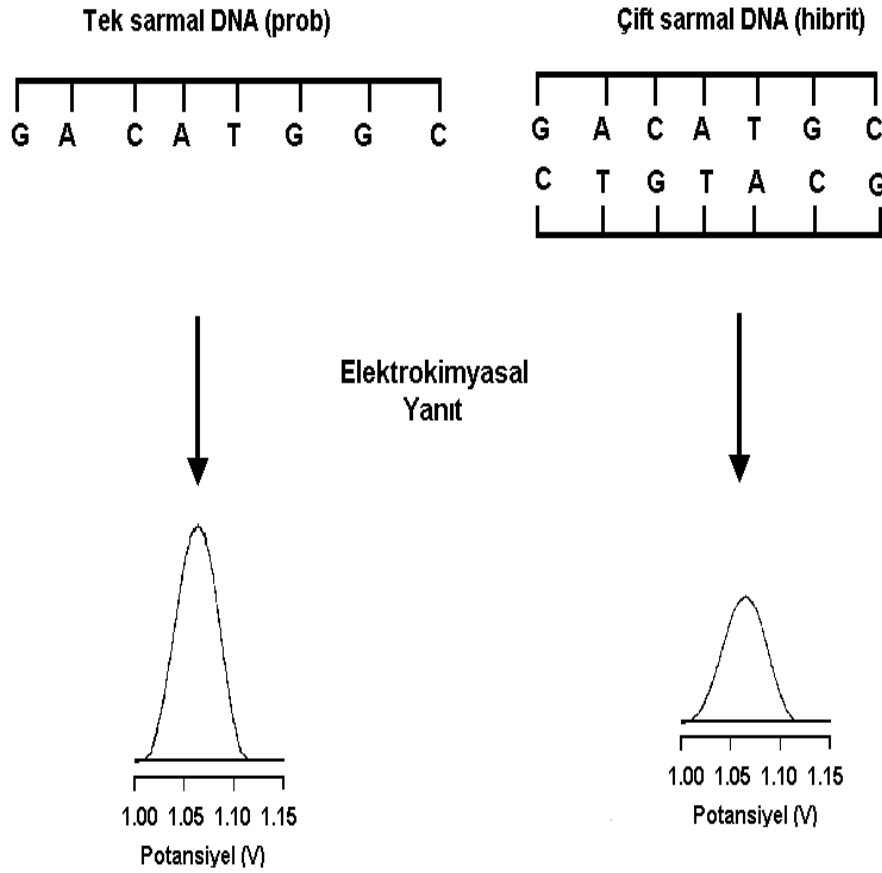


**Şekil 2.37.** DNA bazlarından biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması.



### İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemleri:

Elektrot yüzeyine tutturulan tek sarmal prob diziye (ssDNA) ait Guaninlerin verdiği elektrokimyasal yanıt ile, probun komplementeriyle birleşmesinden sonra oluşan çift sarmal DNA'ya ait guaninlerden alınan elektrokimyasal yanıt arasında Şekil 2.38'de görüldüğü gibi önemli bir farklılık vardır. Bu farklılık hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır (Erdem ve ark, 2004; Wang ve ark, 1998a; Wang ve ark, 1998c).



Şekil 2.38. İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi

### 2.2.7.3. İlaç-DNA Etkileşmesinin Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri İle

#### Algılanması

#### DNA – İlaç Etkileşmesine Dayalı DNA Biyosensörleri

Yeni sentezlenen birçok maddenin, ilacın, DNA hedefli ilacın tasarımı gerçekleştirilirken, bu maddelerin DNA ile etkileşimlerinin hızlı ve etkin bir şekilde aydınlatılması; bu çalışmaların amacı doğrultusunda daha hızlı bir şekilde ilerlemesini sağlayacaktır. Ayrıca çevresel atıkların, kimyasal maddelerin DNA ile etkileşimlerinin saptanması, bu maddelerin insan üstündeki olumsuz etkileri ile mücadele edebilmek açısından önemlidir.

Analizi yapılacak maddelerin DNA ile etkileşimleri üç yolla olur. Bunlar;

--Maddenin, nükleik asitin negatif yüklü şeker – fosfat omurgasına elektrostatik olarak bağlanması ile

--DNA çift sarmal yapısındaki büyük ve küçük oluklara bağlanma ile

--DNA' nın baz çiftleri arasına interkalasyon yapması

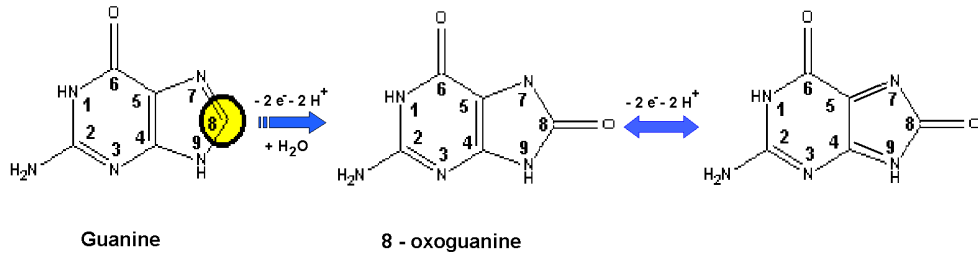
şeklinde sınıflandırılabilir.

DNA biyosensörleri kullanılarak DNA – ilaç etkileşimleri başarılı bir şekilde algılanabilmektedir. Bu algılama DNA' ya ait elektroaktif bazlar olan guanin/adenin sinyali üzerinden ya da analizi yapılacak ilacın elektrokimyasal sinyali üzerinden sağlanabilir. Bu sinyallerdeki değişimlere göre DNA – ilaç etkileşimleri hakkında yorumlar yapılabilir (Erdem ve Ozsoz, 2002).

DNA – ilaç etkileşimine dair literatürde pek çok yayın vardır. Bunlardan bir tanesinde; L. Wang ve arkadaşlarının antikanser bitkisel bir ilaç olan emodin ile diferansiyel puls voltametri tekniği ve dönüşümlü voltametri tekniği kullanarak yaptıkları çalışmada, emodin DNA çift sarmal yapısının içine interkale olarak, DNA

ile etkileştiği sonucunu bulmuşlardır (Wang ve ark 2006). Bir diğer çalışmada; H. Nawaz ve arkadaşlarının, kinolin türevi antibakteriyel etkiye sahip ciprofloxacin ile yaptıkları çalışmaya göre; ciprofloxacinin DNA' ya elektrostatik olarak ve interkalasyon yaparak bağlandığını göstermişlerdir (Nawaz ve ark 2006).

Özellikle bazı antikanser ilaçların DNA ile etkileşmelerinin değişik metodlarla (Firedman ve Borown, 1978; Levision ve ark, 1998; McGown ve ark, 1995; Müler ve Crothers, 1975) incelenmesinin yanı sıra, özellikle son yıllarda elektrokimyasal yöntemlere dayalı tayinler kullanılması elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin önemini arttırmaktadır. Kullanılan yöntem basit ve düşük maliyetli olup, hızlı ve seçimli bir şekilde, DNA ile etkileşme türü incelenen ve ilaç olarak hedeflenen maddenin az miktarlarında çalışmayı mümkün kılmaktadır.



**Şekil 2.39.** Guanin bazının yükseltgenmesi

Plambeck ve Lown (1984), kemoterapide antibiyotik olarak kullanılan Doksorubisin'in dsDNA ile etkileşiminin asılı civa damla elektrot yüzeyinde Adsorptif Transfer Sıyırma Alternatif Akım Voltametri tekniği ile incelemişlerdir. Doksorubisin'in DNA ile etkileşim sonunda interkalasyon sebebiyle ilacın sinyalinde azalma gözlenmiştir.

Wang ve ark., (1998d), kemoterapide antibiyotik olarak kullanılan Daunomisin'in dsDNA ile etkileşiminin perde baskılı karbon, karbon pastası ve dönen disk elektrot yüzeyinde kronopotansiyometrik, sıyırma analizi ve dönüşümlü voltametri teknikleri ile

incelemişlerdir. Daunomisin'in DNA ile etkileşim sonunda interkalasyon sebebiyle ilacın sinyalinde azalma gözlenmiştir.

Marin ve ark., (1998); Ozkan ve ark., (2004) kemoterapide antibiyotik olarak kullanılan Mitomisin C'in dsDNA ile etkileşiminin perde baskılı karbon ve asılı civa damla elektrot yüzeyinde Kare dalga ve dönüşümlü voltametri teknikleri ile incelemişlerdir. Mitomisin C'in DNA ile etkileşim sonunda asit ile aktive edilmiş ilacın sinyalinde azalma gözlenmiştir. DNA'nın guanin yükseltgenme sinyalinde de azalma görülmüştür.

Brett ve ark., (1998); Erdem ve Ozsoz (2001b). kemoterapide antibiyotik olarak kullanılan Mitoksantron'un dsDNA ile etkileşiminin camı karbon ve karbon pastası elektrodu yüzeyinde diferansiyel puls voltametrisi, dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametrisi teknikleri ile incelemişlerdir. Mitoksantron'un DNA ile etkileşim sonunda dönüşümsüz ve pH'a bağlı bir ilaç elektrooksidasyonu söz konusudur. DNA'nın guanin ve adenin bazına ait spesifik bir etkileşme gözlenmemiştir.

Wang ve ark., (1996c) fenotiyazin grubu ilaçlardan; prometazin, fenotiyazin, klorpromazin, tiyridazin ve proklorperazin ile dsDNA etkileşimlerini karbon pastası elektrot kullanarak potansiyometrik sıyırma analizi ve diferansiyel puls voltametrisi teknikleri ile incelemişlerdir. İlaçların DNA ile etkileşim sonunda interkalasyon sebebiyle sinyallerinde artma gözlenmiştir. DNA'nın guanin yükseltgenme sinyalinde de azalma görülmüştür.

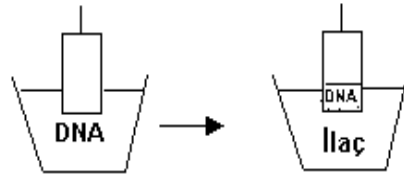
Brett ve ark., (1996) platin grubu bileşiklerden karboplatin ile dsDNA etkileşmesini camı karbon elektrot kullanarak diferansiyel puls voltametri tekniği ile incelemişlerdir. Karboplatin'in DNA çapraz bağlanması nedeniyle adenin sinyalinde artış gözlenmiştir.

Erdem ve ark., (2000); Xia ve ark., (1999) epirubisin ile dsDNA etkileşmesini karbon pastası ve camı karbon elektrot kullanarak dönüşümlü ve diferansiyel puls voltametri teknikleri ile incelemişlerdir. Epirubisin'in DNA etkileşiminde interkalasyon sebebiyle ilacın sinyalinde azalma görülmüştür.

İlaç-DNA etkileşimini elektrokimyasal biyosensörle tayin ederken izlenen yol şu şekildedir; Etkileşim öncesi ve sonrası mevcut ilaç sinyalindeki ve/veya DNA'daki elektroaktif bazlar, guanin ve adenin sinyalindeki değişim ölçülür ve bu değişime göre etkileşim hakkında yorum yapılır (Erdem ve Ozsoz, 2002).

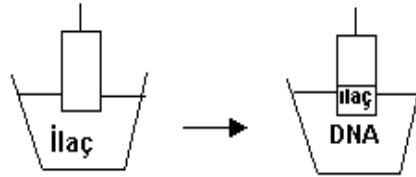
### A Elektrot yüzeyinde etkileşim

#### a. DNA modifiye edilmiş elektrot



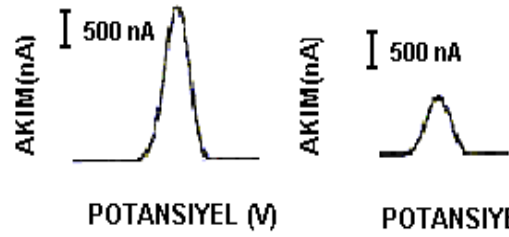
ELEKTROKİMYASAL SİNYALLER

#### b. İlaç modifiye edilmiş elektrot

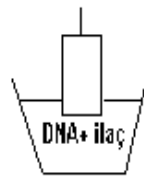


Etkileşim öncesi

Etkileşim sonrası



### B Çözelti içinde etkileşim



**Şekil 2.40.** İlaç-DNA etkileşmesine dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin

(genosensörlerin) tasarımının şematik olarak gösterilmesi: **A)** Çalışma elektrodu yüzeyinde etkileşimin **a)** DNA tutturulmuş elektrot, **b)** ilaç tutturulmuş elektrot kullanılması ile tayin. **B)** Çözelti fazında etkileşim.

Etkileşim basamağından sonra izlenen basamaklar: elektrodun yıkanması ve voltametrik teknikler kullanılarak elektrokimyasal ölçümlerin yapılması ve sinyallerin kıyaslanması; etkileşim öncesi ve/veya sonrası ilaç ve/veya DNA'nın voltametrik sinyalindeki artma veya azalmanın bulunması.

### 2.3. Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlik Testleri)

Analitik yöntemler, ilaç analizlerinde, biyolojik numune analizlerinde, biyoeşdeğerlik, biyoyararlanım çalışmalarında, farmakokinetik bilgilerin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında, ilaç etken maddelerinin nitel ve nicel analizlerinde, ilaç etken maddelerinin metabolitlerinin tayininde kullanılan yöntemlerdir.

Bu işlemlerin yapılabilmesi için iyi karakterize edilmiş, güvenilir sonuçların elde edilebileceği tamamen geçerli analitik yöntemlerin kullanılması veya geliştirilmesi gereklidir. Her yeni geliştirilen yöntemin validasyon sonuçları birbirinden bağımsızdır (Riley ve Rosanske 1993; Swartz ve Krull 1997; ICH 1994; Ahuya ve Scypinski 2001; Lunte ve Radzik 1996).

Yöntem validasyonu analitik işlemlerin istenilen kullanım için uygunluğunu gösteren parametrelerdir. Uygulanacak analitik işlemler için hangi tip validasyon karakteristiklerinin kullanılacağı belirlenmelidir. Geliştirilen bir yöntemin veya parametrelerinde ufak değişiklikler yapılmış bir yöntemin geçerli olabilmesi için mutlaka gerekli validasyon testlerinin ve ilgili hesapların yapılmış olması gereklidir (Riley ve Rosanske 1993; Swartz ve Krull 1997; ICH 1994; Ermer and Miller, 2005; Ahuya ve Scypinski 2001; Lunte ve Radzik 1996; Adamovics 1997; Braggio ve ark 1996; Shabir 2003; Papadoyannis ve Samanidou 2004; Mc Dowell 1999).

Amerikan Farmakopesine (USP 24) göre validasyon, analizi yapılacak madde için geliştirilen analiz yönteminin seçilen aralıkta uygunluğunu, doğruluğunu, duyarlılığını, tekrar edilebilirliğini, sağlamlığını belirtmektedir.

### 2.3.1. Validasyonun Genel İşlemleri

1. Cihazın kontrolü ve validasyonu, (tüm donanım ve yazılımlar için geçerlidir)
2. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için veya geliştirilmiş olan bir yöntemdeki parametrelerde yapılan değişikliklerden sonra yapılan validasyon,
3. Cihaz ve ilgili yöntem seçildikten sonra ve validasyonları yapıldıktan sonra ayırma yöntemleri için gerçekleştirilen Sistem Uygunluk Testleri (SUT). Bu testler FDA ve USP tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir.

Bir analitik yöntemin validasyonu; laboratuvar çalışmaları ile belirlenen ve istenen analitik uygulamaları için gerekli yöntem performans karakteristiklerinin bulunmasıdır. Performans karakteristikleri analitik parametreler cinsinden ifade edilir. Bu parametreler hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalarda kullanılan yöntemler için geçerlidir.

Biyoanalitik yöntemler; kan serum, plazma veya idrar gibi biyolojik sıvılarda etkin maddelerin veya metabolitlerinin; gaz kromatografi (GK), sıvı kromatografisi (SK) veya bunların SK-KS, GK-KS, SK-KS-KS, GK-KS-KS gibi kütle spektrometrisi (KS) ile kombinasyonları, Elektrokimyasal ve Radyokimyasal yöntemler gibi yöntemlerle miktar tayinlerini içerir.

### **2.3.2. Tipik Validasyon Karakteristikleri**

2.3.2.1. Doğruluk (Accuracy; Geri Kazanım(Recovery))

2.3.2.2. Kesinlik (Precision)

2.3.2.3. Seçicilik (Selectivity, specificity)

2.3.2.4. Teşhis Sınırı (LOD)

2.3.2.5. Tayin Sınırı (LOQ) veya tayin alt sınırı (LLOQ)

2.3.2.6. Doğrusallık

2.3.2.7. Duyarlılık

2.3.2.8. Çalışma Aralığı

2.3.2.9. Sağlamlık

2.3.2.10. Tutarlılık

2.3.2.11. Stabilité

#### **2.3.2.1. Doğruluk (Geri Kazanım)**

Analiz sonucu elde edilen değerin gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Bu aynı zamanda biyolojik sıvılardan tüketmenin etkinliğini de gösterir. Kullanılan cihazlardan yapılan ölçümlere dayalı olarak hesaplanır. Biyolojik sıvılarda çalışılırken geri kazanımın % 100 olması gerekmez.



Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişim için yapılır; alçak (tayin alt sınırında veya yakın konsantrasyonunda), orta (çalışma konsantrasyon aralığının ortasında yer alan bir konsantrasyonda) ve yüksek (çalışma konsantrasyon aralığının üst sınırlarında veya yakınında yer alan bir konsantrasyonda) derişim değerleri seçilerek kullanılır. Seçilen her bir konsantrasyon için minimum 5 tayin yapılmalıdır. Bu tayinlerden minimum 3 tanesi ortalama değerin % 15 inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki konsantrasyon için bu sapma % 20 yi geçmemelidir.

Geri kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir. Bunlar:

*Referans standart ile karşılaştırmak:*

Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Sonuçlar referans kabul edilen veya basılı olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır. Bu karşılaştırma işlemi için student-t ve Fisher (F) testleri kullanılır. Student-t testi ile iki yöntemin ortalamaları arasındaki, F testi ile de standart sapmaları arasındaki farklılık karşılaştırılır. Hesapla bulunan t ve F değerleri çizelgelerde verilen teorik t ve F değerleri ile kıyaslanır. Hesapla bulunan değerlerin çizelgede yer alan değerlerden küçük oluşu geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğunu gösterir. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (%BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir.

$$\%BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

$$\%BH = \frac{GD - \bar{X}}{GD} \times 100$$

GD: Gerçek Değer

SS: Standart Sapma

$\bar{\bar{X}}$  : Ortalama Değer

*Kör matris ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek:*

Farmasötik dozaj formları gibi matris etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir. Analizi yapılacak madde boş matrise değişik derişimlerde eklenir. Bu matris ilaç dozaj formları için (etken maddesiz) yardımcı maddelerden, pestisit kalıntıları için pestisit ile muamele edilmemiş ekinlerden oluşur.

Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% BH) ile beraber verilir.

*Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi:*

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları matris içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Madde ilave edilmiş ve ilave edilmemiş bütün numuneler en az 3'er defa analiz edilir. Sonuçlar ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

### 2.2.2.2. Kesinlik

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile bir numuneye aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. % BSS (Bağıl Standart Sapma) veya % VK (Varyasyon Katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan her bir derişim için minimum 5–6 tayin yapılmalıdır. Bunlardan en az 3 tanesi % BSS olarak teorik değerin % 15'inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki konsantrasyon için (TAS) bu sapma % BSS olarak % 20 yi geçmemelidir.

Kesinlik üç kısımda düşünölmelidir. Tekrarlanabilirlik (repeatability), orta kesinlik (intermediate precision) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility).

#### *Tekrarlanabilirlik:*

Kısa zaman aralığı içerisinde aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltilerden en az 10 ölçüm yapılır (30–40 ölçüm tercih edilmelidir). Bu tekrar edilebilirlik gün içi veya çalışma sırasındaki kesinlik olarak da adlandırılır. Sonuçta, kesinlik elde edilen değerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve  $\%BSS \leq 1.0$  olmalıdır.

#### *Orta-Kesinlik:*

Orta kesinlik laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Farklı günlerde, farklı analizciler veya farklı cihazlar kullanılarak saptanabilen değlerlerdir. Çalışmalar arası, deneyler arası veya günler arası kesinlik olarak tanımlanan bu değ çalışmanın tam anlamda kesinliğini belirtir. Bu kesinliği sağlayan çalışma diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış olur. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm, farklı günlerde ve/veya farklı analizciler tarafından ve/veya farklı cihazlarla yapılır. Sonuçta, orta kesinlik elde edilen değlerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve  $\%BSS \leq$

2,0 olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

#### *Tekrar Elde Edilebilirlik:*

Tekrar elde edilebilirlik özellikle ortak çalışma yapan farklı laboratuvarların uygulamaları sonucu elde edilen ve deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Özellikle yöntem tek biçimliliği (standardizasyonu) çalışmalarında kullanılan bir kesinlik değeridir. Geliştirilecek yöntem farklı laboratuvarlarda da aynı anda kullanılacaksa bu kesinliğin hesaplanması ve değerinin raporda belirtilmesi gerekir. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı laboratuvarlarda, farklı zamanlarda ve farklı analizciler tarafından (En az bir kaç gün ara ile yapılmalıdır) hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçta, tekrar elde edilebilirlik, ölçülen değerlerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve  $\%BSS \leq 2,0$  olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

#### **2.3.2.3. Seçicilik**

Analizi yapılacak maddenin numunede bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Bu kompleks numune karışımlarının analizinde girişim derecesinin de bir ölçüsüdür. Etken madde yanında safsızlıkların, parçalanma ürünlerinin, benzer kimyasal maddelerin veya plasebo bileşenlerin bulunduğu numune ile bulunmadıkları numunede yapılan miktar tayini analizlerde etkin maddenin bulunan konsantrasyonları arasındaki fark olarak ifade edilir. Özellikle stabilite tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır.

Seçicilik, miktar tayini sırasında gerekli validasyon işlemleri yapılırken, teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır. Kütle spektrometri ile birleştirilmiş yöntemlerin kullanılması durumunda girişimin olmadığı kabul edilir.

Seçicilik 2 yolla saptanır:

1- Tayini yapılan bileşik ile girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin girişim yapma oranına veya ayırma yöntemlerinde, “Ayrım gücü” ( $R_s$ ) değerlerine bakılır. Bu değer ayırma yöntemleri için  $R_s \geq 2,0$  olmalıdır.

2- Ayırma yöntemlerinde duyarlı bir dedektör seçilebilir. İncelenecek bileşiğe cevap verme yeteneğine sahip olan dedektörler Elektrokimyasal veya Radyoaktivite Dedektörleridir. Bu dedektörler belli maddelere duyarlıdır ve başka maddelerin girişim yapma ihtimalini yok ederler.

1. basamaktaki işlem için:

A- Bütün bilinen veya girişim yapmasından şüphe edilen maddeler aynı anda geliştirilen yöntemle analiz edilir ve cevaptaki değişim incelenir. Ayırma yöntemlerinde bilinen veya girişim yapmasından şüphe edilen maddeler aynı anda kolona etken madde ile birlikte enjekte edilir ve ayırım gücü değerlerine bakılır ( $R \geq 2,0$  olmalıdır).

B- İlaç dozaj şekillerinin yardımcı maddeleri, analizi yapılan madde ile birlikte geliştirilen yöntemle analizlenir ve cevap incelenir. Ayırma yöntemlerinde kolona enjekte edilir ve  $R$  değerlerine bakılır ( $R \geq 2,0$  olmalıdır).

C- Maddenin %10-30'unu bozacak kadar süre, 0,1 N HCl (asit); 0,1 N NaOH (baz); 50 °C sıcaklık; UV ışığı veya %3 lük  $H_2O_2$  çözeltisi ile etkileştirilir ve elde edilen çözelti geliştirilen yöntemle analiz edilir, ayırma yöntemlerinde ise kolona enjekte edilir. Sonuçta elde edilen kromatogramdaki piklerin  $R$  değerleri  $R \geq 2,0$  olmalıdır.

D- Geliştirilen yöntemin şartlarında ufak değişiklikler oluşturulur (pH, tampon, iyon şiddeti, sıcaklık gibi). Bu değişiklikler sonucu cevapta bir farklılık olup olmadığı,

ayırma yöntemlerinde herhangi bir ilave pik olup olmadığı ve bunun madde pikini etkileyip etkilemediği saptanır.

E- Ayırma yöntemlerinde kütle spektrometrisi dedektörleri gibi duyarlı ve hassas tekniklerle veya DAD (Foto diyot dizisi) dedektörü ile değişik dalga boyunda deney anında taramalar yaparak herhangi ilave bir pik olup olmadığını kontrol edilir.

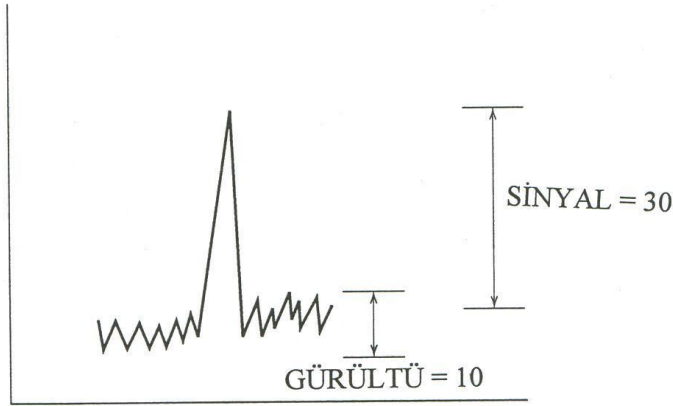
#### **2.3.2.4. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (TS)**

Analizi yapılan örneğin belirttiği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt konsantrasyondur. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır.

Hesaplama yolu ile Teşhis Sınırı saptanmasında;

$$TS = 3.3 \times SS / m$$

eşitliği kullanılır. Bu eşitlikte SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlarının veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir



**Şekil 2.41.** Teşhis sınırını hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli

#### 2.3.2.5. Tayin Alt Sınırı (TAS)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan konsantrasyon düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesaplama bulunabilir.

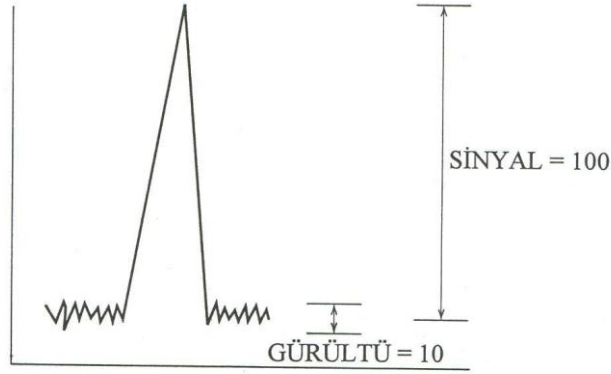
Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek TAS tespiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır.

Hesaplama yolu ile Tayin Alt Sınırı saptanmasında;

$$TAS = 10 \times SS / m$$

eşitliği kullanılır. SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

SS ve m değerleri TS eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.



**Şekil 2.42.** Tayin alt hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli

Biyolojik sıvılarla çalışılırken TAS'ı belirlemek için aşağıdaki şartların yerine gelmesi gerekir:

Analitin TAS'daki derişimi için cihazdan ölçülen cevap kör için ölçülen cevabın en az 5 katı olmalıdır.

Analit için gözlenen pikin veya alınan cevabın tanımlanabilir ve diğer girişim yapma ihtimali bulunan maddelerden ayrı olması gerekir ayrıca % 20 kesinlik ve % 80–120 doğrulukta tekrar edilebilir olmalıdır.

### 2.3.2.6. Doğrusallık

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Eğim (m), kesişim(n) ve korelasyon katsayısı (r) doğrusallığı veren parametrelerdir. Bunlar analit derişiminin ölçülen değerlere karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon

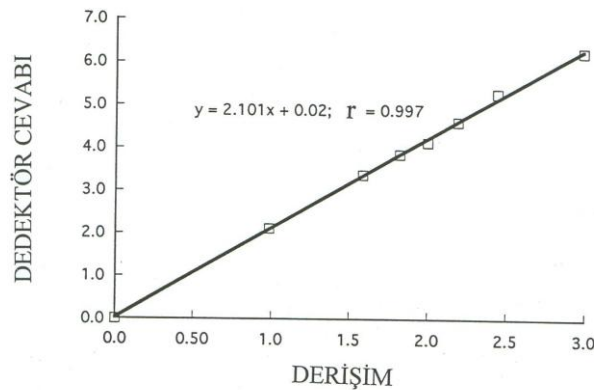


katsayısı  $r = 0,999$  ve üzerinde ise ve cevap değerleri çizilen doğrunun üzerinde yer alıyorsa sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltiden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz edilmesi gerekir. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50 sinden düşük ve üst sınır da %150 sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Bu 5 değerle yapılan doğrusallığın saptanması işleminin en az 3 defa tekrarlanması gerekir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesişim değerlerinin %BSS ları veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir.

#### 2.3.2.6.1. Kalibrasyon Doğrusu (Grafığı)

Analitin bilinen derişimleri ile cihazlarda ölçülen değerler arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve Tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için (kör hariç) cihazdan ölçülen değerlere göre hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur.



**Şekil 2.43.** Kalibrasyon doğrusu (grafığı) ve eşitliği

Biyolojik sıvılarla çalışılırken kalibrasyon eğrisi oluştururken aşağıdaki kriterlerin yerine gelmesi gerekir:

Tayin alt sınırı derişiminden elde edilen cevaplar arasındaki sapma %20 den fazla olmamalıdır

Tayin alt sınırı derişiminin dışında seçilen standart derişimlerden elde edilen cevaplardaki sapmalar % 15 den fazla olmamalıdır.

#### **2.3.2.7. Duyarlılık**

Duyarlılık, doğrusallığın geçerli olduğu aralıktaki doğru denkleminin eğimidir. Pek çok kitapta aynı zamanda tayin alt sınırı olarak tanımlanmıştır. Tayin alt sınırı ne kadar küçükse yöntem o derece duyarlıdır.

#### **2.3.2.8. Çalışma Aralığı**

Yeterli doğruluk ve duyarlılıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır. Derişim aralığı genellikle seçilen yöntemin tipine göre değişir. Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulunduktan sonra belirlenir. Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın ölçülür. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50 sinden düşük ve %150 sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Hedef miktarın %50, 75, 100, 125 ve 150'si olacak şekilde aralık düzenlenebilir.

### **2.3.2.9. Sağlamlık**

Yöntemin, analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi etkenlerdir. Kararlılık yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür ve yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken bir parametredir.

Örneğin pH 3 de  $\pm 0,1$  kadar bir değişim gösteren bir madde pH 4,5 da değişmeden aynı sonucu veriyorsa pH 4,5 ortam olarak seçilmelidir.

### **2.3.2.10. Tutarlılık**

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın: aynı laboratuarda farklı analizciler tarafından; aynı laboratuarda farklı cihazlar tarafından; farklı laboratuarda gerçekleştirilmesi; reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi; farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi; ayırma yöntemlerinde aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir.

Orta kesinlikle de benzeşmektedir. % BSS ile ifade edilir. Uluslararası Uyum Konferansı (ICH= International Conference on Harmonization) bunu yapılması kesin olarak zorunlu işlemler grubuna dahil etmemiştir.

### 2.3.2.11. Stabilité

Zorunlu bir validasyon parametresi olmamakla beraber yapılması tavsiye edilir. Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için numunelerin, standart maddelerin ve kullanılan çözücülerin uygun bir süre (örneğin 1 gün, 1 hafta, 1 ay veya ne kadar süreye ihtiyaç duyuluyorsa o kadar süre ) stabilitesini koruması gereklidir.

Etken maddenin stabilitesi oda sıcaklığında ve en az 6 saat olarak değerlendirilmelidir. Saklama süresinin tamamlanmasından sonra stabilite taze hazırlanmış stok çözelti ile karşılaştırma yaparak tayin edilir.

Biyolojik numunelerde ilacın stabilitesi, onun saklama şartları, kimyasal yapısı, matris ve saklama kabının bir fonksiyonudur. Stabilité olarak; numune toplama ve işleme sırasında, uzun süreli (belirlenen saklama sıcaklığında), kısa süreli saklamalarda (oda sıcaklığında) ve dondurma - çözme işleminden sonra geliştirilen analitik yöntem uygulanarak tayin edilir.

Tüm stabilite çalışmalarında analitin, içinde analit ve girişim olmayan biyolojik sıvı içerisinde taze hazırlanmış stok çözeltilerinden hareketle hazırlanan numune setleri kullanılır.

#### *Dondurma çözme stabilitesi:*

Bu yolla yapılan stabilite çalışmalarında 3 dondurma ve çözme siklusu kullanılır. Düşük ve yüksek derişimlerde en az 3 çözelti istenen sıcaklıkta 24 saat süreyle dondurulur, sonra oda sıcaklığında kendiliğinden çözülmesi beklenir. Tamamen çözüldükten sonra numuneler aynı şartlarda 12–24 saat süreyle yeniden dondurulur. Donma-çözme işlemi 2 kez daha tekrarlanır ve 3. siklustan sonra tayin işlemi yapılır. Eğer analit istenen saklama şartlarında dayanıklı değilse; stabilite için numunenin 3 donma-çözme işlemi için – 70 °C kullanılır.

### *Kısa süreli stabilite*

Düşük ve yüksek derişimlerdeki numuneler oda sıcaklığında çözölür ve bu sıcaklıkta 4–24 saat aralığında tutulur (bu süre numunenin oda sıcaklığına gelmesi süresine bağı olarak değışir). Bu sürenin tamamlanmasından sonra stabilite taze hazırlanmış stok çözelti ile karşılaştırma yaparak tayin edilir.

### *Uzun süreli stabilite*

Bu stabilite, numunenin ilk toplandığı tarihten başlayarak son numune analizine kadar geçen süreyi kapsar. Bu işlemde düşük ve yüksek derişimde en az üç çözeltinin aynı koşullar altında saklanmasıdan sonra tayinleri yapılır. Numunelerin hacmi üç ayrı işlemde kullanıma yetecek kadar olmalıdır. Stabilite hesabında ilk toplandığı andaki derişim ile son derişim arasında kıyaslama yapılarak tayin edilir.

### **2.3.3. Yöntem Validasyonu İle İlgili Çalışmaların Sunumu**

Bir analitik yöntemin validasyonu; laboratuvar çalışmaları ile doğrulanması ve sonuçların deney validasyon raporları olarak sunulması ile tamamlanır. Müracaat sırasında hazırlanacak raporlar aşağıdaki bilgileri kapsamalıdır:

Özet bilgi,

Kullanılan yöntem ile ilgili bilgiler,

Rutin numune analizlerine yöntemin uygulanmasıyla elde edilen biyoanalitik raporlar,

Diğer bilgiler

## 2.4. Analiz Yöntemleri

### 2.4.1. Efavirenz için

#### 2.4.1.1. Kromatografik Yöntemler

Veldkamp AI ve ark (1999) insan serumundan efavirenz'in miktar tayini için basit ve hızlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) metodu geliştirmişlerdir. Ters faz kromatografisiyle 246nm'de UV detektörle ölçüm yapmışlardır. 250 mikrolitre plazma kullanarak 10 – 10,000 ng/mL derişim aralığında yöntemlerini valide etmişlerdir. Bütün kontrol deneylerinde gün içi ve günlerarası tekraredilebilirlikler % 4,3 den küçük bulunmuştur. Tayin alt limiti 10 ng/mL, serumdan geri kazanım ise % 106,4 olarak bulunmuştur.

Villani P ve ark (1999), insan serumundan efavirenz'in UV detektör kullanarak ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle miktar tayinini ve validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Dietil eter ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu için 100 mikrolitre plazma örneği kullanmışlardır. Hareketli faz olarak asetonitril ve su karışımı, akış hızı olarak 1,2 mL/ dk kullanmışlardır. 247 nm de UV detektör kullanılmıştır. Efavirenz'in ve internal standardın alıkonma zamanları sırasıyla 5,3 ve 4,5'dir. Teşhis sınırı 100 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Saras-Nacenta M. ve ark (2001), efavirenz'in insan serumundan miktar tayini için basit bir YPSK metodu geliştirmişler ve valide etmişlerdir. Katı faz ekstraksiyonu ile plazmadan efavirenz'i ve iç standardı ayırmışlardır. Ters faz C<sub>8</sub> kolonu kullanılarak UV detektörle 250nm'de analizi gerçekleştirmişlerdir. İzokratik hareketli faz olarak fosfat tamponu (pH 5,75) - asetonitril kullanarak ilacı ve iç standardı analiz etmişlerdir. Tüm kalite kontrol numuneleri için gün içi ve günler arası tekraredilebilirlik % 8,6'dan az bulunmuştur. Tayin alt sınırı 0,1 µg/mL, serumdan geri kazanım % 83'den büyük bulunmuştur.

Langmann P. ve ark (2001), efavirenz'in serumdan miktar tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi önermişlerdir. 200 mikrolitre plazmadan dietileter kullanarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile başarıyla kantitatif geri kazanım yapılabilmektedir. Hareketli faz olarak 67mM potasyum dihidrojen fosfat-asetonitril kullanılmıştır. Fenomeneks C<sub>18</sub> kolonu ile korunarak XTerraRP 18 kolonu kullanılmış ve 246 nm'de UV detektörle çalışılmıştır. Derişim aralığını 25-15,000 ng/mL olarak bulmuşlardır. Gün içi ve günler arası tekraredilebilirlik çalışmaları %10'dan küçük bulunmuştur.

Fan B ve ark (2002) serumda lamivudin, stavudin ve efavirenz kombinasyonunun miktar tayinini ve validasyonunu LC/MS/MS metoduyla gerçekleştirmişlerdir. Elektrosprey tandem detektör kullanmışlardır. Bu ilaçlar ve internal standart aprobarbital için katı faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Gradient hareketli faz sistemi kullanmışlar, hareketli faz olarak asetonitril ve 20mM amonyum asetat tamponu karışımının pH'ını glasiyel asetik asit kullanarak pH 4,5'a ayarlamışlardır. Kolon olarak hekzilsilan kolon kullanmışlardır. Lamivudin için 1,1 – 540 ng/mL; stavudin için 12,5 – 6228 ng/mL ve efavirenz için 1,0 - 519 ng/ mL konsantrasyon aralıklarında doğrusallık saptanmıştır. Geri kazanım değerleri % 90'ının üstündedir.

Matthews CZ ve ark. (2002), YPSK yöntemi kullanarak efavirenz'i kantitatif olarak insan serumundan ve kalitatif tayinini efavirenz'i fotokimyasal türevlendirerek floresans detektörle gerçekleştirmişlerdir. Kantitatif tayin için ters faz kromatografisi kullanılırken stereokimyasal değerlendirmeler için kiral durgun faz içeren kolon kullanılmıştır. Kantitatif ölçümler 50 -1000 ng/mL derişim aralığında valide edilmiştir. Tüm standart piklerde geri kazanım % 89'dan daha iyi çıkmıştır. Ölçüm aralığında doğruluk % 95 ile 104 aralığında iken, gün içi kesinlik %5 C.V.'den iyidir.

Ramachandran G. ve ark. (2006), efavirenz'in insan serumundan kantitatif tayini için basit ve hızlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Analizlerini, ters faz C-18 kolonu (150mm) kullanarak UV detektör ile gerçekleştirmişler ve 0,0625-10,0 µg/mL derişim aralığında doğrusallık saptamışlardır. Serumda geri kazanım değerini %101 bulmuşlardır.

Dogan-Topal ve ark. (2007) efavirenz, abakavir ve valgansiklovir'in insan serumundan kantitatif tayini için basit ve hızlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrımlarını terz faz 5µm Waters Spherisorb kolon (250 x 4,6 mm ID) kullanarak diod array detektör ile gerçekleştirmişlerdir. Hareketli faz olarak asetonitril: metanol: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.00) (40:20:40 h/h/h) karışımını 1,0 mL/dk akış hızında kullanmışlardır. Serumda, abakavir ve efavirenz için 50-30,000 ng/mL konsantrasyon aralığında, valgansiklovir için ise 10-30,000 ng/mL derişim aralığında doğrusallık saptamışlardır. Tayin alt limitlerini abakavir, efavirenz ve valgansiklovir için sırasıyla 3,80 ng/mL, 2,61 ng/mL ve 130 ng/mL olarak bulmuşlardır.

Seshachalam ve ark. (2008) efavirenz'in S- ve R- enantiomerlerini yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle analiz etmişlerdir. Durgun faz olarak tris- (3,5-dimetilfenilkarbamat) içeren Chiralcel OD (250mm x 4,6mm, 10mikrom) kolonu kullanmışlardır. Hareketli faz olarak %0,1 (h/h) formik asit içeren n-hekzan: isopropilalkol (80:20 h/h) kullanılmıştır. 1,0 mL/dk akış hızı ve 254 nm de UV detektör ile ölçüm yapılmıştır. R- enantiomeri için 0,1 - 6,0 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık saptanmıştır. Teşhis sınırı 0,03 µg/mL ve tayin alt sınırı 0,1 µg/mL (n:3) olarak bulunmuştur. R- enantiomerinin tekraredilebilirlik çalışmaları sonucunda altı tane tekrarlanan ölçüm sonucunda pik cevabının BSS'sı % 1,34 bulunmuştur. Sonuçlar göstermiştir ki geliştirilen metod basit, kesin, sağlam ve saf efavirenz'in miktar tayini için uygulanabilir.

Huang ve ark (2008) insan saçından efavirenz, lopinavir ve ritonavir'in miktar tayinini ve validasyonunu LC/MS/MS yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Saç numuneleri AIDS tedavisi gören hastalardan alınıp 37°C'de 14 saatten fazla metanolde tutulup, zayıf alkali şartlarında metil tert-butil eter: etil asetat (1:1) karışımında ekstraksiyon yapılmıştır. Elektrosprey tandem detektör kullanmışlardır. Kantitatif ölçümler ritonavir için 0,01- 4,0 ng/mg derişim aralığında; lopinavir ve efavirenz için 0,05 - 20 ng/mg derişim aralığında valide edilmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları %15 civarındadır, doğruluk çalışmaları ise %89-110 aralığında değişmektedir.



Lakshmi Sailaja ve ark (2007), efavirenz'in insan serumundan miktar tayini için basit ve hızlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişler ve valide etmişlerdir. Yöntemlerinde C<sub>18</sub> analitik kolonunu ve hareketli faz olarak asetonitril: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,50) (50:50) karışımını kullanmışlardır. Maddeleri UV detektörle 247 nm'de görüntülemişlerdir. Alıkonma zamanları efavirenz için 6,45 dk ve iç standart nefinavir için ise 2,042 dk'dır. Serumda 0,1- 10 µg mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusallık saptamışlardır. Geliştirilen yöntem basit, kesin, doğru ve efavirenz'in biyoyararlanım ve farmakokinetik çalışmaları için uygulanabilir.

#### **2.4.1.2. Voltametrik Yöntemler**

Dogan-Topal ve ark. (2009) efavirenz ile çift sarmal balık spermi DNA'sının etkileşimini kalem grafit elektrot kullanarak diferansiyel puls voltametriyle tayin etmişlerdir. Etkileşme çift sarmal DNA daki guanin sinyalinin azalışı üzerinden incelenmiştir. Efavirenz'in 2,0-24,0 µg/mL konsantrasyon aralığındaki ilavesiyle guanin sinyalindeki doğrusal azalış üzerinden miktar tayini yapılmış ve farmasötik preparatlara uygulanmıştır. Ayrıca efavirenz'in tek başına boş kalem grafit elektrot ile miktar tayini yapılmış; 0,018 -2,56 µg/mL derişim aralığında doğrusallık bulunmuştur. Gerekli tüm validasyon parametreleri hesaplanmıştır.

## 2.4.2. L6prolid i6in

### 2.4.2.1. Kromatografik Y6ntemler

Ueno ve Matsuo (1991) l6prolid ve metaboliti i6in serum ve idrardan miktar tayini i6in y6ksek performanslı sıvı kromatografisi y6ntemi geliştirmişlerdir. L6prolid ve metaboliti i6in Teşhis sınırı 0,05 ng/mL olarak bulunmuştur. Serum ve idrardan geri kazanım 6alışmaları % 88'in y6st6nde bulunmuştur.

Sanz-Nebot ve ark (2000) l6prolid, peptidik hormonunu, elde etmek i6in katı faz peptid sentezi kullanmışlardır. L6prolid'in ayırımı ve karakterizasyonu i6in Elektrosprey iyonizasyonu kullanarak k6tle spektrometresiyle sıvı kromatografisini birleştirmişlerdir. Sıvı kromatografisi ayırım şartları optimize edilmiştir.

Singh ve ark (2000) l6prolid'in miktar tayini i6in 220 nm'de UV detekt6r ve C18 Microsorb-MVTM kolon (4,6 mmx15 cm) kullanarak y6ksek performanslı sıvı kromatografisiyle izokratik y6ntem geliştirilmiştir. Hareketli faz oranı, 0,03M, %77 dibazik amonyum fosfat tamponu: %23 asetonitril'dir. Akış hızı 2,0 mL/dk'dır. B6t6n derişim 6alışmaları i6in kesinlik sonu6ları % 2 (C.V)'den k666kt6r. L6prolid i6in tayin limiti ve kuyruklanma fakt6r6 sırasıyla 100 ng/mL ve 1,16-1,26 bulunmuştur.

Sanz-Nebot ve ark (2002) 6ok peptid i6eren l6prolid'in ayırımı ve karakterizasyonu i6in ters faz sıvı kromatografisi- k6tle spektrometrisi ve kapiller elektroforez y6ntemlerini geliştirmişlerdir. Karışım 6ncelikle LC-MS ile analiz edildi ve kapiller elektroforez ile ayırım ger6ekleştirilmiştir.

Gioia ve ark (2005) tarafından l6prolid'in hassas miktar tayini i6in florojenik 6n kolon t6revlendirmesiyle sıvı kromatografisi y6ntemi geliştirilmiştir. Histidin, arjinin, serin, triptofan, glutamik asit, tirozin, metiyonin, izol6sin, l6sin ve fenilalanin'i ters faz ODS kolon kullanarak ve gradient el6syon y6ntemiyle trietilamonyum fosfat tamponu-

metanol karışımı kullanarak ayırmışlardır. Tüm prosedür için günler arası doğruluk % 80,5 – 109,5 aralığında bulunmuştur, tekraredilebilirlik %BSS'sı % 5,8'den düşük bulunmuştur. Gün içi doğruluk % 81,5 -107,2 aralığında tekraredilebilirlik ise %BSS'sı %4,6 bulunmuştur. Teşhis sınırı 30-800 femtomol bulunmuştur.

Jamshidi ve ark (2006) löprolid asetat için yeni, kararlı bir HPTLC yöntemi geliştirmişlerdir. Durgun faz olarak Silika jel 60F<sub>254</sub>; hareketli faz olarak, etil asetat-metanol-%25 amonyak (60:30:10) kullanılmıştır. Löprolid asidik, bazik ve oksidatif bozulmalara maruz bırakılmıştır. Bozunma ürünlerinin pikleri löprolid'in pikinden farklı yerlerde-dir. Dansitometrik değerler 280nm'de uygulanmıştır. Löprolid için 107-422 ng derişim aralığında doğrusallık saptamışlardır. Tayin alt ve teşhis sınırı sırasıyla 25 ve 107 ng bulunmuştur. Günler arası geri kazanım ve bağıl standart sapma sırasıyla % 97,06-102,0 ve %1,34-2,90 bulunmuştur.

Sofianos ve ark (2008) löprolid'in miktar tayini için kütle spektrometrisi yöntemi geliştirmişlerdir. Fare plazmasından pikomolar derişimde löprolid tayin edilmiştir. Teşhis sınırı 0,1ng/mL olarak bulunmuştur. Farmakokinetik parametreler optimize edilmiştir.

Zhan ve ark (2009), löprolid için serumdan miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişler ve valide etmişlerdir. Serum numunelerinde proteinleri metanol ile ayırıp, Oasis<sup>®</sup> HLB kartuş katı faz ekstraksiyonuyla muamele edildikten sonra löprolid ve alarelini (iç standart), arayüzeyde pozitif elektrosprey iyonizasyonlu üçlü dört uçlu kütle spektrometrisiyle, C<sub>18</sub> kolonda analiz etmişlerdir. Hareketli faz içeriği; asetonitril: su: propiyonik asit (20: 80: 0,05)'dir. Löprolid için 0,018-45,2 ng mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusallık saptamışlardır. Gün içi ve günler arası kesinlik (% BSS) %11,5'den düşük ve doğruluk (bağıl hata)  $\pm$  2,8 civarında bulunmuştur. Teşhis alt limiti, 0,018 ng mL<sup>-1</sup>'dir. Valide edilmiş LC-MS/MS metodu, derialtı 1 mg löprolid verilen sağlıklı Çinli erkek gönüllülerde farmakokinetik çalışmalar için uygulanmıştır.

#### **2.4.2.2. Voltametrik Yöntemler**

Dogan-Topal ve ark (2010) löprolid ile çift sarmal DNA'nın etkileşimini kalem grafit elektrot kullanarak tayin etmişlerdir. Etkileşme mekanizması hem kalem elektrodu üzerinde hem de çözelti ortamında diferansiyel puls voltametriyle incelenmiştir. DNA immobilize edilmiş kalem elektrotta ve çözelti ortamında guanin sinyalindeki doğrusal azalış üzerinden miktar tayini çalışmaları yapılmıştır ve tayin alt limitleri sırasıyla 0,06 ppm ve 0,04 ppm bulunmuştur. Ayrıca efavirenz'in tek başına boş kalem grafit elektrot ile elektrokimyasal davranışı açıklanmış ve miktar tayini yapılmıştır. Tayin alt limiti 0,0014 ppm bulunmuştur. Gerekli tüm validasyon parametreleri hesaplanmıştır ve yöntem farmasötik preparatlara uygulanmıştır.

#### **2.4.3. Fulvestrant için**

##### **2.4.3.1. Kromatografik Yöntemler**

Balaram ve ark (2010), tavşan serumundan fulvestrant'ın sıvı-sıvı ekstraksiyonuyla hızlı ve duyarlı tayini için YPSK yöntemi geliştirmişler ve valide etmişlerdir. Elektrosprey tandem dedektörü kullanmışlardır. Analizlerini ters faz Sunfire C18 kolonu kullanarak 300µL/dk akış hızında gerçekleştirmişlerdir. Noretisteron'u internal standart olarak kullanmışlardır. Yöntem 0,092-16,937 ng/mL derişim aralığında valide edilmiştir. Tayin alt sınırı 0,023 ng/mL'dir. Gün içi ve günler arası tekraredilebilirlik ve doğruluk %10'dan düşüktür. Fulvestrant ve noretisteron için geri kazanım sırasıyla %85 ve 90'dır.

## 2.5. Kullanılan Araç ve Gereçler

### 2.5.1. Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler

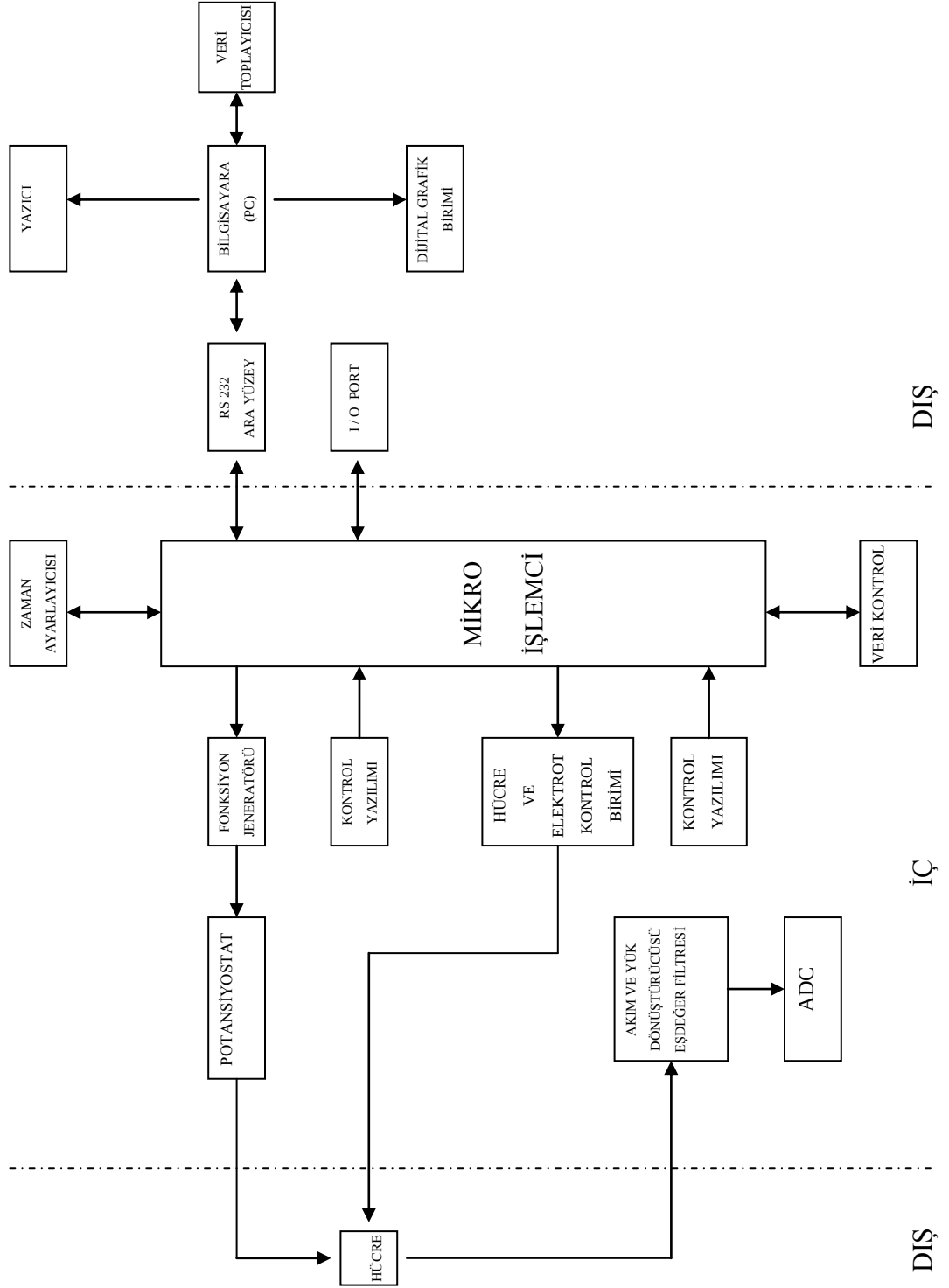
- a) Elektrokimyasal analizör: BAS 100 W ve  
AUTOLAB 30 (Eco Chemie, Hollanda)
- b) Deney hücresi: Tek bölmeli voltametrik hücre
- c) Elektrotlar
  - a. Çalışma elektrodu : Bor ile Dope edilmiş Elmas elektrot  
(Windsor Scientific, England)  
ve Kalem grafit elektrot
  - b. Yardımcı elektrot : Platin tel elektrot (BAS MF 1032)
  - c. Karşılaştırma elektrodu : Ag/AgCl (3M KCl) (BAS MF 2052)
- d) Manyetik karıştırıcı – ısıtıcılı : Ikamag RH (Jange and Kungel IKA-Labor  
Technic)
- e) Hassas terazi : Labor Alliance ve Shimadzu Libror AEG –220
- f) UV-Vis spektrometresi: Shimadzu UV 1601
- g) pH metre : Model 538 (WTW, Austria)
- h) Kombine elektrot (cam elektrot-referans elektrot )
- i) FT-IR spektrometresi: Jasco-420
- j) Santrifüj
- k) Ultrasonik banyo
- l) Çeşitli boylarda pyrex® balonjoje, kapaklı, hacmi belirli deney tüpleri, cam  
havan, beherler, çeşitli ölçülerde otomatik ve mikro pipetler, ön işlem için  
kullanılan BAS marka kahverengi yumuşak yüzeyli parlatma pedleri

### 2.5.1.1. BAS 100 W ve AUTOLAB 30 Elektrokimyasal Analizör

Cihazlarda; potansiyostat ve fonksiyon jeneratörü genel olarak polarograflarda olduğu gibi esas kısımlardır. Bilgisayar teknolojisi ile desteklenerek verim ve kullanım kolaylığı arttırılmıştır. Microsoft Windows® ile uyumlu sistem yazılımı sayesinde cihazın kontrolü, veri toplanması ve bu verilerin değerlendirilmesi kolaylıkla yapılmaktadır (Şekil 2.44). Bu cihazlar, aşağıdaki tekniklerin kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

- a) Dönüşümlü Voltametri
- b) Doğrusal Taramalı Voltametri
- c) Kronoamperometri
- d) Kronokulometri
- e) Normal Puls Voltametri ve Polarografisi
- f) Diferansiyel Puls Voltametri ve Polarografisi
- g) TAST Polarografisi
- h) Barker Kare Dalga Voltametri ve Polarografisi
- i) Osteryoung Kare Dalga Voltametri ve Polarografisi
- j) Alternatif akım (ac) Voltametri ve Polarografisi
- k) Faz Selektif ac Voltametri ve Polarografisi
- l) 2. Harmoni ac Voltametri ve Polarografisi
- m) Üçgen Dalga ac Voltametri ve Polarografisi
- n) Diferansiyel Üçgen Dalga ac Voltametri ve Polarografisi
- o) ac Direnci
- p) Döner Disk Elektrotla DTV
- q) Hidrodinamik Modülasyon Voltametrisi

- r) Barker Kare Dalga Sıyırma Voltametrisi
- s) Diferansiyel Puls Sıyırma Voltametrisi
- t) Doğrusal Taramalı Sıyırma Voltametrisi
- u) Osteryoung Kare Dalga Sıyırma Voltametrisi
- v) Elektrokapiler Eğri Ölçümleri



Şekil 2.44. Genel elektrokimyasal analiz cihazının şeması



### **2.5.1.2. Kullanılan Elektrotların Hazırlanışı**

#### **2.5.1.2.1. Bor ile Dope Edilmiş Elmas Elektrot (BDEE)**

Bu elektrodun çapı 6 mm, yüzey alanı ise  $28,27 \text{ mm}^2$ 'dir. Yardımcı elektrot olarak platin tel elektrot (MW-1032) ve karşılaştırma elektrodu olarak da Ag/AgCl (MF 2052 BAS) elektrot kullanılmıştır.

