

**DİETİLSTİLBESTROL VE PROPRANOLOL TAYİNİ İÇİN VOLTAMETRİK
VE AKIŞA ENJEKSİYON TEMELLİ YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşegül ÖZBAL

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali ÖZCAN

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kasım 2020

ÖZET

DIETİLSTİLBESTROL VE PROPANOLOL TAYİNİ İÇİN VOLTAMETRİK VE AKIŞA ENJEKSİYON TEMELLİ YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Ayşegül ÖZBAL

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kasım 2020

Danışman: Prof. Dr. Ali ÖZCAN

Tez çalışmasının ilk kısmında endokrin sistem bozucu kimyasallardan birisi olan dietilstilbestrol (DES)'ün elektrokimyasal olarak tayini iki ayrı metot ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak kalem ucu grafit (KUG) elektrot yüzeyinde altının indirgenmesiyle hazırlanan modifiye elektrot ile DES'in tayini için voltametrik yöntem oluşturulmuştur. Hazırlanan modifiye elektrot dönüşümlü voltametri (DV), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile karakterize edilmiştir. DES'in tayini amperometrik dedeksiyon (AD)'a sahip akışa enjeksiyon analiz (AEA) sistemi ile de araştırılmıştır. Oluşturulan AEA-AD sistemine C₁₈ kolon dahil edilerek sistemin performansı arttırılmış ve bu sistem DES'in tayini için ilk kez kullanılmıştır. Süt, süt tozu ve su gerçek örneklerinde yapılan analizler sonucunda %89,01-102,9 aralığında geri kazanım elde edilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında KUG elektroda elektrokimyasal ön işlem (EÖİ) uygulanarak modifiye elektrot hazırlanmış ve hazırlanan modifiye elektrot (EÖİ/KUG) bir β -bloker olan Propranolol (PROP)'un elektrokimyasal olarak tayininde kullanılmıştır. Birinci basamakta EÖİ/KUG elektrot karakterize edilmiş ve PROP'un voltametrik olarak tayini gerçekleştirilmiştir. İkinci basamakta ise AEA-AD ve AEA-AD+C₁₈ sistemlerinde PROP tayini gerçekleştirilmiştir. AEA-AD+C₁₈ sisteminde yapılan gerçek örnek çalışmaları sonucunda farmasötik tablette %101,256- 108,04 aralığında, sentetik idrar örneğinde ise %98,8- %100,46 aralığında geri kazanım elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Dietilstilbestrol, Propranolol, Altın nanopartikül, Akışa enjeksiyon analiz, Amperometrik dedeksiyon.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF VOLTAMETRIC AND FLOW INJECTION BASED METHOD FOR DETERMINATION OF DIETHYLSTILBESTROL AND PROPANOL

Ayşegül ÖZBAL

Department of Chemistry

Programme in Analytical Chemistry

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, November 2020

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÖZCAN

In the first part of the thesis, the electrochemical determination of diethylstilbestrol (DES), one of the endocrine system disruptor chemicals, was carried out by two different methods. First, a voltammetric method was designed for the determination of DES with a modified electrode prepared by reducing gold on the pencil graphite electrode (PGE) surface. The modified electrode was characterized by cyclic voltammetry (CV), scanning electron microscopy (SEM) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The determination of DES was also investigated by a flow injection analysis system (FIA) with amperometric detection (AD). Thanks to including C₁₈ columns in the FIA-AD system, the performance of the system was increased and this system was used for the first time for the determination of DES. As a result of the analysis, recovery in the range of 89.01-102.9% was obtained for milk, milk powder and water real samples.

In the second part of the thesis, modified electrode was prepared by applying electrochemical pretreatment (ET) to the PGE and the prepared modified electrode (ET/PGE) was used in the electrochemical determination of Propranolol (PROP) that is a β -blocker. In the first step, the ET/PGE was characterized and the PROP was determined voltammetrically. In the second step, PROP was determined in FIA-AD and FIA-AD+C₁₈ systems. As a result of real sample studies in the FIA-AD+C₁₈ system, recovery in the range of 101.256- 108.04% in the pharmaceutical tablet and 98.8% - 100.46% in the synthetic urine sample was obtained

Keywords: Diethylstilbestrol, Propranolol, Gold nanoparticle, Flow injection analysis, Amperometric detection.

TEŞEKKÜR

Gerek lisans eğitim sürecimde gerekse yüksek lisans tez çalışmam kapsamında hem bilgi ve tecrübesi ile hem de hoşgörüsü ve sabrıyla her zaman bana inanan, destek olan ve çalışmaya teşvik eden değerli tez danışmanım Prof. Dr. Ali ÖZCAN'a bütün katkıları için çok teşekkür ederim.

Değerli vakitlerini ayırarak tezimin değerlendirilmesi sürecine jüri olarak katılan ve değerli fikirlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN ve Prof. Dr. Tufan GÜRAY hocalarıma teşekkür ederim.

Gerek lisans eğitimim gerek yüksek lisans eğitimim süresince değerli bilgileri ile akademik gelişimime katkı sağlayan değerli bölüm hocalarıma teşekkür ederim. Prof. Dr. Ayça ÖZCAN hocama bana olan inancı ve desteği için ayrıca teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim ve iyi vakit geçirdiğim başta aynı dönemde tez çalışmalarına başladığım ve laboratuvarı uzun zaman geçirdiğim Fayha MOHAMED ADAM HAMID, her koşulda moralimi düzeltebilen Melike ÖZHAN, benimle birlikte geç saatlere kadar okulda kalan Zeynep DAŞDELEN ve Harun BAŞ olmak üzere KL 124 laboratuvarı yüksek lisans ve doktora öğrencilerine teşekkür ederim.

Kısacık zamanda beni sevgiyle kucaklayan ve desteğini canı gönülden hissettiğim hocam Öğr. Gör. Sinem ÇOLAK'a ve Zonguldak'ta bana hem oda hem yol arkadaşı olan Araş. Gör. Burcu TİMUR'a teşekkür ederim.

Beni sevgiyle karşılayan ve desteklerini esirgemeyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü hocalarıma teşekkür ederim.

Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı ve Kimya Bölümü Başkanlığı'na tez çalışmamı yapabilmem amacıyla sunduğu olanaklar için teşekkür ederim.

Son olarak beni koşulsuz seven ve destekleyen her zaman yanımda olan babam Ali ÖZBAL, annem Alime ÖZBAL ve kardeşim Azime ÖZBAL'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayşegül ÖZBAL

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ayşegül ÖZBAL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	ii
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGE DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Endokrin Sistem Bozucu Kimyasallar	3
2.1.1. Endokrin sistem bozucu kimyasalların tarihçesi	6
2.1.2. Endokrin sistem bozucu kimyasalların sınıflandırılması.....	8
2.1.2.1. Doğal endokrin bozucular	8
2.1.2.2. Sentetik endokrin bozucular	9
2.1.3. Endokrin sistem bozucu kimyasalların mekanizması	9
2.1.4. Dietilstilbestrol (DES)	12
2.2. β-Adrenerjik Reseptör Blokerleri (β-Blokerler)	15
2.2.1. β-blokerlerin tarihçesi	17
2.2.2. β-blokerlerin sınıflandırılması	18
2.2.3. Propranolol (PROP)	19
2.2.3.1. Propranolol'un yan etkileri	21
2.3. Elektrokimya	21
2.3.1. Elektroanalitik kimya	22
2.3.2. Voltametri	24
2.3.2.1. Voltametrik sistemlerde kullanılan elektrotlar.....	26
Referans elektrotlar.....	26
Karşıt elektrotlar.....	26
Çalışma Elektrotları.....	26

	<u>Sayfa</u>
2.3.2.2. <i>Modifiye elektrotlar ve modifikasyon yöntemleri</i>	28
2.3.2.3. <i>Voltametrik yöntemlerin sınıflandırılması</i>	29
<i>Doğrusal taramalı voltametri (DTV)</i>	30
<i>Dönüşümlü voltametri (DV)</i>	30
<i>Diferansiyel puls voltametri (DPV)</i>	31
<i>Amperometrik Teknikler</i>	32
2.3.3. <i>Elektrokimyasal dedektörler</i>	32
2.4. <i>Akışa Enjeksiyon Analizi</i>	33
2.5. <i>DES'i Tayin Etmek İçin Literatürde Yapılmış Bazı Çalışmalar</i>	35
2.6. <i>PROP'u Tayin Etmek İçin Literatürde Yapılmış Bazı Çalışmalar</i>	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM	41
3.1. Tez Kapsamında Kullanılan Malzemeler	41
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	41
3.1.2. Gerçek örneklerin temini	42
3.1.3. Kullanılan araç ve gereçler	42
3.1.4. Elektrokimyasal hücreler ve elektrotlar	43
3.2. DES Tayinine Yönelik Gerçekleştirilen Deneysel Çalışmalar	44
3.2.1. DES tayininin voltametrik yöntemler ile gerçekleştirilmesi	44
3.2.1.1. <i>DES stok çözeltisinin hazırlanması</i>	44
3.2.1.2. <i>DES tayinine yönelik modifiye elektrot hazırlanması</i>	44
3.2.1.3. <i>KUG-Au elektrodunun karakterizasyonu</i>	45
3.2.1.4. <i>KUG-Au elektrodun DES varlığında elektrokimyasal davranışı</i>	46
3.2.1.5. <i>KUG-Au elektrodunun hazırlanma koşullarının optimizasyonu</i>	47
3.2.1.6. <i>DES'in ölçüm koşullarının optimizasyonu</i>	47
3.2.1.7. <i>DES tayininde girişim yapması olası türlerin araştırılması</i>	47
3.2.1.8. <i>DES tayinine yönelik analitik parametrelerin belirlenmesi</i>	48
3.2.1.9. <i>KUG-Au elektrodun gerçek örneklerde test edilmesi</i>	49
3.2.2. DES tayininin amperometrik dedeksiyon ile kombine edilmiş akışa enjeksiyon analiz sisteminde gerçekleştirilmesi	50
3.2.2.1. <i>AEA-AD sisteminin test edilmesi</i>	50

3.2.2.2. AEA-AD sistemi ile DES tayininin araştırılması	51
3.2.2.3. Ölçüm Koşullarının Optimizasyonu	51
Döngü Sayısı Optimizasyonu	51
Gerilim Optimizasyonu	51
Akış Hızı Optimizasyonu	51
3.2.2.4. Tekrarlanabilirlik Parametresinin Değerlendirilmesi	51
3.2.2.5. AEA-AD sisteminin sıvı kromatografisinde dedektör olarak	
kullanımıyla gerçekleştirilen DES analizleri	52
AEA-AD+C ₁₈ sisteminin kalibrasyonu	52
AEA-AD+C ₁₈ sisteminde gerçek örnek analizleri	52
3.3. PROP Tayinine Yönelik Gerçekleştirilen Çalışmalar	53
3.3.1. PROP tayininin voltametri yöntemiyle gerçekleştirilmesi	53
3.3.1.1. PROP stok çözeltisinin hazırlanması	53
3.3.1.2. PROP tayinine yönelik modifiye elektrot hazırlanması ve	
elektrokatalitik etkisinin incelenmesi	53
3.3.1.3. EÖİ/KUG elektrodun karakterizasyonu	54
3.3.1.4. EÖİ/KUG elektrodun PROP varlığında elektrokimyasal	
davranışı	54
3.3.1.5. EÖİ/KUG elektrodun hazırlanma koşullarının	
optimizasyonu	55
Ön işlem potansiyel aralığı optimizasyonu	55
Döngü sayısı optimizasyonu	55
Ön işlem çözeltisi optimizasyonu	55
3.3.1.6. PROP'un ölçüm koşullarının optimizasyonu	56
pH optimizasyonu	56
Temas süresi optimizasyonu	56
3.3.1.7. PROP tayinine yönelik analitik parametrelerin belirlenmesi .	56
3.3.1.8. PROP tayininde girişim yapması olası türlerin araştırılması..	57
3.3.2. PROP tayininin AEA-AD sistemiyle gerçekleştirilmesi	57
3.3.2.1. PROP analizi için referans elektrot değerlendirmesi	57
3.3.2.2. Koşulların optimizasyonu	57
Gerilim optimizasyonu	57

<i>Kalibrasyon grafiği oluşturulması.....</i>	57
3.3.2.3. AEA-AD sisteminin sıvı kromatografisinde elektrokimyasal dedektör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen PROP analizleri	58
<i>Gerilim optimizasyonu</i>	<i>58</i>
<i>Tampon derişimi etkisinin incelenmesi.....</i>	<i>58</i>
<i>Tekrarlanabilirlik.....</i>	<i>58</i>
<i>Kalibrasyon grafiğinin oluşturulması.....</i>	<i>58</i>
<i>Gerçek Örnek Analizleri</i>	<i>59</i>
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	60
4.1. DES Tayinine Yönelik Gerçekleştirilen Çalışmalar	60
4.1.1. Voltametrik çalışmalar	60
<i>4.1.1.1. KUG yüzeyinde $AuCl_4^-$ 'ün indirgenmesinin incelenmesi</i>	<i>60</i>
<i>4.1.1.2. DES tayinine yönelik hazırlanan KUG-Au modifiye elektrodun karakterizasyonu</i>	<i>61</i>
<i>4.1.1.3. DES'in yükseltgenmesi için altın nanopartikül modifiye KUG elektrodun elektrokatalitik etkisinin incelenmesi.....</i>	<i>65</i>
<i>4.1.1.4. KUG-Au modifiye elektrodun hazırlanması için optimum döngü sayısının belirlenmesi</i>	<i>69</i>
<i>4.1.1.5. DES tayin koşullarının optimizasyonu</i>	<i>70</i>
<i>pH optimizasyonu.....</i>	<i>70</i>
<i>Temas süresi optimizasyonu</i>	<i>71</i>
<i>4.1.1.6. DES tayinine yönelik girişim yapabilecek türlerin incelenmesi</i>	<i>72</i>
<i>4.1.1.7. DES tayini için analitik parametrelerin belirlenmesi</i>	<i>73</i>
<i>4.1.1.8. Gerçek örneklerde DES tayini</i>	<i>76</i>
4.1.2. AEA-AD sistemi çalışmaları	78
<i>4.1.2.1. AEA-AD sisteminin kontrolü</i>	<i>78</i>
<i>4.1.2.2. AEA-AD sistemi ile DES tayininin araştırılması</i>	<i>80</i>
<i>AEA-AD sistemi ile DES tayini için döngü sayısı optimizasyonu.....</i>	<i>81</i>
<i>AEA-AD sistemi ile DES tayini için gerilim optimizasyonu ..</i>	<i>82</i>

<i>AEA-AD sistemi ile DES tayini için akış hızı optimizasyonu.....</i>	<i>83</i>
<i>AEA-AD sistemi ile DES tayininin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi.....</i>	<i>84</i>
4.1.2.3. AEA-AD sisteminin sıvı kromatografide dedektör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen DES analizleri	84
<i>AEA-AD+C₁₈ sisteminin kalibrasyonu</i>	<i>85</i>
<i>AEA-AD+C₁₈ sisteminde gerçek örnek analizleri.....</i>	<i>86</i>
4.2. PROP Tayinine Yönelik Gerçekleştirilen DeneySEL Çalışmalar	87
4.2.1. Voltametrik çalışmalar	87
<i>4.2.1.1. EÖİ/KUG elektrodun PROP yükseltgenmesi üzerindeki elektrokatalitik etkisi</i>	<i>87</i>
<i>4.2.1.2. EÖİ/KUG elektrodun karakterizasyonu</i>	<i>88</i>
<i>Empedans ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi</i>	<i>90</i>
<i>4.2.1.3. EÖİ/KUG elektrodun PROP varlığında elektrokimyasal davranışının incelenmesi</i>	<i>91</i>
<i>4.2.1.4. EÖİ/KUG elektrodunun hazırlanma koşullarının optimizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi</i>	<i>92</i>
<i>Ön işlem için optimum gerilim aralığının belirlenmesi.....</i>	<i>92</i>
<i>Optimum döngü sayısının belirlenmesi.....</i>	<i>93</i>
<i>Optimum ön işlem çözeltisinin belirlenmesi</i>	<i>94</i>
<i>4.2.1.5. EÖİ/KUG elektrodunun PROP tayini için ölçüm koşullarının optimizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi</i>	<i>95</i>
<i>Ölçüm pH'sının optimizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi.....</i>	<i>95</i>
<i>Temas süresi optimizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi... 96</i>	
<i>4.2.1.6. PROP Tayinine Yönelik Analitik Parametrelerin Belirlenmesi.....</i>	<i>97</i>
<i>4.2.1.7. PROP tayinine yönelik girişim yapabilecek türlerin incelenmesi</i>	<i>100</i>
4.2.2. PROP tayininin AEA-AD sistemleriyle gerçekleştirilmesi.....	101
<i>4.2.2.1. PROP analizi için referans elektrot değerlendirmesi</i>	<i>101</i>

	<u>Sayfa</u>
4.2.2.2. Gerilim optimizasyonu	102
4.2.2.3. Kalibrasyon grafiği oluşturulması.....	103
4.2.3. AEA-AD+C ₁₈ sisteminde PROP optimizasyonu	104
4.2.3.1. Gerilim optimizasyonu	104
4.2.3.2. Tampon derişiminin etkisinin incelenmesi	105
Tekrarlanabilirliğin test edilmesi	106
4.2.3.3. Kalibrasyon grafiği oluşturulması.....	107
4.2.3.4. AEA-AD+C ₁₈ sistemi ile gerçek örnek analizleri	108
5. SONUÇLAR.....	110
KAYNAKÇA.....	113
ÖZGEÇMİş	

ÇİZELGE DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Başlıca endokrin bozucuların kaynakları ve örnekleri [26].	5
Çizelge 2.2. DES'in kimyasal yapısı ve özellikleri	12
Çizelge 2.3. PROP'un kimyasal yapısı ve özellikleri	19
Çizelge 3.1. Deneysel süreçlerde kullanılan kimyasallar	41
Çizelge 3.2. Deneysel süreçlerde kullanılan cihazlar	42
Çizelge 4.1. EİS ölçümünden elde edilen değerler	63
Çizelge 4.2. KUG ve KUG-Au elektrotlar ile 2,5 mM Fe(CN) ₆ ^{4-/3-} çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisinde alınan DV ölçümü pik potansiyel ve gerilim değerleri	64
Çizelge 4.3. KUG ve KUG-Au elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu ile 10 µM DES içeren çözelti içerisinde DPV ile alınan pik akım ve gerilim değerleri	66
Çizelge 4.4. Dietilstilbestrol'ün yükseltgenme pikine girişim yapabilecek türlerin maksimum izin verilen derişimleri	73
Çizelge 4.5. Keskin göleti suyu ve süt tozu gerçek örnekleri ile DES için optimum koşullarda gerçekleştirilen ölçümler sonucu bulunan geri kazanım değerleri	78
Çizelge 4.6. Keskin göleti suyu, süt ve süt tozu gerçek örnekleri ile DES için optimum koşullarda gerçekleştirilen ölçümler sonucu bulunan geri kazanım değerleri	86
Çizelge 4.7. 1 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] ve 1 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde EÖİ/KUG ve KUG ile alınan DV ölçüm sonuçları	88
Çizelge 4.8. 1 mM Ru(NH ₃) ₆ ³⁺ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde EÖİ/KUG ve KUG ile alınan DV ölçüm sonuçları	89
Çizelge 4.9. Alınan EİS ölçümünün fit edilmesi sonucu elde edilen devre elemanları değerleri	90
Çizelge 4.10. PROP'un yükseltgenme pikine girişim etkisi yapabileceği düşünülen türlerin maksimum izin verilen derişimleri	101
Çizelge 4.11. AEA-AD+C ₁₈ sistemi ve HPLC ile Dideral® ve sentetik idrar gerçek örneklerinde PROP için optimum koşullarda gerçekleştirilen ölçümler sonucu bulunan geri kazanım değerleri	109

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Endokrin sistem.....	3
Şekil 2.2. Endokrin sistem bozucu kimyasalların sınıflandırılması	8
Şekil 2.3. Endokrin bozucuların mekanizması	10
Şekil 2.4. DES'in sentezi [38].	13
Şekil 2.5. Yenidoğan dönemde DES'e maruz kalmanın 4-6 aylık farelerin obezitetleri üzerine etkileri [18].	13
Şekil 2.6. (S)-Propafenon ve (S)-Propranolol yapısı [48]	16
Şekil 2.7. β -blokerlerin sınıflandırılması [49].	18
Şekil 2.8. PROP sentezi [54].	20
Şekil 2.9. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması.....	23
Şekil 2.10. Voltametrik ölçümlerde kullanılan üç elektrotlu elektrokimyasal sistem....	24
Şekil 2.11. Voltametrik yöntemlerde kullanılan çalışma elektrotları	27
Şekil 2.12. Elektrot modifikasyonunda kullanılan yöntemler [70].	28
Şekil 2.13. Voltametrik yöntemlerin sınıflandırılması	29
Şekil 2.14. Doğrusal voltametri tekniğinde zamana karşı gerilim eğrisi ve ölçüm sonucu alınan doğrusal voltamogram [78].....	30
Şekil 2.15. Dönüşümlü voltametri tekniğinde zamana karşı gerilim eğrisi ve ölçüm sonucu alınan dönüşümlü voltamogram [78].....	31
Şekil 2.16. Diferansiyel puls voltametri tekniğinde zamana karşı gerilim eğrisi ve ölçüm sonucu alınan diferansiyel puls voltamogramı [80]	32
Şekil 3.1. A: Voltametrik sistem için kullanılan hücre B: AEA sistemi için kullanılan hücre.....	44
Şekil 3.2. Kalibrasyon grafiği ve elde edilebilecek veriler.....	48
Şekil 3.3. AEA sistemi şematik gösterimi	50
Şekil 4.1. KUG elektrot yüzeyinde altının davranışının incelenmesi için alınan DV ölçümü (Tarama hızı: 50 mV/s).....	61
Şekil 4.2. A KUG elektroda, B ve C ise KUG-Au elektrotlara ait SEM görüntüleri ve D altın nanopartiküllere ait boyut dağılımı (Büyütme oranları A ve B için; 50.000 X ve C için ise 200.000 X)	62

Şekil 4.3. KUG ve KUG-Au elektrotlara ait 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redoks çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde +0,17 V (OCP) gerilim değerinde alınan elektrokimyasal empedans spektrumları	63
Şekil 4.4. KUG ve KUG-Au elektrotlar ile 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisinde -0,3 V ile 0,8 V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızında alınan DV ölçümleri	64
Şekil 4.5. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde KUG ve KUG-Au elektrotlar ile ve KUG-Au elektrotla 10 μM DES varlığında -0,1 V ile 0,6 V gerilim aralığında alınan DV ölçüm voltamogramları.....	65
Şekil 4.6. KUG ve KUG-Au elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV tekniği ile 10 μM DES varlığında ve yokluğunda 60 s bekleme süresi ile 300 rpm karıştırma hızında alınan voltamogramlar	66
Şekil 4.7. 0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 10 μM DES varlığında DV tekniği kullanılarak 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile farklı tarama hızlarında KUG-Au elektrotları için alınan ölçümler	67
Şekil 4.8. 1,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde A1 KUG A2 KUG-Au elektrotlar için farklı tarama hızlarında alınan voltamogramlar.....	68
Şekil 4.9. 1,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde KUG (B1), KUG-Au (B2) elektrotlar ile elde edilen tarama hızının kareköküne karşı anodik pik akımları.....	68
Şekil 4.10. Farklı döngü sayılarında hazırlanan KUG-Au elektrotların 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda DPV tekniği ile 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında 10 μM DES varlığında elde edilen akım değerleri	69
Şekil 4.11. Optimum koşullarda hazırlanan KUG-Au elektrot ile 0,1 M farklı pH' larda -0,15 V ile 0,7 V gerilim aralığında DPV tekniği ile 10 μM DES varlığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında elde edilen pik akımları	70
Şekil 4.12. Optimum koşullarda hazırlanan KUG-Au elektrot ile 0,1 M farklı pH' larda -0,15 V ile 0,7 V gerilim aralığında DPV tekniği ile 10 μM DES varlığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında alınan voltamogramlar	71

- Şekil 4.13.** 0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 10 μ M DES varlığında -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızında ve farklı temas sürelerine karşı alınan pik akım değerleri 72
- Şekil 4.14.** 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda DPV yöntemiyle DES'in oksidasyon pikine CaCl_2 etkisi 72
- Şekil 4.15.** 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda DPV yöntemiyle -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında, 90 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile 0,25-25 μ M DES derişim aralığında alınan A) voltamogramlar ve B) kalibrasyon grafiğı 74
- Şekil 4.16.** 0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 90 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile -0,18 V ile 0,5 V gerilim aralığında KUG elektrot kullanılarak DPV yöntemiyle alınan voltamogramlar 75
- Şekil 4.17.** KUG-Au elektrotlar ile 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda, DPV tekniğı kullanılarak, -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızı ile 90 s temas süresi ve 10 μ M DES varlığında 11 günlük periyotlarla alınan voltamogramlardaki akım değerlerinin zamana karşı grafiğı 76
- Şekil 4.18.** 0,1 M fosfat tamponu içerisine 40 kat seyreltilerek eklenen keskin suyu gerçek örneğı üzerine artan derişimlerde DES eklenmesi ile -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında 90 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı parametrelerinde alınan DPV ölçüm sonuçları 77
- Şekil 4.19.** 0,1 M fosfat tamponu içerisine 40 kat seyreltilerek eklenen süt tozu gerçek örneğı üzerine artan derişimlerde DES eklenmesi ile -0,18 V ile 0,15 V gerilim aralığında 90 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı parametrelerinde alınan DPV ölçüm sonuçları 78
- Şekil 4.20.** AEA-AD sisteminde KUG elektrot kullanılarak farklı derişimlerde $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi enjekte edilmesi sonucu elde edilen akım zaman eğrileri (Hareketli faz: 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, Uygulanan gerilim: 0,2 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Enjeksiyon hacmi: 20 μ L)..... 79

- Şekil 4.21.** AEA-AD sisteminde KUG elektrot kullanılarak 100 μM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. $3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinin 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu ve 1 M KCl içeren 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisine enjekte edilmesi sonucu elde edilen akım zaman eğrileri, (Uygulanan gerilim: 0,2 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Enjeksiyon hacmi: 20 μL)..... 80
- Şekil 4.22.** AEA-AD sisteminde KUG-Au(5D) elektrodun kullanılarak tekrarlı 5 μM DES enjeksiyonu ile elde edilen akım zaman eğrisi. (Hareketli faz: 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, Gerilim: 0,2 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Enjeksiyon hacmi: 20 μL)..... 80
- Şekil 4.23.** AEA-AD sisteminde farklı döngülerde hazırlanan KUG-Au çalışma elektrotlarının kullanılmasıyla sisteme 5 μM DES enjeksiyonu sonucu elde edilen A) pik akımları sütun grafiği, B) akım zaman eğrileri (Gerilim: 0,2 V, Akış Hızı: 1,1 mL/dk, Hareketli faz: 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, Enjeksiyon hacmi: 20 μL)..... 81
- Şekil 4.24.** AEA-AD sisteminde farklı gerilimlerin uygulanmasıyla, 5 μM DES enjeksiyonu sonucu elde edilen A) pik akımları sütun grafiği, B) akım zaman eğrileri (Akış Hızı: 0,8 mL/dk, Hareketli faz: 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, Enjeksiyon hacmi: 20 μL , Çalışma elektrodu: KUG-Au(5D)).... 82
- Şekil 4.25.** AEA-AD sisteminde farklı akış hızlarında 5 μM DES enjeksiyonu sonucu elde edilen A) pik akımları sütun grafiği, B) akım zaman eğrileri (Gerilim: 0,2 V, Hareketli faz: 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, Enjeksiyon hacmi: 20 μL , Çalışma elektrodu: KUG-Au(5D))..... 83
- Şekil 4.26.** AEA-AD sisteminde optimum koşullarda altı kez 5 μM DES enjeksiyonu sonucu elde edilen akım zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: KUG-Au(5D), Gerilim: 0,2V, Akış hızı: 1,1mL/dk, Hareketli faz: 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, Enjeksiyon hacmi: 20 μL)..... 84
- Şekil 4.27.** AEA-AD+C₁₈ sisteminde optimum koşullarda 1 ve 500 μM DES aralığında artan derişimlerde DES enjeksiyonu sonucu elde edilen akım zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: KUG-Au(5D), Gerilim: 0,2 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Hareketli faz: %70 CH₃OH:%30 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v), Enjeksiyon hacmi: 20 μL)..... 85

- Şekil 4.28.** 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde KUG ve EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,5 V ile 1,2 V gerilim aralığında 60 s temas süresi, 300 rpm karıştırma hızı ile 5 µM PROP varlığında ve yokluğunda alınan DPV ölçümleri 87
- Şekil 4.29.** 1 mM K₄[Fe(CN)₆] ve 1 mM K₃[Fe(CN)₆] içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde -0,2 V ile 0,8 V gerilim değerleri arasında 60 s temas süresi ile 300 rpm karıştırma hızında ve 50 mV/s tarama hızında EÖİ/KUG ve KUG ile alınan DV ölçümleri 88
- Şekil 4.30.** 1 mM Ru(NH₃)₆³⁺ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 0,3 V ile -0,6 V gerilim değerleri arasında 50 mV/s tarama hızında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında EÖİ/KUG ve KUG ile alınan DV ölçümleri ... 89
- Şekil 4.31.** 2,5 mM K₄[Fe(CN)₆] içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde EÖİ/KUG ve KUG elektrotlar ile açık devre potansiyeli olan 0,125 V gerilim değerinde alınan EİS ölçümleri ile elde edilen Nyquist eğrileri 90
- Şekil 4.32.** 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0 V ve 1,2 V gerilim aralığında EÖİ/KUG ve KUG elektrotlar ile 10 µM PROP varlığında ve yokluğunda 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında elde edilen döngüsel voltamogramlar 91
- Şekil 4.33.** 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,5 V ile 1,25 V gerilim aralığında, 10 µM PROP varlığında, 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile farklı tarama hızlarında EÖİ/KUG elektrotlar ile alınan voltamogramlar 92
- Şekil 4.34.** 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, farklı gerilim aralıklarında, 2 döngü hazırlanan elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV yöntemiyle 0,5;1,2 V gerilim aralığında, 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında, 5 µM PROP varlığında gerçekleştirilen ölçümlerden elde edilen A) sütun grafiği, B) voltamogramlar 93
- Şekil 4.35.** 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, DV tekniği ile 0,5;1,4 V gerilimde 50 mV/s tarama hızında ve farklı döngü sayılarında hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda 5 µM PROP varlığında DPV tekniği ile 0,5;1,2 V gerilim aralığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında alınan ölçüm sonuçları..... 94

- Şekil 4.36.** 0,1 M farklı pH'larda hazırlanan fosfat tamponları, 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH çözeltileri içerisinde 0,5 V ve 1,4 V gerilim değerleri arasında 50 mV/s tarama hızında 3 döngü DV tekniği ile hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 5 µM PROP varlığında DPV tekniği ile 0,5; 1,2 V gerilim aralığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında alınan ölçümler elde edilen pik akımlarının pH'ya karşı sütun grafiği..... 95
- Şekil 4.37.** Optimum koşullarda hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M farklı pH'larda hazırlanmış fosfat tamponlarında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile 5 µM PROP varlığında 0,35 V ile 1,3 V gerilim aralığında DPV tekniği ile alınan A) voltamogramlar B) pik akımının pH'ya karşı grafiği 96
- Şekil 4.38.** Optimum koşullarda hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, 0,5 µM PROP varlığında, 0,35 V ile 1,2 V gerilim aralığında DPV tekniği kullanılarak, 300 rpm karıştırma hızında, farklı temas sürelerinde elde edilen pik akımları..... 97
- Şekil 4.39.** 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,35 V ile 1,25 V gerilim değerleri arasında 300 rpm karıştırma hızı ve 120 s temas süresi parametrelerinde alınan DPV ölçümleri A) 0,1-2,5 µM aralığındaki B) 5-25 µM aralığındaki doğrusal aralık 98
- Şekil 4.40.** 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 300 rpm karıştırma hızıyla, 120 s temas süresi parametrelerinde KUG elektrot ile artan PROP derişimine karşı alınan DPV ölçümleri..... 99
- Şekil 4.41.** 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV yöntemiyle 2,5 µM PROP yükseltgenme pikine Üre'nin girişim etkisinin incelenmesi için alınan voltamogramlar 100
- Şekil 4.42.** AEA-AD sisteminde 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu ve 0,1 M KCl içeren 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu hareketli fazlarına 5 ve 50 µM PROP enjeksiyonu ile elde edilen akım zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Gerilim: 0,95 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Enjeksiyon hacmi: 20 µL) 102

- Şekil 4.43.** AEA-AD sisteminde farklı gerilim değerlerinde 10 μ M PROP enjeksiyonu ile alınan A) akım-gerilim grafiği B) akım-zaman eğrileri (Hareketli faz: 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Akış hızı: 1,1 mL/dk) 103
- Şekil 4.44.** AEA-AD sisteminde artan derişimlerde PROP enjekte edilmesiyle alınan akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Hareketli faz: 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Gerilim: 0,95 V)... 104
- Şekil 4.45.** AEA-AD+C₁₈ sistemine farklı gerilim değerlerinde 100 μ M PROP enjekte edilmesiyle elde edilen A) akım-gerilim grafiği B) akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Hareketli faz: %65 CH₃OH; %35 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v), Akış hızı: 1,1 mL/dk Basınç: 93 bar) 105
- Şekil 4.46.** AEA-AD+C₁₈ sisteminde hareketli faz olarak %65 CH₃OH;%35 farklı derişimlerde pH 7,4 fosfat tamponu karışımı (v/v) kullanılarak 100 μ M PROP enjeksiyonu ile alınan A) akım derişim grafiği B) akım- zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Gerilim: 0,9 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Basınç: 87- 92 bar) 106
- Şekil 4.47.** AEA-AD+C₁₈ sistemine optimum koşullarda 100 μ M PROP'un 7 enjeksiyonu ile alınan akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Hareketli faz: %65 CH₃OH; %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v), Akış hızı: 1,1 mL/dk, Basınç: 87 bar) 107
- Şekil 4.48.** AEA-AD+C₁₈ sistemine 0,5 ile 125 μ M PROP derişim aralığında PROP enjeksiyon u ile elde edilen akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Gerilim: 0,9 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Hareketli faz: %65 CH₃OH ile %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v), Basınç: 85 bar)... 107
- Şekil 4.49.** AEA-AD+C₁₈ sistemine PROP için optimum koşullarda Dideral® ve sentetik idrar gerçek örnekleri enjeksiyonu ile elde edilen akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Gerilim: 0,9 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Hareketli faz: %65 CH₃OH ile %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v)) 109

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
β -EST	: β -Estradiol
AA	: Askorbik Asit
AEA	: Akışa Enjeksiyon Analiz
AEA-AD	: Amperometrik Dedeksiyon ile Kombine Akışa Enjeksiyon Analiz
AEA-AD+C ₁₈	: AEA-AD sisteminin dedektör olduğu sıvı kromatografi
AuNPs	: Altın Nanopartikülleri
Bkz.	: Bakınız
BPA	: Bisfenol A
DES	: Dietilstilbestrol
DKE	: Doygun Kalomel Elektrot
DPV	: Diferansiyel Puls Voltametri
DTV	: Doğrusal Taramalı Voltametri
DV	: Dönüşümlü Voltametri
EBK	: Endokrin Sistem Bozucu Kimyasallar
EİS	: Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
EÖİ	: Elektrokimyasal Ön İşlem
ES	: Endokrin Sistem
EPA	: United States Environmental Protection Agency/ABD Çevre Koruma Ajansı
FA	: Folik Asit
FDA	: U.S. Food and Drug Administration/Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GC	: Gaz Kromatografisi
GLC	: Glukoz
HK	: Hidrokinon
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
IARC	: International Agency for Research on Cancer/Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IPCS	: International Programme on Chemical Safety/Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı
KUG	: Kalem ucu grafit

LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
L-Phe	: L-Fenilalanin
m	: Eğim
MNNT	: Mannitol
MS	: Kütle Spektroskopisi
OCP	: Açık Devre Gerilim
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development/Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü ya da İktisadi İşbirliği ve Gelişme Teşkilatı
R _{ct}	: Yük Transfer Direnci
PROP	: Propranolol
RSD	: Bağlı Standart Sapma
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
SHE	: Standart Hidrojen Elektrot
SS	: Standart Sapma
UNEP	: United Nations Environment Programme/Birleşmiş Milletler Çevre Programı
ÜA	: Ürik Asit
WADA	: World Anti-Doping Agency/Dünya Anti-Doping Ajansı
WHO	: World Health Organization/Dünya Sağlık Örgütü
WWF	: World Wide Fund for Nature/Doğal Hayatı Koruma Vakfı

1. GİRİŞ

Östrojenler insanlar ve yaşam için önemli risk teşkil etmesi sebebiyle dünya çapında dikkat çeken doğal ve sentetik hormonlardır. Östrojenik bileşikler veya sentetik östrojenler olarak da bilinen endokrin sistem bozucu kimyasallar (EBK) doğal hormonları taklit ederek endokrin sistemde bozunmaya sebep olan bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Soya'da bulunan fitoöstrojenler gibi bazı EBK'ler doğal olsa da literatürde kullanımda olan birçok EBK sentetiktir. EBK'lerin organizmanın üreme sistemi üzerinde üreme organlarında kanserli tümör, doğum kusurları, düşük sperm sayısı, erken cinsel olgunlaşma, hermafroditizm, hipospadias, kriptorşidizm, cinsiyet değişiklikleri ve diğer fiziksel ve psikolojik cinsiyet gelişim sorunlarını içeren önemli etkileri bulunmaktadır [1].

Dietilstilbestrol (DES) sentetik nonsteroidal bir östrojendir ve sentetik EBK'lerden birisidir. Sıklıkla hayvancılıkta yağ oranını azaltarak protein bileşimini arttırmakta ve hayvanların büyümelerini desteklemek amacıyla kullanılmaktadır. DES'in nispeten kararlı fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle çevresel kirliliğe sebep olduğu ekosistem deneyleri ile kanıtlanmıştır. Son zamanlarda yerel ve uluslararası seviyelerde bazı araştırmalar insanlarda DES'in genetik mutasyon, kanser ve genetik madde bozukluğu gibi yan etkilere sebep olduğunu göstermiştir [2]. DES Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından Grup 1 olarak sınıflandırılmış ve insanlar için kanserojen olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden, DES birçok ülkede hayvancılık ve su ürünleri yetiştiriciliğinde yasaklanmıştır [3]. Bununla birlikte, hala illegal olarak kullanımının devam etmekte olduğu tespit edilen DES'in tayin edilmesine yönelik maliyet ve zaman tasarrufu sağlayabilecek yöntemlerin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır [4]. DES'in tayin edilmesine yönelik moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi [5], elektrokemilüminesans [2], elektrokimyasal yöntemler [6], [7] gibi birçok metot geliştirilmiştir.

β -Adrenerjik Reseptör Blokerleri (β -Bloklerleri) anormal kalp ritmi, yüksek tansiyon, anjina pektoris içeren kardiovasküler hastalıkların tedavi edilmesi için sıklıkla kullanılan kişisel bakım ürünleri ve farmasötiklerin bir çeşididir. β -blokerler ariloksipropanolamin yan zinciri ile aromatik veya heteroaromatik halkaya sahiptir [8]. β -blokerler seçici olarak β -reseptörlere bağlanabilirler ve β -reseptör agonistlerinin β -reseptörlerine bağlanmasını yarışmalı olarak bloke ederek beta reseptör aktivasyonu ile

Üretilen bir dizi etkiyi tetikleyebilirler. Farklı reseptör alt gruplarına göre β -blokerler, non-selektif β -blokerler ve kardiyak selektif β -blokerler olarak ayrılmaktadır. Hem β_1 hem de β_2 reseptörlerini bloke eden non-selektif β -blokerlerden birisi Propranolol (PROP)'dr [9].

PROP otonom sinir sistem aktivitesine sahiptir ve özellikle bronşlarda mevcut reseptörler için β -adrenerjik reseptör uyarıcı ajanlar ile rekabet eder plazmada yüksek derişimlerde astım ve yetişkin solunum sıkıntısı sendromu gibi ciddi solunum problemlerine sebep olabilir. Ayrıca, hücre korumasında temel bir rol oynayan hücre zarlarının fosfolipid bazlı çift katmanları üzerinde zararlı etkiye sahiptir. Daha az fiziksel aktivite içeren sporlarda koroner kan akışı, kasılma ve kalp atış hızını azaltmak amacıyla kötü amaçlar için kullanılabilir. Bu sebeple, Uluslararası Olimpiyat Komitesi PROP'u yasaklanmış ilaçlar listesine dahil etmiştir. Alınmasından sonra hızla metabolize olduğundan biyolojik sıvılarda PROP'un eser konsantrasyonunu belirleyebilmek oldukça zordur [10]. PROP'un tayini farmakokinetik çalışmalar, klinik ve adli analizler gibi birçok çalışmada gereklidir. PROP tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi [11], iyon hareketlilik spektrometresi [12], elektrokimyasal yöntemler [13], [4] gibi farklı analitik teknikler önerilmiştir.

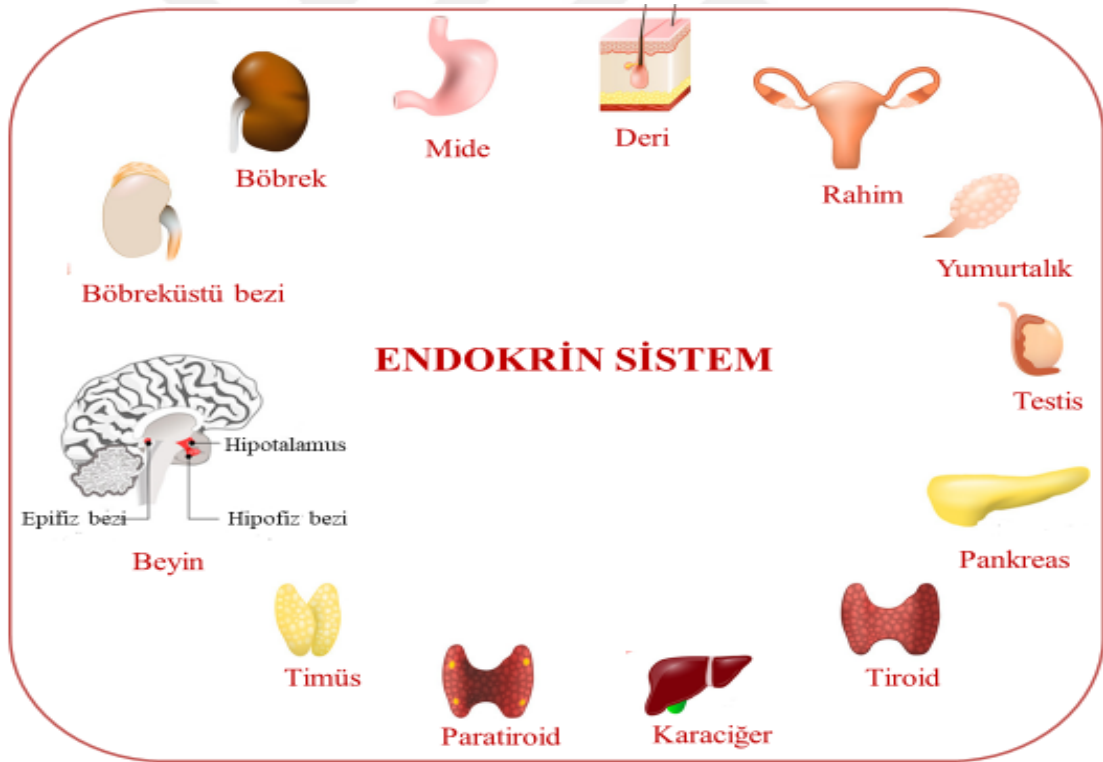
Elektrokimyasal yöntemler basitlik, düşük maliyet, iyi seçicilik, yüksek hassasiyet, hızlı yanıt, kolay numune hazırlama gibi avantajları sebebiyle sıklıkla başvurulan yöntemlerdir [14]. Ayrıca, düşük numune hacmi gerektirme, düşük maliyet, yüksek tekrarlanabilirlik, nispeten kısa analiz süresi gibi avantajlara sahip olan akışa enjeksiyon analiz (AEA) sistemi ile de kolayca birleştirilebilmektedir [15].