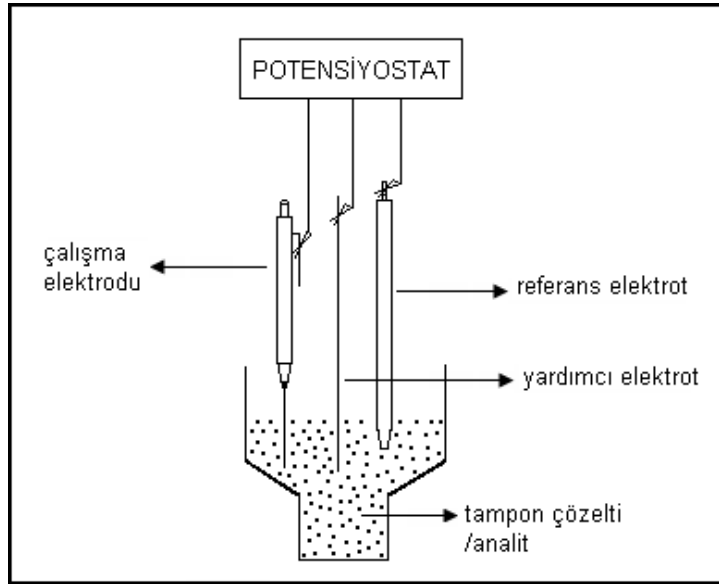
Tekrar edilebilir elektrot yüzeyi oluşturabilmek amacıyla bor ile dope edilmiş elmas çalışma elektroduna basit bir ön işlem uygulanmıştır. Bu elektrot için özel yapılmış yumuşak yüzeyli bir parlatma malzemesi üzerine az miktarda alüminyum oksit ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) tozu konup, distile suyla ıslatılarak elektrot yüzeyi dairesel hareketlerle parlatılmıştır. En iyi tekrar edilebilirliği sağlamak için tüm bu ön işlem değişik sayılarda tekrar edilerek en uygun parlatma sayısı saptanmıştır. Ön işlem yapıldıktan sonra parlatılan elektrot distile suyla yıkandıktan sonra temiz bir kurutma kağıdı ile kurulanıp deney hücresine alınmıştır. Platin tel yardımcı elektrot ile Ag/AgCl referans elektrot ise her deney sonrasında, deney hücresinden çıkarılarak distile suyla yıkanıp, kurutma kağıdı ile kurutularak deney hücresine yerleştirilmiştir.

#### **2.5.1.2.2. Kalem Grafit Elektrot (KGE) Hazırlanışı**

Kalem grafit elektrot yapımında kırtasiyelerden sağlanabilen Rotring T 0.5 mekanik kurşun kalem modeli kullanıldı. Kalem grafit elektrot Wang ve arkadaşları tarafından önerilen yol izlenerek hazırlandı. Bu amaçla kalem gövdesinin uç kısmının metalik bölümü ile dış metalik tutacağının elektriksel iletkenliğini sağlamak için bakır tel ile tutturuldu. Kalem uçlarının (Tombo 0.5, Japon) uzunluğu 60 mm ve çapı 0.5 mm olup, 15mm boyutu dışarıda kalacak şekilde işaretlenip Rotring kaleme hassas bir şekilde yerleştirilir. Elektrokimyasal hücredeki 5 mL'lik analiz çözeltisine bu uçların 12 mm'lik kısmı daldırıldı. (Karadeniz ve ark, 2003; Wang ve ark., 2001).

### 2.5.1.3. Deney Hücresi

Kalem elektrot ile yapılan tüm deneylerde el yapımı olarak tasarlanmış, Şekil 2.45’de görülen deney hücresi kullanılmıştır. BDEE elektrot ile yapılan deneylerde ise BAS 100W Elektrokimyasal Analizörüne ait özel deney hücresi kullanıldı. Bu sistem 2000 mVs<sup>-1</sup> hıza kadar olan gerilim tarama hızlarını yapabilmektedir. Cihaz; Gateway 2000 markalı Pentium 166® işlemcili, Windows XP işletim sistemiyle çalışan bir bilgisayarla uyumlu kullanılmaktadır.



Şekil 2.45. Elektrokimyasal analizör deney hücresi

### 2.5.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Yapılan deneylerde kullanılan kimyasal maddelerden ileri gelebilecek safsızlıkların deney sonuçlarına yansımaması için kromatografik ve / veya analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanılmıştır. (Çizelge 2.2., Çizelge 2.3, Çizelge 2.4).

**Çizelge 2.2.** Kullanılan standart maddeler

| Standart Madde Adı | Üretici Firma Adı   |
|--------------------|---------------------|
| Efavirenz          | Merck Sharp & Dohme |
| Löprolid           | Abbott              |
| Fulvestrant        | Astra Zeneca        |

**Çizelge 2.3.** Tayinlerde üzerinde çalışılan ilaç dozaj formu ve birim doz içeriği

| Madde Adı   | Müstahzar Adı         | Farmasötik Şekli      | Birim Doz İçeriği |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| Efavirenz   | Stocrin <sup>®</sup>  | Film Tablet           | 600 mg            |
| Löprolid    | Lucrin <sup>®</sup>   | Flakon                | 1mg/0,2mL         |
| Fulvestrant | Faslodex <sup>®</sup> | Enjeksiyonluk Çözelti | 250mg/mL          |

**Çizelge 2.4.** Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler

| Kimyasal Maddenin Adı | Üretici Firma Adı |
|-----------------------|-------------------|
| Sülfürik Asit         | Merck             |
| Hidroklorik Asit(%37) | Merck             |
| Sodyum Hidroksit      | Merck             |
| Asetonitril           | Merck             |

|                                  |                |
|----------------------------------|----------------|
| Etanol                           | Merck          |
| Borik Asit                       | Merck          |
| Sodyum klorür                    | Sigma          |
| Fosforik Asit                    | Merck          |
| Glasiyel Asetik Asit ( %99-100)  | Merck          |
| Sodyum dihidrojen fosfat         | Merck          |
| Alüminyum Oksit                  | Merck          |
| Fish sperm dsDNA                 | Serva          |
| Potasyum dihidrojen fosfat       | Riedel-de Haen |
| Di potasyum mono hidrojen fosfat | Riedel-de Haen |

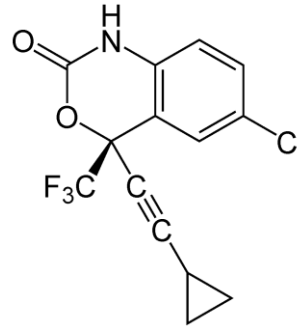
Tüm çalışmalarda Mili Q distile su (18 Mega – ohm’ luk) kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında ( $25,0 \pm 0,5$ ) °C’ de gerçekleştirildi.

### 2.5.2.1. Deneylerde Kullanılan Etken Maddeler Hakkında Genel Bilgi

#### 2.5.2.1.1. Efavirenz Hakkında Bilgi

##### *Tanımı*

Efavirenz, HIV enfeksiyonunun tedavisinde oral yoldan kullanılan non-nükleozit reverse transkriptaz inhibitörü (NNRTI) bir ilaçtır. Yirmi dört haftaya kadar devam eden kontrollü çalışmalarda viral yükte sağladığı azalma ve CD4 hücre sayısındaki artışın standart tedavi ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu saptanmıştır. Efavirenz'in önemli avantajları, günde tek doz halinde kullanılması, serebrospinal sıvıya penetre olabilmesi ve besinlerle ilişkili olmaksızın alınabilmesidir.



**Şekil 2.46.** Efavirenz'in kimyasal yapısı

##### *Etki Mekanizması:*

Efavirenz, HIV reverse transkriptaz enzimini inhibe eder. Nükleozit reverse transkriptaz inhibitörleri (NRTI)'den farklı olarak, efavirenz, şablon veya nükleozit trifosfatları ile yarışmaya girmez. Ayrıca, aktive olmak için fosforilasyona da gereksinim duymaz. Efavirenz, reverse transkriptaz üzerinde NRTI ilaçların bağlandıkları yerden kesinlikle farklı, fakat onların bağlandığı noktaya yakın bir yere doğrudan bağlanır. Bu bağlanma enzimin aktif bölgesinin bozulmasına böylece RNA- ve DNA-polimeraz aktivitelerinin bloke olmasına neden olur.

In-vitro NNRTI ilaçlara karşı çapraz rezistans gösterilmiştir. Daha önce efavirenz'e dirençli olduğu gösterilen HIV-1 türleri, in vitro fenotipik olarak nevirapin ve delavirdin'e de dirençlidir. Bununla birlikte türemiş ZDV-dirençli HIV-1 izolatlarının efavirenz'e in vitro duyarlıklarını korudukları görülmüştür.

*Farmakokinetik Özellikleri:*

Efavirenz oral yoldan verilir. HIV ile enfekte gönüllülere günde 200, 400 ve 600mg dozda verilmesinin ardından plazmada doruk konsantrasyonlara 3-3,5 saat sonra ulaşır. Bu gönüllülerde kararlı plazma konsantrasyonlarına 6-10 günde ulaşır. In vitro çalışmalar efavirenz'in sitokrom P450 (CYP) 3A4 ve CYP2B6 enzimleri ile metabolize olduğunu göstermiştir. Efavirenz, birlikte alındığı ilaca bağlı olarak CYP 450 enzimlerin indükler (CYP3A4) veya inhibe eder (CYP2CP, CYP2C19). On gün süreyle, tekrarlanan dozlar halinde günde 200-400 mg verildiğinde, vücutta biriken miktarı öngörülenden daha düşük bulunmuş (%22-42'den az) ve terminal yarı-ömrü 40-55 saat (tek doz yarı-ömrü 52-76 saat) olarak belirlenmiştir. Radyoaktivite ile işaretli efavirenz ile yapılan bir çalışmada efavirenz ve/veya metabolitlerinin yaklaşık %14-34'ünün idrar ve %16-61'inin de feçesle atıldığı saptanmıştır. Metabolize olmamış kısmı efavirenz'in feçesle atılan en büyük bölümüdür. Buna karşın idrarda değişmemiş halde bulunan ilaç oranı %1'den daha azdır.

*Kimyasal yapısı:* (S)-6-Kloro-4-(siklopropiletinil)-1,4-dihidro-4-(triflorometil)-2H-3,1-benzoksazin-2-on

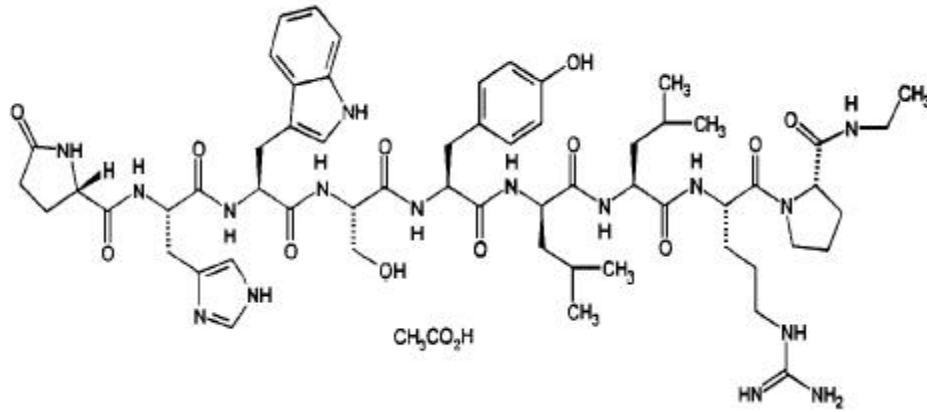
*Fiziksel özellikleri:* Efavirenz beyazdan açık pembeye değişen renkte kristalize bir tozdur. Pratik olarak suda çözünmez.

*Saklama Koşulları:* Efavirenz 15-30°C oda sıcaklığında ve hava geçirmeyen sıkıca kapalı kaplarda saklanmalıdır.

### 2.5.2.1.2. L6prolid Asetat Hakkında Bilgi

#### Tanımı:

L6prolid v6cutta doğal olarak yapılan gonadatropin saliverici hormon (GnRH)'ın sentetik bir analogudur. L6prolid ilerlemiş prostat veya meme kanserinin tedavisinde hormon antagonisti olarak veya endometriyoz tedavisinde hormon terapişi için parenteral yoldan kullanılır. Gonadatropin saliverici hormonda bulunan iki aminoasidin sübstitüsyonu, prostat ve meme kanserlerinin hormonal kontrolunu sağlayan kalıcı bir aktivite sağlar. L6prolid'in depo formölasyonu uterin fibroid tüm6rler, endometriyozis ve ilerlemiş prostat kanserinin tedavisinde endikedir.



Şekil 2.47. L6prolid'in kimyasal yapısı

#### Etki Mekanizması:

L6prolid hastada medikal kastrasyon oluşturur ve hormona bağımlı testosteron ve estrojen tüm6rlerini t6ketir. Kısa süreli veya intermitant tedavi şeklinde uygulandığında l6prolid, gonadatropin saliverici hormonla aynı etkiyi paylaşır, fakat uzun süreli tedavisinde hipofiz bezinde gonadatropin saliverilmesini baskılamasına bağlı olarak overler ve testislerde streidojenezi azaltır. Normalde gonadatropin saliverici hormon pulsatil bir şekilde saliverilir, fakat l6prolid'in sürekli aktivitesi respt6rlerin down

regölasyonuna neden olur ve sonuçta foliköl stimölle edici hormon (FSH) ve luteinleyici hormon (LH) yapımı azalır. Bu aktivitesi erkekte testislerdeki testosteron yapımını durdurmasına neden olur. Aynı etki kadında overlerdeki östrojen yapımının durmasını sağlar. Endometriyozisi olan hastalarda bu reversibl hipoestrojenik durum endometriyozis ağrısını semptomatik olarak iyileştirir ve endometriyotik lezyonların sayısının azalmasını sağlar. Löprolid başlangıçta FSH ve LH’da bir fırlamaya neden olur ve bu fırlama prostat veya meme kanserinde bir alevlenme reaksiyonuna neden olabilir. Ancak sonunda alevlenme reaksiyonu azalır. Total kastrasyon 1-2 hafta içerisinde ortaya çıkar.

#### *Farmakokinetik:*

Löprolid subkütan (SC) veya intramüsküler (IM) yoldan verilir. SC yoldan verildiğinde hızlı ve tam olarak absorbe olur ve biyoyararlanımı % 94 kadardır. IM enjeksiyonundan sonra doruk düzeylerine 4 saatte ulaşır. IM depo enjeksiyon preparatı üzerinde yapılan çalışmalar %20-25 kadarının 1 hafta boyunca absorbe olduğunu göstermiştir. Absorbe olduktan sonra karaciğer, böbrek ve hipofiz dokusunda göreceli olarak daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. İnsanda proteinlere in vitro bağlanma oranı % 43-49 oranındadır. Doğal olarak gonadatropin salıverici hormon gibi löprolid de ön hipofiz ve hipotalamusta metabolize edilebilir. Löprolid’in plazma eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 3 saattir.

#### *Kimyasal Yapı:*

5-Okso-L-prolil-L-histidil-L-triptofil-L-seril-L-tirozil-D-lösil-L-lösil-L-arginil-N-etil-L-prolinamid asetat



### 2.5.2.1.3. Fulvestrant Hakkında Bilgi

turnoverde artış ve çekirdek lokalizasyonunun bozulması şeklinde çoklu değişiklikler meydana gelir. Fulvestrant estrogen reseptörünün yıkılımını da tetikler ve böylece hücrel estrogen reseptörü düzeyinin önemli ölçüde azalmasına neden olur.

#### *Farmakokinetik:*

Fulvestrant parenteral yoldan uygulanır. İntravenöz veya intramüsküler enjeksiyonu takiben, hepatik kan akımına yakın yüksek bir hızla (nominal olarak dakikada 10,5 mL/kg) plazmadan uzaklaşır. Ancak uzun etkili fulvestrant IM enjeksiyon, plazmadaki fulvestrant düzeylerini dar sınırlar arasında devam ettirir.

Fulvestrant vücutta hızla ve geniş kapsamlı olarak dağılır; kararlı düzeylerdeki sanal dağılım hacminin yüksek (yaklaşık 3-5 L/kg) olması, bu bileşiğin büyük ölçüde damar-dışı kompartmanda dağıldığı izleminin vermektedir. Klinik kullanım sırasında elde edilmesi beklenen konsantrasyonlardan çok daha yüksek düzeylerdeki fulvestrantın plazma proteinlerine bağlanma oranı yüksektir (%99). VLDL, LDL ve HDL lipoprotein fraksiyonları, fulvestrantın bağlandığı başlıca proteinler olarak gözükmemektedir. Cinsiyet hormonu bağlayan globüline bağlanma söz konusu olsa bile incelenmemiştir. Proteinlere kompetitif olarak bağlanmayla ilgili ilaç-ilaç etkileşimi çalışmaları, bu tip etkileşimlerin hemen her zaman albümin ve alfa-1-asit glikoproteine bağlanan ilaçlar arasında görülmekte olması nedeniyle yapılmamıştır.

Vücuttaki fulvestrant, karaciğer-safra yoluyla hızla uzaklaştırılır; burada bir bütün olarak hız belirleyen faktör, bileşiğin kullanılma yoludur. Metabolitler vücuttan, dışkı yoluyla uzaklaştırılır.

#### *Kimyasal yapısı:*

7alfa-[9-[(4,4,5,5,5-Pentafloropentil)sülfinil]nonil]estra-1,3,5(10)-trien-3,17beta-diol

#### *Fiziksel özellikleri:*

Fulvestrant çözeltisi berrak, renksiz veya sarıya kayan renkte, viskoz bir sıvıdır.

### 2.5.2.2. Voltametrik Analizlerde Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması

#### 2.5.2.2.1. Destek Elektrolitleri

Elektrokimyasal olaylarda elektroaktif olan maddenin elektrot yüzeyine taşınma basamaklarının aynı anda olmaması olayı basitleştirmektedir. Bu taşıma sistemleri arasında engellenmesi en kolay olanı *göç* (migrasyon) olayıdır. Bunun için çalışılan ortama kolayca iyonlaşan bir tuz, elektrokimyasal özellikleri incelenen maddeninkinden çok daha yüksek derişimlerde ilave edilir. Bu tuza ya da bu tuzu içeren çözeltiye “*destek elektroliti*” adı verilir. Destek elektrolitinin derişimi incelenen maddenin derişiminden 100 kat daha fazla olmalıdır. Miktar tayini çalışmalarında ve kinetik incelemelerde analizi yapılacak maddeleri kolayca çözebilen, uygun pH aralığı sağlayan ve oldukça düşük akım veren çözeltiler destek elektroliti olarak seçilmiştir.

Deneylerde destek elektroliti olarak 0,1 M  $H_2SO_4$  ve 0,5 M  $H_2SO_4$  yanında değişik yapıda asidik ve bazik tampon çözeltileri (fosfat, asetat ve Britton-Robinson tamponları) kullanılmıştır.

#### 2.5.2.2.2. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

Deneylerde sülfürik asit çözeltileri ve tampon çözelti olarak, asetat, fosfat ve Britton–Robinson tamponları kullanılmıştır.

Asetat tamponu için 1 M asetik asit çözeltisi hazırlanmış ve 5 M NaOH ile istenen pH değerlerine ayarlanmıştır. Bu tamponla pH 3,50 – 5,50 aralığında çalışılmıştır.

*0,50 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 4,8):* Kullanılan 0,50 M asetat tampon çözeltisi litresinde 0,2722 g (0,002 mol) sodyum asetat trihidrat ve 0,1154 mL asetik asit içermektedir. Çözeltinin pH'sının 4,8 değerine ayarlanması, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir. Hazırlanışında Mili Q distile su kullanıldı. Hazırlandıktan sonra plastik şişelerde, buzdolabında saklandı. İyonik kuvveti sağlamak için litresine derişimi 0,02 M olacak şekilde 1,168 g NaCl eklendi. (Bu tampon özellikle dsDNA çalışmaları için kullanılmıştır.)

Fosfat tamponu için 0,2 M  $H_3PO_4$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  ve  $Na_2HPO_4$  ve  $Na_3PO_4$  çözeltileri hazırlanmış ve istenen pH'a uygun konjuge baz çözeltileri ile ayarlanmıştır. Bu tamponla pH 2,00–8,05 aralığındaki belli pH değerlerinde çalışılmıştır.

Britton – Robinson tamponu için; 2,47gram  $H_3BO_3$ , 2,7ml derişik  $H_3PO_4$  ve 2,3ml glasiyel  $CH_3COOH$  içeren 1000 mL çözelti bidistile su kullanılarak hazırlanmış ve 5,0 M NaOH çözeltisi ile istenen pH değerine ayarlanmıştır. Bu tamponla pH 2,20 – 12,01 aralığında çalışılmıştır.

#### **2.5.2.2.3. Oligonükleotit Çözeltilerinin Hazırlanışı**

Tüm oligonükleotit stok çözeltileri Mili Q distile su ile 1000 µg/mL derişiminde hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı.

#### **2.5.2.3. Standart Maddelerin Saflık Verileri**

Firmalar tarafından yollanan analiz sertifikaları sayesinde, firmalardan temin edilen standartların çalışmalarımızı yürütebilecek özellikleri taşıdığı görülmüştür.

### 2.5.3. Deneylerde Kullanılan Yöntemler

#### 2.5.3.1. Guanin Sinyali için Optimum Şartların Belirlenmesi

Kullanılan elektrotların aktivasyonu, elektrot yüzeyine dsDNA immobilize edilmesi (tutturulması), DNA materyalinin madde ile elektrot yüzeyinde ve/veya çözelti fazında etkileşmesinde, mevcut literatürlerde (Erdem ve Ozsoz, 2001a; Erdem ve Ozsoz, 2001b; Ozsoz ve ark., 2002) rapor edilen yol aşağıdaki basamaklarda izlenmiştir.

##### 2.5.3.1.1. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen Farklı Derişimlerdeki dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M Asetat tamponu (pH 4,8) içinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**KGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu:** Yüzeyi aktive edilmiş KGE, asetat tamponu (pH 4,80) içinde hazırlanmış olan 0,20 – 10,00 µg/mL aralığında değişen derişimlerde dsDNA çözeltisine daldırıldı. +0,50 V potansiyel 120 saniye süreyle karışan ortamda uygulanarak dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Ölçüm:** +0,5 V ile +1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, asetat tamponu (pH 4,80) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

### 2.5.3.1.2. KGE Yüzeyine Farklı Zamanlarda İmmobilize Edilen dsDNA'ya Ait

#### Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tamponu (pH 4,8) içinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**KGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu:** Yüzeyi aktive edilmiş KGE, asetat tamponu (pH 4,80) içinde hazırlanmış olan 2,00 µg/mL derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. +0,50 V potansiyelde 30-300sn aralığında değişen sürelerde karışan ortamda uygulanarak dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

**Ölçüm:** +0,5 V ile +1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genişliğinde tarama yapılarak, asetat tamponu (pH 4,80) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

### 2.5.3.1.3. Çözelti Ortamındaki Farklı Derişimlerdeki dsDNA'ya Ait Guanin

#### Yükseltgenme Sinyalinin Tayini

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,80) +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**Ölçüm:** Asetat tamponu içerisinde hazırlanan 0,20 – 10,00 µg/mL değişen derişimlerdeki dsDNA, 120 saniye dış ortamda karıştırıldıktan sonra asetat tamponu ile

+0,50 V ile + 1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak ölçüm alındı.

#### **2.5.3.1.4. Çözelti Ortamındaki Farklı Zamanlarda dsDNA'ya Ait Guanin**

##### **Yükseltgenme Sinyalinin Tayini**

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,80) +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**Ölçüm:** Asetat tamponu içerisinde hazırlanan 5,00 µg/mL dsDNA dış ortamda 30-240 sn değişen zamanlarda karıştırıldıktan sonra asetat tamponu ile +0,50 V ile + 1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak ölçüm alındı.

#### **2.5.3.2. Efavirenz'in Boş Kalem Grafit Elektrotta Yükseltgenme Mekanizmasının**

##### **ve dsDNA Modifiye Edilmiş Elektrotta Guanin Sinyali Üzerinden İlaç-DNA Etkileşiminin İncelenmesi**

##### **2.5.3.2.1. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi**

Boş kalem grafit elektrot ile yapılan deneylerde kullanılan efavirenz 5 mg hassas şekilde tartılarak, 5 ml metanol içerisinde 1000 µg/mL derişimde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan değişik derişimlerde ve değişik destek elektrolitleri içerisindeki efavirenz çözeltilerinde %20 metanol oranı sürekli sabit tutulmuştur.

#### **2.5.3.2.2. Voltametrik Yöntemin Tabletlere Uygulanması**

6 adet Stocrin® film tablet hassas olarak tartılmış ve bir havanda ince toz haline getirilmiştir. Bu tozdan 1mg/mL'e eşdeğer miktarda tam tartılmış ve 5mL'lik plastik tüpte metanol ile tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 45 dakika karıştırılmıştır. Sonunda elde edilen berrak çözeltiden uygun miktarda alınmış ve seçilmiş destek elektrolitleri (boş elektrot için pH 3,00 BRT; dsDNA modifiye edilmiş elektrot için pH 4,80 asetat tamponu) ile tüpte gerekli hacime tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin standart çözeltilerle aynı koşullarda voltamogramları alınmıştır.

#### **2.5.3.2.3. Efavirenz İçin Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları**

Tablet içerisindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını anlamak amacıyla tabletlerden geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla belirli miktarda toz edilmiş tablet (efavirenz miktarı önceden tayin edilen) ve belirli miktarda saf madde karışımı belli bir hacimde metanol içinde çözüldükten sonra tabletlere uygulanan işlemler aynen bu çözeltilere de uygulanmış, üstteki berrak çözeltiden kalibrasyon grafiği içerisinde yer alan bir derişime karşılık gelen hacimde çözelti alınmış ve destek elektroliti ile seyreltilip voltamogramları kaydedilmiştir. Buradan da voltametrik deney sonucunda bu tartılan saf madde miktarının ne kadarının tayin edilebildiği hesaplanmıştır.



#### 2.5.3.2.4. Efavirenz ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi

1000 µg/mL efavirenz stok çözeltisi metanol ile hazırlandı. 0,50 M asetat tamponu (pH 4,8) çalışma ortamı olarak kullanıldı.

##### 2.5.3.2.4.1. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA ile Farklı Derişimde

##### Efavirenz Etkileşmesinin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesi

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tamponu (pH 4,80) içinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**KGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu:** Yüzeyi aktive edilmiş KGE, asetat tamponu (pH 4,80) içinde hazırlanmış olan 2,00 µg/mL derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. +0,50 V potansiyel 240 saniye süreyle karışan ortamda uygulanarak dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Efavirenz' in dsDNA ile etkileşimi:** dsDNA immobilize edilmiş KGE, potansiyel uygulanmaksızın asetat tamponu (pH 4,80) içerisinde 2,00 – 32,00 µg/mL aralığında değişen derişimlerde hazırlanan efavirenz ile 120 saniye süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Ölçüm:** +0,5 V ile +1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, asetat tamponu (pH 4,80) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

#### 2.5.3.2.4.2. Elektroda Tutturulmuş dsDNA'nın Efavirenz ile Zamana Göre Etkileşmesinin İncelenmesi

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tamponu (pH 4,8) içinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**KGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu:** Yüzeyi aktive edilmiş KGE, asetat tamponu (pH 4,80) içinde hazırlanmış olan 2,00 µg/mL derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. +0,50 V potansiyel 240 saniye süreyle karışan ortamda uygulanarak dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Efavirenz' in dsDNA ile etkileşimi:** dsDNA immobilize edilmiş KGE, potansiyel uygulanmaksızın asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 24,00 µg/mL derişimde hazırlanan efavirenz ile 30 – 300 saniye arasında değişen sürelerde, karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

**Ölçüm:** +0,50 V ile +1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, asetat tamponu (pH 4,80) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

### **2.5.3.3. Löprolid'in Boş Kalem Grafit Elektrotta Yükseltgenme Mekanizmasının ve dsDNA Modifiye Edilmiş Elektrotta ve Çözelti Ortamında Guanin Sinyali Üzerinden İlaç-DNA Etkileşiminin İncelenmesi**

#### **2.5.3.3.1. Standart Maddenin Stok Çözeltisi**

Boş kalem grafit elektrot ile yapılan deneylerde kullanılan löprolid 5mg hassas şekilde tartılarak, 10ml saf su içerisinde 500µg/mL derişimde stok çözeltileri hazırlanmıştır.

#### **2.5.3.3.2. Voltametrik Yönteminlerin Enjeksiyon Çözeltisine Uygulanması**

Lucrin® hazır farmasötik preparatından 1mg/mL'e eşdeğer miktarda ölçülü alıp 5mL'lik plastik tüpte saf su ile tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 10 dakika karıştırılmıştır. Sonunda elde edilen berrak çözeltiden uygun miktarda alınmış ve seçilmiş destek elektroliti (boş elektrot için pH 2,00 BRT; dsDNA modifiye edilmiş elektrot için pH 4,80 Asetat tamponu) ile tüpte gerekli hacime tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin standart çözeltileyle aynı koşullarda voltamogramları alınmıştır.

#### **2.5.3.3.3. Löprolid İçin Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları**

Enjeksiyonluk çözelti içerisindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını anlamak amacıyla enjeksiyonluk preparatlardan geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla belirli miktarda enjeksiyonluk çözeltisi ve belirli miktarda saf madde karışımı belli bir hacimde distile su içinde çözüldükten sonra enjeksiyonluk çözeltilere uygulanan işlemler aynen bu çözeltilere de uygulanmış, üstteki berrak çözeltiden kalibrasyon

grafifi içerisinde yer alan bir derişime karşılık gelen hacimde çözelti alınmış ve destek elektroliti ile seyreltilip voltamogramları kaydedilmiştir. Buradan da voltametrik deney sonucunda bu tartılan saf madde miktarının ne kadarının tayin edilebildiği hesaplanmıştır.

#### **2.5.3.3.4. Löprolid ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi**

1000 µg/mL löprolid stok çözeltisi saf su ile hazırlandı. 0,50 M asetat tamponu (pH 4,8) çalışma ortamı olarak kullanıldı.

##### **2.5.3.3.4.1. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA ile Farklı Derişimlerde Löprolid Etkileşmesinin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesi**

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tamponu (pH 4,80) içinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**KGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu:** Yüzeyi aktive edilmiş KGE, asetat tamponu (pH 4,80) içinde hazırlanmış olan 2,00 µg/mL derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. +0,50 V potansiyel 240 saniye süreyle karışan ortamda uygulanarak dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Löprolid'in dsDNA ile etkileşimi:** dsDNA immobilize edilmiş KGE, potansiyel uygulanmaksızın asetat tamponu (pH 4,80) içerisinde 0,2-10,0 µg/mL aralığında değişen

derişimlerde hazırlanan löprolid ile 60 saniye süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

**Ölçüm:** +0,5 V ile +1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, asetat tamponu (pH 4,8) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

#### 2.5.3.3.4.2. Elektroda Tutturulmuş dsDNA'nın Löprolid ile Zamana Göre

##### Etkileşmesinin İncelenmesi

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tamponu (pH 4,8) içinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**KGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu:** Yüzeyi aktive edilmiş KGE, asetat tamponu (pH 4,80) içinde hazırlanmış olan 2,00 µg/mL derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. +0,50 V potansiyel 240 saniye süreyle karışan ortamda uygulanarak dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Löprolid' in dsDNA ile etkileşimi:** dsDNA immobilize edilmiş KGE, potansiyel uygulanmaksızın asetat tamponu (pH 4,80) içerisinde 6,00 µg/mL derişimde hazırlanan löprolid ile 30-360 saniye arasında değişen sürelerde, karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Ölçüm:** +0,5 V ile +1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, asetat tamponu (pH 4,80) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

#### 2.5.3.3.4.3. Löprolid ile dsDNA' nın Çözelti Ortamında Etkileşmesinin Guanin

##### Yükseltgenme Sinyali Üzerinden İncelenmesi

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tamponu (pH 4,80) içinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**Löprolid ile dsDNA' nın çözelti fazında etkileşimi:** Asetat tamponu (pH 4,80) ile hazırlanan 5,00 µg/mL dsDNA çözeltisi içerisine değişen derişimlerde löprolid ilave edildi ve 120 saniye dış ortamda karıştırılarak etkileştirildi.

**Ölçüm:** +0,5 V ile +1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, asetat tamponu (pH 4,80) ortamında karışımın ölçümü gerçekleştirildi. +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

#### 2.5.3.4. Fulvestrant'ın Bor ile Dope Edilmiş Elmas Elektrotta Yükseltgenme

##### Mekanizmasının ve dsDNA Modifiye Edilmiş Kalem Elektrotta Guanin

##### Sinyali Üzerinden İlaç-DNA Etkileşiminin İncelenmesi

#### 2.5.3.4.1. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi

Bor ile dope edilmiş elmas elektrot ile yapılan deneylerde kullanılan fulvestrant hassas şekilde tartılarak, asetonitril içerisinde  $1 \times 10^{-3}$  M derişimde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan değişik derişimlerde ve değişik destek elektrolitleri içerisindeki fulvestrant çözeltilerinde %30 asetonitril oranı sürekli sabit tutulmuştur.

#### 2.5.3.4.2. Voltametik Yöntemin Enjeksiyonluk Preparatlara Uygulanması

Faslodex® 250mg/5mL farmasötik prepatından  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  (bor ile dope edilmiş elmas elektrot için) ve 0,5mg/mL (kalem grafit elektrot için)'e eşdeğer miktarda ölçülüp alınmış ve 10mL'lik plastik tüpte asetronitril (BDEE elektrot için) veya etanol (KGE için) ile tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 15 dakika karıştırılmıştır. Sonunda elde edilen berrak çözeltiden uygun miktarda alınmış ve seçilmiş destek elektroliti (boş BDEE elektrot için 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; dsDNA modifiye edilmiş KG elektrot için pH 4,80 asetat tamponu) ile tüpte gerekli hacime tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin standart çözeltilerle aynı koşullarda voltamogramları alınmıştır.

#### 2.5.3.4.3. Fulvestrant İçin Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları

Enjeksiyonluk preparat içerisindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını anlamak amacıyla enjeksiyonluk preparattan geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla belirli miktarda enjeksiyonluk preparat (fulvestrant miktarı önceden tayin edilen) ve belirli miktarda saf madde karışımı belli bir hacimde asetronitril veya etanol içinde çözüldükten sonra enjeksiyonluk preparata uygulanan işlemler aynen bu çözeltilere de uygulanmış, üstteki berrak çözeltiden kalibrasyon grafiği içerisinde yer alan bir derişime karşılık gelen hacimde çözelti alınmış ve destek elektroliti ile seyreltilip voltamogramları kaydedilmiştir. Buradan da voltametik deney sonucunda bu ölçülen saf madde miktarının ne kadarının tayin edilebildiği hesaplanmıştır.

#### 2.5.3.4.4. Fulvestrant Serum Stok Çözeltisi

Bunun için, 10 ml'lik ağız kapaklı santrifüj tüpüne 3,2 ml insan serumu konulur. İnsan serumu üzerine,  $1 \times 10^{-2}$  M'lık standart maddenin stok çözeltisinden toplam hacimde  $10^{-3}$  M olacak şekilde fulvestrant ilave edilir. Üzerine 4,8 ml asetronitril ilave edilerek serum proteinleri çöktürülür. Çözeltinin iyice karışması ve fulvestrant ile serum numunesinin iyice etkileşmesini sağlamak için 30 dk süreyle ultrasonik banyoda karıştırılır. Daha sonra 5000 rpm'de 20 dk süreyle santrifüj edilir, böylece serum proteinlerinin çökmesi sağlanır. Üstteki berrak çözeltiden ( $10^{-3}$  M'lık serum stoğundan) gerekli miktarlarda (1ml ) alınarak hacim 10 ml'ye destek elektroliti ile tamamlanır ( $10^{-4}$  M'lık serum stoğu elde edilir) ve deney hücrelerine alınır. DPV eğrileri standart fulvestrant eğrileri gibi kaydedilir. Çalışmaların sonunda elde edilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanarak insan serumundan (herhangi bir ilaç kullanmayan ve onayları alınmış sağlıklı kişilerden alınan serumdan) fulvestrant'ı geri kazanmak için yüzde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

#### 2.5.3.4.5. Fulvestrant ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri

##### Tekniği İle Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi

1000 µg/mL fulvestrant stok çözeltisi etanol ile hazırlandı. 0,50 M asetat tamponu (pH 4,80) çalışma ortamı olarak kullanıldı. Hazırlanan değişik derişimlerde ve değişik destek elektrolitleri içerisindeki fulvestrant çözeltilerinde %30 etanol oranı sürekli sabit tutulmuştur.



#### 2.5.3.4.5.1. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA ile Farklı Derişimlerde

##### Fulvestrant Etkileşmesinin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesi

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tamponu (pH 4,80) içinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**KGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu:** Yüzeyi aktive edilmiş KGE, asetat tamponu (pH 4,80) içinde hazırlanmış olan 2,00 µg/mL derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. +0,50 V potansiyel 240 saniye süreyle karışan ortamda uygulanarak dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Fulvestrant'ın dsDNA ile etkileşimi:** dsDNA immobilize edilmiş KGE, potansiyel uygulanmaksızın asetat tamponu (pH 4,80) içerisinde 5,00-40,00 µg/mL değişen derişimlerde hazırlanan fulvestrant ile 120 saniye süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Ölçüm:** +0,5 V ile +1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, asetat tamponu (pH 4,80) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

#### 2.5.3.4.5.1. Elektroda Tutturulmuş dsDNA'nın Fulvestrant ile Zamana Göre Etkileşmesinin İncelenmesi

**KGE aktivasyonu:** Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tamponu (pH 4,80) içinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**KGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu:** Yüzeyi aktive edilmiş KGE, asetat tamponu (pH 4,80) içinde hazırlanmış olan 2,00 µg/mL derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. +0,50 V potansiyel 240 saniye süreyle karışan ortamda uygulanarak dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

**Fulvestrant'ın dsDNA ile etkileşimi:** dsDNA immobilize edilmiş KGE, potansiyel uygulanmaksızın asetat tamponu (pH 4,80) içerisinde 10,00 µg/mL derişimde hazırlanan fulvestrant ile 30-420 saniye arasında değişen sürelerde, karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,80) ile gerçekleştirildi.

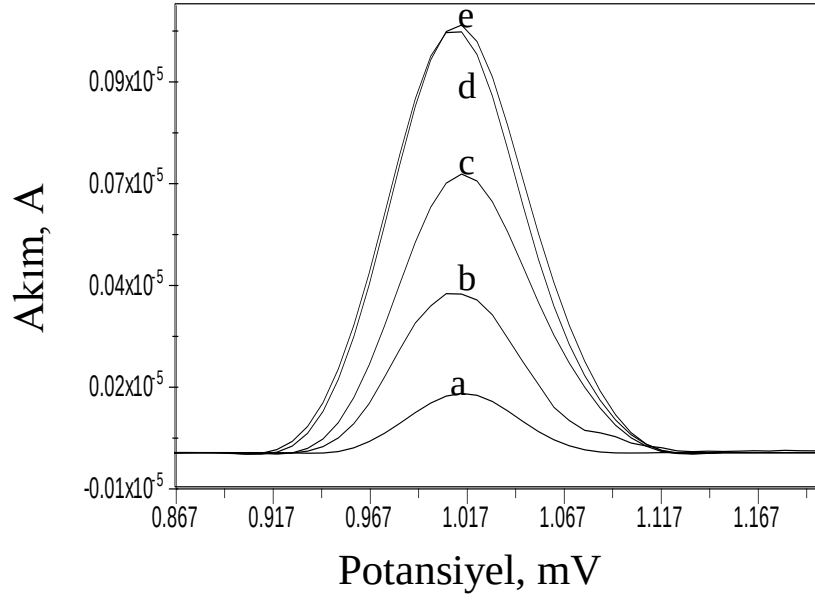
**Ölçüm:** +0,5 V ile +1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, asetat tamponu (pH 4,80) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1,00 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

### **3. BULGULAR**

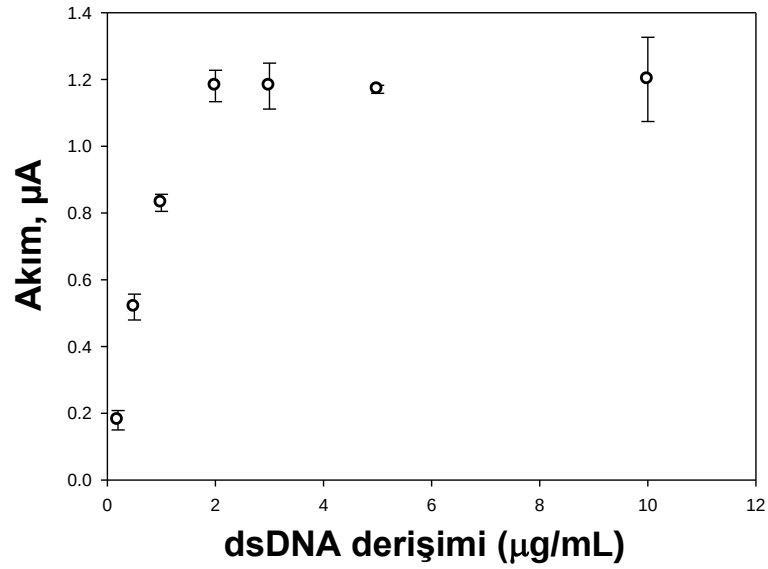
#### **3.1. dsDNA'nın Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrotta ve Çözelti Ortamında Yükseltgenme Sinyallerine Ait Bulgular**

##### **3.1.1.KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen Farklı Derişimlerdeki dsDNA'nın Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular**

Bölüm 2.5.3.1.1. de anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada, tek kullanımlık kalem grafit elektrotta, 0,20–10,00 µg/mL derişim aralığındaki dsDNA'nın, diferansiyel puls voltametri tekniği ile guanin sinyali üzerinden elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiştir. Her bir derişim için ardışık üçer ölçüm alınmıştır. Elde edilen diferansiyel puls voltamogramları şekil 3.1.'de ve dağılım grafiği şekil 3.2' de gösterilmiştir. Ölçümlerin standart hataları dağılım grafiği üzerinde görölmektedir.



**Şekil 3.1.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde dsDNA'nın bazı derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyallerinin AdSDPV eğrileri a) 0,20  $\mu\text{g/mL}$ ; b) 0,50  $\mu\text{g/mL}$ ; c) 1,00  $\mu\text{g/mL}$ ; d) 2,00  $\mu\text{g/mL}$ ; e) 3,00  $\mu\text{g/mL}$



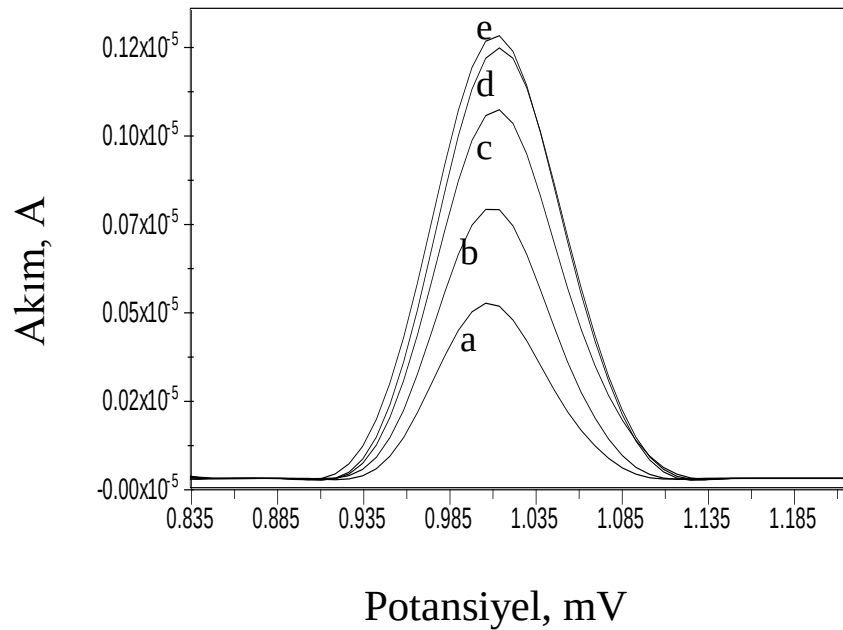
**Şekil 3.2.** 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 5,00; 10,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerdeki dsDNA'ya ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

0,20 – 10,00  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında optimum çalışma derişimi sinyalin yüksek olduğu, 2,00  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir.

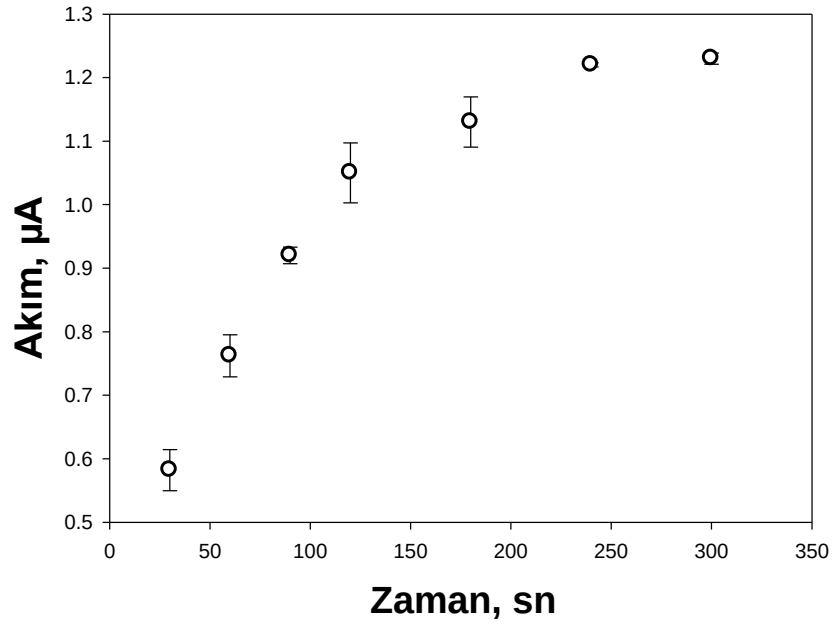
2,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimdeki dsDNA' nın ortalaması 1,02  $\mu\text{A}$  ve bağıl standart sapması (BSS) % 3,81 (n=3) olan anlamlı bir sinyal elde edilmiştir.

### 3.1.2. KGE Yüzeyine Farklı Zamanlarda İmmobilize Edilen dsDNA'nın Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.5.3.1.2. de anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada, tek kullanımlık kalem elektrotta, 2,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimdeki dsDNA'nın, diferansiyel puls voltametri tekniğı ile 350 rpm'de karıştırma süresi 30–300 sn arasında arttırılmıştır. Her bir karıştırma süresi için ardışık üçer ölçüm alınmıştır. Elde edilen diferansiyel puls voltamogramları şekil 3.3.'de ve dağılım grafiğı şekil 3.4'de gösterilmiştir. Ölçümlerin standart hataları dağılım grafiğı üzerinde görölmektedir.



**Şekil 3.3.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA'nın farklı karıştırma hızlarındaki guanin yükseltgenme sinyallerinin AdSDPV eğrileri a) 30 sn; b) 60 sn; c) 120 sn; d) 240 sn; e) 300 sn



**Şekil 3.4.** 2,00µg/mL dsDNA'nın 30; 60; 90; 120; 180; 240; 300 saniye değişen sürelerde karıştırılmasına ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

30–300 saniye değişen zaman aralığında optimum çalışma süresi 240 sn olarak belirlenmiştir.

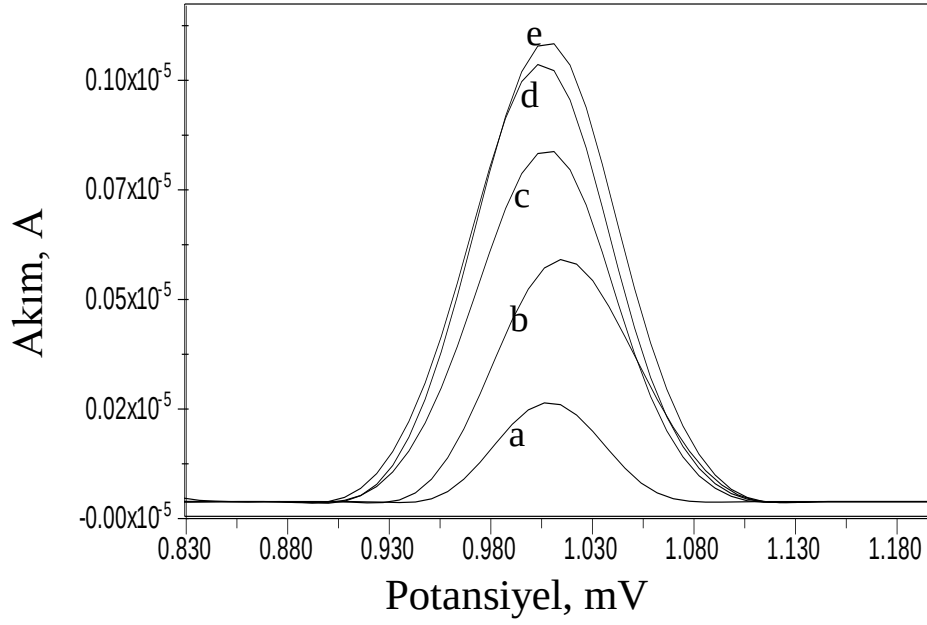
2,00 µg/mL derişimde dsDNA'nın 240sn karıştırma süresinde elde edilen akımlarının ortalaması 1,20 µA ve bağıl standart sapması (BSS) % 1,91 (n=3) olan anlamlı bir sinyal elde edilmiştir.

### 3.1.3. Çözelti Ortamında Farklı Derişimlerdeki dsDNA' ya ait Guanin

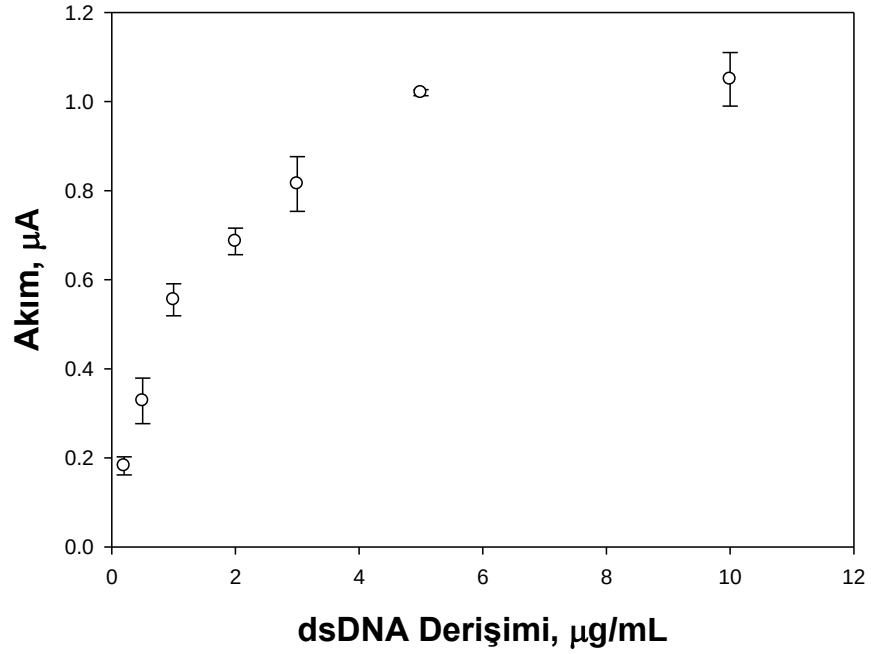
#### Yükseltgenme Sinyaline Ait Bulgular

Bölüm 2.5.3.1.3. de anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada, tek kullanımlık kalem grafit elektrot (KGE) ile çözelti ortamındaki, 0,20–10,00 µg/mL derişim aralığındaki dsDNA' nın, diferansiyel puls voltametri tekniği ile elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiştir. Her bir

derişim için ardışık üçer ölçüm alınmıştır. Elde edilen diferansiyel puls voltamogramları şekil 3.5.'de ve dağılım grafiğı şekil 3.6' da gösterilmiştir. Ölçümlerin standart hataları dağılım grafiğı üzerinde görölmektedir.



**Şekil 3.5.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde dsDNA'nın bazı derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyallerinin AdSDPV eğrileri a) 0,20 µg/mL; b) 1,00 µg/mL; c) 3,00 µg/mL; d) 5,00 µg/mL; e) 10,00µg/mL



**Şekil 3.6.** 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 5,00; 10,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerdeki dsDNA'ya ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

0,20 – 10,00  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında optimum çalışma derişimi olarak 5,00  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir.

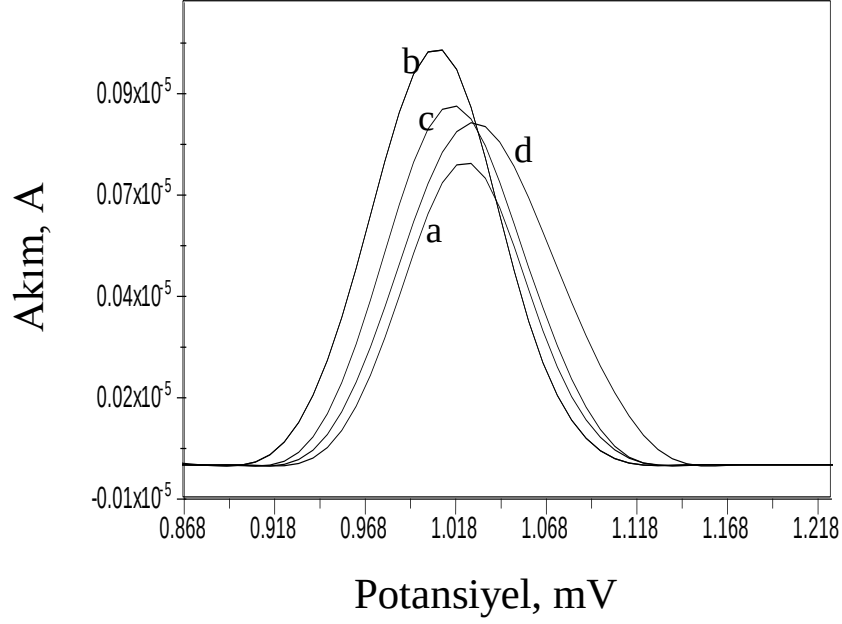
5,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimdeki dsDNA'dan ortalaması 1,01  $\mu\text{A}$  ve bağıl standart sapması (BSS) %1,14 (n=3) olan anlamlı bir sinyal elde edilmiştir.

#### 3.1.4. Çözelti Ortamında Farklı Zamanlarda dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular

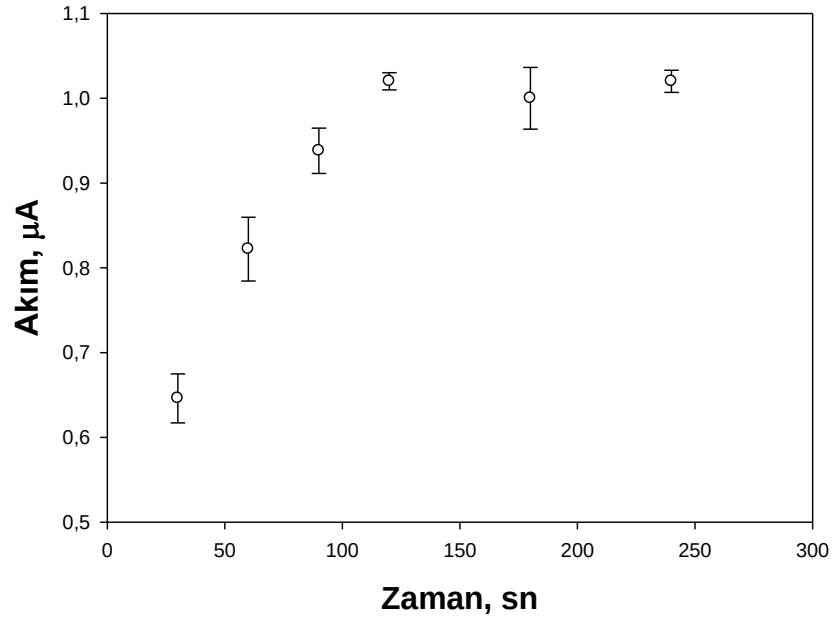
Bölüm 2.5.3.1.4. de anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada, tek kullanımlık kalem elektrotta, 5,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimdeki dsDNA'nın, diferansiyel puls voltametri tekniği ile 350rpm'de karıştırma süresi 30-240sn arasında arttırılmıştır. Her bir karıştırma süresi için ardışık üçer ölçüm alınmıştır. Elde edilen diferansiyel puls voltamogramları şekil



3.7’de ve dağılım grafiği şekil 3.8’ de gösterilmiştir. Ölçümlerin standart hataları dağılım grafiği üzerinde görülmektedir.



**Şekil 3.7.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde 5,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA'nın farklı karıştırma hızlarındaki guanin yükseltgenme sinyallerinin AdSDPV eğrileri a) 60 sn; b) 120 sn; c) 180 sn; d) 300 sn



**Şekil 3.8.** 5,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile farklı sürelerde (30; 60; 90; 120; 180; 240 s) karıştırılmasına ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri

30 – 300 saniye zaman aralığında optimum bekletme süresi 120sn olarak belirlenmiştir.

5,00 µg/mL derişimdeki dsDNA'nın 120sn karıştırma süresinde ortalaması 1,02 µA ve bağıl standart sapması (BSS) %1,75 (n=3) olan anlamlı bir sinyal elde edilmiştir.

### 3.2. Efavirenz Üzerindeki İncelemeler

Çalışma maddesi olarak seçilen efavirenz üzerinde dönüşümlü voltametri (DV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV) teknikleri kullanılarak değişik ortamlarda ve pH değerlerinde kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

AUTOLAB 30 elektrokimyasal analizörü, kalem grafit çalışma elektrodu, platin tel yardımcı elektrot ve Ag/AgCl referans elektrot (MF 2052) deneylerin tamamında kullanılmıştır.

Diferansiyel puls voltametrisi tekniğinde en uygun ortamı seçebilmek için pH 2,00–12,00 arasındaki Britton-Robinson (BR) tamponuyla elektrokimyasal davranışı yükseltgenme yönünde incelenmiştir. Deneylerde analitik amaçlar için en uygun ortamın pH 3,00 BRT olduğu saptanmıştır.

Yukarıdaki pH ve ortamda, saf maddenin davranışı değişen hızlarda incelendikten sonra ticari tabletler üzerindeki uygulamaya geçilmiş ve bu amaçla Merck Sharp & Dohme ilaç firmasından temin edilen ve her biri 600 mg efavirenz içeren Stocrin® adlı ilaçtan örnekler alınıp tabletlerden miktar tayini ve % geri kazanım deneyleri yapılmıştır.

### 3.2.1. Efavirenz Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar

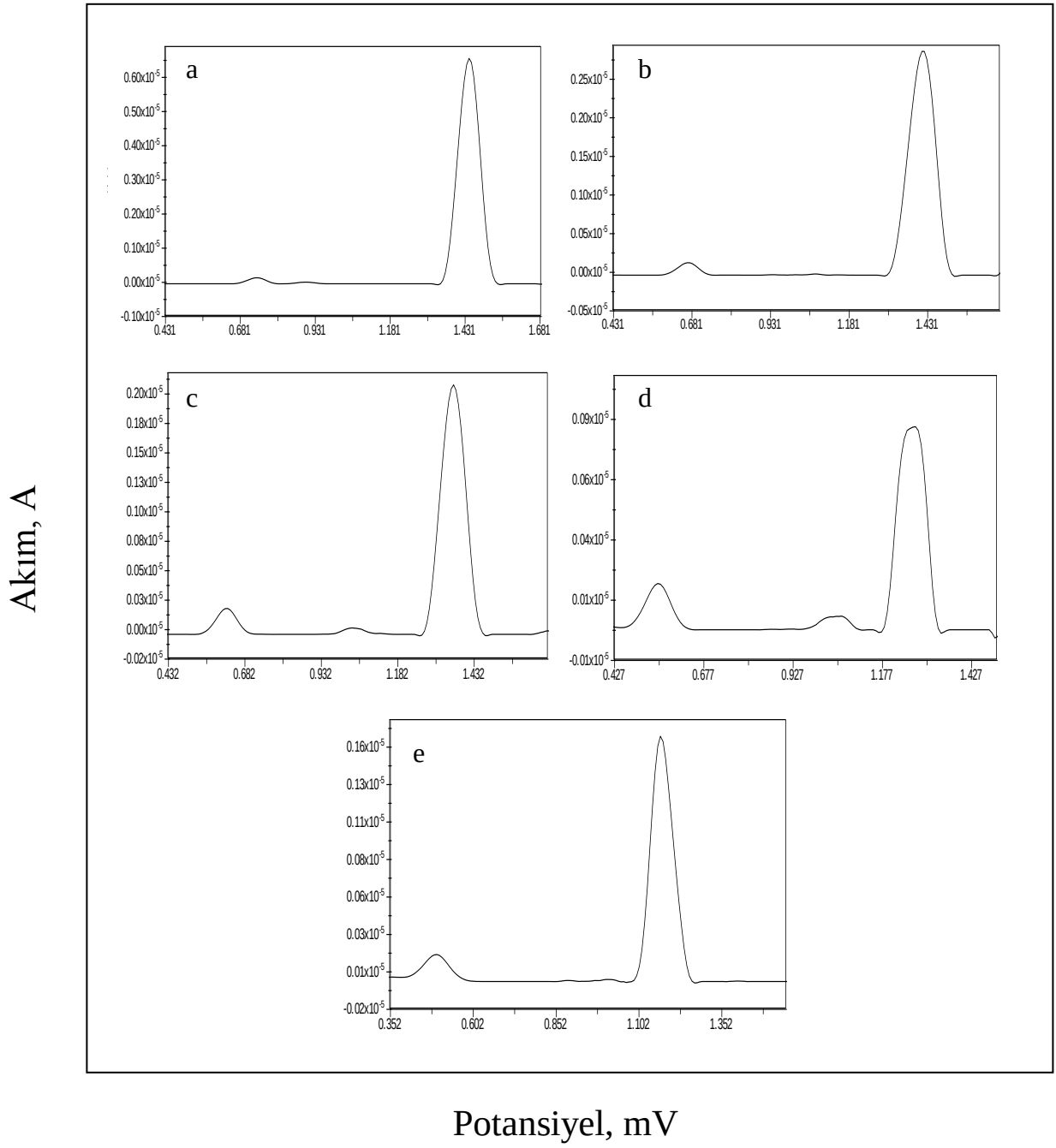
Efavirenz'in voltametrik incelemesi, kalem grafit elektrot ile diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve dönüşümlü voltametri (DV) teknikleri kullanılarak yapılmıştır.

#### 3.2.1.1. Efavirenz'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Diferansiyel Puls Voltametri Çalışmaları

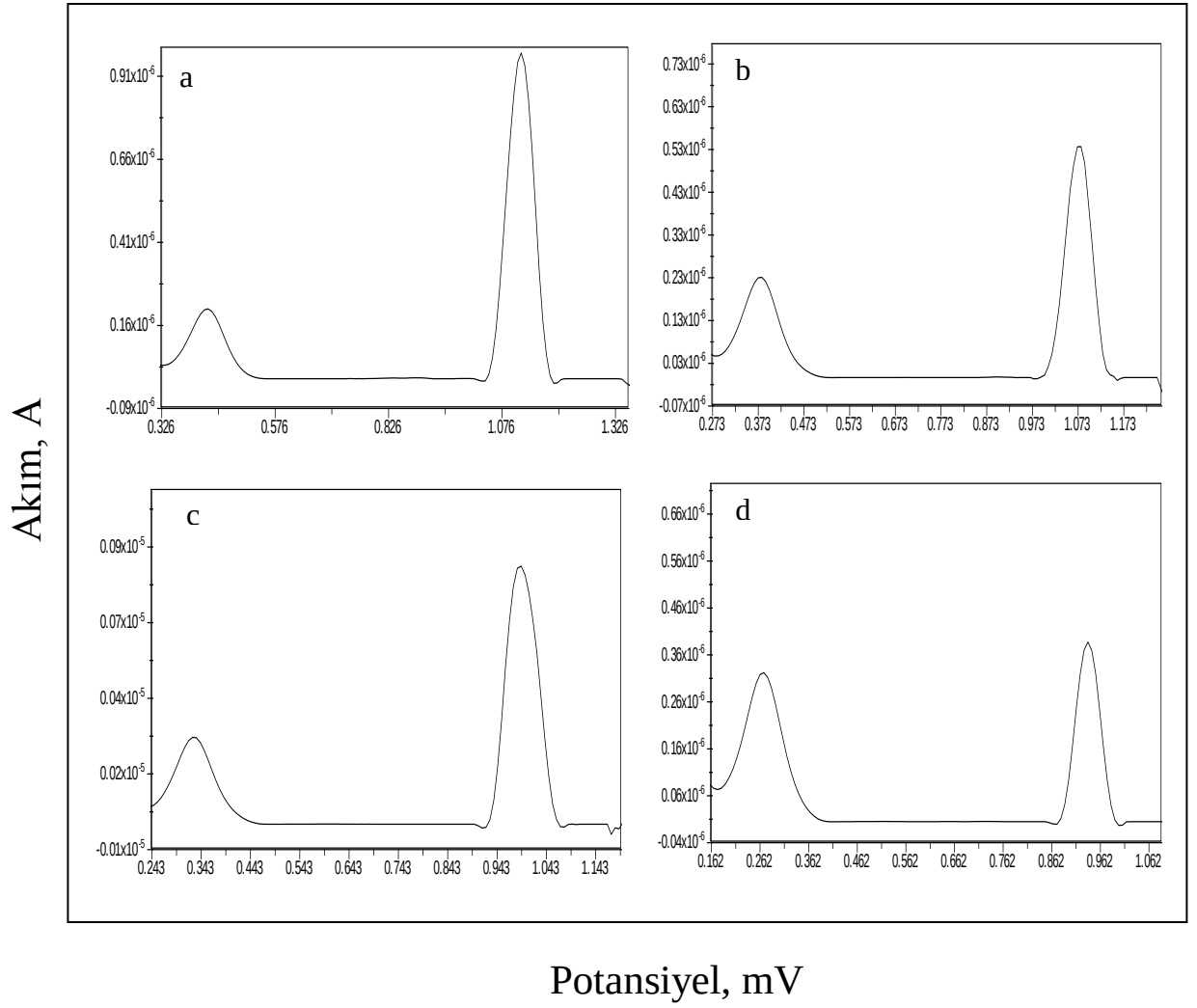
Efavirenz'in BR tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 2,00; 3,03; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,03; 9,00; 10,00; 11,00; 12,00 BR tampon çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde 2,00µg/mL derişimde, %20 metanollü ortamda çalışılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerdendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektrolitinin cinsinin ve pH'ının reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2,00µg/mL derişimi ile pH 2,00–12,00 BR tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.9a ve 3.9b'de görölmektedir.

pH 2,00'de pik 1444 mV'da gözlenirken pH arttıkça bu pikin daha az pozitif potansiyellere kaydığı saptanmıştır. pH 2,00–12,00 arasındaki potansiyeller değerdleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.



**Şekil 3.9a.** 2,00µg/mL efavirenz'in pH 2,00 – 6,00 arası BR tamponları içerisindeki voltamogramları. a) pH 2,00; b) pH 3,00; c) pH 4,00; d) pH 5,00; e) pH 6,00.



**Şekil 3.9b.** 2,00µg/mL efavirenz'in pH 7,00 – 10,00 arası BR tamponları içerisindeki voltamogramları. a) pH 7,00 b) pH 8,00; c) pH 9,00; d) pH 10,00.

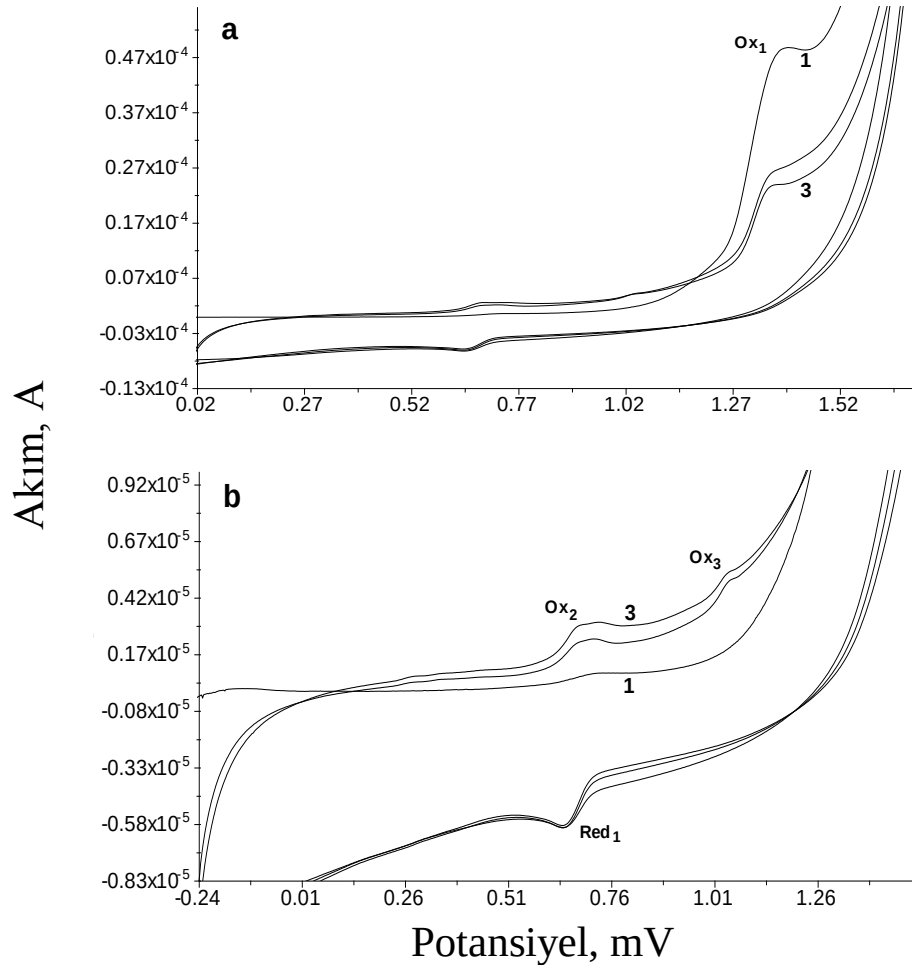
**Çizelge 3.1.** BRT çözeltileri içerisinde kaydedilen 2,00µg/mL efavirenz'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

| pH    | Pik Potansiyeli<br>(mV) | Pik Akımı<br>(µA) |
|-------|-------------------------|-------------------|
| 1,93  | 1444                    | 2,64              |
| 3,00  | 1389                    | 2,29              |
| 4,00  | 1365                    | 1,48              |
| 5,00  | 1270                    | 0,86              |
| 6,00  | 1166                    | 1,64              |
| 7,00  | 1119                    | 1,00              |
| 8,00  | 1079                    | 0,55              |
| 9,00  | 992                     | 0,86              |
| 10,00 | 936                     | 0,39              |

### 3.2.1.2. Efavirenz'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü

#### Voltametri Çalışmaları

pH 3,00 BRT içerisinde 30,00 $\mu$ g/mL efavirenz içeren çözeltinin altı devirli voltamogramı kalem grafit elektrot ile 100mVs<sup>-1</sup> hızla çizdirilmiştir (Şekil 3.10). İlk devirde anodik yönde efavirenz'in 1400mV civarında (Ox<sub>1</sub>) yükseltgenme pikinin ve katodik yönde 630mV civarında küçük bir indirgenme pikinin olduğu gözlenmiştir. 2. devirde, 700mV (Ox<sub>2</sub>)'da ve 1040mV (Ox<sub>3</sub>)'da iki küçük anodik pik belirmiştir. Bu yeni pikler efavirenzin birinci devirde yükseltgenmesinden sonra gözlenmiştir.



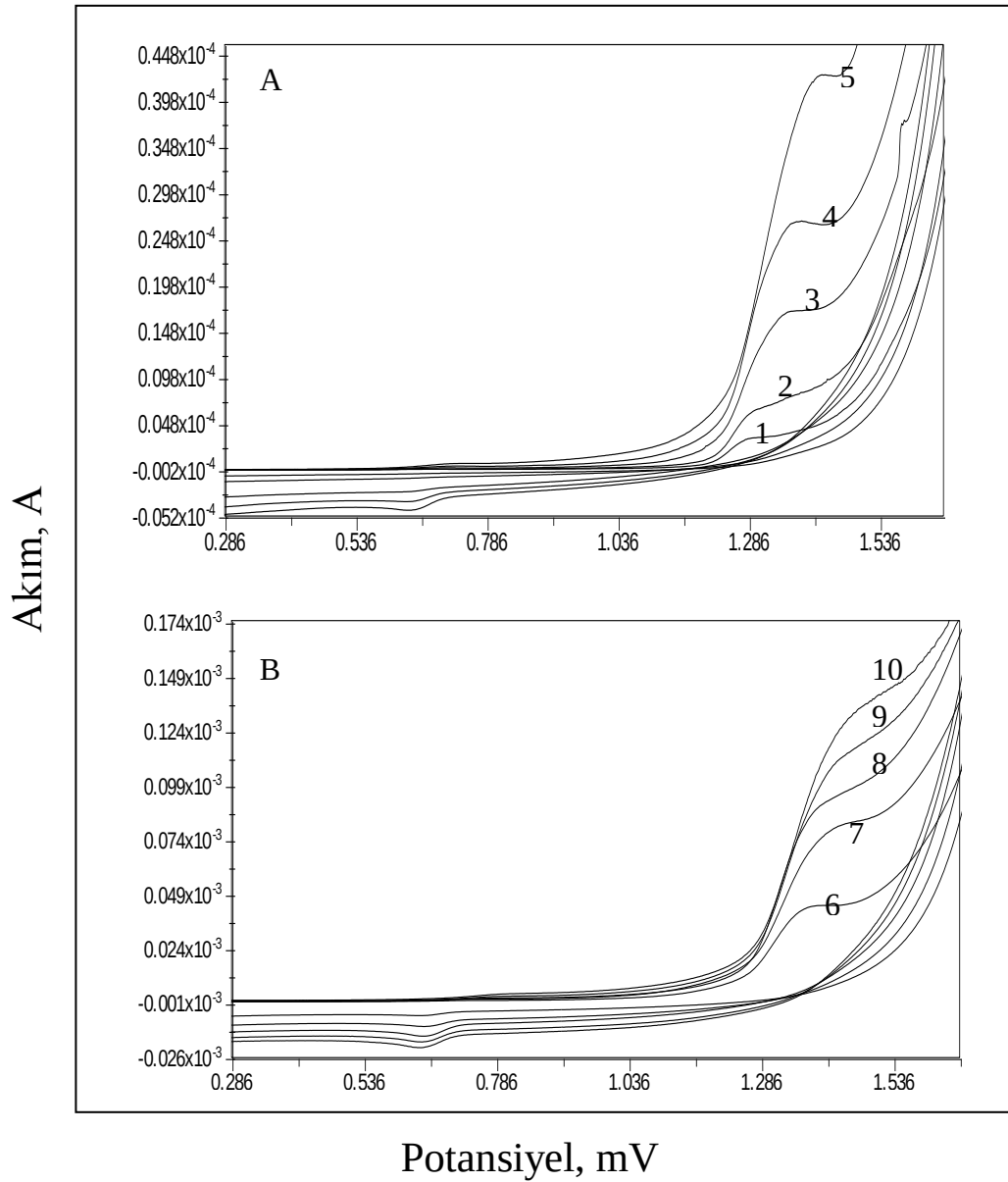
**Şekil 3.10.** pH 3,00 BRT içerisinde 30,00 $\mu$ g/mL efavirenz içeren çözeltinin altı devirli dönüşümlü voltamogramı (a); 2. ve daha büyük devirlerde görülen ilave akımlar (b)

Akım değerinin en yüksek okunduğu 3,00 BRT çözeltisi içinde 30,00µg/mL efavirenz'in değişik tarama hızlarındaki eğrileri 5-1000mVs<sup>-1</sup> aralığında kaydedilmiştir. Bu deneylerden elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman 5-100mVs<sup>-1</sup> aralığında hızın karekökü ile akımın doğrusal olarak arttığı ve potansiyelin 5-100mVs<sup>-1</sup> aralığında 146mV kaydığı saptanmıştır. Bu deneylerden elde edilen veriler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Bu deneylere ait voltamogram da Şekil 3.11a ve b'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** 30,00µg/mL efavirenz'in pH 3,00 BRT çözeltisi içerisinde 5-1000mVs<sup>-1</sup> tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (Ep) ve akım (ip) değerleri.

| Tarama hızı<br>(mVs <sup>-1</sup> ) | $v^{1/2}$ | $i_p$ (µA) | Ep (mV) | logv  | log $i_p$ |
|-------------------------------------|-----------|------------|---------|-------|-----------|
| 5                                   | 2,236     | 34,3       | 1423    | 0,699 | 1,54      |
| 10                                  | 3,162     | 28,3       | 1409    | 1     | 1,45      |
| 25                                  | 5         | 27,4       | 1377    | 1,398 | 1,44      |
| 50                                  | 7,071     | 21,1       | 1389    | 1,699 | 1,32      |
| 75                                  | 8,660     | 13,5       | 1357    | 1,875 | 1,13      |
| 100                                 | 10        | 9,94       | 1389    | 2     | 1,00      |
| 250                                 | 15,811    | 7,66       | 1348    | 2,398 | 0,88      |
| 500                                 | 22,360    | 5,03       | 1340    | 2,699 | 0,70      |
| 750                                 | 27,386    | 2,06       | 1292    | 2,875 | 0,31      |
| 1000                                | 31,623    | 1,15       | 1277    | 3     | 0,06      |





**Şekil 3.11.** 30,00µg/mL efavirenz'in 3,00BRT içerisinde A) 5 – 75 mVs<sup>-1</sup> ; B) 100 – 1000 mVs<sup>-1</sup> tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramları. 1) 5 ; 2) 10 ; 3) 25 ; 4) 50 ; 5) 75; 6) 100; 7) 250; 8) 500; 9) 750; 10) 1000 mVs<sup>-1</sup>

Eğrilerde geri dönüş pikinin olmaması ve hızla birlikte pik potansiyelinin kayması reaksiyonun geri dönüşsüz olduğunu göstermektedir.

Hızın akım ile doğrusal olarak değiştiği  $5 - 100 \text{ mVs}^{-1}$  tarama hızlarında gerekli hesaplamalar yapıldığı zaman doğru denklemi;

$$i_p (\mu\text{A}) = 0,125 v (\text{mVs}^{-1}) + 1,06 \quad r = 0,994 \quad (n = 6)$$

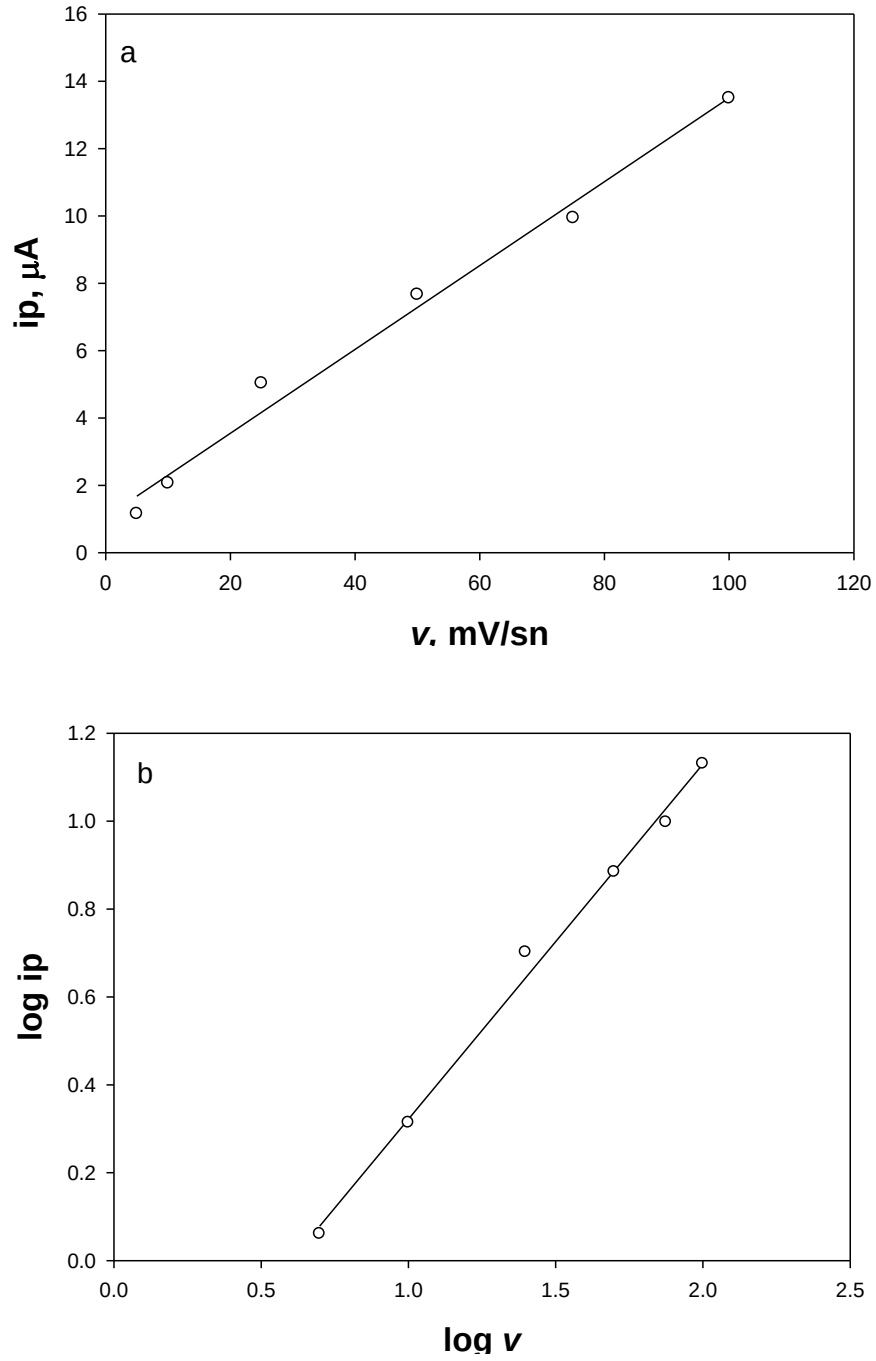
olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 3.12.a). Aynı hız aralığındaki  $\log v - \log i$  grafiği (Şekil 3.12.b) ve denklemi incelenince bulunan eğim değerinin 0,81 olması reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Laviron ve ark., 1980; Greef ve ark., 1990).

Elde edilen doğru denklemi;

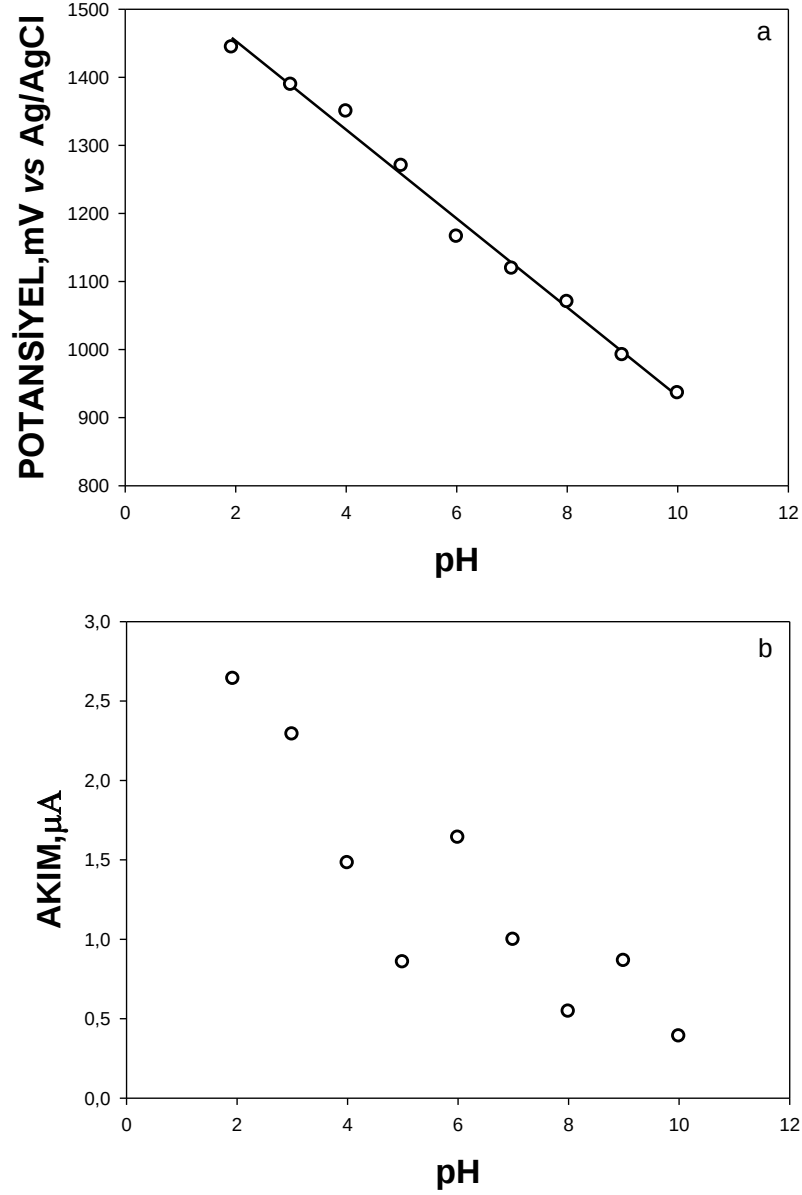
$$\log i_p (\mu\text{A}) = 0,81 \log v (\text{mVs}^{-1}) - 0,49 \quad r = 0,997 \quad (n = 6)$$

(Saf difüzyon kontrollü olduğu zaman ve çözeltinin bu madde için ideal olduğu durumlarda eğim 0,5 , saf adsorbsiyon kontrollü olduğu zaman ve kullanılan elektrodun o olay için ideal olduğu durumlarda 1 olur) (Laviron, 1980)



**Şekil.3.12.** 30,00 $\mu g/mL$  efavirenz'in 3,00BRT içerisinde 5 – 1000  $mVs^{-1}$  tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a)  $v - i_p$  ve b)  $\log v - \log i$  grafikleri

pH'ın potansiyel ve pik akımına etkisini daha rahat görebilmek için bütün pH'ları ve ortamları bir arada gösteren (Pik potansiyeli - pH) Ep-pH, (Pik akımı - pH) İp-pH eğrileri Şekil 3.13a, 3.13b'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.13.** 2,00 µg/mL efavirenz'e ait Ep – pH (a) , İp – pH (b) eğrileri.  
(○) : BRT

Diferansiyel puls voltametri tekniğiyle bütün pH çözeltilerinde, doğrusallık elde edildiği görülmüştür. Şekil 3.13'den de anlaşılacağı gibi pH 10,00' a kadar doğrusallık elde edilmiştir (Çizelge 3.1).

Bu Çizelge değerlerine göre;

$$E_p(\text{mV}) = 1584 - 65.25\text{pH} \quad (r:0.996) \quad (n=9) \quad \text{'dir.}$$

### 3.2.1.3. Geliştirilen Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları

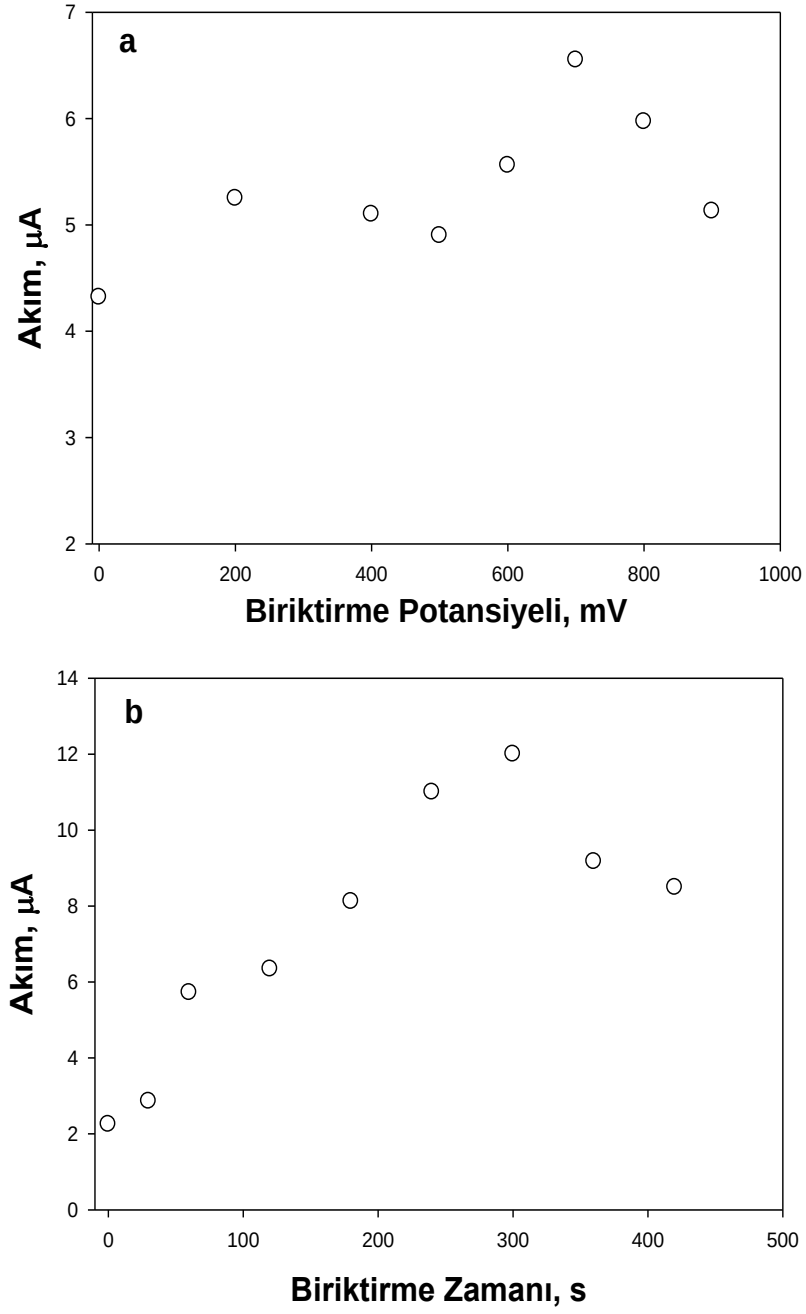
Adsorpsiyon kontrollü olan ve daha hassas bir teknik olan adsorptif sıyırma voltametrik yöntemlerinin uygulanmasına imkân tanıyan efavirenz ile ilgili voltametrik bir çalışmaya literatürlerde rastlanmadı. Adsorptif sıyırma voltametrisi ile miktar tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Elektrot yüzeyinde etken maddenin birikmesi elektrolitik olarak değil, fiziksel adsorbsiyonla meydana gelmiştir. Yeterince etken madde biriktirdikten sonra, birikmiş madde AdSDPV tekniği kullanılarak analiz edilmiştir.

Öncelikle elektrokimyasal ön biriktirme basamağında pik akımının en iyi olduğu, potansiyeli ve zamanı seçmek için şartlar optimize edilmiştir (Çizelge 3.3) (Şekil 3.14a ve 3.14b). Pik akımının en iyi olduğu potansiyeli seçerken 2,00µg/mL derişimdeki AdSDPV için 60sn biriktirme süresi uygulanmıştır. En uygun potansiyeli 700mV olarak belirledikten sonra, bu potansiyelde en uygun zamanı 300sn olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 3.3.** 2,00µg/mL efavirenz'in % 20 metanollü pH 3,00 BRT içerisinde AdSDPV yöntemi ile potansiyel ve zamana göre akımdaki değişiklik

| Potansiyel (mV) | Akım(µA) | Zaman (sn) | Akım(µA) |
|-----------------|----------|------------|----------|
| 0               | 4,32     | 30         | 2,86     |
| 200             | 5,25     | 60         | 5,72     |
| 400             | 5,10     | 120        | 6,34     |
| 500             | 4,90     | 180        | 8,12     |
| 600             | 5,56     | 240        | 11,00    |
| 700             | 6,55     | 300        | 12,00    |
| 800             | 5,97     | 360        | 9,17     |
| 900             | 5,13     | 420        | 8,49     |

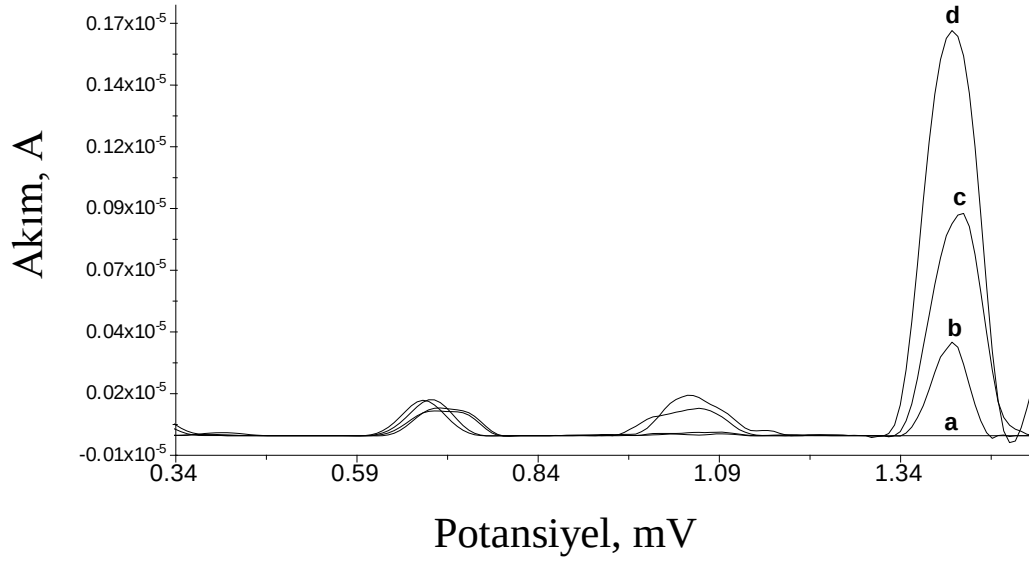


**Şekil 3.14.** AdSDPV tekniğiyle 2,00µg/mL efavirenz'in %20 metanollü pH 3,00 BRT çözeltisi içerisinde a)  $i_p$  (µA) –  $E_p$  (Biriktirme Potansiyeli) b)  $i_p$  (µA) –  $t$  (dk) (Biriktirme Zamanı) grafikleri.

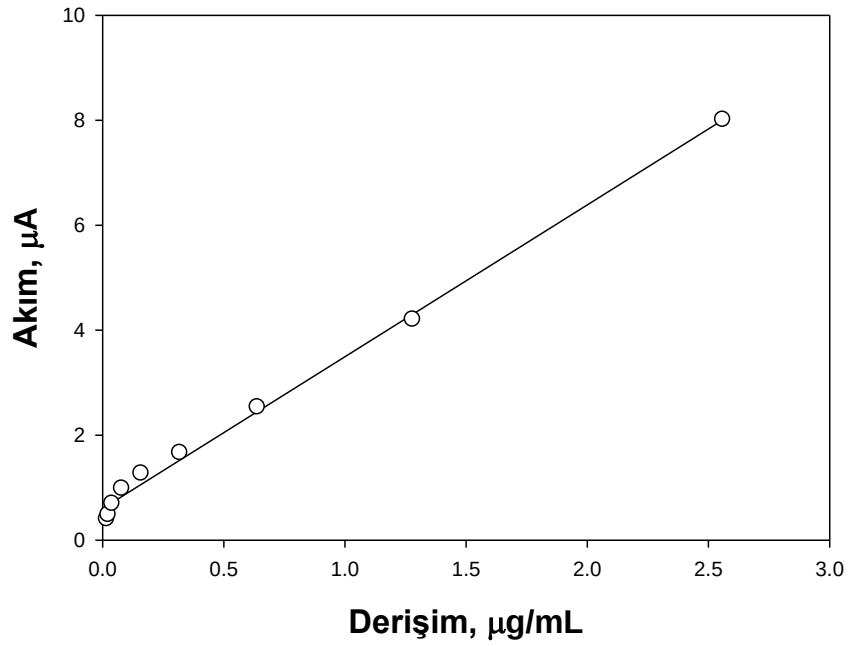
Şekil 3.14'den de anlaşılabileceği gibi bu sonuçlarla elektrokimyasal ön biriktirme basamağındaki şartları optimize edilmiş oldu. Buna göre 700mV'da 300sn bekletilerek akımın en büyük olduğu şartlar sağlanmış oldu. Şartlar optimize edildikten sonra elektrot üzerinde birikmiş olan madde AdSDPV tekniği kullanılarak tayin edilmiştir. Efavirenz'in voltametrik analizi için geliştirilen AdSDPV yöntemi, en yüksek akımın ve en keskin pik şeklinin elde edildiği pH 3,00 BRT içerisine uygulanmıştır. pH 3,00 BRT çözeltisi içinde 0,018 – 2,56 µg/mL derişim aralığında elde edilen AdSDPV eğrilerinden bazı seçilmiş derişimler Şekil 3.15'de verilmiştir.

Efavirenz'in derişiminin pik akımı üzerine etkisi için optimum koşullar % 20 metanollü ortamda pH 3,00 BRT içeren çözeltisinde diferansiyel puls sıyırma voltametrisi kulanılarak elde edilmiştir. Çizelge 3.4'de efavirenz derişimleri (C) ve AdSDPV için +1,34V'da karşılık gelen pik akımı değerleri ( $i_p$ ) verilmiştir. Bu değerlere göre 0,018 – 2,56 µg/mL derişim aralığında derişim-pik akımı arasında  $r = 0,999$  korelasyon katsayısı ile AdSDPV için  $i_p(\mu A) = 2,89 C(M) + 0,601$  eşitliklerine uyan doğrusal ilişki bulunmaktadır (Şekil 3.16). Bu sonuçlara dayanarak, kalem grafit elektrot ile AdSDPV teknikleri kullanılarak efavirenz'in ticari preparatından miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.





**Şekil 3.15.** pH 3,00 BRT içerisinde efavirenz'in bazı derişimlerdeki AdSDPV eğrileri  
(a) destek ; (b) 0,08  $\mu\text{g/mL}$ ; (c) 0,16  $\mu\text{g/mL}$  ; (d) 0,32  $\mu\text{g/mL}$



**Şekil 3.16.** 0,018 – 2,56  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında pH 3,00 BRT içerisinde efavirenz'in (%20 metanollü ortam) AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği

**Çizelge 3.4.** pH 3,00 BRT içerisinde efavirenz için (%20 metanollü ortam) elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları

| Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Akım ( $\mu\text{A}$ ) |
|------------------------------|------------------------|
| 0,0179                       | 0,399                  |
| 0,0238                       | 0,481                  |
| 0,0400                       | 0,693                  |
| 0,0800                       | 0,982                  |
| 0,1600                       | 1,270                  |
| 0,3200                       | 1,660                  |
| 0,6400                       | 2,530                  |
| 1,2800                       | 4,200                  |
| 2,5600                       | 8,010                  |

Çizelge 3.4'deki AdSDPV tekniğı ile elde edilen verileri kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5'de verilen yakalama (YAS) ve tayin alt (TAS) sınırları;

$$\text{YAS} = 3 \text{ s/m}; \text{TAS} = 10 \text{ s/m}$$

formüllerinden bulunmuştur (Riley ve Rosanske, 1996; Swartz ve Krull, 1997)

Bu formüllerde s, en düşük derişimin bir üst derişiminde 3 adet tekrarlanan sonucun standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir.

**Çizelge 3.5.** pH 3,00 BRT içerisinde efavirenz için AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

|                                                      | AdSDPV       |
|------------------------------------------------------|--------------|
| Ölçüm Yapılan Potansiyel (V)                         | 1,34         |
| Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)      | 0,35         |
| Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) | 0,60         |
| Doğrusallık aralığı ( $\mu\text{g/mL}$ )             | 0,018 – 2,56 |
| Eğim ( $\mu\text{A.M}^{-1}$ )                        | 2,89         |
| Kesişim ( $\mu\text{A}$ )                            | 0,601        |
| Korelasyon Katsayısı                                 | 0,999        |
| Eğimin standart hatası                               | 0,0701       |
| Kesişimin standart hatası                            | 0,069        |
| Yakalama Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )*                | 0,0042       |
| Tayin alt Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )*               | 0,0138       |
| Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)            | 1,32         |
| Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)       | 1,58         |

(\*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları 0,018  $\mu\text{g/mL}$  derişiminin 3 değerinden elde edilmiştir.

Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde oldukça iyi sonuçlar elde edilebilmesi, efavirenz içeren piyasa preparatlarından miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

#### **3.2.1.4. Efavirenz İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları**

Efavirenz tayini için geliştirilen voltametrik teknik piyasa preparatlarına çalışmalarına uygulanmıştır.

##### **3.2.1.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım alışmaları**

Efavirenz içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek için numuneler 2.5.3.2.2 bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve eğriler saf efavirenz gibi kaydedilmiştir. Bu eğrilerden okunan pik akımı değerleri ilgili kalibrasyon eşıtliğinde yerine konularak tabletlerin içerdiği etken madde miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz çalışması sonuçları izelge 3.6' da gösterilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Efavirenz içeren (600 mg) Stocrin<sup>®</sup> tabletlerin pH 3,00 BRT destek elektroliti içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları

|           | AdSDPV                                  |
|-----------|-----------------------------------------|
| Numune No | Tablette Bulunan Madde Miktarı (600 mg) |
| 1         | 615,40                                  |
| 2         | 595,96                                  |
| 3         | 599,20                                  |
| 4         | 592,72                                  |
| 5         | 605,68                                  |
|           |                                         |
| $X_{ort}$ | 600,82                                  |
| SS        | 10,07                                   |
| %BSS      | 1,68                                    |
| %Bias     | -0,41                                   |

Tablet içerisinde yer alan katkı maddelerinin tayin yöntemlerimizi etkileyip etkilemediğini anlamak için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 2.5.3.2.3’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan saf etken madde içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda etken madde ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % Geri kazanım sonuçları Çizelge 3.7.’de gösterilmiştir.

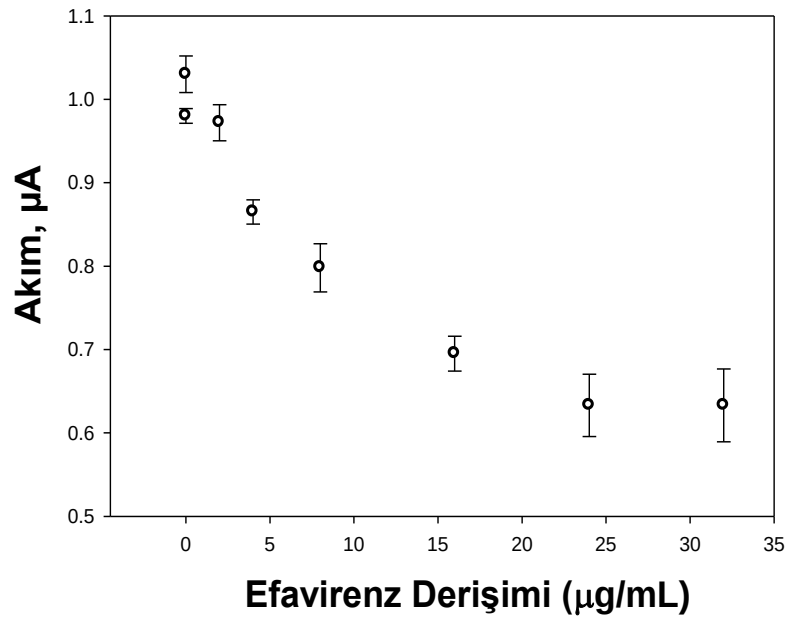
**Çizelge 3.7.** Efavirenz içeren tabletlerden pH 3,00 BRT içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları.

| Yöntem | İlave Edilen Madde<br>Miktarı (mg) | Bulunan Madde<br>Miktarı (mg) | % Geri<br>Kazanım |
|--------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| AdSDPV | 5,00                               | 4,93                          | 98,54             |
|        | 5,00                               | 4,86                          | 97,19             |
|        | 5,00                               | 4,78                          | 95,57             |
|        | 5,00                               | 4,87                          | 97,46             |
|        | 5,00                               | 4,83                          | 96,65             |
|        |                                    |                               | $X_{ort} : 97,07$ |
|        |                                    |                               | SS : 1,09         |
|        |                                    |                               | % BSS : 1,12      |
|        |                                    |                               | %Bias: 2,93       |
|        |                                    |                               |                   |

### 3.2.2. Efavirenz ile dsDNA Etkileşiminin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular

#### 3.2.2.1.KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA ile Farklı Derişimde Efavirenz Etkileşmesinin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.5.3.2.4.1. de anlatılan yol izlenerek, KGE yüzeyine immobilize edilen dsDNA' nın 2,00 – 32,00  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında değişen efavirenz ile etkileşiminden elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklüklerini gösteren grafik Şekil 3.17'deki gibidir.



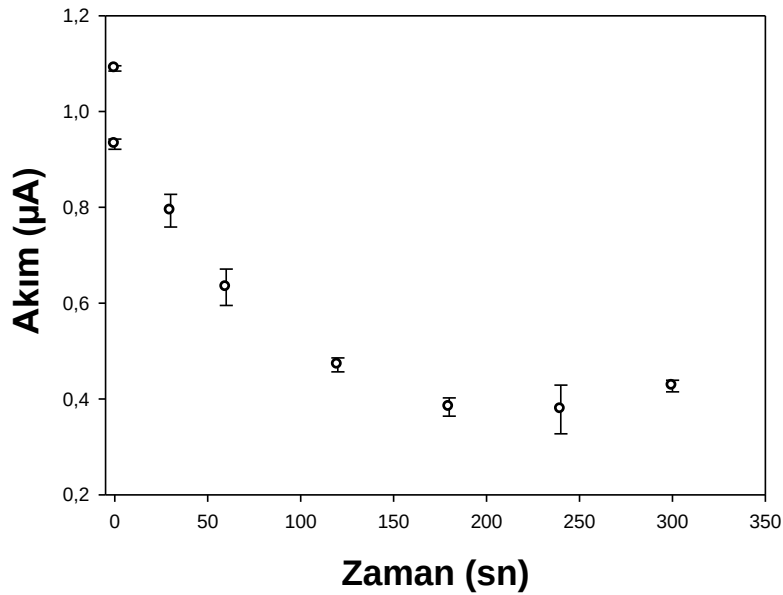
**Şekil 3.17.** Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; sırasıyla 2,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile efavirenz etkileşmeden önce; metanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 2,00; 4,00; 8,00; 16,00; 24,00; 32,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerde efavirenz ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri.

Şekil 3.17’de elde edilen verilere göre, efavirenz’in derişimi arttırıldıkça guanin yükseltgenme sinyalinde düşüş olduğu gözlenmiştir. Ancak bu düşüş 24,00  $\mu\text{g/mL}$  efavirenz’den sonra sabitlenmiştir. Grafiğe göre uygun efavirenz derişimi 24,00  $\mu\text{g/mL}$ ’ dir.

### 3.2.2.2. Elektroda Tutturulmuş dsDNA’nın Efavirenz ile Zamana Göre

#### Etkileşmesinin İncelenmesine ait Bulgular

Bölüm 2.5.3.2.4.2. de anlatılan yol izlenerek, bölüm 3.3.2.1’den elde edilen veriler doğrultusunda 24,00  $\mu\text{g/mL}$  efavirenz’in 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile etkileşiminde sürenin etkisini inceleyebilmek için etkileşim süresi 30–300 saniye arasında değiştirilmiş ve elde edilen sonuçlardan Şekil 3.18’deki grafik çizdirilmiştir.



**Şekil 3.18.** Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; 2,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile 24,00 $\mu\text{g/mL}$  efavirenz’in farklı sürelerde (sırasıyla 2,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile efavirenz etkileşmeden önce; etanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 30; 60; 120; 180; 240; 300  $\mu\text{g/mL}$  etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.



Guanin yükseltgenme sinyalinde etkileşim süresi arttırıldıkça bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün 3. dakikadan sonra sabitlenmesi nedeniyle optimum etkileşim zamanı 3 dakika olarak belirlenmiştir.

### 3.2.2.3. Optimize Edilen dsDNA-Efavirenz Etkileşiminin Voltametrik Yöntemlerle

#### Yapılan Analiz Çalışmaları

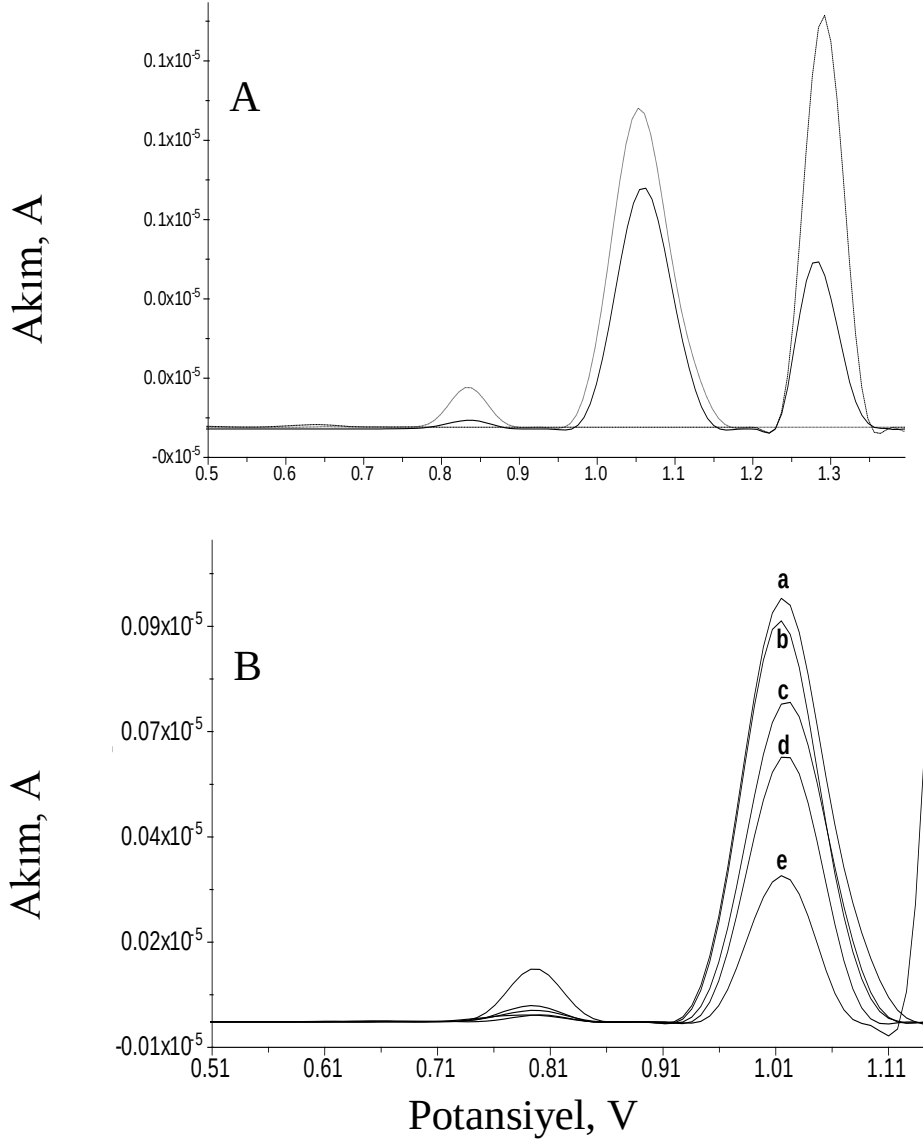
Efavirenz-dsDNA etkileşiminin voltametrik bir çalışmasına literatürlerde rastlanmadı. Efavirenz ve guanin pik akımları etkileşimden önce ve sonra diferansiyel puls voltametrisi (DPV) tekniğiyle ölçülmüştür ( Şekil 3.19b).

Öncelikle dsDNA'daki guanin pik akımını en çok düşüren efavirenz derişimi seçilmiştir, 24,00µg/mL, sonra bu derişimde guanin sinyalini en çok düşüren karıştırma süresi, 180sn, seçilerek şartlar optimize edilmiştir.

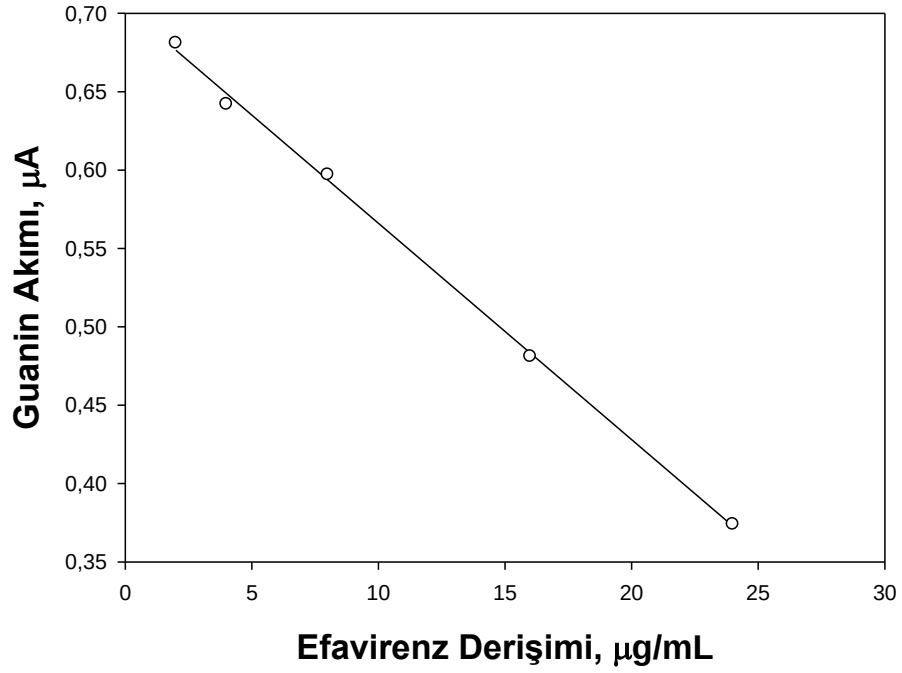
Şekil 3.18'den de anlaşılabilceği gibi bu sonuçlarla şartlar optimize edilmiş oldu. Buna göre 180sn bekletilerek akımın en küçük olduğu şartlar sağlanmış oldu. Şartlar optimize edildikten sonra elektrot üzerinde birikmiş olan madde AdSDPV tekniği kullanılarak tayin edilmiştir. pH 4,80 asetat tamponu içerisinde 2,00 – 24,00 µg/mL derişim aralığında elde edilen AdSDPV eğrilerinden bazı seçilmiş derişimler Şekil 3.19b'de verilmiştir.

Efavirenz'in derişiminin guanin pik akımı üzerine etkisi için optimum koşullar % 20 metanollü ortamda pH 4,80 asetat tamponu içeren çözeltisinde diferansiyel puls sıyırma voltametrisi kulanılarak elde edilmiştir. Çizelge 3.8'de efavirenz derişimleri (C) ve AdSDPV için +1,02V'da karşılık gelen pik akımı değerleri ( $i_p$ ) verilmiştir. Bu değerlere göre 2,00 – 24,00 µg/mL derişim aralığında derişim-pik akımı arasında  $r = -0,999$  korelasyon katsayısı ile AdSDPV için  $i_p(\mu A) = -0,0138 C(M) + 0,704$  eşitliklerine uyan doğrusal ilişki bulunmaktadır (AdSDPV için Şekil 3.20). Bu sonuçlara

dayanarak, kalem grafit elektrot ile AdSDPV teknikleri kullanılarak efavirenz'in ticari preparatından miktar tayininin yapılabilceğine karar verilmiştir.



**Şekil 3.19.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde **A)** 2,00  $\mu\text{g/mL}$  efavirenz ile 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA etkileşmesine ait grafikler; etkileşmeden önce guanine sinyali (---); dsDNA ile etkileştikten sonra efavirenz sinyali (—) and etkileşmeden önce efavirenz sinyali (— · — · —). **B)** 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA'nın guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikleri; a) 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile efavirenz etkileşmeden önce; b) metanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; c) 2,00 ; d) 8,00 e) 24,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerde efavirenz ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri.