Tez alışması kapsamında DES ve PROP'un elektrokimyasal olarak tayinleri gerçekleştirilmiştir. DES'in ilk basamakta voltametrik tayini için optimum şartlar belirlenmiştir. İkinci basamakta ise AEA sisteminde DES'in amperometrik olarak belirlenmesi için optimum şartlar belirlenmiş ve gerçek örnek analizleri yapılmıştır. Tez çalışmasının ikinci kısmında, ilk olarak PROP'un voltametrik tayini gerçekleştirilmiştir. İkinci basamakta ise amperometrik dedeksiyonlu AEA sisteminde PROP tayini ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Sistem Bozucu Kimyasallar

İnsan sağlığı, hormonların bedensel fonksiyonları düzenlemek ve koordine etmek için kimyasal haberciler gibi davrandığı fonksiyonel endokrin sistemine (ES) bağlıdır [16]. Endokrin sistemler, organizmanın spesifik ihtiyaçlarını karşılamak için fizyolojik süreçleri düzenler, aynı zamanda dinamik ve kronik çevresel değişikliklere veya karışıklıklara adaptasyonu kolaylaştırır [17]. İnsan vücudunda karbonhidrat, yağ ve proteinleri de içeren yakıtların kullanımını düzenlemede de önemli bir rol oynar [18]. Endokrin sistem endokrin bezleri (tiroid, adrenal, paratiroid, pineal ve hipofiz) ile aynı zamanda akciğer, gastrointestinal sistem ve paraganglia gibi çeşitli organlardaki nöroendokrin hücrelerinin hem küçük kümelerini hem de tekli hücrelerini içerir (Bkz. Şekil 2.1.) [19].



Şekil 2.1. Endokrin sistem

Endokrin sistem, dolaşım sistemi vasıtasıyla dolaşan ve vücutun her tarafına dağılan hormon adında kimyasal haberciler salgılar. Bu sistem, acil yanıt alınması gerekmeyen ancak uzun süreli olması gereken yanıtları (büyüme, metabolik hız, cinsel gelişim ve üreme) kontrol etmek için hormonları kullanır. Dolayısıyla, ES üzerindeki olası tehlikeli etkiler hemen gözlenmeyebilir, ancak sağlığımız üzerinde uzun süreli etkileri olabilir. Etkilerin hemen gözlenememesi durumu ES'yi bozan maddeleri araştırmayı zorlaştırmaktadır. Son yıllarda, üreme bozuklukları, obezite, diyabet ve kanserler gibi endokrin bozuklukları ile bağlantılı hastalıklar artış göstermektedir [20]. Uzun yıllardır yapılan çalışmalar hem doğal hem de sentetik birçok çevresel kimyasalın endojen hormonların davranışlarını taklit ederek veya engelleyerek endokrin cevapların çeşitli yönlerini değiştirebileceğini göstermektedir. Bu kimyasallar endokrin bozucular veya endokrin sistem bozucu kimyasallar (EBK) adıyla karşımıza çıkmaktadır [21]. 1992'de WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve IPCS (Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı) EBK'leri, endokrin sistemi değiştiren ve sonucunda bozulmamış organizmada, soylarında yada (alt)popölasyonlarında endokrin sistemin bozulmasına sebep olan eksojen bir madde veya karışım şeklinde tanımlamıştır [22]. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından ise vücuttaki doğal hormonların üretimi, salınması, taşınması, metabolizması, bağlanması, hareketi veya ortadan kaldırılmasına müdahale eden, homeostazisinin korunmasından ve gelişim süreçlerinin düzenlenmesinden sorumlu olan eksojen bir ajan olarak tanımlanmıştır [23]. Endokrin bozulma hem toksikoloji hem de endokrinoloji konularını içeren gelişmekte olan çok disiplinli bir araştırma alanıdır [24]. Bugüne kadar EBK olarak tanımlanan yaklaşık 1000 kimyasal vardır. Plastikler, kişisel bakım ürünleri, tarım ilaçları, temizlik için kullanılan kimyasallar, farmasötik maddeler gibi birçok kaynakta yer alan bu kimyasallara hava, su, yiyecekler vb. yollar ile maruz kalınabilmektedir, günlük yaşamda karşılaştığımız bazı EBK'lerin kaynakları ve örnekleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir. Aynı zamanda bu maddeler biyolojik sıvılarda da bulunabilir [25].

Çizelge 2.1. Başlıca endokrin bozucuların kaynakları ve örnekleri [26].

Çevresel kaynaklar	Örnek EBK'ler
İlaçlar	17-β estradiol, DES
Tarımsal sızıntı	İnsektisitler, herbisitler, fungusitler, sentetik hormonlar
Atık yakımı	Poliklorlu bifeniller, dioksinler
Mesleki	Herbisitler, fungusitler
Endüstriyel atıklar	Alkilfenoller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, bisfenol, ftalatlar
Tüketici ürünleri	Parabenler, bisfenol, ftalatlar
Gıda paketlenme ve diyet	Herbisitler, bisfenol, ftalatlar

EBK karışımları atıklarda bulunur ve bir kez çevreye salındığında etkilerini tahmin etmek pek mümkün değildir. Eğer embriyo fetüsü bu kimyasallara maruz kalırsa etkileri geri dönüşümsüz ve uzun dönemlidir [27]. Genellikle hormon reseptörleri için doğal ligandlara göre düşük afinite gösteren EBK'ler insanlardaki birçok dokuda zararlı etkiler gösterebilir. EBK'lere maruz kalma dönemi ve süresi de önemli parametrelerdendir, kritik gelişim döneminde maruz kalınması sonucunda çok düşük miktarları bile güçlü etkiler göstermekle birlikte bu yan etkiler hemen ortaya çıkmayıp uzun yıllar sonra ortaya çıkabilmektedir [28].

Bir EBK'ye ait risk değerlendirmesi yapabilmek için;

- ✓ Öncelikle EBK'nin tehlikesi, maddenin potansiyeline ve davranışına göre tanımlanmalıdır,
- ✓ Maruz kalındığında vücuda alınan ve atılan miktarları belirlenmelidir ve
- ✓ Bireysel duyarlılığı belirlenmelidir [29].

2.1.1. Endokrin sistem bozucu kimyasalların tarihçesi

İnsan sağlığı açısından bu kadar önemli etkilere sahip olan EBK'lerin tarihsel gelişimine bakıldığında, 90'ların başına dayanmasına rağmen, çevrede şu an var olan çoğu kimyasalın insan ve hayvanların hayatını olumsuz etkiledikleri çok önceden bilinmekteydi. 20. yüzyıldaki olaylar üreme ve endokrin sistemlerini çevrenin nasıl etkilediğini gösteren mevcut anlayışımızı etkilemiştir. 1920'lerde, Amerika Birleşik Devletleri'nde domuz çiftçileri, küflenmiş tahıl ile beslenen domuz sürülerinde doğurganlığın azalması konusunda endişelenmeye başlamışlardır. Batı Avustralya'daki koyun çiftçilerinin yoncanın belirli alanlarında hayvanları otlattıktan sonra koyunlarında sık görülen düşükler ve kısırılık rapor ettikleri 1946'da bu durum endişeyi daha da arttırmıştır. Daha sonra yapılan araştırmalar bu sorunun altında yatan nedenin doğurganlıktan sorumlu östrojenik aktiviteyi bozan küf (mikoöstrojen) veya bitki materyali (fitoöstrojen) içeren bileşiklerin tüketimi olduğunu göstermiştir [16]. Zondek'in söğüt ağacının çiçeklerinde biyolojik olarak aktif östrojenleri gösterdiği 1920'lerin başında çevrede ve gıdalarda östrojenik maddeler bulunmuştur. 1923'te Gine domuzu ve sığanda yapılan çalışmalar sonucu Allen and Doisy tarafından yumurtalıklarda östronlar tanımlanmıştır.

1938'de Sir Charles Dodds ve ark. tarafından kürtaşı önlemek için kullanılmış olan güçlü bir östrojen olarak bilinen dietilstilbestrol (DES) sentezlenmiştir. 1950'lerde stilbestrol ile kontaminasyondan kaynaklanan fare kolonilerinin kısırılığına, 4 yaşındaki bir kız çocuğu ve 6 yaşındaki erkek kardeşinde nodüler meme genişlemesine neden olduğu bulunmuştur [22]. 1971'de ise DES reçete edilen annelerin çocuklarında 20'li yaşların başında üreme sistemi kanserinin arttığı bulunmuştur [28]. 1950'lerde Dodds öncülüğündeki kimyagerler östrojen davranışının mekanizmalarını anlamak amacıyla östrojenik özellikleri olan bir dizi kimyasallar sentezlemişlerdir ve böylece yeni sentetik hormon endüstrisinin doğmasını sağlamışlardır. Çeşitli fitoöstrojenler Biggers tarafından 1959 yılında özetlenmiştir.

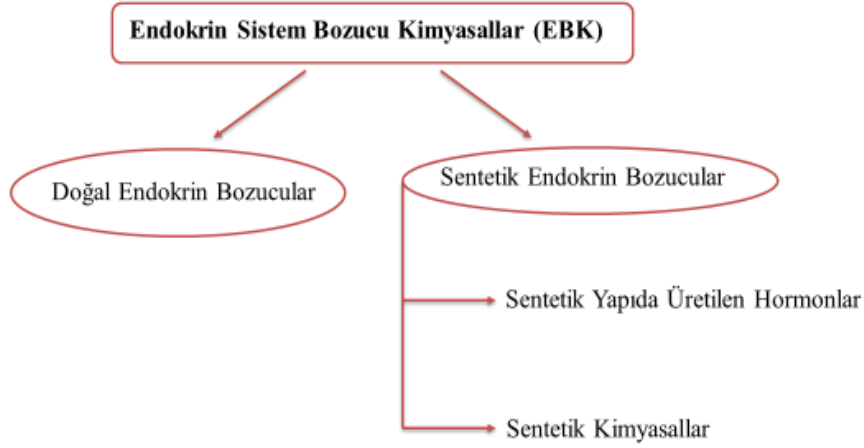
1962'de Amerikan biyolog Rachel Carson tarafından Silent Spring kitabında yapay kimyasalların çevre ve tarımda kullanılması özellikle de böcek ilacı DDT'nin yaşamdaki kirlenme ve ciddi üreme sorunlarına sebep olduğu konusunda uyarıda bulunmuştur [25]. 1985 yılında Hertz tarafından östrojenler ve östrojenik kimyasallar için tarihsel araştırmalar özetlenmiştir [22]. İlki 1991'de Theo Colborn'ın düzenlediği ABD'nin Wisconsin eyaletinde Doğal Hayatı Koruma Vakfı (WWF) Wingspread

Konferansı olan çevre kimyasalları ile ilgili konuların görüldüğü toplantıya 15 farklı disiplinden 21 uluslararası bilim adamı katılmış ve ilk kez endokrin bozucu ifadesi önerilmiştir. [28].

1992’de WHO ve IPCS EBK’ler için tanımlama yapmıştır. 1997’den beri uluslararası kuruluşlar (WHO, OECD, UNEP, IPCS) ve çeşitli ülkeler EBK’ler ile başa çıkmak için stratejiler geliştirmektedir. 1999’da ABD Ulusal Araştırma Konseyi çevredeki hormonal olarak aktif ajanları ya da diğer adıyla EBK’leri yayınlamıştır. [22]. 2002 yılında WHO, EBK biliminin durumunun ilk değerlendirmesini EBK’lere karşı savunmasız üreme, nörodavranış, kanser, bağışıklık sistemi ve diğer endokrin sistemler üzerinde insan sağlığına etkilerini bu belgede incelemiştir. 2006 yılında Irvine şehri Kaliforniya Üniversitesi’ndeki araştırmacılar yaygın hastalıklardan biri olan obezitenin ortaya çıkmasında çevresel kimyasalların rolünün altını çizmiş ve obezite terimini kullanmışlardır. Obezite, yağ hücrelerinin sayısında artışa ve/veya adipositlerdeki yağların depolanması ile birlikte metabolizmanın kalorik depolama moduna doğru kaymasına sebep olmasıyla obeziteyi desteklediği rapor edilmiştir [28]. 2007’de kanunlaşan ve sonraki 10 yılda kademeli olarak uygulanan Kimyasal Maddeler Mevzuatının tescili, değerlendirilmesi, yetkilendirilmesi ve sınırlandırılması yoluyla, bazı EBK’lerin çevreye salıverilmesinden sonra ortaya çıkacak olan problemlerin beklenmesinin aksine önce güvenlik bilgilerinin yer aldığı belge zorunlu hale getirilmiştir. 1991 konferansından 18 yıl sonra 2009’da ABD Endokrin Topluluğu EBK’lerin etki ve mekanizmalarını özetleyen ve insan klinik gözlemlerini deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarla nasıl birleştirileceğini gösteren ilk bilimsel raporu yayınladı. CHEM Trust, 1991-2013 yılları arasında online olarak erişilebilen, EBK’ler ile ilgili detaylı kronolojik bilgi sağlayan anahtar bilimsel ifadeler listesi hazırladı [16]. 2015 yılında çeşitli seviyelerde bozucu metabolizması ile yağlı karaciğer, diyabet ve obeziteyi destekleyebilecek çevresel kimyasalları tanımlamak için metabolizmayı bozan kimyasallar terimi öne sürülmüştür [28].

2.1.2. Endokrin sistem bozucu kimyasalların sınıflandırılması

EBK'ler Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi doğal ve sentetik olmak üzere iki kategoriye ayrılarak sınıflandırılabilir [30], [31].



Şekil 2.2. Endokrin sistem bozucu kimyasalların sınıflandırılması

2.1.2.1. Doğal endokrin bozucular

Endokrin sistemin normal fonksiyonları için gerekli olan doğal hormonlardır. Doğal hormonlar steroid al östrojenleri (estron, 17 β -estradiol ve estriol gibi) içerir. Kolesterol den türetilmiş olan bu hormonlar adrenal korteks, yumurtalık, plasenta veya insan ve hayvanların testisleri tarafından salınır ve biyolojik atıkların boşaltımı yoluyla su yollarına girer [32]. Bu grubun en iyi bilinen kimyasalları, endojen östrojenlerle karşılaştırıldığında nispeten daha zayıf olan fitoöstrojenlerdir. Günlük yaşamda sıklıkla kullandığımız birçok besinde (havuç, elma, sarımsak, kahve, baklagiller, maydanoz, kiraz gibi) bulunmaktadır. Fitoöstrojenler yüksek miktarlarda tüketildiğinde östrojenik etkilere ve düşük derişimlerde antiöstrojenik etkilere sahiptir [33]. Yarılanma ömürleri kısa olan doğal EBK'ler kolaylıkla parçalanarak vücuttan atılırlar [34].

2.1.2.2. Sentetik endokrin bozucular

Bu grupta endokrin sistemde meydana gelebilecek bozuklukları tedavi etmek amacıyla üretilen sentetik hormonlar bulunabileceği gibi ya endokrin sistemi hedef almak için tasarlanmış kimyasallar ya da antropojenik aktivitelerden türetilmiş insan yapımı kimyasallar olan sentetik bileşikler veya ksenoöstrojenler bulunur. Çoğunlukla hormon replasman tedavisi ve doğum kontrol uygulamalarında aktif farmasötik bileşenler olarak bulunan sentetik östrojenleri (17 α -etinilestradiol, dietilstilbestrol (DES) ve poliestrasiol fosfat gibi) içerir ve tekrar insanlardan ve çiftlik hayvanlarından boşaltım yoluyla atılır [32]. Bu EBK'lerin en iyi bilineni güçlü östrojenik aktiviteye sahip olan DES'dir [33]. Yağ dokularında depolanmaları sebebiyle sentetik EBK'ler canlılar üzerinde ciddi zararlara sebep olabilir [34].

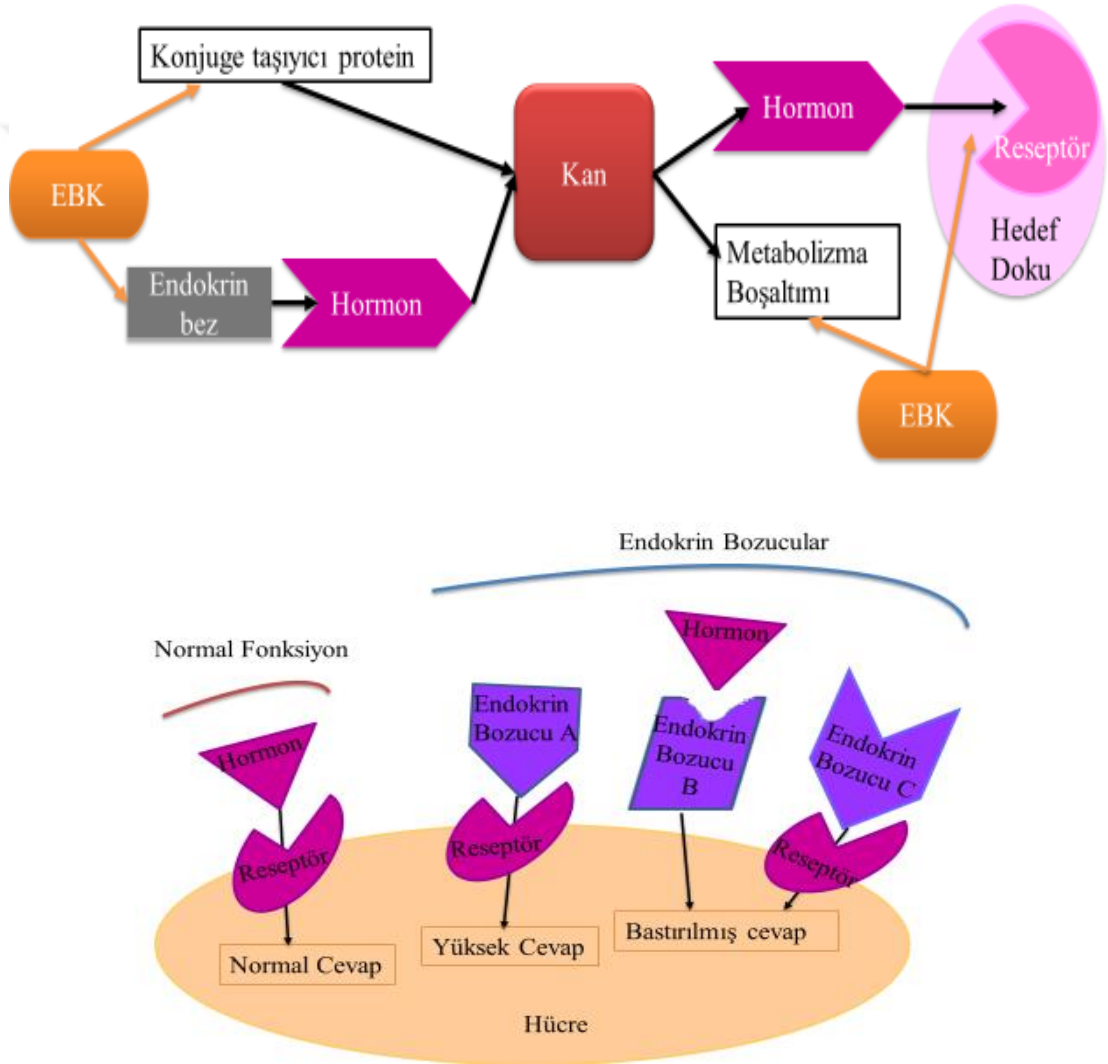
2.1.3. Endokrin sistem bozucu kimyasalların mekanizması

EBK'lerin yüksek heterojenliğe sahip bileşikler grubu olarak karakterize edilmesi sebebiyle etki ve davranış mekanizmalarını tam olarak açıklayabilmek güçtür.

- EBK'ler vücutta düşük dozları yüksek dozlarına göre daha güçlü etkiler gösterebilen, doğrusal olmayan U şekilli veya bifazik cevap gösterir, dolayısıyla bu durum mekanizmanın araştırılmasını güçleştirir [28].
- Hormonlar gibi EBK'lere kritik gelişim döneminde düşük seviyelerde maruz kalındığında bile bozucu etkilere sebep olabilmektedirler. Bebeklik, ergenlik, menopoz gibi hassas dönemlerde maruz kalındığında bireylerin çok sayıda zararlı hastalığa yatkınlıkları artmaktadır.
- EBK'lere maruz kalma zamanı ile hastalığın klinik olarak açıklanması arasında gecikme olabilir ve etkilerin doğrudan değil, maruziyetten birkaç yıl sonra ortaya çıkması mümkündür [28].
- Çevrede EBK'ler tek olarak bulunabildikleri gibi karışım halinde de bulunabilmektedirler ve bu karışımında bulunan farklı sınıf mensubu EBK'ler ya katılma yada sinerjik bir şekilde etkileşime girerek ortaya çıkabilecek etkileri veya hastalıkları önceden öngörmeyi zorlaştırır [28].
- EBK'ler ayrıca hormon reseptör doygunluğu ve doluluğunun karmaşık dinamikleri yüzünden beklenmeyen doz cevapları sergileyebilir [35].
- Endokrin bez tarafından salgılanan bir hormon, konjuge edilebileceği ve taşıyıcı proteine bağlanabileceği kan dolaşımına girer. Serbest bir hormon hedef dokuya

girebilir ve burada olan reseptör tarafından hedef hücreleri tanır. EBK'ler hormonların metabolizması, atılımı, yapımı, yıkımı, taşınması üzerine olumlu ya da olumsuz etkiler gösterebildiği gibi hedef hücredeki davranışları da değiştirebilmektedir. Ayrıca, hormon salgılanmasına, konjugasyona, taşıyıcı proteine bağlanma ve metabolizmaya da müdahale edebilir (Bkz. Şekil 2.3.) [16], [36].

- Tek bir EBK, bir veya daha fazla hormon reseptörüne bağlanma içerebilir ve agonist, antagonist olarak davranır veya karışık etkilere sahiptir [25].



Şekil 2.3. Endokrin bozucuların mekanizması

- EBK'ler genellikle hormon reseptörleri için doğal ligandlara göre daha düşük afinite göstermelerine rağmen bu koşullar altında dahi birçok insan dokusunda ciddi zararlı etkiler göstermektedirler.

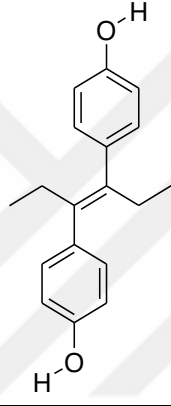
- EBK'lerin etki mekanizmalarından biri de genler üzerindeki doğrudan etkileri ve onların epigenetik etkileridir. Bu etkiler, gelişimin erken dönemlerinde genetik programlamadaki değişikliğin sonucu sonraki yılları derinden etkileyebilmesine ve hastalığın nesiller arası kalıtımına sebep olmaktadır [35].
- Çoğu EBK lipofiliktir, hücre membranlarından geçebilir ve hücre içi reseptörlere bağlanmayı içeren hücrelerde etkilerini gösterir.
- Yapılan araştırmalar, nükleer reseptör sinyallerini değiştirmenin yanı sıra non-steroid reseptörler, transkripsiyonel koaktivatörler, steroid biyosentezi veya metabolizmasındaki enzimatik yollar ve endokrin ile üreme sistemlerini birleştiren birçok diğer mekanizma yoluyla etki yapabildiklerini göstermiştir [35].

Aşağıda tez kapsamında çalışmaları gerçekleştirilmiş olan Dietilstilbestrol ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

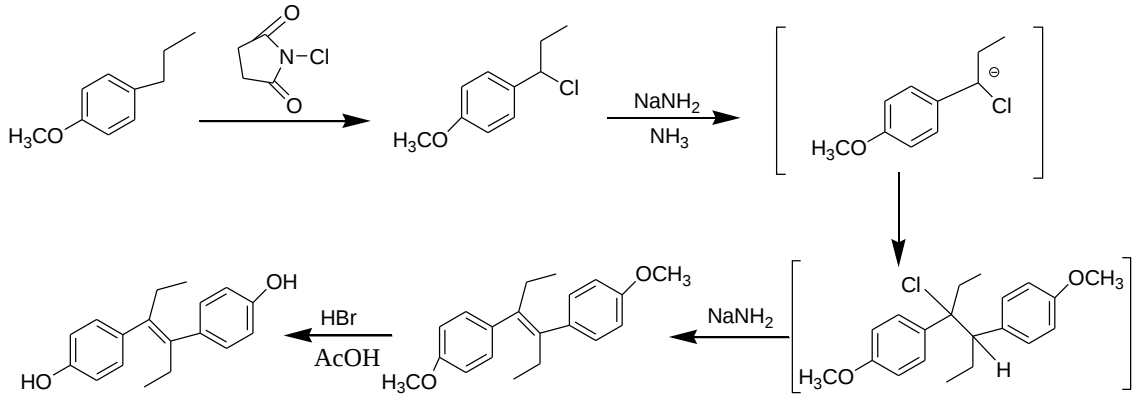
2.1.4. Dietilstilbestrol (DES)

Sentetik EBK'lerin en iyi bilinen kimyasallarından biri olan DES, ilk kez 1938 yılında Sir Edward Charles Dodds'ın formülüne göre Sir Robert Robinson tarafından sentezlenmiş, hamilelikte düşükleri ve ilgili komplikasyonları önlemek için birçok kadına 1940-1971 yıllarında reçete edilmiş ilk sentetik non-steroidal östrojendir [37], [38]. DES'in kimyasal yapısı ve özellikleri Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. DES'in kimyasal yapısı ve özellikleri

Kimyasal Adı	Dietilstilbestrol (DES) 4-[(E)-4-(4-hydroxyphenyl) hex-3-en-3-yl] phenol		
Açık Yapısı		Kapalı Formülü	C ₁₈ H ₂₀ O ₂
		Molekül Kütlesi	268.356 g/mol
		Erime Noktası	169-172°C
		Kaynama Noktası	407,1±25,0°C (760 Torr)
		Yoğunluk	1,107±0,06 g/cm ³ (20°C 760 Torr)
Fiziksel Tanımı	Kokusuz, tatsız, beyaz toz		
Çözünürlük	Suda 12 mg/L (at 25 °C) Alkol, eter, kloroform, yağlarda çözünürdür.		
Tehlikeleri	 GHS06  GHS07  GHS08  GHS09		

Yağda çözünen DES, ağızdan alınmasından sonra 20-40 dakika içinde en yüksek pik derişimine ulaşan emilebilir bileşiktir. Yarı ömürleri 3-6 saattir ve idrar ile atılırlar [39]. Düşük ve hamilelik komplikasyonlarında reçete edilen ilaç için herhangi bir patent talep edilmemesi sebebiyle, çoğu ilaç şirketi DES'i üretebilmek amacıyla eş zamanlı olarak patent başvurusunda bulundu. 1941 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) kapsamlı bir formülasyon oluşturdu ve sonrasında 287 ilaç şirketi DES ve ilgili bileşikleri üretti. Şekil 2.4.'de DES'in sentezi gösterilmiştir.



Şekil 2.4. DES'in sentezi [38].

1 Temmuz 1947'de FDA hamilelikte düşüklerin önlenmesi için DES'in kullanımını resmi olarak onaylamıştır. Ancak, büyük üretim yapılmadan önce ilaç üzerinde oldukça az toksikolojik çalışmalar uygulanmıştır. 1971'de, fetal gelişim sırasında DES'e maruz kalmış kızların ergenlik dönemlerinde vajinada kötü huylu tümör geliştiği bulunmuştur [39]. Araştırmalar sonucu DES'in anne sağlığı için tehlikeli olduğu ve çocuklarında üreme, kalp ve ürogenital anormallikler ile ilişkilendirildiği sonucuna ulaşılmıştır. 1971'de ABD'de FDA tarafından DES insan kullanımı için yasaklanmıştır [37]. DES'e maruz kalan kadınların gerçek sayısı bilinmemesine rağmen 1940-1970 yılları arasında 10 milyonun üzerinde bireyin DES'e maruz kaldığı tahmin edilmektedir [39]. DES'in protein metabolizması ve sentezini arttırma, hayvanlarda günlük gelişimi arttırma ve yağ sentezini azaltma rolünün yanında hayvanlarda östrojen replasmanı için kullanılır [40]. DES, hayvanlarda canlı artışı daha hızlı sağlaması ve daha az yem kullanarak yemden tasarruf edilmesi sebebiyle kullanımı hızla artmıştır [41]. Şekil 2.5'de yenidoğan dönemde DES'e maruz bırakılan farelerin gelişimleri gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Yenidoğan dönemde DES'e maruz kalmanın 4-6 aylık farelerin obezitetleri üzerine etkileri [18].

DES hayvanlarda anabolizan madde olarak kullanıldığında, hayvanlardan boşaltım yoluyla çevreye salınmasının yanı sıra hayvansal ürünlerin (süt, et, yumurta, bal) tüketimi ile insan vücuduna girmektedir. Karsinojen etkilere sahip olduğu anlaşılan DES'in anabolizan madde olarak hayvanlarda kullanımı sınırlandırılmıştır. 1989 yılında Avrupa Birliği'nde büyüme hormonu kullanılarak yetiştirilen hayvanların etlerinin tüketime sunulması yasaklanmıştır. Türkiye'de 19.06.2003 tarihinde Resmi gazetede yayınlanmasının ardından yürürlüğe giren, anabolizan madde olarak hayvanlarda kullanılan hormon ve türevi maddelerin belirtilmesi ve uygulamalarının düzenlenmesini amaçlayan 2003/18 nolu tebliğ, madde 5 ile;

1. Anabolizan madde olarak kullanılan steroidler,
2. Stilbenler ve türevleri, esterleri, tuzları,
3. Beta agonist etkili maddeler
4. Antitiroidal etkili maddeler,
5. Rezorsilik asit laktonlar (Zeranol dahil) olarak numaralandırılmış maddelerin hayvanlarda anabolizan amaçla kullanılması ya da bu maddeleri içeren besinlerin insan tüketimine sunulması yasaklanmıştır [42].

DES'in düşük dozlarda uzun süreli alımı meme kanseri, yumurtalık kanseri, genetik zarar, genetik mutasyon ve tümör riskini arttırabileceği gibi gelecek nesillere aktarılmasına da neden olabilmektedir. Çoğu ülke DES kullanımını yasaklamış ve sıfır toleransta maksimum kalıntı seviyesini yasalaştırmıştır. Buna rağmen, bazı ülkelerde DES hala çevrede, suda ve hayvanlarda bulunmaktadır [43]. DES yüksek kararlılık ve düşük biyobozunurluğa sahip olduğu için, insan vücudu ve çevrede uzun süre kalmaktadır. Bu durum insan sağlığı ve gıda güvenliği için DES'in tayin edilmesini zorunlu kılmaktadır [44], [45]. Bu nedenle, tayin edilmesi bu denli önemli bir madde olan DES, tez çalışması kapsamında çalışılacak olan maddelerden birisi olarak seçilmiştir.

2.2. β -Adrenerjik Reseptör Blokerleri (β -Blokerler)

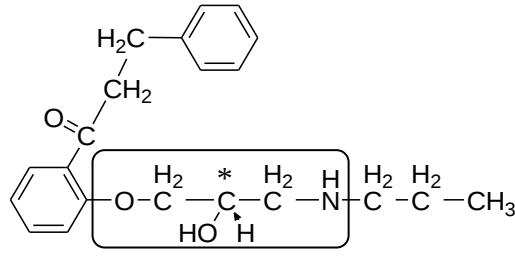
Adrenerjik reseptörler hücre içi sinyal iletimi ve sempatik uyarma arasındaki ilişkide anahtar role sahip trans membran G proteine bağlanmış reseptörlerdir. α ve β reseptörler olmak üzere 2 çeşit reseptör vardır; vasküler düz kas hücrelerinde bulunan α -reseptörler (α -1 ve α -2 reseptörleri) vazokonstrüktör (kan damarlarındaki düz kasın kasılmasını sağlayan madde) olarak davranır ve endotel hücrelerinde vazorelaksasyon (damar basıncının azalması) ile ilişkilendirilir [46].

Hücre membranı üzerinde bulunan β -reseptörleri metabolik ve fizyolojik birçok fonksiyonu düzenler. β -Blokerler adrenerjik sistemin kalp üzerindeki etkilerini engeller ve ikinci bir haberci sistem aracılığıyla bu voltaja duyarlı kanalları dolaylı olarak değiştirir. β -1 ve β -2 olmak üzere 2 çeşit β -reseptörü vardır [47].

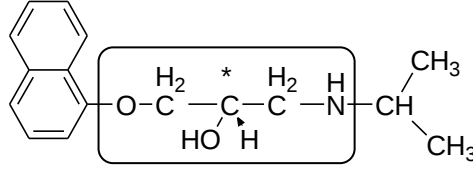
β -1 reseptörü çoğunlukla kalpte, böbreğin renin salgılayan dokusunda, sulu salgıların üretiminden sorumlu göz kısımları ve akciğerin bronşiyal dokusunda sınırlı derecede bulunur. β -1 adrenerjik reseptörler kalp atışını ve miyokardiyal kasılmayı düzenler ama stres durumuyla kardiyak β -2 reseptörlerinin uyarılmasında epinefrin provokasyonu ile birlikte kalp atışı ve kasılmasına katkı sağlar.

β -2 reseptörleri akciğerin bronşiyal dokularında, vasküler düz kaslarda, pankreasın insülin salgılayan dokularında, gastrointestinal sistemde baskındır ve kalp ile koroner arterlerde sınırlı derecede bulunur. Yaş ile reseptörlerin popülasyon yoğunluğu azalır. β - reseptör popülasyonu durağan değildir ve β -adrenerjik bloker ajanlar ile uzun dönem terapisi sırasında reseptörlerin sayısı artar. Kalp 70:30 oranında β -1 ve β -2 reseptörleri içerir. Kalp yetmezliğinde popülasyon ve sayıda kardiyak β -1 reseptörleri azaltılır.

β -blokerler, β -reseptörleri bloke ederler. β blokerlerin hepsi asimetric bir karbon atomu (D- ve L- izomerlerinin oluşumunu sağlayan) ve amino alkol yan zincirini içerir. Şekil 2.6.'da β -blokerlerden (S)-Propafenon ve (S)-Propranolol'ün moleküler yapıları verilmiştir.



(S)-Propafenon



(S)-Propranolol

Şekil 2.6. (S)-Propafenon ve (S)-Propranolol yapısı [48]

Propranolol, sotalol, propafenon gibi β blokerler için D- ve L- enantiyomerlerinin β bloker etkileri karşılaştırıldığında L- enantiyomerlerinin daha etkili olduğu bulunmuştur. D-enantiyomerlerin olası yan etkileri ve etkileşimleri arttırması sebebiyle β bloker ilaçlarla tedavi edilen hastaların rasemik karışımları uzun süre kullanması önerilmez.

Adrenalin ve noradrenalin veya diğer adıyla epinefrin ve norepinefrin olarak bilinen katekolaminlere yapısal olarak benzerler [49]. β -blokerler, katekolaminlerin yarışmalı farmakolojik inhibitörleridir. β -blokerler, hücrelerde β -adrenoseptörlere bağlanır ve böylece epinefrin ve norepinefrinin bağlanmasını bloke ederler. Norepinefrin sempatik sinir sisteminin temel nörotransmitteridir. Epinefrin, adrenal iliksi bezden salınır ve kan damarları ve kalp üzerinde etkileri vardır. Bu iki madde, endokrin davranışları yüzünden hem nörotransmitter hem de hormonlar olarak rol alırlar.

β -blokerler öncelikli olarak kalp hastalıkları ve ilgili durumlarda kullanılırlar. Adrenalin kalp atış hızı ve miyokard kontraktilesini arttırarak kardiyak debinin artmasına sebep olur. Bu durumda miyokardın oksijen ihtiyacı artar. β -blokerlerin adrenoreseptörlere bağlanması kalp atışında ve kalp kası kasılmasında azalmaya yol açar. Kalp kasının gereksinim duyacağı oksijen miktarı azalacağından anjina pectoris sırasında göğüste oluşan ağrı azalır ve β -blokerler sonraki yıllarda kalp krizi geçirme olasılığı yüksek olan anjina hastasının kalp krizi geçirmesini engellemeye yardımcı olur [49]. Tedirginlik ve yüksek kaygının olduğu golf, okçuluk, av gibi spor dallarında sakinlik ve rahatlama hissini oluşturması sebebiyle β -blokerler performans arttırıcı

olarak adlandırılmıştır ve Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) tarafından yasaklanmıştır [50].

β -blokerler enerji gereksinimi olmadan mide ve bağırsaklardan difüzyon ile emilirler, kanda ise albümin ve proteinlere bağlanırlar. Bu ilaçların yağda çözünenleri metabolize edilirken, suda çözünenleri idrar yoluyla atılırlar [48].

2.2.1. β -blokerlerin tarihçesi

İngiltere’de 19.yy’ın sonlarında ilk katekolamin araştırmaları Dr. George Oliver ve Sir Edward Albert Sharpey-Schafer (endokrinolojinin kurucusu) tarafından adrenal bezlerden farmakolojik olarak aktif eksrakt ile olan çalışmalarında başlamıştır. Dr. Raymond Ahlquist 1948’de Birleşik Devletleri’nde α - ve β - adrenerjik reseptör aracılığı ile davranan katekolamin benzeri ilaçlara iki belirgin doku-organ cevaplarının belirlendiği klasik deneyler serisi yürütmüştür. 1958’de ilk beta bloker ilaç dikloroizoproterenol farmasötik şirketi Eli Lilly tarafından üretilmiştir. 1964’de keşfedilen, 1988’de Nobel ödülü alan Sir James Black ve İngiltere’de Emperyal Kimya Endüstrisi’nde bulunan iş arkadaşları şu an hala kullanılmakta olan ve kardiyak ilaç tedavisinin temeli olan β -adrenerjik bloker Propranolol’ü geliştirmişlerdir [49]. 1970’ler ve 1980’lerde yapılan araştırmalar kardiyak β -1 reseptörler, kısmi adrenerjik agonist aktivitesi, eş zamanlı α -adrenerjik bloklayıcı aktivite ve ilave doğrudan kan damarlarını genişletici aktivite için nispeten seçici ilaçların geliştirilmesine yol açmıştır. Hem β -1 hem de β -2’yi bloke eden birinci kuşak ilaçlar nispeten nonselektiftir. Öncelikle β -1’i hedefleyen ikinci kuşak ilaçlar daha kardiyoselektiftir ve yüksek dozlarda seçiciliğini kaybederler. Üçüncü kuşak ilaçlar vasküler α -reseptörlerin anestetik madde ile sinirsel iletiminin kesilmesi ile kan basıncını düşürür ve damar genişletici davranışa sebep olur [50].

Kardiyak β -1 reseptörleri blokajı kalp atışında, miyokardiyal kasılmada ve kardiyak kasılma hızında azalmaya sebep olur. β blokerler kalp krizi, anjina gibi durumlarda hayat kurtarıcı olabilmesinin yanı sıra, göğüs ağrısının ağır sancılarını önlemede etkilidirler.

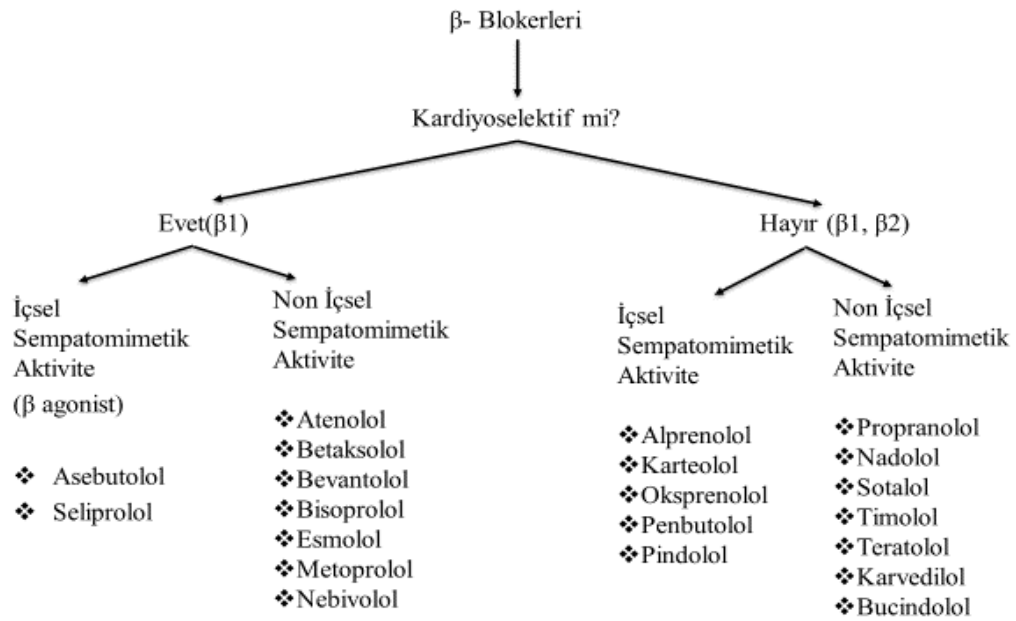
Stres ve hareketli egzersiz durumunda adrenalın miktarını arttırarak

- 1) Kan trombositlerinin sayısı ve yapışkanlığını,
- 2) Pıhtılaşma faktörü VIII (hemofilik faktör) ve
- 3) Kanın viskozitesini arttırır.

β -blokerler adrenalinin bazı zararlı etkilerini bloke ederler. β -blokerler, antiaritmik etkilere sahiptir; faz 4 diastolik depolizasyonu baskılayarak, artan katekholaminlerin yol açtığı aritmileri engeller. Bu davranış iskemik kalp hastalığı olanlar için ve atrial fibrilasyonun neden olduğu hızlı kalp atışına sahip hastalar için önemli bir etkidir [49]. β -blokerler çoğu tedavide kullanılmasına rağmen bu ilaçların yüksek plazma derişimi astım, solunum güçlüğü sendromu, kalp yetmezliği gibi ciddi problemlere neden olabilir. Çevrede ve atık sularda bu ilaçlarının atıklarının bulunması sağlık açısından olumsuz durumlara sebep olmaktadır. Bu sebeple bu ilaçların biyolojik sıvılarda ve çevrede analizi için metot geliştirilmesi ve uygun farmasötik formülasyonlarının bulunması gereklidir [51], [52].

2.2.2. β -blokerlerin sınıflandırılması

Aşağıda şekil 2.7’de β -blokerlerin kardiyoselektifliklerine göre sınıflandırılması verilmiştir [49].



Şekil 2.7. β -blokerlerin sınıflandırılması [49].

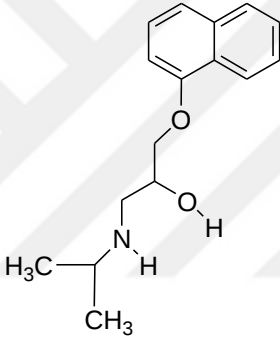
İntrinsik (içsel) sempatomimetik aktivite; bazı beta bloker ilaçlar kısmi agonisttir ve beta reseptörleri duruma göre bloke veya aktive ederler.