**Şekil 3.20.** 2,00 – 24,00 µg/mL derişim aralığında pH 4,80 asetat tamponu içerisinde efavirenz'in (%20 metanollü ortam) AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği

**Çizelge 3.8.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde efavirenz ile etkileşen guanin sinyali için (%20 metanollü ortam) elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları

|                                                    | Derişim (µg/mL) | Akım (µA) |
|----------------------------------------------------|-----------------|-----------|
| Tek başına guanin sinyali                          | 0               | 0,930     |
| 'metanol + asetat tamponu' ile etkileştikten sonra | 0               | 0,804     |
| efavirenz ile etkileştikten sonra                  | 2               | 0,681     |
|                                                    | 4               | 0,642     |
|                                                    | 8               | 0,597     |
|                                                    | 16              | 0,481     |
|                                                    | 24              | 0,374     |

Çizelge 3.8'deki AdSDPV tekniği ile elde edilen verileri kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

**Çizelge 3.9.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde efavirenz-dsDNA etkileşimi için guanin üzerinden AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

|                                                      | AdSDPV       |
|------------------------------------------------------|--------------|
| Ölçüm Yapılan Potansiyel (V)                         | 1,02         |
| Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)      | 0,29         |
| Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) | 0,46         |
| Doğrusallık aralığı ( $\mu\text{g/mL}$ )             | 2,00 – 24,00 |
| Eğim ( $\mu\text{A.M}^{-1}$ )                        | -0,0138      |
| Kesişim ( $\mu\text{A}$ )                            | 0,704        |
| Korelasyon Katsayısı                                 | -0,999       |
| Eğimin standart hatası                               | 0,00029      |
| Kesişimin standart hatası                            | 0,0040       |
| Yakalama Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )*                | 0,599        |
| Tayin alt Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )*               | 1,995        |
| Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)            | 0,96         |
| Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)       | 2,22         |

(\*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları  $2,00 \mu\text{g/mL}$  derişiminin 3 değerinden elde edilmiştir.

Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinden oldukça iyi sonuçlar elde edilebilmesi, efavirenz içeren piyasa preparatlarından miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

#### **3.2.2.4. Efavirenz-dsDNA Etkileşimi İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları**

Efavirenz-dsDNA etkileşiminin tayini için geliştirilen voltametrik teknik piyasa preparatlarına uygulanmıştır.

##### **3.2.2.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışmaları**

Efavirenz içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek için numuneler 2.5.3.2.2. bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Etkileşim sonrası elde edilen guanin eğrilerinden okunan pik akımı değerleri ilgili kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak tabletlerin içerdiği etken madde miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.10' da gösterilmiştir.

**Çizelge 3.10.** Efavirenz içeren (600 mg) Stocrin® tabletlerin pH 4,80 asetat tamponu içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları

|           | AdSDPV                                  |
|-----------|-----------------------------------------|
| Numune No | Tablette Bulunan Madde Miktarı (600 mg) |
| 1         | 603,26                                  |
| 2         | 590,58                                  |
| 3         | 585,15                                  |
| 4         | 605,07                                  |
| 5         | 596,02                                  |
|           |                                         |
| $X_{ort}$ | 596,02                                  |
| SS        | 8,40                                    |
| %BSS      | 1,41                                    |
| %Bias     | 0,66                                    |

Tablet içerisinde yer alan katkı maddelerinin tayin yöntemlerimizi etkileyip etkilemediğini anlamak için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 2.5.3.2.3’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan saf etken madde içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda etken madde ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % Geri kazanım sonuçları Çizelge 3.11’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.11.** Efavirenz içeren tabletlerden pH 4,80 asetat tamponu içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları.

| Yöntem | İlave Edilen Madde<br>Miktarı (mg) | Bulunan Madde<br>Miktarı (mg) | % Geri<br>Kazanım  |
|--------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| AdSDPV | 12,00                              | 12,03                         | 100,24             |
|        | 12,00                              | 12,28                         | 102,36             |
|        | 12,00                              | 12,61                         | 105,07             |
|        | 12,00                              | 12,17                         | 101,45             |
|        | 12,00                              | 11,92                         | 99,34              |
|        |                                    |                               | $X_{ort} : 101,69$ |
|        |                                    |                               | SS : 2,21          |
|        |                                    |                               | % BSS : 2,18       |
|        |                                    |                               | %Bias: -1,69       |
|        |                                    |                               |                    |

### 3.2.3. İki Yöntemin Analiz Çalışmalarının Karşılaştırılması

Boş kalem elektrot ve dsDNA tutturulmuş elektrotta Stocrin tabletlerden elde edilen analiz bulguları karşılaştırıldığı zaman, hesaplanan t ve F değerleri tablo değeriyle karşılaştırıldığında yöntemler arasındaki farkın önemsiz olduğu görülmektedir.

**Çizelge 3.12.** dsDNA tutturulmuş ve boş kalem grafit elektrot ile Stocrin® tabletlerden elde edilen analiz bulgularının karşılaştırmalı sonuçları

|                                     | Boş kalem elektrot | dsDNA tutturulmuş kalem elektrot |
|-------------------------------------|--------------------|----------------------------------|
| Tablette bulunan madde miktarı (mg) | 600,00             | 600,00                           |
| Bulunan madde miktarı (mg)          | 600,82             | 596,02                           |
| %BSS                                | 1,68               | 1,41                             |
| Hesaplanan t değeri                 | 0,32               | $T_{\text{teorik}} = 2.31$       |
| Hesaplanan F değeri                 | 0,90               | $F_{\text{teorik}} = 2.60$       |

(p: 0,005)



### 3.3. L6prolid 0zerindeki İncelemeler

Çalışma maddesi olarak seçilen l6prolid 0zerinde d6nüşümlü voltametri (DV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV) teknikleri kullanılarak değişik ortamlarda ve pH değerlerinde kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Deneylerin tamamında AUTOLAB 30 elektrokimyasal analizörü, kalem grafit çalışma elektrodu, platin tel yardımcı elektrot ve Ag/AgCl referans elektrot (MF 2052) kullanılmıştır.

Diferansiyel puls voltametrisi tekniğinde en uygun ortamı seçebilmek için pH 2,00–12,00 arasındaki Britton-Robinson (BR) tamponuyla elektrokimyasal davranışı yükseltgenme yönünde incelenmiştir. Deneylerde analitik amaçlar için en uygun ortamın pH 2,00 BRT olduğu saptanmıştır.

Yukarıdaki pH ve ortamda, saf maddenin davranışı değişen hızlarda incelendikten sonra ticari tabletler 0zerindeki uygulamaya geçilmiş ve bu amaçla Abbott ilaç firmasından temin edilen ve her biri 1mg/0,2mL l6prolid içeren Lucrin® adlı ilaçtan örnekler alınıp enjeksiyonluk çözeltiden miktar tayini ve % geri kazanım deneyleri yapılmıştır.

#### 3.3.1. L6prolid 0zerindeki Voltametrik Çalışmalar

L6prolid'in voltametrik incelemesi, kalem grafit elektrot ile diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve d6nüşümlü voltametri (DV) teknikleri kullanılarak yapılmıştır.

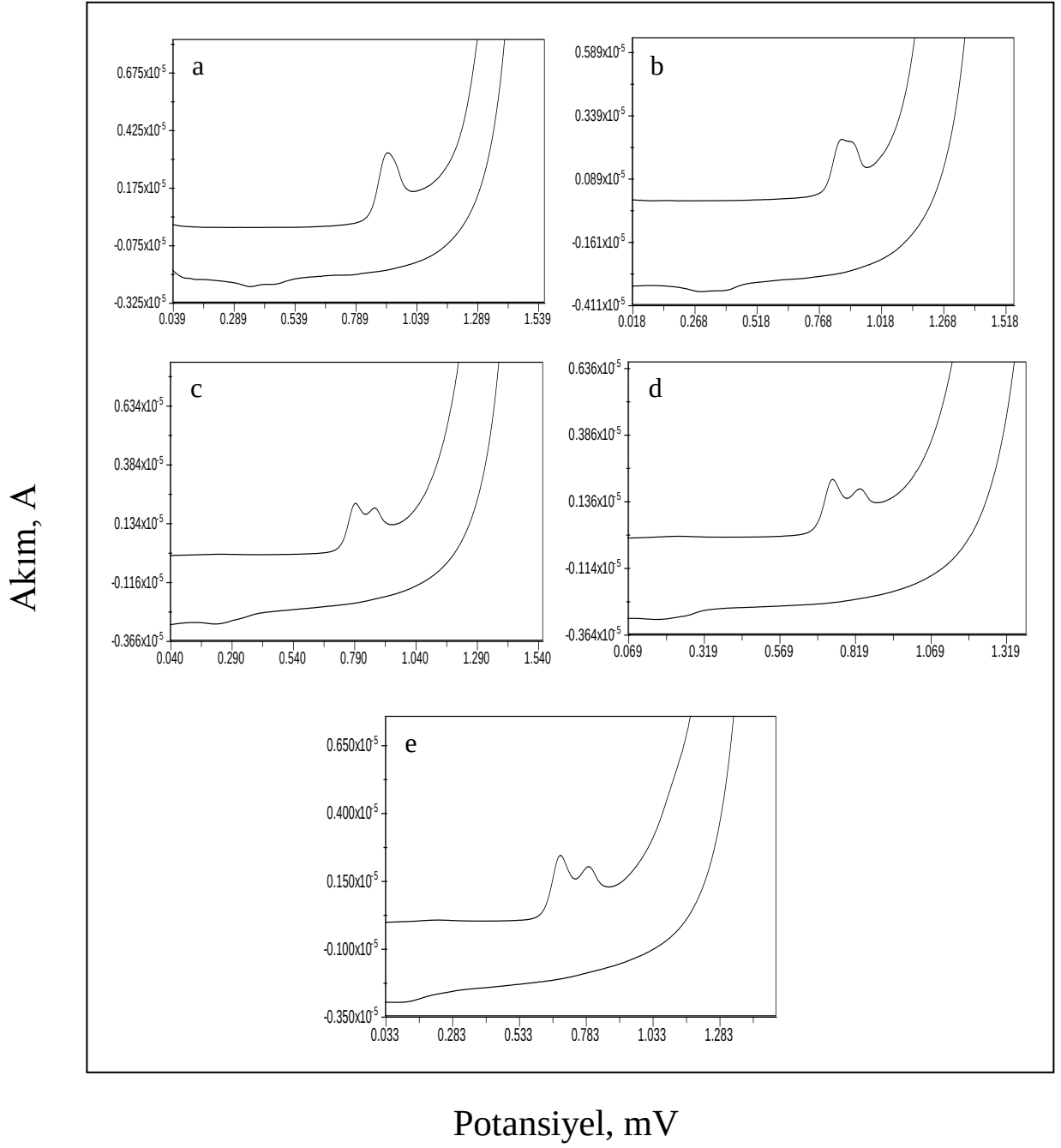
### 3.3.1.1. Löprolid'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü

#### Voltametri Çalışmaları

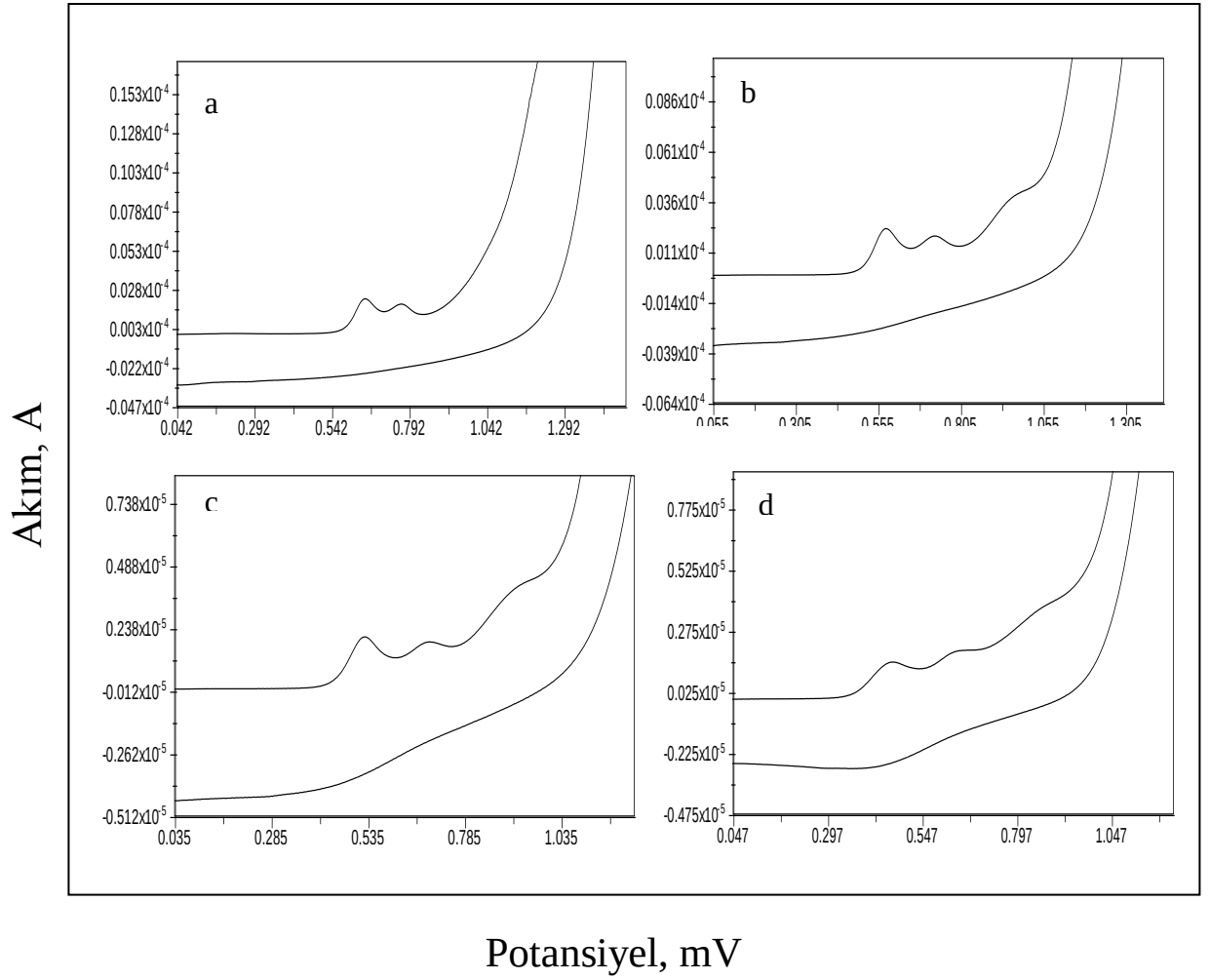
Löprolid'in BR tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 2,00; 3,03; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,03; 9,00; 10,00; 11,00; 12,00 BR tampon çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde 4,00µg/mL derişimde distile sulu ortamda çalışılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerdendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektrolitinin cinsinin ve pH'ının reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

4,00µg/mL derişimi ile pH 2,00–12,00 BR tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.21a ve 3.21b' de görölmektedir.

pH 2,00'de pik 918 mV'da gözlenirken pH arttıkça bu pikin daha az pozitif potansiyellere kaydığı saptanmıştır. pH 2,00–12,00 arasındaki potansiyeller değerdleri Çizelge 3.13'de verilmiştir.



**Şekil 3.21a** 4,00µg/mL löprolid pH 2,00 – 6,00 arası BR tamponları içerisindeki voltamogramları. a) pH 2,00 ; b) pH 3,00; c) pH 4,00; d) pH 5,00; e) pH 6,00.

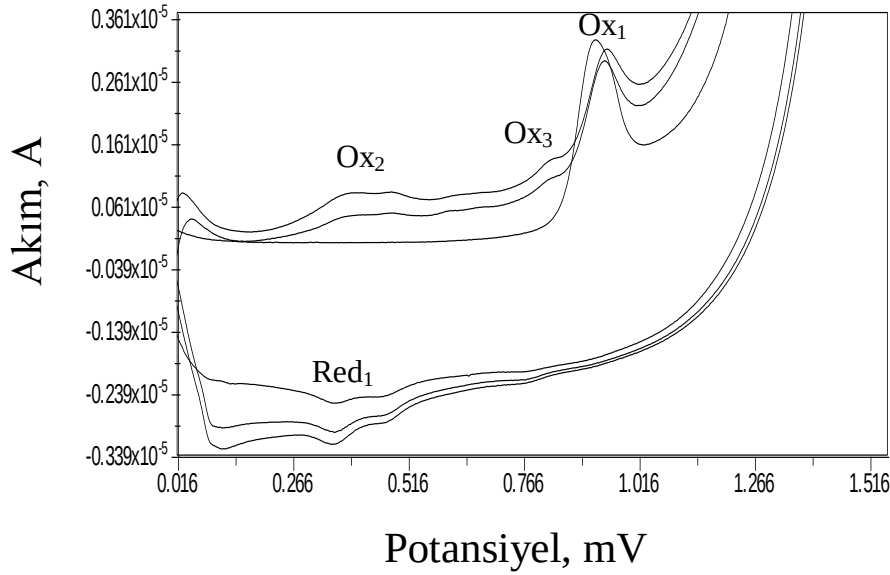


**Şekil 3.21b** 4,00µg/mL löprolid'in pH 7,00 – 10,00 arası BR tamponları içerisindeki voltamogramları. a) pH 7,00 b) pH 8,00; c) pH 9,00; d) pH 10,00.

**Çizelge 3.13.** BRT çözeltileri içerisinde kaydedilen 4,00µg/mL löprolid'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

| pH    | Pik Potansiyeli<br>(mV) | Pik Akımı<br>(µA) |
|-------|-------------------------|-------------------|
| 2,00  | 913                     | 2,613             |
| 3,00  | 854                     | 1,674             |
| 4,00  | 789                     | 1,05              |
| 5,00  | 745                     | 1,15              |
| 6,00  | 684                     | 1,45              |
| 7,00  | 642                     | 1,33              |
| 8,00  | 574                     | 1,506             |
| 9,00  | 520                     | 1,297             |
| 10,00 | 467                     | okunamadı         |
| 11,00 | 451                     | okunamadı         |
| 12,00 | 424                     | okunamadı         |

pH 2,00 BRT içerisinde 4,00 $\mu$ g/mL löprolid içeren çözeltinin altı devirli voltamogramı kalem grafit elektrot ile 100mVs<sup>-1</sup> hızla çizdirilmiştir (Şekil 3.22). İlk devirde anodik yönde löprolid'in 918mV civarında (Ox<sub>1</sub>) yükseltgenme pikinin oluştuğu ve katodik yönde indirgenme piki 350mV civarında gözlenmiştir. 2. devirde, 400 mV (Ox<sub>2</sub>)'da ve 822 mV (Ox<sub>3</sub>)'da iki küçük anodik pik belirmiştir. Bu yeni pikler löprolid'in birinci devirde yükseltgenmesinden sonra gözlenmiştir.

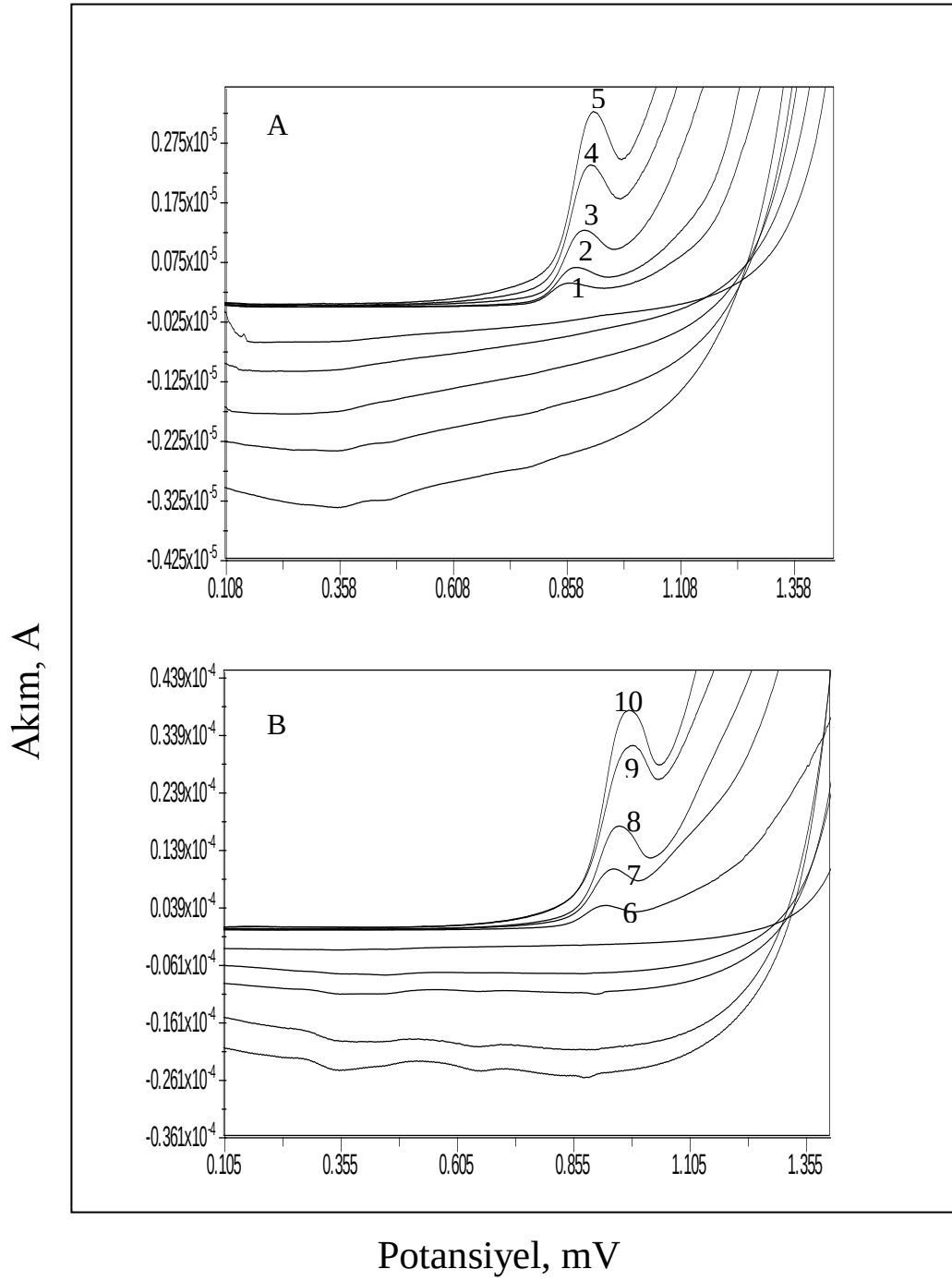


**Şekil 3.22.** pH 2,00 BRT içerisinde 4,00 $\mu$ g/mL löprolid içeren çözeltinin altı devirli dönüşümlü voltamogramı

Akım değerinin en yüksek okunduğu pH 2,00 BRT çözeltisi içinde 4,00 $\mu$ g/mL löprolid'in değişik tarama hızlarındaki eğrileri 5–1000 mVs<sup>-1</sup> aralığında kaydedilmiştir. Bu deneylerden elde edilen sonuçlara bakıldığında zaman 5–100 mVs<sup>-1</sup> aralığında hız ile akımın doğrusal olarak arttığı ve potansiyelin 5–100 mVs<sup>-1</sup> aralığında 110mV kaydığı saptanmıştır. Bu deneylerden elde edilen veriler Çizelge 3.14'de gösterilmiştir. Bu deneylere ait voltamogram da Şekil 3.23a ve 3.23b'de verilmiştir.

**Çizelge 3.14.** 4,00µg/mL löprolid'in pH 2,00 BRT çözeltisi içerisinde 5-1000mVs<sup>-1</sup> tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (Ep) ve akım (ip) değerleri.

| Tarama hızı<br>(mVs <sup>-1</sup> ) | $v^{1/2}$ | $i_p$ (µA) | Ep (mV) | logv  | logi <sub>p</sub> |
|-------------------------------------|-----------|------------|---------|-------|-------------------|
| 5                                   | 2,236     | 18,9       | 975     | 0,699 | 1,28              |
| 10                                  | 3,162     | 13,8       | 982     | 1     | 1,14              |
| 25                                  | 5         | 9,65       | 952     | 1,398 | 0,99              |
| 50                                  | 7,071     | 4,63       | 943     | 1,699 | 0,67              |
| 75                                  | 8,660     | 2,15       | 927     | 1,875 | 0,33              |
| 100                                 | 10        | 1,58       | 919     | 2     | 0,20              |
| 250                                 | 15,811    | 1,17       | 910     | 2,398 | 0,07              |
| 500                                 | 22,360    | 0,658      | 896     | 2,699 | -0,18             |
| 750                                 | 27,386    | 0,358      | 877     | 2,875 | -0,45             |
| 1000                                | 31,623    | 0,218      | 865     | 3     | -0,66             |



**Şekil 3.23.** 4,00µg/mL löprolid'in pH 2,00 BRT içerisinde A) 5 – 75 mVs<sup>-1</sup> ; B) 100 – 1000 mVs<sup>-1</sup> tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramları. 1) 5 ; 2) 10 ; 3) 25 ; 4) 50 ; 5) 75; 6) 100; 7) 250; 8) 500; 9) 750; 10) 1000 mVs<sup>-1</sup>



Eğrilerde geri dönüş pikinin olmaması ve hızla birlikte pik potansiyelinin kayması reaksiyonun geri dönüşümsüz olduğunu göstermektedir.

Hızın akım ile doğrusal olarak değiştiği 5–1000 mVs<sup>-1</sup> tarama hızlarında gerekli hesaplamalar yapıldığı zaman doğru denklemi;

$$i_p (\mu A) = 0,019 v (mVs^{-1}) + 0,180 \quad r = 0,999 \quad (n: 10)$$

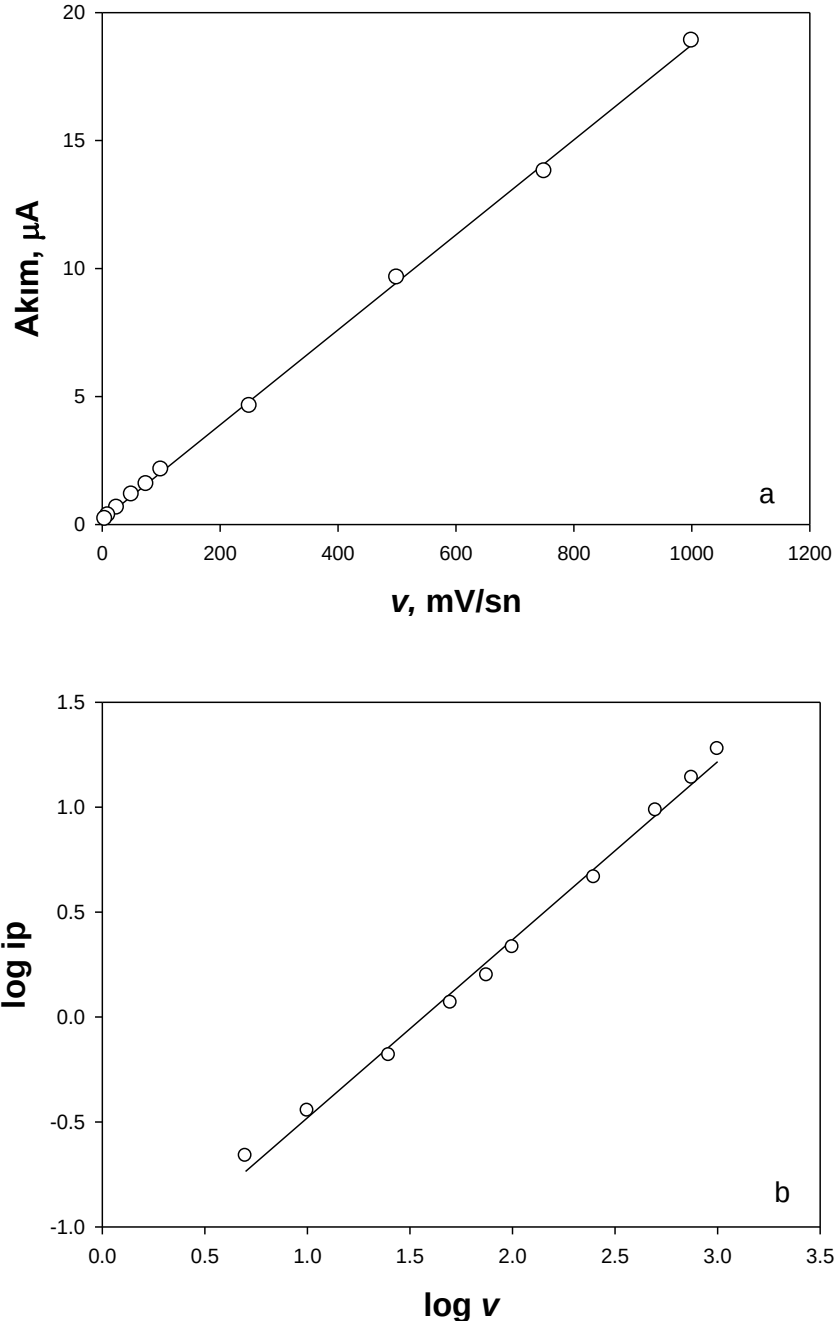
olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 3.24a). Aynı hız aralığındaki  $\log v - \log i$  grafiği (Şekil 3.24b) ve denklemi incelenince bulunan eğim değerinin 0,85 olması reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Laviron ve ark., 1980; Greef ve ark., 1990).

Elde edilen doğru denklemi;

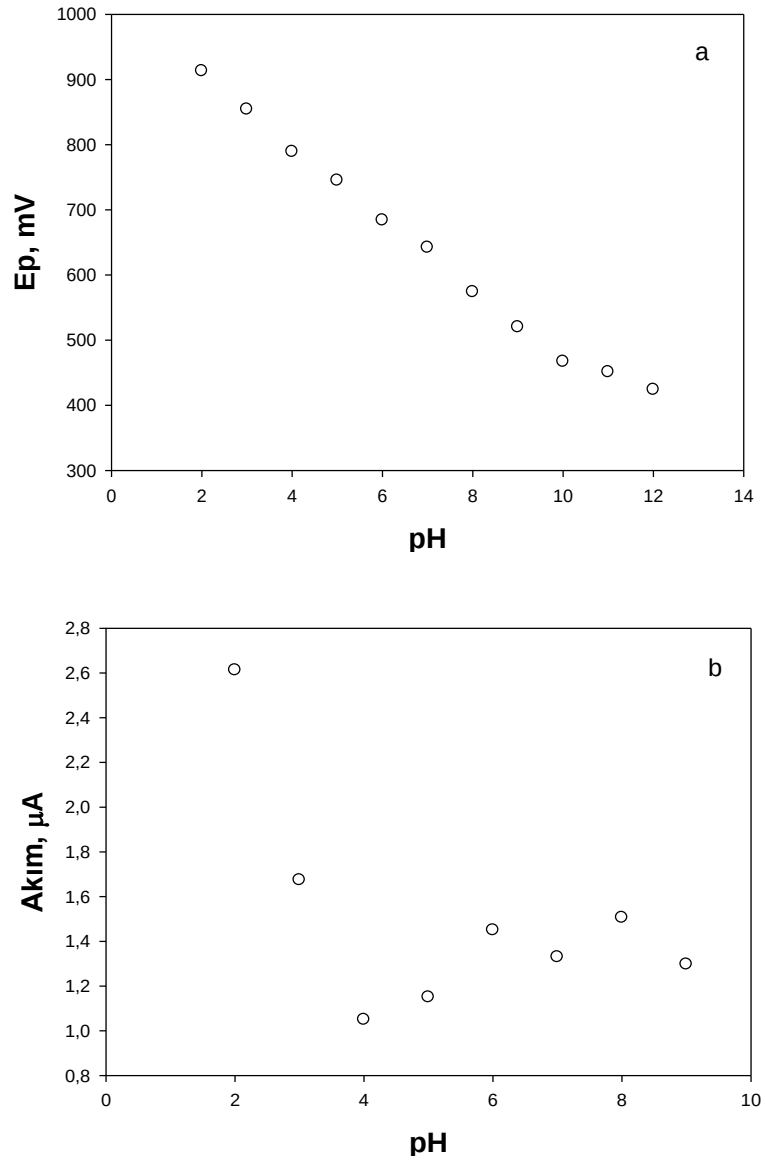
$$\log i_p (\mu A) = 0,85 \log v (mVs^{-1}) - 1,33 \quad r = 0,997 \quad (n:10)$$

(Saf difüzyon kontrollü olduğu zaman ve çözeltinin bu madde için ideal olduğu durumlarda eğim 0,50, saf adsorbsiyon kontrollü olduğu zaman ve kullanılan elektrodun o olay için ideal olduğu durumlarda 1 olur) (Laviron, 1980)



**Şekil.3.24.** 4,00 $\mu\text{g/mL}$  löprolid'in pH 2,00 BRT içerisinde 5 – 1000  $\text{mVs}^{-1}$  tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a)  $v - i_p$  ve b)  $\log v - \log i$  grafikleri

pH'nin potansiyel ve pik akımına etkisini daha rahat görebilmek için bütün pH'ları ve ortamları bir arada gösteren (Pik potansiyeli - pH)  $E_p\text{-pH}$ , (Pik akımı - pH)  $I_p\text{-pH}$  eğrileri Şekil 3.25a, 3.25b'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.25.** 4,00µg/mL löprolid'in  $E_p$  – pH (a) ,  $I_p$  – pH (b) eğrileri.  
(○) : BRT

Diferansiyel puls voltametri tekniğiyle bütün pH çözeltilerinde, doğrusallık elde edildiği görülmüştür. Şekil 3.25'den de anlaşılacağı gibi pH 10,00' a kadar doğrusallık elde edilmiştir.(Çizelge 3.13)

Bu çizelge değerlerine göre;

$$E_p(\text{mV}) = 1019,5 - 55,32\text{pH} \quad (r:0.996) \quad (n=9) \quad \text{'dir.}$$

### 3.3.1.2. Geliştirilen Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları

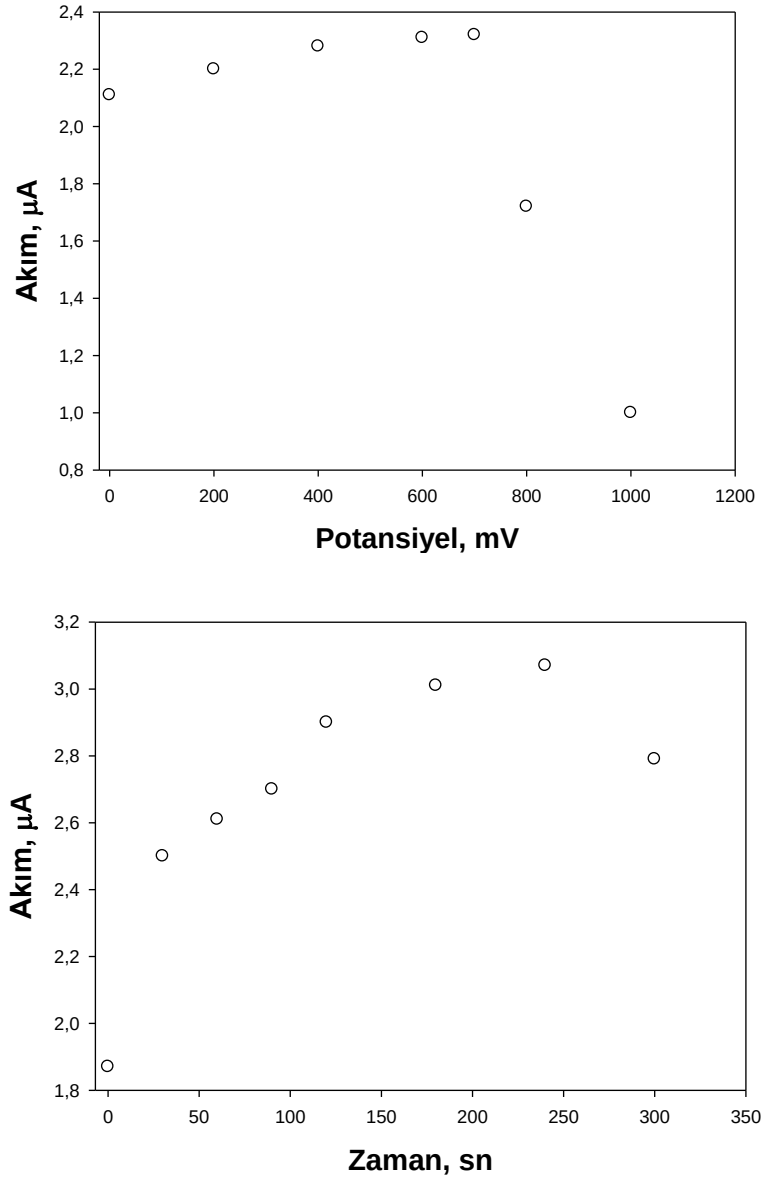
Adsorpsiyon kontrollü olan ve daha hassas bir teknik olan adsorptif sıyırma voltametrik yöntemlerinin uygulanmasına imkân tanıyan löprolid ile ilgili voltametrik bir çalışmaya literatürlerde rastlanmadı. Adsorptif sıyırma voltametrisi ile miktar tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Elektrot yüzeyinde etken maddenin birikmesi elektrolitik olarak değil, fiziksel adsorbsiyonla meydana gelmiştir. Yeterince etken madde biriktirdikten sonra, birikmiş madde AdSDPV tekniği kullanılarak analiz edilmiştir.

Öncelikle elektrokimyasal ön biriktirme basamağında pik akımının en iyi olduğu, potansiyeli ve zamanı seçmek için şartlar optimize edilmiştir (Çizelge 3.15) (Şekil 3.26a ve 3.26b). Pik akımının en iyi olduğu potansiyeli seçerken 1,00µg/mL derişimdeki AdSDPV için 120sn biriktirme süresi uygulanmıştır. En uygun potansiyeli 700mV olarak belirledikten sonra, bu potansiyelde en uygun zaman 180 sn olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 3.15.** 1,00µg/mL löprolid'in pH 2,00 BRT içerisinde AdSDPV tekniğiyle potansiyel ve zamana göre akımdaki değişiklik

| Potansiyel (mV) | Akım(µA) | Zaman (sn) | Akım(µA) |
|-----------------|----------|------------|----------|
| 0               | 2,11     | 0          | 1,87     |
| 200             | 2,20     | 30         | 2,50     |
| 400             | 2,28     | 60         | 2,61     |
| 600             | 2,31     | 90         | 2,70     |
| 700             | 2,32     | 120        | 2,90     |
| 800             | 1,72     | 180        | 3,01     |
| 1000            | 1,00     | 240        | 3,07     |
|                 |          | 300        | 2,79     |

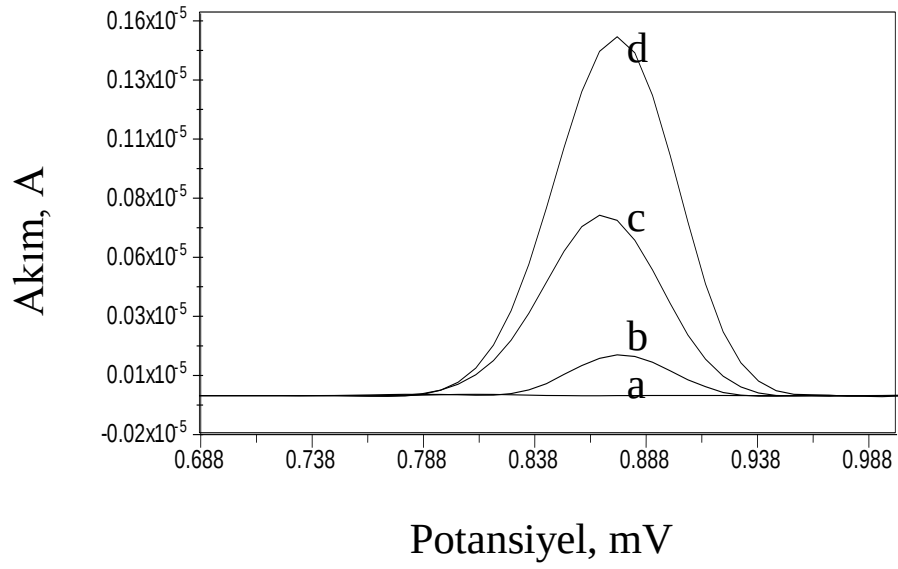


**Şekil 3.26.** AdSDPV tekniğiyle 1,00 $\mu\text{g/mL}$  löprolid'in pH 2,00 BRT çözeltisi içerisinde a)  $i_p$  ( $\mu\text{A}$ ) –  $E_p$  (Biriktirme Potansiyeli) b)  $i_p$  ( $\mu\text{A}$ ) – t (dk) (Biriktirme Zamanı) grafikleri.

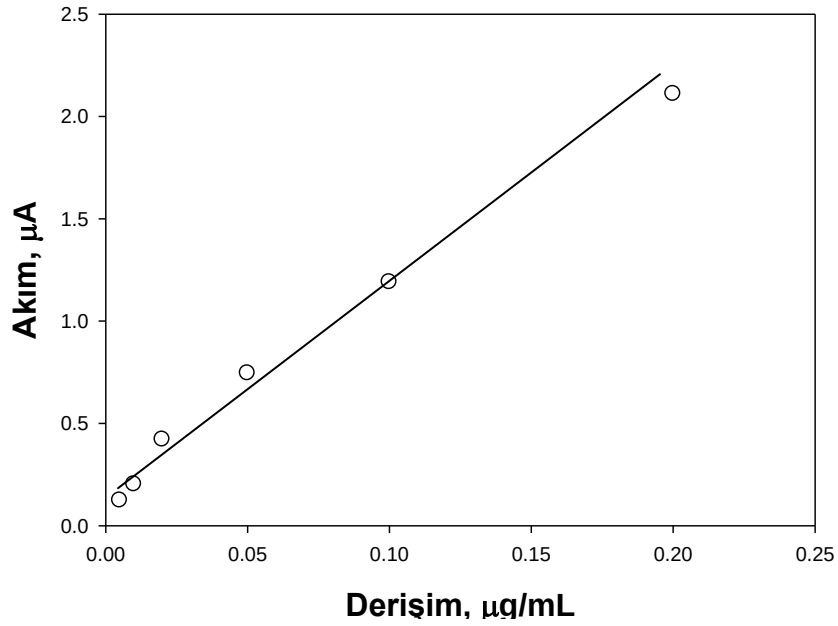
Şekil 3.26'dan da anlaşılabileceği gibi bu sonuçlarla elektrokimyasal ön biriktirme basamağındaki şartları optimize edilmiş oldu. Buna göre 700mV'da 180sn bekletilerek akımın en büyük olduğu şartlar sağlanmış oldu. Şartlar optimize edildikten sonra

elektrot üzerinde birikmiş olan madde AdSDPV tekniği kullanılarak tayin edildi. Löprolid'in voltametrik analizi için geliştirilen AdSDPV yöntemi, en yüksek akımın ve en keskin pik şeklinin elde edildiği pH 2,00 BRT içerisine uygulanmıştır. pH 2,00 BRT çözeltisi içinde 0,005 – 0,200 µg/mL derişim aralığında elde edilen AdSDPV eğrilerinden bazı seçilmiş derişimler Şekil 3.27'de verilmiştir.

Löprolid'in derişiminin pik akımı üzerine etkisi için optimum koşullar pH 2,00 BRT içeren çözeltisinde diferansiyel puls sıyırma voltametrisi kullanılarak elde edilmiştir. Çizelge 3.28'de löprolid derişimleri (C) ve AdSDPV için 0,87 V'a karşılık gelen pik akımı değerleri ( $i_p$ ) verilmiştir. Bu değerlere göre 0,005 – 0,200 µg/mL derişim aralığında derişim-pik akımı arasında  $r = 0,997$  korelasyon katsayısı ile AdSDPV için  $i_p(\mu A) = 9,95 C(M) + 0,16$  eşitliklerine uyan doğrusal ilişki bulunmaktadır (AdSDPV için Şekil 3.28). Bu sonuçlara dayanarak, kalem grafit elektrot ile AdSDPV teknikleri kullanılarak löprolid'in ticari preparatından miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.



**Şekil 3.27.** pH 2,00 BRT içerisinde löprolid'in bazı derişimlerdeki AdSDPV eğrileri  
(a) destek ; (b) 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; (c) 0,05  $\mu\text{g/mL}$  ; (d) 0,10  $\mu\text{g/mL}$



**Şekil 3.28.** 0,005 – 0,20  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında pH 2,00 BRT içerisinde löprolid'in AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği



**Çizelge 3.16.** pH 2,00 BRT içerisinde löprolid için elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları

| Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Akım ( $\mu\text{A}$ ) |
|------------------------------|------------------------|
| 0,005                        | 0,123                  |
| 0,01                         | 0,202                  |
| 0,02                         | 0,421                  |
| 0,05                         | 0,745                  |
| 0,1                          | 1,19                   |
| 0,2                          | 2,11                   |

Çizelge 3.16'daki AdSDPV tekniğı ile elde edilen verileri kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.17'de verilen yakalama (YAS) ve tayin alt (TAS) sınırları;

$$\text{YAS} = 3 \text{ s/m}; \text{TAS} = 10 \text{ s/m}$$

formüllerinden bulunmuştur (Riley ve Rosanske, 1996; Swartz ve Krull, 1997)

Bu formüllerde s, en düşük derişimin bir üst derişiminde 3 adet tekrarlanan sonucun standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir.

**Çizelge 3.17.** pH 2,00 BRT içerisinde löprolid için AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

|                                                      | AdSDPV                |
|------------------------------------------------------|-----------------------|
| Ölçüm Yapılan Potansiyel (V)                         | 0,86                  |
| Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)      | 0,20                  |
| Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) | 0,25                  |
| Doğrusallık aralığı ( $\mu\text{g/mL}$ )             | 0,005-0,2             |
| Eğim ( $\mu\text{A.M}^{-1}$ )                        | 9,95                  |
| Kesişim ( $\mu\text{A}$ )                            | 0,160                 |
| Korelasyon Katsayısı                                 | 0,997                 |
| Eğimin standart hatası                               | $4.71 \times 10^{-1}$ |
| Kesişimin standart hatası                            | $4.43 \times 10^{-2}$ |
| Yakalama Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )*                | $1.36 \times 10^{-3}$ |
| Tayin alt Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )*               | $4.53 \times 10^{-3}$ |
| Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)            | 1,55                  |
| Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)       | 2,03                  |

(\*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları  $0,01 \mu\text{g/mL}$  derişiminin 3 değerinden elde edilmiştir.

Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde oldukça iyi sonuçlar elde edilebilmesi, löprolid içeren piyasa preparatlarından miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

### **3.3.1.3. L6prolid İ7in Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları**

L6prolid tayini i7in geliştirilen voltametrik teknik piyasa preparatlarına 7alışmalarına uygulanmıştır.

#### **3.3.1.3.1. Geliştirilen Y6ntemlerin Farmas6tik Dozaj şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım 7alışmaları**

L6prolid i7eren enjeksiyonluk 76zeltiden miktar tayini yapabilmek i7in numuneler 2.5.3.3.2 b6l6m6nde anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve eğriler saf l6prolid gibi kaydedilmiştir. Bu eğrilerden okunan pik akımı değerleri ilgili kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak tabletlerin i7erdiği etken madde miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen y6ntemlerle yapılan analiz sonu7ları 7izelge 3.18' de g6sterilmiştir.

**Çizelge 3.18.** Löprolid içeren Lucrin® enjeksiyonluk çözeltilerinin pH 2,00 BRT destek elektroliti içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları

|           | AdSDPV                                                  |
|-----------|---------------------------------------------------------|
| Numune No | Enjeksiyonluk Çözeltide Bulunan Madde Miktarı (5 mg/mL) |
| 1         | 5,12                                                    |
| 2         | 4,87                                                    |
| 3         | 4,97                                                    |
| 4         | 4,97                                                    |
| 5         | 4,92                                                    |
|           |                                                         |
| $X_{ort}$ | 4,97                                                    |
| SS        | 0,09                                                    |
| %BSS      | 1,89                                                    |
| %Bias     | 0,6                                                     |

Enjeksiyonluk çözelti içerisinde yer alan katkı maddelerinin tayin yöntemlerimizi etkileyip etkilemediğini anlamak için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 2.5.3.3.3’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan saf etken madde içeren enjeksiyonluk numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda etken madde ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % Geri kazanım sonuçları Çizelge 3.19.’de gösterilmiştir.

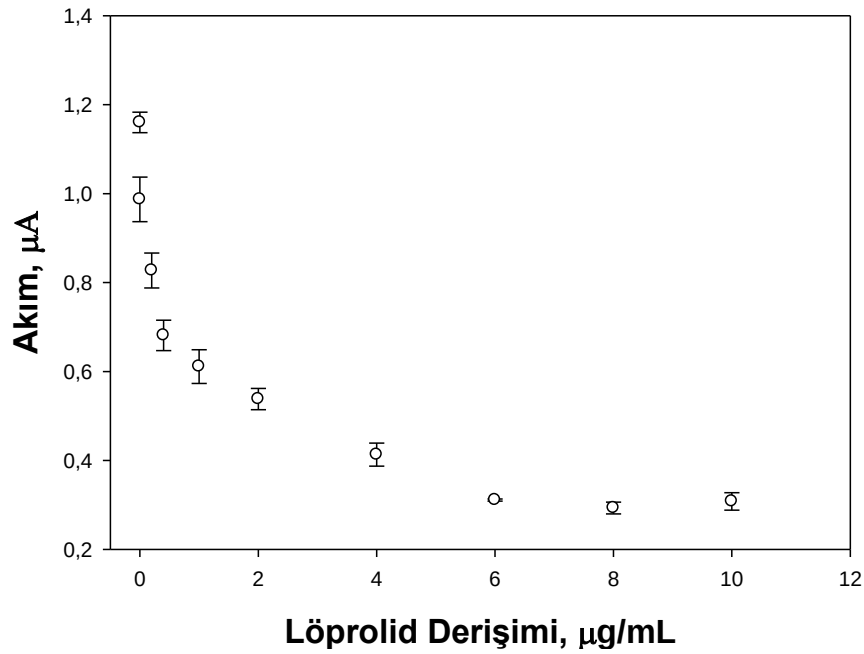
**Çizelge 3.19.** Löprolid içeren tabletlerden pH 2,00 BRT içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları.

| Yöntem | İlave Edilen Madde<br>Miktarı (mg) | Bulunan Madde<br>Miktarı (mg) | % Geri<br>Kazanım        |
|--------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| AdSDPV | 2,00                               | 1,96                          | 97,97                    |
|        | 2,00                               | 2,05                          | 102,49                   |
|        | 2,00                               | 1,96                          | 98,22                    |
|        | 2,00                               | 2,05                          | 102,49                   |
|        | 2,00                               | 1,96                          | 98,22                    |
|        |                                    |                               | X <sub>ort</sub> : 99,88 |
|        |                                    |                               | SS : 2,39                |
|        |                                    |                               | % BSS : 2,39             |
|        |                                    |                               | %Bias: 0,12              |
|        |                                    |                               |                          |

### 3.3.2. Löprolid ile dsDNA'nın Elektrot Yüzeyinde Etkileşiminin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular

#### 3.3.2.1. dsDNA İmmobilize Edilen KGE Yüzeyinde Farklı Derişimlerde Löprolid Etkileşiminin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.5.3.3.4.1. de anlatılan yol izlenerek, KGE yüzeyine immobilize edilen dsDNA'nın 0,20-10,00  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında değişen löprolid ile etkileşiminden elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklüklerini gösteren grafik Şekil 3.29' deki gibidir.



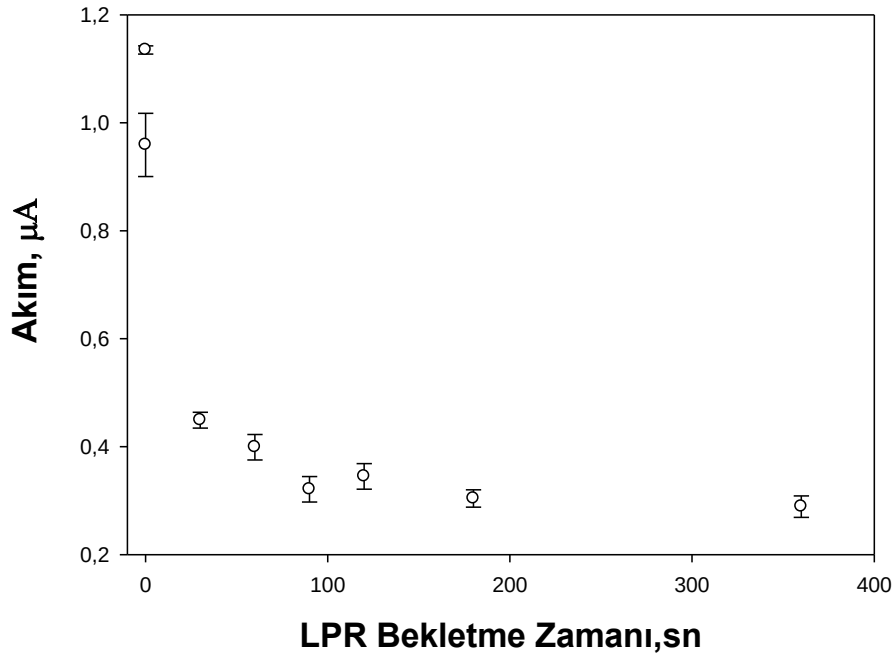
**Şekil 3.29.** Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; sırasıyla 2,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; saf su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 0,20; 0,40; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerde löprolid ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri.

Şekil 3.29’ da elde edilen verilere göre, löprolid’in derişimi arttırıldıkça guanin yükseltgenme sinyalinde düşüş olduğu gözlenmiştir. Ancak bu düşüş 6,00  $\mu\text{g/mL}$  löprolid’ den sonra sabitlenmiştir. Grafiğe göre uygun löprolid derişimi 6,00  $\mu\text{g/mL}$ ’ dir.

### 3.3.2.2. Löprolid Etkileşim Süresindeki Değişimin Guanin Yükseltgenme Sinyali

#### Üzerine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.5.3.2.4.2. de anlatılan yol izlenerek, 3.3.2.1.’ den elde edilen veriler doğrultusunda 6,00  $\mu\text{g/mL}$  löprolid’in 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile etkileşiminde sürenin etkisini inceleyebilmek için etkileşim süresi 30–360 sn arasında arttırılmış ve sonuçlardan Şekil 31’deki grafik çizdirilmiştir.



**Şekil 3.30.** Guanin yükseltgenme sinyali için grafikler; 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile 6  $\mu\text{g/mL}$  löprolid’in farklı sürelerde (sırasıyla 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; saf su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 30; 60; 90; 120; 180; 360sn) etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

Guanin yükseltgenme sinyalinde etkileşim süresi arttırıldıkça bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün 90 saniyeden sonra sabitlenmesi nedeniyle optimum etkileşim zamanı 90 sn olarak saptanmıştır.

### 3.3.2.3. Optimize Edilen dsDNA-Löprolid Çalışmasının Voltametrik Yöntemlerle

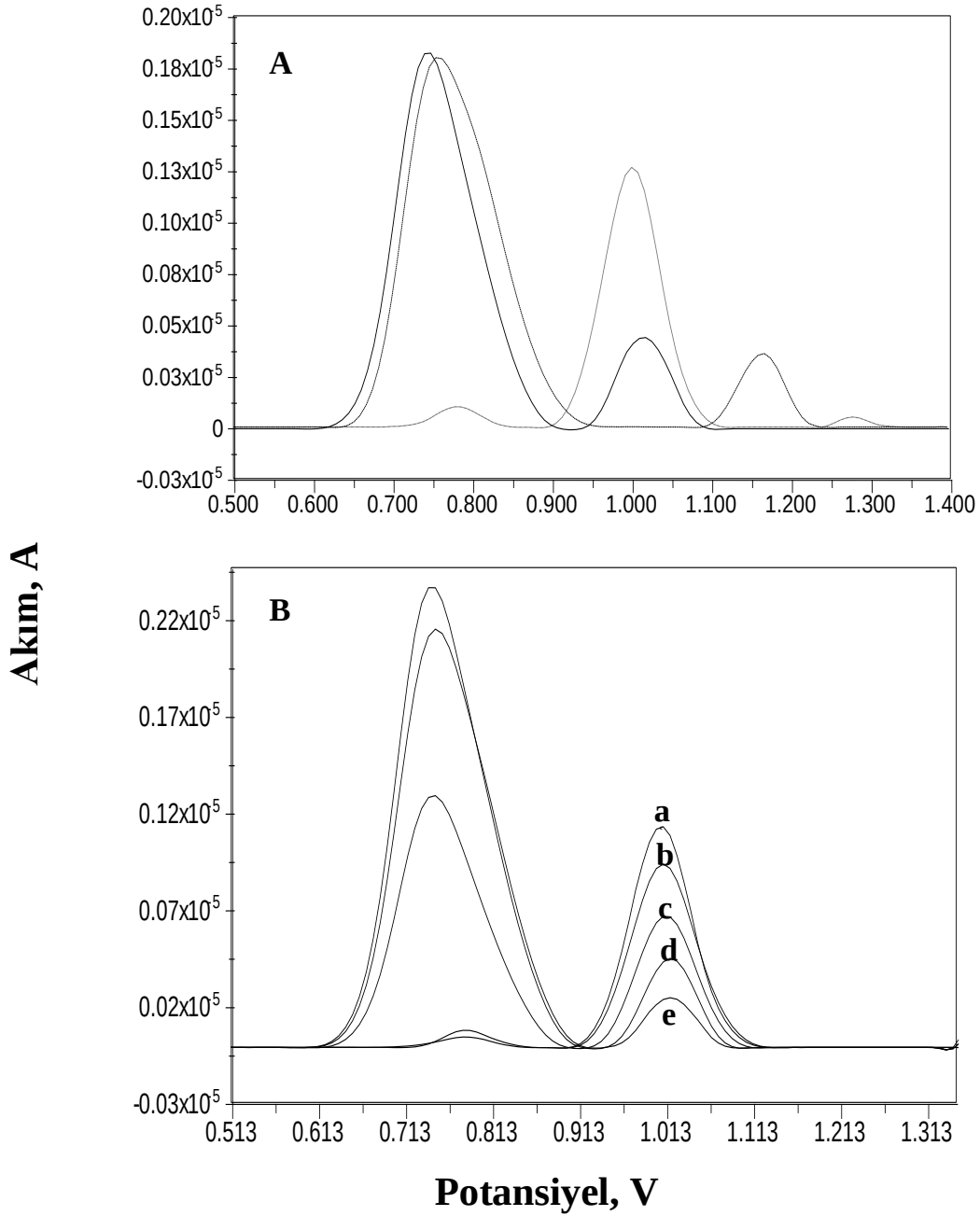
#### Yapılan Analiz Çalışmaları

Löprolid-dsDNA etkileşiminin voltametrik bir çalışmasına literatürlerde rastlanmadı. Löprolid ve guanin pik akımları etkileşimden önce ve sonra Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV) tekniğiyle ölçülmüştür ( Şekil 3.31a). Öncelikle dsDNA'daki guanin pik akımını en çok düşüren löprolid derişimi seçilmiştir, 6,00µg/mL, sonra bu derişimde guanin sinyalini en çok düşüren karıştırma süresi, 90sn, seçilerek şartlar optimize edilmiştir.

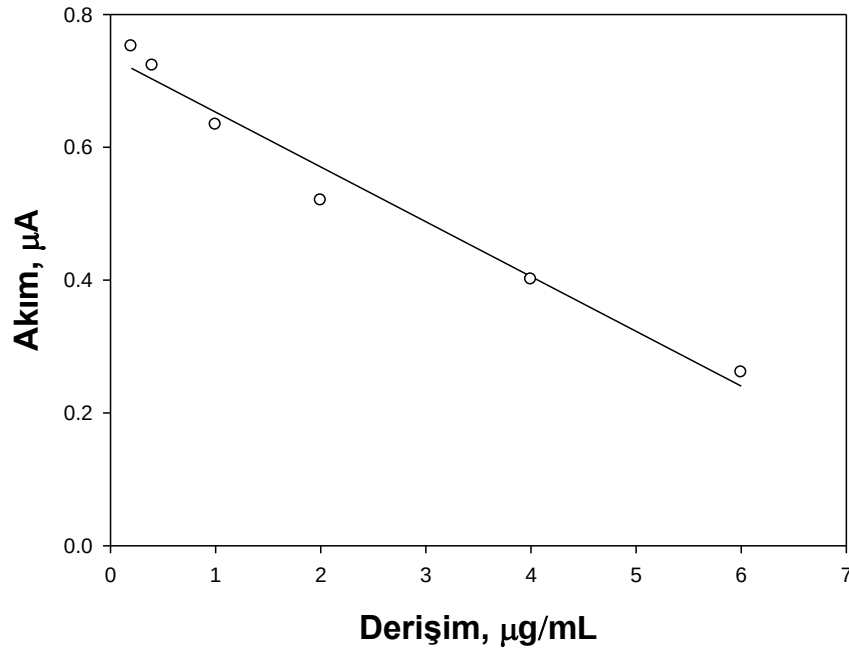
Şekil 3.30'den de anlaşılabileceği gibi bu sonuçlarla şartlar optimize edilmiş oldu. Buna göre 90sn bekletilerek akımın en küçük olduğu şartlar sağlanmış oldu. Şartlar optimize edildikten sonra elektrot üzerinde birikmiş olan maddeler AdSDPV tekniği kullanılarak tayin edildi. pH 4,80 asetat tamponu içerisinde 0,20 – 6,00 µg/mL derişim aralığında elde edilen AdSDPV eğrilerinden bazı seçilmiş derişimler Şekil 3.31b'de verilmiştir.

Löprolid'in derişiminin guanin pik akımı üzerine etkisi için optimum koşullar pH 4,80 asetat tamponu içeren çözeltisinde diferansiyel puls sıyırma voltametrisi kullanılarak elde edilmiştir. Çizelge.3.20'de löprolid derişimleri (C) ve AdSDPV için +1.02V'da karşılık gelen guanin pik akımı değerleri ( $i_p$ ) verilmiştir. Bu değerlere göre 0,20 – 6,00 µg/mL derişim aralığında derişim-pik akımı arasında  $r = -0,987$  korelasyon katsayısı ile AdSDPV için  $i_p(\mu A) = -0,0825 C(M) + 0,7355$  eşitliklerine uyan doğrusal ilişki bulunmaktadır (AdSDPV için Şekil 3.32). Bu sonuçlara dayanarak, kalem grafit elektrot ile AdSDPV teknikleri kullanılarak löprolid'in ticari preparatından miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.





**Şekil 3.31.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde (A) KGE yüzeyinde 2,00  $\mu\text{g/mL}$  ds-DNA ile 1,00  $\mu\text{g/mL}$  löprolid etkileşiminine ait grafikler; etkileşimden önce guanin sinyali ( - - - - ); dsDNA ile etkileşiminden sonra löprolid sinyali(——) ve etkileşimden önce löprolid sinyali(— · — · —) (B) 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA'nın guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikleri; a) 2,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; b) Su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; c) 0,40  $\mu\text{g/mL}$ ; d) 2,00 e) 6,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerde löprolid ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri.



**Şekil 3.32.** 0,20 – 6,00 µg/mL derişim aralığında pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid'in AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği

**Çizelge 3.20.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid için elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları

|                                               | Derişim (µg/mL) | Akım (µA) |
|-----------------------------------------------|-----------------|-----------|
| Tek başına guanin sinyali                     | 0               | 1,06      |
| 'su + asetat tamponu' ile etkileştikten sonra | 0               | 0,939     |
| löprolid ile etkileştikten sonra              | 0,20            | 0,752     |
|                                               | 0,40            | 0,723     |
|                                               | 1,00            | 0,634     |
|                                               | 2,00            | 0,520     |
|                                               | 4,00            | 0,400     |
|                                               | 6,00            | 0,260     |

Çizelge 3.20'deki AdSDPV tekniği ile elde edilen verileri kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.21'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.21.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid-dsDNA etkileşimi için guanin üzerinden AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

|                                                   | AdSDPV      |
|---------------------------------------------------|-------------|
| Ölçüm Yapılan Potansiyel                          | 1,02        |
| Doğrusallık aralığı<br>( $\mu\text{g/mL}$ )       | 0,20 – 6,00 |
| Eğim ( $\mu\text{A.M}^{-1}$ )                     | -0,083      |
| Kesişim ( $\mu\text{A}$ )                         | 0,736       |
| Korelasyon Katsayısı                              | -0,987      |
| Eğimin standart hatası                            | 0,0068      |
| Kesişimin standart hatası                         | 0,021       |
| Yakalama Sınırı (M)*                              | 0,06        |
| Tayin alt Sınırı (M)*                             | 0,19        |
| Akımın gün içi<br>tekrarlanabilirliği (%BSS)      | 1,75        |
| Akımın günler arası<br>tekrarlanabilirliği (%BSS) | 3,24        |

(\*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları 0,20  $\mu\text{g/mL}$  derişiminin 3 değerinden elde edilmiştir.

Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde oldukça iyi sonuçlar elde edilebilmesi, löprolid içeren piyasa preparatlarından miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

### 3.3.2.4. L6prolid İ7in Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları

L6prolid-dsDNA etkileşiminin tayini i7in geliştirilen voltametrik teknik piyasa preparatlarına uygulanmıştır.

#### 3.3.2.4.1. Geliştirilen Y6ntemlerin Farmas6tik Dozaj şekillerine Uygulanması

L6prolid i7eren enjeksiyonluk preparatlarda miktar tayini yapabilmek i7in numuneler, 2.5.3.3.2 b6l6m6nde anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Etkileşim sonrası elde edilen guanin eğrilerinden okunan pik akımı değerleri ilgili kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak enjeksiyonluk c6zeltilerin i7erdiği etken madde miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen y6ntemlerle yapılan analiz sonu7ları 7izelge 3.22’ de g6sterilmiştir.

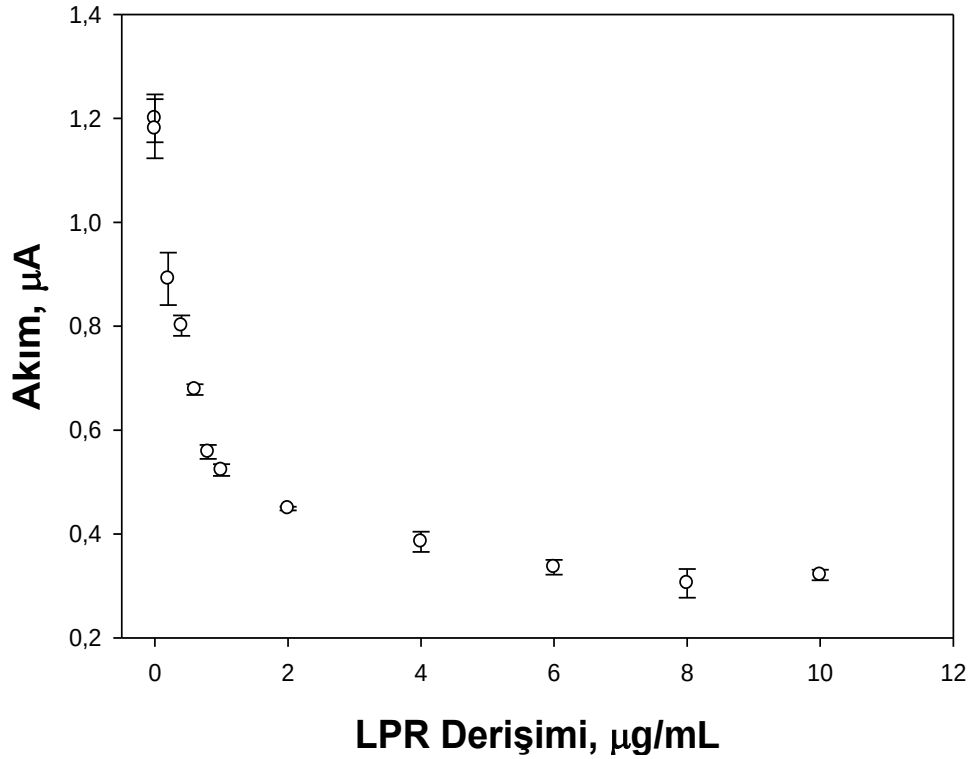
**7izelge 3.22.** L6prolid i7eren (5 mg/mL) Lucrin<sup>®</sup> enjeksiyonluk preparatından pH 4,80 asetat tamponu i7erisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV y6ntemleriyle elde edilen analiz bulguları

|           | Enjeksiyon C6zeltisinde Bulunan Madde<br>Miktarı (5 mg/mL) |
|-----------|------------------------------------------------------------|
| Numune No | AdSDPV                                                     |
| 1         | 5,20                                                       |
| 2         | 5,17                                                       |
| 3         | 5,00                                                       |
| 4         | 4,81                                                       |
| 5         | 4,99                                                       |
| $X_{ort}$ | 5,04                                                       |
| SS        | 0,16                                                       |
| %BSS      | 3,15                                                       |
| %Bias     | -0,8                                                       |

### 3.3.3. Löprolid ile dsDNA' nın Çözelti Ortamında Etkileşiminin Guanin

#### Yükseltgenme Sinyali Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.5.3.3.4.3.de anlatılan yol izlenerek, çözelti fazında 5,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile 0,20-10,00  $\mu\text{g/mL}$  derişimleri arasında değışen löprolid'in etkileşiminden elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklüklerini gösteren grafik Şekil 3.33' deki gibidir.



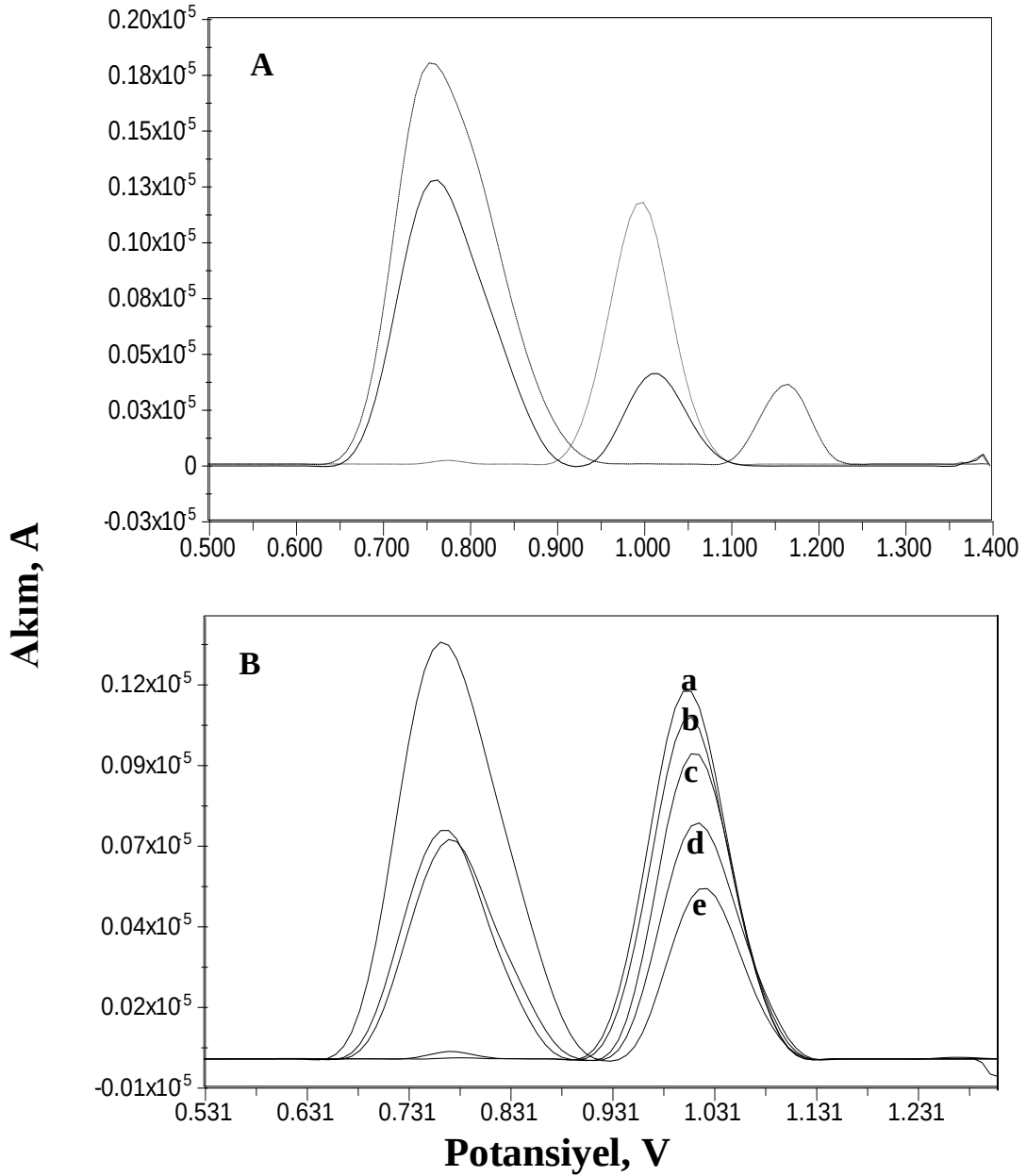
**Şekil 3.33.** Çözelti fazında etkileşen guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; sırasıyla 5,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00 $\mu\text{g/mL}$  derişimlerde löprolid ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri.

Şekil 3.33'e göre löprolid'in derişimi arttırıldıkça guanin yükseltgenme sinyalinde düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş löprolid'in 6,00  $\mu\text{g/mL}$  derişiminden sonra sabitlenmiştir.

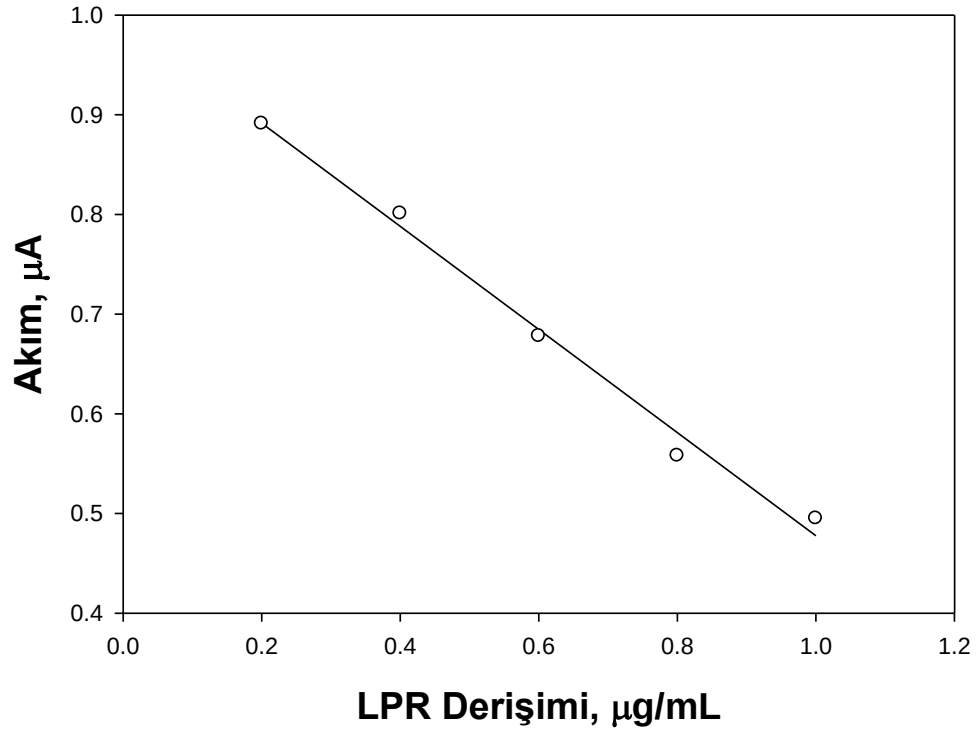
### 3.3.3.1. Çözelti Ortamında dsDNA-Löprolid Çalışmasının Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları

Çözelti ortamında löprolid-dsDNA etkileşimine ait herhangi bir voltametrik çalışmaya literatürlerde rastlanılmamıştır. Löprolid ve guanin pik akımları etkileşimden önce ve sonra Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV) tekniğiyle ölçülmüştür (Şekil 3.34a). Öncelikle dsDNA'daki guanin pik akımını en çok düşüren löprolid derişimi belirlendi. Şekil 3.33'den de anlaşılacağı gibi bu sonuçlarla şartlar belirlenmiş oldu. Buna göre dış ortamda 120sn karıştırarak elektrot üzerinde birikmiş olan madde-dsDNA, AdSDPV tekniği kullanılarak guanin sinyali üzerinden tayin edilmiştir. pH 4,80 asetat tamponu çözeltisi içinde 0,20 – 1,00 µg/mL derişim aralığında elde edilen AdSDPV eğrilerinden bazı seçilmiş derişimler Şekil 3.34b'de verilmiştir.

Çözelti ortamında löprolid'in derişiminin guanin pik akımı üzerine etkisi için optimum koşullar pH 4,80 asetat tamponu içeren çözeltisinde diferansiyel puls sıyırma voltametrisi kullanılarak elde edilmiştir. Çizelge 3.23'de löprolid derişimleri (C) ve AdSDPV için +1,01V'da karşılık gelen guanin pik akımı değerleri ( $i_p$ ) verilmiştir. Bu değerlere göre 0,20 – 1,00 µg/mL derişim aralığında derişim-pik akımı arasında  $r = -0,995$  korelasyon katsayısı ile AdSDPV için  $i_p(\mu A) = -0,5175 C(M) + 0,9951$  eşitliklerine uyan doğrusal ilişki bulunmaktadır (AdSDPV için Şekil 3.35). Bu sonuçlara dayanarak, kalem grafit elektrot ile AdSDPV teknikleri kullanılarak löprolid'in ticari preparatından miktar tayininin yapılacağına karar verilmiştir.



**Şekil 3.34.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde (A) Çözelti ortamında 5,00  $\mu\text{g/mL}$  ds-DNA ile 1,00  $\mu\text{g/mL}$  löprolid etkileşiminine ait grafikler; etkileşimden önce guanin sinyali (---); dsDNA ile etkileşiminden sonra löprolid sinyali(—) and etkileşimden önce löprolid sinyali(---) (B) pH 4,80 asetat tamponu içerisinde 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA'nın Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikleri; a) 5,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile löprolid etkileşmeden önce; b) Su/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; c) 0,08  $\mu\text{g/mL}$ ; d) 0,16  $\mu\text{g/mL}$  e) 0,32  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerde löprolid ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri.



**Şekil 3.35.** 0,20 – 1,00  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid'in AdSDPV tekniğı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı



**Çizelge 3.23.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid için elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları

|                                                   | Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Akım ( $\mu\text{A}$ ) |
|---------------------------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Tek başına guanin sinyali                         | 0 (guanin)                   | 1,12                   |
| ‘saf su + asetat tamponu’ ile etkileştikten sonra | 0 (asetat ile)               | 0,987                  |
| löprolid ile etkileştikten sonra                  | 0,20                         | 0,891                  |
|                                                   | 0,40                         | 0,801                  |
|                                                   | 0,60                         | 0,678                  |
|                                                   | 0,80                         | 0,558                  |
|                                                   | 1,00                         | 0,495                  |
|                                                   |                              |                        |

Çizelge 3.23’deki AdSDPV tekniğı ile elde edilen verileri kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.24’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.24.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde löprolid-dsDNA etkileşimi için guanin üzerinden AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

|                                                   | AdSDPV      |
|---------------------------------------------------|-------------|
| Ölçüm Yapılan Potansiyel                          | 1,01        |
| Doğrusallık aralığı<br>( $\mu\text{g/mL}$ )       | 0,20 – 1,00 |
| Eğim ( $\mu\text{A.M}^{-1}$ )                     | –0,518      |
| Kesişim ( $\mu\text{A}$ )                         | 0,995       |
| Korelasyon Katsayısı                              | –0,995      |
| Eğimin standart hatası                            | 0,0295      |
| Kesişimin standart hatası                         | 0,0196      |
| Yakalama Sınırı (M)*                              | 0,04        |
| Tayin alt Sınırı (M)*                             | 0,14        |
| Akımın gün içi<br>tekrarlanabilirliği (%BSS)      | 1,84        |
| Akımın günler arası<br>tekrarlanabilirliği (%BSS) | 2,52        |

(\*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları  $0,40 \mu\text{g/mL}$  derişiminin 3 değerinden elde edilmiştir.

Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde oldukça iyi sonuçlar elde edilebilmesi, löprolid içeren piyasa preparatlarından çözelti ortamında miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

### **3.3.3.2. Löprolid İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları**

Çözelti ortamında löprolid-dsDNA etkileşiminin tayini için geliştirilen voltametrik teknik piyasa preparatlarına uygulanmıştır.

#### **3.3.3.2.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması**

Löprolid içeren enjeksiyonluk preparattan miktar tayini yapabilmek için numuneler 2.5.3.3.2 bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Etkileşim sonrası elde edilen guanin eğrilerinden okunan pik akımı değerleri ilgili kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak enjeksiyon çözeltilerinin içerdiği etken madde miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.25’ de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.25.** Löprolid içeren (5 mg/mL) Lucrin® enjeksiyonluk preparatların pH 4,80 asetat tamponu içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları

|           | Enjeksiyon Çözeltisinde Bulunan Madde<br>Miktarı (5 mg/mL) |
|-----------|------------------------------------------------------------|
| Numune No | AdSDPV                                                     |
| 1         | 4,95                                                       |
| 2         | 4,83                                                       |
| 3         | 4,98                                                       |
| 4         | 5,16                                                       |
| 5         | 4,99                                                       |
|           |                                                            |
| $X_{ort}$ | 4,98                                                       |
| SS        | 0,12                                                       |
| %BSS      | 2,34                                                       |
| %Bias     | 0,4                                                        |

### 3.3.4. Üç Yöntemin Analiz Çalışmalarının Karşılaştırılması

Boş kalem elektrotta, çözelti ortamında ve dsDNA tutturulmuş elektrotta Lucrin enjeksiyonluk çözeltisinden elde edilen analiz bulguları karşılaştırıldığı zaman, bulunan t ve F değerleri tablo değeriyle karşılaştırıldığında yöntemler arasındaki farkın önemsiz olduğu görülmektedir.

**Çizelge 3.26.** Boş kalem grafit elektrotta (KGE), çözelti ortamında ve elektrot üzerinde etkileşimde Lucrin<sup>®</sup> enjeksiyonluk çözeltisinden elde edilen analiz bulgularının karşılaştırmalı sonuçları

|                                     | Boş KGE                    | Elektrot üzerinde etkileşimde | Çözelti ortamında etkileşimde |
|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Tablette bulunan madde miktarı (mg) | 5,00                       | 5,00                          | 5,00                          |
| Bulunan madde miktarı (mg)          | 4,97                       | 5,04                          | 4,98                          |
| %BSS                                | 1,89                       | 3,15                          | 2,34                          |
| Hesaplanan t değeri                 | $t_{\text{teorik}} = 2,31$ | 0,46                          | 0,91                          |
| Hesaplanan F değeri                 | $F_{\text{teorik}} = 2,60$ | 0,33                          | 0,69                          |

(p: 0,005)

### 3.4. Fulvestrant Üzerindeki İncelemeler

Çalışma maddesi olarak seçilen fulvestrant üzerinde dönüşümlü voltametri (DV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV) teknikleri kullanılarak değişik ortamlarda ve pH değerlerinde kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. BAS 100 W elektrokimyasal analizörü, bor ile dope edilmiş elmas (BDEE) çalışma elektrodu, platin tel yardımcı elektrot ve Ag/AgCl referans elektrot deneylerin tamamında kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda fulvestrant'ın farklı pH'lardaki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için destek elektroliti olarak 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 2,00 – 12,00 arasındaki Britton – Robinson (BRT) tamponları, pH 2,00 – 7,00 arasındaki fosfat tamponları ve pH 3,50 – 5,50 arasındaki asetat tamponları kullanılmıştır. Deneylerde analitik amaçlar için en uygun ortamın 0,1M sülfürik asit olduğu saptanmıştır.

Yukarıdaki pH ve ortamda, saf maddenin davranışı değişen hızlarda incelendikten sonra ticari preparatlar üzerindeki uygulamaya geçilmiş ve bu amaçla Astra Zeneca ilaç firmasından temin edilen ve 250 mg/5mL fulvestrant içeren Faslodex® adlı ilaçtan örnekler alınıp enjeksiyonluk çözeltiden miktar tayini ve % geri kazanım deneyleri yapılmıştır.

Çalışmanın daha sonraki aşamasında ise insan kan serumu örnekleri temin edilmiş ve bu örneklerle geliştirilen miktar tayin yöntemi uygulanmıştır. İn vivo – in vitro ya da Ex-vivo olarak adlandırılan bu yöntemle ilgili detaylı açıklamalar ve hazırlanışa bölüm 2.5.3.4.4'de yer verilmiştir.

#### 3.4.1. Fulvestrant Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar

Fulvestrant'ın voltametrik incelemesi, bor ile dope edilmiş elmas (BDEE) elektrot ile dönüşümlü voltametri (DV) ve adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametrisi (AddPSV) tekniği kullanılarak yapılmıştır.

### 3.4.1.1. Fulvestrant'ın Adsorptif Sıyırma Diferansiyel Puls Voltametri Çalışmaları

Adsorptif Sıyırma Diferansiyel Puls Voltametri (AdSDPV) tekniği kullanılarak fulvestrant'ın bor ile dope edilmiş elmas elektrot ile 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 2,00 – 9,00 Britton – Robinson (BRT) tamponları, pH 2,00 – 7,00 arasındaki fosfat tamponları ve pH 3,50 – 5,50 arasındaki asetat tamponları içerisinde pH, hız taraması ve mekanizma çalışmalarına yönelik incelemeler yapılmıştır.

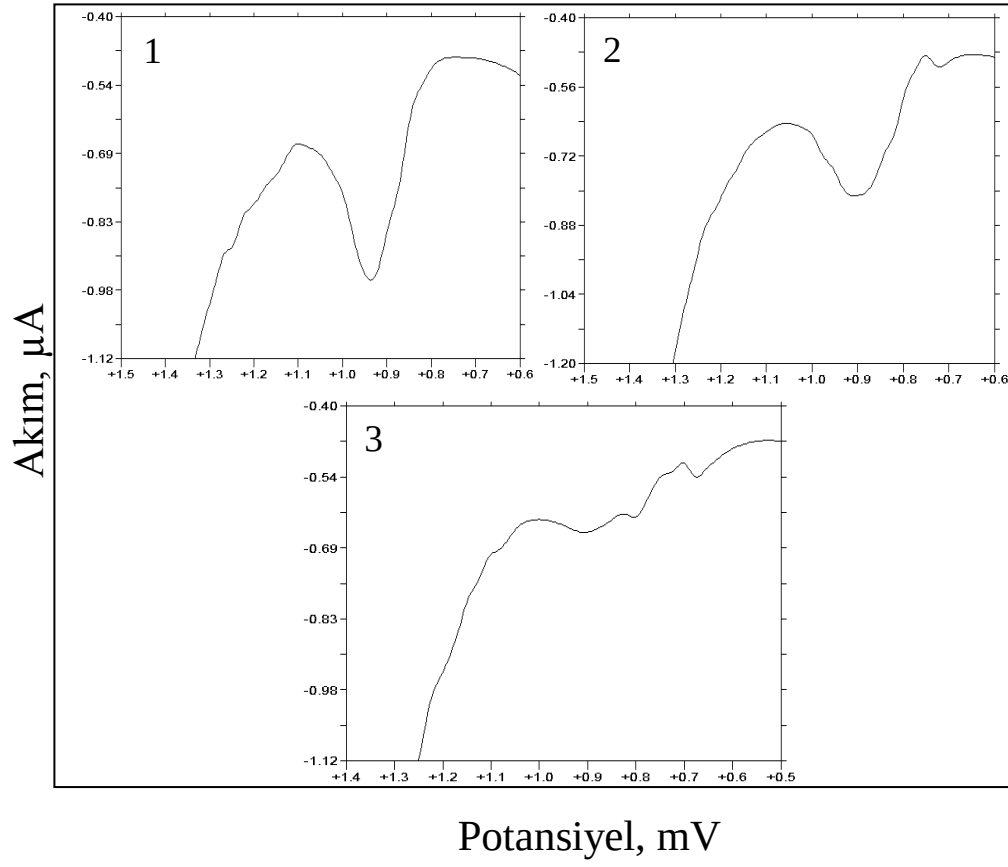
#### 3.4.1.1.1. Fulvestrant'ın BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Adsorptif

##### Sıyırma Diferansiyel Puls Voltametri Çalışmaları

Fulvestrant'ın BR tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 2,00; 3,03; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,03; 9,00 BR tamponları çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde  $2 \times 10^{-5}$  M derişimde, %30 asetonitril içeren ortamda çalışılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerdendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektrolitinin cinsinin ve pH'nın reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

pH taraması öncelikle diferansiyel puls voltametrisiyle yapılmış ve belirlenen orta değerde bir pH'da (pH 4,00 BRT) pH taraması için sıyırma voltametrisi şartları optimize edilmiştir. pH taramasında AdSDPV yöntemi kullanılarak 1050V'da 90 sn karıştırılarak çalışılmıştır. (Çizelge 3.34) (Şekil 3.45a ve 3.46b).

$2 \times 10^{-5}$  M derişim ile pH 2,00–9,00 BR tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.36'de görölmektedir. pH 2,00'de pik 906 mV'da gözlenirken pH arttıkça bu pikin daha az pozitif potansiyellere kaydığı saptanmıştır. pH 2,00–9,00 arasındaki potansiyel değerdleri Çizelge 3.27 'de verilmiştir.



**Şekil 3.36.**  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$  fulvestrant'ın pH 2,00 – 6,00 arası BR tamponları içerisindeki AdSDPV voltamogramları. 1) pH 2,00 ; 2) pH 4,00; 3) pH 6,00.



**Çizelge 3.27.** BRT çözeltileri içerisinde kaydedilen  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  fulvestrant'ın değişik pH değerlerinde AdSDPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

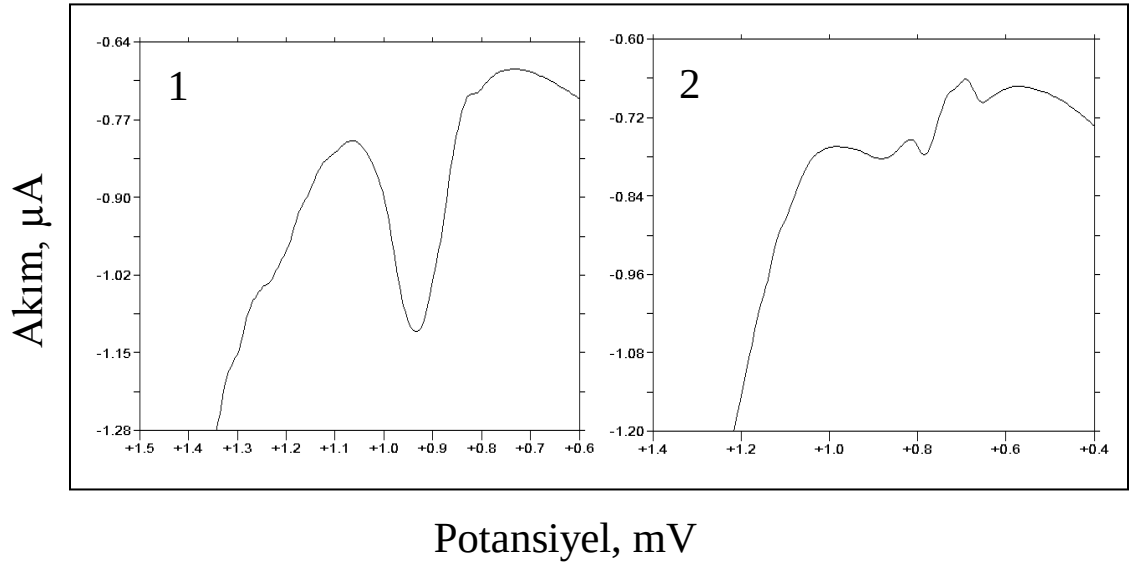
| pH   | Pik Potansiyeli<br>(mV) | Pik Akımı<br>( $\mu\text{A}$ ) |
|------|-------------------------|--------------------------------|
| 2,00 | 906                     | 0,365                          |
| 3,00 | 856                     | 0,290                          |
| 4,00 | 840                     | 0,229                          |
| 5,00 | 823                     | 0,150                          |
| 6,00 | 802                     | 0,060                          |
| 7,00 | 777                     | 0,071                          |
| 8,00 | 718                     | 0,062                          |
| 9,00 | 693                     | 0,007                          |

#### 3.4.1.1.2. Fulvestrant'ın Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan AdSDPV

##### Çalışmaları

Fulvestrant'ın fosfat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 2,00; 3,00; 6,00; 7,00 fosfat tamponları çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  derişimde, %30 asetonitril içeren ortamda çalışılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektroliti cinsinin ve pH'nın reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

$2 \times 10^{-5} \text{M}$  derişim ile pH 2,00–7,00 fosfat tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.37' de görülmektedir. pH 2,00'de pik 902 mV'da gözlenirken pH arttıkça bu pikin daha az pozitif potansiyellere kaydığı saptanmıştır. pH 2,00–7,00 arasındaki potansiyeller değerleri Çizelge 3.28'de verilmiştir.



**Şekil 3.37.**  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  fulvestrant'ın pH 2,00 – 7,00 arası fosfat tamponları içerisindeki AdSDPV voltamogramları. 1) pH 2,00 ;2) pH 6,00.

**Çizelge 3.28.** Fosfat tampon çözeltileri içerisinde kaydedilen  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  fulvestrant'ın değişik pH değerlerinde AdSDPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

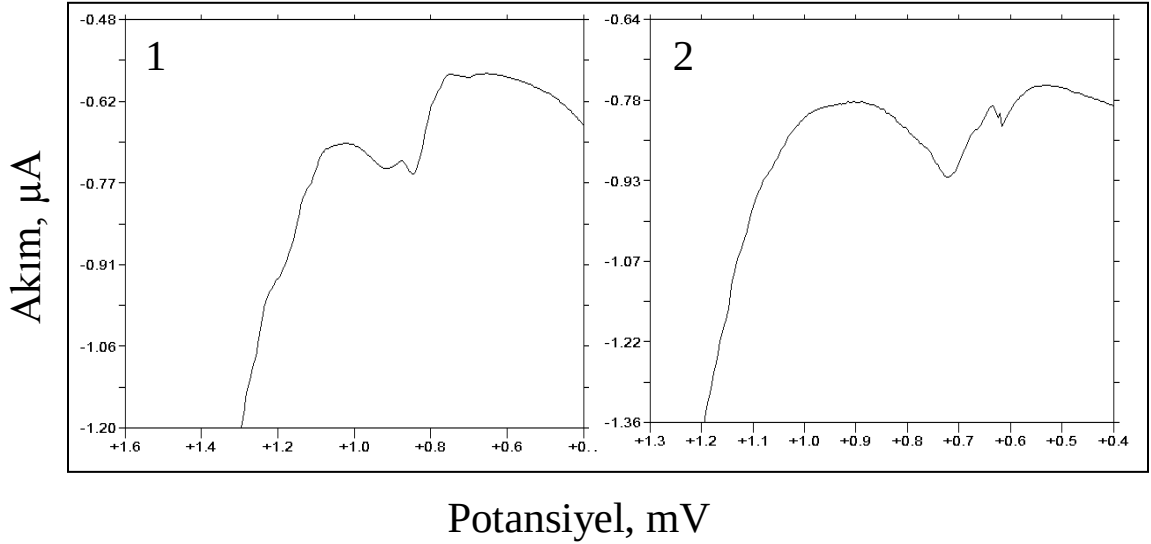
| pH   | Pik Potansiyeli<br>(mV) | Pik Akımı<br>( $\mu\text{A}$ ) |
|------|-------------------------|--------------------------------|
| 2,00 | 902                     | 0,370                          |
| 3,00 | 859                     | 0,270                          |
| 6,00 | 785                     | 0,085                          |
| 7,00 | 745                     | 0,045                          |

### 3.4.1.1.3. Fulvestrant'ın Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan AdSDPV

#### Çalışmaları

Fulvestrant'ın asetat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 3,50; 4,50; 5,50 asetat tamponları çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  derişimde, %30 asetonitrilli ortamda çalışılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektrolitinin cinsinin ve pH'nın reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

$2 \times 10^{-5} \text{M}$  derişim ile pH 3,50–5,50 asetat tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.38' da görölmektedir. pH 3,50'de pik 846 mV'da gözlenirken pH arttıkça bu pik daha az pozitif potansiyellere kaydığı saptanmıştır. pH 3,50–5,50 arasındaki potansiyeller değerleri Çizelge 3.29'da verilmiştir.



**Şekil 3.38.**  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  fulvestrant'ın pH 3,50 – 5,50 arası asetat tamponları içerisindeki AdSDPV voltamogramları. 1) pH 3,50 ; 2) pH 4,50; 3) pH 5,50.

**Çizelge 3.29.** Asetat tamponu çözeltileri içerisinde kaydedilen  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  fulvestrant'ın değişik pH değerlerinde AdSDPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

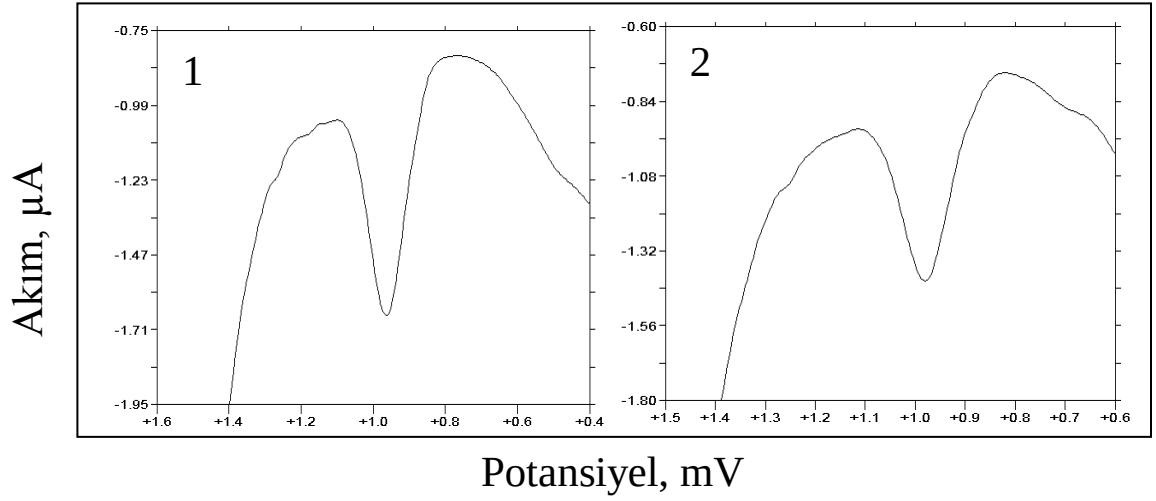
| pH   | Pik Potansiyeli<br>(mV) | Pik Akımı<br>( $\mu\text{A}$ ) |
|------|-------------------------|--------------------------------|
| 3,50 | 846                     | 0,14                           |
| 4,50 | 800                     | 0,14                           |
| 5,50 | 731                     | 0,10                           |

#### 3.4.1.1.4. Fulvestrant'ın Sülfirik Asit Çözeltileri İçerisinde Yapılan AdSDPV

##### Çalışmaları

Fulvestrant'ın  $\text{H}_2\text{SO}_4$  destek elektroliti içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için  $0,1 \text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  destek elektroliti kullanılmıştır. pH incelemelerinde  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  derişimde, %30 asetonitril içeren ortamda çalışılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektroliti cinsinin ve pH'ının reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

$2 \times 10^{-5} \text{M}$  derişim ile  $0,1 \text{M}$  ve  $0,5 \text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  destek elektrolitindeki voltamogramları Şekil 3.39' da görülmektedir.  $0,1 \text{M}$  ve  $0,5 \text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  destek elektrolitindeki potansiyel değerleri Çizelge 3.30'da verilmiştir.

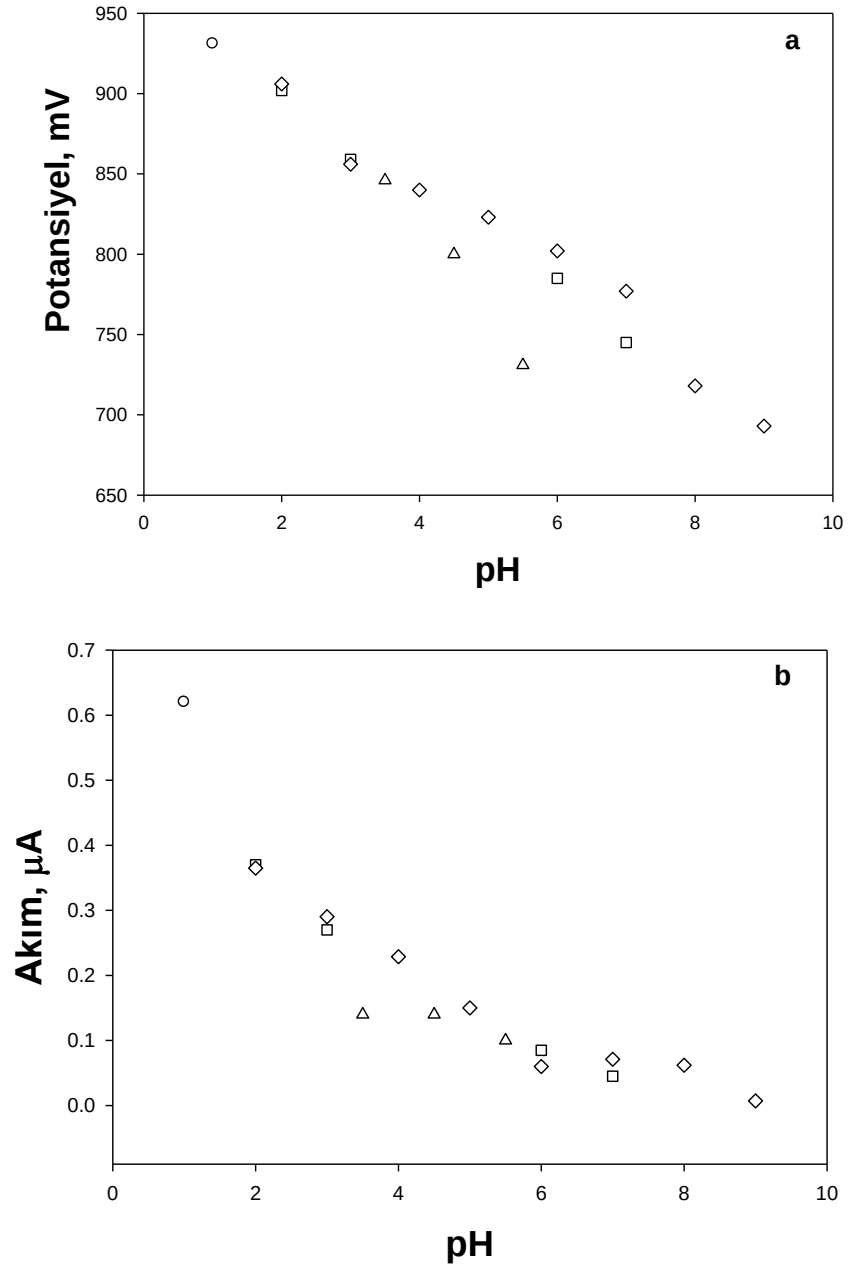


**Şekil 3.39.**  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  fulvestrant'ın 0,1M (1) ve 0,5M (2)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  destek elektroliti içerisindeki voltamogramı.

**Çizelge 3.30.** Sülfirik asit çözeltileri içerisinde kaydedilen  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  fulvestrant'ın değişik pH değerlerinde AdSDPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

| pH   | Pik Potansiyeli (mV) | Pik Akımı ( $\mu\text{A}$ ) |
|------|----------------------|-----------------------------|
| 0,30 | 976                  | 0,57                        |
| 1,00 | 931                  | 0,62                        |

pH'ın potansiyel ve pik akımına etkisini daha rahat görebilmek için bütün pH'ları ve ortamları bir arada gösteren (Pik potansiyeli - pH) Ep-pH, (Pik akımı - pH) İp-pH eğrileri Şekil 3.40a, 3.41b'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.40.**  $1 \times 10^{-3}$  M Fulvestrant'ın Ep – pH (a) , İp – pH (b) eğrileri. (○) : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; (◇) : BRT ; (Δ) : Asetat ; (□) : Fosfat

Adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametri tekniğiyle bütün pH çözeltilerinde, doğrusallık elde edildiği görülmüştür. Şekil 3.40'dan de anlaşılacağı gibi pH 10,00' a kadar doğrusallık elde edilmiştir.(Çizelge 3.31)

**Çizelge 3.31.** pH 2,00 – 12,00 arası pH'a karşı okunan potansiyel değerleri

| pH   | 1.Pik Potansiyeli (mV) |
|------|------------------------|
| 1,00 | 931                    |
| 2,00 | 902                    |
| 3,00 | 859                    |
| 3,50 | 846                    |
| 4,00 | 840                    |
| 4,50 | 800                    |
| 5,00 | 823                    |
| 6,00 | 785                    |
| 7,00 | 745                    |
| 8,00 | 718                    |
| 9,00 | 693                    |

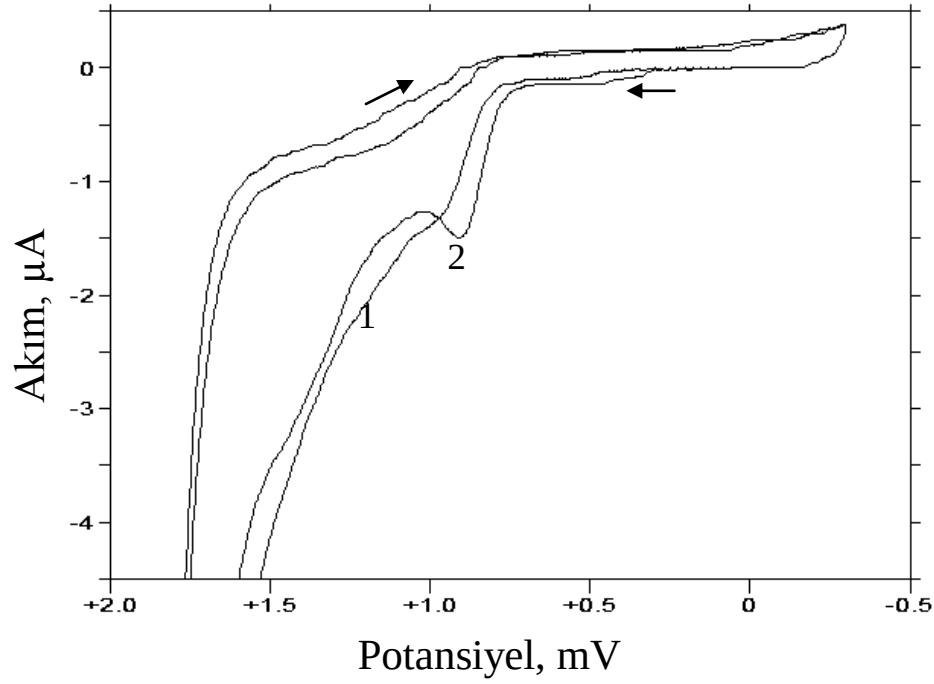
Bu Çizelge değerlerine göre;

$$E_p = 954,83 - 29,45 \text{ pH} \quad (r:0,991) \quad (n=11)$$

### 3.4.1.2. Fulvestrant'ın Sülfirik Asit Destek Elektroliti İçerisinde Yapılan

#### Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içerisinde  $8 \times 10^{-5}\text{M}$  fulvestrant içeren çözeltinin dört devirli voltamogramı BDE elektrot ile  $100\text{mVs}^{-1}$  hızla çizdirilmiştir (Şekil 3.41). İlk devirde anodik yönde fulvestrant'ın 956mV civarında bir dalga verdiği, katodik yönde bir pik vermediği gözlenmiştir. 2. devirde, fulvestrant'a ait dalga daha az pozitif potansiyele kaymış ve 911mV'da pike dönüşmüştür.



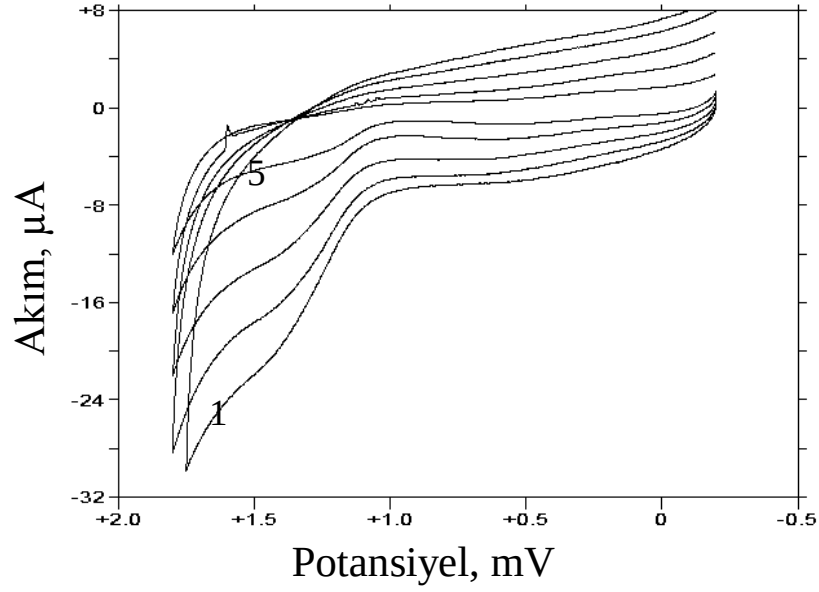
**Şekil 3.41.** 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içerisinde  $8 \times 10^{-5}\text{M}$  fulvestrant içeren çözeltinin 2 devirli dönüşümlü voltamogramı

Akım değerinin en yüksek okunduğu 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içerisinde  $4 \times 10^{-5}\text{M}$  fulvestrant'ın değişik tarama hızlarındaki eğrileri  $5\text{-}1000\text{mVs}^{-1}$  aralığında kaydedilmiştir. Bu deneylerden elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman  $5\text{-}1000\text{mVs}^{-1}$  aralığında hız ile akımın doğrusal olarak arttığı ve potansiyelin  $5\text{-}1000\text{mVs}^{-1}$  aralığında 230mV kaydığı saptanmıştır. Bu deneylerden elde edilen veriler Çizelge 3.32'de gösterilmiştir. Bu deneylere ait voltamogram da Şekil 3.42a ve 3.42b'de verilmiştir.

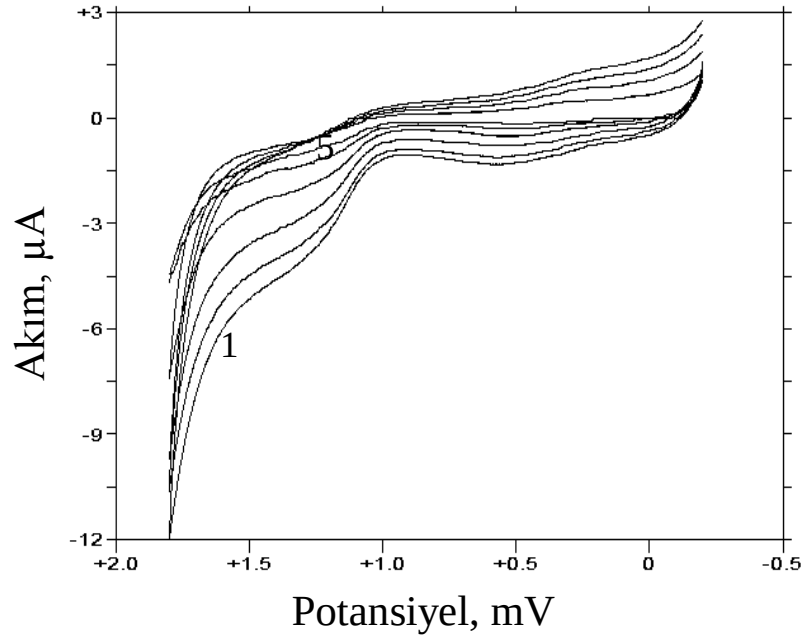


**Çizelge 3.32.** 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde 4x10<sup>-5</sup>M fulvestrant'ın 5-100mVs<sup>-1</sup> tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (Ep) ve akım (ip) değerleri.

| Tarama hızı<br>(mVs <sup>-1</sup> ) | $v^{1/2}$ | $i_p$ (μA) | Ep (mV) | logv  | log $i_p$ |
|-------------------------------------|-----------|------------|---------|-------|-----------|
| 5                                   | 2,236     | 4,49       | 1381    | 0,699 | 0,65      |
| 10                                  | 3,162     | 3,20       | 1357    | 1     | 0,51      |
| 25                                  | 5         | 2,40       | 1368    | 1,398 | 0,38      |
| 50                                  | 7,071     | 1,70       | 1293    | 1,699 | 0,23      |
| 75                                  | 8,660     | 0,88       | 1238    | 1,875 | -0,06     |
| 100                                 | 10        | 0,81       | 1213    | 2     | -0,09     |
| 250                                 | 15,811    | 0,50       | 1220    | 2,398 | -0,31     |
| 500                                 | 22,360    | 0,30       | 1207    | 2,699 | -0,52     |
| 750                                 | 27,386    | 0,18       | 1181    | 2,875 | -0,74     |
| 1000                                | 31,623    | 0,11       | 1151    | 3     | -0,97     |



**Şekil 3.42.a.** 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde  $4 \times 10^{-5}$ M fulvestrant'ın 100 – 1000 mVs<sup>-1</sup> tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları. 1) 1000 ; 2) 750 ; 3) 500 ; 4) 250 ; 5) 100 mVs<sup>-1</sup>



**Şekil 3.42.b.** 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde  $4 \times 10^{-5}$ M fulvestrant'ın 5 – 100 mVs<sup>-1</sup> tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları. 1) 75 ; 2) 50 ; 3) 25 ; 4) 10 ; 5) 5 mVs<sup>-1</sup>

Eğrilerde geri dönüş pikinin olmaması ve hızla birlikte pik potansiyelinin kayması reaksiyonun geri dönüşümsüz olduğunu göstermektedir.

Hızın akım ile doğrusal olarak değiştiği  $5 - 1000 \text{ mVs}^{-1}$  tarama hızlarında gerekli hesaplamalar yapıldığı zaman doğru denklemi;

$$i_p (\mu\text{A}) = 0,0041 v (\text{mVs}^{-1}) + 0,3162 \quad r = 0,991 \quad (n:10)$$

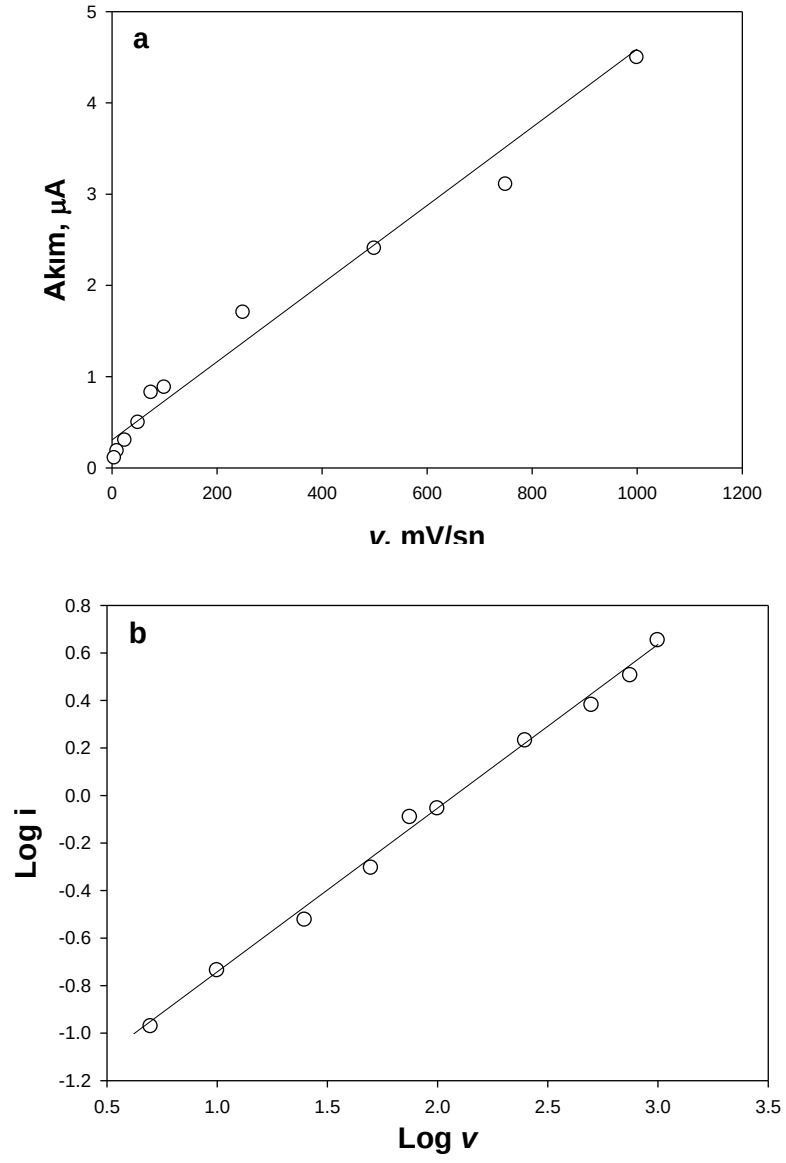
olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olabileceğini göstermektedir (Şekil 3.43a). Aynı hız aralığındaki  $\log v - \log i$  grafiği (Şekil 3.43b) ve denklemi incelenince bulunan eğim değerinin 0,69 olması reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olabileceğini göstermektedir (Laviron ve ark., 1980; Greef ve ark., 1990).