Aşağıda tez çalışması kapsamında çalışmaları gerçekleştirilmiş olan Propranolol β -blokeri ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

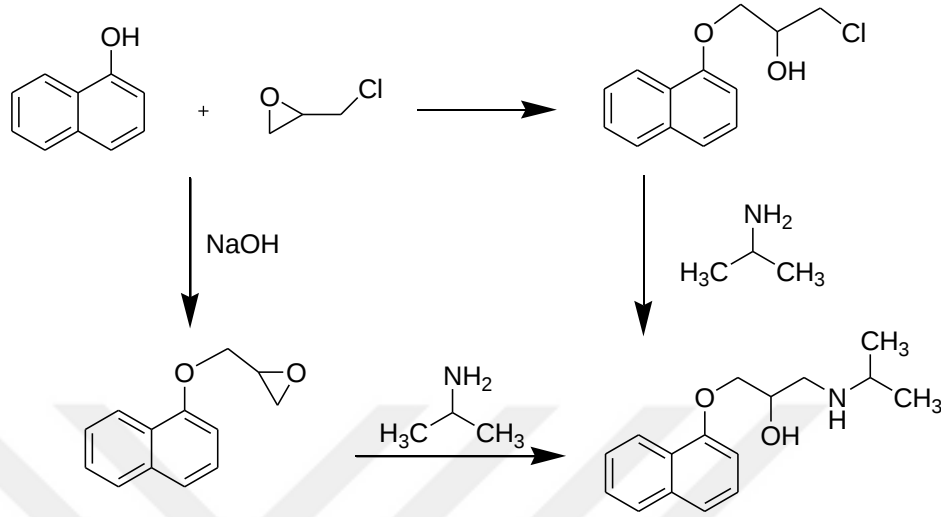
2.2.3. Propranolol (PROP)

Propranolol (PROP) 1964 yılında keşfedilmiştir ve bu keşif için 1988 yılında James W. Black ve meslektaşlarına Nobel Ödülü verilmiştir [53]. PROP'un kimyasal yapısı ve özellikleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. PROP'un kimyasal yapısı ve özellikleri

Kimyasal Adı	Propranolol (PROP) (RS)-1-(1-methylethylamino)-3-(1- 15 naphthyloxy) propan-2-ol 1-naphthalen-1-yloxy-3-(propan-2-yl amino) propan-2-ol 1-isopropylamino-3-(1-naphthyloxy)-2-propranolol		
Açık Yapısı		Kapalı Formülü	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂
		Molekül Kütlesi	259.349 g/mol
		pKa	9.5±0.1
		Fiziksel Tanımı	Beyaz, kokusuz, kristal katı
Çözünürlük	Suda ve alkolde çözünür. Kloroformda çözünürlüğü azdır.		
Tehlikeleri	 GHS07		

PROP'un aynı başlangıç materyali ile 2 yolla sentezlenmesine ait reaksiyon Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8. PROP sentezi [54].

PROP β -adrenerjik antagonist olarak da adlandırılan β -bloke edici ilaçlar sınıfına aittir [51]. Birçok hastalığın tedavisinde kullanılan PROP içeren birçok ilaç, reçete edilen ilk 200 ilaç arasındadır [55]. β -adrenerjik blokerlerin prototip ilacı olarak düşünülen PROP, hem β -1 hem de β -2 reseptörlerini bloke eden bir β -blokerdir [56]. PROP'un S-enantiyomeri, R-enantiyomerine göre 100 kat daha etkindir. [48], [51].

Damardan enjeksiyonu ile veya oral olarak alınabilir. PROP'un oral olarak alınmasıyla hızlıca emilmekte ve hızlı iyileştirici etki göstermektedir [51]. Yaklaşık olarak 4 L/kg dağılım hacmine sahip olan PROP ilk geçiş metabolizmasına karaciğerde uğrar. %25'lik kısmı sistemik dolaşıma katılır, 30 dakika kanda dolaşımında bulunur [56]. En uzun yarılanma ömrüne (5-7 saat) sahip temel metaboliti 4-hidroksi PROP'dır. İlacın ağızdan alınmasının 1-2 saat sonrasında kan derişimi en yüksek seviyeye ulaşır ve maksimum etkiyi verir. Kan beyin bariyerini geçerek %90 oranında plazma proteinlerine bağlanır. İnsanlarda 3-6 saat yarılanma ömrüne sahiptir [57]. PROP çok geniş aralıkta farklı hastalığı tedavi etmek için kullanılmaktadır. Bu hastalıklara örnek olarak, kardiyovasküler hastalıklar, kalp ritim bozukluğu, kalp krizi, miyokardiyal enfarktüs (koroner damarlardan birinin tıkanması), yüksek kan basıncı, feokromositoma (böbrek üstü bezinden kaynaklanan bir tümör), sinüs taşikardisi, kronik göğüs ağrısı, migren, esansiyel tremor (titreme hastalığı), performans kaygısı, hipertiroidi, kapiler

hemanjiyom (iyi huylu bir çeşit tümör) verilmektedir. Son zamanlarda çocuk hastalıklarında da kullanılmaktadır [51], [53], [13], [58].

Bu ilaç iyileştirici etkisinin yanı sıra yoğun konsantrasyon gerektiren sporlarda doping ajanı olarak kullanılması sebebiyle Uluslararası Olimpiyat Komitesi ve Dünya Anti Doping Ajansı (WADA) PROP'u yasaklanan maddeler listesine eklemiştir. WADA analitik yöntemlerden elde edilen sonuçların güvenilirliği için bu ilacın idrarda gerekli minimum performans limitini 500 µg/L olarak belirlemiştir [51], [59].

2.2.3.1. Propranolol'un yan etkileri

İshal, göz kuruluğu, saç dökülmesi, bulantı, halsizlik, baş dönmesi, bayılma, düşük nabız, bradikardi (kalp atışının azalması), düşük kan basıncı, bronkospazm (akciğerlerin kasılması), akut kalp yetmezliği, atriyoventriküler iletim bozukluğunun artması, hipoglisemi, astım ilacın kullanımında rastlanılabilecek yan etkileridir [53], [56], [13], [60]. Uyku bozukluğu ise sıkça rastlanılan yan etkisidir [61]. Ayrıca hücre zarı için büyük önem taşıyan hücre zarının fosfolipid çift tabakasına da zarar verebilir [10].

Belirtilen yan etkileri ve doping ajanı olarak yasaklanan bu β -bloker ilacın biyolojik sıvılarda, aynı zamanda hastane atık sularından, boşaltım yoluyla insanlardan çevreye salınması ile canlılara verebileceği zararları önlemek için tayin edilmesi önemlidir. Bu sebeple, tayin edilmesi önemli olan PROP tez çalışması kapsamında çalışılacak ikinci madde olarak seçilmiştir.

2.3. Elektrokimya

Elektrik ve kimya çalışmalarının birleştirilmesiyle oluşturulan modern bir araştırma alanıdır. Bu bağlantı ilk bataryayı keşfeden Volta tarafından 1793' de gösterildiği gibi kimyasal enerjiyi elektriğe dönüştürmek amacıyla, bilim adamları tarafından oldukça erken dönemlerde tespit edilmiştir. Benzer şekilde, elektrik enerjisi kimyasal enerjiye çeşitli faydalı bileşiklerin elektrosentezi için dönüştürülmüştür. 1800'de ilk kez bunu gösterenlerden birisi Nicolson, Volta pilini kullanarak suyu hidrojen ve oksijene parçalamıştır. Daha sonra Faraday elektrokimyasal reaksiyonların daha sistematik çalışmalarını sağlamak için bir elektrokimyasal reaksiyonda tüketilen elektrik miktarı ile elektroliz ürünlerinin miktarı arasında nicel bir ilişki olduğunu göstermiştir. Temelde elektrokimya, elektrot ve kimyasal türler arasında yük taşınımının

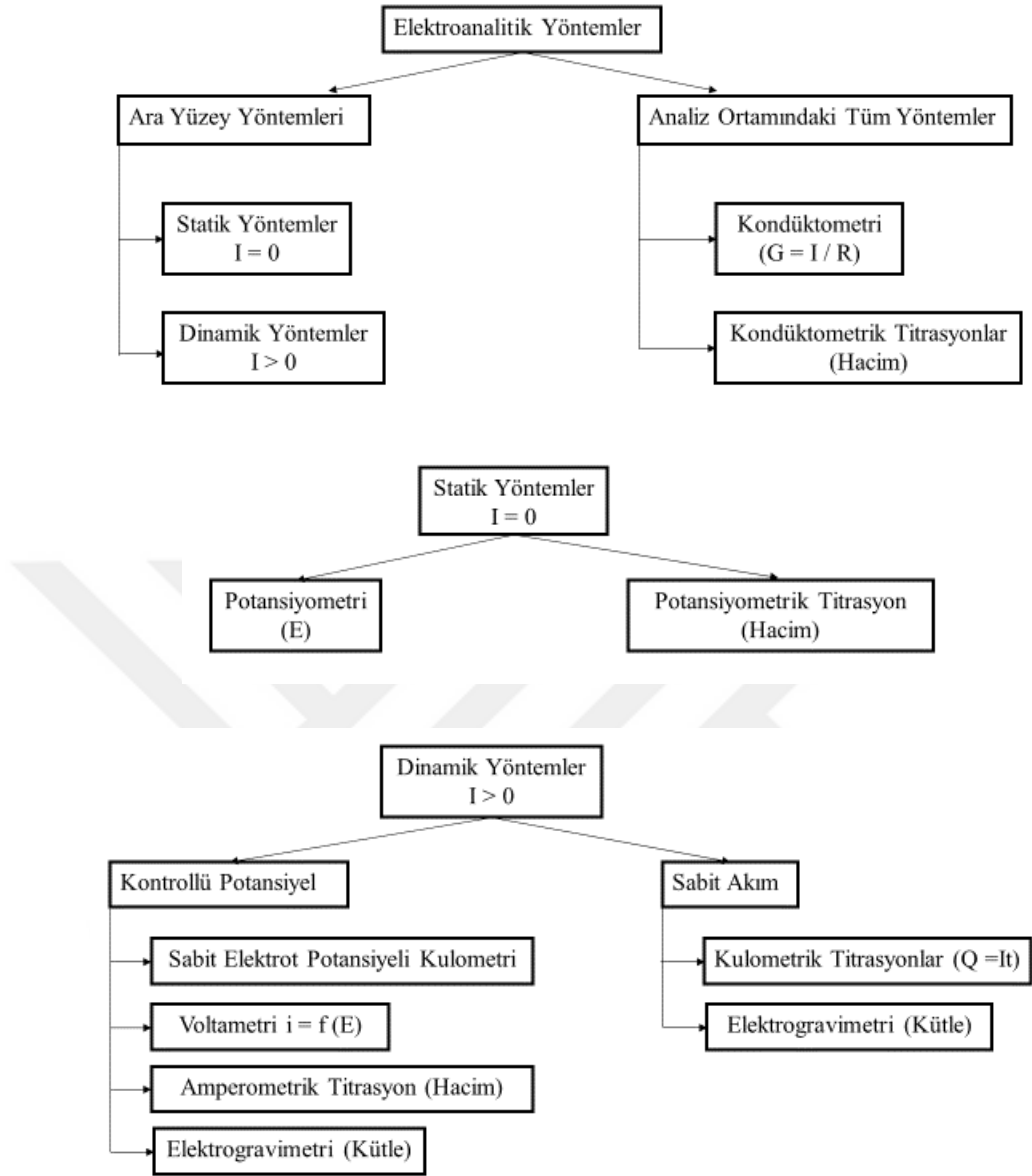
olduğu iyonik iletken ve elektrot iletkeni arasındaki ara yüzeyde bulunan kimyasal türlerin reaksiyonu ile ilgilidir. Elektrot genel olarak metal veya yarı iletken materyallerden oluşur ve elektrolit olarak adlandırılan iyonik iletken, çözelti bazlı (organik veya sulu çözeltilerde çözünmüş iyonlar) veya katı formda olabilir.

Bu ilk örnekler ve Nernst, Heyrovsky, Frumkin, Volmer, Tafel, Wagner, Pourbaix, Marcus, Gerischer, Conway ve Bockris gibi öncü bilim adamları tarafından elektrokimyasal reaksiyonların termodinamiği ve kinetiğine ilişkin temel bilgi birikimi sonucunda, elektrokimya disiplini biyolojik, kimyasal ve fiziksel bilimleri kapsayan çok disiplinli bir alana dönüşmüştür. Bu nedenle, uygulama alanları da oldukça fazladır. Elektroanalitik kimya elektrokimyanın bir alt dalı olup, elektrokimyasal süreçlerin analitik amaçlar için kullanılmasını kapsamaktadır [62].

2.3.1. Elektroanalitik kimya

Analitik kimya biliminin önemli bir kısmını elektroanalitik kimya oluşturmaktadır ve elektroanalitik yöntemler ile elektrokimyasal bir hücrede bulunan türlerin elektriksel özellikleri (potansiyel, akım, yük miktarı, iletkenlik) ölçülmektedir. Çok düşük gözlenebilme sınırına inilebilen elektroanalitik yöntemler ile ara yüzeyde gerçekleşen yük aktarım hızı ve kütle aktarım hızı, kimyasal reaksiyonların denge ve hız sabitleri, adsorpsiyon özellikleri gibi konuları da içeren birçok bilgi elde edilebilmektedir. Elektroanalitik yöntemler diğer yöntemler ile kıyaslandığı zaman; duyarlılık, numune hazırlama basamağında daha az saflaştırma işlemine ihtiyaç duyması, kısa sürede cevap elde edilmesi, ekonomik olması, analiz için az miktarda numuneye ihtiyaç duyması, düşük tayin sınırı, geniş doğrusal çalışma aralığı, basit olması ve genel olarak tayin edilen maddenin yükseltgenme veya indirgenme basamağı için spesifik olması avantajlarına sahiptir. Bütün bu avantajları göz önüne alınarak tez çalışması kapsamında seçilen DES ve PROP tayinine yönelik bir analitik yöntem geliştirilmesi için elektroanalitik yöntemlerin tercih edilmesine karar verilmiştir.

Elektroanalitik yöntemler kendi içinde çeşitli alt dallara ayrılmaktadır, bunlar Şekil 2.9’da verilmiştir.



Şekil 2.9. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması

Tez kapsamında burada verilen yöntemlerden voltametri kullanılmıştır. Bu nedenle, voltametri aşağıda daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

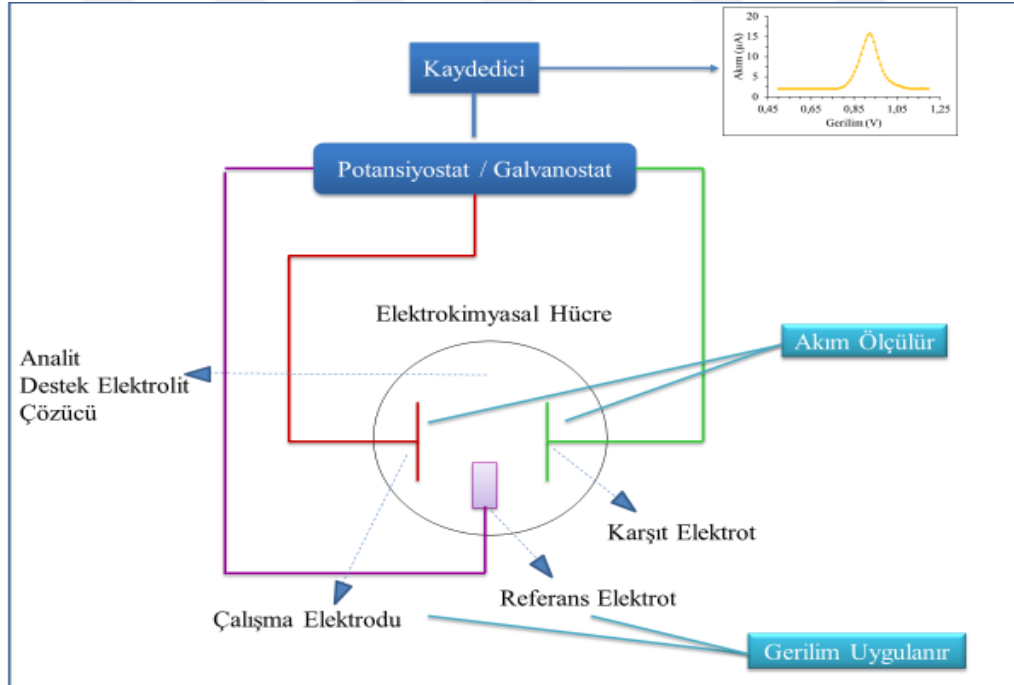
2.3.2. Voltametri

Bir çalışma (indikatör) elektrodunun polarize olduğu koşullarda, analit hakkında bilgi sağlamak amacıyla sisteme uygulanan potansiyele veya akıma karşı elektrokimyasal hücrede oluşan akımın veya potansiyelin ölçüldüğü elektroanalitik bir yöntemdir.

Voltametrik sistemlere bakıldığında 3 temel bileşeni bulunmaktadır;

- ◆ Elektrokimyasal hücre
- ◆ Potansiyostat/Galvanostat
- ◆ Kaydedici

Elektrokimyasal hücreler olarak üç veya beş boyunlu hücreler ile birlikte iki yada üç elektrotlu sistemler kullanılmaktadır. Sistemde iki elektrot kullanıldığında, kullanılan elektrotlar çalışma ve referans (karşılaştırma) elektrotlardır. Sistemde üç elektrot kullanılıyorsa, kullanılan elektrotlar çalışma, karşıt ve referans elektrotlardır. Şekil 2.10'da voltametrik ölçümlerde kullanılan bir elektrokimyasal sistemin şekli şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Voltametrik ölçümlerde kullanılan üç elektrotlu elektrokimyasal sistem

Elektrokimyasal hücre içerisine eklenen ölçüm çözeltisi ise analit, çözücü ve destek elektrolit bileşenlerini içerir. Analit olarak elektroaktif bir tür seçildikten sonra

analiti çözebilmek amacıyla uygun bir çözücü seçilir. Seçilen çözücü çoğunlukla su veya sulu karışımlar olsa da bazen susuz çözücüler (organik asitler, asetonitril, alkoller gibi) tercih edilebilmektedir. Seçilen analitten en az 100 kat daha fazla eklenen, kuvvetli elektrolit olan destek elektrolit, ortamdaki elektriksel direnci düzenlemekte ve karşıt ve çalışma elektrotları arasında meydana gelen iyon göçünü kontrol etmektedir [63]. Ayrıca destek elektrolit seçimine göre bazen tampon olarak ortamın pH'sını ayarlama veya ligand olarak bazı iyonları kompleksleştirme görevlerine de sahip olabilir [64]. Alkali metal tuzları sıklıkla kullanılan destek elektrolit türleridir.

Çalışma, karşıt ve referans elektrotları içeren elektrokimyasal bir hücrede elektroaktif bir analitin elektrokimyasal davranışının incelendiği sistemler sonucu gerilime karşı akımın grafiği ile elde edilen eğrilere voltamogram denir [65].

Bu yöntemin gelişimi, 1959'da kimyada Nobel Ödülü alan Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1922'de polarografinin keşfi ile başlamıştır. Çalışma elektrodu olarak damlayan cıva elektrotların kullanılması polarografik yöntemlerin, voltametrik yöntemlerden en belirgin farkıdır. 1960'lar ve 1970'lerde voltametrimin teori, metodoloji ve enstrümental kısımlar gibi alanlarında önemli gelişmeler sağlanmış, analitik metotlarda uygulamaları ve hassaslığı arttırılmıştır. Voltamerik tekniklerin önemli avantajları vardır. Bunlar aşağıda listelenmiştir:

- ✓ Yükseltgenme ve indirgenme mekanizmaları ile elektron aktarım mekanizmalarını aydınlatması,
- ✓ Yükseltgenme veya indirgenme sonucu bir türün toplam miktarı dışında, indirgenen veya yükseltgenen formunun miktarının belirlenebilmesi,
- ✓ Hem organik hem de inorganik türler için geniş doğrusal çalışma aralığında iyi hassasiyet sağlaması,
- ✓ Kullanılabilecek çözücü ve elektrolit çeşidinin fazla olması,
- ✓ Geniş sıcaklık aralığı,
- ✓ Hızlı analiz süresi,
- ✓ Birden fazla analitin eş zamanlı tayini,
- ✓ Kinetik ve mekanik parametreleri belirleme yeteneği,
- ✓ Farklı dalga formlarında potansiyel üretilebilme kolaylığı ve
- ✓ Küçük akımların ölçülebilmesi [66].

2.3.2.1. Voltametrik sistemlerde kullanılan elektrotlar

Referans elektrotlar

Referans elektrot Nernst eşitliğine uygun tersinir bir yarı tepkime içeren kesin ve kararlı, küçük akımlar ile değişmeyen bir denge potansiyeline sahip bir yarı hücredir. Elektrokimyasal hücrede ölçülebilen diğer elektrotların potansiyellerine karşı referans noktası olarak kullanılır. Hücrede kullanılan elektrolitten bağımsız bir elektrot potansiyeline sahip, çoğunlukla ticari olarak ulaşılabilir yaygın birkaç elektrot mevcuttur. Bunlar; doymuş kalomel elektrot (DKE), standart hidrojen elektrot (SHE) ve gümüş klorür/gümüş elektrot olarak sıralanabilir. Bu referans elektrotlar genellikle çözeltiden gözenekli bir sıra ile ayrılır [66], [67]. Bu elektrotlara ideal olarak polarize edilemeyen elektrotlar da denir [65].

Karşıt elektrotlar

Çalışma elektroduna, analiti yükseltmek veya indirmek amacıyla bir potansiyel uygulanarak sistemdeki akım akışı başlatılır. Akım çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında elektron akışı ile sağlanır. Elektrokimyasal hücrede meydana gelen reaksiyonu etkilemez (bu yüzden yüzey alanı çalışma elektrotuna oranla daha büyüktür), meydana gelen akımın taşınmasına yardım eder. Bu sayede sistemde kullanılan referans elektrotun üzerine akım geçmesini engelleyerek elektrodu korur. Karşıt elektrot olarak platin veya karbon çoğunlukla tercih edilir [66], [67].

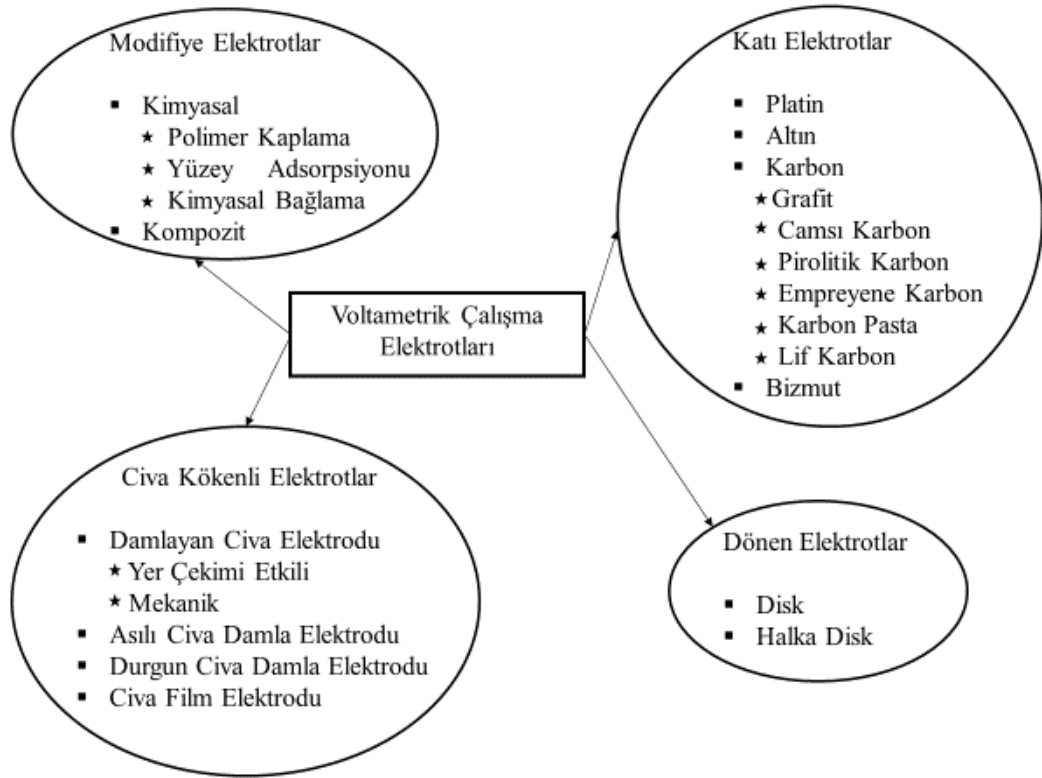
Çalışma Elektrotları

Elektrokimyasal hücrede, yüzeyine gerilim veya akım uygulanarak yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerinin incelendiği elektrotlardır. Sistemden alınan cevap eğrileri büyük oranda kullanılan çalışma elektrotuna bağlıdır. Bu nedenle çalışma elektrotu seçilirken bazı kriterlere bakılması gerekmektedir. Bunlar aşağıda maddeler halinde sıralanmışlardır:

- ✱ İdealde hızlı ve tekrarlanabilir olarak analit ile uygun redoks reaksiyonu vermesi,
- ✱ Kullanılan elektrolit çözelti içerisinde uygulanacak potansiyel aralığının oldukça geniş olması ve bu aralıkta inert olması,
- ✱ Elektrot maliyeti,

- * İşlenebilir olması,
- * Yüzeyin rejenere edilebilir olması ve
- * Toksisitesi dikkat edilmesi gereken önemli parametrelerdir.

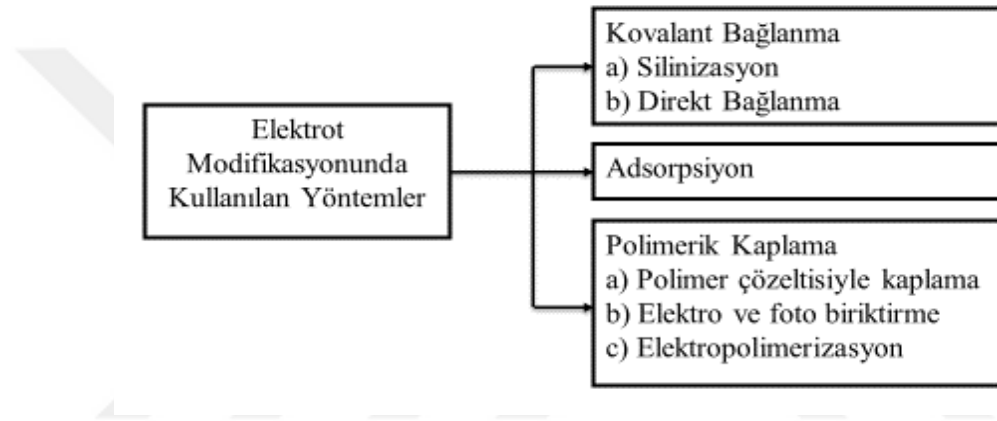
Voltametrik yöntemlerde çok çeşitli tür ve şekilde çalışma elektrotları mevcuttur ve bunlar Şekil 2.11’de gösterilmiştir. Platin, altın, paladyum, karbon ve cıva sıklıkla kullanılan elektrot materyalleridir. Karbon elektrotların en yaygın formları camı karbon, karbon pasta ve grafit elektrotlarıdır. Bu çalışma elektrotları ölçümlerde, bazen direkt olarak veya bazen de bazı modifikasyon işlemleri yapıldıktan sonra kullanılır. Kalem ucu grafit (KUG) elektrotlar ticari olarak ulaşılabilir, tek kullanımlık, ucuz, iyi mekanik dirence sahip olması, kolay modifikasyon imkanı sağlaması, düşük arka plan akımına sahip olması sebebiyle sıkça tercih edilmektedir [68], [69]. Tez çalışması kapsamında da KUG elektrotlar tercih edilmiştir.



Şekil 2.11. Voltametrik yöntemlerde kullanılan çalışma elektrotları

2.3.2.2. Modifiye elektrotlar ve modifikasyon yöntemleri

Elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan çalışma elektrodu sayısının sınırlı sayıda olması sebebiyle, kullanılacak çalışma elektrot yüzeyleri ölçüm öncesi yapılan bazı işlemlerle modifiye edilir. Modifikasyon işlemi için kullanılan teknikler Şekil 2.12’de gösterilmiştir. Yapılan modifikasyon işlemleri ile elektrodun fiziksel ve kimyasal özellikleri iyileştirilir, elektron transferi hızlanır böylece elektrot performansı iyileştirilerek, analite karşı modifiye edilmemiş elektrotta göre daha yüksek cevap vermesi sağlanır.



Şekil 2.12. Elektrot modifikasyonunda kullanılan yöntemler [70].

Yapılan modifikasyon işlemi ölçümlerin hassaslığını iyileştirmektedir ancak bu iyileşme için uygulanan modifikasyon işleminin analite uygun olarak seçilmesi gerekmektedir. Bu modifikasyon kapsamında elektrokimyasal ön işlem uygulanabilir veya uygun bir modifikasyon ajanı ile elektrot yüzeyi değiştirilebilir. Grafit temelli elektrotlara elektrokimyasal ön işlem uygulanmasıyla yüzey alanlarının ve elektron transfer hızlarının artırılması sağlanabilir [71]. Pozitif potansiyellerde ön işlem uygulanan KUG elektrot yüzeyinin hidrofilik özelliği arttırılacağından elektrotun adsorpsiyon özelliğinde iyileşme sağlanır. Elektrokimyasal ön işlem görmüş KUG elektrotlar diğer modifiye karbon temelli elektrotlarla kıyaslandığında genellikle iyi elektrokimyasal reaktivite, hassaslık ve seçicilik gösterdiği rapor edilmiştir [72].

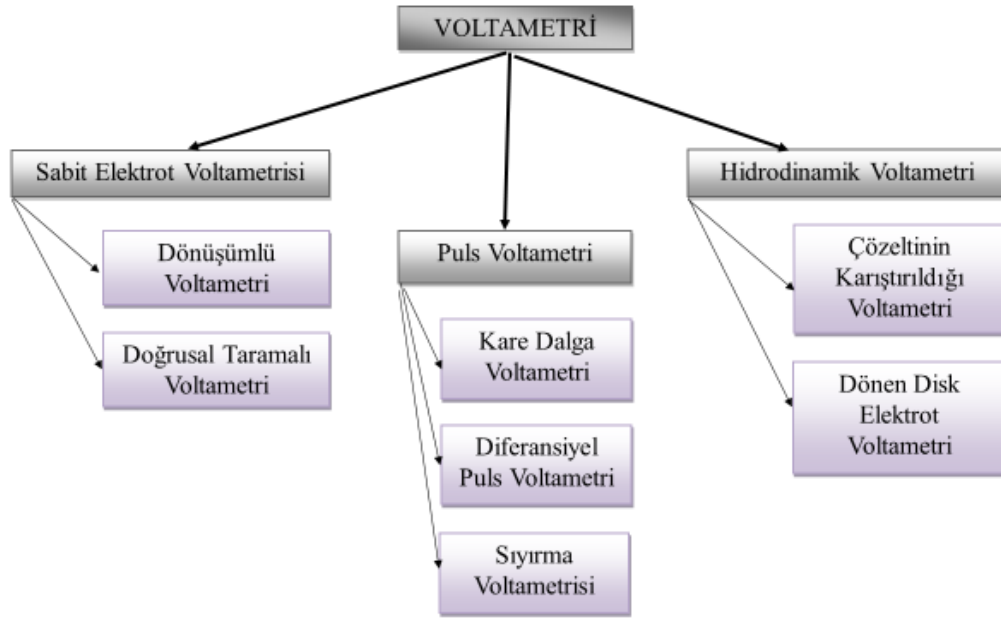
Metal nanopartiküller, grafen ve türevleri, nanokompozitler, karbon nanotüpler, kompleksler gibi birçok modifikasyon ajanı elektrotları modifiye etmek amacıyla kullanılmaktadır. Fakat, nanopartiküllere olan ilginin artmasıyla birlikte modifikasyon

ajanı olarak metal nanopartiküllerin kullanımı artmıştır. Metal nanopartiküllerin en kararlılarından birisi olan altın nanopartiküller boyutlarının küçük olması, çok iyi katalitik ve iletkenlik özelliklerine sahip olması sebebiyle elektrokimyasal sensörlerin hassasiyetini arttırmak amacıyla sıklıkla tercih edilir [73]–[77].

Yürütülen tez çalışması kapsamında DES analizi için KUG elektrodun altın nanopartiküller ile modifiye edilmesi, PROP için ise KUG elektroda elektrokimyasal ön işlem uygulanarak elektrot yüzeyinin değiştirilmesi sağlanmıştır.

2.3.2.3. Voltametrik yöntemlerin sınıflandırılması

Voltametrik tekniklerde temel prensip sisteme belirli bir potansiyel uygulayarak meydana gelen akımı ölçmektir. Voltametri elektrokimyasal reaksiyon mekanizmalarını araştırmak için kullanılan önemli tekniklerden biridir ve çeşitli formları Şekil 2.13’de gösterilmiştir.

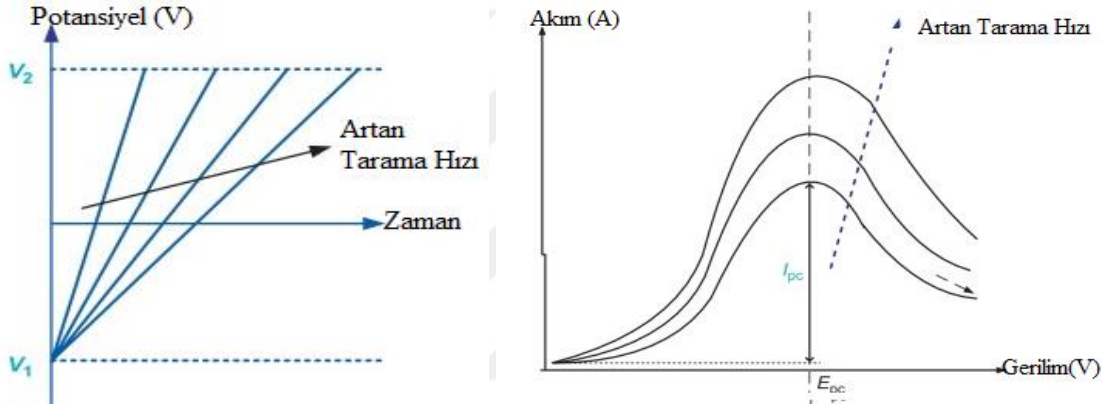


Şekil 2.13. Voltametrik yöntemlerin sınıflandırılması

Aşağıda başlıca kullanılan doğrusal taramalı voltametri, dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametri yöntemleri açıklanmıştır.

Doğrusal taramalı voltametri (DTV)

Doğrusal taramalı voltametri (DTV) tekniği, Şekil 2.14’de gösterildiği gibi tipik olarak 1 ve 1000 mV/s arasında seçilen bir tarama hızında, zaman ile doğrusal olarak artan veya azalan gerilim taramasını içerir [78]. Tarama sonucu alınan elektroaktif türün indirgenme veya yükseltgenmesine ait gerilime karşı akım eğrisine ise doğrusal voltamogram adı verilir ve Şekil 2.14’de gösterilmiştir. Alınan ölçümlerde analite ait yalnızca indirgenme veya yükseltgenme piki görülebilir. DTV’de Randles-Sevcik denklemine dayanan akımın derişim ile olan doğru orantısından nicel analiz yapılırken, pik gerilim değerinden nitel analiz yapılır [65].

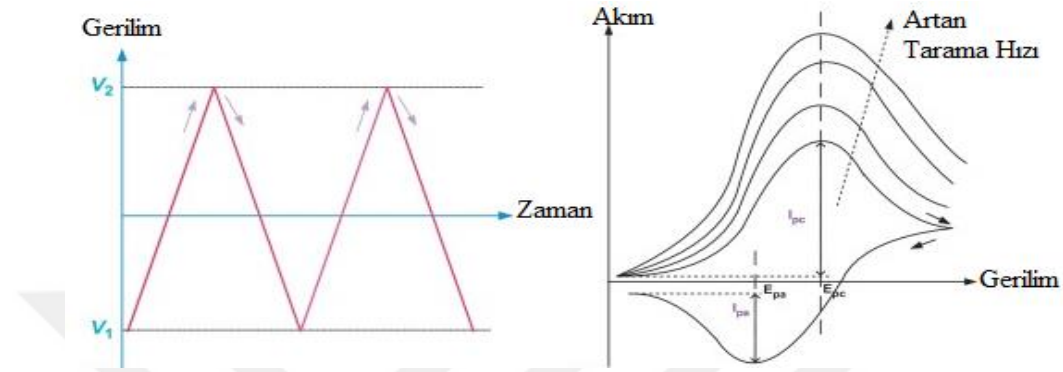


Şekil 2.14. Doğrusal voltametri tekniğinde zamana karşı gerilim eğrisi ve ölçüm sonucu alınan doğrusal voltamogram [78]

Dönüşümlü voltametri (DV)

Çalışma elektrotuna anodik veya katodik yöne doğru gerilim uygulandıktan sonra, uygulanan gerilimin zıt yönde tekrar uygulanmasıyla başlangıç noktasına dönmesinin sağlandığı yöntemle dönüşümlü voltametri (DV) denilmektedir. Yapılan bu taramada gerilimin zamana karşı doğrusal olarak değişim gösterdiği Şekil 2.15’ de gösterilmiştir. Ölçüm sonucu çizilen dönüşümlü voltamogram olarak adlandırılan, gerilime karşı akım grafiği Şekil 2.15’de gösterilmektedir. Bu yöntem nitel ve nicel analiz için kullanılabilir. Sistemde indirgenme ve yükseltgenme olayları birlikte incelenebilmektedir. Reaksiyon mekanizmalarını aydınlatmada, yüzey analizlerinde veya elektrot modifikasyon işlemlerinde kullanılabilir. Bu yöntem ile indirgenme veya yükseltgenme basamak sayısı belirlenebilmekte, meydana gelen reaksiyonların tersinir, tersinmez ya da yarı tersinir olup olmadığı, reaksiyon sonucunda kararlı ürünler oluşup

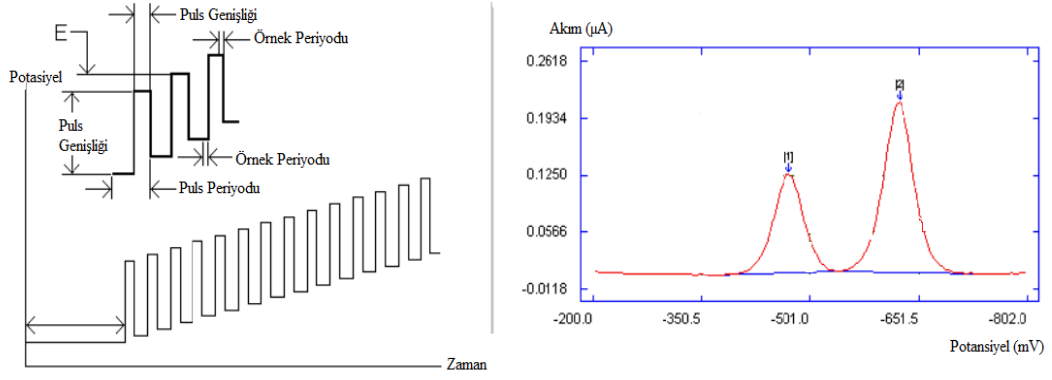
oluşmadığı, elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyona etki eden ilave bir reaksiyonun olup olmadığı, elektrot morfolojisinin değişip değişmediği yorumu yapılabilmektedir. [65]. Tez kapsamında modifikasyon ve karakterizasyon işlemlerinde bu teknikten yararlanılmıştır.



Şekil 2.15. Dönüşümlü voltametri tekniğinde zamana karşı gerilim eğrisi ve ölçüm sonucu alınan dönüşümlü voltamogram [78]

Diferansiyel puls voltametri (DPV)

Diferansiyel puls voltametri (DPV), yükseltgenme veya indirgenme özelliği olan çoğu maddenin eser miktar analizlerine imkan sağlayan bir yöntemdir [64]. DPV ile hem nicel analiz hem de reaksiyonların mekanizması, kinetiği ve termodinamiği çalışılabilir. İlk kez 1952 yılında Barker Jenkin sunmuştur [79]. Zamanın bir fonksiyonu olarak ve çalışma ile referans elektrotlar arasındaki potansiyelin bir fonksiyonu olarak hücre akımının ölçüldüğü elektrokimyasal bir tekniktir. Doğrusal olarak bir akım artışının görülebileceği şekilde sisteme periyodik olarak Şekil 2.16'da gösterildiği gibi potansiyel pulsları gönderilir ve gönderilen bu gerilim pulsunun başlangıç akımı ile bitiş akımı arasındaki farka karşı gerilim grafiğe geçirilerek oluşturulan diferansiyel puls voltamogramı Şekil 2.16'da gösterilmektedir. Tez kapsamında voltametrik ölçümler bu yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.16. Diferansiyel puls voltametri tekniğinde zamana karşı gerilim eğrisi ve ölçüm sonucu alınan diferansiyel puls voltamogramı [80]

Amperometrik Teknikler

Amperometrik teknikler için öncelikle tayini gerçekleştirilecek analite ait alınan voltamogramlar incelenerek kullanılacak gerilim değerine karar verilir. Ardından sisteme belirlenen değerde gerilim uygulanmasıyla oluşan akım ölçülür ve bu teknik amperometrik teknik olarak adlandırılır. Sistemde analitin elektroaktif olduğu gerilim değerinin seçilmesi sistemin duyarlılığını arttırmaktadır. Bu teknik sensör ve kromatografi sistemlerinde dedektör olarak tercih edilebilmektedir. Ayrıca titrasyon işlemlerinde sadece analit değil ürün veya titrant bileşenlerinden en az bir tanesinin elektroaktif özellik göstermesiyle amperometrik titrasyon teknikleri kullanılabilir [65]. Tez kapsamında akışa enjeksiyon analiz sisteminde amperometrik teknik dedektör olarak tercih edildiğinden elektrokimyasal dedektörler aşağıda anlatılmıştır.

2.3.3. Elektrokimyasal dedektörler

Çalışma prensiplerine göre farklılık gösteren birçok dedektör vardır. Geniş derişim aralığı, yüksek kararlılık, düşük gürültü seviyesi, basınç ve sıcaklığa karşı sonucun etkilenmemesi gibi bir dizi ideal dedektör özelliği sayılsa da gerçekte ideal dedektörün bütün koşullarını sağlayan bir dedektör yoktur, dolayısıyla ideal dedektör özelliklerine en yakın dedektör çalışmalar için uygun görülmektedir. Yüksek duyarlılığa sahip elektrokimyasal dedektörlerde bir dedektör çeşididir. Elektrokimyasal dedektörler çalışma prensibine bağlı olarak amperometrik, voltametrik, potansiyometrik ve impedimetrik olarak sınıflandırılabilir [81]. Elektrokimyasal dedektörlerin çalışma prensibi, sisteme uygulanan bir potansiyele karşı, sistemde bulunan elektroaktif türlerin elektrot yüzeyinde indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu meydana gelen akım artışı

ile eş zamanlı bir pikin oluşmasıdır. Gözlenen akım, elektrot yüzeyinde yükseltgenen veya indirgenen türün derişimine bağlıdır [82]. Elektrokimyasal dedektörler basit, duyarlı ve kullanışlı olması, yükseltgenme ve indirgenme özelliği gösteren bütün elektroaktif türlerde kullanılabilmesi sebebiyle geniş kullanım alanına sahiptir. Bütün bu avantajları sayesinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemlerinde de ideal dedektöre yakın potansiyel bir dedektör olarak görülmesi sebebiyle kullanılmaktadır. Aynı zamanda akışa enjeksiyon analiz sistemlerinde de kullanımı tercih edilmektedir.

2.4. Akışa Enjeksiyon Analizi

Ruzicka ve Hansen tarafından 1975 yılında tanımlanan akışa enjeksiyon analizi (AEA), aslında 1957’de Skeggs tarafından tanıtılan sürekli akış analizi fikrine dayanmaktadır. Danimarka’da Ruzicka ve Hansen, aynı zamanda ABD’de Stewart’ın patenti ile bu yeni teknoloji hızla yaygınlaştı. AEA tekniği, çoğu analitik işlemlerin otomasyonunu sağlayan hız, yüksek numune verimi, çeşitli kimyasallar ile uyumluluk, esneklik, seçicilik, kesinlik, doğruluk açısından iyi sonuçlar elde etmeyi sağlayan bir tekniktir [83], [84]. Sistem basittir, optimize etmek ve kimyasal değişkenleri kontrol etmek kolaydır. Sistemin ucuz olması, az numune ve reaktif tüketimi dolayısıyla az atık üretimi, yüksek örnekleme oranlarına sahip olması, kısa analiz süresi ile rutin analizler için kolaylık sağlaması ve diğer yöntemler ile kombinasyonunun kolay olması önemli avantajlar sağlamaktadır [85]. AEA üç prensibin kombinasyonuna dayanır, bu prensipler;

- Örnek enjeksiyonu,
- Enjekte edilen örnek bölgesinin kontrollü dağılımı ve
- Enjeksiyon noktasından dedektöre doğru hareketin tekrarlanabilir zamanlamasıdır.

Temel bir AEA sistemi;

- Sistemde sürekli akışı sağlayan bir pompa,
- Sisteme örnek enjeksiyonunun yapılabildiği bir enjeksiyon valfi,
- Bir reaksiyon hücresi ve
- Son olarak dedektörden oluşmaktadır.

Genel olarak, AEA tekniği uygun bir mobil faza analiti içeren çözeltinin enjeksiyonuna dayanır. Enjekte edilen örnek dedektör tarafından algılanır ve madde miktarıyla orantılı bir sinyal elde eder.

Bu sistemin düzgün çalışabilmesi için; kesilmeyen sürekli akış, tekrarlanabilir örnek uygulaması, örnek bölgesinin kontrollü kısmi dağılımı gibi özelliklere dikkat edilmesi gerekmektedir [83].

Bu kapsamda literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda tartışılmıştır.

Lisboa ve d. [86], askorbik asitin belirlenmesi için camı karbon elektrot yüzeyini indirgenmiş grafen oksit ile modifiye ederek hazırlanan sensör ile akışa enjeksiyon analiz sisteminde amperometrik dedeksiyonunu sağlamışlardır. Bu sistemde matriks ortamında askorbik asit tayini araştırılmıştır. Geri kazanım çalışmaları için multi vitaminli yiyecekler, süt, fermente süt ve sütlü çikolata örneklerinde askorbik asit tayini gerçekleştirilmiş ve %91-%108 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. Elde edilen elektrokimyasal analiz sonuçlarını karşılaştırmak için ultra hızlı sıvı kromatografisi kullanılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Y. Dilgin ve d. [87], çevresel örneklerde ciddi kirliliğe sebep olan hidrazini tayin edebilmek amacıyla amperometrik dedeksiyon ile kombine akışa enjeksiyon analiz sisteminde sodyum dodesil sülfat/ bis neocuproin bakır (II) şelat kompleksi adsorpsiyonuyla modifiye edilmiş kalem ucu grafit elektrodunu kullanmışlardır. SEM görüntüleri ile karakterizasyonu yapılan çalışma elektrodunun DV ölçümleri sonucunda hidrazinin elektrokimyasal oksidasyonu için iyi sonuçlar elde edilmiş ve AEA sisteminde kullanmışlardır. AEA sisteminde yapılan ölçümler sonucunda LOD değeri 0,07 μM olan 0,25–250 μM aralığında doğrusal çalışma aralığı elde etmişlerdir. Çeşitli su örneklerinde %96,3-%101,5 aralığında geri kazanım elde etmişlerdir.

D.G. Dilgin ve d. [88], kalem ucu grafit elektrot, bakır nanopartiküller ve akışa enjeksiyon analiz sisteminin avantajlarını bir araya getirerek glikozun oksidasyonu ile amperometrik dedeksiyonunu sağlamışlardır. Kalem ucu grafit elektrot yüzeyi bakır nanopartiküller ile modifiye edildikten sonra EİS, DV, SEM ve EDX yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Modifiye elektrot akışa enjeksiyon analiz sisteminde kullanılarak sistem optimize edilmiştir. Optimize edilmiş sistemde 0,04 μM LOD değerine sahip 0,1-400 μM aralığında doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir. Girişim yapabilecek

türler varlığında analizin gerçekleştirilebileceği gösterildiği glikozun bazı gerçek örneklerde geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

D. McCrudden ve d. [89], perde baskılı karbon elektrodunu platin-bakır karışımını içeren çözelti ile modifiye ederek elektrot yüzeyini nano gözenekli platin ile kaplamışlardır. Modifiye elektrodu DV ve SEM ölçümleri ile karakterize etmişlerdir. Daha sonra modifiye elektrot amperometrik dedeksiyon ile kombine edilmiş ve AEA sisteminde patates örneğinde indirgenmiş şekerlerin tayininde kullanmışlar ve iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Modifiye edilen elektrodun kararlılık çalışmaları sonucunda 5 hafta sonra cevabının %10,7'sini kaybettiğini göstermişlerdir.

A. A. Karyakin ve d. [90], AEA sisteminde modifiye edilmemiş perde baskılı karbon elektrodu kullanarak glutamik asit hariç bütün aminoasitlerin spesifik elektrokimyasal oksidasyonunu göstermişlerdir. Aynı zamanda elektro oksidasyonu Prussian Mavisi'nin katalizlediğini bulmuşlardır. Elektro-katalitik döngünün kurulmasıyla bir amino asit veya aminoasit kalıntısı tarafından Prussian Mavisi'ne tekrar indirgenen elektriksel olarak üretilmiş Berlin Yeşili sayesinde protein veya aminoasitlerin elektrokimyasal oksidasyonunun katalizlendiği ve yükseltgenme sinyalinin arttığını göstermişlerdir. Glutamin, serin ve histidin için sırasıyla 54, 31 ve 11 kat akım artışı gözlemişlerdir.

Tez kapsamında AEA sisteminde kullanılmak üzere modifiye elektrotlar geliştirilmiş ve bu sistemin tek başına ve sıvı kromatografisinde dedektör olarak kullanılabilirliği test edilmiştir.

2.5. DES'i Tayin Etmek İçin Literatürde Yapılmış Bazı Çalışmalar

DES'i tayin etmek için birçok analitik metot mevcuttur. Bunlar dizilmiş langasite kristal mikroterazi (kuvars kristal mikrobals) [91], kolorimetrik analiz [44], HPLC [5], izotop seyreltme-sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi [92], izotop seyreltme-ultra performanslı sıvı kromatografisi/tandem sıvı kromatografisi [93], ultra performanslı sıvı kromatografisi/üçlü kuadrople kütle spektroskopisi [94] ve elektrokimyasal yöntemler [45], [95], [96], [97] olarak sıralanabilir.

DES'in tayini için yapılan bazı elektrokimyasal çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Aragao ve d. tarafından yapılan çalışmada [7], camsı karbon elektrot yüzeyi altın nanopartikül, çok duvarlı karbon nanotüp ve kobalt fitalosiyanın ile modifiye edilmiştir. Modifiye elektrotun DES'in yükseltgenmesini katalizlemesi sonucu kare dalga

voltametrisi ile $1,99 \times 10^{-7}$ mol/L gözlenebilme sınırı, $6,64 \times 10^{-7}$ mol/L tayin sınırı değerleri elde edilmiştir. Geliştirilen metot ile et ve su gerçek örneklerinde DES tayin edilmiş ve sırasıyla %94,05 ve %98,56 geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Peng ve d. [98], Bi_2WO_6 nanoplakaları hidrotomal olarak hazırlayıp, karakterizasyonunu yaptıktan sonra karbon pasta elektrot hazırlamışlardır ve hazırlanan modifiye elektrot ile Bisfenol A (BPA) ve DES'i tayin etmişlerdir. Diferansiyel puls voltametrisi ile yapılan ölçümler sonucunda DES için 15 nM, BPA için ise 20 nM gözlenebilme sınırı değerleri ve DES ve BPA için sırasıyla çalışma aralığı 50-2100 nM, 70-1300 nM olarak bulunmuştur. Geliştirilen sensör süt tozundan ekstrakte edilen farklı miktarlarda DES eklenmiş süt örneklerinde test edilerek DES için %90-%99, BPA için %88-%98 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Ji ve d. [99], 1,3,5-benzen trikarboksilik asit ve bakırı kullanarak metal organik kafes sentezlenmiş ve sentezlenen bu madde ile karbon pasta elektrot hazırlamışlardır. Hazırlanan elektrot ile DES ve estradiol tayini gerçekleştirilmiştir. Alınan diferansiyel puls ölçümleri sonucu DES için 2,7 nM estradiol için ise 1,1 nM gözlenebilme sınırı belirlenmiştir. Gerçek örnek olarak suyun seçildiği ölçümlerde DES için %97,27 estradiol için %102,9 geri kazanım elde edilmiştir.

Xiao ve d. [97], Fe gözenekli koordinasyon polimerinin karbonizasyonu ile Fe_3O_4 katkılı nano gözenekli karbon sentezlenmiştir ve sentezlenen materyal DES ve 17 β -estradiol östrojenlerini tayin edebilmek için camsı karbon elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir. DES için 0,01-12 $\mu\text{mol/L}$ estradiol için 0,01-20 $\mu\text{mol/L}$ doğrusal çalışma aralığı ve sırasıyla 4,6 nmol/L ve 4,9 nmol/L gözlenebilme sınırı bulunmuştur. Gerçek örnek olarak tonerin seçildiği çalışmada DES için %91,2 estradiol için %110 geri kazanım elde edilmiştir.

Zhang ve d. [100], β -siklodekstrin ile fonksiyonelleştirilmiş indirgenmiş grafen oksit hibrit nanolevhalar camsı karbon elektrotu modifiye etmek için kullanılmıştır ve hazırlanan elektrot ile DES tayini gerçekleştirilmiştir. 0,01-13 μM aralığı doğrusal aralık olarak belirlenirken gözlenebilme sınırı 4 nM olarak bulunmuştur. Süt örneğinde yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda %96,5 ve %106 arasında geri kazanım elde edilmiştir.

DES'in tayini için farklı yöntemlerin kullanılması ile yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Wang ve d. [101] deniz suyunda DES'in önderiştirmesi ve izolasyonu için süspansiyon polimerizasyonu ile yüksek seçici moleküler baskılı polimer hazırlamışlardır. Deniz suyunda DES'in tayininde kesikli moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyon metodu ve HPLC-DAD (Diyot Dizi Dedektörü) metotlarının birleştirilmesiyle %77 üzerinde bir geri kazanım değeri elde edilmiştir. Gözlenebilme sınırı 1,8 ng/mL ve tayin sınırı ise 6 ng/mL olarak bulunmuştur.

Shi ve d. [102] karbon nanotüp takviyeli içi boş elyaf katı faz mikroekstraksiyon ile HPLC kombinasyonu sonucu süt ürünlerinde DES'in ekstrakte edilmesi ve belirlenmesi sağlanmıştır. Önerilen metot ile DES çok duvarlı karbon nanotüpler ile ekstrakte edilmiş, CH₃OH ile desorpsiyonu yapılmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. 24–960 µg/L doğrusal çalışma aralığı, 5,1 µg/L gözlenebilme sınırı ve süt örneğinde %57,5 ve %120,42 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Reuvers ve d. [103], tüketilebilir hayvan dokularında DES kalıntılarını tayin etmek amacıyla, analiti tert-bütül metil eter ile ekstrakte ettikten sonra 1 M NaOH ile tekrar ekstrakte etmiştir ve C₁₈ katuşlu katı faz ekstraksiyonu ile temizlemiştir. Analiz izokrotik elüsyon, C₁₈ kolon ile elektrokimyasal olarak tayin edilmiştir ve gözlenebilme sınırı 0,1-0,2 µg/kg olarak belirlenmiştir. Gerçek örnek çalışmaları ise %66-%68 geri kazanım değeri ile sonuçlanmıştır.

Xie ve d. [104], dienestrol, DES ve heksestrol östrojenlerinin tayini için akışkan sistemli kemilüminesans metodu geliştirmişlerdir. Formaldehit ve KMnO₄'ın sülfürik asit ortamında östrojenler ile kemilüminesans reaksiyonu çalışılmıştır. Deneyler sonucunda dienestrol için $8,00 \times 10^{-9}$ - $8,00 \times 10^{-6}$ g/mL, DES için $5,00 \times 10^{-9}$ - $4,75 \times 10^{-6}$ g/mL, heksestrol için $2,00 \times 10^{-8}$ - $5,00 \times 10^{-6}$ g/mL doğrusal çalışma aralığı ve sırasıyla $2,61 \times 10^{-9}$ g/mL, $1,08 \times 10^{-9}$ g/mL, $6,28 \times 10^{-9}$ g/mL gözlenebilme sınırı değerleri elde edilmiştir. Gerçek örnek olarak su ve tabletler seçilmiştir. DES için ilaç tabletlerinde yapılan deneylerde %95-%99,2 geri kazanım, su örneğinde ise dienestrol için %99,2-%104, DES için %97,8-%100,2, heksestrol için %98,6-%100,4 geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

2.6. PROP'u Tayin Etmek İçin Literatürde Yapılmış Bazı Çalışmalar

PROP'u tayin etmek için literatürde geliştirilmiş birçok kromatografi, spektrofotometri, atomik absorpsiyon spektroskopisi, florimetri, kulorimetri ve elektrokimyasal yöntemler bulunmaktadır [105], [106], [107]. Bunlardan bazıları; HPLC [108], [109], HPLC/kütle spektroskopisi (MS) [110], [111], gaz kromatografisi (GC)/MS [112], ince tabaka kromatografisi [113], kapiler elektroforez [114], [115], nükleer manyetik rezonans spektroskopisi [116], atomik absorpsiyon spektroskopisi [117], moleküler floresans [118], polarografi [119], akış enjeksiyon analiz yöntemi ile kombine edilmiş kemilüminesans [120] ve elektrokimyasal yöntemler [13], [58], [121].

Filho ve d. [13], camsı karbon elektrodu fonksiyonelleştirilmiş grafen, iyonik sıvı ve gümüş nanopartikülleri ile modifiye ederek salbutamol ve PROP'u elektroanalitik yöntemle tayin etmişlerdir. Kare dalga voltametrisi yöntemiyle alınan ölçümler sonucunda salbutamol için 79 nmol/L-2,9 µmol/L, PROP için 0,1 µmol/L-2,9 µmol/L doğrusal çalışma aralığı ve sırasıyla 13 nmol/L ve 17 nmol/L gözlenebilme sınırı değerleri belirlenmiştir. İdrar ve serum gerçek örnekleri ile yapılan deneylerde salbutamol için idrar örneğinde %96-%98, serum örneğinde %97-%98 geri kazanım, PROP için idrar örneğinde %101-%103, serum örneğinde %98-%104 geri kazanım elde edilmiştir.

Gupta ve d. [59], iletken polimer olan poli-1,5-diaminonaftalen ve grafenin modifiye edilmesiyle kenar düzlemi pirolize grafit sensörü hazırlamışlardır. Alınan ölçümler sonucu 0,1-750 µM doğrusal çalışma aralığı ve 20 nM gözlenebilme sınırı olarak bulunmuştur. Kan ve idrar gerçek örneklerinde yapılan deneyler sonucunda geri kazanım değerlerinde %3,1'den daha az bağıl standart sapma olduğu saptanmıştır.

Wong ve d.[60] karbon siyahı, grafen oksit, ve iletken polimer olarak poli (3,4-ethiylendioksitiyofen)- poli (stiren sülfonat) karışımını camsı karbon elektrot üzerine kaplamış ve ardından bakır nanopartiküllerin elektrot üzerine elektrokimyasal olarak biriktirilmesi sağlanmıştır. Hazırlanan elektrot ile izoproterenol, asetaminofen, folik asit, PROP ve kafein tayini eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kare dalga yöntemiyle alınan ölçümler sonucu izoproterenol için 8-50 µmol/L, asetaminofen için 0,9-7 µmol/L, folik asit için 5-31 µmol/L, PROP için 0,5-2,9 µmol/L, kafein için 11-64 µmol/L doğrusal çalışma aralığı olarak ve sırasıyla 1,9 µmol/L, 0,23 µmol/L, 1 µmol/L, 0,18 µmol/L, 3,4 µmol/L gözlenebilme sınırı olarak belirlenmiştir. İnsan biyolojik sıvılarında (idrar ve serum) gerçek örnek analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucu

izoproterenol için %92-%103, asetaminofen için %90-%94,2, folik asit için %92,5-%100, PROP için %97,8-%100 ve kafein için %102-%103 oranında geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Khairy ve d. [10], PROP, timolol, amlodipin, amilorid ve triamteren tayinleri için modifiye edilmemiş ekran baskılı karbon elektrotlar ile optimum derişimdeki sodyum dodesil sülfat varlığında diferansiyel puls voltametrisi ölçümleri almışlardır. Yapılan deneyler sonucu PROP için 0,033-3,22 μM ve 3,26-24,69 μM , timolol için 0,033-3,3 μM ve 4,58-15,86 μM , amlodipin için 0,033-3,53 μM ve 6,74-30,14 μM , amilorin için 0,33-17,76 μM ve 17,76-22,8 μM , triamteren için 0,056-3,83 μM ve 3,83-6,37 μM olmak üzere her bir madde için iki doğrusal aralık belirlenmiştir ve sırasıyla 0,0056 μM , 0,042 μM , 0,006 μM , 0,18 μM , 0,0107 μM değerleri gözlenebilme sınırı olarak saptanmıştır. Gerçek örneklerde yapılan deneylerde PROP için ilaçta %97,34-%99,66 idrarda %93,22-%94,73, timolol için ilaçta %99,24-%102,73 idrarda %93,01-%94,5, amlodipin için ilaçta %97,38-%99,73 idrarda %87,67-%91,56, amilorin için ilaçta %96,92-%98,29 idrarda %90,52-%93,67, triamteren için ilaçta %100,85-%102,26 idrarda %91,72-%95,67 geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Alizadeh ve d. [122], PROP'un karsinojenik metaboliti olan nitrosopropranolol'un belirlenmesi için karbon pasta elektrotu, çöktürme polimerizasyonu ile nano boyutta hazırlanan moleküler baskılanmış polimer nanopartikülleri ile hazırlanmışlardır. Diferansiyel puls voltametrisi yöntemiyle alınan ölçümler sonucunda 1×10^{-7} - 1×10^{-5} mol/L doğrusal çalışma aralığı ve 8×10^{-8} mol/L gözlenebilme sınırı olarak bulunmuştur. Serum gerçek örneğinde %90-%106, mide suyunda %91,6-%107 aralığında geri kazanım elde edilmiştir.

Kong ve d. [121], çok duvarlı karbon nanotüpler ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotun üzerine dopamin elektropolimerizasyonu sonucu PROP.HCl'i belirlemek amacıyla moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensör hazırlamışlardır. 0,2-100 μM aralığı doğrusal aralık olarak, $2,53 \times 10^{-8}$ M gözlenebilme sınırı olarak bulunmuştur. %97,3-%104 oranında geri kazanım değerleri, ilaç tabletleri ile yapılan gerçek örnek çalışmaları sonucu bulunmuştur.

Yuyang ve d. [123], farmasötik formülasyonlarda PROP tayini için 8-hidroksi-8-propoksi-kaliks [8] aren ve çok duvarlı karbon nanotüp ile camı karbon elektrotu modifiye etmeleri sonucu yeni modifiye elektrot geliştirmişlerdir. Geliştirilen elektrot ile alınan ölçümler sonucu $3,38 \times 10^{-7}$ - $5,41 \times 10^{-5}$ mol/L doğrusal çalışma aralığı,

$1,35 \times 10^{-7}$ mol/L gözlenebilme sınırı değerleri bulunmuştur. PROP tabletlerinde yapılan gerçek örnek çalışmaları sonucu %96,4-%102,4 geri kazanım elde edilmiştir.

PROP'un tayini için akışa enjeksiyon analiz sistemiyle de yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Saraiva ve d. [105], farmasötik formülasyonlarda bulunan PROP, asebutolol ve metoprolol β -blokerlerini belirlemek amacıyla Sıralı Enjeksiyon Analiz tekniğini kullanmışlardır. Metoprolol 40,52-250 mg/L aralığında, asebutolol 32.85-140 mg/L aralığında ve PROP 16,58-120 mg/L aralığında doğrusaldır. Farmasötik formülasyonlarda yapılan deneyler sonucu geri kazanım bağıl standart sapma değerleri %5'in altında bulunmuştur.

Evmiridis ve d. [106], PROP tayini için periyodat ile yükseltgenmiş pyrogallol kemilüminesans reaktifi temelli akış enjeksiyon algılama yöntemi geliştirmişlerdir. Sunulan yöntem 10 dakika içinde PROP'un yükseltgenmesinden sonra kalan periyodat fazlası ile pyrogallol'un oksidasyonu esnasında kemilüminesans emisyonunun oluşmasına dayanan dolaylı bir kemilüminesans algılama yöntemidir. Çizilen kalibrasyon grafiğine göre 0-1 mg/L aralığı doğrusal aralık, sonrasında 1-20 mg/L aralığında ayrı bir doğrusal aralık olarak belirlenmiş ve gözlenebilme sınırı 37,4 μ g/L'dir. Inderal isimli ilaç ile yapılan gerçek örnek çalışmalarında %92-%112 geri kazanım elde edilmiştir.

Pulgarin ve d. [120], sülfürik asit ortamında KMnO_4 ile reaksiyonu sonucu kemilüminesans oluşturulması temeline dayanan PROP'un tayini için sürekli akış yöntemini tanımlamışlardır. Çizilen kalibrasyon grafiği ile 1-17,5 mg/L doğrusal çalışma aralığı, 0,87 mg/L gözlenebilme sınırı olarak belirlenmiştir. Farklı ilaçlarda yapılan gerçek örnek çalışmaları sonucu, %96,8-%161 aralığında geri kazanım sağlanmıştır. İlaç içinde bulunan diğer ilaç etken maddeleri emisyon yoğunluğunu arttırdığı rapor edilmiştir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, DES ve PROP kimyasalları için tez kapsamında geliştirilen modifikasyon ve yöntemlerin daha önce kullanılmamış olması ve bu kimyasalların tayini için amperometrik dedeksiyon ile kombine edilmiş akışa enjeksiyon analizlerinin daha önce geliştirilmemiş olması gerçekleştirilen tez çalışmasının özgünlüğünü teşkil etmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Tez Kapsamında Kullanılan Malzemeler

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1’de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. DeneySEL süreçlerde kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası	Kimyasal Adı	Markası
Dietilstilbestrol (%99,9)	Sigma Aldrich	Asetonitril (%99,9)	Carlo ERBA
Propranolol. HCl	Sigma Aldrich	Aseton (%99,5)	Sigma Aldrich
Altın (III) klorür trihidrat (≥%99,9)	Sigma Aldrich	Ürik Asit (%99)	Sigma Aldrich
Potasyum Ferrisiyanür (%99)	Riedel-de Haën	β-Estradiol (%98)	Sigma Aldrich
Potasyum Ferrosiyanür Trihidrat (%99,5)	Riedel-de Haën	L-Askorbik Asit (>%99,5)	Fluka
Lityum Perklorat (≥%99)	Fluka	Üre	Fluka
Potasyum Klorür (≥%99)	Fluka	α-D(+)- glukoz (susuz 99%)	ACROS Organics™
Potasyum monohidrojen fosfat (%98+)	Sigma Aldrich	Kalsiyum Klorür (%98)	J.T. Baker
Potasyum dihidrojen fosfat (%99,5 - %100,5)	Merck	Folik asit (%98)	Sigma Aldrich
Metanol	Merck	L-Fenilalanin	Sigma Aldrich
Hegzaaminorutenyum (III) klorür (%98)	Sigma Aldrich	Hidrokinon (%98+)	Sigma Aldrich
Sodyum klorür (%99,5)	Merck	Mannitol	Sigma Aldrich
Amonyum Klorür	Sigma Aldrich		

3.1.2. Gerçek örneklerin temini

Tez çalışması kapsamında gerçek örnek olarak süt, süt tozu, Dideral® (40 mg, Sanofi), nehir suyu ve sentetik idrar kullanılmıştır. Bu örneklerin hangi kaynaklardan temin edildiği aşağıda verilmiştir:

- ✓ Süt ve süt tozu yerel bir marketten,
- ✓ Dideral® ilacı yerel bir eczaneden,
- ✓ Su örneği Keskin Köyü'nde bulunan bir göletten temin edilmiştir.
- ✓ Sentetik idrar örneği ise laboratuvar ortamında hazırlanmıştır.

3.1.3. Kullanılan araç ve gereçler

Tez kapsamında kullanılan cihazlar Çizelge 3.2.'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Deneysel süreçlerde kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka ve Model	Kullanım Amacı
ULTRAFE-SEM	ZeissUltraplus	Elektrot yüzeyine kaplanan altın nanopartiküllerinin karakterizasyonunda kullanılmıştır.
HPLC	Agilent 1100 Series	Kromatografik yöntem ile gerçek örnek geri kazanım çalışmaları için kullanılmıştır.
Santrifüj Cihazı	Hettich universal 320	Hazırlanan gerçek örnek analizlerinde çöktürme yapabilmek için kullanılmıştır.
Analitik Terazı	Ohaus	Deneysel süreçte kullanılan katı kimyasalların tartım işlemleri için kullanılmıştır.
Saf Su	Sartorius (Sartorius Arium Comfort I-1-UV-T)	Çözeltileri hazırlayabilmek için ultra saf su temin edebilmek amacıyla kullanılmıştır.
Ultrasonik Banyo	Isolab	Hazırlanan çözeltilerin çözünmesini sağlamak için kullanılmıştır.
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica	Karıştırma işlemleri için kullanılmıştır.
pH metre	Radiometer-IONcheck45	Hazırlanan çözeltilerin pH'sını ayarlayabilmek amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 3.2.(Devam) Deneysel süreçlerde kullanılan cihazlar

Vorteks	Daigger Vortex Genie 2 G-560 22220A	Ölçümlerde kullanılacak olan çözeltilerin karıştırılması amacıyla kullanılmıştır.
Potansiyostat-Galvanostat	Autolab PGSTAT 240	Elektrokimyasal ölçümlerin alınması için kullanılmıştır.
Potansiyostat-Galvanostat	CHI 440B	Elektrokimyasal olarak elektrot yüzeyini modifiye etmek için kullanılmıştır.
Potansiyostat-Galvanostat	CHI 660D	Karakterizasyon çalışmalarında elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ölçümleri için kullanılmıştır.
HPLC Pompası	Dionex P680 HPLC Pump	AEA sistemlerinde çözeltinin hücreden sürekli geçmesi amacıyla kullanılmıştır.
Örnek Enjeksiyon Vanası (20 µL)	Rheodyne 8125 sample injection valve	AEA sistemine örnek enjeksiyonu için kullanılmıştır.
Kolon	Gl Sciences Inc. Inertsil ODS-3 5 µM 4,6 x 150 mm	AEA ve HPLC sisteminde kromatografik ayrımlar için kullanılmıştır.

3.1.4. Elektrokimyasal hücreler ve elektrotlar

Tez çalışması kapsamında DES ve PROP tayinlerini gerçekleştirmek amacıyla voltametri ve AEA olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmış olup, bu iki yöntem için de iki farklı hücre kullanılmıştır. Voltametrik çalışmalar için borasilikat cam malzemeden özel olarak tasarlanan Şekil 3.1A'da gösterilen 5 boyunlu hücre, AEA sistemleri için ise KUG elektrotlar için özel olarak iki parça halinde tasarlanan ve Şekil 3.1B'de gösterilen hücre kullanılmıştır.

Çalışma elektrodu olarak, her iki hücrede de Tombow marka HB kalitede 0,5 mm çapında KUG elektrotlar kullanılmıştır. KUG elektrotlar yerel kırtasiyelerden tedarik edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında referans elektrot olarak Gamry marka (Gamry Instruments, ABD) doygun kalomel elektrot (DKE), gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrot ve gümüş tel (Ag) olmak üzere üç çeşit elektrot kullanılmıştır. Çalışma elektrotlarının modifikasyon işlemlerinde Ag/AgCl referans elektrot, voltametrik ölçümler sırasında doygun kalomel elektrot ve AEA sistemi ile gerçekleştirilen deneylerde Ag tel referans elektrot olarak kullanılmıştır.

3.2. DES Tayinine Yönelik Gerçekleştirilen Deneysel Çalışmalar

3.2.1. DES tayininin voltametrik yöntemler ile gerçekleştirilmesi

5 mM 10 mL için gerekli olan DES miktarı tartılarak 10 mL CH₃OH içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 10 adet ependorfa bölünerek -20 °C’de saklanmıştır. Deneysel çalışmalar sırasında gerekli seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır.

DES'in elektrokimyasal tayinini gerçekleştirebilmek amacıyla, çalışma elektrodu olarak seçilen kalem ucu grafit (KUG) elektrodun yüzeyine altının voltametrik yöntemlerle indirgenerek kaplanması sağlanmıştır. Bu kapsamda 1 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi içerisine 0,1 M LiClO_4 eklenerek hazırlanan çözeltinin iyice karışmasını sağlamak amacıyla 45 saniye vortekslenip daha sonra 7 dakikada ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra, deneme-yanılma yöntemiyle daha önceden optimize edilen koşullarda KUG elektrot aşağıdaki şekilde modifiye edilmiştir. Hazırlanan 10 mL AuCl_4^- çözeltisi, Ag/AgCl referans elektrodu, Pt karşıt elektrodu ve KUG çalışma

elektrodunun kullanıldığı 5 boyunlu hücreye alınmıştır. Sistemdeki çözünmüş oksijeni gidermek amacıyla çözeltilerden 10 dakika N_2 gazı geçirilmiştir. Dönüşümlü voltametri (DV) tekniği kullanılarak 0,0 V ile -1,2 V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızında 3 döngü olacak şekilde tarama yapılmasıyla KUG elektrot yüzeyine altının indirgenerek kaplanması (KUG-Au) sağlanmıştır. Hazırlanan elektrot KUG-Au olarak gösterilmiştir. KUG elektrot yüzeyinde $HAuCl_4$ davranışını belirleyebilmek amacıyla 0 V gerilimden başlayarak önce -1,25 V'ye ardından 1,0 V'ye gidip tekrar 0 V gerilime dönen 50 mV/s tarama hızında 3 döngüde DV ölçümü alınmıştır.

3.2.1.3. KUG-Au elektrodunun karakterizasyonu

Karakterizasyon çalışmalarında, dönüşümlü voltametri, taramalı elektron mikroskopi ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemleri kullanılmıştır.

- KUG ve KUG-Au elektrotların yüzeylerinde meydana gelen değişim ve elektron aktarım hızı ile ilgili yorum yapabilmek amacıyla DV ölçümleri 2,5 mM $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisinde -0,25 V ile 0,8 V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızında alınmıştır. KUG ve KUG-Au için alınan DV voltamogramları karşılaştırılmıştır.
- 2,5 mM $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisinde açık devre potansiyeli olan 0,17 V gerilimde KUG ve KUG-Au elektrotların EİS ölçümleri alınarak, Randles-Sevcik devresinin kullanılmasıyla oluşturulan Nyquist eğrisine ve R_{ct} değerlerine bakılarak elektron transfer kinetiği yorumlanmıştır.
- KUG elektrot yüzeyinde altın nanopartiküllerinin (AuNPs) morfolojisinin belirlenmesi amacıyla KUG ve KUG-Au elektrotların SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.4. KUG-Au elektrodun DES varlığında elektrokimyasal davranışı

Modifiye elektrodun analite karşı olan cevabını değerlendirebilmek, elektrodun etkinliğini, etkin yüzey alanını ve modifiye elektrot ile analit arasındaki etkileşimin temelini anlayabilmek amacıyla DV ölçümleri alınmış ve tarama hızı deneyleri gerçekleştirilmiştir.

- 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde -0,1 V ile 0,6 V aralığında DV tekniği kullanılarak 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile 10 μ M DES varlığında ve yokluğunda alınan ölçümler ile KUG-Au elektrodun DES'e karşı cevabı incelenmiştir.
- KUG-Au modifiye elektrot ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV tekniği ile -0,3 V ile 0,55 V gerilim aralığında, 10 μ M DES varlığında ve yokluğunda 60 s bekleme süresi ile 300 rpm karıştırma hızında alınan voltamogramlar ile modifiye elektrodun DES'in yükseltgenmesi üzerinde olan elektrokatalitik etkisi incelenmiştir.
- 0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 10 μ M DES varlığında -0,15 V ile 0,3 V gerilim aralığında, 1 döngü DV tekniği kullanılarak 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 mV/s olmak üzere farklı tarama hızlarında KUG-Au elektrotları için alınan ölçümler sonucu KUG-Au elektrot yüzeyinde gerçekleşen etkileşimin adsorpsiyon kontrollü mü yoksa difüzyon kontrollü mü olduğuna karar verilmiştir.
- 1,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde -0,3 V ile 0,8 V gerilim aralığında, 60 s temas süresi ile 300 rpm karıştırma hızında, 1 döngü DV tekniği kullanılarak 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 mV/s olmak üzere farklı tarama hızlarında KUG ve KUG-Au elektrotları için alınan ölçümler sonucunda Randles-Sevcik denklemi kullanılarak modifiye elektrodun etkin yüzey alanı hesaplanmıştır.

3.2.1.5. KUG-Au elektrodunun hazırlanma koşullarının optimizasyonu

Hazırlanan modifiye elektrodun performansını iyileştirebilmek amacıyla KUG yüzeyine AuNPs'lerin kaplanması sırasında kullanılan döngü sayısı optimize edilmiştir. Bu kapsamda, 0,1 M LiClO₄ içeren 1 mM H₂AuCl₄.3 H₂O çözeltisinde 0,0 V ile -1,2 V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızında ve farklı döngü sayılarında DPV ölçümleri alınarak KUG elektrotlar modifiye edilmiştir. Elektrotların etkinliği ise 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda DPV tekniği ile -0,3 V ile 0,6 V gerilim aralığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında 10 µM DES varlığında ölçülmüştür.

3.2.1.6. DES'in ölçüm koşullarının optimizasyonu

DES'in tayininde pH ve temas süresi optimizasyonu ile ölçüm koşullarının optimize edilmesi sonucu alınan verilerin iyileştirilmesi sağlanmıştır.

Hücreye ayrı ayrı destek elektrolit olarak farklı pH'larda 0,1 M fosfat tamponları (pH 2; 3; 4; 5; 6; 7,4; 8,5; 9; 10) koyularak -0,15 V ile 0,7 V gerilim aralığında DPV tekniği kullanılarak 10 µM DES varlığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında alınan ölçümlerin değerlendirilmesi sonucu deneysel süreç için optimum pH belirlenmiştir.

Hücreye eklenen 0,1 M pH 10 fosfat tamponu üzerine 10 µM DES eklenerek -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında 15, 30, 45, 60, 75 ,90, 120, 150, 180, 240 saniye olmak üzere farklı temas süreleri ile 300 rpm karıştırma hızı kullanılarak ölçümler alınmış ve ölçümler sonucu optimum temas süresi saptanmıştır.

3.2.1.7. DES tayininde girişim yapması olası türlerin araştırılması

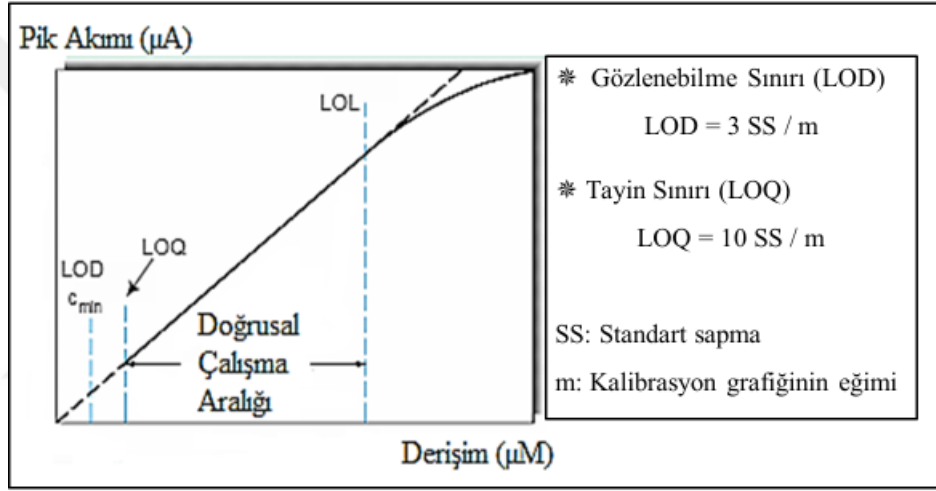
DES'in tayin edilmesini güçleştirebilecek olası elektroaktif türlerin etkisi incelenmiştir. Girişim yapabilecek olası elektroaktif türler olarak β-estradiol (β-EST), askorbik asit (AA), ürik asit (ÜA), glukoz (GLC), kalsiyum klorür (CaCl₂), potasyum klorür (KCl), folik asit (FA), hidrokinon (HK), L-fenilalanin (L-Phe) ve üre seçilmiştir.

0,1 M pH 10 fosfat tamponunda, DPV tekniği kullanılarak, -0,18 V ile 0,5 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızı ile 90 s temas süresi ve 5 µM DES varlığında ayrı ayrı AA, CaCl₂, GLC, KCl için 500, 1000 ve 2000 µM artan derişimlerde ve β-EST, L-Phe, FA, HK, üre ve ürik asit için 5, 15, 25, 50 µM artan derişimlerde girişim çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu voltamogramlar

incelenerek seçilen maddelerin KU-Au modifiye elektrodu ile DES tayinini etkileyip etkilemediği yorumlanmıştır.

3.2.1.8. DES tayinine yönelik analitik parametrelerin belirlenmesi

Analitik yöntemlerin büyük çoğunluğunda nicel analiz amacıyla kullanılması durumunda kalibrasyon grafiğinin çizilmesi gereklidir. Kalibrasyon grafiğinden doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı ve hassaslık gibi noktalarda önemli bilgiler alınabilmektedir. Kalibrasyon grafiği ve bu grafik yardımıyla bulunabilecek değerler Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Kalibrasyon grafiği ve elde edilebilecek veriler

Analiz ortamına artan derişimlerde eklenen DES ile gerçekleştirilen DPV ölçümleri sonucu elde edilen voltamogramlar yardımıyla artan derişime karşı akımın doğru orantılı olarak arttığı kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon grafiğini çizebilmek için ölçümler 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda DPV yöntemiyle -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında, 90 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında artan derişimlerde DES eklenmesiyle alınmıştır. Çizilen grafikten doğrusal çalışma aralığı, LOD ve LOQ değerleri bulunmuştur.

Yapılan deneylerde tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek ve modifiye elektrodun uzun süre kararlı sonuçlar verebilmesi önemli analitik parametrelerdendir.

0,1 M pH 10 fosfat tamponunda, DPV tekniği kullanılarak, -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızı ile 90 s temas süresi ve 10 µM DES

varlığında alınan voltamogramlardan okunan pik akımları yardımıyla alınan 10 ölçüm sonucunu içeren bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Vakum desikatöründe 33 gün saklanan KUG-Au elektrotlar ile 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda, DPV tekniği kullanılarak, -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızı ile 90 s temas süresi ve 10 µM DES varlığında 11 günlük periyotlarla ölçümü alınan KUG-Au elektrotların kararlılığı test edilmiştir.

3.2.1.9. KUG-Au elektrodun gerçek örneklerde test edilmesi

KUG-Au modifiye elektrot ile DES'in tayininin gerçekleştirileceği örnekler olarak su ve süt tozu örnekleri seçilmiştir.

Su örneği bölgede bulunan Keskin Göleti'nden temin edilerek 0,45 µm süzgeç kağıdından süzülerek kullanılmıştır. Süzüntü üzerine CH₃OH içerisinde çözülmüş DES örneği eklenerek analizler gerçekleştirilmiştir.

Süt tozu örneği ise bölgede bulunan yerel bir marketten temin edilmiştir. 50 mg süt tozu örneği üzerine 3 ml 4:1 (v/v) oranında karıştırılmış asetronitril:aseton karışımı eklenmiştir. 30 dk boyunca ultrasonik banyoda karıştırıldıktan sonra 5 dk 10000 rpm hız ile santrifüjlenerek, sıvı kısım ayrılmıştır. Ayrılan sıvı kısım üzerine CH₃OH içerisinde çözülmüş DES örneği eklenerek gerçek örnek analizleri yapılmıştır.

0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisine 250 µL gerçek örnek ilave edilerek, DPV tekniği kullanılmasıyla, keskin göleti suyu için -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında süt tozu için -0,18 V ile 0,15 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızı ile 90 s temas süresi parametrelerinde ölçümler alınması sonucu voltamogramlardan alınan pik akımları kullanılarak geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

3.2.2.2. AEA-AD sistemi ile DES tayininin araştırılması

AEA-AD sistemi test edildikten sonra, analit olarak voltametri deneyleri gerçekleştirilen DES'in tayin edilmesine karar verilmiştir. KUG-Au(5D) elektrot ile, 0,2 V gerilim, 1,1 mL/dk akış hızı ve 0,05 M pH 10 fosfat tamponunun kullanıldığı AEA-AD sistemine 5 μ M DES enjekte edilmesi sonucu elde edilen akım-zaman eğrilerine bakılarak sistemin DES'e cevap verip vermediği görülmüştür.

3.2.2.3. Ölçüm Koşullarının Optimizasyonu

Döngü Sayısı Optimizasyonu

0,2 V gerilim, 1,1 mL/dk akış hızı, 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, 5 μ M DES ve çalışma elektrotu olarak farklı döngü alınarak hazırlanmış KUG-Au (3, 5, 7, 10 döngü) elektrotlar kullanılarak yapılan enjeksiyonlar sonucu alınan ölçümlerde modifiye elektrot için optimum döngü sayısı belirlenmiştir.

Gerilim Optimizasyonu

Tasarlanan AEA-AD sisteminde hareketli faz olarak 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, çalışma elektrotu olarak 5 döngü altın kaplanarak hazırlanan KUG-Au(5D) elektrot, akış hızı 0,8 mL/dk ve 5 μ M DES ile 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 V olmak üzere farklı gerilimlerde analizler gerçekleştirilerek optimum gerilim değerine karar verilmiştir.

Akış Hızı Optimizasyonu

Tasarlanan AEA-AD sisteminde hareketli faz olarak 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, çalışma elektrotu olarak 5 döngü altın kaplanarak hazırlanan KUG-Au(5D) elektrot, 0,2 V gerilim uygulanarak 0,11; 0,22; 0,33; 0,44; 0,88; 1,1; 1,32; 1,54 mL/dk akış hızında 5 μ M DES enjeksiyonu ile optimum akış hızı seçilmiştir.

3.2.2.4. Tekrarlanabilirlik Parametresinin Değerlendirilmesi

0,05 M pH 10 fosfat tamponu hareketli fazı ve çalışma elektrotu olarak KUG-Au(5D) elektrotun kullanıldığı sistemde 0,2 V gerilim ve 1,1 mL/dk akış hızı koşullarında, 5 μ M DES enjeksiyonunun altı kez yapılması ile alınan ölçümler ile tekrarlanabilirlik test edilmiştir.

3.2.2.5. AEA-AD sisteminin sıvı kromatografisinde dedektör olarak kullanımıyla gerçekleştirilen DES analizleri

AEA-AD+C₁₈ sisteminin kalibrasyonu

Hazırlanmış AEA-AD sistemine bir de C₁₈ kolon eklenerek sisteme enjekte edilen çözeltinin bir pompa yardımıyla kolondan geçmesi sağlanmış ve bu yeni sistem AEA-AD+C₁₈ olarak gösterilmiştir. AEA-AD+C₁₈ ile AEA-AD sisteminin sıvı kromatografide dedektör olarak kullanımı araştırılmıştır. Hareketli faz olarak, %70 CH₃OH:%30 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v) HPLC analizleri sonucu seçilmiştir. Analiz 1,1 mL/dk akış hızı, KUG-Au(5D) çalışma elektrodu kullanılarak 1-500 µM DES aralığında artan derişimlerde DES çözeltilerinin sisteme enjekte edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

AEA-AD+C₁₈ sisteminde gerçek örnek analizleri

Gerçek örnek olarak seçilen su, süt ve süt tozu örneklerine öncelikle ön işlem yapılmıştır.

Su ve süt tozu örnekleri için voltametrik analizde uygulanan ön işlemler uygulanmış ve belirlenen derişimlerdeki DES içeren örnekler hazırlanmıştır.