Elde edilen doğru denklemi;

$$\log i_p (\mu\text{A}) = 0,69 \log v (\text{mVs}^{-1}) - 1,45 \quad r = 0,997 \quad (n = 10)$$

(Saf difüzyon kontrollü olduğu zaman ve çözeltinin bu madde için ideal olduğu durumlarda eğim 0,5, saf adsorbsiyon kontrollü olduğu zaman ve kullanılan elektrodun o olay için ideal olduğu durumlarda 1 olur) (Laviron E., 1980)



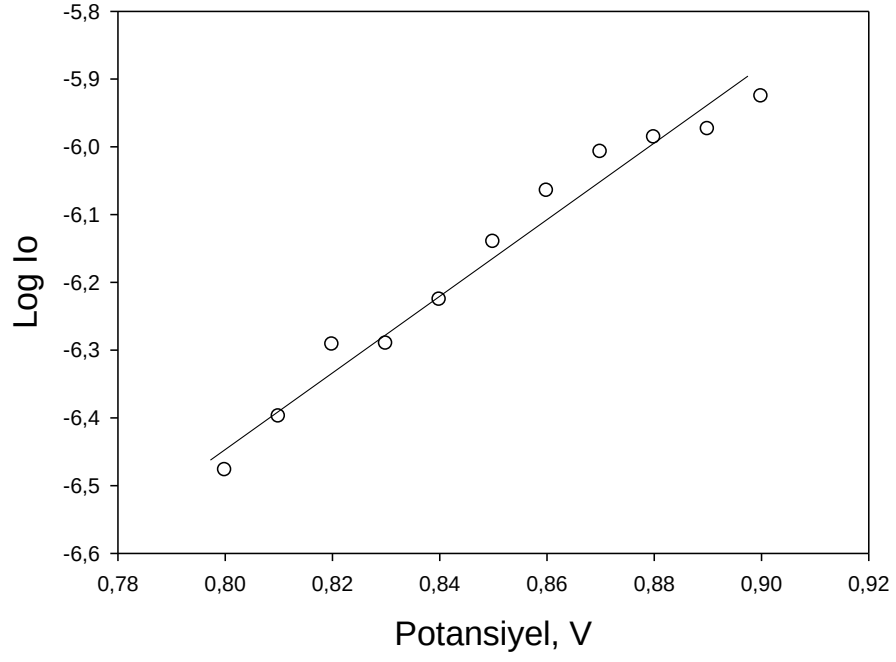
**Şekil 3.43.** 0,1M  $H_2SO_4$  içerisinde  $4 \times 10^{-5} M$  fulvestrant'ın 5 – 1000  $mVs^{-1}$  tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a)  $v - i_p$  ve b)  $\log v - \log i$  grafikleri

#### 3.4.1.2.1. Fulvestrant İçin Elde Edilen Mekanizma Verilerinin Değerlendirilmesi

Fulvestrant için çalışılan bütün ortamlardan elde edilen eğrilerin geri dönüşlerinde pik görülmemesi ve pik potansiyellerinin hız ile beraber değişmesi olayın seçilen ortamlarda geri dönüşümsüz olduğunu göstermektedir.

Seçilen ortamda (0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), değişik tarama hızlarında DV eğrileri kaydedilmiş ve bunlarla ilgili gerekli değerlendirmeler yapılmış ve Şekil 3.42 ve Çizelge 3.32’de verilmiştir.

0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde yapılan değişik tarama hızlarında elde edilen değerlendirmeler sonucunda reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğu düşünülmektedir. Mekanizma değerlendirmelerine ışık tutması açısından fulvestrant çözeltisinin BDEE ile kararlı hal kinetiğini incelemek için 5 mVs<sup>-1</sup> tarama hızında elde edilen voltamogramlarından yararlanılarak Tafel grafiği çizilmiştir (Yıldız ve Genç, 1993; Kissinger ve Heineman, 1996). Tafel grafiği için kullanılan veriler 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektrolitinde Çizelge 3.33’de ve bu verilere karşılık gelen Tafel eğrisi de Şekil 3.44’de verilmiştir. Doğrusal bölgenin eğiminden  $\alpha_n$  hesaplanmıştır.



**Şekil 3.44.**  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  fulvestrant'ın  $5 \text{ mVs}^{-1}$  tarama hızında  $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  içerisinde elde edilen Tafel eğrisi

**Çizelge 3.33.** 0,1 M Sülfirik asit'te 5 mVs<sup>-1</sup> tarama hızında potansiyele karşılık pik akımı değerleri

| Potansiyel(V) | Log i <sub>p</sub> (μA) |
|---------------|-------------------------|
| 0,80          | -6,48                   |
| 0,81          | -6,40                   |
| 0,82          | -6,29                   |
| 0,83          | -6,29                   |
| 0,84          | -6,22                   |
| 0,85          | -6,14                   |
| 0,86          | -6,06                   |
| 0,87          | -6,01                   |
| 0,88          | -5,99                   |
| 0,89          | -5,98                   |
| 0,90          | -5,93                   |

0,1 M Sülfirik asit'te Tafel değerleri hesaplanırken pikin görüldüğü 800-900 mV arasındaki seçilmiş potansiyeller akıma karşı grafiğe geçirildiğinde;

$$i_p(\mu A) = 5,54E_p - 10,87 \quad r = 0,985, (n = 11)$$

Buradan  $\alpha_n = 0,33$  ;  $I_0 = 1,35 \times 10^{-11} \text{ A/cm}^2$  olarak bulunmuştur.

### 3.4.2. Geliştirilen Voltametrik Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları

Adsorpsiyon kontrollü olan ve daha hassas bir teknik olan adsorptif sıyırma voltametrik yöntemlerinin uygulanmasına imkân tanıyan fulvestrant ile ilgili voltametrik bir çalışmaya literatürlerde rastlanmadı. Adsorptif sıyırma voltametrik yöntemle miktar tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

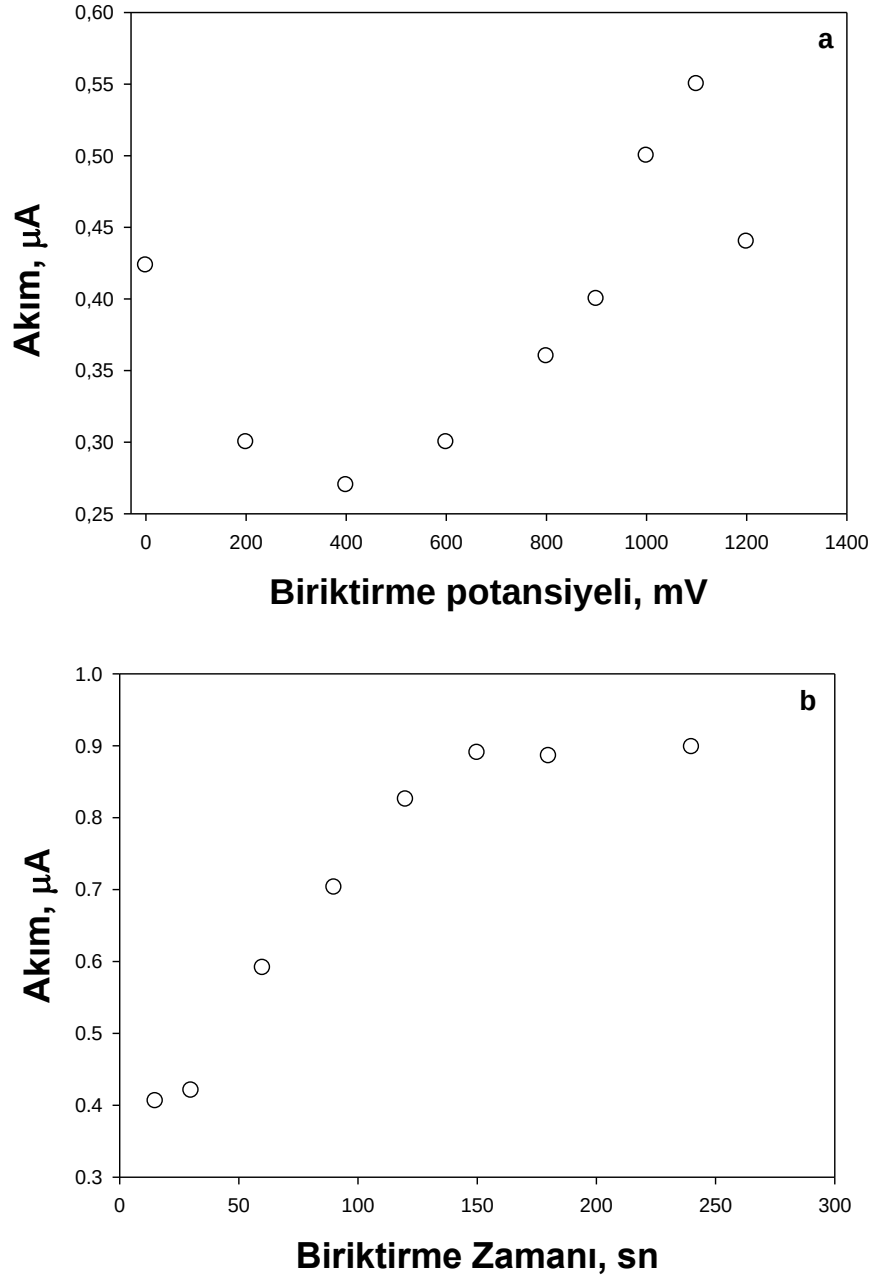
Elektrot yüzeyinde etken maddenin birikmesi elektrokimyasal olarak değil, fiziksel adsorbsiyonla meydana gelmiştir. Yeterince etken madde biriktirildikten sonra, birikmiş madde DPV tekniği kullanılarak analiz edildi.

Öncelikle elektrokimyasal ön biriktirme basamağında pik akımının en iyi olduğu, potansiyeli ve zamanı seçmek için şartlar optimize edildi (Çizelge 3.34) (Şekil 3.45a ve 3.46b). Pik akımının en iyi olduğu potansiyeli seçerken  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  derişimlerde AdSDPV için 30sn biriktirme süresi uygulanmıştır. En uygun potansiyeli 1100mV olarak belirledikten sonra, bu potansiyelde en uygun zaman olarak 150sn belirlenmiştir.



**Çizelge 3.34.**  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  fulvestrant'ın % 30 asetonitril içeren 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  çözeltisinde AdSDPV tekniğiyle potansiyel ve zamana göre akımdaki değişiklik

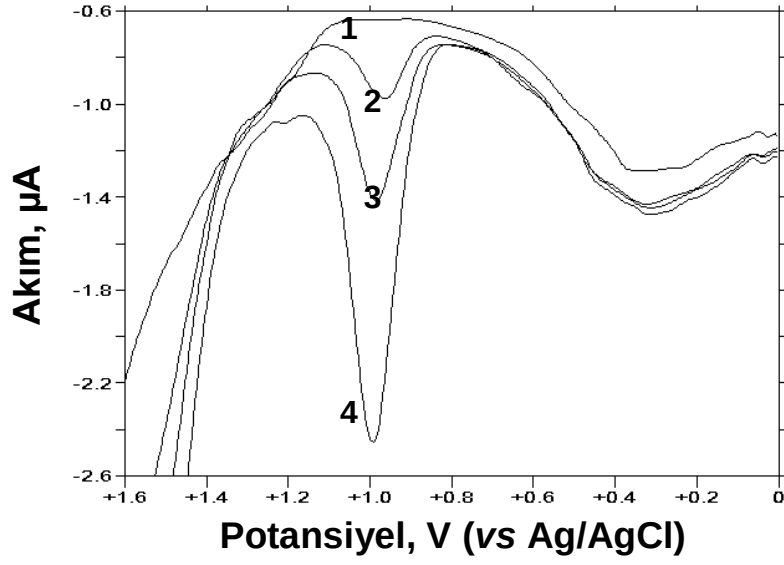
| Potansiyel (mV) | Akım( $\mu\text{A}$ ) | Zaman (sn) | Akım( $\mu\text{A}$ ) |
|-----------------|-----------------------|------------|-----------------------|
| 0               | 0,42                  | 15         | 0,41                  |
| 200             | 0,30                  | 30         | 0,42                  |
| 400             | 0,27                  | 60         | 0,59                  |
| 600             | 0,30                  | 90         | 0,70                  |
| 800             | 0,36                  | 120        | 0,83                  |
| 900             | 0,40                  | 150        | 0,89                  |
| 1000            | 0,50                  | 180        | 0,89                  |
| 1100            | 0,55                  | 240        | 0,90                  |
| 1200            | 0,44                  |            |                       |



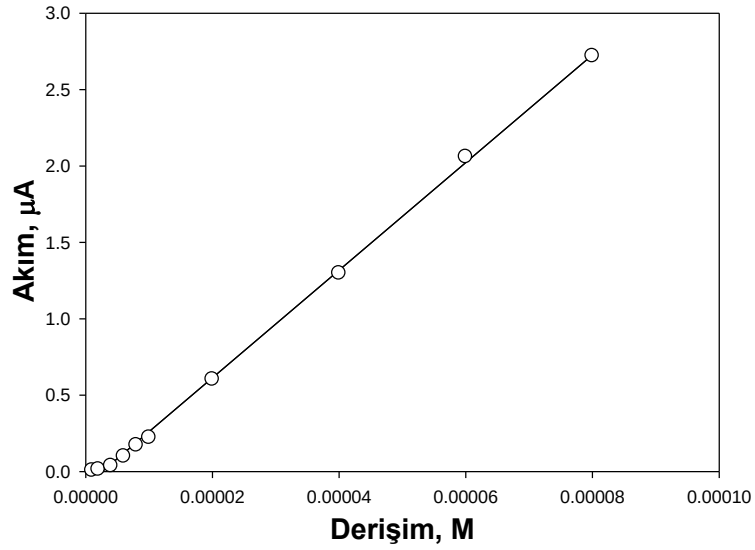
**Şekil 3.45.** AdSDPV tekniğiyle  $2 \times 10^{-5} M$  fulvestrant'ın % 30 asetonitrilli  $0,1 M H_2SO_4$  içerisinde a)  $i_p$  ( $\mu A$ ) –  $E_p$  (Biriktirme Potansiyeli) b)  $i_p$  ( $\mu A$ ) –  $t$  (sn) (Biriktirme Zamanı) grafikleri.

Şekil 3.45’den de anlaşılabileceği gibi bu sonuçlarla elektrokimyasal ön biriktirme basamağındaki şartları optimize edilmiş oldu. Buna göre 1100mV’da 150sn bekletilerek akımın en büyük olduğu şartlar sağlanmış oldu. Şartlar optimize edildikten sonra elektrot üzerinde birikmiş olan madde AdSDPV tekniği kullanılarak tayin edildi. Fulvestrant’ın voltametrik analizi için geliştirilen AdSDPV yöntemi, en yüksek akımın ve en keskin pik şeklinin elde edildiği 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisine uygulanmıştır. 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti içerisinde  $1 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında elde edilen AdSDPV eğrilerinden bazı seçilmiş derişimler Şekil 3.46’de verilmiştir.

Fulvestrant derişiminin pik akımı üzerine etkisi için optimum koşullar % 30 asetonitrilli ortamda 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren çözeltisinde diferansiyel puls sıyırma voltametrisi kullanılarak elde edilmiştir. Çizelge 3.35’de fulvestrant derişimleri (C) ve AdSDPV için +1,00V’da karşılık gelen pik akımı değerleri (*i<sub>p</sub>*) verilmiştir. Bu değerlere göre  $1 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında derişim-pik akımı arasında  $r=0,999$  korelasyon katsayısı ile AdSDPV için  $i_p(\mu A) = 35200C(M) - 0,0902$  eşitliklerine uyan doğrusal ilişki bulunmaktadır (AdSDPV için Şekil 3.47). Bu sonuçlara dayanarak, BDEE elektrot ile AdSDPV teknikleri kullanılarak fulvestrant’ın ticari preparatından miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.



**Şekil 3.46.** % 30 asetonitrilli 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde fulvestrant'ın bazı derişimlerdeki AdSDPV eğrileri (1) destek ; (2)  $1 \times 10^{-5}$  M; (3)  $2 \times 10^{-5}$  M; (4)  $4 \times 10^{-5}$  M



**Şekil 3.47.**  $1 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde fulvestrant'ın (%30 asetonitrilli ortam) AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği

**Çizelge 3.35.** 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde fulvestrant için (%30 asetonitrilli ortam) elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları

| Derişim (M)        | Akım (μA) |
|--------------------|-----------|
| 1x10 <sup>-6</sup> | 0,0072    |
| 2x10 <sup>-6</sup> | 0,014     |
| 4x10 <sup>-6</sup> | 0,037     |
| 6x10 <sup>-6</sup> | 0,0998    |
| 8x10 <sup>-6</sup> | 0,172     |
| 1x10 <sup>-5</sup> | 0,222     |
| 2x10 <sup>-5</sup> | 0,603     |
| 4x10 <sup>-5</sup> | 1,298     |
| 6x10 <sup>-5</sup> | 2,06      |
| 8x10 <sup>-5</sup> | 2,72      |

Çizelge 3.35'deki AdSDPV tekniği ile elde edilen verileri kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.36'de gösterilmiştir. Çizelge 3.36'da verilen yakalama (YAS) ve tayin alt (TAS) sınırları;

$$YAS = 3 \text{ s/m} ; TAS = 10 \text{ s/m}$$

formüllerinden bulunmuştur (Riley ve Rosanske, 1996 ; Swartz, Krull, 1997)

Bu formüllerde s, en düşük derişimin bir üst derişiminde 3 adet tekrarlanan sonucun standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir.

**Çizelge 3.36.** 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde fulvestrant için (%30 asetonitrilli ortam) AdSDPV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

|                                                      | AdSDPV                                |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Ölçüm Yapılan Potansiyel                             | 1,00                                  |
| Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)      | 0,66                                  |
| Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) | 0,71                                  |
| Doğrusallık aralığı (M)                              | $1 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5}$ |
| Eğim ( $\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$ )           | $3,52 \times 10^4$                    |
| Kesişim ( $\mu\text{A}$ )                            | $-9,02 \times 10^{-2}$                |
| Korelasyon Katsayısı                                 | 0,999                                 |
| Eğimin standart hatası                               | $4,17 \times 10^2$                    |
| Kesişimin standart hatası                            | $1,46 \times 10^{-2}$                 |
| Yakalama Sınırı (M)*                                 | $2,36 \times 10^{-7}$                 |
| Tayin alt Sınırı (M)*                                | $7,88 \times 10^{-7}$                 |
| Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)            | 0.55                                  |
| Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)       | 1.50                                  |

(\*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları  $6 \times 10^{-6}$  M derişiminin 3 değerinden elde edilmiştir.

Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde oldukça iyi sonuçlar elde edilebilmesi, fulvestrant içeren piyasa preparatlarından miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

### **3.4.3. Fulvestrant İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları**

Fulvestrant tayini için geliştirilen AdSDPV voltametrik tekniği ile hem piyasa preparatlarına hem de insan serumundan % geri kazanım çalışmalarına uygulanmıştır

#### **3.4.3.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım alışmaları**

Fulvestrant içeren enjeksiyonluk çözeltiden miktar tayini yapabilmek için numuneler 2.5.3.4.2 bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve eğriler saf fulvestrant gibi kaydedilmiştir. Bu eğrilerden okunan pik akımı değerleri ilgili kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak enjeksiyonluk çözeltinin içerdiği etken madde miktarı hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları izelge 3.37’ de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.37.** Fulvestrant içeren (250 mg/ 5 mL) Faslodex® enjeksiyonluk çözeltisinin pH 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti içerisinde BDEE elektrotla, geliştirilen AdSDPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları

|                  | Enjeksiyonluk Çözeltide Bulunan Madde<br>Miktarı (250 mg/ 5 mL) |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Numune No        | AdSDPV                                                          |
| 1                | 250,22                                                          |
| 2                | 248,17                                                          |
| 3                | 250,09                                                          |
| 4                | 250,30                                                          |
| 5                | 252,85                                                          |
|                  |                                                                 |
| X <sub>ort</sub> | 250,33                                                          |
| SS               | 1,67                                                            |
| %BSS             | 0,67                                                            |
| %Bias            | -0,13                                                           |

Enjeksiyonluk çözeltinin içerisinde yer alan katkı maddelerinin tayin yöntemlerimizi etkileyip etkilemediğini anlamak için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 2.5.3.4.3.'de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan saf etken madde içeren enjeksiyonluk preparat, yine bilinen miktarda etken madde ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda % geri kazanım değerleri bulunmuştur. % Geri kazanım sonuçları Çizelge 3.38.'de gösterilmiştir.



**Çizelge 3.38.** Fulvestrant içeren farmasötik preparattan 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları.

| Yöntem | İlave Edilen Madde<br>Miktarı (mg) | Bulunan Madde<br>Miktarı (mg) | % Geri<br>Kazanım         |
|--------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| AdSDPV | 20,00                              | 20,15                         | 100,77                    |
|        | 20,00                              | 20,40                         | 102,00                    |
|        | 20,00                              | 20,39                         | 101,95                    |
|        | 20,00                              | 19,62                         | 98,07                     |
|        | 20,00                              | 20,32                         | 101,61                    |
|        |                                    |                               | X <sub>ort</sub> : 100,88 |
|        |                                    |                               | SS :1,65                  |
|        |                                    |                               | % BSS : 1,63              |
|        |                                    |                               | %Bias: -0,88              |
|        |                                    |                               |                           |

### 3.4.3.2. Geliştirilen Yöntemlerin İnsan Serumuna Uygulanması ve Serumda %

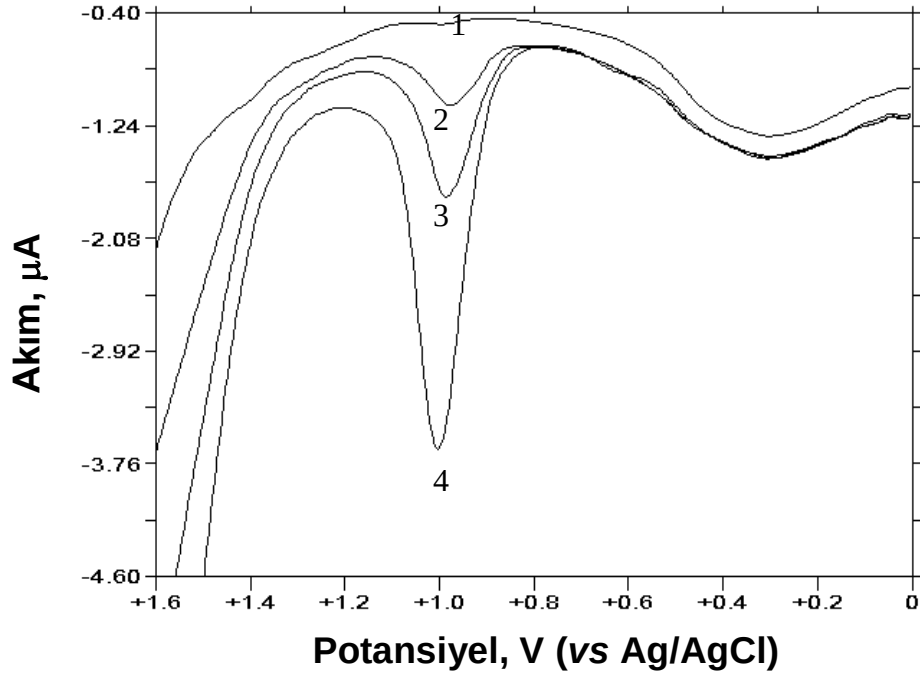
#### Geri Kazanım Çalışmaları

Fulvestrant için geliştirilen miktar tayini yöntemleri, fulvestrant'ın serum numunelerinden tayin edilebilirliğinin araştırılması amacıyla insan serum numunelerine bölüm 2.3.2.2.' de anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Bu çalışma ile ilgili voltamogramlar Şekil 3.48' de görülmektedir. Elde edilen sonuçlar da Çizelge 3.39'da verilmiştir.

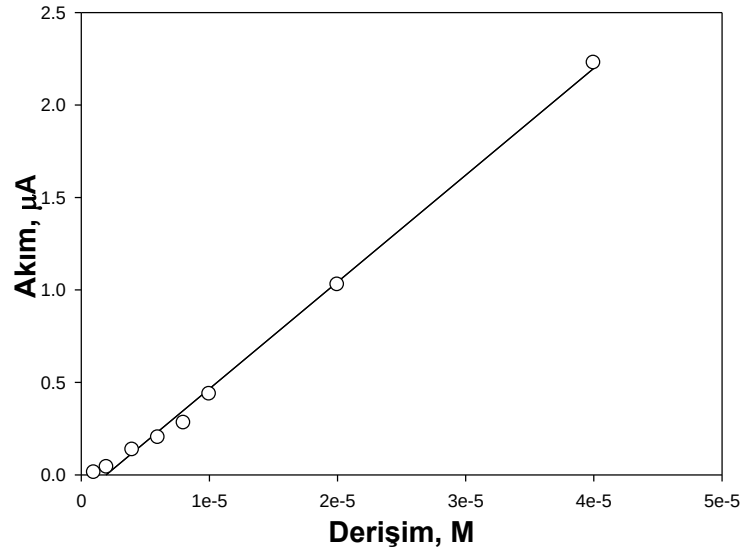
0,1 M  $H_2SO_4$  çözeltisi içerisinde  $1 \times 10^{-6}$ –  $4 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında insan serumunda elde edilen AdSDPV eğrilerinden bazı seçilmiş derişimler Şekil 3.48' de, verilmiştir.

Fulvestrant'ın serum derişiminin pik akımı üzerine etkisi için optimum koşullar % 30 asetonitrilli ortamda 0,1M  $H_2SO_4$  tamponu içeren elektrolit çözeltisinde diferansiyel puls sıyırma voltametrisi kullanılarak elde edilmiştir. Çizelge 3.39'da fulvestrant'ın serum derişimleri ve AdSDPV için +0,98V'da karşılık gelen pik akımı değerleri verilmiştir. Bu değerlere göre  $1 \times 10^{-6}$ –  $4 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında derişim-pik akımı arasında  $r=0.998$  korelasyon katsayısı ile AdSDPV için  $i(\mu A) = 5,77 \times 10^4 C(M) - 0,112$  eşitlikliğine uyan doğrusal ilişki bulunmaktadır (Şekil 3.49).

Bu sonuçlara dayanarak, BDEE elektrot ile AdSDPV kullanılarak fulvestrant'ın serumdan miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.



**Şekil 3.48.** 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti içerisinde fulvestrant'ın bazı serum derişimlerdeki AdSDPV eğrileri (1) : destek ; (2)  $1 \times 10^{-5}$  M ; (3)  $2 \times 10^{-5}$  M ; (4)  $4 \times 10^{-5}$  M



**Şekil 3.49.**  $1 \times 10^{-6}$  –  $4 \times 10^{-5}$  M serum derişim aralığında fulvestrant'ın 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti içerisinde (%30 asetonitrilli ortam) AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği

**Çizelge 3.39.** Fulvestrant'ın 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti içerisinde (%30 asetonitrilli ortam) elde edilen serum derişim – pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları

| Derişim (M)        | Pik Akımı (μA) |
|--------------------|----------------|
| $1 \times 10^{-6}$ | 0,012          |
| $2 \times 10^{-6}$ | 0,041          |
| $4 \times 10^{-6}$ | 0,135          |
| $6 \times 10^{-6}$ | 0,202          |
| $8 \times 10^{-6}$ | 0,280          |
| $1 \times 10^{-5}$ | 0,437          |
| $2 \times 10^{-5}$ | 1,028          |
| $4 \times 10^{-5}$ | 2,227          |

Çizelge 3.39'daki AdSDPV tekniğı ile elde edilen verileri kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.40 ve Çizelge 3.41' de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.40.** 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti AdSDPV ile elde edilen serum kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri

|                                                      | AdSDPV                                |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Ölçüm Yapılan Potansiyel (V)                         | 0,98                                  |
| Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)      | 0,95                                  |
| Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) | 1,28                                  |
| Doğrusallık aralığı (M)                              | $1 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-5}$ |
| Eğim ( $\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$ )           | $5,77 \times 10^4$                    |
| Kesişim ( $\mu\text{A}$ )                            | -0,112                                |
| Korelasyon Katsayısı                                 | 0,998                                 |
| Eğimin standart hatası                               | $1,40 \times 10^3$                    |
| Kesişimin standart hatası                            | $2,33 \times 10^{-7}$                 |
| Yakalama Sınırı (M)*                                 | $2,33 \times 10^{-7}$                 |
| Tayin alt Sınırı (M)*                                | $7,76 \times 10^{-7}$                 |
| Akımın gün içi tekraredilebilirliği (%BSS)           | 0,67                                  |
| Akımın günler arası tekraredilebilirliği (%BSS)      | 0,71                                  |

(\*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları  $4 \times 10^{-7}$  M derişiminin 3 değerinden elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar pik potansiyeli için tekrar edilebilirliğin çok iyi olduğunu kanıtlamaktadır.

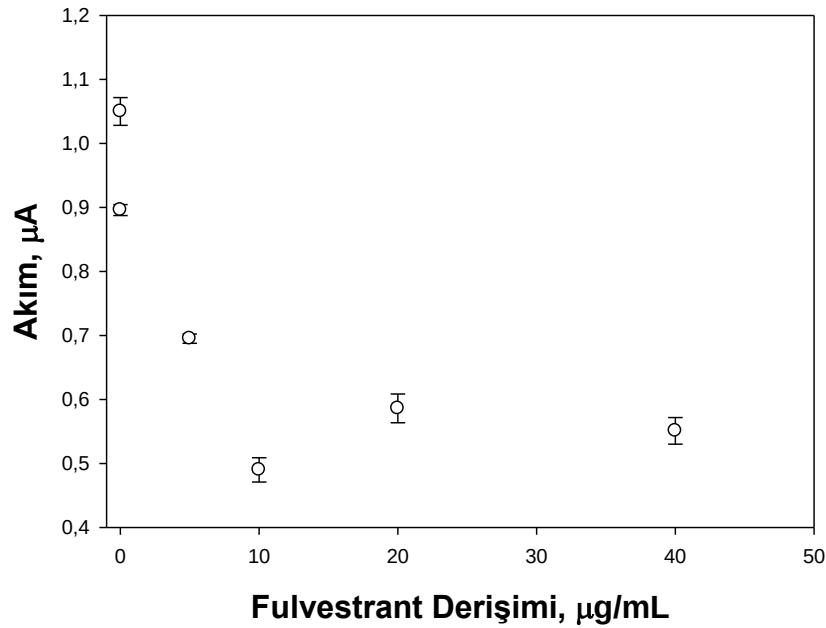
**Çizelge 3.41.** AdSDPV ile 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti içerisinde insan serumunda elde edilen geri kazanım sonuçları

| Yöntem | Seruma İlave Edilen Madde Miktarı (M) | Bulunan Madde Miktarı (M) | Ortalama % Geri Kazanım | % BSS | %Bias |
|--------|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------|-------|
| AdSDPV | 4,00x10 <sup>-5</sup> M               | 4,01 x10 <sup>-5</sup> M  | 100,34                  | 0,85  | -0,34 |

### 3.4.2. Fulvestrant ile dsDNA Etkileşiminin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği İle Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular

#### 3.4.2.1. dsDNA İmmobilize Edilen KGE Yüzeyinde Farklı Derişimlerde Fulvestrant Etkileşiminin Guanin Yükseltgenme Sinyalindeki Değişim Üzerinden İncelenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.5.3.4.5.1. de anlatılan yol izlenerek, KGE yüzeyine immobilize edilen dsDNA'nın 5,00–40,00  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında değişen fulvestrant ile etkileşiminden elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklüklerini gösteren grafik Şekil 3.50' deki gibidir.

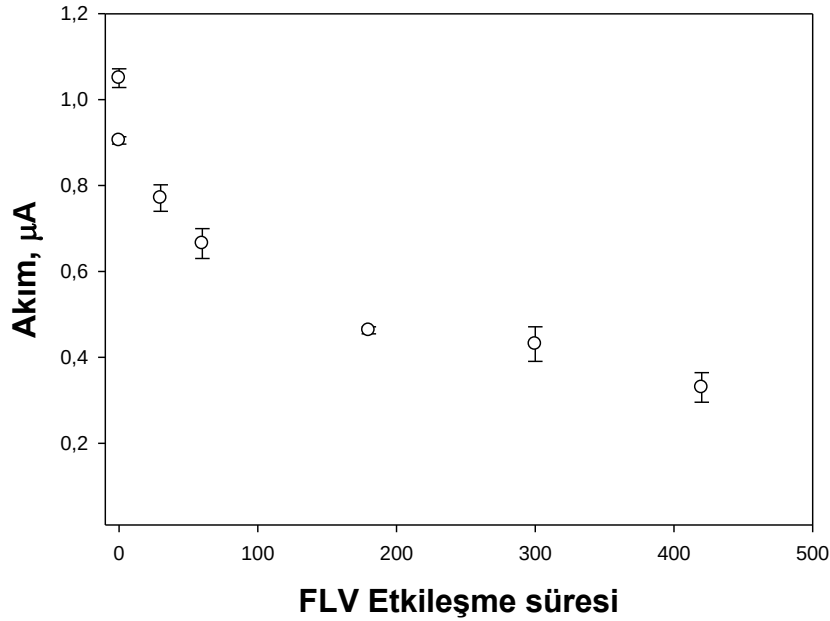


**Şekil 3.50.** Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; sırasıyla 2,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile fulvestrant etkileşmeden önce; etanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 5,00; 10,00; 20,00; 40,00 $\mu\text{g/mL}$  derişimlerde fulvestrant ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri.

Şekil 3.50’ de elde edilen verilere göre, FLV’ nin derişimi arttırıldıkça guanin yükseltgenme sinyalinde düşüş olduğu gözlenmiştir. Ancak bu düşüş 10,00  $\mu\text{g/mL}$  FLV’ den sonra sabitlendi. Grafiğe göre uygun FLV derişimi 10,00  $\mu\text{g/mL}$ ’ dir.

#### 3.4.2.2. Fulvestrant Etkileşim Süresindeki Değişimin Guanin Yükseltgenme Sinyali Üzerine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.5.3.4.5.2. de anlatılan yol izlenerek, 3.4.2.1.’ den elde edilen veriler doğrultusunda 10,00  $\mu\text{g/mL}$  Fulvestrant’ın 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile etkileşiminde sürenin etkisini inceleyebilmek için etkileşim süresi 30–420 sn arasında arttırılmış ve sonuçlardan Şekil 3.51’deki grafik çizdirilmiştir.



**Şekil 3.30.** Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikler; 2,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile 10,00 $\mu\text{g/mL}$  fulvestrant’ın farklı sürelerde (sırasıyla 2,00 $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile fulvestrant etkileşmeden önce; etanol/asetat tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; 30; 60; 180; 300; 420 sn) etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.



Guanin yükseltgenme sinyalinde etkileşim süresi arttırıldıkça bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün 180 saniyeden sonra sabitlenmesi nedeniyle optimum etkileşim zamanı olarak 180 sn saptanmıştır.

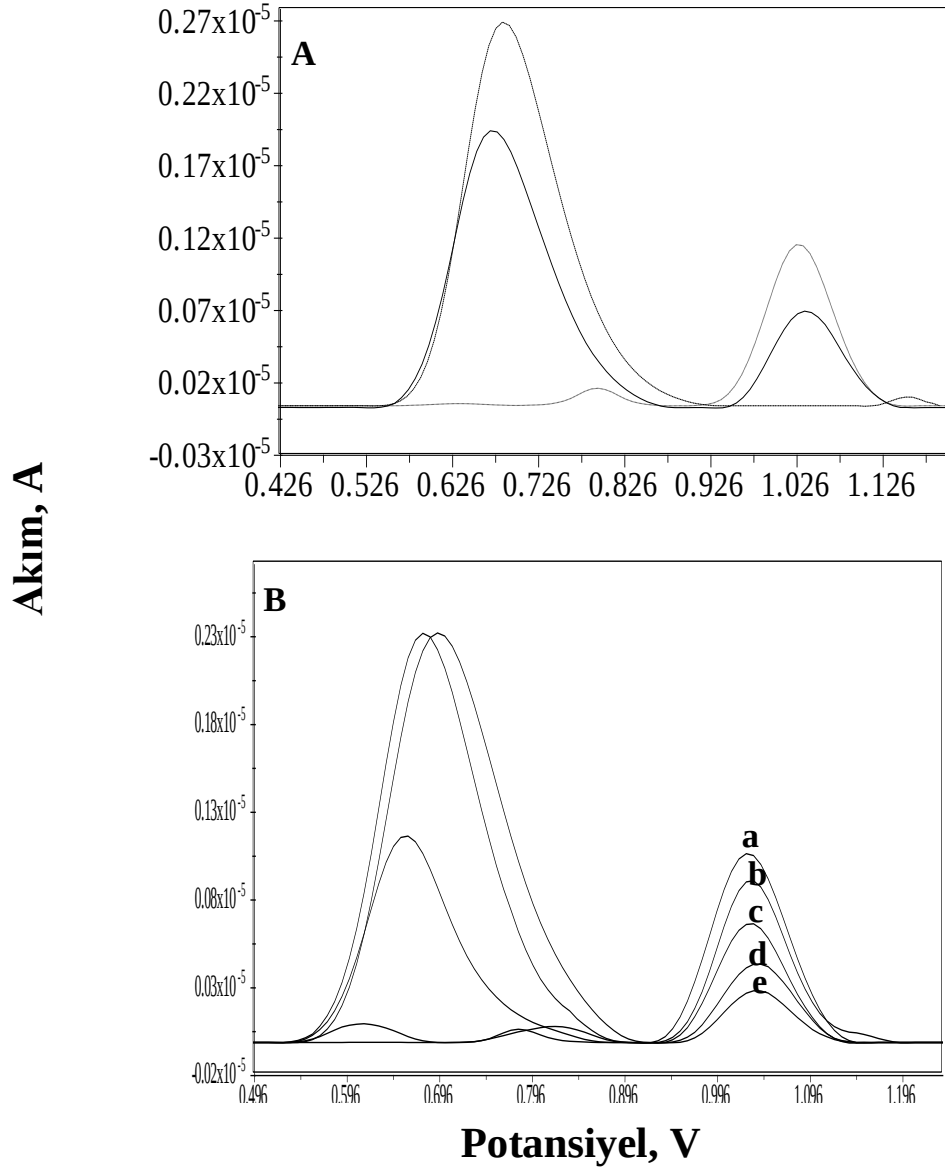
### 3.4.2.3. Optimize Edilen dsDNA-Fulvestrant Çalışmasının Voltametrik

#### Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları

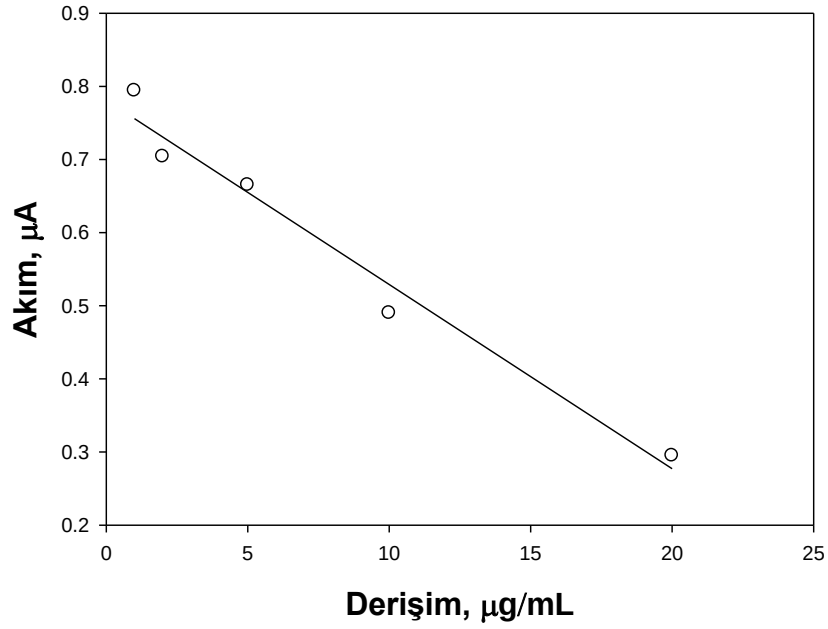
Fulvestrant-dsDNA etkileşiminin voltametrik bir çalışmasına literatürlerde rastlanmadı. Fulvestrant ve guanin pik akımları etkileşimden önce ve sonra Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV) tekniğiyle ölçülmüştür (Şekil 3.52a). Öncelikle dsDNA'daki guanin pik akımını en çok düşüren fulvestrant derişimi 10,00µg/mL ve bu derişimde guanin sinyalini en çok düşüren karıştırma süresi de 180sn olarak seçilmiş ve şartlar optimize edilmiştir.

Şekil 3.51'den de anlaşılabileceği gibi bu sonuçlarla şartlar optimize edilmiş oldu. Buna göre 180sn bekletilerek akımın en küçük olduğu şartlar sağlanmış oldu. Şartlar optimize edildikten sonra elektrot üzerinde birikmiş olan maddeler AdSDPV tekniği kullanılarak tayin edildi. pH 4,80 asetat tamponu çözeltisi içinde 1,00 – 20,00 µg/mL derişim aralığında elde edilen AdSDPV eğrilerinden bazı seçilmiş derişimler Şekil 3.52b'de verilmiştir.

Fulvestrant'ın derişiminin guanin pik akımı üzerine etkisi için optimum koşullar pH 4,80 asetat tamponu içeren çözeltisinde diferansiyel puls sıyrma voltametrisi kullanılarak elde edilmiştir. Çizelge 3.42'de fulvestrant derişimleri (C) ve AdSDPV için +1,03V'da karşılık gelen guanin pik akımı değerleri ( $i_p$ ) verilmiştir. Bu değerlere göre 1,00 – 20,00 µg/mL derişim aralığında derişim-pik akımı arasında  $r = -0,987$  korelasyon katsayısı ile AdSDPV için  $i_p(\mu A) = -0,0252 C(\mu g/mL) + 0,7811$  eşitliklerine uyan doğrusal ilişki bulunmaktadır (AdSDPV için Şekil 3.53). Bu sonuçlara dayanarak, kalem grafit elektrot ile AdSDPV teknikleri kullanılarak fulvestrant'ın ticari preparatından miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.



**Şekil 3.52.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde (A) KGE yüzeyinde 2,00 µg/mL ds-DNA ile 10,0 µg/mL fulvestrant etkileşiminine ait grafikler; etkileşimden önce guanin sinyali (---); dsDNA ile etkileşiminden sonra fulvestrant sinyali (—) ve etkileşimden önce fulvestrant sinyali (---) (B) 2,00 µg/mL dsDNA'nın Guanin yükseltgenme sinyaline ait grafikleri; a) 2,00 µg/mL dsDNA ile fulvestrant etkileşmeden önce; b) Etanol/asetat (30/70) tamponu karışımı ile etkileştikten sonra; c) 2,00 µg/mL; d) 10,00 e) 20,00 µg/mL derişimlerde fulvestrant ile etkileştikten sonra elde edilen sinyallerin ortalama büyüklükleri.



**Şekil 3.53.** 1,00 – 20,00 µg/mL derişim aralığında pH 4,80 asetat tamponu içerisinde fulvestrant'ın AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafiği

**Çizelge 3.42.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde fulvestrant için elde edilen derişim-pik akımı ilişkisine ait analiz sonuçları

|                                                      | Derişim (µg/mL) | Akım (µA) |
|------------------------------------------------------|-----------------|-----------|
| Tek başına guanin sinyali                            | 0               | 1,050     |
| 'etanol + asetat tamponu'<br>ile etkileştikten sonra | 0               | 0,905     |
| fulvestrant ile etkileştikten<br>sonra               | 1,00            | 0,794     |
|                                                      | 2,00            | 0,704     |
|                                                      | 5,00            | 0,665     |
|                                                      | 10,00           | 0,490     |
|                                                      | 20,00           | 0,300     |

Çizelge 3.42'deki DPV tekniği ile elde edilen veriler kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.43'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.43.** pH 4,80 asetat tamponu içerisinde fulvestrant-dsDNA etkileşimi için guanin üzerinden AdSDPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

|                                                | AdSDPV                |
|------------------------------------------------|-----------------------|
| Ölçüm Yapılan Potansiyel (V)                   | 1,03                  |
| Doğrusallık aralığı ( $\mu\text{g/mL}$ )       | 1,00 – 20,00          |
| Eğim ( $\mu\text{A.M}^{-1}$ )                  | –0,0252               |
| Kesişim ( $\mu\text{A}$ )                      | 0,7811                |
| Korelasyon Katsayısı                           | –0,987                |
| Eğimin standart hatası                         | $2,84 \times 10^{-3}$ |
| Kesişimin standart hatası                      | $2,45 \times 10^{-2}$ |
| Yakalama Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )*          | 0,41                  |
| Tayin alt Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )*         | 1,39                  |
| Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)      | 0,81                  |
| Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) | 1,85                  |

(\*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları  $1,00 \mu\text{g/mL}$  derişiminin 3 değerinden elde edilmiştir.

Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde oldukça iyi sonuçlar elde edilebilmesi, fulvestrant içeren piyasa preparatlarından miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

#### **3.4.2.4. Fulvestrant İçin Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları**

Fulvestrant-dsDNA etkileşiminin tayini için geliştirilen voltametrik teknik piyasa preparatlarına uygulanmıştır.

##### **3.4.2.4.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması**

Fulvestrant içeren enjeksiyonluk preparatlarda miktar tayini yapabilmek için numuneler, 2.5.3.4.2 bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Etkileşim sonrası elde edilen guanin eğrilerinden okunan pik akımı değerleri ilgili kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak enjeksiyonluk çözeltilerin içerdği etken madde miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.44' de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.44.** Fulvestrant içeren (250 mg/5mL) Faslodex® enjeksiyonluk preparatından pH 4,80 Asetat tamponu içerisinde kalem grafit elektrotla, geliştirilen DPV yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları

|           | Enjeksiyon Çözeltisinde Bulunan Madde<br>Miktarı (250 mg/5mL) |
|-----------|---------------------------------------------------------------|
| Numune No | AdSDPV                                                        |
| 1         | 268,95                                                        |
| 2         | 251,09                                                        |
| 3         | 239,19                                                        |
| 4         | 254,07                                                        |
| 5         | 249,11                                                        |
|           |                                                               |
| $X_{ort}$ | 252,48                                                        |
| SS        | 10,77                                                         |
| %BSS      | 4,27                                                          |
| %Bias     | -0,99                                                         |

Enjeksiyonluk preparat içerisinde yer alan katkı maddelerinin tayin yöntemlerimizi etkileyip etkilemediğini anlamak için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 2.5.3.4.3’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan saf etken madde içeren enjeksiyonluk numunelerin üzerine, yine bilinen miktarda etken madde ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % Geri kazanım sonuçları Çizelge 3.45’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.45.** Fulvestrant içeren enjeksiyonluk preparatlardan pH 4,80 asetat tamponu içerisinde elde edilen % geri kazanım sonuçları.

| Yöntem | İlave Edilen Madde<br>Miktarı (mg) | Bulunan Madde<br>Miktarı (mg) | % Geri<br>Kazanım        |
|--------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| DPV    | 10,00                              | 9,55                          | 95,47                    |
|        | 10,00                              | 8,50                          | 84,94                    |
|        | 10,00                              | 9,63                          | 96,25                    |
|        | 10,00                              | 9,84                          | 98,43                    |
|        | 10,00                              | 9,78                          | 97,84                    |
|        |                                    |                               | X <sub>ort</sub> : 94,58 |
|        |                                    |                               | SS : 5,52                |
|        |                                    |                               | % BSS : 5,84             |
|        |                                    |                               | %Bias: 5,41              |
|        |                                    |                               |                          |

### 3.3.3.5. İki Yöntemin Analiz Çalışmalarının Karşılaştırılması

Boş BDE elektrotta ve dsDNA tutturulmuş KG elektrotta Faslodex enjeksiyonluk preparatından elde edilen analiz bulguları karşılaştırıldığı zaman, bulunan t ve F değerleri tablo değeriyle karşılaştırıldığında yöntemler arasındaki farkın önemsiz olduğu görülmektedir.

**Çizelge 3.46.** Boş BDEE ve dsDNA modifiye kalem elektrot üzerinde etkileşimde Faslodex® enjeksiyonluk çözeltisinden elde edilen analiz bulgularının karşılaştırmalı sonuçları

|                                                     | Boş BDEE                   | dsDNA modifiye KG elektrot |
|-----------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Enjeksiyonluk preparatta bulunan madde miktarı (mg) | 250,00                     | 250,00                     |
| Bulunan madde miktarı (mg)                          | 250,33                     | 252,48                     |
| %BSS                                                | 0,67                       | 4,26                       |
| Hesaplanan t değeri                                 | $t_{\text{teorik}} = 2,31$ | 0,67                       |
| Hesaplanan F değeri                                 | $F_{\text{teorik}} = 2,60$ | 0,003                      |

(p: 0,005)



#### 4. TARTIŞMA

Antiviral ilaçlardan efavirenz, antikanser ilaçlardan löprolid ve fulvestrant ile tez kapsamında yürütülen araştırmalarda voltametrik teknikler kullanılarak, bu ilaçların miktar tayininde kullanılabilecek yeni ve duyarlı yöntemler geliştirilmiştir. Ayrıca, moleküllerin yükseltgenmesine ve çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşmesine ait mekanizmaya ışık tutması düşüncesiyle dönüşümlü voltametri (DV) ve Adsorptif Sıyırma Diferansiyel Puls Voltametrisi (AdSDPV) teknikleri kullanılmıştır. Literatür araştırması sırasında üç ilacın da detaylı elektrokimyasal davranışlarına ait herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Efavirenz'in elektrokimyasal tepkimeleri kalem grafit elektrot kullanılarak incelenmiştir. Kalem grafit elektrotla değişik pH değerlerinde yapılan çalışmalar, efavirenz'in yüksek potansiyellerde ve bütün pH değerlerinde tersinmez olarak yükseltgendiğini göstermektedir. Efavirenz'e ait pik AdSDPV tekniğiyle kalem grafit elektrot kullanılarak kaydedilmiştir. Pik akımları ve potansiyelleri %20 metanol içeren pH 1,93 – 10,00 aralığında BR tamponunda tayin edilmiştir.

DPV eğrilerinin pik akımı – pH eğrileri incelendiği zaman en yüksek pik akımı değerine pH 3,00 BR tampon çözeltisi ile (% 20 metanollü ortam) ulaşıldığı görülmektedir.

Olayın özelliğini anlayabilmek için seçilmiş ortamda yapılan hız taraması deneylerini değerlendirilmiş ve  $i_p - v^{1/2}$ ,  $i_p - v$  ve  $\log i_p - \log v$  ilişkileri incelenmiştir. DV tekniği ile, efavirenz'in pH 3,00 BR tamponunda (% 20 metanol oranı) 5 - 1000 mVs<sup>-1</sup> hız tarama aralığında, değişik tarama aralıklarda, incelemeler yapılmıştır.

Pozitif potansiyelde elde edilen pik adsorpsiyon kontrollü bulunmuştur. pH 3,00 BRT'de 30,00µg/mL derişimdeki, 5–100 mVs<sup>-1</sup> aralığında yapılan hız taraması sonucunda; pik akımı (i) ve v arasında doğrusal bir ilişki saptandı.

$$i_p (\mu A) = 0,125v (mVs^{-1}) + 1,06 \quad (r: 0,994 ; n: 6)$$

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Aynı hız aralığındaki  $\log v - \log i$  grafiği ve denklemi incelenince (Şekil 3.12) bulunan eğim değerinin 0,81 olup adsorpsiyon kontrollü teorik değer olan 1,00'e yakın bulunması reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Laviron ve ark., 1980 ; Greef ve ark., 1990).

Elde edilen doğru denklemi;

$$\log i_p (\mu A) = 0,81 \log v (mVs^{-1}) - 0,49 \quad (r: 0,997 ; n: 6)$$

5-100  $mVs^{-1}$  aralığında yapılan hız taramasında pik akımı ve potansiyelinin değerlendirilmesi sonucunda hız artmasıyla pik potansiyeli 80mV pozitif kayması katodik yönde bir pik ya da dalga olmaması ile birlikte olayın tersinmez olduğunu göstermektedir.

pH taraması sırasında yükseltgenme pik potansiyeli pH arttıkça daha düşük pozitif potansiyele kaymış ve pH 2,00–10,00 değerleri arasında doğrusallık elde edilmiştir.

$$E_p(mV) = 1584 - 65,25pH \quad r = 0.996 \quad (pH:2,0 \text{ ve } 10,0 \text{ arası})$$

pH 10,00'dan sonra elde edilen eğrilerde herhangi bir dalga veya pik elde edilememiştir. Bizim çalışmalarımızda cevap elde ettiğimiz bu son pH değeri literatürdeki 10,20 olan pKa [<http://www.cal-tox.org>] değerine yakındır.

pH taramasının pik akımı üzerine etkisi de incelenmiştir,  $i_p$  - pH grafiğinden de anlaşıldığı gibi maksimum pik akımı asit ortamda özellikle de pH 3,00 BRT'de görülmüştür (Şekil 3.13). Elde edilen verilerden bu pikin adsorptif karakterde olduğu bulunmuştur. Bu yüzden analitik ölçümler için duyarlılığı daha fazla olan adsorptif sıyırma tekniği kullanarak düzgün, keskin ve en iyi pik şekli elde edilen pH 3,00 BRT ile deneylere devam edilmiştir.

Efavirenz'in hem asidik hem bazik ortamda elektroaktif olduğu görülmektedir. Yükseltgenme mekanizması hakkında literatür bulunamamıştır.

Yapılan 3 devirli eğrilerde elektrot cevabı ilk eğride yüksek çıkmakta, daha sonraki devirlerde azalmaktadır. Tahminen 1. devirde yüzeyde tutulmuş olan maddeler ve

difüzyonla elektrot yüzeyine gelen moleküller reaksiyona girmektedir. Ancak 2. devirde yeni bir adsorpsiyon dengesinin kurulması için yeterli zaman olmadığından elektrot yüzeyine difüzyonla ulaşan moleküller genelde reaksiyona girmektedir.

Efavirenz'in tayini için duyarlı ve seçici voltametrik yöntem geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda daha keskin ve iyi belirlenmiş piklerin elde edilmesinden dolayı AdSDPV tekniği seçilmiştir. Analitik açıdan en iyi efavirenz pikleri ve tekrar edilebilirlik sonuçları elde edildiği için pH 3,00 BR tamponu (%20 metanollü) çalışma ortamı olarak seçilmiştir. AdSDPV için diğer kullanılan şartlar (sıyırma voltametrisi için; biriktirme potansiyeli 700 mV, biriktirme süresi 300s olarak optimize edilmiştir), bulgular kısmında detaylı olarak verilmiştir. Bu koşullarda yapılan voltametrik analiz çalışmaları kalem grafit elektrodun efavirenz'in sıyırma voltametrik yöntemlerle analizine uygun elektrot olduğunu göstermiştir. pH 3,00 BRT (%20 metanol) içerisinde efavirenz için 0,018 – 2,56 µg/mL derişim aralığında doğrusallık bulunmuştur (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5). Yakalama sınırı 0,0042 µg/mL bulunmuştur.

Voltametrik incelemenin saf maddeler üzerinde yapılmasından sonra geliştirilen teknikler efavirenz'in piyasa preparatı olan Stocrin® film kaplı tabletlere uygulanmıştır. Tabletler toz haline getirilip daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi çözeltileri hazırlandıktan sonra herhangi bir ayırma veya süzme işlemine gerek kalmadan voltamogramları alınmıştır. Toz edilmiş ilaç numunesinden bilinen miktarda efavirenz içeren numunelerin üzerine, bilinen miktarda saf madde ilave edilerek geri kazanım çalışmaları için numuneler hazırlanmıştır. Bu numunelerden alınan voltamogramlardan ve elde edilen % geri kazanım değerlerinin yüksek olmasından ilaç katkı maddelerinin yöntemlerimizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Efavirenz'in kalem elektrotta elektrokimyasal davranışı aydınlatıldıktan sonra dsDNA tutturulmuş kalem elektrot ile etkileşim mekanizmalarının aydınlatılmasına çalışılmıştır. Balık spermi çift sarmal DNA ile efavirenz'in etkileşimi, 0,02 M NaCl içeren asetat tamponu (pH 4,8) kullanılarak kalem elektrot yüzeyinde adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametri tekniği ile incelenmiştir.

Madde ve DNA arasındaki etkileşim, DNA bazlarından guanin yükseltgenme sinyalindeki farklılanma üzerinden incelenmiştir. DNA çalışmaları için öncelikle tekraredilebilir guanin sinyali elde edilen çift sarmal DNA derişimi belirlenmiştir. Şekil 3.2'ye göre optimum çalışılan dsDNA derişimi 2,00 µg/mL ve Şekil 3.4'e göre optimum karıştırma süresi 240 sn'dir. Guanin akımının gün içi ve günler arası tekraredilebilirliği sırasıyla % 0,98 ve % 1,58'dir. Guanin ve efavirenz pik akımları etkileşimden önce ve sonra Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV) tekniğiyle ölçülmüştür. (Şekil 3.19a) Etkileşimden sonra guanin sinyalinde doğrusal bir azalma görülmüştür (Şekil 3.19b). Efavirenz sinyalinde de etkileşim sonrası azalma saptanmıştır, fakat doğrusal değildir.

16,00 µg/mL derişimdeki efavirenz'in 2,00 µg/mL derişimdeki dsDNA ile etkileşimine dair diferansiyel puls ölçümlerinde, guanin yükseltgenme sinyaline ait gün içi ve günler arası bağıl standart sapması sırasıyla % 0,96 ve % 2,22'dir (n=3).

Optimum analitik çalışma performansının bulunabilmesi için çift sarmal DNA derişimi, biriktirme süresi ve DNA üzerindeki efavirenz derişiminin ve etkileşim süresinin etkileri gibi deneysel parametreler incelenmiştir.

DNA optimizasyonu için 0,20–10,00 µg/mL derişim aralığında çalışıldı. Optimum biriktirme süresini bulmak için 2,00 µg/mL DNA ile 30–300 sn aralığında çalışıldı ve biriktirme zamanı 240sn olarak belirlenmiştir. Yöntemin tablet dozaj formlarına da uygulanabilmesi için DNA'yla etkileşen efavirenz derişimi ve etkileşim zamanı optimize edilmiştir. Efavirenz 0,00–32,00 µg/mL derişim aralığında 120s etkileştirildi, guanin sinyalini en çok düşüren derişim 24,00 µg/mL'da olarak bulunmuştur. Bu derişimde 0–300 sn aralığında etkileşim süresi optimize edildi ve biriktirme zamanı 180sn olarak belirlenmiştir.

Guanin yükseltgenme pik akımı efavirenz ile etkileşmesinden sonra doğrusal olarak azaldı. pH 4,80 asetat tamponu (%20 metanol) içerisinde guanin sinyalindeki azalma efavirenz artan derişiminin (2,00–24,00 µg/mL aralığında) fonksiyonudur. (Çizelge 3.9). Yakalama sınırı 0,599 µg/mL bulunmuştur.

Voltametrik incelemenin saf maddeler üzerinde yapılmasından sonra geliştirilen teknikler efavirenz'in piyasa preparatı olan Stocrin® film kaplı tabletlere uygulanmıştır. % geri kazanım çalışmaları için numuneler hazırlanmıştır. Bu numunelerden alınan voltamogramlardan ve elde edilen % geri kazanım değerlerinin yüksek olmasından ilaç katkı maddelerinin yöntemlerimizi etkilemediği sonucuna varılmıştır. dsDNA modifiye edilen KGE ve boş KGE ile yapılan tablet çalışmalarından t ve F testi hesaplanmış, aralarındaki fark anlamsız bulunmuştur.

Efavirenz için geliştirilen her iki yöntemin de doğruluğu, duyarlılığı, uygulanabilirliği ve seçiciliğini gösterebilmek için yöntemlere gerekli tüm validasyon çalışmaları uygulanmış ve elde edilen sonuçlarla yöntemlerin tekrar edilebilirliği, duyarlılığı, doğruluğu, seçiciliği ve uygulanabilirliği gösterilmiştir (Çizelge 3.5; 3.6; 3.7; 3.9; 3.10; 3.11).

Tez kapsamında üzerine çalışılan ikinci maddemiz kanser ilacı löprolid'dir. Löprolid'in elektrokimyasal tepkimeleri kalem grafit elektrot kullanılarak incelenmiştir. Kalem grafit elektrotla değişik pH değerlerinde yapılan çalışmalar, löprolid'in yüksek potansiyel değerlerinde bütün pH değerlerinde tersinmez olarak yükseltgendiğini göstermektedir. Löprolid'e ait pik AdSDPV tekniğiyle kalem grafit elektrot kullanılarak kaydedilmiştir. Pik akımları ve potansiyelleri pH 2,00–12,00 aralığında BR tamponunda tayin edilmiştir.

DPV eğrilerinin pik akımı – pH eğrileri incelendiği zaman en yüksek pik akımı değerine pH 2,00 BR tampon çözeltisi ile ulaşıldığı görülmektedir.

Olayın özelliğini anlayabilmek için seçilmiş ortamda yapılan hız taraması deneylerini değerlendirmek için  $i_p - v^{1/2}$ ,  $i_p - v$  ve  $\log i_p - \log v$  ilişkileri incelenmiştir. DV tekniği ile, löprolid'in pH 2,00 BR tamponunda; 5–1000 mVs<sup>-1</sup> hız tarama aralığında, değişik tarama aralıklarda, incelemeler yapılmıştır. Pozitif potansiyeldeki pik adsorpsiyon kontrollü bulunmuştur. pH 2,00 BR tamponunda, 4,00µg/mL derişimdeki, 5–1000 mVs<sup>-1</sup> aralığında yapılan hız taraması sonucunda; pik akımı ve  $v$  arasında doğrusal bir ilişki saptandı.

$$i_p (\mu A) = 0,019v (mVs^{-1}) + 0,18 \quad (r: 0,999 ; n: 10)$$

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Aynı hız aralığındaki  $\log v - \log i$  grafiği (Şekil 3.24b) ve denklemi incelenince bulunan eğim değerinin 0,85 olup adsorpsiyon kontrollü teorik değer olan 1,00'e yakın bulunması reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Laviron ve ark., 1980 ; Greef ve ark., 1990).

Elde edilen doğru denklemi;

$$\log i_p (\mu A) = 0,85 \log v (mVs^{-1}) - 1,33 \quad (r: 0,997 ; n: 10)$$

5–1000  $mVs^{-1}$  aralığında yapılan hız taramasında pik akımı ve potansiyelinin değerlendirilmesi sonucunda hız artmasıyla pik potansiyeli 110mV pozitif kayması katodik yönde bir pik yada dalga olmaması ile birlikte olayın tersinmez olduğunu göstermektedir.

pH taraması sırasında yükseltgenme pik potansiyeli pH arttıkça daha düşük pozitif potansiyele kaymıştır, doğrusallık elde edilmiştir.

$$E_p(mV) = 1019,5 - 55,32pH \quad r = 0.999 \quad (pH:2,00 \text{ ve } 10,00 \text{ arası})$$

pH arttıkça pH 10,00'den sonra pik potansiyeli daha yavaş kaymaya başlamıştır. Bu nokta literatürdeki 9,60 olan pKa [<http://www.sanofi-aventis.ca/products/en/eligard.pdf>] değerine yakındır.

pH taramasının pik akımı üzerine etkisi de incelenmiştir,  $i_p - pH$  grafiğinden de anlaşıldığı gibi maksimum pik akımı asit ortamda özellikle de pH 2,00 BRT'de görülmüştür. Elde edilen verilerden bu pikin adsorptif karakterde olduğu bulunmuştur. Bu yüzden analitik ölçümler için duyarlılığı daha fazla olan adsorptif sıyırma tekniği kullanarak düzgün, keskin ve en iyi pik şekli elde edilen pH 2,00 BRT ile deneylere devam edilmiştir.

Löprolid'in elektrokimyasal mekanizmasına bakıldığı zaman, hem asidik hem bazik ortamda elektroaktif olup yapısındaki indol ve fenol gruplarından yükseltgendiği düşünülmektedir (Altun ve ark., 2009; Demircigil ve ark., 2002). Löprolid, indol halkasındaki azot atomundan (Yılmaz ve ark., 2001; Sagar ve ark., 1992; Humphries ve

Dryhurst 1987; Özkan ve Uslu, 2002) ve fenol halkasındaki hidroksil grubundan yükseltgenmektedir (Demircigil ve ark., 2002). Model ilaç olarak karşılaştırılan anisol ve 4-metoksi fenol'ün ikisi birden kinon yapısına dönmektedir (Grimshow, 2000; Demircigil ve ark., 2002). Yapılan çalışmalarla kıyaslandığı zaman, löprolid bütün destek elektroliti çözeltileri içerisinde 2 elektronlu bir oksidasyon ve hızlı kimyasal reaksiyonlarla benzokinona dönüşmektedir.

Yapılan 3 devirli eğrilerde elektrot cevabı ilk eğride yüksek çıkmakta, daha sonraki devirlerde azalmaktadır. Tahminen 1. devirde yüzeyde tutulmuş olan maddeler ve difüzyonla elektrot yüzeyine gelen moleküller reaksiyona girmektedir. Ancak 2. devirde yeni bir adsorpsiyon dengesinin kurulması için yeterli zaman olmadığından elektrot yüzeyine difüzyonla ulaşan moleküller genelde reaksiyona girmektedir.

Löprolid'in tayini için duyarlı ve seçici voltametrik yöntem geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda daha keskin ve iyi belirlenmiş piklerin elde edilmesinden dolayı AdSDPV tekniği seçilmiştir. Analitik açıdan en iyi löprolid pikleri ve tekrar edilebilirlik sonuçları elde edildiği için pH 2,00 BR tamponu çalışma ortamı olarak seçilmiştir. AdSDPV için diğer kullanılan şartlar (sıyırma voltametri için; biriktirme potansiyeli 700 mV, biriktirme süresi 180s olarak optimize edilmiştir), bulgular kısmında verilmiştir. Bu koşullarda yapılan voltametrik analiz çalışmaları kalem grafit elektrodun löprolid'in sıyırma voltametrik yöntemlerle analizine uygun elektrot olduğunu göstermiştir. pH 2,00 BRT içerisinde löprolid için 0,005–0,20 µg/mL derişim aralığında doğrusallık bulunmuştur (Çizelge 3.16). Yakalama sınırı  $1,36 \times 10^{-3}$  µg/mL olarak bulunmuştur.

Voltametrik incelemenin saf maddeler üzerinde yapılmasından sonra geliştirilen teknikler löprolid'in piyasa preparatı olan Lucrin® enjeksiyonluk çözeltilerine uygulanmıştır. Enjeksiyonluk çözelti numunesinden belirli miktarda löprolid içeren numunelerin üzerine, bilinen miktarda saf madde ilave edilerek geri kazanım çalışmaları için numuneler hazırlanmıştır. Bu numunelerden alınan voltamogramlardan ve elde edilen % geri kazanım değerlerinin yüksek olmasından ilaç katkı maddelerinin yöntemlerimizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Löprolid'in kalem elektrotta elektrokimyasal davranışı aydınlatıldıktan sonra dsDNA tutturulmuş kalem elektrot ile etkileşim mekanizmalarının aydınlatılmasına çalışılmıştır.

Löprolid'in iki ayrı yöntemle etkileşim mekanizması incelenmiştir. Bunlardan ilki; dsDNA tutturulmuş kalem elektrotla löprolid incelenmesi, ikincisi; çözelti ortamında dsDNA ile löprolid'in incelenmesidir. Balık spermi çift sarmal DNA ile löprolid'in etkileşimi, 0,02 M NaCl içeren asetat tamponu (pH 4,80) kullanılarak iki yöntemle de, adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametri tekniği ile incelenmiştir.

Her iki yöntemle de madde ve dsDNA arasındaki etkileşim, dsDNA bazlarından guanin yükseltgenme sinyalindeki farklılanma üzerinden incelenmiştir. Her iki yöntemle de öncelikle tekraredilebilir guanin sinyali elde edilen dsDNA derişimi belirlenmiştir. Daha önce açıklandığı gibi elektrotta etkileşimde çalışılan optimum dsDNA derişimi 2,00  $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Elektrotta etkileşim için guanin akımının gün içi ve günler arası tekraredilebilirliği sırasıyla %1,01 ve %1,06'dır. Çözelti ortamında bulunan optimum dsDNA derişimi 5,00  $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Çözelti ortamında etkileşim için guanin akımının gün içi ve günler arası tekraredilebilirliği sırasıyla %1,39 ve %2,39'dır. Her iki yöntem için de guanin ve löprolid pik akımları etkileşimden önce ve sonra diferansiyel puls voltametrik (DPV) teknikle ölçülmüştür. (Şekil 3.31a ve Şekil 3.34a)

Her iki teknik için de optimum analitik çalışma performansının bulunabilmesi için çift sarmal DNA derişimi, biriktirme süresi ve dsDNA üzerindeki löprolid derişiminin ve etkileşim süresinin etkileri gibi deneysel parametreler incelenmiştir.

Elektrotta etkileşimde guanin sinyali için şartlar optimize edilmiştir. Aktive edilen kalem elektrot 2,00  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA ile 0,5V'da 240 sn karıştırılarak tutturulmuştur. Yöntemin farmasötik dozaj formlarına da uygulanabilmesi için dsDNA'yla etkileşen löprolid derişimi ve etkileşim zamanı optimize edilmiştir. Löprolid 0,00–6,00  $\mu\text{g/mL}$  derişim aralığında 60sn etkileştirilmiş, guanin sinyalini en çok düşüren derişim 6,00  $\mu\text{g/mL}$ 'de olarak bulunmuştur (Şekil 3.29). 2,0  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA tutturulmuş elektrotta 6,00  $\mu\text{g/mL}$ 'de derişimde löprolid'in, 0–360 sn aralığında etkileşim süresi optimize edildi ve 90sn olarak belirlenmiştir (Şekil 3.30).



Çözelti ortamında etkileşim için de öncelikle guanin sinyali için şartlar optimize edilmiştir. Aktive edilen kalem grafit elektrot yüzeyine, 0,20–10,00 µg/mL aralığında değişen derişimde dsDNA çözeltisi, 0V’da 120sn karıştırılarak dış ortamda tutturuldu. Optimum derişim 5,00 µg/mL belirlendi (Şekil 3.5). 5,0 0µg/mL dsDNA kullanılarak karıştırma süresi 30–240 sn aralığında değiştirilerek optimum karıştırma süresi 120 sn olarak bulunmuştur (Şekil 3.6). Yöntemin farmasötik dozaj formlarına da uygulanabilmesi için dsDNA’yla etkileşen löprolid derişimi optimize edilmiştir. Dış ortamda hazırlanmış olan 5,00 µg/mL dsDNA çözeltisine löprolid 0,20–10,00 µg/mL değişen derişim aralığında eklenmiş ve 0V 120 sn karıştırılarak elektroda tutturulmuştur (Şekil 3.33). löprolid’in derişimi arttırıldıkça guanin yükseltgenme sinyalinde düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş löprolid’in 6,00 µg/mL derişiminden sonra sabitlendi.

Her iki yöntemle de löprolid ile etkileşimden sonra guanin yükseltgenme pik akımında doğrusal bir azalma görülmüştür. pH 4,80 asetat tamponu içerisinde guanin sinyalindeki azalma; elektrotta etkileşimde löprolid’in 0,20–6,00 µg/mL ve çözelti ortamında löprolid’in 0,20–1,00 µg/mL derişim aralıklarında gözlenmiştir. (Çizelge 3.20 ve Çizelge 3.23). Yakalama sınırı elektrotta ve çözelti ortamında sırasıyla 0,06 µg/mL ve 0,04 µg/mL olarak bulunmuştur.

Elektrotta etkileşimde; 4,00 µg/mL derişimdeki löprolid’in 2,00 µg/mL derişimdeki elektroda tutturulmuş dsDNA ile etkileşimine ait diferansiyel puls ölçümlerinde, guanin yükseltgenme sinyaline ait gün içi ve günler arası bağıl standart sapması sırasıyla % 1,75 ve % 3,23’dir (n=3).

Çözelti ortamında etkileşimde; 0,80 µg/mL derişimdeki löprolid’in 5,00 µg/mL derişimdeki dsDNA ile etkileşimine dair diferansiyel puls ölçümlerinde, guanin yükseltgenme sinyaline ait gün içi ve günler arası bağıl standart sapması sırasıyla % 1,84 ve % 2,52’dir (n=3).

Madde-DNA etkileşiminin saf maddeler üzerinde yapılmasından sonra geliştirilen her iki teknik de löprolid’in piyasa preparatı olan Lucrin® enjeksiyonluk çözeltisine uygulanmıştır. Bu numunelerden alınan voltamogramlardan ilaç katkı maddelerinin yöntemlerimizi etkilemediği sonucuna varılmıştır. Boş KGE, dsDNA ile modifiye edilen

KGE ve çözelti ortamında löprolid-dsDNA etkileşim için yapılan enjeksiyonluk çözelti çalışmalarından t ve F testi değerleri hesaplanmış, teorik çizelge değerleriyle karşılaştırılmıştır. Üç teknik arasında enjeksiyonluk preparata uygulanması yönünden aradaki fark anlamsız bulunmuştur.

Löprolid için geliştirilen her üç yöntemin de doğruluğu, duyarlılığı, uygulanabilirliği, seçiciliğini gösterebilmek için yöntemlerin tüm validasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlarla yöntemlerin tekrar edilebilirliği, duyarlılığı, doğruluğu, seçiciliği ve uygulanabilirliği gösterilmiştir (Çizelge 3.17 ;3.18 ;3.19 ;3.21 ;3.22 ;3.24 ve 3.25).

Tez kapsamında çalışılan üçüncü maddemiz kanser ilacı fulvestrant'tır. İlaç analizlerinde kromatografik ve optik yöntemlere alternatif yöntem olarak nitelendirilen voltametrik teknikler kullanılarak, fulvestrant'ın miktar tayininde kullanılabilecek yeni ve duyarlı yöntemler geliştirilmiş, molekülün yükseltgenmesine ait mekanizmaya ışık tutması düşüncesiyle bor ile dope edilmiş elmas (BDEE) elektrotla dönüşümlü voltametri (DV) ve AdSDPV teknikleri kullanılmıştır.

Fulvestrant elektrokimyasal tepkimeleri mekanik ön işleme temizlenmiş BDEE elektrot kullanılarak incelenmiştir. Sonuçların tekrar edilebilirliği bu ön işlemin yeterli olacağı fikrini vermektedir (Çizelge 3.16). BDEE elektrotla değişik pH değerlerinde ve farklı destek elektrolitleri içerisinde yapılan çalışmalar, fulvestrant'ın yüksek potansiyel değerlerinde bütün ortamlarda ve pH değerlerinde tersinmez olarak yükseltgendiğini göstermektedir. pH çalışmalarına başlamadan önce sıyırma voltametrisi parametreleri orta bir pH'da optimize edilmiştir. Biriktirme süresi ve potansiyeli optimize edilmiş, sırasıyla +1,05V ve 90 sn olarak bulunmuştur. Fulvestrant'a ait yükseltgenme piki +1,05V'da 90 sn karıştırılarak AdSDPV tekniğiyle elmas elektrot kullanılarak kaydedilmiştir. Pik akımları ve potansiyelleri %30 asetonitril içeren destek elektrolitleri ile tayin edilmiştir. Böylece değişik elektrokimyasal tekniklerle (dönüşümlü ve diferansiyel puls voltametrisi) çeşitli destek elektrolit ve tamponlarıyla birçok kez ölçüm alınmıştır. Fulvestrant'ın BDEE elektrot kullanarak pH 1,00–12,00 aralığında yükseltgendiği görülmüştür.

Fulvestrant için DV ve AdSDPV teknikleri ile 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 2,00–12,00 Britton-Robinson, pH 2,00–7,00 fosfat ve pH 3,50–5,50 asetat tampon çözeltileri ile çalışmalar yapılmıştır. Bütün çalışmalarda % 30 asetonitrilli ortam sabit tutularak deneyler gerçekleştirilmiştir. AdSDPV eğrilerinin pik akımı–pH eğrileri incelendiği zaman, bütün teknikler için en yüksek akım değerine 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti (% 30 asetonitrilli ortam) ile ulaşıldığı görülmektedir.

Olayın özelliğini anlayabilmek için seçilmiş olan ortamda yapılan hız taraması deneylerini değerlendirmek için  $i_p - v^{1/2}$ ,  $i_p - v$  ve  $\log i_p - \log v$  ilişkileri incelenmiştir. DV tekniği ile, fulvestrant'ın 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (% 30 asetonitril ortam) destek elektrolitinde; 5 - 1000 mVs<sup>-1</sup> hız tarama aralığında, değişik tarama aralıklarda, incelemeler yapılmıştır.

Fulvestrant'ın hız taramasına ait sonuçlara göre piki adsorpsiyon kontrollü bulunmuştur. 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de 4x10<sup>-5</sup>M derişimde, 5-1000 mVs<sup>-1</sup> aralığında yapılan hız taraması sonucunda; pik akımının ( $i_p$ ) ve  $v$  arasında doğrusal bir ilişki saptandı.

$$i_p (\mu A) = 0,0041v (mVs^{-1}) + 0,3162 \quad (r: 0,992 ; n: 10)$$

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Aynı hız aralığındaki  $\log v - \log i$  grafiği ve denklemi incelenince (Şekil 3.43) bulunan eğim değerinin 0,69 olup adsorpsiyon kontrollü teorik değer olan 1,00'e yakın bulunması reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Laviron, ve ark., 1980; Greef ve ark., 1990).

Elde edilen doğru denklemi;

$$\log i_p (\mu A) = 0,69 \log v (mVs^{-1}) - 1,45 \quad (r: 0,998; n: 10)$$

5–1000 mVs<sup>-1</sup> aralığında yapılan hız taramasında pik akımı ve potansiyelinin değerlendirilmesi sonucunda hız artmasıyla pik potansiyeli 230 mV pozitif kayması katodik yönde bir pik yada dalga olmaması ile birlikte olayın tersinmez olduğunu göstermektedir.

pH taraması sırasında yükseltgenme pik potansiyeli pH arttıkça daha düşük pozitif potansiyele kaymıştır, bir doğrusallık elde edilmiştir.

$$E_p(\text{mV}) = 954,83 - 29,45\text{pH} \quad r = 0.991 \quad (\text{pH}:1.0 \text{ ve } 9.0 \text{ arası})$$

pH arttıkça pH 9,00'dan sonra fulvestrant'ın piki kaybolmuştur. pH taramasının pik akımı üzerine etkisi de BDEE elektrotla incelendi,  $i_p$  - pH grafiğinden de anlaşıldığı gibi maksimum pik akımı asit ortamda özellikle de 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'de görülmüştür. Elde edilen verilerden bu pikin adsorptif karakterde olduğu bulunmuştur. Bu yüzden analitik ölçümler için de adsorptif sıyırma tekniği kullanarak düzgün, keskin ve en iyi pik şekli elde edilen 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile deneylere devam edilmiştir.

Fulvestrant'ın yapısında yer alan aromatik halka üzerindeki hidroksil grubundan yükseltgendiği düşünülmektedir. Yükseltgenme sonrasında moleküldeki hidroksil grubunun kinon yapısına döndüğü düşünülmektedir. Fulvestrant bütün destek elektroliti çözeltileri içerisinde 2 elektronlu bir oksidasyon ve hızlı kimyasal reaksiyonlarla benzokinona dönüşür. (Grimshow, 2000; Demircigil ve ark., 2002)

DV yöntemine ait BR, asetat ve fosfat tamponlarıyla elde edilen pik potansiyeli - pH eğrilerine bakıldığı zaman (Şekil 3.40)  $E_p$ -pH denkleminin eğimi  $\sim -29,45 \text{ mV}$ 'dur. 59 mV'dan (Nernst denklemindeki eğimden) daha düşük olarak bulunması olayda proton iyonlarının etkili olduğunu göstermektedir.

Yapılan 3 devirli eğrilerde elektrot cevabı ilk eğride dalga halinde gözükmemektedir, daha sonraki devirlerde ise dalga pik şeklini almıştır. (Şekil 3.41 )

Fulvestrant'ın BDEE elektrot ile kararlı hal kinetiğini incelemek için  $5\text{mVs}^{-1}$  tarama hızında 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  destek elektrolitleri içerisinde çizilen voltamogramları yardımı ile Tafel diyagramı çizilmiş doğrusal bölgenin eğimi hesaplanmıştır (Şekil 3.44 ve Çizelge 3.33). Tafel eğrisi çizilirken gerçek denge potansiyelinden sapma yerine kararlı hal potansiyelinden başlayarak ölçülen potansiyel değerleri alınmıştır. Maddenin reaksiyona girmeye başladığı potansiyel noktasından başlanmıştır. Tafel diyagramının eğiminden  $\alpha n$  değeri hesaplanmış ve 0,33 olarak bulunmuştur. Bulunan  $I_0$  değerinin çok küçük oluşu ise ( $I_0 = 1,35 \times 10^{-11} \text{ A/cm}^2$ ) bize bu reaksiyonların yavaş yürüdüğünü (yük aktarım hızının yavaş olduğunu) göstermektedir (Yıldız ve Genç, 1993).

Fulvestrant'ın tayini için duyarlı ve seçici voltametrik yöntem geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda DV'ye göre daha keskin ve iyi belirlenmiş piklerin elde edilmesinden dolayı AdSDPV tekniği seçilmiştir. Analitik açıdan en iyi fulvestrant pikleri ve tekrar edilebilirlik sonuçları elde edildiği için 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti (%30 asetonitrilli) çalışma ortamı olarak seçilmiştir. AdSDPV için diğer kullanılan şartlar (sıyırma voltametrisi için; biriktirme potansiyeli 1100 mV, biriktirme süresi 150s olarak optimize edilmiştir), bulgular kısmında verilmiştir. Bu koşullarda yapılan voltametrik analiz çalışmaları BDEE elektrodun fulvestrant'ın sıyırma voltametrik yöntemlerle analizine uygun elektrot olduğunu göstermiştir. 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destek elektroliti (%30 asetonitril) içerisinde fulvestrant için her iki yöntemle de  $1 \times 10^{-6}$ – $8 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında doğrusallık bulunmuştur (Çizelge 3.34). Yakalama sınırı olarak DPV için  $2.36 \times 10^{-7}$  M bulunmuştur.

Voltametrik incelemenin saf maddeler üzerinde yapılmasından sonra geliştirilen teknikler fulvestrant'ın piyasa preparatı olan Faslodex® enjeksiyonluk çözeltilerine uygulanmıştır. İlaç numunesinden bilinen miktarda fulvestrant içeren numunelerin üzerine, bilinen miktarda saf madde ilave edilerek geri kazanım çalışmaları için numuneler hazırlanmıştır. Bu numunelerden alınan voltamogramlardan ve elde edilen % geri kazanım değerlerinin yüksek olmasından ilaç katkı maddelerinin yöntemlerimizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Geliştirilen tekniklerin insan serumundan fulvestrant'ın tayinine uygulanabilirliği de araştırılmıştır. Yapılan geri kazanım çalışmaları ile elde edilen sonuçlardan serum içerisinde yer alan ve girişim yapması muhtemel maddelerin (endojen maddeler) analiz pikimizi ve yöntemimizi etkilemediği görüşüne hem voltamogramlara hem de elde edilen geri kazanım sonuçlarına bakılarak varılmıştır.

Geliştirilen tekniklerin doğruluğu, duyarlılığı, uygulanabilirliği, seçiciliğini gösterebilmek için yöntemlerin gerekli tüm validasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlarla yöntemlerin tekrar edilebilirliği, duyarlılığı, doğruluğu, seçiciliği ve uygulanabilirliği gösterilmiştir (Çizelge 3.36; 3.37; 3.38; 3.40; 3.41).

Fulvestrant'ın bor ile dope edilmiş elmas elektrotta elektrokimyasal davranışı aydınlatıldıktan sonra DNA tutturulmuş kalem elektrot ile etkileşim mekanizmalarının aydınlatılmasına çalışılmıştır. Balık spermi çift sarmal DNA ile fulvestrant'ın etkileşimi, 0,02 M NaCl içeren asetat tamponu (pH 4,8) kullanılarak kalem elektrot yüzeyinde adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametri tekniği ile incelenmiştir.

Madde ve dsDNA arasındaki etkileşim, dsDNA bazlarından guanin yükseltgenme sinyalindeki farklılanma üzerinden incelenmiştir. dsDNA çalışmaları için öncelikle tekraredilebilir guanin sinyali elde edilen çift sarmal DNA derişimi belirlenmiştir. Şekil 3.2'e göre optimum çalışılan dsDNA derişimi 2,00 µg/mL ve Şekil 3.4'e göre optimum karıştırma süresi 240 sn'dir. Guanin akımının gün içi ve günler arası tekraredilebilirliği sırasıyla % 1,40 ve % 1,44'dür. Guanin ve fulvestrant pik akımları etkileşimden önce ve sonra Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV) tekniğiyle ölçülmüştür. (Şekil 3.52a) Etkileşimden sonra guanin sinyalinde doğrusal bir azalma görülmüştür (Şekil 3.52b).

10,00 µg/mL derişimdeki löprolid'in 2,00 µg/mL derişimdeki dsDNA ile etkileşimine dair diferansiyel puls ölçümlerinde, guanin yükseltgenme sinyaline ait gün içi ve günler arası bağıl standart sapması sırasıyla % 0,81 ve % 1,85'dir (n=3).

Optimum analitik çalışma performansının bulunabilmesi için çift sarmal DNA derişimi, biriktirme süresi ve dsDNA üzerindeki fulvestrant derişiminin ve etkileşim süresinin etkileri gibi deneysel parametreler incelenmiştir.

dsDNA optimizasyonu için 1,00–20,00 µg/mL derişim aralığında çalışıldı. Optimum biriktirme süresini bulmak için 2,00 µg/mL dsDNA ile 30–300 sn aralığında çalışıldı ve 240 sn olarak belirlenmiştir. Yöntemin enjeksiyonluk preparatlara da uygulanabilmesi için dsDNA'yla etkileşen fulvestrant derişimi ve etkileşim zamanı optimize edilmiştir. Fulvestrant 0,00–40,00 µg/mL derişim aralığında 120 s etkileştirildi, guanin sinyalini en çok düşüren derişim 10,00 µg/mL'da bulunmuştur. Bu derişimde 0–420 sn aralığında etkileşim süresi optimize edildi ve 180 sn olarak belirlenmiştir.

Guanin yükseltgenme pik akımı fulvestrant ile etkileşmesinden sonra doğrusal olarak azaldı. pH 4,80 asetat tamponu (%30 etanol) içerisinde guanin sinyalindeki azalma fulvestrant artan derişiminin (1,00–20,00 µg/mL aralığında) fonksiyonudur. (Çizelge 3.43). Yakalama sınırı 0,41 µg/mL bulunmuştur.

Voltametrik incelemenin saf maddeler üzerinde yapılmasından sonra geliştirilen teknikler fulvestrant'ın piyasa preparatı olan Faslodex® film kaplı tabletlere uygulanmıştır. % geri kazanım çalışmaları için numuneler hazırlanmıştır. Bu numunelerden alınan voltamogramlardan ve elde edilen % geri kazanım değerlerinin yüksek olmasından ilaç katkı maddelerinin yöntemlerimizi etkilemediği sonucuna varılmıştır. dsDNA modifiye edilen KGE ve boş BDEE ile yapılan enjeksiyonluk preparat çalışmalarından t ve F testi hesaplanmış, aradaki fark anlamsız bulunmuştur.

Fulvestrant-dsDNA için geliştirilen yöntemin doğruluğu, duyarlılığı, uygulanabilirliği, seçiciliğini gösterebilmek için yöntemlerin tüm validasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlarla yöntemlerin tekrar edilebilirliği, duyarlılığı, doğruluğu, seçiciliği ve uygulanabilirliği gösterilmiştir (Çizelge 3.43; 3.44; 3.45).

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Moleküler tanı ve farmakogenetik çalışma alanlarında biyosensör tasarımıyla kullanılan nükleik asit tanıma katmanları, yeni ve ilgi çekicidir. DNA katmanlarına dayalı biyosensörlerin tasarımı ile ortaya çıkan elektrokimyasal DNA biyosensörleri (genosensörler) ile gelecekte hasta başında veya doktor gözetimindeki daha hızlı, daha güvenilir ve daha ucuz DNA analizlere olanak sağlayan biyoçiplere ait önemli adımlar atılmış olacaktır.

Adsorptif sıyırma voltametrisi; ucuzluğu, basitliği, hızı, duyarlılığı, aynı anda çoklu ve mikrohacim analit tayinine olanak tanınması ve gerektiğinde taşınabilir ölçülere de sahip olması açısından modern DNA tanısı ve nükleik asit araştırmalarında geleceği çok parlak olan bir yöntemdir.

Farmasötik ve biyolojik önemi olan pek çok bileşiğin üzerinde yapılan elektrokimyasal çalışmalar; onların in vitro yükseltgenme mekanizmaları ile farmakolojik davranışları ya da diğer bir deyişle yapı-etki ilişkileri arasında pek çok benzerlik olduğunu ortaya koymaktadır. (La-Scalea ve ark., 2001; Monzon ve Yudi, 2001) Elektrokimyasal DNA biyosensörünün kullanıldığı bu araştırmadan elde edilen bilgiler, aynı zamanda yeni sentezlenen bu bileşiklerin tıp ve eczacılıkta kullanılabilirliği için en uygun yapının ve fonksiyonel grupların önceden belirlenmesine ve in vivo davranışlarının anlaşılmasına olanak sağlayacaktır. (Rauf ve ark., 2005; Swain ve Gierasch, 2006)

Tez çalışmasının ilk bölümünde antiviral ilaç Efavirenz ile çalışılmıştır. Kalem grafit elektrot üzerinde farklı pH ortamlarında efavirenz'in elektrokimyasal davranışı DV ve DPV metodu kullanılarak aydınlatılmıştır. Analitik çalışmalar için en uygun ortamın % 20 metanol içeren pH 3,00 BRT olduğu saptanmıştır. Kalem grafit elektrot kullanılarak efavirenz'in adsorpsiyon kontrollü çıkan piki için AdSDPV tekniği ile elektrokimyasal ön biriktirme basamağının şartları optimize edilmiş ve geliştirilen voltametrik tayin yöntemleri ile 0,018 – 2,56 µg/mL derişim aralığında doğrusallık (r: 0,999) saptanmıştır. Efavirenz'in DNA ile etkileşmesi sonucunda, guanin yükseltgenme



sinyallerindeki değişim incelenmiş ve geliştirilen yöntem, efavirenz ile DNA'nın etkileşme mekanizmasının tayini için kullanılmıştır. Guaninin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta bir azalma görölmüştür: bu değişim, DNA'nın elektroaktif bazı, guanine ait yükseltgenebilen grupların kısmen hasar görmesi şeklinde yorumlanabilir. Her iki yöntemle de kalibrasyon eğrilerine ait ve gerekli diğer validasyon hesaplamaları yapıp ilgili çizelgelerde verilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde antikanser ilaç löprolid ile çalışılmıştır. Kalem grafit elektrot üzerinde farklı pH ortamlarında löprolid'in elektrokimyasal davranışı DPV metodu kullanılarak aydınlatılmıştır. Analitik çalışmalar için en uygun ortamın pH 2,00 BRT olduğu saptanmıştır. Kalem grafit elektrot kullanılarak löprolid'in adsorpsiyon kontrollü çıkan piki için AdSDPV tekniği ile elektrokimyasal biriktirme basamağının şartları optimize edilmiş ve geliştirilen voltametrik tayin yöntemleri ile 0,005 – 0,200 µg/mL derişim aralığında doğrusallık ( $r:0,997$ ) saptanmıştır. Löprolid-dsDNA etkileşimi için iki teknik kullanılmış; hem dsDNA immobilize edilen KGE yüzeyinde; hem de çözelti ortamında etkileşimleri incelenmiştir. Her iki teknikle de etkileşim guanine yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden incelenmiş ve geliştirilen yöntem, löprolid ile DNA'nın etkileşme mekanizmasının tayini için kullanılmıştır. Guaninin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta bir azalma görölmüştür: bu değişim, DNA'nın elektroaktif bazı, guanine ait yükseltgenebilen grupların kısmen hasar görmesi şeklinde yorumlanabilir. Her iki yöntemle de kalibrasyon eğrilerine ait ve gerekli diğer validasyon hesaplamaları yapıp, parametreler ilgili çizelgelerde verilmiştir.

Tez çalışmasının üçüncü bölümünde antikanser ilaç fulvestrant ile çalışılmıştır. Bor ile dope edilmiş elektrot üzerinde farklı pH ortamlarında fulvestrant'ın elektrokimyasal davranışı AdSDPV metodu kullanılarak aydınlatılmıştır. Analitik çalışmalar için en uygun ortamın % 30 asetonitril içeren 0,1 M  $H_2SO_4$  olduğu saptanmıştır. BDEE elektrot kullanılarak fulvestrant'ın adsorpsiyon kontrollü çıkan piki için AdSDPV tekniği ile elektrokimyasal ön biriktirme basamağının şartları optimize edilmiş ve geliştirilen voltametrik tayin yöntemleri ile  $1 \times 10^{-6}$ – $8 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında doğrusallık ( $r: 0,999$ ) saptanmıştır. Fulvestrant'ın dsDNA ile etkileşmesi

sonucunda, guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim incelenmiş ve geliştirilen yöntem, Fulvestrant ile dsDNA'nın etkileşme mekanizmasının tayini için kullanılmıştır. Guaninin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta bir azalma görülmüştür: bu değişim, dsDNA'nın elektroaktif bazı, guanine ait yükseltgenebilen grupların kısmen hasar görmesi şeklinde yorumlanabilir. Her iki yöntemle de kalibrasyon eğrilerine ait ve gerekli diğer validasyon hesaplamaları yapıp, gerekli parametreler ilgili çizelgelerde verilmiştir.

dsDNA ile etkileşen çeşitli maddelerin voltametrik davranışlarının tayini, kemoterapide kullanılan dsDNA'ya özgül olarak bağlanan moleküllerin dizayn edilmesi ve dsDNA'ya bağlı hasta başı teşhislerde kullanılan biyoteknolojik araçların geliştirilmesinde büyük bir önem taşımaktadır.

Çalışmanın amacı olan dsDNA ile etkileşen yeni sentezlenen bileşiklerin dsDNA ile etkileşim türlerinin, geliştirilen bu yöntemle tayini ilaç-dsDNA etkileşim mekanizmalarının çözülmesinde tek kullanımlık elektrot sistemi ile kombine elektrokimyasal metodların geliştirilmesidir. Bu amaçla kalem grafit elektrodu (KGE) kullanılarak diferansiyel puls voltametri tekniğine dayalı daha hızlı, daha ucuz ve yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

Geliştirilen bu yöntemler, etken maddelerin farmasötik dozaj formlarına basit, hızlı ve herhangi bir ayırım yapılmadan doğrudan uygulanabilmektedir. Tablet ya da enjeksiyonluk dozaj form katkı maddelerinin çalışmamızı etkilemediğini kanıtlamak için geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalıştığımız her üç maddenin de tayini için hızlı, kolay, doğru, duyarlı, kesin, seçici ve herhangi bir ayırma işlemine gerek duyulmayan voltametrik teknikler geliştirilmiş ve bunların etken madde içeren farmasötik dozaj formlarına uygulanabilirliği istatistiksel olarak gösterilmiştir. Geliştirilen her yöntemin gerekli tüm validasyon (yöntem geçerliliği) çalışmaları yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar bu yöntemlerin, bu üç ilacın analizinde rahatlıkla kullanılabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak, gelecekte DNA'ya hedefli ilaç olarak sentezlenen maddelerin kullanılabilirliğinin araştırılmasına yönelik yeni bir yöntem geliştirilmiştir. İlaç-DNA kompleksinin fonksiyonlarının incelenmesi ve bu fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi, ilaç moleküllerinde hedeflerine göre yapmamız gereken tasarımlar için önemlidir. DNA-ilaç etkileşmelerinin türü ve DNA bazlarındaki yapı değişimleri, geliştirilen elektrokimyasal genosensörler ile aydınlatıldığında, belki ilacın biyolojik fonksiyonlarını içeren kurallar açıklanabilir. Bu kurallar sayesinde, kullanımda olan ilacın aktivitesini arttırmak veya istenen aktiviteyi gösterecek gerekli yapılara sahip yeni bir sınıf bileşikler tasarlamak mümkün olacaktır. DNA analizlerine dayalı tasarlanan elektrokimyasal genosensörlerin, yeni sentezlenecek olan antibiyotik, antiviral, antikanser ilaç ve antisense oligonükleotitlerine dayalı ilaç hedefleme çalışmalarına katkıda bulunmak ve/veya bir ilaç hammaddesinin daha duyarlı bir şekilde tayinini yapmak amacıyla, gelecekte piyasaya sürülecek DNA biyoçiplerinin teknolojisini oluşturacağı ümit edilmektedir.

## ÖZET

### **Bazı Antiviral ve Antineoplastik İlaç Etken Maddelerinin DNA ile Etkileşimi ve Elektrokimyasal Analizleri**

Bu çalışmada efavirenz, löprolid ve fulvestrant ilaçlarının çift sarmal DNA (dsDNA) ile olan etkileşimleri elektrokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Etkileşimlerin belirlenebilmesi için elektrokimyasal tayin tekniklerinden diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği ile tek kullanımlık kalem elektrot (KGE) çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Deneysel parametrelerdeki farklılık (incelenen ilaç derişimi, DNA derişimi, madde-DNA etkileşme süresi) DPV tekniğiyle ölçüm yapılarak incelenmiştir.

Efavirenz'in dsDNA ile etkileşiminde, dsDNA'nın elektroaktif bazı olan guanin yükseltgenme sinyalinde azalma gözlemlendi. Ayrıca efavirenz'in yükseltgenme davranışı KGE üzerinde ve alkol – su karışımli ortamda (20: 80 metanol: H<sub>2</sub>O, pH aralığı 2,00 – 10,00) Dönüşümlü voltametri (DV) ve DPV teknikleri ile çalışılmıştır.

Löprolid'in dsDNA ile etkileşiminde, hem elektrotta hem de çözelti ortamında dsDNA'nın elektroaktif bazı olan guanin yükseltgenme sinyalinde azalma gözlemlendi. Ayrıca löprolid'in yükseltgenme davranışı KGE ile pH 2,00 – 12,00 aralığında DV ve DPV teknikleri ile çalışılmıştır.

Fulvestrant'ın dsDNA ile etkileşiminde, dsDNA'nın elektroaktif bazı olan guanin yükseltgenme sinyalinde azalma gözlemlendi. Ayrıca fulvestrant'ın yükseltgenme davranışı Bor ile dope edilmiş elmas elektrot (BDEE) üzerinde ve alkol – su karışımli ortamda (30: 70 Asetonitril: H<sub>2</sub>O, pH aralığı 1,00 – 12,00) DV ve DPV teknikleri ile çalışılmıştır.

Efavirenz, löprolid ve fulvestrant'ın dsDNA ile etkileşimleri sonrasında yanıtta gözlenen azalmalar, bu ilaçların dsDNA'nın çift sarmal yapısını bozabileceği şeklinde yorumlanabilir. Çalışılan ilaçların ve dsDNA ile etkileşimlerinin miktar tayini için AdSDPV tekniğiyle çalışılmıştır. Geliştirilen bütün yöntemler maddelerin farmasötik dozaj formlarına ile uygulanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** dsDNA, etkileşim, guanin, kalem grafit elektrot, miktar tayini, voltametri.

## SUMMARY

### **Interaction Between DNA and Some Antiviral, Antineoplastic Drugs and Their Electrochemical Analyses**

In this study, the interaction of efavirenz, leuprolide and fulvestrant with double stranded DNA (dsDNA) structure was examined with electrochemical methods. For investigation of these interactions, differential pulse voltammetry (DPV) technique was utilized. This is an electrochemical designation technique in which a disposable pencil graphite electrode (PGE) was used as a working electrode. The difference in the experimental parameters (the concentration of studied drug, the concentration of dsDNA, and the interaction time of compound with DNA) was studied by measuring with DPV technique.

The interaction of efavirenz with dsDNA showed a decrease in the oxidation signal of guanine. Also, the electrochemical oxidation of efavirenz was studied in hydroalcoholic media (20:80 methanol: H<sub>2</sub>O, pH range 2,00 – 10,00) using cyclic voltammetry (CV) and DPV at PGE.

The interaction of leuprolide with dsDNA showed a decrease in the oxidation signal of guanine both on the electrode and also in solution media. Also, the electrochemical oxidation of leuprolide was studied between pH 2,00 – 12,00 range using CV and DPV at a PGE.

The interaction of fulvestrant with dsDNA also showed a decrease in the oxidation signal of guanine. Also, the electrochemical oxidation of fulvestrant was studied in hydroalcoholic media (30:70 methanol: H<sub>2</sub>O, pH range 1,00 – 12,00) using CV and DPV at a boron-doped diamond electrode (BDEE).

The decrease in guanin signals that is observed after interaction of efavirenz, leuprolide and fulvestrant with dsDNA could be explained by a possible damage of these drugs to the double helix form of dsDNA. Determination of the drugs and their interaction with dsDNA were performed by AdSDPV. All these developed methods were applied for the analysis of these drugs in pharmaceutical dosage forms.

**Keywords:** determination, dsDNA, interaction, guanine, pencil graphite electrode, voltammetry.

## KAYNAKLAR

- ABAD-VALLE, P., FERNANDEZ-ABEDUL, M.T., COSTA-GARCIA, A. (2005). Genosensor on gold films with enzymatic electrochemical detection of a SARS virus sequence. *Biosens. Bioelectron.* **20**: 2251-2260.
- ADAMOVIĆ, J.A., Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, 1997
- ADAMS, R.N., Mc CLURE, J.H., MORRIS, J.B. (1958) Chrono – potentiometric studies at solid electrodes. *Anal. Chem.*, **30**: 471.
- ADELOJU, S.B. and CHUN-GUO, C. (1991). Determination of copper in process magnese sulfate electrolyte by differential anodic stripping voltammetry. *Electroanalysis*, **3**: 979-984.
- AHUYA, S., SCYPINSKI, S. (2001) Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, New York.
- ALTINÖZ , S., TEMIZER, A.,(1990a). Differential puls adsorptive stripping voltammetric determination of ceftriaxone at a static mercury drop electrode. *J. Pharm. Sci.*, **79**: 351-355.
- ALTINÖZ , S., TEMIZER, A., and BEKSAC, S., (1990b). Determination of ceftriaxone in biological material by differential pulse adsorbtive stripping voltammetry. *Analyst*, **115**: 873-74.
- ALTINÖZ , S., ÖZER, D., TEMIZER, A., and BAYRAKTAR, Y., (1992). Determination of ranitidine in a biological material by using differential pulse adsorbtive stripping voltammetry. *Anal Lett.*, **25**: 111-118.
- ALTUN, Y., DOGAN-TOPAL, B., USLU, B., OZKAN, S. A., (2009) Anodic behavior of sertindole and its voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum using glassy carbon and boron-doped diamond electrodes *Electrochim. Acta.* **54**: 1893-1903.
- BAIRD, W.M., HOOVEN, L.A., MAHADEVAN, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* **45**: 106-114.
- BARD, A.J., FAULKNER, L.R., (1980). Electrochemical Methods Fundamentals and Applications. John Wiley&Sons. New York. USA.
- BARTON, J.K., GOLDBERG, J.M., KUMAR, C.V. , TURRO, N.J., (1986). Binding modes and base spesificity of tris (phenantroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids tunning the stereoselectivity , *J. Am. Chem. Soc.*, **108**: 2081-2088.
- BEJ, A.K. (1996). Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and strategies, *Nucleic acid analysis: Principles and Bioapplications*; Ed. Dangler, C.A., Wiley-Liss, Inc., s. 1-29.
- BERTINO, J.R. (1992). Antineoplastic Drugs, *Textbook of Pharmacology*, Smith, C.M. and Reynard, A.M., *Section IX - Cancer Chemotherapy*; W. B. Saunders Company, USA; 957-958.
- BİRYOL, İ., KABASAKALOĞLU, M., ŞENTÜRK, Z., (1989) Investigation of mechanism of the electrochemical oxidation of bamipine hydrochloride by voltammetry. *Analyst*, **114**: 181 – 184
- BİRYOL, İ., USLU, B., KÜÇÜKYAVUZ, Z. (1996) “Voltammetric determination of imipramine hydrochloride and amitriptyline hydrochloride using a polymer modified carbon paste electrode”. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **15**: 371– 381

- BİRYOL, İ., USLU, B., KÜÇÜKYAVUZ, Z. (1998) "Voltammetric determination of amoxicillin using a carbon paste electrode modified with poly (4- vinyl pyridine)" *STP Pharm.Sci.*, **8(6)**: 383-386
- BLEWICZ, R. and KUBLIK, Z., (1983). The cathodic stripping voltammetry determination of traces of iodide with a hanging copper amalgam drop electrode. *Anal.Chim.Acta*, **171**: 205-213.
- BLUTSTEIN, H. and BOND, (1976). Trace zinc determination in acid media by differential pulse anodic stripping voltammetry" *Anal.Chem.*, **48**: 759-761.
- BOCRIS, J.O.M., REDDY, A.K.N. (1970) *Modern Electrochemistry*. Vol:2 London : Mc Donald Co Ltd.
- BOND, A.M., (1980). *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*, New York Marcel Dekker Inc.
- BOND, A.M., MAHON, P.J., SCHIEWE, J., VICENTE-BECKETT, V., (1997). An inexpensive and renewable pencil electrode for use in field-based stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, **345**: 67-74.
- BOOTH, M.D. and FLEET, B., (1970). Electrochemical behaviour of triphenyltin compounds and their determination at submicrogram levels by anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.*, **42**: 825-828.
- BRABEC, V., (1981). Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **128**: 437-449.
- BRAGGIO, S., BARNABY, R.J., GROSSI, P., CUGOLA, M. (1996) A strategy for validation of bioanalytical methods. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **14**: 375-388.
- BREEF, C.M.A., OLIVERA BRETT, A.M.C.F. and PEREIRA, J.L.C., (1991). Adsorptive stripping voltammetry of cobalt and nickel in flow systems at wall-jet electrodes. *Electroanalysis*, **3**: 683-689.
- BRETT, A.M. OLIVEIRA, MACEDO, T.R.A., RAIMUNDO, D., MARQUES, M.H., SERRANO, S.H.P. (1998). Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, **13**: 861-867.
- BREZINA, M., ZUMAN, P., (1958) *Polarography in Medicine*. Biochemistry and Pharmacy. New York, Interscience Publishers
- BRETT, A.M. OLIVEIRA, SERRANO, S.H.P., MACEDO, T.A., RAIMUNDO, D., MARQUES, M. H., LA-SCALEA, M.A. (1996). Electrochemical determination of Carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, **8**: 992-995.
- BRETT, A.M. OLIVEIRA, SERRANO, S.H.P., GUTZ, I., LA-SCALEA, M.A., CRUZ, M.L. (1997). Voltammetric behaviour of nitroimidazoles at a DNA-biosensor, *Electroanalysis*, **9**: 1132-1137.
- BRETT, A.M., OLIVEIRA, MACEDO, T.R.A., RAIMUNDO, D., MARQUES, M.H., SERRANO, S.H.P. (1998). Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, **13**: 861-867.
- BRIHAYE, C. and GILLAIN A. (1983). Determination of traces of metals by anodic stripping voltammetry at a rotating glassy carbon ring disc electrode. *Anal.Chim.Acta*, **148**: 51-57.
- CAI, X., RIVAS, G., SHIRASHI, H., FARIAS, P., WANG, J., TOMSCHIK, M., JELEN, F., PALECEK, E. (1997). Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces, *Anal. Chim. Acta.*, **344**: 65-76.
- CAMMAN, K., LEMKE, U., ROHEN, A., SANDER, J., WILKEN, H., WINTER, B. (1991). Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications, *Angew. Chem. Int. De.Engl.* **30**: 516-539.
- CARAPUÇA H. M., CABRAL D. J. and ROCHA L. S. (2005). Adsorptive stripping

- voltammetry of trimethoprim: Mechanistic studies and application to the fast determination in pharmaceutical suspensions" *J. Pharm. and Bio. Anal.*, In Press
- CARTER, M.T. AND BARD, A. J. (1987). Voltammetric studies of the interaction of tris (1,10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**:7528-7530.
- CARTER, M.T., RODRIGUEZ, M., BARD, A.J. (1989) Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris chelated complexes of Cobalt (III) and Iron (II) with 1,10-phenanthroline and 2, 2'-Bipyridine, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**: 8901-8911.
- CHRISTIE, J.H., TURNER, J.A., OSTERYOUNG, R.A., (1977) Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode. *Theory. Anal. Chem.*, **49 (13)**: 1899 - 1913
- CHRISTIAN, G.D., (1969). A. Stripping pulsed voltammetry. *J. Electroanal. Chem.*, **23**: 1-7.
- COLLINS, F.S., PATRINOS, A., JORDAN, E., CHAKRAVARTI, A. GESTELAND, R., WALTERS, L. and the members of the DOE and NIH planning groups. (1998). New goals for the U.S. Human Project: 1998-2003, *Science*, **282**: 682-689.
- CONVIGTON, J.R. and LACOSTE, R.J., (1965). Voltammetric determination with a carbone ceresine wax paste electrode. *Anal. Chem.*, **37**: 420-422,.
- COULET, P.R. (1991). What is a Biosensor?, *Chapter 1; Biosensor principles and applications*, Editörler; L.J.Blum, P.R. Coulet, Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.
- COX, J.A., GADD, S.E., DAS, B.K., (1988) Modification of glassy carbon with a stable film containing iridium oxide and palladium. *J. Electroanal. Chem.* **256**:199-205
- CUSHMAN, M.R., BENNET, B.G., and ANDERSON, W.C. (1981). Electrochemistry at carbon Fibers. *Anal. Chem. Acta.*, **130**:323-327.
- DEFORCE, D.L.D., RYNIERS, F.P.K., VAN DEN EECKHOUT, E.G., LEMIERE, F. ESMANS, E.L. (1996). Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **68**: 3575-3584.
- DEMİRCİGİL, B.T., USLU, B., ÖZKAN, Y., ÖZKAN, S.A., ŞENTÜRK, Z., (2003) "Voltammetric oxidation of ambroxol and application to its determination in pharmaceutical and in drug dissolution studies, *Electroanalysis*, **15(3)**: 230-234
- DEMİRCİGİL, B.T., ÖZKAN, S.A., ÇORUH, Ö., YILMAZ, S. (2002). Electrochemical behavior of formoterol fumarate and its determination in capsules for inhalation and human serum using differential pulse and square wave voltammetry. *Electroanalysis*, **14(2)**: 122 – 127
- DERMİŞ, S., BİRYOL, İ., (1990) Anodic oxidation of some phenothiazine derivatives on pretrated platinum and ruthenium electrodes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**: 999 – 1003
- DERVAN, P.B. (1998). Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Ed. Eckstein, F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, s.49-64.
- DIAZ-CRUZ, J.M., ARRINO, C., ESTEBAN, M., (1991). Polarography and stripping voltammetry of metal polycarboxylate complexes: complexes of cadmium and zinc with polyacrylic and polymethacrylic acids. *Electroanalysis*, **3**: 299-307.
- DOĞAN, B., USLU, B., ÖZKAN, S.A., (2004) "Anodic adsorptive stripping voltammetry of the hypertensive drug candesartan cilextil at the glassy carbon electrode" *Die Pharmazie*, **11**:840-844
- DOĞAN, B., ÖZKAN, S.A., (2005). Electrochemical Behavior of Carvedilol and its Adsorptive stripping determination in dosage forms and biological fluids. *Electroanalysis*, **17**: 2074-2083.
- DOĞAN, B., ÖZKAN, S.A., USLU, B., (2005a) "Electrochemical characterization of flupenthixol and rapid determination of the drug in human serum and pharmaceuticals by voltammetry" *Anal. Lett.*, **38**: 641-656



- DOĞAN, B., USLU, B., SÜZEN, S., ÖZKAN, S. A. (2005b). "Electrochemical evaluation of nucleoside analogue lamivudine in pharmaceutical dosage forms and human serum" *Electroanalysis*, **17**:1886-1894
- DOĞAN, B., CANBAZ, D., ÖZKAN, S.A., USLU, B., (2006). "Electrochemical methods for determination of protease inhibitor indinavir sulfate in pharmaceuticals and human serum" *Die Pharmazie*, **61**: 409-413
- DOĞAN-TOPAL, B., ÖZKAN, S.A., USLU, B. (2007) Simultaneous determination of abacavir, efavirenz and valganciclovir in human serum samples by isocratic HPLC-DAD detection. *Chromatographia*, **66**: S25-S30.
- DOĞAN-TOPAL, B., USLU, B., ÖZKAN, S.A., (2009) Voltammetric studies on the HIV-1 inhibitory drug Efavirenz: the interaction between dsDNA and drug using electrochemical DNA biosensor and adsorptive stripping voltammetric determination on disposable pencil graphite electrode, *Biosensors&Bioelectronics*, **24**: 2358-2364.
- DOĞAN-TOPAL, B., ÖZKAN, S.A., (2011) A novel sensitive electrochemical DNA biosensor for assaying of anticancer drug leuprolide and its adsorptive stripping voltammetric determination, *Talanta*, **83**: 780-788.
- DÖKMECİ İ., , Editör, (1992). Farmakoloji - İlaç uygulamalarında temel kavramlar, 63.Bölüm: Antikanser İlaçlar. Nobel Tıp Kitabevleri, 819-848.
- DRUMMOND, T.G., HILL, M.G., BARTON, J.K. (2003). Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotechnolog.* **10**(21): 1192-1199.
- EGGERTSEN, F.T., WEISS, F.T., (1956). Effect of structure of certain amine indicators on oxidation potential and color intensity on oxidation. *Anal Chem.* **28**: 1000
- EISNER, U., MARK, H. B. Jr., (1970). The anodic stripping voltammetry of Trace Silver solutions employing graphite electrodes. Application to silver analysis of rain and snow samples from silver iodide seeded clouds. *J.Electroanal. Chem.*, **24**: 345-355.
- ERDEM A., KERMAN K., MERİÇ B., AKARCA U.S., OZSOZ M. (1999). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Electroanalysis*, **11**: 586-588.
- ERDEM A., KERMAN K., MERİÇ B., AKARCA U.S., OZSOZ M. (2000). Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Anal. Chim. Acta.*, **422**: 139-149.
- ERDEM A, OZSOZ M. (2001a). Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA, *Anal.Chim. Acta*, **437**: 107-114.
- ERDEM A., OZSOZ M. (2001b). Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA, *Turk. J. Chem*, **25**: 469-475.
- ERDEM A., OZSOZ M., (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA drug interactions. *Electroanalysis*. **14**: 965-974
- ERDEM A., ISABEL PÍVİDORÍ M., DEL VALLE M., ALEGRET S. (2004). Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **567**: 29-37.
- ERDEM, A., KOSMİDER, B., OSIĞCKA, R., ZYNER, E., OCHOCKI, J., OZSOZ, M. (2005a) " Electrochemical genosensing of the interaction between the potential chemotherapeutic agent, cis-bis(3-aminoflavone) dichloroplatinum(II) and DNA in comparison with cis-DDP" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**: 645-652.
- ERDEM, A., ÖZKAN, A.D., KARADENİZ H., KARA, P., SENGONUL, A., SAYINER, A.A., OZSOZ, M., (2005b). Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology. *Electrochem. Commun.* **7**: 815-820.