Süt örneğinin hazırlanması: 4 mL süt örneği bir tüpe alınarak, üzerine 8 mL ACN eklenip, 1 dk vortekslenmiştir. 40 dk dinlendirilerek 10 dk 5000 rpm hızda santrifüjlenmiştir. Berrak kısım kuruluğa kadar buharlaştırılmış ve üzerine sadece CH₃OH ve 5, 10, 20 µM DES derişimleri içeren CH₃OH eklenmiştir. Analizde standart ekleme yöntemi kullanılmıştır.

Analizler AEA-AD+C₁₈ yönteminin yanı sıra karşılaştırmak amacıyla HPLC cihazı ile de yapılmıştır. Her iki sistem için de kullanılan hareketli faz %70 CH₃OH:%30 0,05 M pH 7,4 (v/v) fosfat tamponudur ve akış hızı 1,1 mL/dk'dir. HPLC cihazında 241,16 nm dalga boyunda analizler gerçekleştirilmiştir.

3.3. PROP Tayinine Yönelik Gerçekleştirilen Çalışmalar

Tez çalışması kapsamında PROP tayini için voltametri ve akışa enjeksiyon olmak üzere iki farklı yöntem geliştirilmiştir.

3.3.1. PROP tayininin voltametri yöntemiyle gerçekleştirilmesi

3.3.1.1. *PROP stok çözeltisinin hazırlanması*

5 mM 10 mL PROP çözeltisi için gerekli olan PROP tartılarak 10 mL su içerisinde çözölmüştür. Tam çözönmeyin sağlanması için çözelti bir süre vortekslenip, ultrasonik banyoda tutulmuştur. Hazırlanan çözelti +4 °C’de saklanmış ve deneyler için gereken seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır. Stok çözelti belirli periyotlarla tekrar hazırlanmıştır.

3.3.1.2. *PROP tayinine yönelik modifiye elektrot hazırlanması ve elektrokatalitik etkisinin incelenmesi*

PROP’un elektrokimyasal tayinini gerçekleştirebilmek amacıyla 5 boyunlu bir hücrede Ag/AgCl referans elektrot, Pt karşıt elektrot ve KUG çalışma elektrodu kullanılmış, KUG elektroduna 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda, dönüşümlü voltametri tekniği ile 0,5;1,4 V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızında 3 döngü tarama yapılmasıyla elektrokimyasal ön işlem uygulanmış ve hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar analizlerde kullanılmıştır.

Modifiye edilmemiş KUG elektrot ve elektrokimyasal ön işlem uygulanmış EÖİ/KUG elektrotların 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV tekniği kullanılarak 0,5 V ile 1,2 V gerilim aralığında 60 s temas süresi, 300 rpm karıştırma hızı ile 5 µM PROP varlığında ve yokluğunda ölçüm alınmasıyla modifiye elektrodun PROP’un yükseltgenmesi üzerinde olan elektrokatalitik etkisi incelenmiştir.

3.3.1.3. EÖİ/KUG elektrodun karakterizasyonu

Dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemleri EÖİ/KUG elektrodunun karakterize edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

- Hazırlanan EÖİ/KUG ve KUG elektrotlar ile 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ve 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde -0,2 V ile 0,8 V gerilim değerleri arasında 60 s temas süresi ile 300 rpm karıştırma hızında ve 50 mV/s tarama hızında DV ölçümleri alınmıştır. Alınan voltamogramlardan elektrot yüzeyinde meydana gelen değişim ve elektron aktarım hızı ile ilgili yorum yapılmıştır.
- Hazırlanan EÖİ/KUG ve KUG elektrotlar ile 1 mM $Ru(NH_3)_6^{3+}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 0,3 V ile -0,6 V gerilim değerleri arasında, 50 mV/s tarama hızında, 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile DV ölçümleri alınmıştır. Alınan voltamogramlar yardımıyla modifiye elektrot yüzeyinde meydana gelen değişim hakkında yorum yapılmıştır.
- 2,5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde EÖİ/KUG ve KUG elektrotlar ile açık devre potansiyeli olan 0,125 V gerilim değerinde EİS ölçümleri alınmış ve sonuçlar Randles-Sevcik devresine fit edilmiştir.

3.3.1.4. EÖİ/KUG elektrodun PROP varlığında elektrokimyasal davranışı

Modifiye elektrot ve analit arasındaki etkileşim ile elektrodun etkinliği alınan DV ölçümleri ile değerlendirilmiştir.

- EÖİ/KUG ve KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0 V ve 1,2 V gerilim aralığında, 10 μ M PROP varlığında ve yokluğunda 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında DV ölçümleri gerçekleştirilmiştir.
- EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,5 V ile 1,25 V gerilim aralığında, 10 μ M PROP varlığında, 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 mV/s) ölçüm alınarak elde edilen grafiklerden alınan akım değerlerinin tarama hızı ve tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulan grafiklerden modifiye elektrot ve analit etkileşiminin adsorpsiyon kontrollü mü yoksa difüzyon kontrollü mü olduğuna karar verilmiştir.

3.3.1.5. EÖİ/KUG elektrodun hazırlanma koşullarının optimizasyonu

Hazırlanan EÖİ/KUG elektrodu ile yapılan PROP analizlerinde yüksek ve kararlı bir cevap elde edebilmek amacıyla elektrodun hazırlanması sırasında kullanılan ön işlem gerilim aralığı, modifikasyon için kullanılacak döngü sayısı ve tampon pH'sı optimize edilmiştir.

Ön işlem potansiyel aralığı optimizasyonu

0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde, farklı gerilim aralıklarında (0,5 V ile 1,0; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,8; 2,0 V aralıklarında) 50 mV/s tarama hızında 2 döngü parametreleri ayarlanarak DV yöntemiyle hazırlanan elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,5;1,2 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızıyla 60 s bekleme süresinde, 5 µM PROP varlığında diferansiyel puls ölçümleri alınarak optimum sonuç veren ön işlem aralığı tespit edilmiştir.

Döngü sayısı optimizasyonu

0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, DV tekniği ile 0,5; 1,4 V gerilimde 50 mV/s tarama hızında ve farklı döngü sayılarında elektrokimyasal ön işlem uygulanan KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda 5 µM PROP varlığında DPV tekniği ile 0,5; 1,2 V gerilim aralığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında alınan ölçümler sonucu optimum döngü sayısına karar verilmiştir.

Ön işlem çözeltisi optimizasyonu

0,1 M farklı pH'larda hazırlanan fosfat tamponları, 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH çözeltileri içerisinde 0,5 V ve 1,4 V gerilim değerleri arasında 50 mV/s tarama hızında 3 döngü alınarak elektrotlar DV tekniği ile hazırlanmıştır. Daha sonra, hazırlanan elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 5 µM PROP varlığında DPV tekniği ile 0,5; 1,2 V gerilim aralığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında ölçümler alınarak optimum pH değeri belirlenmiştir.

3.3.1.6. PROP'un ölçüm koşullarının optimizasyonu

pH optimizasyonu

Optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar ile farklı pH'larda hazırlanmış 0,1 M fosfat tamponlarında 60 s temas süresi, 300 rpm karıştırma hızı ve 5 µM PROP varlığında 0,35 V ile 1,3 V gerilim aralığında DPV tekniği ile alınan ölçümler sonucu voltamogramlara bakılarak optimum pH değeri belirlenmiştir.

Temas süresi optimizasyonu

Optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, 0,5 µM PROP varlığında, 0,35 V ile 1,2 V gerilim aralığında DPV tekniği kullanılarak, 300 rpm karıştırma hızında, farklı temas süreleri uygulanmasıyla alınan ölçümler sonucu optimum temas süresine karar verilmiştir.

3.3.1.7. PROP tayinine yönelik analitik parametrelerin belirlenmesi

LOD, LOQ ve doğrusal çalışma aralığı gibi parametreleri belirleyebilmek amacıyla kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu grafiğin oluşturulabilmesi için optimum koşullarda hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,35 V ile 1,25 V gerilim değerleri arasında, artan derişimlerde eklenen PROP varlığında DPV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon deneyi aynı koşullarda KUG elektrot ile de yapılarak ön işlem uygulanan elektrot ile karşılaştırılmıştır.

Yapılan deneylerde tekrarlanabilir ve uzun süre kararlı sonuçlar elde etmek önemli analitik parametrelerden olduğu için bu parametreler incelenmiştir.

0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, DPV tekniği kullanılarak, 0,35 V ile 1,25 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızı ile 120 s temas süresi ve 10 µM PROP varlığında farklı günlerde ve aynı gün alınan voltamogramlardan okunan pik akımları yardımıyla farklı günlerde alınan 6 ölçüm sonucunu içeren bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Aynı gün alınan 7 ölçüm sonucu için de bağıl standart sapma değeri hesaplanmıştır.

Vakum desikatöründe saklanan elektrotlar kullanılarak 7 günlük periyotlarda ölçümler, 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, DPV tekniği kullanılarak, 0,5 V ile 1,25 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızı ile 120 s temas süresi ve 10 µM PROP varlığında toplamda 21 günlük zaman diliminde alınmıştır.

3.3.1.8. PROP tayininde girişim yapması olası türlerin araştırılması

PROP'un elektroaktif türlerin de içinde bulunduğu bir matriks ortamında analiz edilebilmesi önemli parametrelerden bir tanesidir. Bu sebepten PROP analizi için girişim yapması muhtemel olan elektroaktif türler belirlenmiş ve bu türlerin varlığında analizler gerçekleştirilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu analizler 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, 0,5 ve 1,25 V gerilim aralığında, 120 s bekleme süresi, 300 rpm karıştırma hızı ve 2,5 µM PROP varlığında AA, KCl, GLC ve mannitol (MNNT) için 100, 500, 1000 ve 2000 µM artan derişimlerinde ve üre ile ÜA için 5, 15, 25, 50 µM artan derişimlerinde yapılmıştır.

3.3.2. PROP tayininin AEA-AD sistemiyle gerçekleştirilmesi

3.3.2.1. PROP analizi için referans elektrot değerlendirmesi

0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu ve 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponuna 0,1 M KCl ilavesi ile 0,95 V gerilimde EÖİ/KUG çalışma elektrodu ile 1,1 mL/dk akış hızında 5 ve 50 µM derişimlerinde PROP enjeksiyonu ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda kullanılacak referans elektroda karar verilmiştir.

3.3.2.2. Koşulların optimizasyonu

Gerilim optimizasyonu

Referans elektrot olarak Ag tel, karşıt elektrot olarak Pt tel ve çalışma elektrodu olarak EÖİ/KUG elektrodun kullanıldığı elektrokimyasal akış hücresinden bir pompa yardımıyla 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu 1,1 mL/dk akış hızında sistemden geçirilmiştir. Sisteme 10 µM PROP enjekte edilerek farklı gerilimlerin (0,85; 0,9; 0,95; 1,0 V) uygulanmasıyla oluşan akımın ölçülmesi sonucu çizilen grafikler değerlendirilmiş ve optimum gerilim değerine karar verilmiştir.

Kalibrasyon grafiği oluşturulması

AEA-AD sisteminde hareketli faz olarak 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,95 V gerilim ve 1,1 mL/dk akış hızı parametrelerinde farklı derişimlerde PROP çözeltileri (0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 75 µM) enjekte edilerek alınan ölçümler sonucunda kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

3.3.2.3. AEA-AD sisteminin sıvı kromatografisinde elektrokimyasal dedektör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen PROP analizleri

Gerilim optimizasyonu

AEA sistemine kolonun da dahil edilmesiyle oluşturulan sistem (AEA-AD+C₁₈) için kullanılacak hareketli faz HPLC ile yapılan analizler sonucu %65 CH₃OH; %35 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu karışımı (v/v) olarak belirlenmiştir. Sistemde akış hızı bir pompa yardımıyla 1,1 mL/dk olarak ayarlanarak sistemden sürekli çözelti akışı sağlanmıştır. Sistemde basınç 93 bar olarak okunmuştur. Sisteme farklı gerilimler uygulanarak (0,85; 0,9; 0,95; 1,0 V) 100 µM PROP enjekte edilmiştir ve alınan sonuçların grafiğe geçirilmesi sonucu optimum gerilim değerine karar verilmiştir.

Tampon derişimi etkisinin incelenmesi

AEA-AD+C₁₈ sisteminde hareketli faz olarak %65 CH₃OH; %35 farklı derişimlerde pH 7,4 fosfat tamponu (0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 M) karışımı (v/v), 1,1 mL/dk akış hızı, 0,9 V gerilim değeri ve 100 µM PROP enjeksiyonu ile yapılan enjeksiyonların sonuçları doğrultusunda çizilen grafiklerden optimum tampon derişimi belirlenmiştir.

Tekrarlanabilirlik

AEA-AD+C₁₈ sisteminde hareketli faz olarak %65 CH₃OH; %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu karışımı (v/v), 1,1 mL/dk akış hızı, 0,9 V gerilim değeri ve 100 µM PROP enjeksiyonu ile gerçekleştirilen ölçümler yardımıyla belirlenmiştir.

Kalibrasyon grafiğinin oluşturulması

AEA-AD+C₁₈ sisteminde hareketli faz olarak %65 CH₃OH; %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu karışımı (v/v), 1,1 mL/dk akış hızı, 0,9 V gerilim değeri ve artan derişimlerde PROP örnekleri (0,5; 2,5; 5; 7,5; 10; 25; 50; 75; 100; 125; 250 µM) enjekte edilerek alınan sonuçlar ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Gerçek Örnek Analizleri

AEA-AD+C₁₈ sisteminde PROP analizi için gerçek örneklerin içerdiği matriks ortamında verdiği cevapları değerlendirebilmek amacıyla seçilen sentetik idrar ve farmasötik tablet gerçek örnekleri ile analizler gerçekleştirilmiştir.

Yerel bir eczaneden temin edilen Dideral® isimli ilacın 5 tableti toz haline getirildikten sonra hesaplanan miktar tartılarak üzerine yaklaşık 60 mL deiyonize su eklendikten sonra 15 dk manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmış ardından 8 dk sonikatörde tutulmuştur. Karışım bir süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek 100 mL'lik balonjoje içine süzölmüş ve hacim çizgisine kadar deiyonize su eklenmiştir, böylelikle 1000 µM PROP çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 1/100 seyreltilerek 10 µM çözelti hazırlanmış ve deneylerde kullanılmıştır.

Sentetik idrar örneği için 2×10^{-2} M KCl, $4,9 \times 10^{-2}$ M NaCl, $1,5 \times 10^{-2}$ M KH₂PO₄, 1×10^{-2} M CaCl₂, $1,8 \times 10^{-2}$ M NH₄Cl, $1,8 \times 10^{-2}$ M üre tartılmış, bir miktar suda çözölmüş ve balonjojede deiyonize su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır [60]. Hazırlanan örnek içine bilinen derişimlerde PROP eklenerek analizler gerçekleştirilmiştir.

Bilinen miktarlarda PROP içerecek şekilde hazırlanan Dideral® ilacı ve sentetik idrar örnekleri ile AEA-AD+C₁₈ sisteminde hareketli faz olarak %65 CH₃OH; %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu karışımı (v/v) kullanılarak 1,1 mL/dk akış hızı ve 0,9 V gerilim parametrelerinde yapılan ölçömler ile geri kazanım değeri hesaplanmıştır. Hazırlanan örnekler HPLC cihazı ile de analiz edilerek iki sistem karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

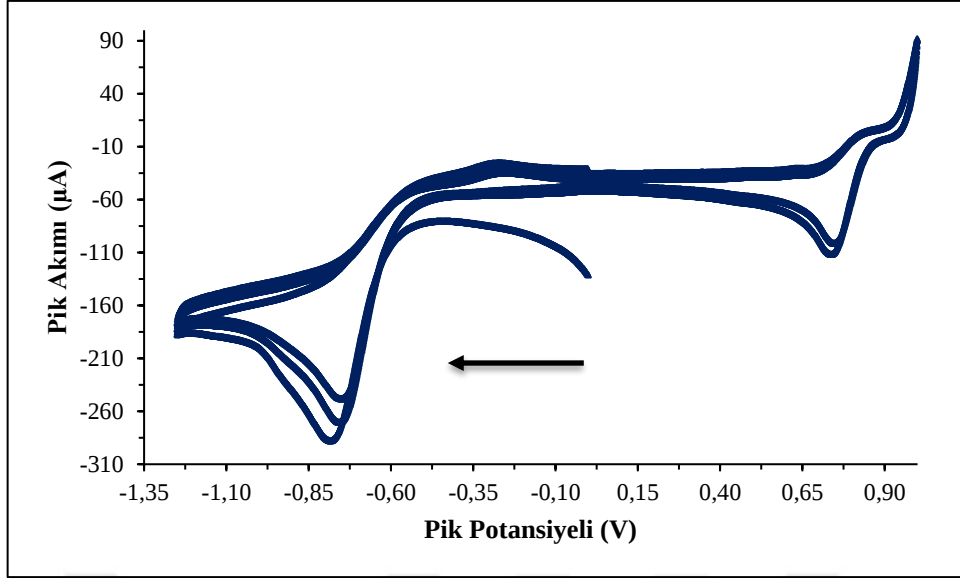
Tez kapsamında EBK'lerden biri olan DES ve β -bloker ilaçlar sınıfına giren PROP maddeleri analit olarak seçilmiştir. Seçilen analitlerin tayinleri için voltametrik yöntemler ve akışa enjeksiyon analiz sistemi kullanılarak ayrı ayrı yöntem geliştirilmiştir.

4.1. DES Tayinine Yönelik Gerçekleştirilen Çalışmalar

4.1.1. Voltametrik çalışmalar

4.1.1.1. KUG yüzeyinde $AuCl_4^-$ 'ün indirgenmesinin incelenmesi

Voltametrik çalışmalarda analite iyi cevap verecek modifikasyonu bulabilmek, çalışmanın başarısını etkileyen önemli bir parametredir. Yapılan çalışmada DES için KUG elektrot yüzeyine altın indirgenerek modifiye edilmiş ve KUG elektroda göre analite daha yüksek cevap veren bir modifiye elektrot hazırlanmıştır. KUG elektrot yüzeyinde $HAuCl_4$ davranışını belirleyebilmek amacıyla 0 V gerilimden başlayarak önce -1,25 V'ye ardından 1,0 V'ye gidip tekrar 0 V gerilime dönen 50 mV/s tarama hızında 3 döngü DV voltamogramı kaydedilmiştir (Şekil 4.1). Alınan voltamogramda -0,76 V ile 0,75 V gerilim değerlerinde indirgenme, -0,2 V ile 0,7 V gerilim değerlerinde ise yükseltgenme pikleri görülmektedir. Şekil 4.1'de 0 V'den -1,25 V değerine tarama yapılmasıyla -0,76 V değerinde Au (III)'ün Au (0)'a dönüşmesinden kaynaklı bir katodik pik görülmektedir. Döngü sayısı artıkça elektrot yüzeyinde altın birikmesi sebebiyle piklerde sola kayma görülmektedir. Görülen anodik pikler altının Au (0) formundan Au (III) formuna yükseltgenmesi ve farklı türlerdeki altın oksitlerin oluşumundan kaynaklanmaktadır [124]. 0,75 V değerinde gözlenen katodik pik ise altın oksit formlarının indirgenmesinden kaynaklanmaktadır.

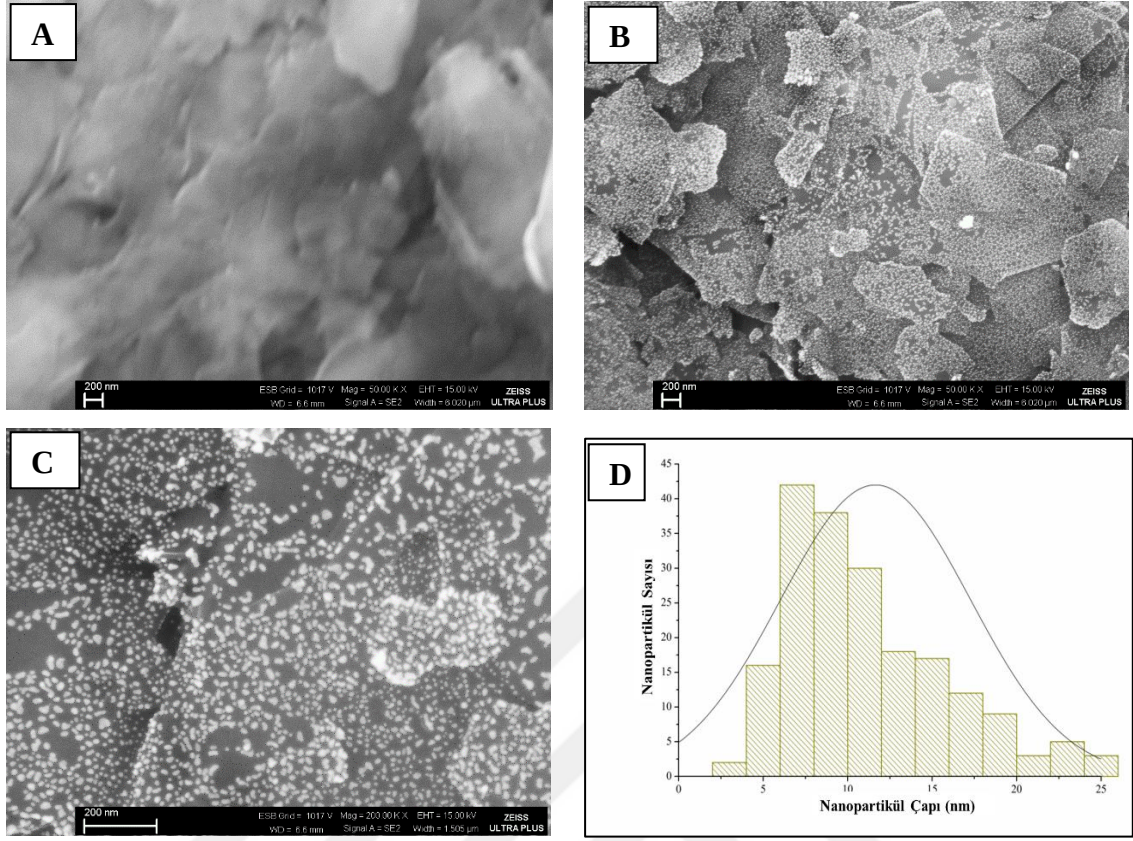


Şekil 4.1. KUG elektrot yüzeyinde altının davranışının incelenmesi için alınan DV ölçümü (Tarama hızı: 50 mV/s)

4.1.1.2. DES tayinine yönelik hazırlanan KUG-Au modifiye elektrodun karakterizasyonu

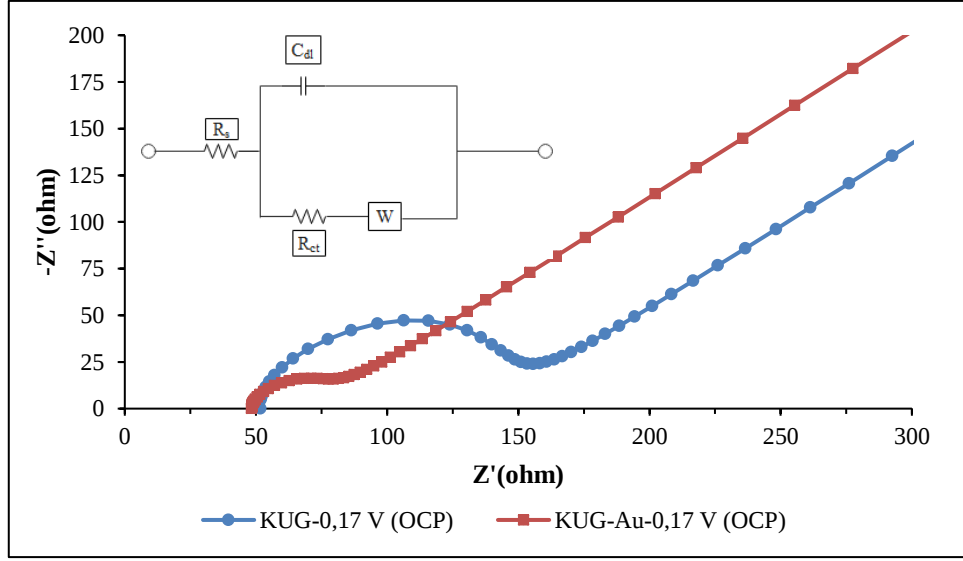
KUG-Au elektrodun karakterizasyonunda SEM, EİS ve DV yöntemleri kullanılmıştır.

KUG ve KUG-Au elektrotların SEM görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir. A modifiye edilmemiş KUG elektroda ait SEM görüntüsünü göstermektedir. B ve C görüntüleri KUG-Au elektroda aittir ve Au nanopartikülleri beyaz noktalar halinde açıkça görülmektedir. Aynı büyütme oranına sahip A ve B görüntüleri karşılaştırıldığında altın nanopartiküllerin indirgenerek yüzeye kaplandığı ve yüzeyi değiştirdiği görülmektedir. C fotoğrafında bulunan SEM görüntüsü kullanılarak ImageJ programı yardımıyla altın nanopartiküllerinin boyut dağılımı incelenmiştir. D görüntüsünde görüldüğü gibi modifiye elektrot üzerindeki nanopartiküller 2 ile 25 nm aralığında dağılım göstermekte ve çapları ortalama $11,648 \pm 5,623$ nm değerindedir.



Şekil 4.2. A KUG elektroda, B ve C ise KUG-Au elektrotlara ait SEM görüntüleri ve D altın nanopartiküllere ait boyut dağılımı (Büyütme oranları A ve B için; 50.000 X ve C için ise 200.000 X)

EİS ölçümleri 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redoks çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde +0,17 V açık devre gerilim (OCP) değerinde KUG ve KUG-Au elektrotları ile gerçekleştirilmiştir. Nyquist eğrileri incelendiğinde KUG-Au elektrodu ile elde edilen eğrinin çapının KUG elektroda göre daha az olduğu açıkça görülmektedir (Bkz. Şekil 4.3.). Ayrıca yük transfer dirençleri (R_{ct})’de KUG ve KUG-Au elektrotları için Çizelge 4.1. de görüldüğü gibi sırasıyla 90,16 Ω ; 26,45 Ω ’ dır. KUG-Au elektrot için R_{ct} değerinin daha küçük olması yüzeyin değiştiğini ve elektron transfer hızının arttığını göstermektedir.

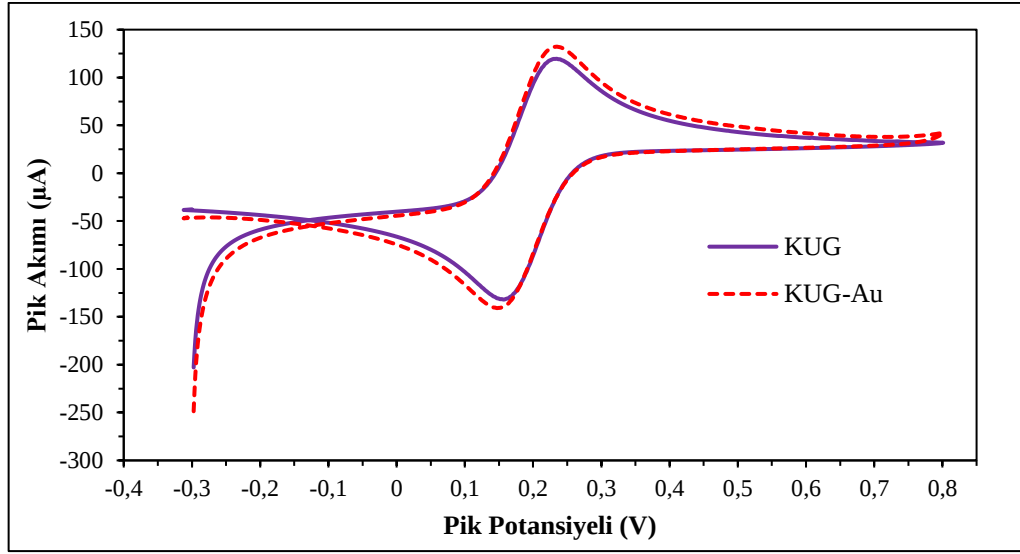


Şekil 4.3. KUG ve KUG-Au elektrotlara ait 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redoks çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde +0,17 V (OCP) gerilim değerinde alınan elektrokimyasal empedans spektrumları

Çizelge 4.1. EIS ölçümünden elde edilen değerler

	R_{ct} (Ω)	R_s (Ω)	C_{dl} (F)	W
KUG	90,16	51,47	$4,256 \times 10^{-7}$	0,001047
KUG-Au	26,45	48,32	$3,015 \times 10^{-6}$	0,00155

KUG ve KUG-Au elektrotlarının karakterizasyonunda kullanılan bir diğer yöntem ise 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisinde alınan DV ölçümleridir (Bkz. Şekil 4.4.). Alınan voltamogram incelendiğinde iki elektrot içinde yükseltgenme piki aynı gerilimde görülürken indirgenme piki KUG elektrot için 0,15656 V gerilimde KUG-Au elektrot için ise biraz daha sol tarafa kaymış 0,15167 V gerilim değerinde görülmektedir. Bu da yüzeyde bir değişiklik olduğu söylenebilmektedir. Aynı şekilde pik akımları karşılaştırıldığında hem anodik hem katodik pikler için modifiye elektrot ile alınan ölçümlerde değerlerin artması elektrodun etkin yüzey alanının arttığının bir göstergesidir.



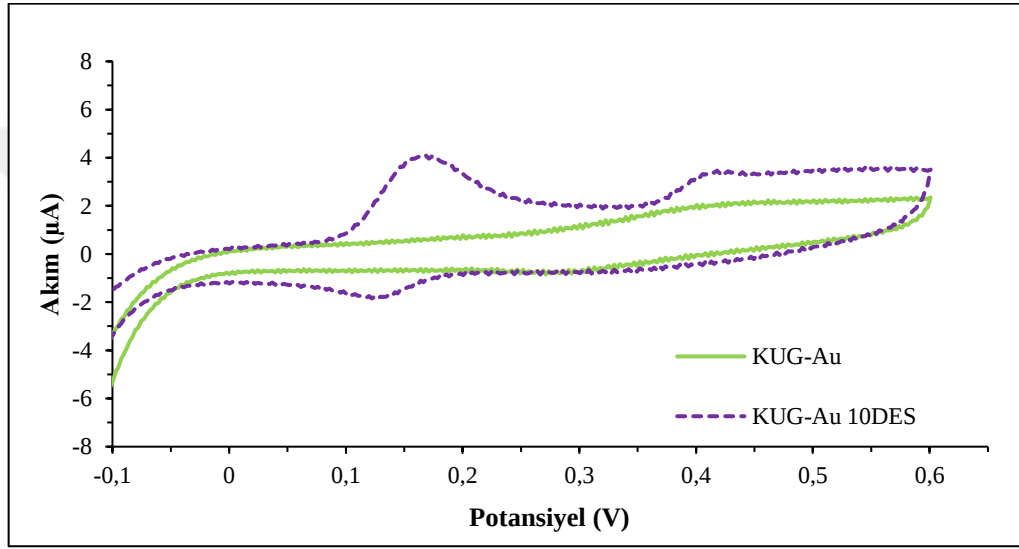
Şekil 4.4. KUG ve KUG-Au elektrotlar ile 2,5 mM $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisinde -0,3 V ile 0,8 V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızında alınan DV ölçümleri

Çizelge 4.2. KUG ve KUG-Au elektrotlar ile 2,5 mM $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ çiftini içeren 0,1 M KCl çözeltisinde alınan DV ölçümü pik potansiyel ve gerilim değerleri

	E_a (V)	I_a (µA)	E_k (V)	I_k (µA)
KUG	0,2298	133,01	0,15656	-137,28
KUG-Au	0,2298	152,41	0,15167	-142,26

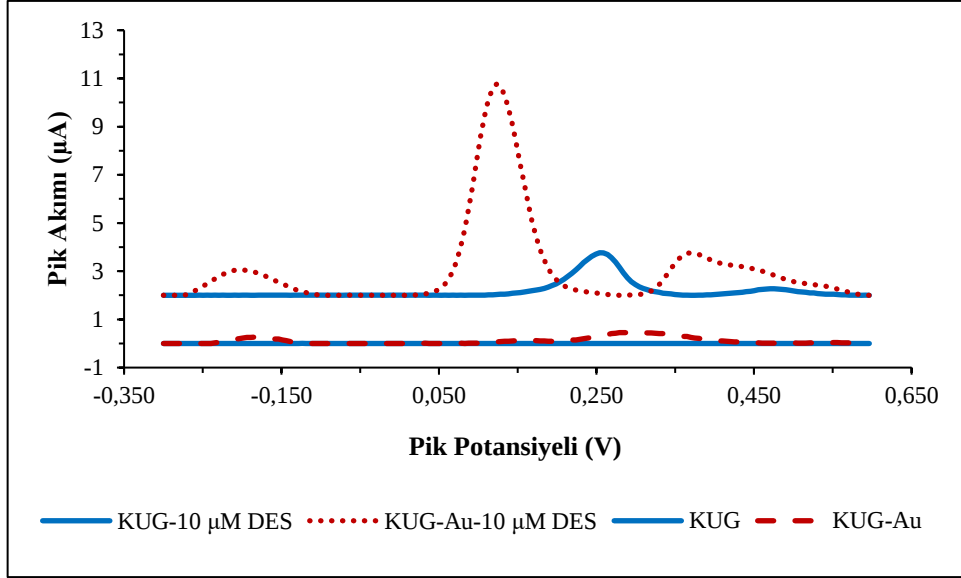
4.1.1.3. DES'in yükseltgenmesi için altın nanopartikül modifiye KUG elektrodun elektrokatalitik etkisinin incelenmesi

Modifiye elektrodun elektrokimyasal davranışının incelenmesi amacıyla 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DV yöntemiyle alınan voltamogramlar Şekil 4.5'de verilmiştir. Modifiye elektrot analit yokken hiçbir pik vermezken, DES varlığında 0,15 V ve 0,4 V gerilimlerde yükseltgenme pikleri ve 0,13 V gerilimde ise indirgenme piki vermiştir.



Şekil 4.5. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde KUG ve KUG-Au elektrotlar ile ve KUG-Au elektrotla 10 µM DES varlığında -0,1 V ile 0,6 V gerilim aralığında alınan DV ölçüm voltamogramları.

0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde KUG-Au ve KUG elektrotlar ile alınan voltamogramlar Şekil 4.6'de görüldüğü gibi KUG elektrot için 0,25391 V gerilim değerinde, KUG-Au elektrot için ise daha sol tarafta 0,12299 V gerilim değerinde DES piki vermektedir. Çizelge 4.3 incelendiğinde modifiye elektrodun pik akım değerinin, modifiye edilmemiş elektrodun pik akım değerine göre 4,9621 kat daha yüksek olduğu görülmektedir. Voltamogramlar incelendiğinde analit olmadığı zaman KUG-Au modifiye elektrodun DES'in pikinin gözlemlendiği gerilim değerinde pik vermediği, dolayısıyla DES pikine herhangi bir girişim yapmadığı da açıkça görülmektedir.

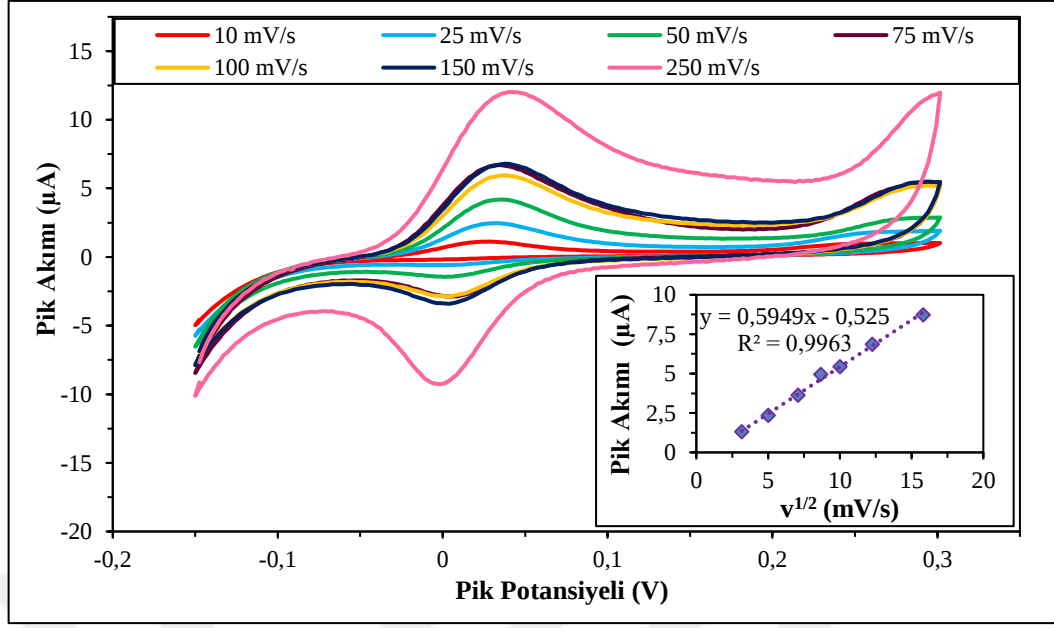


Şekil 4.6. KUG ve KUG-Au elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV tekniği ile 10 μ M DES varlığında ve yokluğunda 60 s bekleme süresi ile 300 rpm karıştırma hızında alınan voltamogramlar

Çizelge 4.3. KUG ve KUG-Au elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu ile 10 μ M DES içeren çözelti içerisinde DPV ile alınan pik akım ve gerilim değerleri

Çalışma Elektrodu	Pik Gerilim Değeri (V)	Pik Akım Değeri (μ A)
KUG	0,25391	1,7658
KUG-Au	0,12299	8,7621

0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 10 μ M DES varlığında DV tekniği kullanılarak, farklı tarama hızlarında KUG-Au elektrotları ile alınan ölçümlerin voltamogramları Şekil 4.7’de verilmiştir. Çizilen grafik sonucu pik akımının tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Bu da KUG-Au elektrot yüzeyinde gerçekleşen etkileşimin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.7. 0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 10 μ M DES varlığında DV tekniği kullanılarak 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile farklı tarama hızlarında KUG-Au elektrotları için alınan ölçümler

1,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde farklı tarama hızlarında DV tekniği kullanılarak hem KUG hem de KUG-Au modifiye elektrot için ölçümler alınmıştır (Bkz. Şekil 4.8). Pik akımının tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen grafikten eğim değerleri KUG elektrot için $8,0 \times 10^{-5}$ ve KUG-Au elektrot için $1,0 \times 10^{-4}$ olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.9.). Randles-Sevcik denklemi ve $6,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ D_R değeri kullanılarak etkin yüzey alanları sırasıyla KUG ve KUG-Au elektrotlar için $0,04792 \text{ cm}^2$ ve $0,05989 \text{ cm}^2$ olarak hesaplanmıştır (Bkz. Denklem 4.1). Sonuçlardan da anlaşılacağı gibi yapılan modifikasyon ile etkin yüzey alanı arttırılmıştır.

$$I_{pa} = 2,65 \times 10^5 \sqrt[3]{n} A C_o \sqrt{D_R} \sqrt{v} \quad 4.1.$$

I_{pa} = Anodik pik akımı (A)

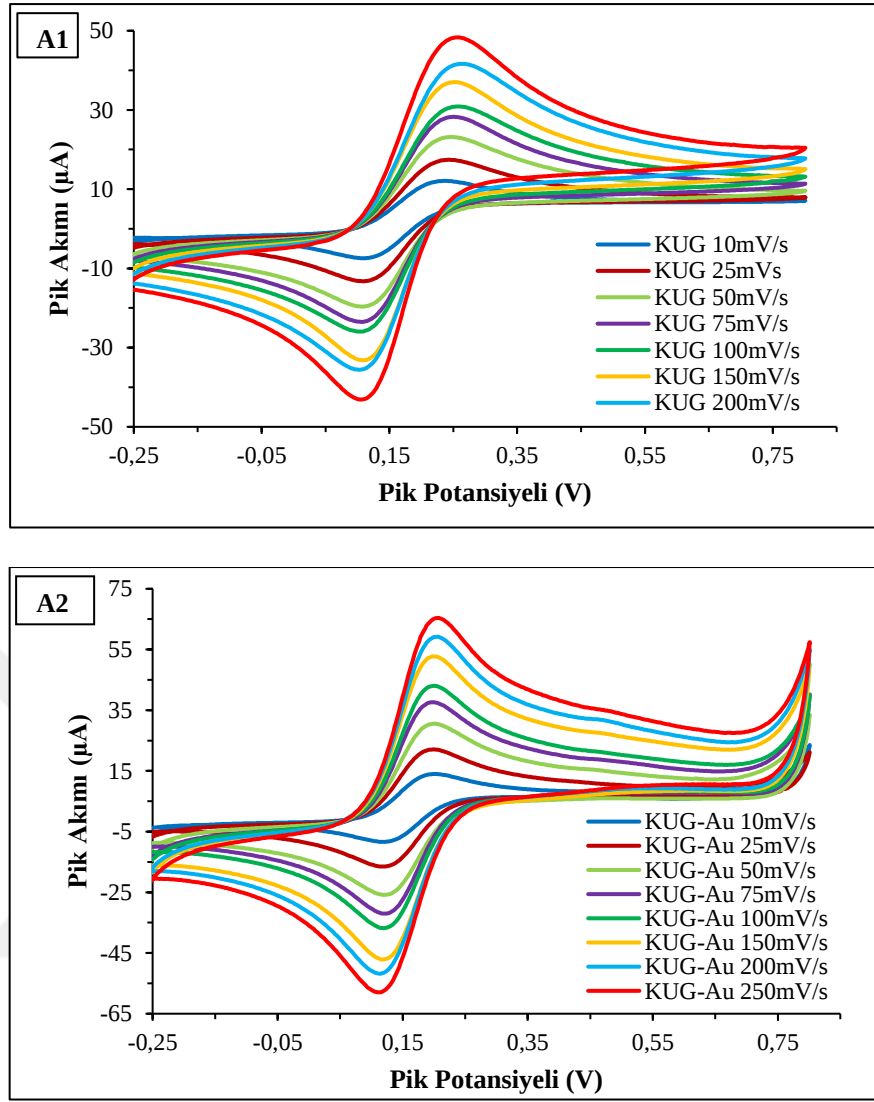
n = Aktarılan elektron sayısı

A = Etkin yüzey alanı (cm^2)

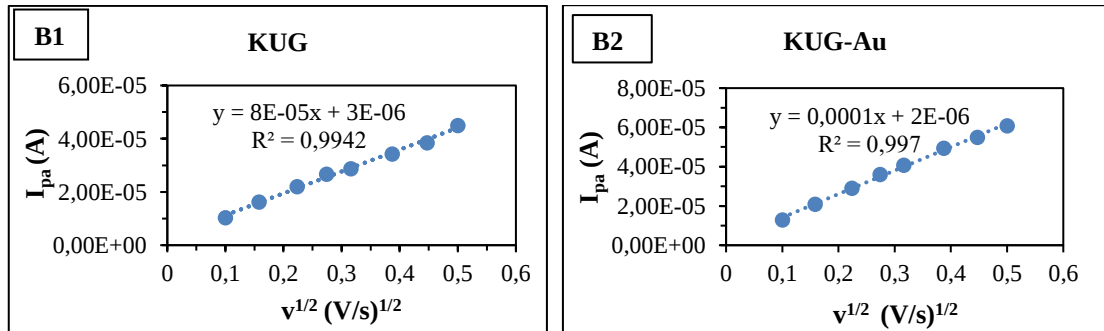
C_o = Yükseltgenen çözelti derişimi (mol/L)

D_R = Difüzyon katsayısı (cm^2/s)

v = Tarama hızı (V/s)



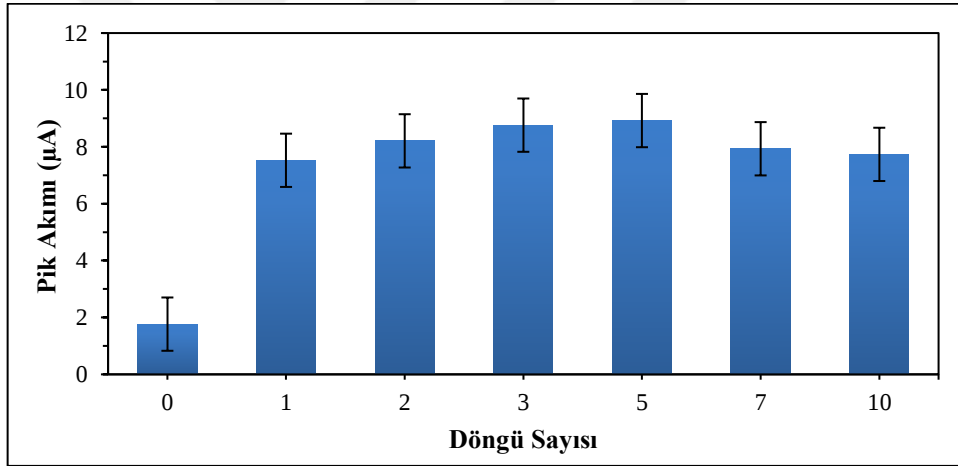
Şekil 4.8. $1,0 \text{ mM Fe(CN)}_6^{4-}$ içeren $0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde A1 KUG A2 KUG-Au elektrotlar için farklı tarama hızlarında alınan voltamogramlar



Şekil 4.9. $1,0 \text{ mM Fe(CN)}_6^{4-}$ içeren $0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde KUG (B1), KUG-Au (B2) elektrotlar ile elde edilen tarama hızının kareköküne karşı anodik pik akımları

4.1.1.4. KUG-Au modifiye elektrodun hazırlanması için optimum döngü sayısının belirlenmesi

Kullanılan modifiye elektrodun performansını arttırmak için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, 0,1 M LiClO_4 içeren 1 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinde 0,0 V ile -1,25 V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızında DV tekniği ile farklı döngü sayılarında KUG elektrotlar hazırlanmıştır. Daha sonra elektrotların performansları 10 μM DES varlığında DPV tekniği ile test edilmiştir. Ölçüm sonucu elde edilen voltamogramlardan alınan pik akımları grafiğe geçirildiğinde 3 ve 5 döngülerde hazırlanan elektrotlar ile en yüksek sonuçların elde edildiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.10). 3 döngü için 8,76 μA ve 5 döngü için ise 8,92 μA pik akım değerleri alınmıştır. Bu akım değerlerinin birbirlerine yakın olması sebebiyle zaman ve malzeme tasarrufu düşünülerek optimum değer olarak 3 döngü seçilmiştir.