- ERMER, J. MILLER, J.H. McB. (2005) Method validation in pharmaceutical analysis. 1<sup>st</sup> Ed. Wiley-VCH Pub., Weinheim.
- EVANS, J.F., KUWANA, T., (1977) Radiofrequency oxygen plasma treatment of pyrolytic graphite electro surface. *Anal. Chem.* **49**: 1632 – 1635
- EVANS, A., (1991). Potentiometry and ISE, ACOL, London, s.106-198.
- FAGAN, D.T., HU, I.F., KUWANA, T., (1985) Vacuum heat treatment for activation of glassy carbon electrode. *Anal. Chem.* **57**:2759-2763
- FAN B., BARTLETT M.G., STEWART J.T. (2002) Determination of lamivudine/efavirenz in human serum using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry with ionization polarity switch. *Biomed. Chromatogr.* **16**: 383-389.
- FERRET and PHILIPS, (1985) Studies in polarography. The rotating platinum electrode. *Trans. Faraday Soc.* **51**: 390
- FIREDMAN, T., BOROWN, D.M. (1978). Base specific reactions useful for DNA sequencing: methylene blue – sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxidemodification of thymine, *Nucl. Acids Res.*, **5**: 615-623.
- FLORENCE, T.M., (1970). Adsorptive stripping voltammetry with a glassy carbon electrode mercury-plated. *J.Anal.Chem.* **27**: 273-281.
- FLORENCE, T.M., (1980). Compression of linear scan and differential pulse anodic stripping voltammetry at a thin mercury film glassy carbon electrode. *Anal.Chim.Acta*, **119**: 217-233.
- GAO, W., SONG, J., WU, N. (2005). Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of trepibutone at a pencil graphite electrode. *J. Electroanal. Chem.* **576**: 1-7.
- GİOİA M.G., GATTİ R., MİNARİNİ A. (2005) LC determination of leuprolide component amino acids in injectable solution by phanquinone pre-column derivatization labelling procedure. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **37**(5): 1135-1141.
- GOODİNG, J.J. (2002). “Electrochemical DNA hybridization biosensors” *Electroanal.* **14**: 1149.
- GÖKMEŞE, F. (2004) Bazı Naftaldimin ve Salisilaldiminlerin Çeşitli Voltametrik Tekniklerle Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- GREEF, R., PEAT, R., PETER, L.M., PLETCHER, D., ROBINSON, J., (1990) Instrumental Methods in Electrochemistry, London, Ellis Harwood Series in Physical Chemistry
- GRİMSHAW, J., (2000). Electrochemical reactions and mechanisms in Organic Chemistry. Elsevier Sci Pub, Amsterdam.
- GRONOW, M., MULLEN, W.H., RUSSEL, L.J., ANDERTON, D.J. (1992). Biosensors, Chapter, 15. Molecular Biology and Biotechnology, (Walker, J.M., Gingold, E.B.) 2nd ed. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
- GÜLMEZ, A.B., (2005). DNA'nın Elektrokimyasal Algılanmasında Kullanılan Yeni Sensör Tasarımları. Yüksek lisans tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- HALL, E.A.H. (1990). Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere; s.3-30.
- HART, J.P., (1990) Electroanalysis of Biologically Important Compounds. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry. P: 20 - 21
- HART, J.P., (1997). Recent developments in the design and application of screen printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses. *TrAC*, **16**: 89-103.
- HAYASHIZAKI, Y., KANAMORI, M. (2004). Dynamic transcriptome of mice. *Trends Biotechnol.* **22**: 161-167.

- HERSHENHART, E., Mc CREEY, R.L., KNIGHT, R.D., (1984) In situ cleaning and activation of solid electrode surface by pulsed laser light. *Anal. Chem.* **56**: 2256 – 2257
- HODGSON, J.,(1998). Shrinking DNA diagnostics to fill the markets of the future, *Nature Biotech.*, **16**: 725-727.
- HU, I.F., KARWEIK, D.H., KUWATA, T.,(1985) Activation and deactivation of glassy carbon electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **188**: 59-72
- [HUANG, Y.](#), [GANDHI, M.](#), [GREENBLATT, R.M.](#), [GEE, W.](#), [LIN, E.T.](#), [MESSENKOFF, N.](#) (2008) Sensitive analysis of anti-HIV drugs, efavirenz, lopinavir and ritonavir, in human hair by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **22**: 3401-3409.
- HUMPHRIES K., DRYHURST.,(1987). Electrochemical oxidation of 5-hydroxytryptophan in acid solution.*J.Pharm.Sci*, **76**:839
- HYUNG, S.K., SOO, H.B., BYUNG, M.L. (2005). Effects of chemical carcinogenes and physicochemicals factors on the UV spectrophotometric determination of DNA. *J. Toxicol. Environ. Health Part A-68*, **23-24**: 2081-2095.
- <http://www.baskent.edu.tr/~cokeliler/biyosensor.doc>
- <http://www.biyomedtek.com/bmt-konular-no4.htm>
- <http://www.cal-tox.org/Downloads/Monographs/Efavirenz.pdf>
- <http://www.chm.bris.ac.uk/pt/diamond/mattthesis/chapter1.htm>
- [http://www.kontrolkalemi.com/forum/arşiv\\_baslik1915.0.html](http://www.kontrolkalemi.com/forum/arşiv_baslik1915.0.html)
- <http://www.obitet.gazi.edu.tr/obitet/sensorler/algilayici.htm>
- <http://www.sanofi-aventis.ca/products/en/eligard.pdf>
- <http://www.scribd.com/doc/9380782/Biyosensorler-2>
- IBRAHIM MS., SHEHATTA IS., AL-NAYELI AA.,(2002). Voltametric studies of the interaction of lumazine with cyclodextrins and DNA. *J. Pharm. Biomed.*, **28**: 271-225
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH 1994); Draft Guideline on Validation of Analytical Procedures for Pharmaceuticals; Availability, Fed.Reg., 59, 9750.
- JAGNER, D and GRANELI, A.,(1976). Potansiometric Stripping Analysis, *Anal. Chem. Acta*, **83**: 19-26.
- JAGNER, D., (1982). Potansiometric Stripping Analysis, *Analyst*, **107**: 593-599.
- JAKUBOWSKI, M., TRZCINKA-OCHOCKA, M. (2005). Biological monitoring of exposure: Trends and key developments. *J. Occup. Health*, **47**: 22-48.
- JAMSHIDI, A., MOBEDI, H., AHMAD-KHANBEIGI, F. (2006) Stability-indicating HPTLC assay for leuprolide acetate. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*. **19**: 223-227.
- JARBAWI, B., HEINEMAN, W.R., (1982). Applications of Hydride generation atomic absorption spectrometry to coal analyse. *Anal. Chim Acta*, **135**: 363-368.
- JARBAWI, B. and HEINEMAN, W.R., (1986). Preconcentration of tranquilizers by adsorption extraction at a Wax- Impregnated Graphite Electrode” *Anal. Chim Acta*, **186**: 11-19.
- JELEN, F., ERDEM A., PALECEK, E. (2002). Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode, *Bioelectrochemistry*, **55**: 165-167.
- JOHNSTON, D.H., GLASGOW, K.C., THORP, H.H. (1995). Electrochemical Measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron transfer between DNA and Metal complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 8933-8938.

- JOHNSTON, D.H., THORP, H.H. (1996). Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: Homogeneous electron-transfer kinetics, *J. Phys. Chem.*, **100**: 13837-13843.
- JOHNSTON, D.H., WELCH, T.W., THORP, H.H. (1996). Electrochemically activated nucleic acid oxidation; Metal Ions in Biological systems, Ed. Sigel, A., Sigel, H.; Vol. 33: *Marcel Dekker, Inc*, NY; 299-324.
- JU, H., ZHOU, J., CAI, C., CHEN, H. (1995). The electrochemical behavior of methylene blue at a microcylinder carbon fiber electrode, *Electroanal.*, **7**: 1165-1170.
- KABASAKALIAN, P., Mc GLOTTEN, J., (1958) Polarographic oxidation of phenothiazine tranquilizers. *Anal. Chem.* **30**: 471
- KADAYIFÇILAR, K.P. (2003). Çeşitli Bulaşıcı ve Kalıtsal Hastalıklara Neden Olan Gen Dizilerini İçeren PCR Ürünü Örnekler Kullanarak Elektrokimyasal DNA Biyosensörleriyle Bu Hastalıkların Saptanması. Yüksek lisans tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- KAPANICA, M. (1991). Determination of amalgam-Forming metals by anodic stripping voltammetry in solutions containing dissolved oxygen. *Electroanalysis*, **3**: 925-928.
- KARADENİZ H., GULMEZ, B., SAHİNCİ, F., ERDEM, A., KAYA, G.I., UNVER, N., KİVCAK, B., OZSOZ, M., (2003). Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**: 295.
- KARADENİZ H., (2004). DNA analizlerine yönelik elektrokimyasal genosensörün tasarımı ve uygulamaları, Yüksek lisans tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- KARA,P., CAVDAR, S., MERİC, B., ERENŞOY, S., OZSOZ, M., (2007).Electrochemical probe DNA design in PCR amplicon sequence for the optimum detection of microbiological diseases. *Bioelectrochem.*, **71**: 204-210.
- KAUFFMANN,J.M., LAUDET, A., PATRIARCHE, G.J. and CHRISTIAN, G., (1982).The graphite, spray electrode and its application in the anodic stripping voltammetry of bismuth. *Anal.Chim.Acta.*, **135**: 153.
- KELLEY, S. O., BARTON, J.K. (1997). Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode, *Bioconjugate Chem.*, **8**: 31-37.
- KELLEY, S. O., HOLMLIN, R. E., STEMP, E.D.A., BARTON, J.K. (1997). Photoinduced electron transfer in Ethidium-modified DNA duplexes: dependence on distance and base stacking, *J.Am. Chem. Soc.*, **119**: 9861-9870.
- KERMAN K., MERİC B., ÖZKAN D., KARA P., ERDEM A., OZSOZ M., (2001). Electrochemical DNA biosensor for the determination of benzo[a]pyrene-DNA adducts. *Anal.Chim.Acta.* **450**: 45-52
- KIR, S., ONAR, A. N. and TEMİZER, A., (1990). Adsorptive stripping voltametric determination of midazolam as a method for quality control. *Anal. Chim. Acta* , **229**: 145-147.
- KISSINGER, P.T. ; HEINEMAN, W.R., (1996) Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, 2<sup>nd</sup> Ed. Revised and Expanded, New York, Marcel Dekker Inc.
- KOLAKOWSKI, B., BATTAGLINI, F., LEE, Y.S.,GIANNOULA, K., MIKKELSEN, S.R. (1996). Comparison of an intercalating dye and an intercalant-enzyme conjugate for DNA detection in a microtiter-based assay, *Anal. Chem.*, **68**: 1197-1200.
- KOLTHOF, I.M., TANAKA, N., (1954) Rotated and stationary platinum wire electrode.*Anal. Chem.* **26**: 632 - 636
- KRIZKOVA, S., ADAM, V., PETRLOVA, J., ZITKA, O., STEJSKAL, K., ZEHNÁLEK,

- J., SURES, B., TRNKOVA, L., BEKLOVA, M., KIZEK, R. (2007) "A suggestion electrochemical biosensor for study of Platinum(II)-dna interactions" *Electroanalysis* **19**: 331-338.
- KUBIK, T., BOGUNIA-KUBIK, K., SUGISAKA, M. (2005). Nanotechnology on duty in medical applications. *Curr. Pharm. Biotech.* **6**: 17-33.
- LABUDA J., BUCKOVA M., HEILEROVA L., CANIOVA-ZIAKOVA A., BRANDSTETEROVA E., MATTUSCH J., WENNRICH R. (2002). Voltammetric detection of antioxidative properties of flavanoids using electrically heated DNA modified Carbon Paste Electrode, *Sensors.*, **2**: 1-10.
- LAKSHMI SAILAJA, A., KISHORE KUMAR, K., RAVI KUMAR, D.V.R., MOHAN KUMAR, C., YUGANDHAR, N.M., SRINUBABU, G. (2007) Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of efavirenz in human plasma. *Chromatographia*, **65**: 359-361.
- LANE, R.F., HUBBARD, A.T., (1976) Differential double pulse voltammetry at chemically modified platinum electrodes for in vivo determination catecholamines. *Anal. Chem.* **48**: 1287 – 1293
- LANGMANN P., SCHIRMER D., VATH T., ZILLY M., KLINKER H. (2001) High-performance liquid chromatographic method for the determination of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz in plasma of patients during highly active antiretroviral therapy. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **755**:151-156.
- LA-SCALEA MA., SERRANO SHP, FERREIRA EL., BRETT A.M.O.(2002) Voltammetric behavior of benznidazole at a DNA-electrochemical biosensor. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29**:561-568
- LAVIRON, E. (1979) General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem.*, **101**: 19-23.
- LAVIRON, E., ROULIER, L., DEGRAND, C. (1980) A multiplayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: Part II theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction. *J. Electroanal. Chem.*, **112**: 11 – 23
- LEVISON, P.R., DENNIS, J.W., JONES, K.D., PHILPOTT, R.W., TAYLOR, S.L., GRIMM, V.(1998). New approaches in the binding of DNA for clinical applications, *Clin. Chem.*, **44**: 2060-2061.
- LIAO K. and HUANG H. (2005). Femtomolar immunoassay based on coupling gold nanoparticle enlargement with square wave stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, In Press.
- LIU, S., YE, J., HE, P., FANG, Y. (1996). Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode, *Anal. Chim. Acta*, **335**: 239-243.
- LIU, J., ABID, S., HAIL, M.E., LEE, M.S., HANGELAND, J., ZEIN, N. (1998). Use of affinity capillary electrophoresis for the study of protein and drug interactions, *Analyst*, **123**: 1455-1459.
- LIU, G., WANG, J., WU, H., LIN, Y., LIN, Y. (2007). Nanovehicles based bioassay labels, *Electroanalysis*, **19**: 777-785.
- LUCARELLI, F., PALCHETTI, I., MARAZZA, G., MASCINI, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, **56**: 949-957.
- LUCARELLI, F., MARRAZZA, G., TURNER, A.P.F., MASCINI, M. (2004). Carbon and gold electrodes as electrochemical transducer for DNA hybridization sensors. *Biosens. Bioelectron.*, **19**: 515-530.

- LUKASOVA, E., JELEN, F. AND PALECEK, E. (1982). Electrochemistry of Osmium Nucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted double-stranded regions in DNA, *Gen. Physiol., Biophys.*, **1**: 53-70.
- LUNTE, S.M., RADZIK, D.M.(1996) Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis, Elsevier Science Ltd, New York.
- MADDEN, E.F., (2003). The role of combined metal interactions in metal carcinogenesis: a review. *Rev.Environ.Health*, **18**: 91-109.
- MARAZZA, G., CHIANELLA, I., MACSINI, M. (1999). *Anal. Chim. Acta*, **387**: 297-307.
- MARIN, D., PEREZ, P., TEIJEIRO, C., PALECEK, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophysical Chemistry*, **75**: 87-95.
- MARTÍNEZ-HUITLE, C. A., FERRO, S., REYNA, S., CERRO-LÓPEZ, M., DE BATTISTI, A., QUIROZ, M. A. (2008) Electrochemical oxidation of oxalic acid in the presence of halides at boron doped diamond electrode. *J. Braz. Chem. Soc.*, **19**: 150.
- MASAWAT, P., LIARUANGRATH, S., VANEESORN, Y., LIARUANGRATH, B., (2002). Design and fabrication of a low-cost flow-through cell for the determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations by flow injection cyclic voltammetry. *Talanta*. **58**: 1221-1234.
- MASINI, M. (2001). Affinity electrochemical biosensors for the pollution control, *Pure Appl. Chem.*, **73**(No. 1): 23-30.
- MASINI, M., BAGNI, G., DI PETRO, M.L., RAVERA, M., BARACCO, S., OSELLA, D., (2006) Electrochemical biosensor evaluation of the interaction between DNA and metallo-drugs. *Biometals*, **19**: 409-418.
- MATTHEWS C.Z., WOLF E.J., MAZENKO R.S., HADDIX-WIENER H., CHAVEZ-ENG C.M., CONSTANZER M.L., DOSS G.A., MATUSZEWSKI B.K. (2002) Determination of efavirenz, a selective non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using HPLC with post-column photochemical derivatization and fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**:925-934.
- MATSON W.R., ROE, D.K. and CARRIT, D.E. (1965). Solvent extraction and spectrometric determination" *Anal. Chem.*, **37**: 1595-1603.
- McDOWALL, R.D. (1999) The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. *Anal.Chim.Acta*, **391**:149-158.
- MCGOWN, L.B., JOSEPH, M.J., PITNER, J.B., VONK, G.P. VE LINN, C.P. (1995). The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition, *Anal. Chem.*, **67**: 663 A-668 A.
- MERİÇ, B., (2001). Elektrokimyasal Hibridizasyon İndikatörleri Kullanılarak DNA Dizilerinin Saptanması. Yüksek lisans tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- MILLAN, K.M., SPURMANIS, A. J., MIKKELSEN, S.R. (1992). Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes. *Electroanalysis.*, **4**: 929- 932.
- MILLAN, K.M., MIKKELSEN, S.R.(1993). Sequence-selective biosensor for DNA Based on electroactive hybridization indicators, *Anal. Chem.*, **65**: 2317-2323.
- MILLAN, K.M., SARAULLO, A., MIKKELSEN, S.R. (1994). Voltammetric DNA Biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode, *Anal. Chem.*, **66**: 2943-2948.
- MIKKELSEN, S.R. (1996). Electrochemical biosensors for DNA sequence detection- a review, *Electroanalysis.*, **8** (1): 15-19.
- MOLINIER-JUMEL, C., MALFOY, B., REYNAUD, J. A. AND AUBEL-SADRON, G. (1978). Electrochemical study of DNA-Anthracyclines interactions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **84**(2): 441-449.

- MONZON, L.M.A., YUDİ, L.M. (2001) Voltammetric analysis of lipophilicity of benzodiazepine derivatives at the water/1,2-dichloroethane inter- face. *J. Electroanal. Chem.* 495: 146.
- MÜLLER, W., CROTHERS, D.M. (1975). Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids, *Eur. J. Biochem.*, **54**: 267-277.
- NAMURA, S., NOZAKI, K. and OKAZAKI, S., (1991). Fundamental studies on fast scan stripping, voltammetry with microelectrode. *Electroanalysis*, **3**: 617-624.
- NAKAMURA, H., KARUBE, I. (2003). Current research activity in biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**: 446-468.
- NAWAZ, H., RAUF, S., AKHTAR, K., KHALID, A. M. (2006). Electrochemical DNA biosensor for the study of ciprofloxacin – DNA interaction, *Analytical Biochemistry*, **354**: 28-34.
- NICHOLSON, R.S., SHAIN, I., (1964) Theory of stationary electrode polarography. *Anal. Chem.* **36**: 706 – 723
- OHE, T., WATANABE, T., WAKABAYASHI, K. (2004). Mutagens in surface waters: a review, *Mutat. Res.*, **567**: 109-149.
- OLIVEIRA-BRETT, A.M., PIEDADE, J.A.P., SILVA, L.A., DICULESCU, V.C. (2004). Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Analytical Biochemistry*, **332**: 321-329.
- OLIVEIRA-BRETT, A.M., CHIORCEA PAQUIM, A.M., DICULESCU, V.C, PIEDADE, J.A.P. (2006) “ Electrochemiatry of nanoscale DNA surface films on carbon” *Medical Engineering & Physics*. **28**: 963-970.
- ONAT T., EMERK K. Editörler, Temel Biyokimya 2. (1997). Bölüm 8: Bilgi Kaynağı olan Makromoleküller; Saray Medikal Yayıncılık, 2. Baskı: sayfa 565-567.
- OPYDO, J., (1992). The influence of complexing agents on the effectiveness of electrochemical masking with anion surfactans in anodic stripping voltammetry” *Talanta*, **39**: 229- 234.
- OSTATNA, V., USLU, B., DOGAN, B. , ÖZKAN, S.A., PALECEK, E. (2006) “Native and denatured bovine serum albumin. DC polarography, stripping voltammetry and constant current chronopotentiometry ” *J.Electroanal.Chem.*, **593**: 172-178
- OSTERYOUNG, R.A. and CHRISTIE, J.H., (1974). Theoretical treatment of pulsed voltametric stripping at thin film mercury electrode, *Anal. Chem.*, **46**: 351-354.
- OZKAN D., KARADENİZ H., ERDEM A., MASCINI M., OZSOZ M. (2004). Electrochemical genosensor for Mitomycin C- DNA interaction based on guanine signal, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**: 905-912.
- OZSOZ, M., ERDEM, A., KARA, P., KERMAN, K., ÖZKAN, D., (2002). Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal. *Electroanalysis*, **15**: 613-619.
- ÖZKAN, B., BİRYOL, İ., ŞENTÜRK, Z. (1993) “Modifiye elektrotlara genel bir bakış” *FABAD J.Pharm.Sci.*, **18**(2): 95-101
- ÖZKAN, S.A., BİRYOL, İ., ŞENTÜRK, Z., (1994) An activation method for glassy carbon electrode. *Tr. J.Chem.* **18**: 34-38
- ÖZKAN, S.A., ŞENTÜRK, Z., BİRYOL, İ., (1997) Voltammetric determination of ornidazole in pharmaceutical dosage forms based on reduction at an activate glassy carbon electrode. *Int.J. Pharm.* **157**: 137 – 144
- ÖZKAN, S.A., ÖZKAN, Y., ŞENTÜRK, Z., (1998) Electrochemical reduction of metronidazole at activated glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**: 3299 – 3305

- ÖZKAN, S.A., ERK, N., USLU, B., YILMAZ, N., BİRYOL, İ., (2000) Study on electrooxidation of cefadroxil monohydrate and its determination by differential pulse voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17**: 3299 - 3305
- ÖZKAN S.A. USLU B., (2002) Electrochemical study of fluvastatin sodium--analytical application to pharmaceutical dosage forms, human serum, and simulated gastric juice. *Anal. Bioanal. Chem.* **372**: 582-586
- ÖZKAN, S.A., USLU, B., ABOUL-ENEIN, H.Y. (2003a) Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **33**: 155-181
- ÖZKAN S.A., USLU B., ABOUL-ENEIN H.Y., (2003b). Voltammetric investigation of Tamsulosin. *Talanta*, **61**: 147
- PALASKA, P., ARİTZOGLOU, E., GIROUSİ, S. (2007) "Sensitive detection of cyclophosphamide using DNA-modified carbon paste, pencil graphite and hanging mercury drop electrodes" *Talanta*. **72**: 1199-1206.
- PALECEK, E. (1988). New trends in electrochemical analysis of nucleic acids. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.*, **20**: 179-194.
- PALECEK, E., (1995). Nucleic acids: electrochemical and immunochemical methods. Encyclopedia of Analytical Science. (ed. by Alan Townshend), London, Academic press, Vol. **6**: 3600-3609.
- PALECEK, E. (1996). From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes, *Electroanalysis.*, **8** (1): 7-14.
- PALECEK, E. (2002). Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta*, **56**: 809-819.
- PALECEK E., JELEN F., (2002). Electrochemistry of nucleic acids and development of DNA sensors. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **32**: 261-270
- PAPADOYANNIS, I.N., SAMANIDOU, V.F. (2004) Validation of HPLC instrumentation. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* **27**, 753-783
- PANZER, R.E., (1972) Behaviour of carbon electrodes in aqueous and non – aqueous system. *J. Electrochem. Soc.*, 119 – 864.
- PATRIARCHE, G.J., CHATEAU – GOSSELIN, M., VANDENBALCK, J.L., (1979). Polarography and related electroanalytical techniques in pharmacy and pharmacology. *Electroanal. Chem.* **11**: 141 – 189
- PEREZ, P., TEIJEIRO, C., MARIN, D. (1999). Interactions of surface-confined DNA with electroreduced mitomycin C comparison with acid-activated mitomycin C, *Chemico-Biological Interactions*, **117**: 65-81.
- PIETRZYK, D.J.; FRANK, C.W. (1979). *Analytical Chemistry*, 2. Baskı, Academic press: s.226-239.
- PIVIDORI, M.I., MERKOÇI, A., ALEGRET, S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, **15**: 291-303.
- PLAMBECK, J.A., LOWN, J.W. (1984). Electrochemical Studies of antitumor antibiotics: V. An electrochemical method of measurement of the binding of Doxorubicin and Daunorubicin derivatives to DNA, *J. Electrochem. Soc.*, **131** (11): 2556-2563.
- POIRIER, M.C., SANTELLA, R.M., WESTON, A. (2000) Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis*, **21**: 353-359.
- PRAVDA, M., (1998) Application of electrochemical sensors and detection system in biomedical analysis. Thesis presented to fulfil the requirements for the degree of doctor in Pharmaceutical Sciences. Vrije Universiteit, Brussel.



- PRUDENZİATİ, M., 1994. Handbook of Sensors and Actuators 1; Volume-1: Thick film sensors. Elsevier Science B.V., Oxford, UK.
- RAUF, S., GOODING, J.J., AKHTAR, K., GHOURI, M.A., RAHMAN, M., ANWAR, M.A., KHALID, A.M. (2005). Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 205-217.
- RAMACHANDRAN G., KUMAR A.K., SWAMINATHAN S., VENKATESAN P., KUMARASWAMI V., GREENBLATT D.J. (2006) Simple and rapid liquid chromatography method for determination of efavirenz in plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **835**: 131-135.
- RICHARDSON, C. L., SPRINGFIELD, G.E.S. et al., Intercalation inhibition assay for compounds that interact with DNA or RNA, *Amerikan patent no*; 4,257,774 / 24 Mart 1981).
- RILEY, C.M., ROZANSKE, T.W., (1993) Development and Validation of Analytical Methods. New York, Elsevier Science Ltd.
- ROSS, Jr., (1977) The effect of anions hydrogen chemisorption and oxide formation in aqueous acids. *J. Electroanal. Chem.* **76**: 139-145.
- RUSLING, J.F., (1984). Variations in electron-transfer rate at polished glassy carbon electrodes exposed to air. *Anal. Chem.*, **56**: 575-578
- SAGAR K., FERNANDEZ ALVAREZ J.M., HUA C., SMYTH MR., MUNDEN R., (1992) Differential pulse voltammetric determination of sumatriptan succinate (1:1) in a tablet dosage form. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **10**: 17-21.
- SANZ-NEBOT V., BENAVENTE F., BARBOSA J. (2000) Separation and characterization of multicomponent peptide mixtures by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Application to crude products of the synthesis of leuprolide. *J. Chromatogr. A.* **870**(1-2): 315-334.
- SANZ-NEBOT V., BENAVENTE F., BARBOSA J. (2002) Liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis combined approach for separation and characterization of multicomponent peptide mixtures. Application to crude products of leuprolide synthesis. *J. Chromatogr. A.* **950**(1-2): 99-111.
- SARAS-NACENTA M., LOPEZ-PUA Y., LIPEZ-CORTES L.F., MALLOLAS J., GATELL J.M., CARNE X. (2001) Determination of efavirenz in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **763**: 53-59.
- SCHIAVON, G., ZOTTI, TONIOLO, R. and BONTEMPELLI, G., (1991). Anodic stripping voltammetry in highly-resistive media by electrodes supported on Ion exchange membranes. *Electroanalysis*, **3**: 527-534.
- SESHACHALAM U., NARASIMHA RAO D.V., CHANDRASEKHAR K.B. (2008) Validated enantiospecific LC method for determination of (R)-enantiomer impurity in (S)-efavirenz. *Pharmazie*. **63**: 107-109.
- SERVICE R.F. (1998). New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science.*, **282**: 396.
- SHEARER, C.M., CHRISTENSON, K., MUJHERJI, A., PAPARIELLO, C.J., (1972) Peak voltammetry at glassy carbon electrode of acetaminophen dosage forms. *J. Pharm. Sci.* **61**: 1627
- SHARMA, A., ROGERS, K.M. (1994). Biosensors. *Meas. Sci. Technol.* **5**: 461-472.
- SHABIR, G.A. (2003) Validation high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A.*, 987, 57-66.

- SINGH, J., RASTOGİ, S.K., SINGH, S.N., BHATIA, J.S. (2000) Quantitation of leuprolide acetate by high performance liquid chromatography. *J. Liq Chromatogr. RT.* **23**: 3023-3031.
- SIANGPROH W, WANGFUENGKANAGUL N, CHAILAPAKUL O (2003) Electrochemical oxidation of tiopronin at diamond film electrodes and its determination by amperometric flow injection
- SINDEN, R.R. (Editör) DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions of DNA; Academic Press, California. (1994). sayfa 1-57.
- SKOOG, D. A., WEST, D.A., HOLLER, F.J. (1996) Analitik Kimyanın Temelleri Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esma Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.L., NIEMAN, T.A., (1998). Principles of Instrumental Analysis. (Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Enstrümental Analiz İlkeleri) 1. baskı. Bilim Yayıncılık Ltd.Şti, Ankara.
- SKOOG – HOLLER – NIEMAN. (2000). Analitik Kimya Temelleri. 7. Baskı Çeviri Editörleri Esma Kılıç ve ark., Ankara, Bilim Yayıncılık s: 460 – 466
- SMYTH, M.R., VOS, J.G., (1992) Analytical Voltammetry, Volume XXVII, New York, Elsevier Publications,
- SOFIANOS Z.D., KATSİLA T., KOSTOMİTSOPOULOS N., BALAFAS V., MATSOUKAS J., TSELİOS T., TAMVAKOPOULOS C., (2008) In vivo evaluation and in vitro metabolism of leuprolide in mice-mass spectrometry-based biomarker measurement for efficacy and toxicity. *J. Mass Spectrom.*, **43**(10):1381-1392.
- SOLAK, A.O., TEMİZER, A., ALTINÖZ, S and ÖZER, D., (1988). Determination of ranitidine with adsorptive stripping voltammetry., *J.Fırat Uni.*, **3**: 23-29.
- SÖĞÜT, E., Ö., KAYALI, A. (2005). Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **34**(1): 41-57.
- STOICA, GABRIELA R., ORGULESCU E., MARINESCU, D. and BAIULESCU G. (2002). Differential pulse cathodic stripping voltammetric determination of selenium in pharmaceutical products. *J. Pharm. and Bio. Anal.*, **30**: 1425-1429.
- STRADIOTTO, N.R., YAMANAKA, H., ZANONI, M.V.B., (2003). Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**: 159-173.
- STROBEL, H.A., “Chemical Instrumentation”, Addison – Wesley Publishing Company Inc., London 1973
- STRYJEWSKA, E., and RUBEL, S., “Adsorptive stripping voltammetry for determination of trace amounts of aluminium with calmagite”, *Electroanalysis*, **3**, 995-998, 1991.
- STEEL, A.B., HERNE, T.M., TARLOV, M.J. (1998). Electrochemical Quantitation of DNA immobilized on gold, *Anal. Chem.*, **70**: 4670-4677.
- STEENKEN, S., JOVANOVIĆ, S.V., (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**: 617-618.
- STEINBACH, P.B., HURTUBISE, R.J., (2000). Fluorescence of tetrols, tetrols complexed with DNA and benzo[a]pyrene-DNA adducts in methanol / water solutions, *App. Spect.*, **54**: 287-293.
- STUTTS, K.J., KOVACH, P.M., KUHR, W.G., WHITMAN, R.M. (1983). Enhanced electrochemical reversibility at heat treated glassy carbon electrodes. *Anal. Chem.* **55**: 1632 – 1634
- SWARTZ, M.E., KRULL, I.S., (1997) Analytical method development and validation, Marcel Dekker, New York.

- ŞAHINCI, F., (2005). İlaç-DNA Etkileşmesinin Elektrokimyasal Algılanmasına Dayalı Tasarımlar. Yüksek lisans tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- ŞENTÜRK, Z., ÖZKAN, S.A., USLU, B., BİRYOL, İ., (1996) Anodic voltammetry of fluphenazine at different solid electrodes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**: 365 – 370
- ŞENTÜRK, Z., ÖZKAN, S.A., ÖZKAN, N., (1998) Electroanalytical study of nifedipine using activated glassy carbon electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**: 801 – 807
- TAKENAKA, S., IHARA, T., TAKAGI, M. (1990). Bis-9 acridinyl derivative containing a viologen linker chain: electrochemically active intercalator for reversible labelling of DNA, *J. Chem. Soc., Chem. Communications*, **21**: 1485-1487.
- TAYLOR, R.J., HUMPFREY, A.A.(1973) Electrochemical studies on glassy carbon electrodes. *Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, **42**:347- 354
- TEIJEIRO, C., PEREZ, P., MARIN, D., PALECEK, E. (1995). Cyclic voltammetry of mitomycin C and DNA , *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **38**: 77-83.
- TELEFONCU A. (1999). Biyosensörler. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi. İzmir.
- THEVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A., WILSON G.S., (1999). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.*, **71**: 2333-2348.
- THORNTON, D.C., CORBY, K.T., SPENDEL, V.A., JORDAN, J., ROBBAT, A., RUTSTORM, D.J., EROS, M., RITZLER, G., (1985). Pretreatment and validation procedure for glassy carbon voltammetric indicator electrodes. *Anal. Chem.*, **57**:150-155
- TIAN, X., LI, F., ZHU, L., YE, B. (2008). Study on the electrochemical behavior of anticancer herbal drug rutin and its interaction with DNA. *J. Electroanal. Chem.* **621**:1-6.
- TJADEN, U.R., LANKELMA, J., POPPE, H., MUUSZE, R.G., (1976) Anodic coulometric detection with a glassy carbon electrode in combination with reversed phase high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* **125**: 275 - 286
- TUİTE, E., NORDEN, B. (1994). Sequence-specific interactions of methylene blue with polynucleotides and DNA: A spectroscopic study, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**: 7548-7556.
- TURNER, J.A., CHRISTIE, J.H., VUKOVIC, M., OSTERYOUNG, R.A., (1977) Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: Experimental. *Anal. Chem.* **49 (13)**: 1904 - 1908
- TURNER, A.P.F. (1987). "Biosensors: Fundamentals and Applications", Ed: Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G. S.; Oxford University Pres. Oxford, sayfa 5-7.
- TOMSCHIK, M., JELEN, F., HAVRAN, L., TRNKOVA, L., NIELSEN, P.E., PALECEK, E. (1999). Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, **476**: 71-80.
- TUNÇEL, N., AYRAL, M.N., BİRYOL, İ., (1984) İn vivo ve in vitro elektrokimyasal oksijen tayini. *Doğa Bilim Dergisi*, **8**: 82 – 89
- TURNER, A.P.F.(1987). Biosensors: Fundamentals and Applications, Editörler; Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S.; Oxford University Press, Oxford, sayfa v-vii.
- UENO H., MATSUO S. (1991) "High-performance liquid chromatography followed by radioimmunoassay for the determination of a luteinizing hormone-releasing hormone analogue, leuporelin, and its metabolite." *J. Chromatogr.*, **566**(1): 57-66.
- USLU, B., YILMAZ, S., ÖZKAN, S.A. (2001) "Determination of olsalazine sodium in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry" *Die Pharmazie* ,**56**(8): 629-632
- USLU, B., (2002) "Voltammetric analysis of alfuzosin HCl in pharmaceuticals, human serum and simulated gastric juice" *Electroanalysis* , **14(12)**: 866-870

- USLU, B., ÖZKAN, S.A., (2002) Electrochemical characterisation of nefazodone hydrochloride and voltammetric determination of the drug pharmaceuticals and human serum. *Anal. Chim. Acta*, **462**: 49–57
- USLU B., ÖZKAN S.A. (2004), Anodic voltammetry of abacavir and its determination in pharmaceuticals and biological fluids. *Electrochim.Acta* **49**: 4321
- USLU, B., DOĞAN, B., ÖZKAN, S.A., ABOUL-ENEIN, H.Y., (2005a) “ Voltammetric investigation and determination of mefloquine” *Electroanalysis*, **17**: 1563-1570
- USLU, B., DOĞAN, B., ÖZKAN, S.A., (2005b) “Electrochemical studies of ganciclovir at glassy carbon electrodes and its direct determination in serum and pharmaceuticals by square wave and differential pulse voltammetry” *Anal. Chim. Acta*, **537**: 307-313
- USLU, B., ÖZKAN, S.A., ŞENTÜRK, Z., (2006) Electrooxidation of the antiviral drug valacyclovir and its square-wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human biological fluids. *Anal. Chim. Acta*, **555**: 341-347
- USLU, B., ÖZKAN S.A. (2007a ) Electroanalytical application of carbon based electrodes to the Pharmaceuticals. *Anal.Lett.* **40**: 817 – 853.
- USLU, B., ÖZKAN, S.A. (2007b) Solid Electrodes in Electroanalytical Chemistry: Present Applications and Prospects for High-throughput Screening of Drug Compounds, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, CC&HTS*, **10**: 495-513.
- USLU, B., DOĞAN-TOPAL, B., ÖZKAN, S.A., (2008) Electroanalytical investigation and determination of pefloxacin in pharmaceuticals and serum at boron-doped diamond and glassy carbon electrodes, *Talanta*, **74**: 1191-1200.
- ÜNERİ, S., (1979) *Elektrokimya Cilt 2*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi.
- VAN DER LINDEN, W.E., DIEKER, J.W., (1986) Glassy carbon as electrode material in electroanalytical chemistry. *Anal. Chim. Acta.*, **199**: 1–24
- VELDKAMP A.I., van HEESWIJK R.P., MEENHORST P.L., MULDER J.W., LANGE J.M., BEIJNEN J.H., HOETELMANS R.M. (1999) Quantative determination of efavirenz (DMP 266), a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **734**(1): 55-61.
- VILLANI P., PREGNOLATO M., BANFO S., RETTANİ M., BURRONİ D., SEMINARİ E., MSERATİ R., REGAZZİ M.B. (1999) High-performance liquid chromatography method for analyzing the antiretroviral agent efavirenz in human plasma. *Ther. Drug Monit.* **21**:346-350.
- WANG, J., HUTCHINS, L.D., (1985a) Activation of glassy carbon electrodes by alternating current electrochemical treatment. *Anal. Chim. Acta.*, **167**: 325–334
- WANG, J., LUO, D. B. (1985b). The determination of bilirubin by adsorptive stripping voltammetry. *J.Electroanal.Chem.*, **185**: 61-71
- WANG, J., *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry on Laboratory Medicine*. VCH. Publishers, N.Y 1988
- WANG, J., CAI, X., RIVAS, G., SHIRAISHI, H., FARIAS, P.A.M., DONTA, N. (1996a). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus, *Anal. Chem.* **68**: 2629-2634.
- WANG, J., RIVAS, G., LUO, D., CAI, X., VALERA, F.S., DONTA, N. (1996b). DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines, *Anal. Chem.*, **68**: 4365-4369.
- WANG, J., RIVAS, G., CAI, X., , SHIRAISHI, H., FARIAS, A.M.P., DONTA, N., LUO, D. (1996c). Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes, *Anal. Chim. Acta*, **332**: 139-144.

- WANG, J., RIVAS, G., LUO, D., CAI, X., VALERA, F.S., DONTA, N., FARIAS, P. A. M., SHIRAISHI, H. (1996d). DNA Biosensor for the detection of hydrazines, *Anal. Chem.*, **68**: 2251-2254.
- WANG, J., CAI, X., RIVAS, G., SHIRAISHI, H. (1996e). Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes, *Anal. Chim. Acta*, **326**: 141-147.
- WANG, J., NIELSEN, P., JIANG, M., CAI, X., FERNANDES, J.R., GRANT, D.H., OZSOZ, M., BEGLIETER, A., MOWAT, M. (1997a). Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance, *Anal. Chem.*, **69**: 5200-5202.
- WANG, J., RIVAS, G., CAI, X., PALECEK, E., NIELSEN, P., SHIRAISHI, DONTA, N., LUO, D., PARRADO, C., CHICHARRO, M., FARIAS, P.A.M., VALERA, F.S., GRANT, D.H., OZSOZ, M., FLAIR, M.N. (1997b). DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Anal. Chem.*, **347**:1-8.
- WANG, J., RIVAS, G., OZSOZ, M., GRANT, D.H., CAI, X., PARRODO, C. (1997c). Microfabricated electrochemical sensor for the detection of radiation-induced DNA damage, *Anal. Chem.*, **69**: 1457-1460.
- WANG, J., RIVAS, G., FERNANDES, J.R., JIANG, M., PAZ, J.L.L., WAYMIRE, R., NIELSEN, T.W., GETTS, R.C. (1998a). Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon electrodes, *Electroanalysis*, **10**(8): 553-556.
- WANG, J., RIVAS, G., FERNANDES, J.R., PAZ, J.L.L., JIANG, M., WAYMIRE, R. (1998b). Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor, *Anal. Chim. Acta.*, **375**: 197-203.
- WANG, J., FERNANDES, J.R., KUBOTA, L.T. (1998c). Polishable and renewable DNA hybridization biosensors, *Anal. Chem.*, **70**: 3699-3702.
- WANG, J., OZSOZ, M., CAI, X., RIVAS, G., SHIRAISHI, H., GRANT, D.H., CHICARRO, M., FERNANDES, J. R., PALECEK, E. (1998d). Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, **45**: 33 - 40.
- WANG, J., BOLLO, S., PAZ, J.L.L., SAHLIN, E., MUKHERJEE, B., (1999). Ultratrace measurements of nucleic acids by baseline-corrected adsorptive stripping square-wave voltammetry. *Anal. Chem.*, **71**: 1910-1913.
- WANG, J., (2000). Analytical Electrochemistry. Second Edition. John Wiley & Sons., Inc., New York, USA.
- WANG, J., KAWDE, A.N., SAHLIN, E., (2000). Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. *Analyst*, **125**: 5-7.
- WANG, J., KAWDE, A.N., (2001). Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Anal. Chim. Acta*, **431**: 219-224.
- WANG, J., KAWDE, A.N., ERDEM, A., SALAZAR, M. (2001). Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, **126**: 2020- 2024.
- WANG, J., (2002) Electrochemical nucleic acid biosensors. *Anal. Chim. Acta*, **469**: 63-71.
- WANG, L.R., WANG, R.X., YANG, L.Z., LU, G.H., (2005). Study of the interaction of CTZAMB-Cu(II) with DNA and determination of DNA. *J. Electroanal. Chem.*, **585**: 214-219.
- WANG, L., LIN, L., YE, B. (2006). Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42**: 625-629.
- WIGHTMAN R.M., DEAKIN, M.R., KOVACH, P.M., KUHR, W.G., STUTTS, K.J., (1984) Methods to improve electrochemical reversibility at carbon electrodes, *J. Electrochem. Soc.*, **131**: 1578 – 1583

- WOGAN, G.N., HECHT, S.S., FELTON, J.S., CONNEY, A.H., LOEB, L.A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, **14**: 473-486.
- WOPSCALL, R. H. AND SHAİN, I., (1967). Adsorption effect in Stationary Electrode Polarography with a Chemical Reaction Following Charge Transfer, *Anal. Chem.*, **39**: 1535.
- XIA, C., GUOLI, S., JIANHUI, J., RUQIN, Y.(1999). Intercalation of Pharmorubicin anticancer drug to DNA studied by cyclic voltammetry with analytical applications, *Anal. Lett.*, **32** (4): 717-727.
- YALÇIN, G. (2007). Bazı kimyasal maddelerin dna ile etkileşmesinin biyosensörle ile algılanması. Yüksek lisans tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- YILDIZ, A., GENÇ, Ö., (1993). Enstrümental Analiz. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları 1.Baskı, s: 352
- YILDIZ, A., GENÇ, Ö., (1993) Enstrümental Analiz, Hacettepe Yayınları A-64, sayfa;289-384.
- YILDIZ, A., GENÇ, Ö., BEKTAŞ, S., (1997). Enstrümental Analiz Yöntemleri. 2. baskı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, Ankara.
- YILMAZ, N.,ÖZKAN, S.A., USLU, B.,ŞENTÜRK, Z., BİRYOL, İ. (1998) “Determination of terbutaline based on oxidation by voltammetry” *J.Pharm.Biomed.Anal.*,**17**:349-355
- YILMAZ S., USLU B., ÖZKAN S.A. (2001), Anodic oxidation of etodolac and its square wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum. *Talanta* **54**: 351
- ZEN, J.-M., KUMAR,A.S. TSAİ, D.-M., (2003). Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry. *Electroanalysis* **15**: 1073-1087.
- ZHAN, Y., CHEN, X., ZHAO, X., ZHONG, D. (2009) Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of leuprolide in human serum. *J. Chromatogr. B.* **877**: 3194-3200.
- ZHANG, S., VİLLALTA, P.W., WANG, M., HECHT, S.S. (2007). Detection and Quantitation of Acrolein-Derived 1, N<sup>2</sup>-Propanodeoxyguanosine Adducts in Human Lung by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**: 565-571.
- ZHANG J, OYAMA M (2004), Electroanalysis of myoglobin and hemoglobin with a boron-doped diamond electrode, *Microchemical Journal*, **78**: 217-222.
- ZHOU, H., SUN, Z., HOSHİ, T., KASHİWAGİ, Y., ANZAI, J., Lİ, G. (2005) “ Electrochemical studies of danthron and the DNA-danthron interaction” *Biophysical Chemistry*. **114**: 21-26.
- ZUMAN, P., BREZINA, M., (1962). Polarographic analysis in pharmacy progress in polarography. Vol. 2th Ed. P. Zuman, I.M. Kolthoff, New York, Intersence Publishers.

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

|                                                                                                                               |                                                   |                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>SOYADI, ADI</b><br>DOĞAN-TOPAL Burcu                                                                                       | <b>DOĞUM YERİ, TARİHİ</b><br>AKÇAKOCA, 01.01.1981 |                                                     |
| <b>UYRUĞU</b> TC                                                                                                              | <b>MEDENİ DURUMU</b> EVLİ                         |                                                     |
| <b>YAZIŞMA ADRESİ :</b><br>ANKARA ÜNİVERSİTESİ, ECZACILIK FAKÜLTESİ, ANALİTİK KİMYA<br>ANABİLİM DALI, 06100, Tandoğan, ANKARA |                                                   |                                                     |
| <b>TELEFON</b><br>0 312 203 3173                                                                                              | <b>FAKS</b><br>0 312 223 82 43                    | <b>E-MAIL:</b><br>bdogan@pharmacy.ank<br>ara.edu.tr |

### II- Eğitimi

| ÖĞRENİM<br>DÖNEMİ | DERECE<br>(**)   | ÖĞRENİM BİRİMİ             | ÖĞRENİM ALANI  |
|-------------------|------------------|----------------------------|----------------|
| 2005-2009         | Doktora          | Ankara Üniversitesi        | Analitik Kimya |
| 2002-2005         | Yüksek<br>Lisans | Ankara Üniversitesi        | Analitik Kimya |
| 1998-2002         | Lisans           | Ankara Üniversitesi        | Eczacılık      |
| 1995-1998         |                  | Akçakoca Lisesi (Y.Dil Ağ) |                |
| 1992-1995         |                  | Akçakoca Lisesi Ortaokulu  |                |
| 1987-1992         |                  | Akçakoca Yalı İlkokulu     |                |

\* **Yabancı Dili :** İngilizce (ÜDS: 70)

**III- Ünvanları**

| ÖĞRENİM DÖNEMİ | ÜNVANI        |
|----------------|---------------|
|                | Doktor Eczacı |
| 2005           | Uzman Eczacı  |
| 2002           | Eczacı        |

**IV- Mesleki Deneyimi**

| GÖREV DÖNEMİ                | GÖREV TÜRÜ          | KURULUŞ             |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|
| HAZİRAN 2003-<br>ŞUBAT 2004 | ECZACI              | SSK ULUS HASTANESİ  |
| MART 2004-<br>Devam ediyor  | ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ | ANKARA ÜNİVERSİTESİ |

**VI- Bilimsel İlgi Alanları**

## Uluslararası makaleler

- 1- **Doğan, B.**, Uslu, B., Özkan, S.A., (2004). Anodic Adsorptive Stripping Voltammetry of the Hypertensive Drug Candesartan Cilexetil at a Glassy Carbon Electrode. *Die Pharmazie*. **11: 840-844**.
- 2- **Doğan, B.**, Uslu, B., Özkan, S.A., (2005). Electrochemical Characterization of Flupenthixol and Rapid Determination of the Drug in Human Serum and Pharmaceuticals by Voltammetry. *Anal. Lett.*, **38: 641-656**.
- 3- Uslu, B., **Doğan, B.**, Özkan, S.A., Aboul-Enein, H.Y., (2005). Voltammetric investigation and determination of mefloquine. *Electroanalysis* **17: 1563-1570**
- 4- Uslu, B., **Doğan, B.**, Özkan, S.A., (2005). Electrochemical studies of ganciclovir at glassy carbon electrodes and its direct determination in serum and pharmaceuticals by square wave and differential pulse voltammetry. *Anal. Chim. Acta* **537: 307-313**.
- 5- Gölcü, A., **Doğan, B.**, Özkan, S.A., (2005). Anodic Voltammetric Behavior and Determination of Cefixime in Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Fluids.



- Talanta*, **67**: 703-712.
- 6- **Doğan, B.**, Uslu, B., Süzen, S., Özkan, S.A., (2005). Electrochemical evaluation of nucleoside analogue lamivudine in pharmaceutical dosage forms and human serum. *Electroanalysis*, **17**: 1886-1894.
  - 7- Gölcü, A., **Doğan, B.**, Özkan, S.A., (2005). Anodic Voltammetric Behaviour and Determination of Antihistaminic Agent: Fexofenadine HCl. *Anal. Lett.*, **38**: 1913-1931.
  - 8- **Doğan, B.**, Özkan, S.A., (2005). Electrochemical Behavior of Carvedilol and its Adsorptive stripping determination in dosage forms and biological fluids. *Electroanalysis*, **17**: 2074-2083.
  - 9- Uslu, B., **Doğan, B.**, Özkan, S.A., Aboul-Enein, H.Y., (2005). Electrochemical behavior of vardenafil on glassy carbon electrode: Determination in tablets and human serum. *Anal. Chim. Acta*, **552**: 127-134.
  - 10- **Doğan, B.**, Canbaz, D., Özkan, S.A., Uslu, B., (2006) Electrochemical methods for determination of protease inhibitor indinavir sulfate in pharmaceuticals and human serum. *Die Pharmazie* **61**: 409-413.
  - 11- Özkan, S.A., **Doğan, B.**, Uslu, B., (2006). Voltammetric analysis of the novel antipsychotic drug quetiapine in human serum and urine. *Microchim. Acta* **153**: 27-35.
  - 12- V.Ostatna, B.Uslu, **B.Dogan**, S.A. Özkan, E.Palecek (2006). Native and denatured bovine serum albumin. DC polarography, stripping voltammetry and constant current chronopotentiometry. *J.Electroanal.Chem.*, **593**: 172-178,.
  - 13- Bozkaya, P., **Dogan, B.**, Suzen, S., Nebioğlu, D., Özkan, S.A., (2006). Determination and Investigation of Electrochemical Behaviour of 2-Phenylindole Derivatives: Discussion on Possible Mechanistic Pathways. *The Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*. **51**: 125-139.
  - 14- Tuncel M., Dogrukol-Ak D., Yeniceli D., Uslu, B., **Dogan B.** (2006) Capillary electrophoretic determination of droperidol in tablets and human serum” *Chromatographia*, **63**: 507- 511.
  - 15- C.S. Erdurak-Kılıç, B.Uslu, **B.Doğan**, U.Özgen, S.A. Özkan, M.Coşkun (2006). Anodic voltammetric behavior and selective determination of ascorbic acid in pharmaceutical dosage forms and some rosa species of Turkey” *J.Anal.Chem.*, **61**: 1113-1120.
  - 16- Y. Altun, **B. Dogan**, S. A. Özkan, B. Uslu, (2007) Development and Validation of Voltammetric Techniques for Nabumeton in Pharmaceutical Dosage Form, Human Serum and Urine. *Acta Chimica Slovenica*, **54**: 287-294 .
  - 17- **B. Dogan-Topal** , B. Uslu, S.A. Özkan, (2007) Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of valganciclovir in human serum and tablets. *Chromatographia*, **S1**: 97-101,.
  - 18- **B. Dogan**, S. Tuncel, B. Uslu, S.A. Özkan, (2007) Selective electrochemical behavior of highly conductive boron-doped diamond electrodes for fluvastatin sodium oxidation. *Diamond & Related Materials*, **16**: 1695-1704.
  - 19- **B. Dogan-Topal**, S.A. Özkan, B. Uslu, (2007). Simultaneous Determination of Abacavir, Efavirenz and Valganciclovir in Human Serum Samples by Isocratic High-Performance Liquid Chromatography with DAD Detection,

*Chromatographia*, **S1**: 25-30.

- 20- **B. Dogan-Topal**, B. Uslu, S.A. Özkan, (2007) Investigation of Electrochemical Behavior of Lipid Lowering Agent Atorvastatin Calcium in Aqueous Media and Its Determination from Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Fluids Using Boron-Doped Diamond and Glassy Carbon Electrodes. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, CC&HTS*, **10**: 571-582.
- 21- **B. Dogan-Topal**, B. Uslu, S.A. Özkan, P. Zuman, (2008) Electrochemical determination of HIV drug Abacavir based on its reduction. *Analytical Chemistry*, **80**: 209-216.
- 22- B. Uslu, **B. Dogan-Topal**, S.A. Özkan, (2008). Electroanalytical investigation and determination of pefloxacin in pharmaceuticals and serum at boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. *Talanta*, **74**: 1191-1200.
- 23- **B. Dogan-Topal**, A. Golcu, M. Dolaz, S.A. Özkan, (2009) Electrochemical Behaviour of the Bactericidal Cefoperazone and Its Selective Voltammetric Determination in Pharmaceutical Dosage Forms and Human serum, *Current Pharmaceutical Analysis*, **5**: 179-189.
- 24- **B. Dogan-Topal**, A. Golcu, M. Dolaz, S.A. Özkan, (2009) Anodic Oxidation of Antibacterial Drug Cefotaxime Sodium and Its Square Wave and Differential Pulse Voltammetric Determination in Pharmaceuticals and Human Serum, *Current Pharmaceutical Analysis*, **5**: 197-207.
- 25- Y. Altun, **B. Dogan-Topal**, B. Uslu, S. A. Özkan, (2009) Anodic behavior of sertindole and its voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum using glassy carbon and boron-doped diamond electrodes, *Electrochimica Acta*, **54**: 1893-1903.
- 26- **B., Dogan-Topal**, B., Uslu, S.A., Özkan, (2009) Voltammetric studies on the HIV-1 inhibitory drug Efavirenz: the interaction between dsDNA and drug using electrochemical DNA biosensor and adsorptive stripping voltammetric determination on disposable pencil graphite electrode, *Biosensors&Bioelectronics*, **24**: 2358-2364.
- 27- **B., Dogan-Topal**, A., Golcu, S.A., Özkan, (2009) Electrochemical Investigation and Determination of the antibacterial Loracarbef by voltammetric methods, *Analytical Letters*, **42**: 689-705.
- 28- Kul D., **Dogan-Topal, B.**, Kutucu, T., Uslu, B., Özkan, S.A., (2010) High-performance liquid chromatographic and First Derivative of the Ratio Spectrophotometric Determination of Amlodipine and Valsartan in their binary mixtures. *Journal of AOAC International*, **93(3)**: 882-890.
- 29- Bozal B., **Dogan-Topal, B.**, Uslu, B., Özkan, S.A., Aboul-Enein, H.Y., (2009) Quantitative analysis of irbesartan in pharmaceuticals and human biological fluids by voltammetry. *Anal.Lett.* **42**: 2322-2338.
- 30- **Dogan-Topal, B.**, Bozal B., Demircigil, B. T., Uslu, B., Özkan, S.A., (2009) Electroanalytical Studies and Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Atorvastatine Calcium in Binary Mixtures Using First Derivative of the Ratio-Voltammetric Methods. *Electroanalysis*, **21 (22)**: 2427-2439.
- 31- H. E. Satana, **B. Dogan-Topal**, B. Uslu, S. A. Özkan, (2010) Electrochemical Characterization and Rapid Voltammetric Determination of Riluzole in

Pharmaceuticals and Human Serum. *Anal.Lett.*, **in press**.

- 32- **Dogan-Topal, B.**, Tuncel, S., Özkan, S.A., (2010) Anodic Voltammetric Behavior and Determination of Rosiglitazone in Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Fluids on Solid Electrode, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, CC&HTS*, **13: 694-702**.
- 33- **B. Dogan-Topal**, S.A.Ozkan, B.Uslu, (2010) The analytical applications of square wave voltammetry on pharmaceutical analysis, *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*, **3: 83-100**.
- 34- **Dogan-Topal, B.**, Ozkan, S.A. (2011) A novel sensitive electrochemical DNA biosensor for assaying of anticancer drug leuprolide and its adsorptive stripping voltammetric determination, *Talanta*, **83: 780-788**.

## VII- Bilimsel Etkinlikleri

### -Yurt Dışı Çalışmalar:

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Ankara üniversitesi Bilimsel yayınları özendirme desteği ile Prof. Emil Palecek'in Institute of Biophysics, Lab of Biophysical Chemistry and Molecular Oncology, Brno, Czech Republic deki laboratuvarında protein elektrokimyası ve DNA biyosensörleri üzerinde 2 ay süre ile bilimsel araştırmaya katılmak. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### -Projeler:

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Bazı hipolipidemik ilaçların elektroanalitik incelenmesi, A.Ü. Bilimsel Araştırma ve Projeler Müdürlüğü, Proje No: 20030803043, 2003 –2006 (araştırmacı olarak)                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2. Bazı antiviral ilaçların DNA ile etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesi ve DNA biyosensörleri tasarımında kullanılması, Biyoteknoloji Enstitüsü, Proje No: G8, 2006 –2009 (araştırmacı olarak)                                                                                                                                                                                          |
| 3. Sefalosporin grubu (lorakarbef, sefprozil, sefaklor, sefaperazone, sefodizim, seftazidime ve sefataxim) antibiyotiklerin Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Fe(II), Fe(III), Pt(II), Pd(II) ve Ru(II) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu, elektroanalitik, kemilüminesans ve antibakteriyal özelliklerinin araştırılması, TÜBİTAK, Proje no: 105T371, 2006 – 2009 (araştırmacı olarak) |

- Sosyal Komite Üyeliği (2008-devam ediyor)