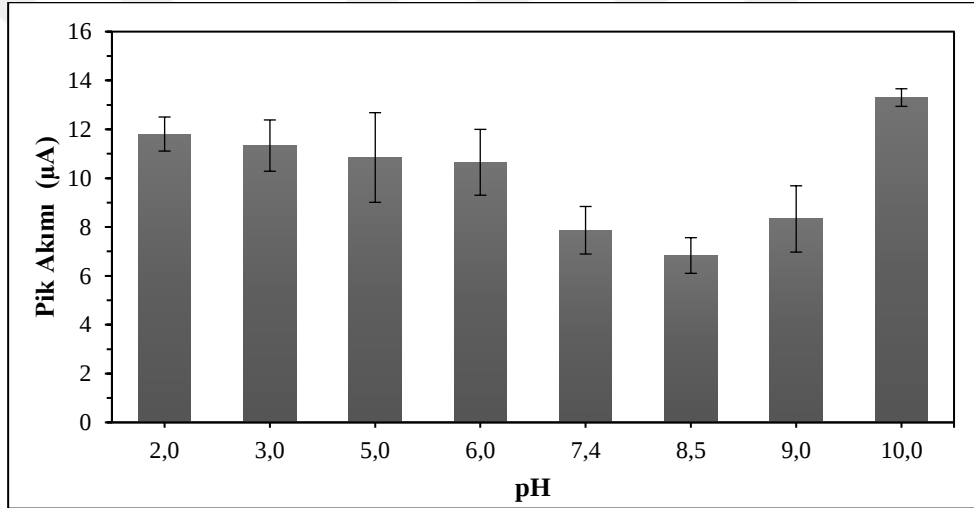
Şekil 4.10. Farklı döngü sayılarında hazırlanan KUG-Au elektrotların 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda DPV tekniği ile 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında 10 μM DES varlığında elde edilen akım değerleri

4.1.1.5. DES tayin koşullarının optimizasyonu

Elektrodun hazırlanması için optimum koşulların belirlenmesinin ardından ölçüm koşulları da optimize edilmiştir.

pH optimizasyonu

Hazırlanan KUG-Au elektrotlar ile farklı pH'larda -0,15 V ile 0,7 V gerilim aralığında DPV tekniği ile 10 μ M DES varlığında alınan ölçümler sonucu elde edilen pik akımları Şekil 4.11' de verilmiştir. Grafikten de açıkça görüldüğü gibi pH 10 fosfat tamponunda en yüksek pik akım değerine ulaşılmıştır. Bu nedenle optimum pH olarak pH 10 seçilmiştir.



Şekil 4.11. Optimum koşullarda hazırlanan KUG-Au elektrot ile 0,1 M farklı pH'larda -0,15 V ile 0,7 V gerilim aralığında DPV tekniği ile 10 μ M DES varlığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında elde edilen pik akımları

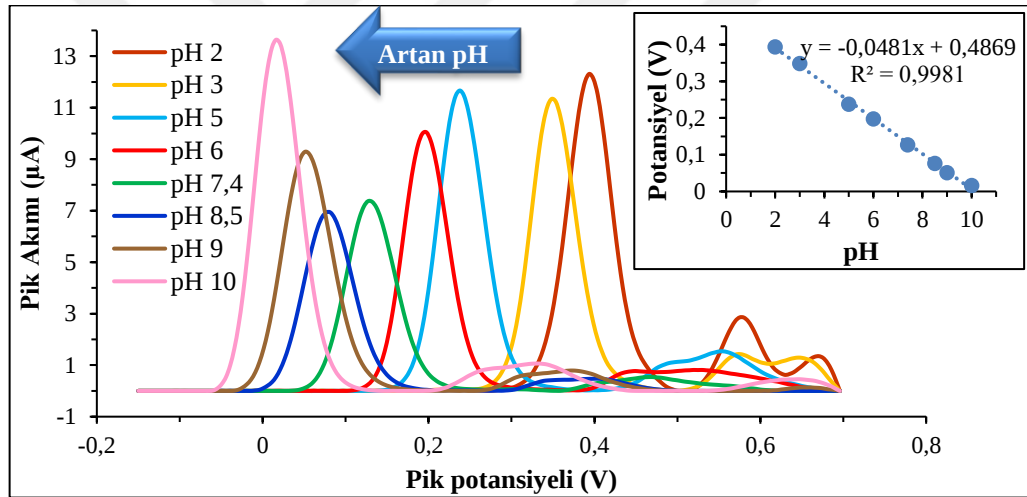
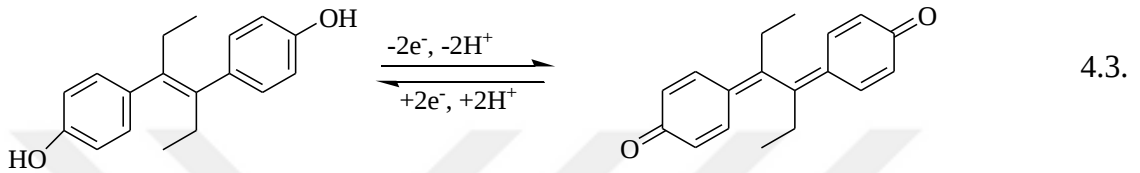
Alınan voltamogramlar incelendiğinde pH'ın artmasıyla, ortamdaki hidronyum iyonu derişimi değişmesi sonucu piklerin potansiyellerinin de sola doğru kaydığı Şekil 4.12'de görülmektedir. Bu da elektrot reaksiyonunda protonların da yer aldığını göstermektedir. Pik potansiyeline karşı pH grafiğe geçirildiğinde R^2 değeri 0,9981 ve eğimi -0,0481 V/pH olan bir grafik elde edilmiştir. Elde edilen değerin, Denklem 4.2'de Nernst eşitliği gereği teorik değere olan yakınlığı elektrot tepkimesinde eşit sayıda proton ve elektronun yer aldığını göstermektedir. Buradan literatür çalışmaları da [45]

dikkate alınarak DES'in yükseltgenmesi için bir mekanizma önerilmiştir (Bkz. Denklem 4.3).

$$E = E^{\circ} - RT/nF \ln K \quad 4.2.$$

$$E = E^{\circ} + (0,0591/n) \log K$$

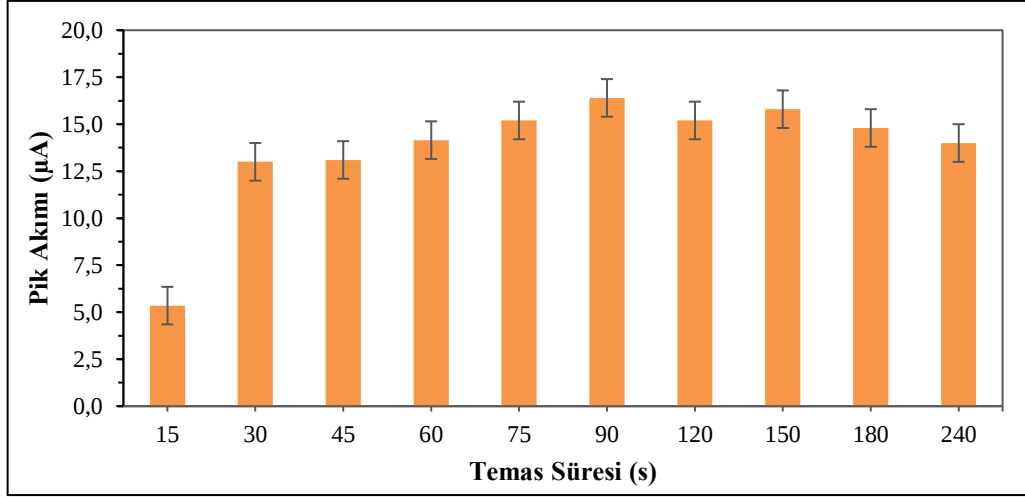
R= Gaz sabiti; T= mutlak sıcaklık; n= alınıp verilen e⁻ sayısı; F= Faraday sabitini gösterir.



Şekil 4.12. Optimum koşullarda hazırlanan KUG-Au elektrot ile 0,1 M farklı pH'larda -0,15 V ile 0,7 V gerilim aralığında DPV tekniği ile 10 µM DES varlığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında alınan voltamogramlar

Temas süresi optimizasyonu

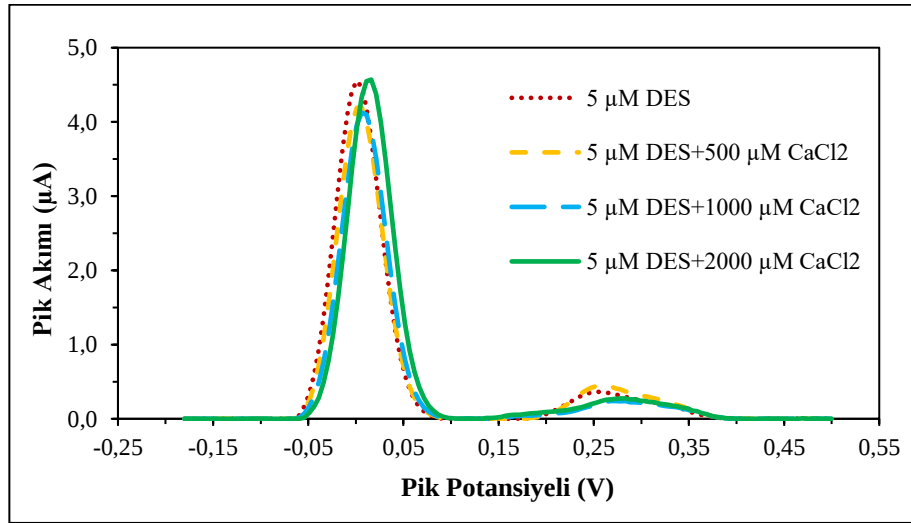
KUG-Au elektrotlar ile 0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 10 µM DES varlığında farklı temas süreleri uygulanarak alınan DV ölçümleri sonucu elde edilen pik akım değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.13.). Grafikten de görüldüğü gibi en yüksek cevap 90 s temas süresi uygulandığında alınmıştır. Bu nedenle, optimum değer olarak 90 s seçilmiştir.



Şekil 4.13. 0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 10 µM DES varlığında -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızında ve farklı temas sürelerine karşı alınan pik akım değerleri

4.1.1.6. DES tayinine yönelik girişim yapabilecek türlerin incelenmesi

DES analiti gerçek örneklerde tayin edilmek istendiğinde, bir matris ortamında tayin edilmesi gerekir ve bu ortamda tayinin gerçekleşmesine engel olabilecek çeşitli elektroaktif türler çıkabilir. Bu sebeple girişim yapması muhtemel elektroaktif türler belirlenmiş ve girişim etkileri araştırılmıştır. Belirlenen elektroaktif türlerin 5 µM DES varlığında alınan voltamogramları incelendiğinde DES'e ait yükseltgenme pikine girişim yapmadığı görülmüştür. Şekil 4.14'de DES'in yükseltgenme pikine CaCl₂'nin girişim etkisinin incelendiği voltamogramlar verilmiştir.



Şekil 4.14. 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda DPV yöntemiyle DES'in oksidasyon pikine CaCl₂ etkisi

Girişim yapması muhtemel türlerin DES varlığında maksimum izin verilen derişimleri Çizelge 4.4’de verilmiştir. Sonuçlar KUG-Au elektrotlar ile bu türlerin Çizelge 4.4’de verilen derişimleri ve bu derişimlerin altındaki derişimlerinde gerçek örneklerde DES tayininin gerçekleştirilebileceğini göstermiştir.

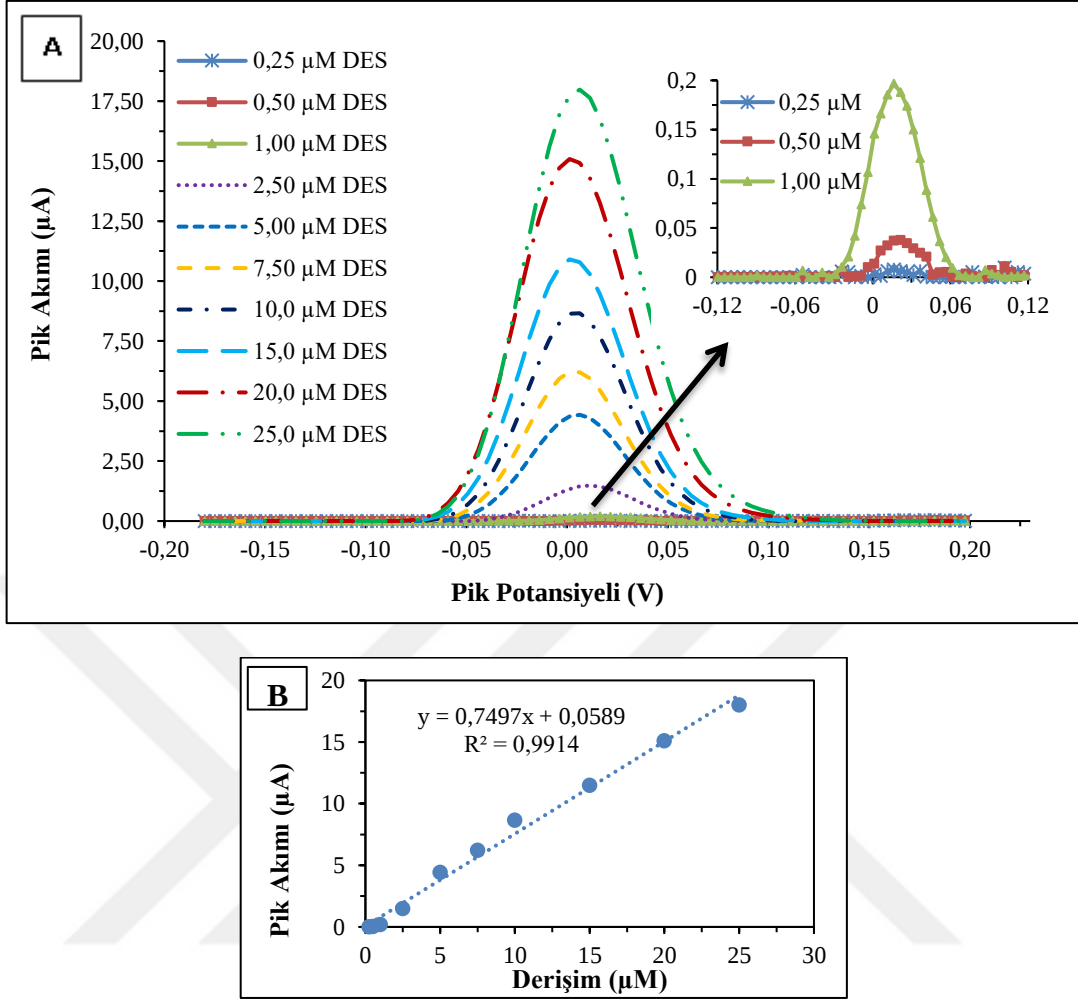
Çizelge 4.4. *Dietilstilbestrol’ün yükseltgenme pikine girişim yapabilecek türlerin maksimum izin verilen derişimleri*

Girişim etkisi incelenen türler	Girişim etkisine izin verilen maksimum derişim (µM)
Glukoz	2000
Kalsiyum Klorür	2000
Potasyum Klorür	2000
Askorbik Asit	1000
β-estradiol	50
Folik Asit	50
Hidrokinon	50
L-Fenilalanin	50
Üre	50

4.1.1.7. DES tayini için analitik parametrelerin belirlenmesi

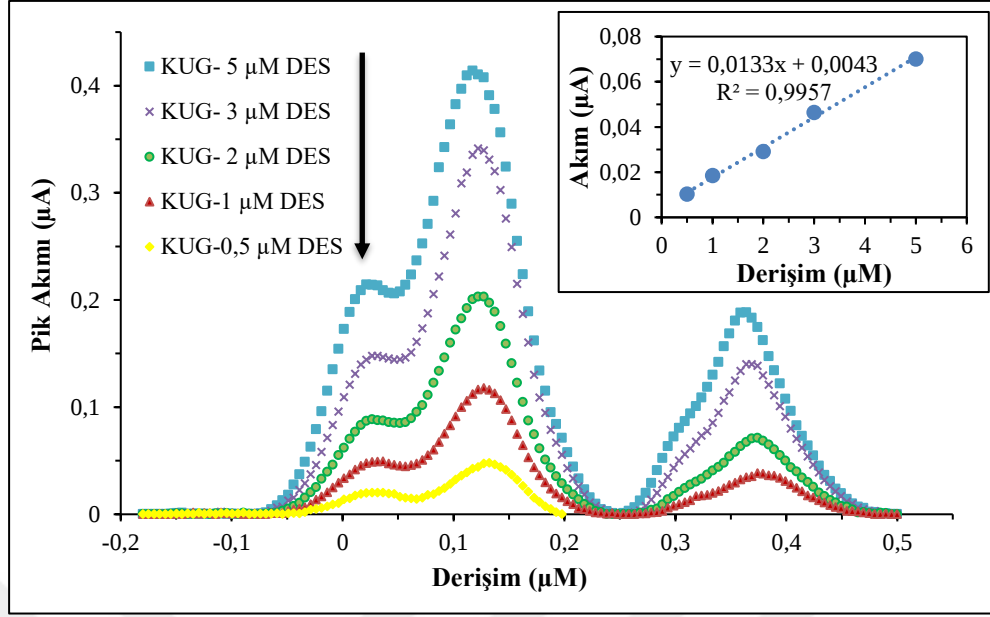
KUG-Au elektrot ile artan derişimlerde DES eklenerek alınan voltamogramlardaki pik akımlarının derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulan kalibrasyon grafiği yardımıyla çalışılabilecek doğrusal çalışma aralığı ve grafiğin eğimi belirlenmiştir (Şekil 4.15A ve Şekil 4.15B) Modifiye elektrot için alınan blank ölçüm pik akımları yardımıyla hesaplanan standart sapma değeri (SS) ve grafik eğimi (m) denklemde yerine koyularak gözlenebilme sınırı belirlenmiştir (Denklem 4.4). Yapılan çalışmalar sonucunda 0,25 µM ile 25 µM DES derişim aralığı doğrusal çalışma aralığı, 0,00629 µM LOD değeri ve 0,02097 µM LOQ değeri olarak bulunmuştur.

$$LOD = (3 \times SS)/m \quad 4.4.$$



Şekil 4.15. 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda DPV yöntemiyle -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında, 90 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile 0,25-25 μM DES derişim aralığında alınan A) voltamogramlar ve B) kalibrasyon grafiği

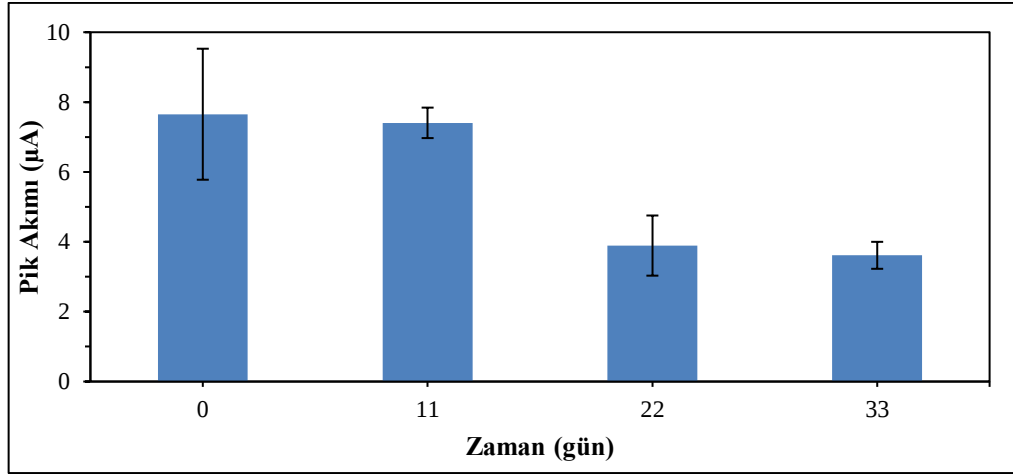
Modifiye edilmemiş KUG elektrot ile 0,5 μM ile 5 μM derişim aralığında DPV yöntemiyle ölçümler alınmıştır (Şekil 4. 16). Voltamogramlarda da görüldüğü gibi DES analizi için KUG-Au elektrotta olduğu gibi düşük derişimlere inilememiştir. Ayrıca, analite ait tek bir pik yerine ikili pik gözlenmiştir. Bu sonuçlar DES analizi için etkili bir modifiye elektrot hazırlandığını göstermektedir.



Şekil 4.16. 0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 90 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile -0,18 V ile 0,5 V gerilim aralığında KUG elektrot kullanılarak DPV yöntemiyle alınan voltamogramlar

Optimum koşullarda hazırlanan KUG-Au modifiye elektrodun tekrarlanabilirlik çalışmaları için 0,1 M pH 10 fosfat tamponu içerisinde 10 μM DES varlığında 10 farklı DPV ölçümü alınarak değerlendirilmesi yapılmıştır. RSD değeri %13,88 olarak bulunmuştur.

Hazırlanan modifiye elektrodun ne kadar süre kararlı kalabildiği de önemli bir parametredir. Bu kapsamda 33 gün boyunca vakum desikatöründe saklanan elektrotlar ile 11 günlük periyotlarda DPV ölçümleri alınmış ve alınan voltamogramlardaki pik akım değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek elektrodun kararlılığını ne kadar koruduğu değerlendirilmiştir (Bkz. Şekil 4.17). Hazırlanan KUG-Au modifiye elektrodunun 11 günlük periyotta beklemesi sonucu alınan ölçümünde çok fazla bir değişim olmamıştır ve cevabını %96,77 oranında korumuştur. Ancak 22 ve 33 günlük periyotlarda bu oran %50 civarına düşmekle birlikte piklerde de kuyruklanma görülmeye başlamıştır. Bu durumun, elektrotların yüzeyinin oksitlenmesi neticesinde olabileceği sonucuna varılmıştır. Sonuçlardan da görüldüğü üzere KUG-Au elektrodun makul sürede kararlılığını koruduğu görülmüştür.

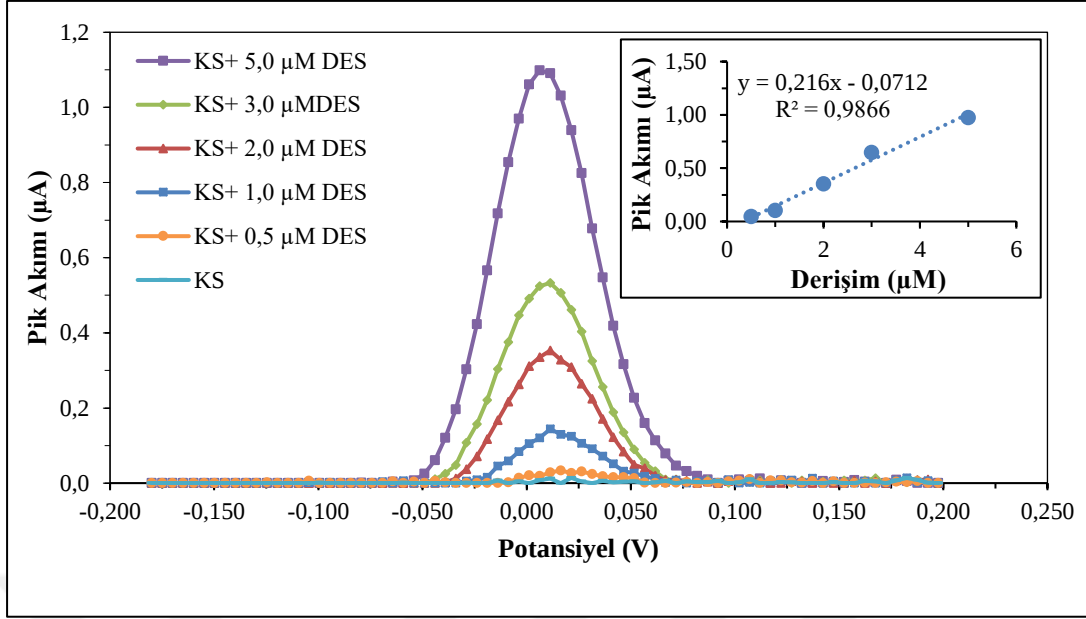


Şekil 4.17. KUG-Au elektrotlar ile 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda, DPV tekniği kullanılarak, -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında, 300 rpm karıştırma hızı ile 90 s temas süresi ve 10 µM DES varlığında 11 günlük periyotlarla alınan voltamogramlardaki akım değerlerinin zamana karşı grafiği

4.1.1.8. Gerçek örneklerde DES tayini

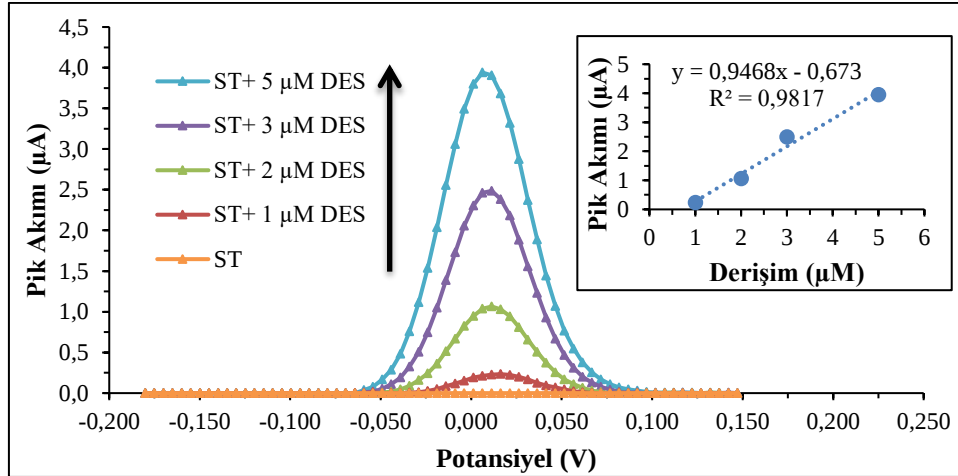
Hazırlanan modifiye elektrodun analite olan seçiciliğini değerlendirebilmek için modifiye elektrot ile matriks ortamında analitin tayin edilebilmesi önemli bir parametredir. Bu sebeple modifiye elektrodun gerçek örneklerde de DES tayinine imkan sağladığı su ve süt tozu gerçek örneklerinde analitin tayini gerçekleştirilerek geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

0,1 M fosfat tamponu içerisine 40 kat seyreltilerek eklenen keskin göleti suyu örneği içerisinde optimum koşullarda DPV yöntemiyle ortamda DES olmadan blank ölçümleri alınmış ve gerçek örneğin DES içermediği görülmüştür. Ancak ortama standart DES eklendiğinde 0,01 V gerilim değerinde analite ait yükseltgenme piki görülmüştür ve bu pik artan hacimlerde DES standardı eklenmesiyle birlikte cevabını arttırmıştır (Şekil 4.18). Bu sonuç doğrultusunda, DES'in keskin göleti suyu gerçek örneğinin matriks ortamından etkilenmediği söylenebilir. Keskin suyunun DES içermemesi sebebiyle örnek içerisine bilinen miktarlarda (0,5; 1,0 ve 2 µM) DES enjekte edilerek bu miktarın geri kazanımı araştırılmıştır (Çizelge 4.5). Elde edilen veriler %89,69-102,68 değerleri arasında geri kazanım sağlandığını göstermektedir.



Şekil 4.18. 0,1 M fosfat tamponu içerisinde 40 kat seyreltilerek eklenen keskin suyu gerçek örneği üzerine artan derişimlerde DES eklenmesi ile -0,18 V ile 0,2 V gerilim aralığında 90 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı parametrelerinde alınan DPV ölçüm sonuçları

0,1 M fosfat tamponu içerisinde 40 kat seyreltilerek eklenen süt tozu örneği içerisinde, optimum koşullarda DPV tekniğiyle alınan blank ölçümleri gerçek örneğin DES içermediğini göstermiştir. Ancak ortama standart DES eklendiğinde 0,01 V gerilim değerinde analite ait yükseltgenme piki görülmüştür ve bu pikin artan hacimlerde DES standardı eklenmesiyle birlikte arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.19). Süt tozunun DES içermemesi sebebiyle örnek içerisinde bilinen miktarlarda (0,5; 1,0 ve 2 µM) DES enjekte edilerek bu miktarın geri kazanım değeri araştırılmıştır (Çizelge 4.5). Geri kazanım çalışmaları sonucu elde edilen veriler yardımıyla geri kazanım miktarları %77,98-89,61 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.19. 0,1 M fosfat tamponu içerisinde 40 kat seyreltilerek eklenen süt tozu gerçek örneği üzerine artan derişimlerde DES eklenmesi ile -0,18 V ile 0,15 V gerilim aralığında 90 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı parametrelerinde alınan DPV ölçüm sonuçları

Çizelge 4.5. Keskin göleti suyu ve süt tozu gerçek örnekleri ile DES için optimum koşullarda gerçekleştirilen ölçümler sonucu bulunan geri kazanım değerleri

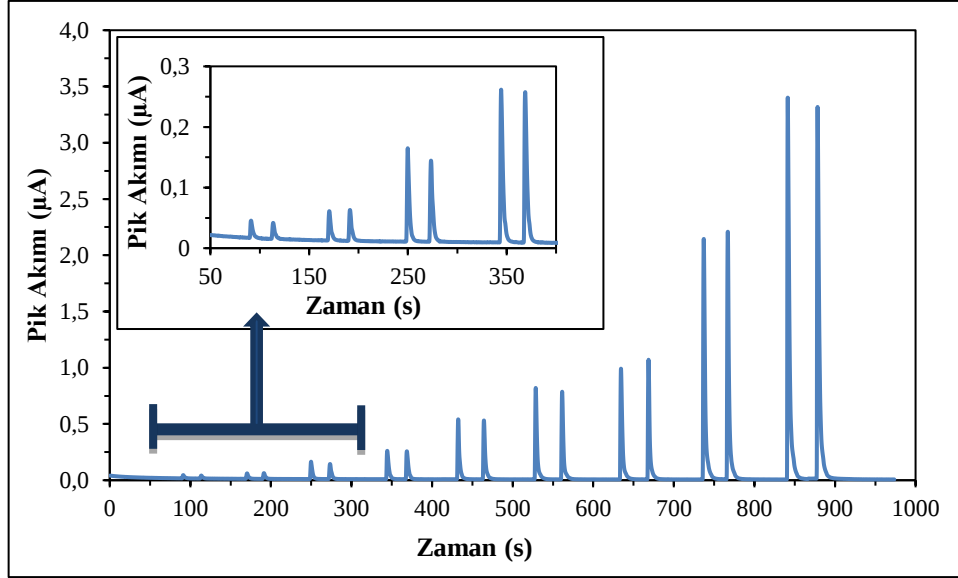
Örnek	Eklenen DES Derişimi (µM)	Bulunan DES Derişimi (µM)	% Geri Kazanım
Keskin suyu	0,5000	0,5134	102,6800
Keskin suyu	1,0000	1,0005	100,0500
Keskin suyu	2,0000	1,7939	89,6966
Süt Tozu	0,5000	0,4481	89,6151
Süt Tozu	1,0000	0,8007	80,0665
Süt Tozu	2,0000	1,5596	77,9842

Sonuç olarak, DES analiti su ve süt tozu gerçek örneklerinde matriks ortamından etkilenmeden tayin edilebileceği söylenebilir.

4.1.2. AEA-AD sistemi çalışmaları

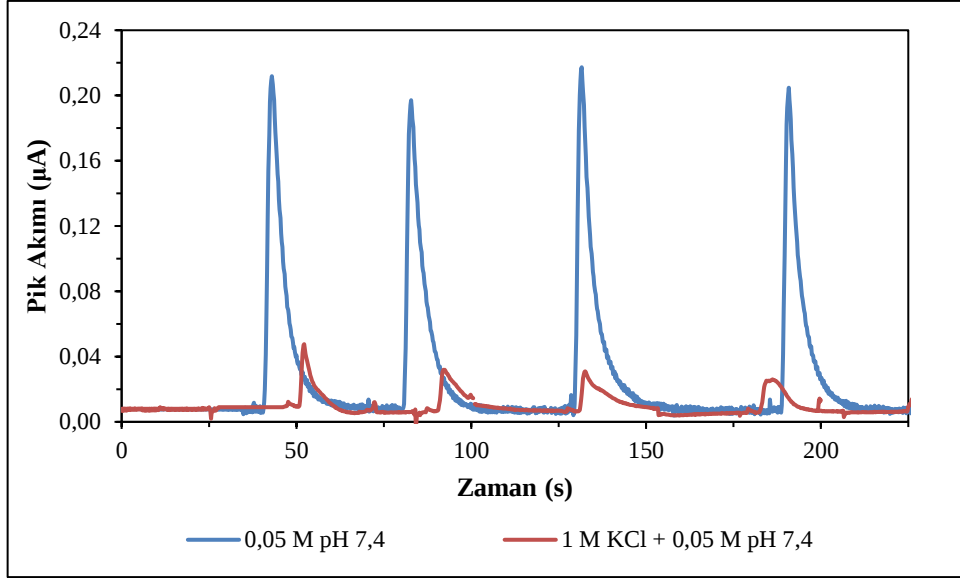
4.1.2.1. AEA-AD sisteminin kontrolü

AEA-AD sistemi deneyleri için kullanılacak hücre ve sistem özel olarak tasarlanarak deney ortamı oluşturulmuştur. Oluşturulan bu yeni sistemi test edebilmek amacıyla farklı derişimlerde hazırlanan $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ çözeltileri sisteme enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlar sonucu alınan akım zaman eğrileri Şekil 4.20’de verilmiştir. Akım zaman eğrilerinde de görüldüğü üzere, sistem artan derişime karşı artan akım cevabı vermiştir. Elde edilen bu grafik, deney için özel olarak hazırlanan bu yeni sistemin yeterli performansa sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.20. AEA-AD sisteminde KUG elektrot kullanılarak farklı derişimlerde $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ çözeltisi enjekte edilmesi sonucu elde edilen akım zaman eğrileri (Hareketli faz: 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, Uygulanan gerilim: 0,2 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Enjeksiyon hacmi: 20 µL)

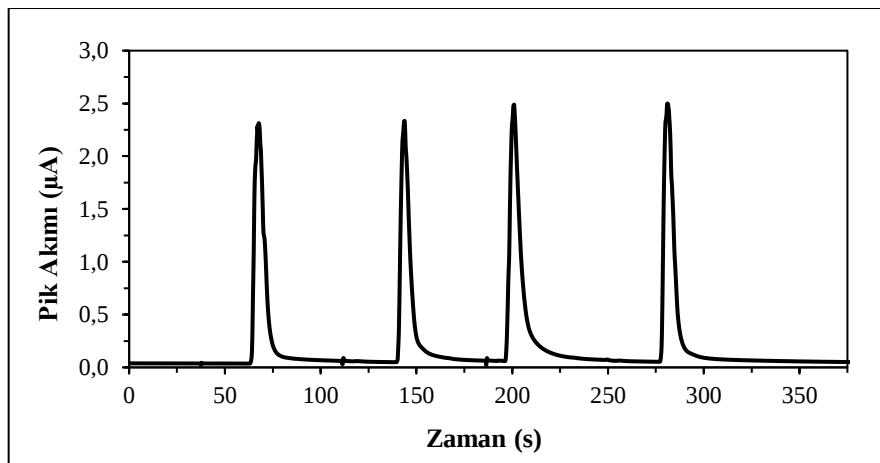
Hazırlanan yeni AEA-AD sisteminde Ag tel referans olarak kullanılmıştır. Fakat literatürde AEA-AD sistemleri için kullanılan hareketli faza KCl ilavesi ile ortamda Ag/AgCl referans elektrot oluşturularak deneyler gerçekleştirilmiştir [14], [87], [88]. Bu sebeple, ortama 1 M KCl ilave edilerek ortamda Ag/AgCl referans elektrot oluşturulmuş ve Ag tel ile Ag/AgCl referans elektrotların kullanıldığı sistemler karşılaştırılmıştır (Şekil 4.21). Elde edilen akım zaman eğrisi açıkça Ag tel kullanılan sistemin daha etkili olduğunu gösterdiğinden, deneyler ortama KCl ilavesi yapılmadan yalnızca Ag tel referans elektrot kullanılarak devam ettirilmiştir.



Şekil 4.21. AEA-AD sisteminde KUG elektrot kullanılarak $100 \mu\text{M}$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinin $0,05 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu ve 1 M KCl içeren $0,05 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu içerisine enjekte edilmesi sonucu elde edilen akım zaman eğrileri, (Uygulanan gerilim: $0,2 \text{ V}$, Akış hızı: $1,1 \text{ mL/dk}$, Enjeksiyon hacmi: $20 \mu\text{L}$)

4.1.2.2. AEA-AD sistemi ile DES tayininin araştırılması

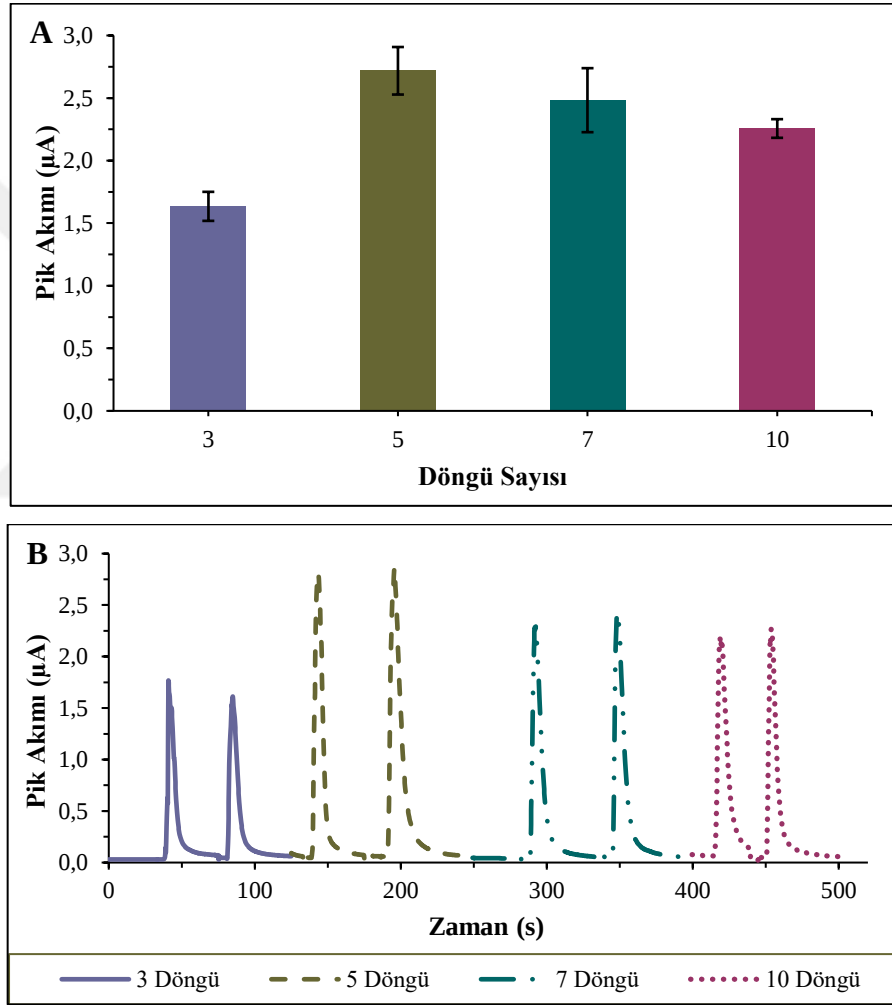
AEA-AD sisteminde, KUG-Au çalışma elektrodu kullanılarak tekrarlı $5 \mu\text{M}$ DES enjekte edilmesi sonucu elde edilen akım zaman eğrilerinde DES'e ait pikler Şekil 4.22'de görülmektedir.



Şekil 4.22. AEA-AD sisteminde KUG-Au(5D) elektrodun kullanılarak tekrarlı $5 \mu\text{M}$ DES enjeksiyonu ile elde edilen akım zaman eğrisi. (Hareketli faz: $0,05 \text{ M}$ pH 10 fosfat tamponu, Gerilim: $0,2 \text{ V}$, Akış hızı: $1,1 \text{ mL/dk}$, Enjeksiyon hacmi: $20 \mu\text{L}$)

AEA-AD sistemi ile DES tayini için döngü sayısı optimizasyonu

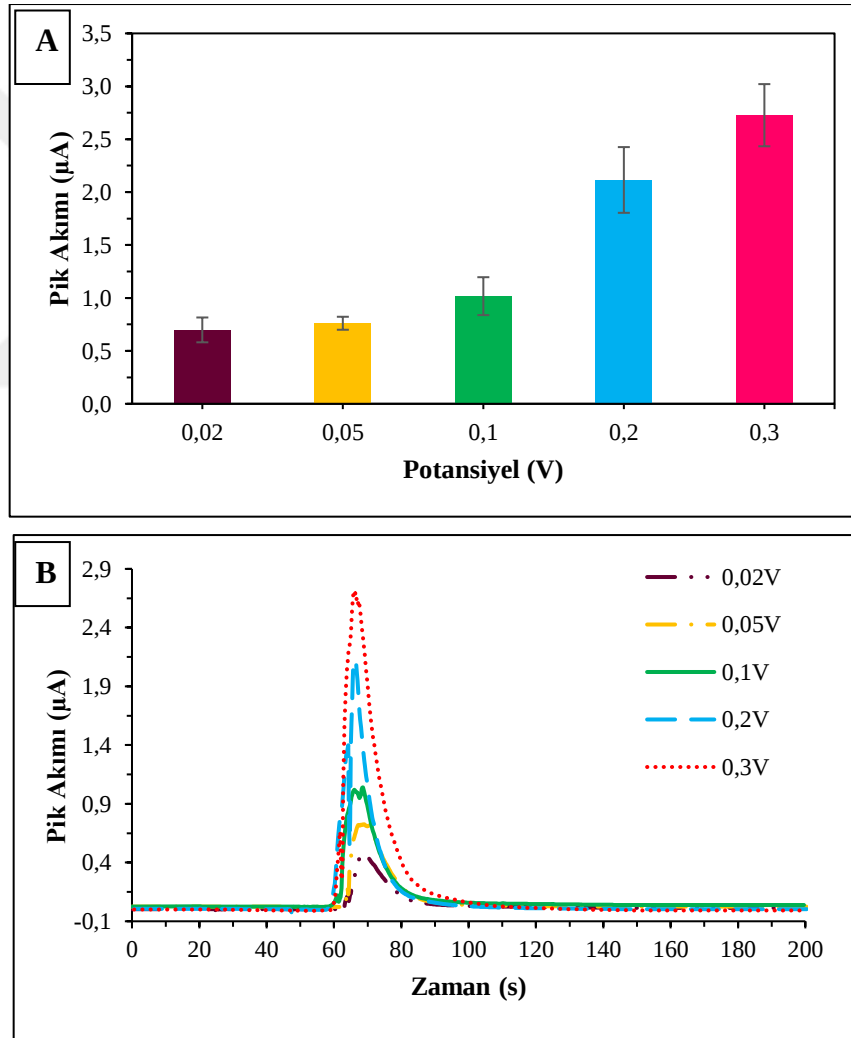
AEA-AD sisteminde çalışma elektrotu olarak farklı döngü sayılarında hazırlanmış KUG-Au (3, 5, 7, 10 döngü) elektrotlar kullanılarak, 5 μM DES enjeksiyonu ile elde edilen akım değerleri ile döngü sayısına karşı grafiği ve akım zaman eğrileri Şekil 4.23’de verilmiştir. Elde edilen sütun grafiğinde ve akım-zaman eğrisinde en yüksek cevap 5 döngü hazırlanan elektrot kullanılmasıyla elde edilmiş ve optimum olarak 5 döngü seçilmiştir.



Şekil 4.23. AEA-AD sisteminde farklı döngülerde hazırlanan KUG-Au çalışma elektrotlarının kullanılmasıyla sisteme 5 μM DES enjeksiyonu sonucu elde edilen A) pik akımları sütun grafiği, B) akım zaman eğrileri (Gerilim: 0,2 V, Akış Hızı: 1,1 mL/dk, Hareketli faz: 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, Enjeksiyon hacmi: 20 μL).

AEA-AD sistemi ile DES tayini için gerilim optimizasyonu

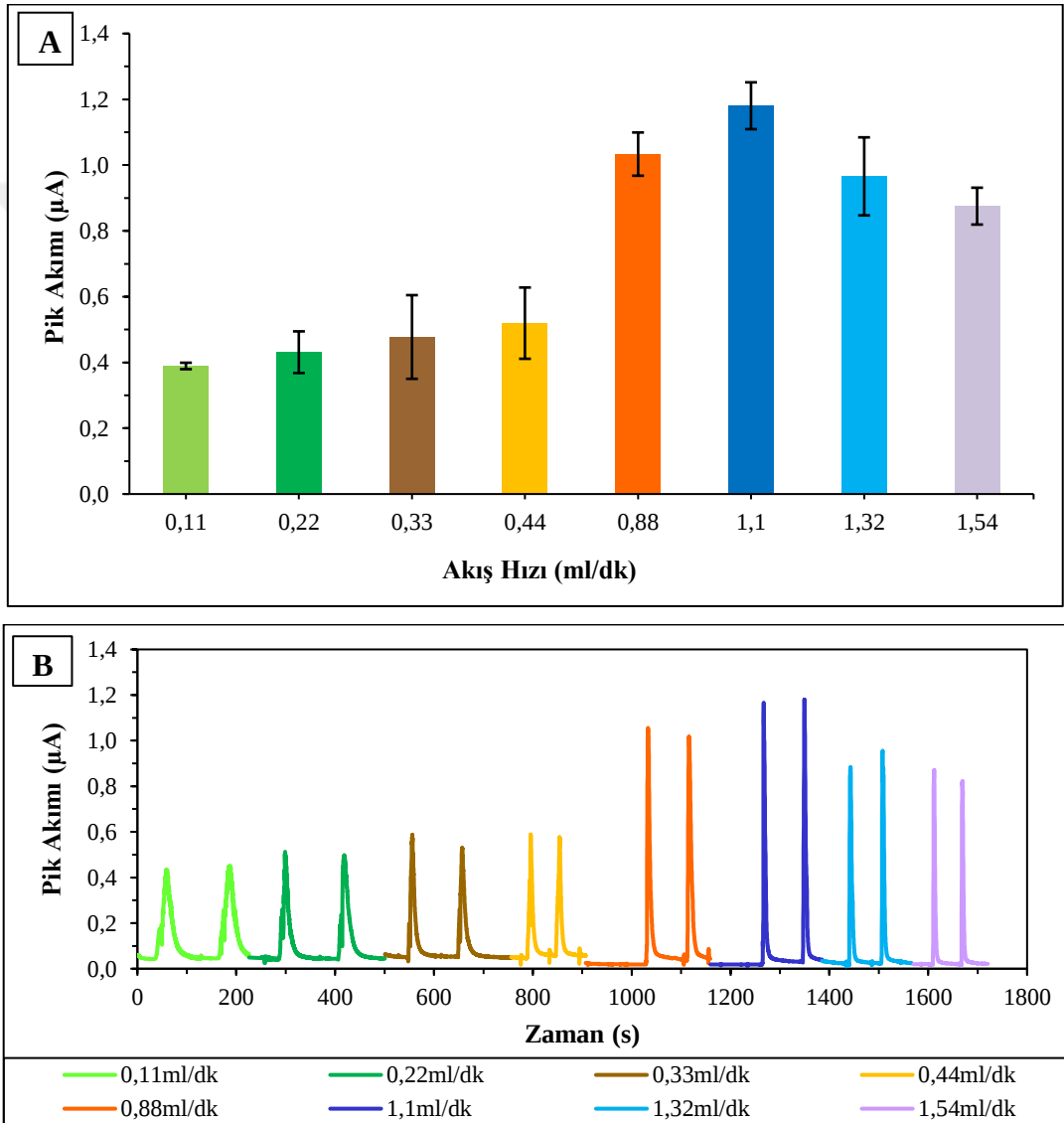
AEA-AD sisteminde hareketli faz olarak 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, çalışma elektrotu olarak 5 döngü altın kaplanarak hazırlanan KUG-Au(5D) elektrot, akış hızı 0,8 mL/dk ve 5 μ M DES enjeksiyonu ile farklı gerilimlerde analizler gerçekleştirilerek optimum gerilim değerinin 0,2 V olduğuna karar verilmiştir. En yüksek cevap 0,3 V gerilim değerinde elde edilmesine karşın, gerilim değerinin artmasıyla oluşabilecek girişimleri azaltmak amacıyla optimum değer olarak 0,2 V değeri seçilmiştir. Ayrıca, Şekil 4.24’de gösterilen grafikler incelendiğinde akım artışının en fazla 0,2 V değerinde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.24. AEA-AD sisteminde farklı gerilimlerin uygulanmasıyla, 5 μ M DES enjeksiyonu sonucu elde edilen A) pik akımları sütun grafiği, B) akım zaman eğrileri (Akış Hızı: 0,8 mL/dk, Hareketli faz: 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, Enjeksiyon hacmi: 20 μ L, Çalışma elektrodu: KUG-Au(5D))

AEA-AD sistemi ile DES tayini için akış hızı optimizasyonu

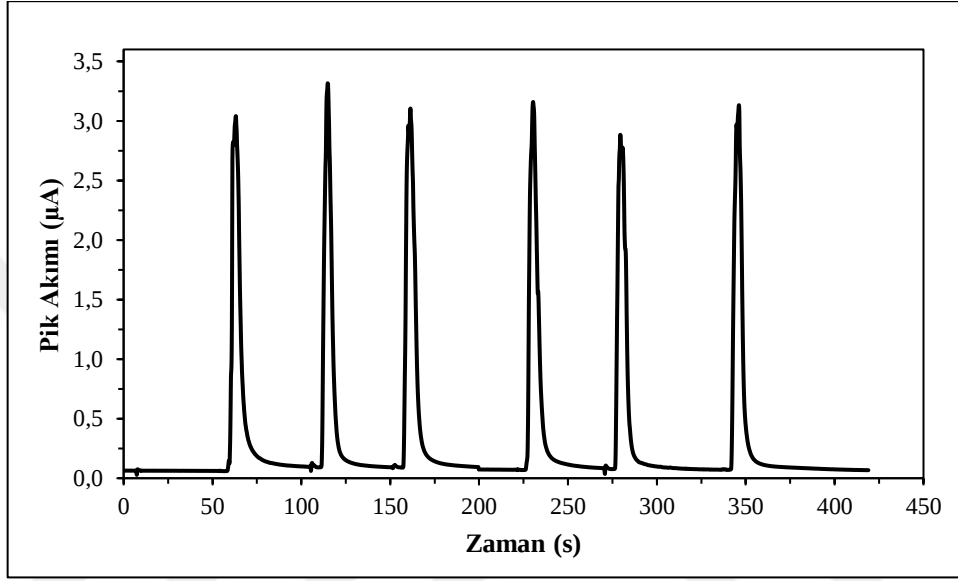
AEA-AD sisteminde KUG-Au(5D) çalışma elektrodu ile, 0,2 V gerilim ve 0,05 M pH 10 fosfat tamponu hareketli fazında farklı akış hızlarında ölçümler alınarak optimum akış hızına karar verilmiştir. Şekil 4.25’de verilen grafiklerde de görüldüğü gibi en yüksek cevabın 1,1 mL/dk akış hızında elde edilmesi sebebiyle optimum akış hızı olarak 1,1 mL/dk seçilmiştir.



Şekil 4.25. AEA-AD sisteminde farklı akış hızlarında 5 μM DES enjeksiyonu sonucu elde edilen A) pik akımları sütun grafiği, B) akım zaman eğrileri (Gerilim: 0,2 V, Hareketli faz: 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, Enjeksiyon hacmi: 20 μL , Çalışma elektrodu: KUG-Au(5D))

AEA-AD sistemi ile DES tayininin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi

0,05 M pH 10 fosfat tamponu hareketli fazı ile optimum koşullarda, 5 μ M DES enjeksiyonunun altı kez yapılması ile alınan ölçümler sonucu oluşturulan akıma karşı zaman grafiği sonuçların tekrarlanabilir olduğunu Şekil 4.26'da göstermiştir bununla birlikte, RSD değeri %4,5718 olarak hesaplanmıştır.



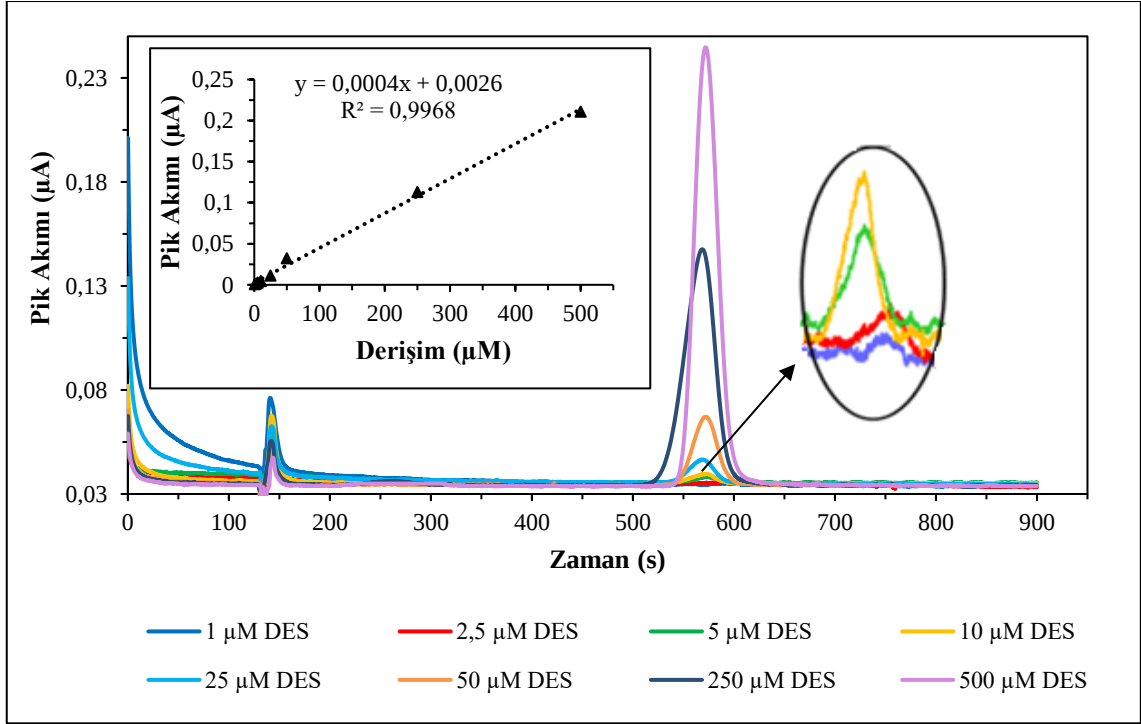
Şekil 4.26. AEA-AD sisteminde optimum koşullarda altı kez 5 μ M DES enjeksiyonu sonucu elde edilen akım zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: KUG-Au(5D), Gerilim: 0,2 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Hareketli faz: 0,05 M pH 10 fosfat tamponu, Enjeksiyon hacmi: 20 μ L)

4.1.2.3. AEA-AD sisteminin sıvı kromatografide dedektör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen DES analizleri

DES'in tayininin daha duyarlı tayin edilmesini sağlamak amacıyla AEA-AD sistemine C₁₈ kolon dahil edilmiştir (AEA-AD+C₁₈). C₁₈ kolon sayesinde analitin ayrımının daha seçici yapılarak daha hassas ve duyarlı sonuçların elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda AEA-AD+C₁₈ sisteminde deneyler gerçekleştirilmiştir.

AEA-AD+C₁₈ sisteminin kalibrasyonu

AEA-AD+C₁₈ sisteminde, HPLC analizleri sonucu seçilen hareketli faz olarak %70 CH₃OH:%30 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v) kullanılmasıyla, 1,1 mL/dk akış hızı parametrelerinde KUG-Au(5D) çalışma elektrodu kullanılan sisteme farklı derişimlerde DES çözeltilerinin enjekte edilmesi sonucu alınan voltamogramlar Şekil 4.27’de gösterilmektedir. Bu sonuçlar ile kalibrasyon grafiğı çizildiğinde 1 ve 500 µM DES derişim aralığında bir doğrusallık elde edildiğı Şekil 4.27’nin içerisindeki grafikte gösterilmiştir. LOD değeri 0,2327 µM ve LOQ değeri ise 0,7756 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.27. AEA-AD+C₁₈ sisteminde optimum koşullarda 1 ve 500 µM DES aralığında artan derişimlerde DES enjeksiyonu sonucu elde edilen akım zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: KUG-Au(5D), Gerilim: 0,2 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Hareketli faz: %70 CH₃OH:%30 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v), Enjeksiyon hacmi: 20 µL)

AEA-AD+C₁₈ sisteminde gerçek örnek analizleri

Gerçek örnek olarak seçilen su, süt tozu ve süt örneklerine standart ekleme yöntemi kullanılarak DES eklenmesi sonucu analizler hareketli fazın %70 CH₃OH:%30 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v), olduğu 1,1 mL/dk akış hızı koşulları ve HPLC cihazında 241,16 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Gerçek örneklerde %89,01-102,9 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. Analizler, AEA-AD+C₁₈ sistemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla HPLC cihazı ile de yapılarak sonuçlar Çizelge 4.6'da karşılaştırılmıştır. DES tayini için kullanılan AEA-AD+C₁₈ ve HPLC yöntemlerine ait sonuçların farklarını ortaya koymak için Minitab 19 programı kullanılarak t testi uygulanmıştır. Her iki yöntem için aynı konsantrasyonlarda yapılan geri kazanım deneylerinin sonuçları kullanılmış olup, analiz sonucunda AEA-AD+C₁₈ ($\bar{x}$ =10,43; SS=6,76) ve HPLC ($\bar{x}$ =10,68; SS=6,90) yöntemleri arasında $p>0,05$ ($p=0,946$) olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çizelge 4.6. Keskin göleti suyu, süt ve süt tozu gerçek örnekleri ile DES için optimum koşullarda gerçekleştirilen ölçümler sonucu bulunan geri kazanım değerleri

Örnek	AEA-AD+C ₁₈ sistemi			HPLC (UV dedektör kullanılan sistem)		
	Eklenen DES Derişimi (µM)	Bulunan DES Derişimi (µM)	% Geri Kazanım	Eklenen DES Derişimi (µM)	Bulunan DES Derişimi (µM)	% Geri Kazanım
Süt	5,0000	5,0783	101,5667	5,0000	5,1700	103,4000
Süt	10,0000	9,8867	98,8667	10,0000	8,9500	89,5000
Süt	20,0000	19,0856	95,4278	20,0000	20,9000	104,5000
Süt Tozu	5,0000	4,6040	92,0800	5,0000	4,6400	92,8140
Süt Tozu	20,0000	20,5800	102,9000	20,0000	19,2600	96,3230
Su	5,0000	4,8510	97,0200	5,0000	4,5430	90,8590
Su	10,0000	8,9100	89,1000	10,0000	11,3150	113,1460

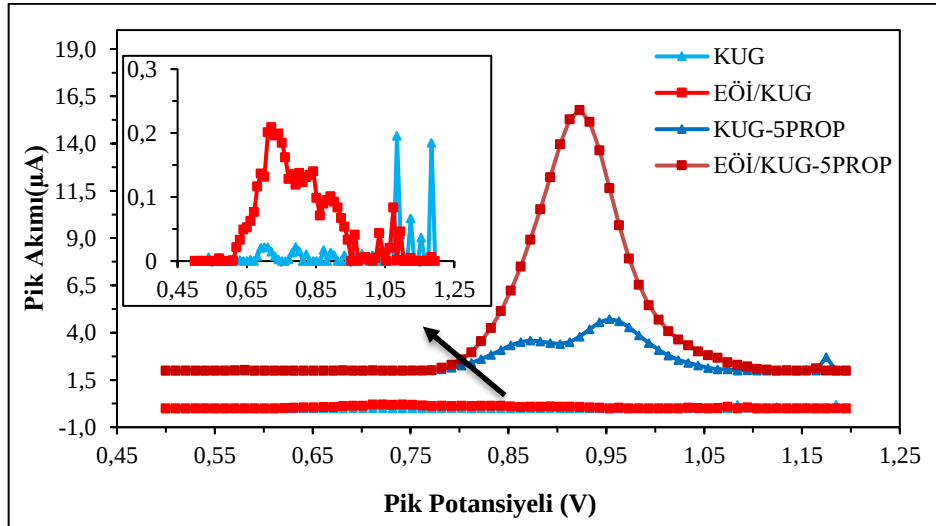
4.2. PROP Tayinine Yönelik Gerçekleştirilen Deneysel Çalışmalar

4.2.1. Voltametrik çalışmalar

4.2.1.1. EÖİ/KUG elektrodun PROP yükseltgenmesi üzerindeki elektrokatalitik etkisi

KUG elektroduna 0,1 M pH 10 fosfat tamponunda dönüşümlü voltametri tekniği ile 0,5;1,4 V gerilim aralığında 50 mV/s tarama hızında 3 döngü tarama yapılmasıyla elektrokimyasal ön işlem uygulanmış ve bu yolla modifiye edilen elektrotlar EÖİ/KUG olarak adlandırılmıştır.

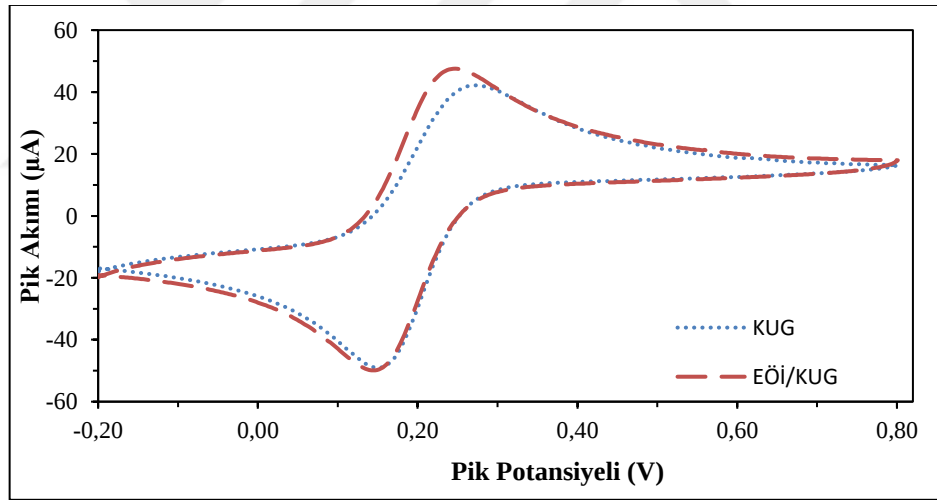
Şekil 4.28’de modifiye edilmemiş KUG elektrot ve elektrokimyasal ön işlem uygulanmış EÖİ/KUG elektrot ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV tekniğiyle 5 μ M PROP varlığında ve yokluğunda alınan voltamogramlar gösterilmiştir. Alınan voltamogramlar incelendiğinde yapılan işlem ile elektrot yüzeyinde bir iyileşme sağlandığı ve modifiye elektrodun PROP varlığında 0,923 V gerilim değerinde yükseltgenme piki verdiği görülmektedir. KUG elektrot analit için ikili ve daha düşük akım değerinde bir pik verirken EÖİ/KUG elektrot daha yüksek akım değerinde ve tek bir pik vermiştir. KUG elektrot için pik akım değeri (2,7144 μ A) ve EÖİ/KUG elektrot için elde edilen pik akım değeri (13,779 μ A) karşılaştırıldığında modifiye elektrodun 5,0763 kat daha yüksek cevap verdiği görülmüştür.



Şekil 4.28. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde KUG ve EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,5 V ile 1,2 V gerilim aralığında 60 s temas süresi, 300 rpm karıştırma hızı ile 5 μ M PROP varlığında ve yokluğunda alınan DPV ölçümleri

4.2.1.2. EÖİ/KUG elektrodun karakterizasyonu

Şekil 4.29’da EÖİ/KUG elektrot ve KUG elektrot ile 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ve 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde elde edilen voltamogramlar gösterilmiştir. Voltamogramlarda görülen piklerin gerilim ve akım değerleri Çizelge 4.7.’de görülmektedir. KUG ve EÖİ/KUG elektrotlar için voltamogramlar ve sayısal değerleri incelendiğinde EÖİ/KUG elektrodun indirgenme pikinin 0,01 V sola kaydığı, akım değerleri arasında ise 1,2 μA fark olduğu ve yükseltgenme piklerine bakıldığında EÖİ/KUG elektrodun 0,02 V sola kaydığı, akım değerleri arasında ise 6,3 μA fark olduğu görülmektedir. Meydana gelen bu farklar elektrot yüzeyinin modifiye edildiğini göstermektedir. Aynı zamanda her bir elektrodun anodik ve katodik piklerinin potansiyel değerlerinin farklarına bakıldığında modifiye elektroda ait fark daha azdır. Bu da elektrokimyasal ön işlem uygulanmasıyla elektrodun elektron aktarım hızının arttığını göstermektedir.

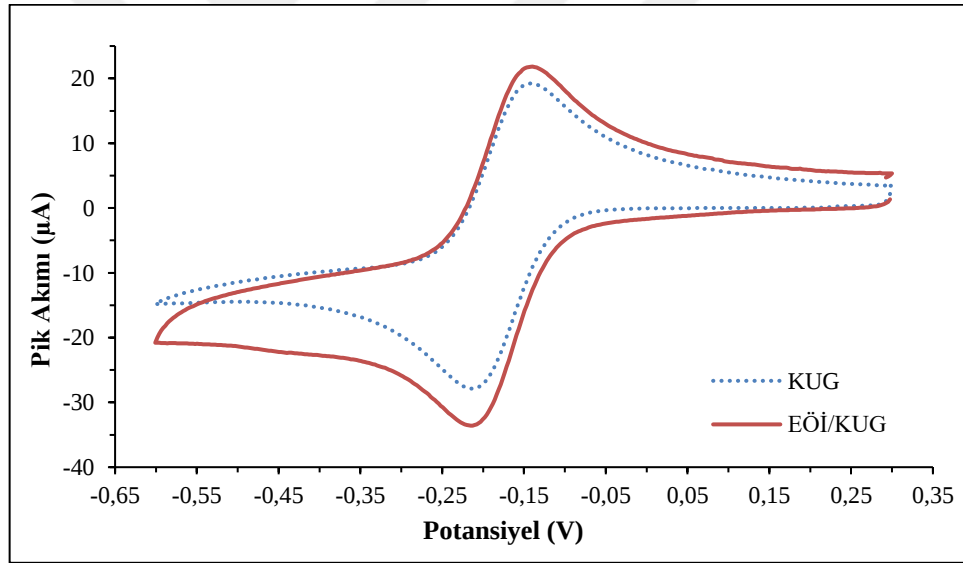


Şekil 4.29. 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ve 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde -0,2 V ile 0,8 V gerilim değerleri arasında 60 s temas süresi ile 300 rpm karıştırma hızında ve 50 mV/s tarama hızında EÖİ/KUG ve KUG ile alınan DV ölçümleri

Çizelge 4.7. 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ve 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde EÖİ/KUG ve KUG ile alınan DV ölçüm sonuçları

	Yükseltgenme		İndirgenme		E_a-E_k
	Potansiyel (V)	Akım (μA)	Potansiyel (V)	Akım (μA)	
KUG	0,26642	43,89	0,15656	-51,732	0,10986
EÖİ/KUG	0,242	50,19	0,14679	-50,585	0,09521

Şekil 4.30'da EÖİ/KUG elektrot ve KUG elektrot ile 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 0,3 V ile -0,6 V gerilim değerleri arasında elde edilen voltamogramlar verilmiştir. Voltamogramlarda görülen indirgenme ve yükseltgenme piklerinin gerilim ve akım değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir. KUG ve EÖİ/KUG elektrotlar için voltamogramlar ve sayısal değerler incelendiğinde EÖİ/KUG elektrodun indirgenme pikinin 0,00245 V sola kaydığı, akım değerleri arasında ise 2,577 μA fark olduğu ve yükseltgenme piklerine bakıldığında elektrotların aynı potansiyelde pik verdiği fakat modifiye elektrodun akım değerini 1,858 μA arttırdığı görülmektedir. Meydana gelen bu farklar elektrot yüzeyinde bir değişim meydana geldiğini doğrulamaktadır. Her bir elektrodun sahip olduğu anodik ve katodik piklerin gerilim değerleri farkları alındığında modifiye elektrotta daha az fark olması ise modifiye elektrodun elektron aktarım hızını arttırdığını desteklemektedir.



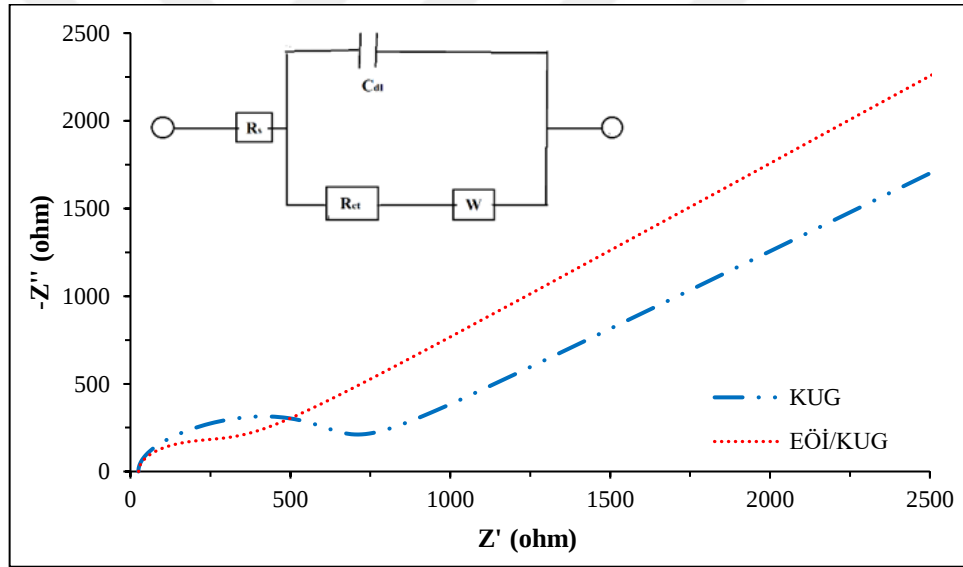
Şekil 4.30. 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 0,3 V ile -0,6 V gerilim değerleri arasında 50 mV/s tarama hızında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında EÖİ/KUG ve KUG ile alınan DV ölçümleri

Çizelge 4.8. 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde EÖİ/KUG ve KUG ile alınan DV ölçüm sonuçları

	Yükseltgenme		İndirgenme		$E_a - E_k$
	Potansiyel (V)	Akım (μA)	Potansiyel (V)	Akım (μA)	
KUG	-0,14435	24,699	-0,21027	-23,086	0,06592
EÖİ/KUG	-0,14435	26,557	-0,20782	-25,663	0,06347

Empedans ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi

Şekil 4.31’de 2,5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde EÖİ/KUG ve KUG elektrotlar ile açık devre potansiyeli olan 0,125 V gerilim değerinde alınan ölçümler ve Randles devresinin kullanılmasıyla oluşturulan Nyquist eğrileri verilmiştir. Eğrilere bakıldığında ön işlem uygulanmış EÖİ/KUG elektrot için verilen eğrinin çapının KUG elektroda göre daha küçük olduğu görülmektedir, bu küçülme modifiye elektrodun elektron aktarım hızını arttırdığını göstermektedir. Aynı zamanda Çizelge 4.9’ da yük transfer dirençleri incelendiğinde KUG için 578,6 Ω , EÖİ/KUG için ise 251,2 Ω değerleri görülmektedir, modifiye elektrodun R_{ct} değerinin KUG elektroda göre daha düşük olması elektron aktarım hızının daha yüksek olduğunu desteklemektedir.



Şekil 4.31. 2,5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde EÖİ/KUG ve KUG elektrotlar ile açık devre potansiyeli olan 0,125 V gerilim değerinde alınan EİS ölçümleri ile elde edilen Nyquist eğrileri

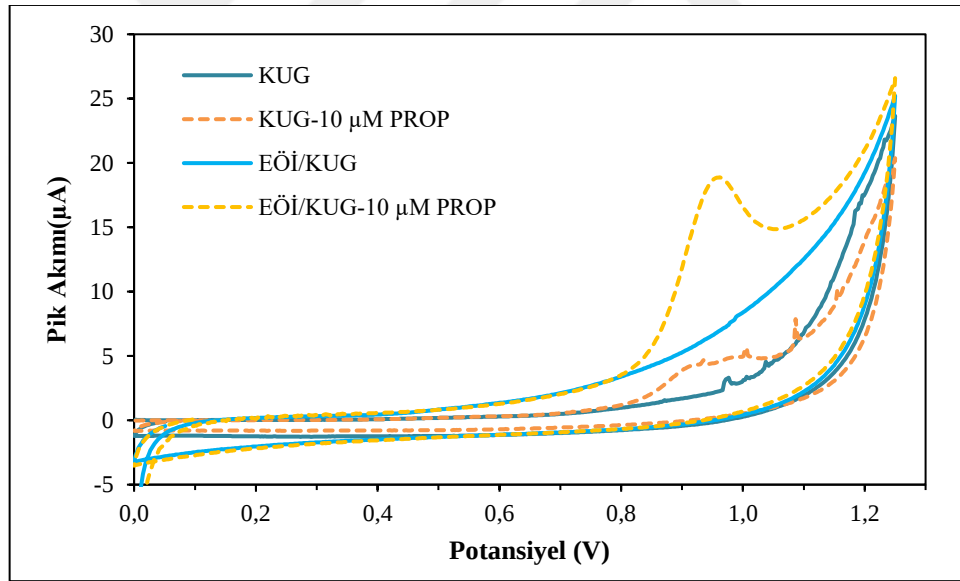
Çizelge 4.9. Alınan EİS ölçümünün fit edilmesi sonucu elde edilen devre elemanları değerleri

	R_{ct} (Ω)	R_s (Ω)	C_{dl} (F)	W
KUG	578,6	24,8	$1,029 \times 10^{-6}$	0,0004084
EÖİ/KUG	251,2	25,38	$5,653 \times 10^{-6}$	0,0004613

EİS ölçüm sonuçları ile $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisi ve $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ çözeltisinde alınan ölçümlerde elektron aktarım hızının arttığını gösteren ve birbirini destekleyen sonuçlar elde edilmiştir.

4.2.1.3. EÖİ/KUG elektrodun PROP varlığında elektrokimyasal davranışının incelenmesi

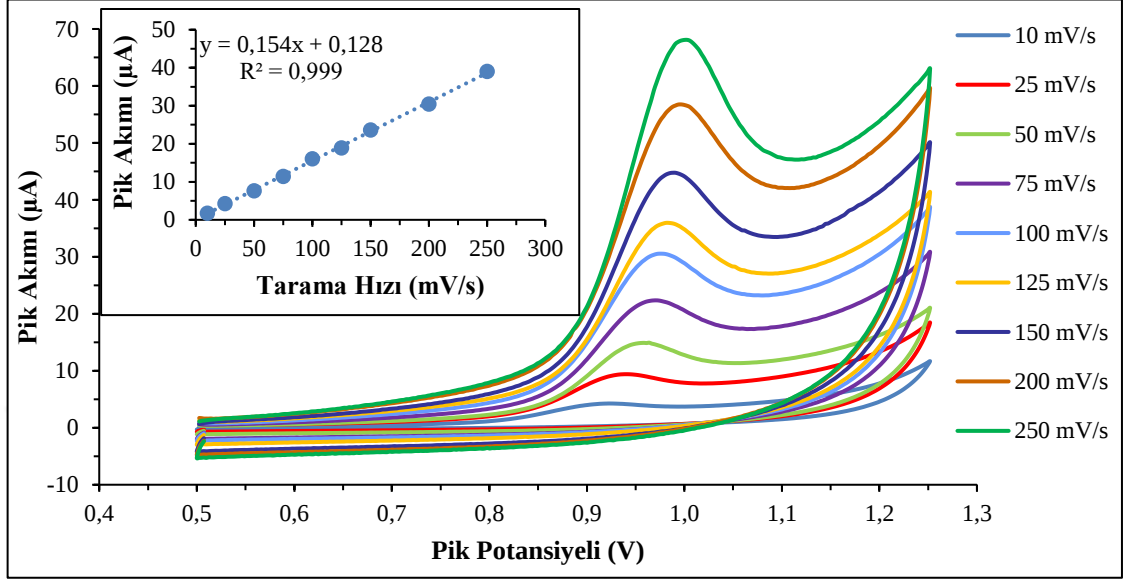
Şekil 4.32’de 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0 V ve 1,2 V gerilim aralığında, 10 μM PROP varlığında ve yokluğunda DV tekniğiyle EÖİ/KUG ve KUG ile alınmış voltamogramlar verilmiştir. Voltamogramlar incelendiğinde ortama analit eklenmediğinde EÖİ/KUG elektrodun elektroaktivitesi mevcut değildir. Ortama analit eklendikten sonra KUG ve EÖİ/KUG elektrotlar ile yapılan ölçümlerde sırasıyla 1,4255 μA ve 8,1585 μA pik akım değerleri elde edilmiştir. Bu da modifikasyonun elektrodun PROP’a karşı cevabını iyileştirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.32. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0 V ve 1,2 V gerilim aralığında EÖİ/KUG ve KUG elektrotlar ile 10 μM PROP varlığında ve yokluğunda 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında elde edilen döngüsel voltamogramlar

Şekil 4.33’de EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 10 μM PROP varlığında farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 mV/s) ölçümler alınmıştır. Alınan sonuçlar pik akım değerlerinin tarama hızının artmasıyla birlikte doğrusal olarak arttığını ve grafiğe geçirildiğinde R^2 değerinin 0,999

olduğunu göstermektedir. Bu sonuca bakılarak elektrot ve analit arasındaki etkileşimin adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır.

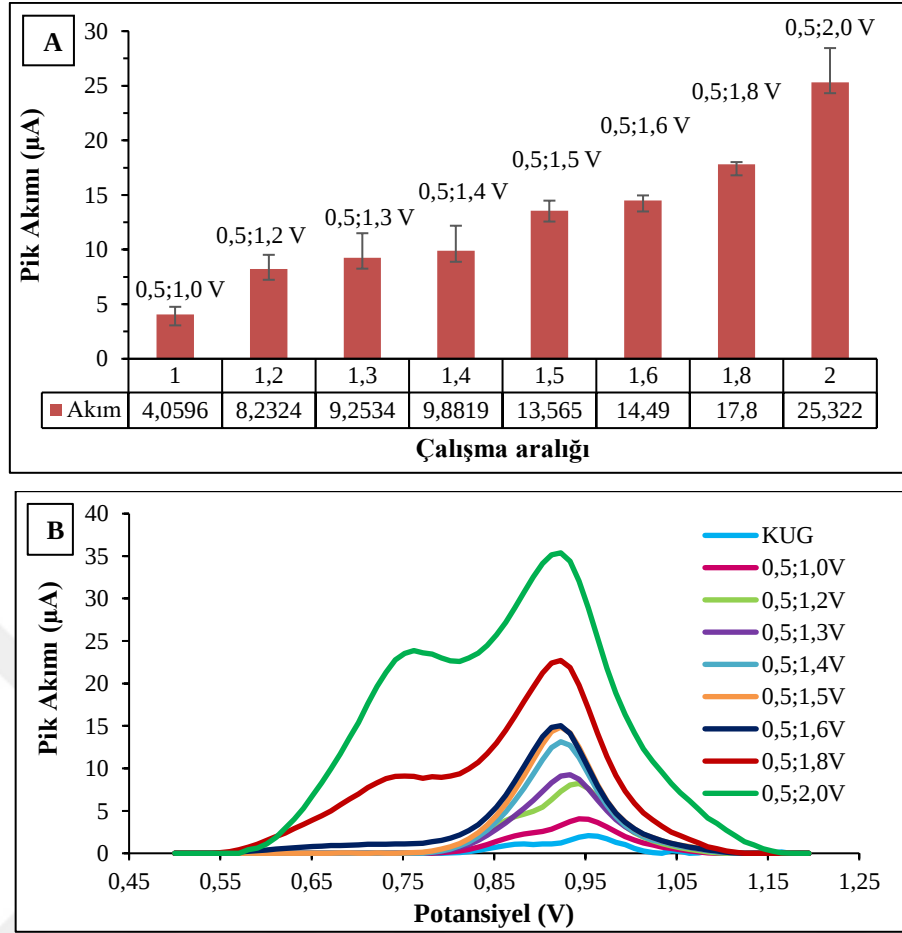


Şekil 4.33. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,5 V ile 1,25 V gerilim aralığında, 10 µM PROP varlığında, 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile farklı tarama hızlarında EÖİ/KUG elektrotlar ile alınan voltamogramlar

4.2.1.4. EÖİ/KUG elektrodunun hazırlanma koşullarının optimizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi

Ön işlem için optimum gerilim aralığının belirlenmesi

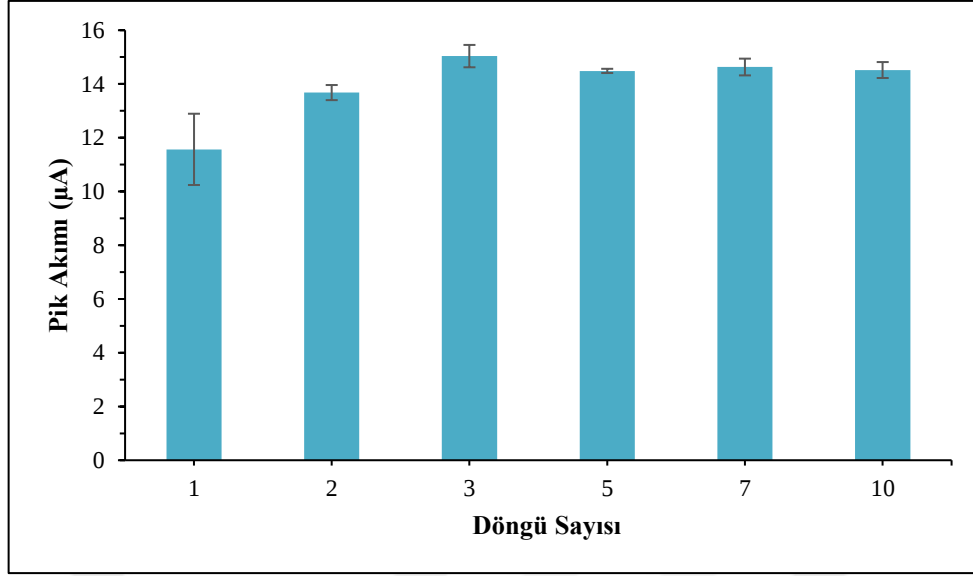
0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde, farklı gerilim aralıklarında hazırlanan elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 5 µM PROP varlığında alınan voltamogramlar ve pik akımları kullanılarak oluşturulan sütun grafikleri Şekil 4.34'de verilmiştir. Şekil 4.34.A incelendiğinde ön işlem için kullanılan gerilim aralığı arttıkça pik akımlarında arttığı görülmüştür. Ancak Şekil 4.34.B incelendiğinde ise voltamogramlar gerilim arttıkça piklerin kuyruklanmaya başladığını ve sonunda ikili piklere dönüştüğünü göstermektedir. Pik akımlarının, gerilim aralığının artmasıyla birlikte artmasına karşın voltamogramlarda görülen bu kuyruklanmalar sebebiyle optimum çalışma aralığı olarak 0,5 V ile 1,4 V gerilim aralığı seçilmiştir.



Şekil 4.34. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, farklı gerilim aralıklarında, 2 döngü hazırlanan elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV yöntemiyle 0,5;1,2 V gerilim aralığında, 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında, 5 µM PROP varlığında gerçekleştirilen ölçümlerden elde edilen A) sütun grafiği, B) voltamogramlar

Optimum döngü sayısının belirlenmesi

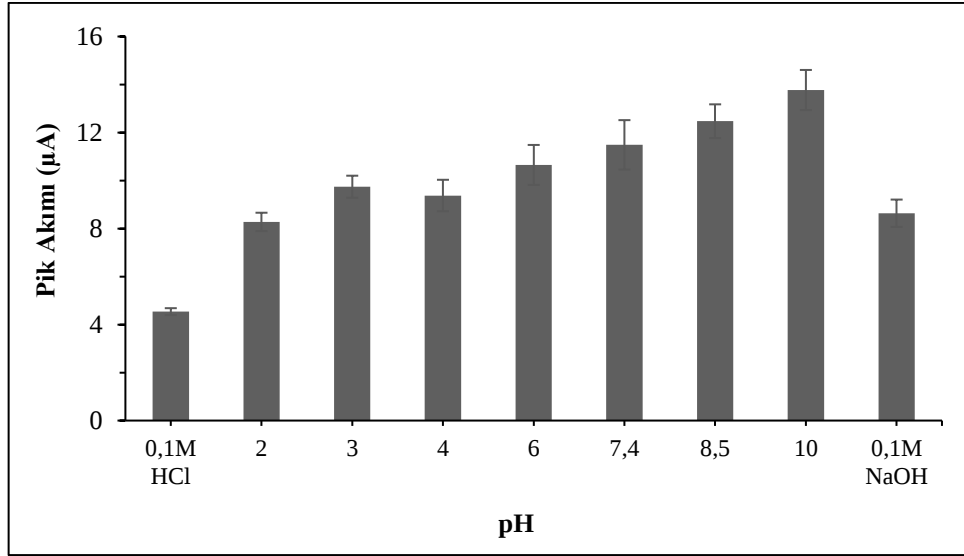
0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda DV tekniği ile farklı döngü sayılarında hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda 5 µM PROP varlığında gerçekleştirilen DPV ölçümlerinden elde edilen pik akımları Şekil 4.35’de verilmiştir. Grafikten de açıkça görüldüğü gibi 0,5 V ile 1,4 V gerilim aralığında 3 döngü koşullarında hazırlanan elektrotlar ile en yüksek pik akım cevapları elde edilmiştir, dolayısıyla optimum olarak 3 döngü seçilmiştir.



Şekil 4.35. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, DV tekniği ile 0,5;1,4 V gerilimde 50 mV/s tarama hızında ve farklı döngü sayılarında hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda 5 µM PROP varlığında DPV tekniği ile 0,5;1,2 V gerilim aralığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında alınan ölçüm sonuçları

Optimum ön işlem çözeltisinin belirlenmesi

0,1 M farklı pH'larda hazırlanan fosfat tamponları, 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH çözeltileri içerisinde DV tekniği ile hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 5 µM PROP varlığında DPV tekniği ile ölçümler alınarak elde edilen sonuçlar Şekil 4.36'da verilmiştir. Çizilen sütun grafiği incelendiğinde en yüksek pik akım değerinin pH 10 fosfat tamponu içerisinde alındığı görülmektedir, dolayısıyla optimum ön işlem çözeltisi olarak 0,1 M pH 10 fosfat tamponu seçilmiştir.

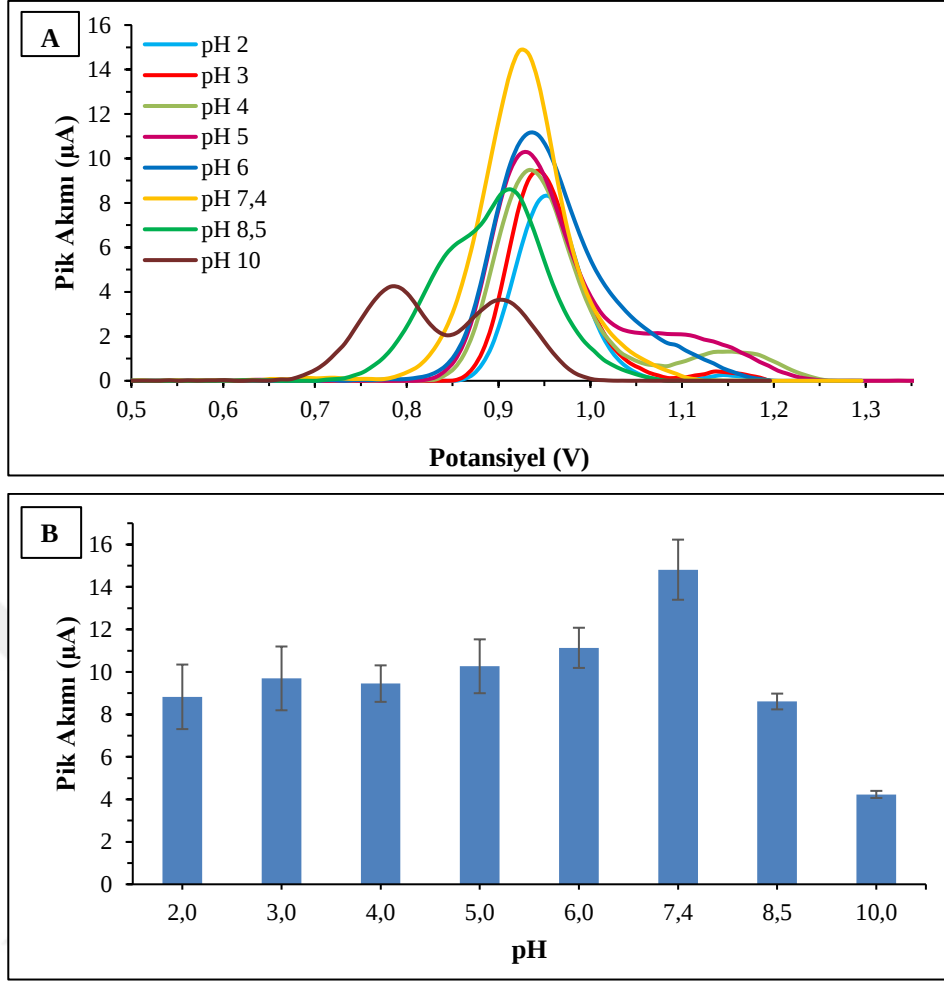


Şekil 4.36. 0,1 M farklı pH'larda hazırlanan fosfat tamponları, 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH çözeltileri içerisinde 0,5 V ve 1,4 V gerilim değerleri arasında 50 mV/s tarama hızında 3 döngü DV tekniği ile hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 5 µM PROP varlığında DPV tekniği ile 0,5;1,2 V gerilim aralığında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızında alınan ölçümler elde edilen pik akımlarının pH'ya karşı sütun grafiği

4.2.1.5. EÖİ/KUG elektrodunun PROP tayini için ölçüm koşullarının optimizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi

Ölçüm pH'sının optimizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi

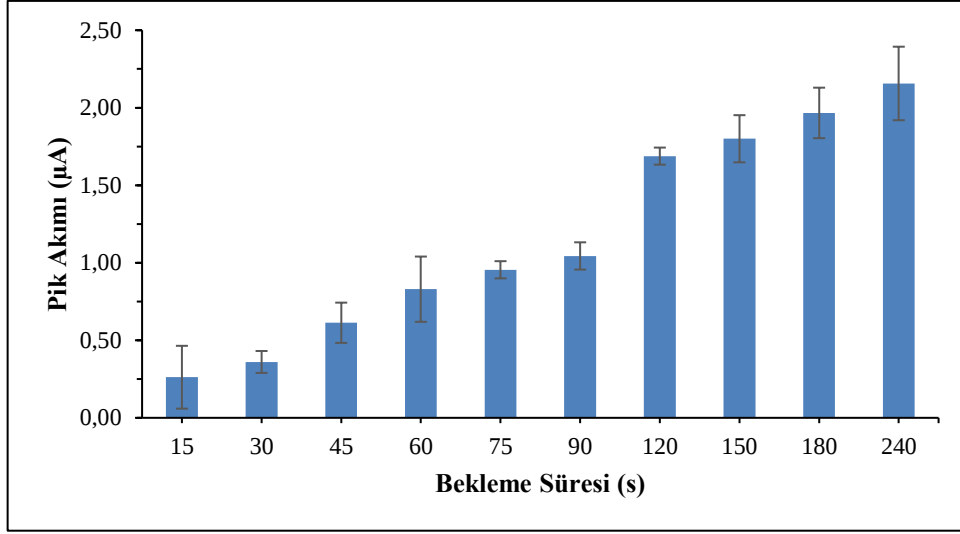
Optimum koşullarda hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M farklı pH'larda hazırlanmış fosfat tamponlarında 5 µM PROP varlığında DPV tekniği ile elde edilen voltamogramlar Şekil 4.37A'da verilmiştir. Alınan pik akımlarının pH'ya karşı grafiği Şekil 4.37B'de verilmiştir. Çizilen sütun grafiği incelendiğinde en yüksek cevabın pH 7,4 fosfat tamponunda elde edildiği, daha düşük pH'lara ve daha yüksek pH'lara doğru gidildiğinde ise elektrodun cevabının azaldığı gözlenmiştir. Voltamogramlar incelendiğinde pH'nın artmasıyla analite ait pik potansiyelinin sol tarafa kaydığı gözlenmiş, bununla birlikte pH 7,4'den daha küçük pH'larda piklerde sağa doğru kuyruklanma görülürken, daha yüksek pH'larda ikili pik oluşturma eğiliminde olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, optimum ölçüm çözeltisi olarak 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu seçilmiştir.



Şekil 4.37. Optimum koşullarda hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M farklı pH'larda hazırlanmış fosfat tamponlarında 60 s temas süresi ve 300 rpm karıştırma hızı ile 5 µM PROP varlığında 0,35 V ile 1,3 V gerilim aralığında DPV tekniği ile alınan A) voltamogramlar B) pik akımının pH'ya karşı grafiği

Temas süresi optimizasyonu sonuçlarının değerlendirilmesi

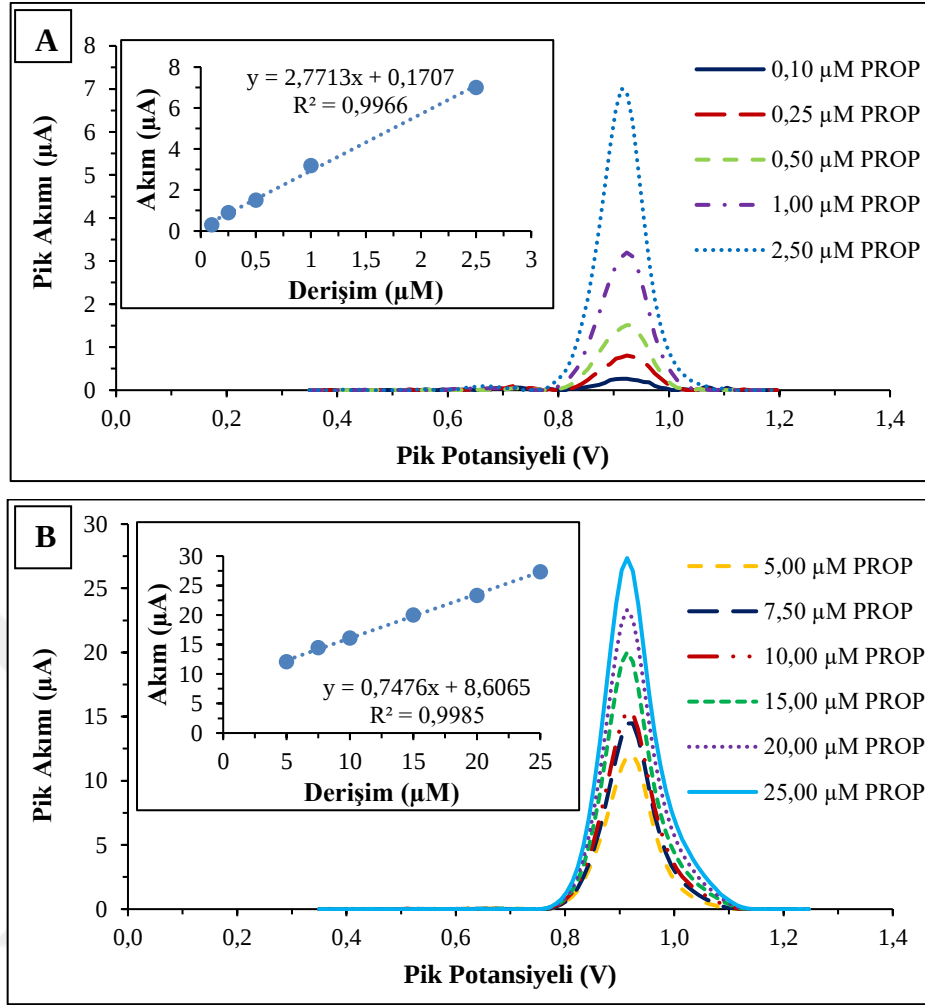
Optimum koşullarda hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, 0,5 µM PROP varlığında, DPV yöntemiyle farklı temas süreleri uygulanarak ölçümler alınmış ve elde edilen pik akımları Şekil 4.38'de verilmiştir. Elde edilen sütun grafiği incelendiğinde süre arttırıldıkça cevabında arttığı görülmektedir. En fazla artış 240 s bekleme süresinde görülmesine karşın 120 s ile 240 s arasında önemli bir fark olmaması nedeniyle ve analiz sürelerinin mümkün olduğu kadar kısa tutulabilmesi için optimum olarak 120 s seçilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.38. Optimum koşullarda hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar ile 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, 0,5 μ M PROP varlığında, 0,35 V ile 1,2 V gerilim aralığında DPV tekniği kullanılarak, 300 rpm karıştırma hızında, farklı temas sürelerinde elde edilen pik akımları

4.2.1.6. PROP tayinine yönelik analitik parametrelerin belirlenmesi

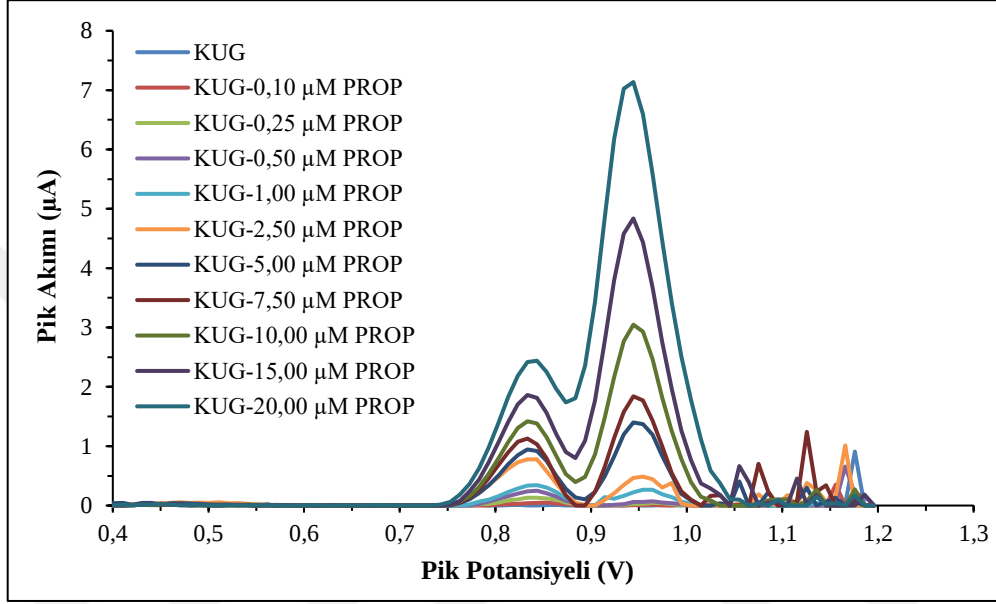
KUG-Au modifiye elektrot ile PROP için çalışılabilecek doğrusal aralık ve minimum gözlenebilecek derişimi gösteren LOD değerinin hesaplanması amacıyla kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur. Bu sebeple, 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV yönteminin kullanılmasıyla 0,1 μ M ve 25 μ M PROP derişim aralığında artan derişimlerin ortama eklenmesiyle ölçümler alınarak, oluşturulan kalibrasyon grafiğı Şekil 4.39’da verilmiştir. Çizilen kalibrasyon grafiğinde 0,1-2,5 μ M ve 5-25 μ M olmak iki doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir. Çizilen grafiğın eğimi ve 7 blank ölçümünün standart sapmasının Şekil 3.2’de verilen formülde yerine koyulmasıyla LOD değeri 0,0244 μ M ve LOQ değeri 0,0813 μ M olarak bulunmuştur.



Şekil 4.39. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,35 V ile 1,25 V gerilim değerleri arasında 300 rpm karıştırma hızı ve 120 s temas süresi parametrelerinde alınan DPV ölçümleri A) 0,1-2,5 μM aralığındaki B) 5-25 μM aralığındaki doğrusal aralık

0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde modifiye edilmemiş KUG elektrotlar kullanılarak artan derişimlerde PROP eklenmesiyle elde edilen voltamogramlar Şekil 4.40'da verilmiştir. Alınan voltamogramlar incelendiğinde modifiye edilmemiş elektrodun, modifiye EÖİ/KUG elektrotlar gibi etkin ve tek bir pik vermediği görülmektedir. PROP'a ait pikler ikili pikler şeklinde görülmektedir ve 2,5 μM altı derişimlerde piklerin ilkinde ait akım değeri diğerine göre daha yüksek iken, 2,5 μM üzeri derişimlerde ikinci pike ait akım değerleri daha yüksek gelmektedir. Derişime karşı akımın grafiğe geçirilmesiyle elde edilen grafiklerde doğrusallık gözlenmemiştir. Ancak EÖİ/KUG modifiye elektrotlar ile 0,1M pH 7,4 fosfat tamponu içerisine PROP eklenmesiyle DPV ölçümü alındığında analite ait tek bir pik vermesiyle KUG elektroda

karşı üstünlük sağlamıştır. Aynı zamanda artan derişimlerde PROP eklenmesiyle Şekil 4.38’de de görüldüğü gibi iki ayrı doğrusal çalışma aralığına izin vermiştir. Sonuç olarak, KUG elektroda elektrokimyasal ön işlem uygulanması ile hazırlanan EÖİ/KUG elektrotlar analite ait tek bir pik vermesi ve doğrusal çalışma aralığı sunması ile PROP analizlerine imkan sunmuştur.



Şekil 4.40. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 300 rpm karıştırma hızıyla, 120 s temas süresi parametrelerinde KUG elektrot ile artan PROP derişimine karşı alınan DPV ölçümleri

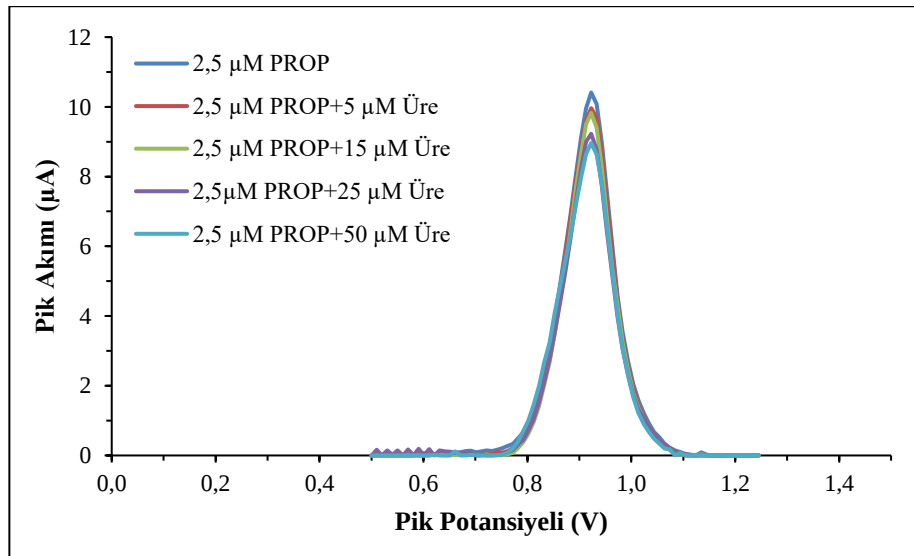
Optimum koşullarda hazırlanan EÖİ/KUG elektrotların birbirleriyle benzer cevaplara sahip olması da alınan ölçümlerin güvenilirliği açısından önemli bir parametredir. Bu yüzden hazırlanan elektrotlar ile gün içinde ve günler arası olmak üzere iki ayrı tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Gün içinde optimum koşullarda hazırlanan EÖİ/KUG modifiye elektrot ile optimum koşullarda DPV metoduyla 5 µM PROP varlığında yedi ölçüm alınarak elektrotların tekrarlanabilirliği test edilmiştir. Voltamogramlardan elektrotların verdiği pik akım cevapları alınmıştır. Sonuçlara göre RSD değeri %4,88 olarak hesaplanmıştır.

Bununla birlikte hazırlanan modifiye elektrodun günler arası tekrarlanabilirliği de DPV yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu sebeple 10 µM PROP varlığında optimum koşullarda alınan altı farklı ölçüm sonucunun pik akımları belirlenmiştir. Sonuçlara göre RSD değeri %4,82 olarak hesaplanmıştır.

Modifiye elektrotların cevaplarını bir süre koruması çalışmaları açısından tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmeyi sağladığından kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan EÖİ/KUG elektrotların kararlılığını test etmek amacıyla, 21 gün boyunca vakum desikatöründe saklanan elektrotların 7 günlük periyotlar ile 10 μM PROP varlığında ölçümleri alınmıştır. Elde edilen voltamogramlardan alınan pik akımları değerlendirilerek 21 günün sonunda elektrodun cevabını %89,01 oranında koruduğu görülmüştür. Bu da hazırlanan elektrotların yeterli düzeyde kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.1.7. PROP tayinine yönelik girişim yapabilecek türlerin incelenmesi

Deneysel çalışmalarda analitin tek başına başarılı bir şekilde analiz edilebilmesiyle birlikte gerçek örneklerde bir matriks ortamı içinde bulunduğundan, birlikte bulunma ihtimali olan kimyasallarla aynı ortamdayken de başarılı bir şekilde analiz edilebilmesi gerekmektedir. Bu gereklilik sebebiyle analit olarak seçilen PROP'un gerçek örneklerde birlikte bulunma ihtimali bulunan elektroaktif türler olarak AA, GLC, MNNT, üre, ÜA ve KCl kimyasalları seçilerek, 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda 2,5 μM PROP varlığında EÖİ/KUG elektrotlarla DPV yöntemi kullanılarak girişim çalışmaları yapılmıştır. Şekil 4.41'de verilen voltamogramlar incelendiğinde PROP'un yükseltgenme pikine ürenin girişim yapmadığı görülmektedir.



Şekil 4.41. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde DPV yöntemiyle 2,5 μM PROP yükseltgenme pikine ürenin girişim etkisinin incelenmesi için alınan voltamogramlar

Alınan DPV ölçümleri sonucu voltamogramlar incelendiğinde, seçilen elektroaktif türlerin PROP'un yükseltgenme pikini etkilemediği görülmüş ve gerçek örneklerin bu maddeleri Çizelge 4.10'da belirtilen veya daha az miktarlarını içermeleri halinde analite ait cevabı etkilemeyeceği saptanmıştır.

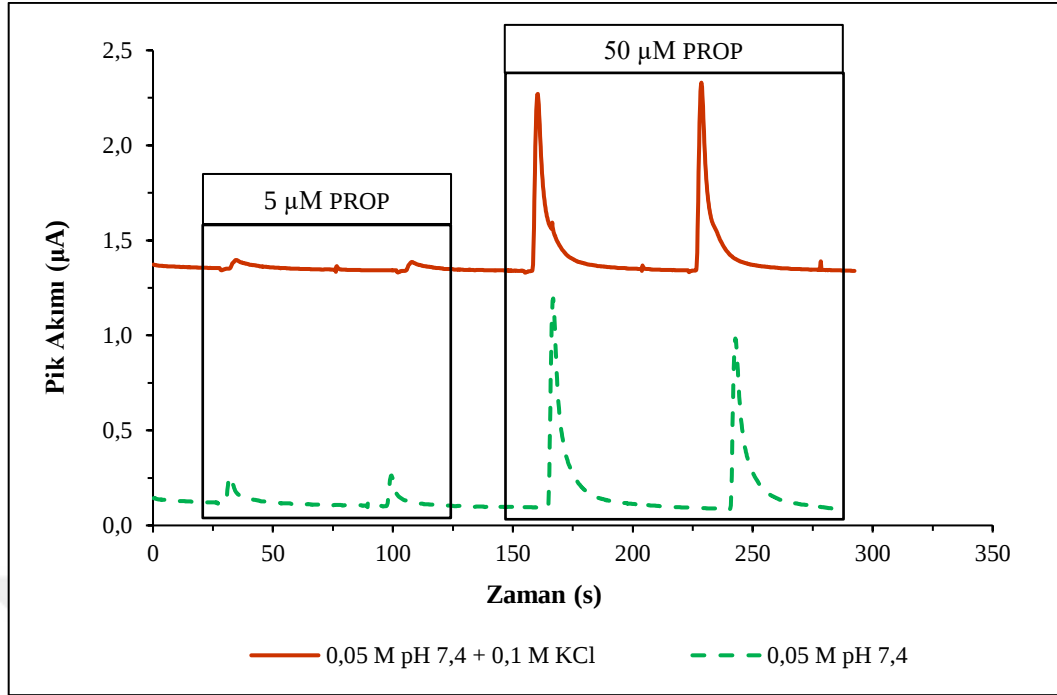
Çizelge 4.10. *PROP'un yükseltgenme pikine girişim etkisi yapabileceği düşünülen türlerin maksimum izin verilen derişimleri*

Girişim etkisi incelenen türler	Girişim etkisine izin verilen maksimum derişim (μM)
Glukoz	2000
Mannitol	2000
Potasyum Klorür	2000
Askorbik Asit	1000
Üre	50
Ürik Asit	50

4.2.2. PROP tayininin AEA-AD sistemleriyle gerçekleştirilmesi

4.2.2.1. PROP analizi için referans elektrot değerlendirmesi

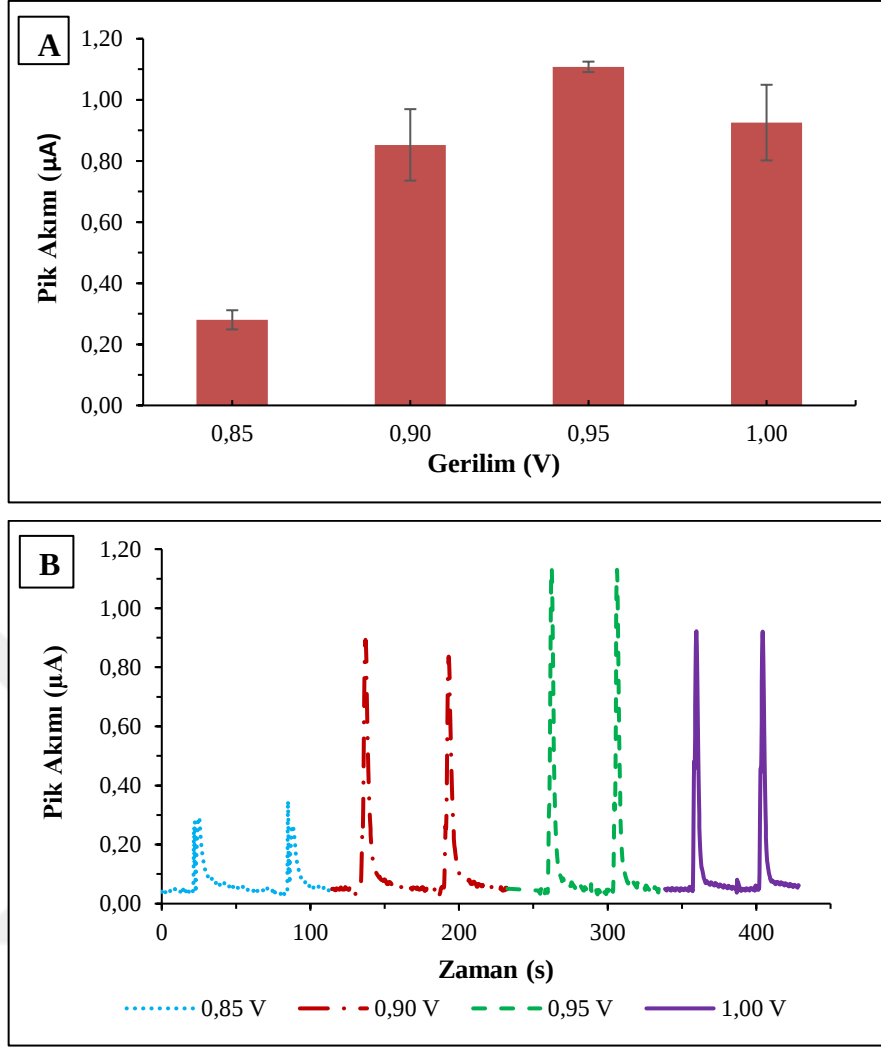
0,05 M pH 7,4 tamponu ve 0,05 M pH 7,4 tamponuna 0,1 M KCl ilavesi ile 0,95 V gerilimde EÖİ/KUG elektrotlar ile 1,1 mL/dk akış hızında 5 ve 50 μM PROP enjeksiyonu ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda Şekil 4.42'de de görüldüğü gibi KCl ilavesi ile 5 μM PROP cevabının azaldığı, 50 μM PROP enjeksiyonunda ise cevabın çok fazla etkilenmediği görülmektedir. Dolayısıyla, küçük derişimlerde cevabın azalması, yüksek derişimlerde ise çok büyük değişimlerin olmaması ve Şekil 4.20'de de ortamda KCl ilavesi olmadığında daha yüksek cevap elde edilmiş olması sebebiyle ortamda referans elektrot olarak Ag tel elektrot kullanılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir.



Şekil 4.42. AEA-AD sisteminde 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu ve 0,1 M KCl içeren 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu hareketli fazlarına 5 ve 50 μ M PROP enjeksiyonu ile elde edilen akım zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Gerilim: 0,95 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Enjeksiyon hacmi: 20 μ L)

4.2.2.2. Gerilim optimizasyonu

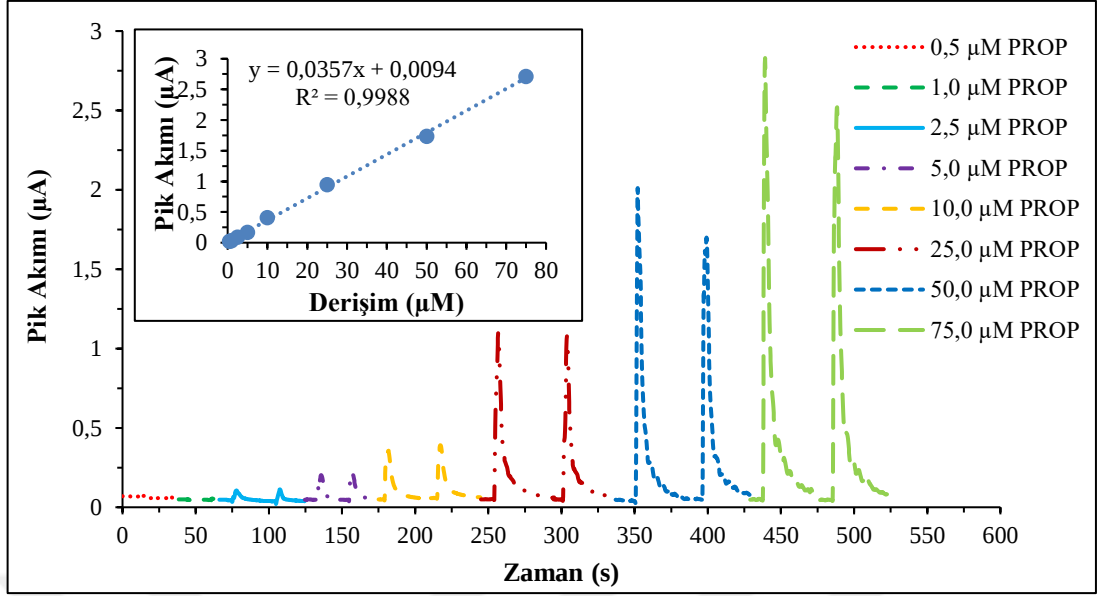
AEA-AD sisteminde 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu hareketli fazına 10 μ M PROP enjekte edilmesiyle farklı gerilimlerde alınan ölçümler sonucu elde edilen grafikler Şekil 4.43’de verilmiştir. Grafiklerde de görüldüğü üzere en yüksek cevaplar 0,95 V gerilim değerinde alınmıştır, bu sebeple optimum gerilim değeri 0,95 V olarak seçilmiştir.



Şekil 4.43. AEA-AD sisteminde farklı gerilim değerlerinde 10 μM PROP enjeksiyonu ile alınan A) akım-gerilim grafiği B) akım-zaman eğrileri (Hareketli faz: 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Akış hızı: 1,1 mL/dk)

4.2.2.3. Kalibrasyon grafiği oluşturulması

AEA-AD sistemine optimum koşullarda artan derişimlerde PROP çözeltilerinin enjekte edilmesiyle alınan ölçüm sonuçları Şekil 4.44'de verilmiştir. Alınan ölçümler neticesinde doğrusal çalışma aralığı olarak 0,5 ve 75 μM PROP derişim aralığı belirlenmiştir. Alınan 10 ölçüm sonucu LOD değeri 0,1323 μM ve LOQ değeri ise 0,4410 μM olarak hesaplanmıştır.



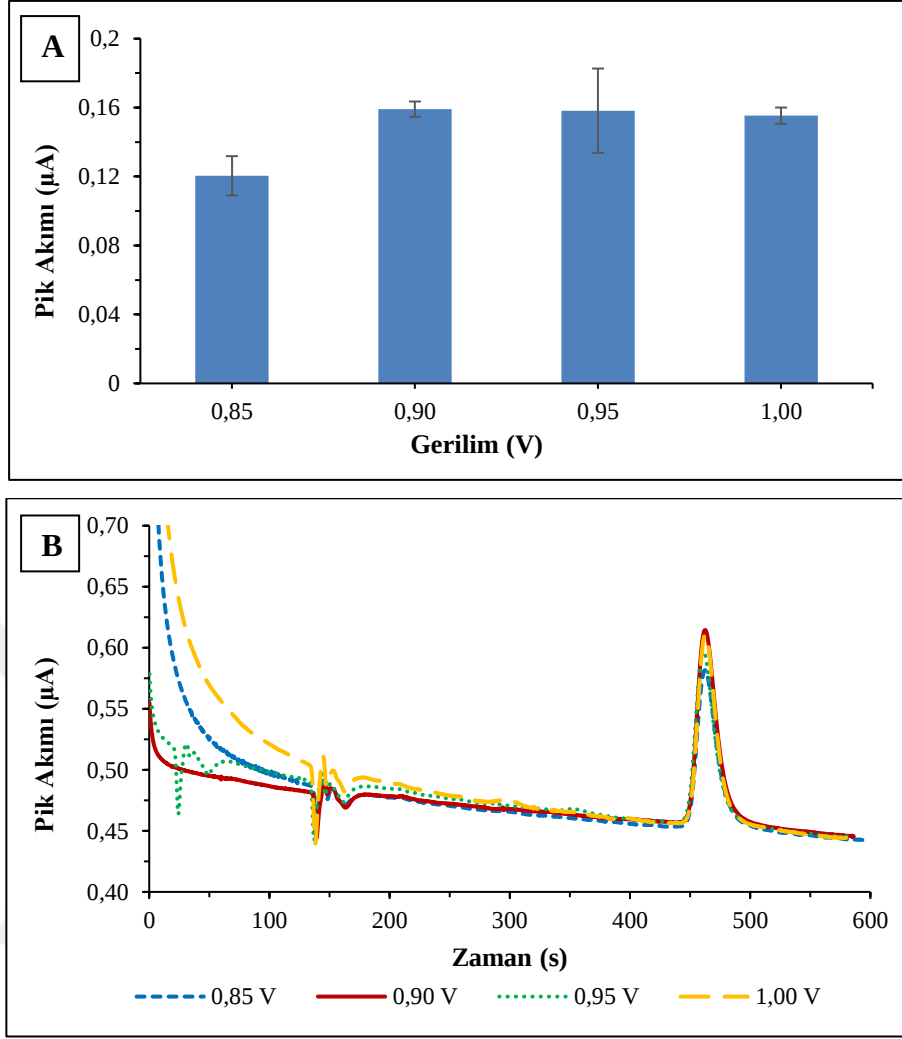
Şekil 4.44. AEA-AD sisteminde artan derişimlerde PROP enjekte edilmesiyle alınan akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Hareketli faz: 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Gerilim: 0,95 V)

4.2.3. AEA-AD+C₁₈ sisteminde PROP optimizasyonu

4.2.3.1. Gerilim optimizasyonu

AEA-AD sistemine kolonun da dahil edilmesiyle oluşturulan AEA-AD+C₁₈ sistemi için kullanılacak hareketli faz, HPLC ile yapılan analizler sonucu %65 CH₃OH; %35 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu karışımı (v/v) olarak belirlenmiştir.

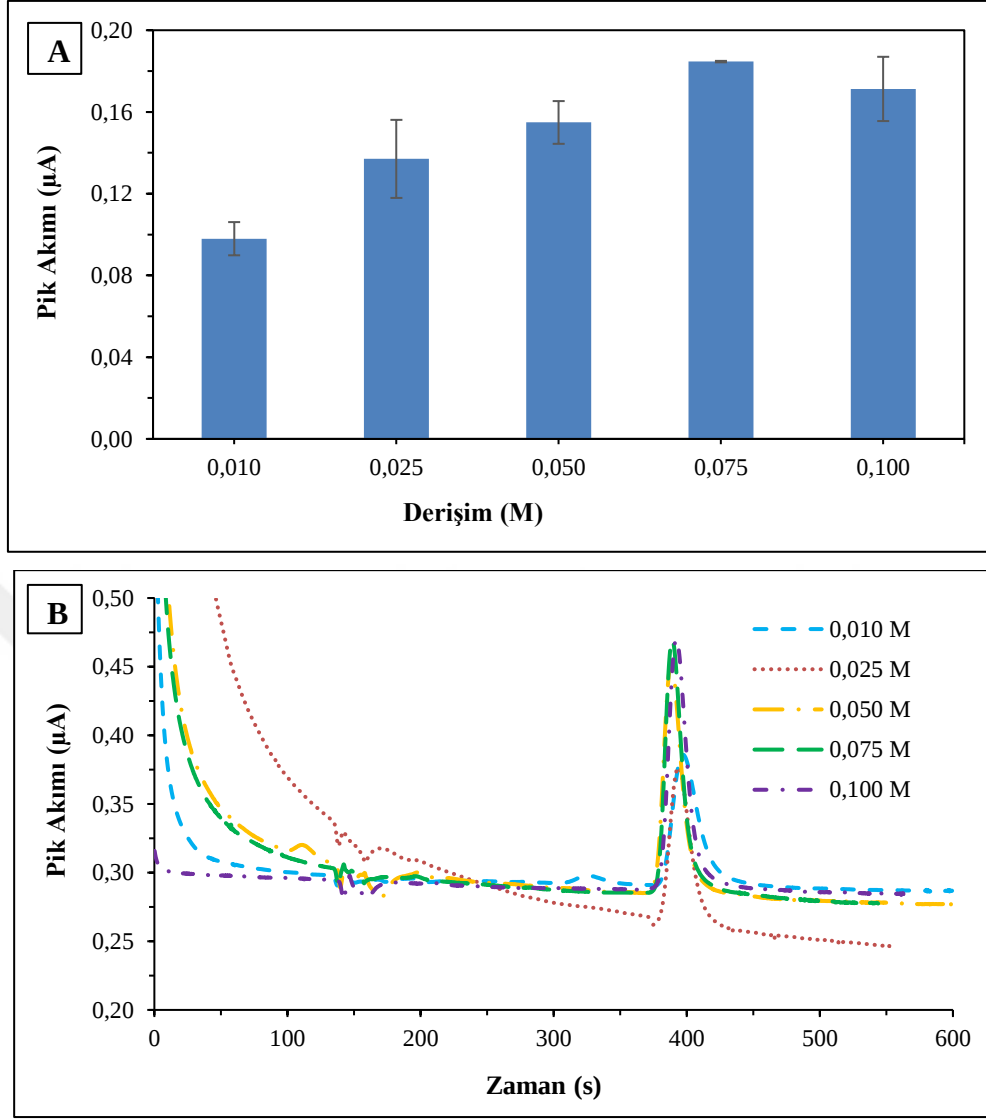
AEA-AD+C₁₈ sisteminde farklı gerilim değerlerinde belirlenen hareketli faz akışına 100 µM PROP enjekte edilmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 4.45’de grafiğe geçirilmiştir. Grafikler incelendiğinde en yüksek akım cevabının alındığı 0,9 V optimum olarak seçilmiştir.



Şekil 4.45. AEA-AD+C₁₈ sistemine farklı gerilim değerlerinde 100 µM PROP enjekte edilmesiyle elde edilen A) akım-gerilim grafiği B) akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Hareketli faz: %65 CH₃OH; %35 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v), Akış hızı: 1,1 mL/dk Basınç: 93 bar)

4.2.3.2. Tampon derişiminin etkisinin incelenmesi

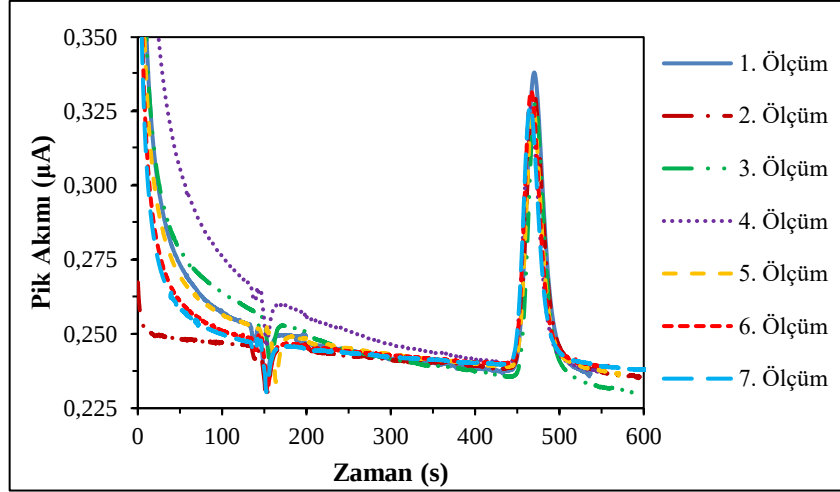
AEA-AD+C₁₈ sisteminde hareketli faz olarak %65 CH₃OH; %35 farklı derişimlerde pH 7,4 fosfat tamponu karışımı kullanılarak 100 µM PROP enjeksiyonu yapılmış ve elde edilen grafikler Şekil 4.46'da verilmiştir. Ölçümler sonucu çizilen grafiklerden optimum hareketli fazın %65 CH₃OH ile %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu karışımı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.46. AEA-AD+C₁₈ sisteminde hareketli faz olarak %65 CH₃OH; %35 farklı derişimlerde pH 7,4 fosfat tamponu karışımı (v/v) kullanılarak 100 μM PROP enjeksiyonu ile alınan A) akım derişim grafiği B) akım- zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Gerilim: 0,9 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Basınç: 87- 92 bar)

Tekrarlanabilirliğin test edilmesi

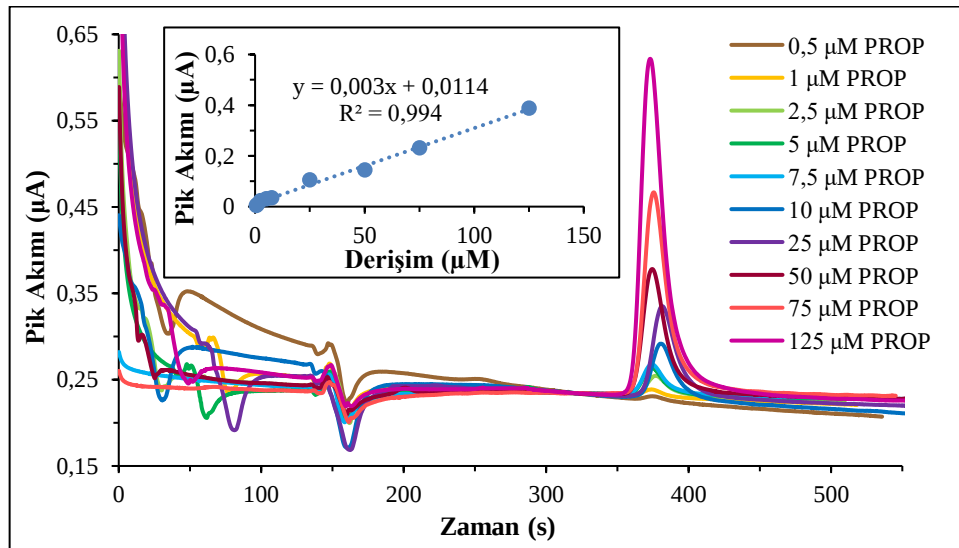
AEA-AD+C₁₈ sistemine optimum koşullarda 100 μM PROP enjeksiyonu ile elde edilen 7 ölçümün akım-zaman eğrileri Şekil 4.47’de verilmiştir. Elde edilen akım zaman eğrileri birbirlerine yakın sonuçlar alındığını göstermiş ve %RSD değeri %5,4 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.47. AEA-AD+C₁₈ sistemine optimum koşullarda 100 µM PROP'un 7 enjeksiyonu ile alınan akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Hareketli faz: %65 CH₃OH; %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v), Akış hızı: 1,1 mL/dk, Basınç: 87 bar)

4.2.3.3. Kalibrasyon grafiği oluşturulması

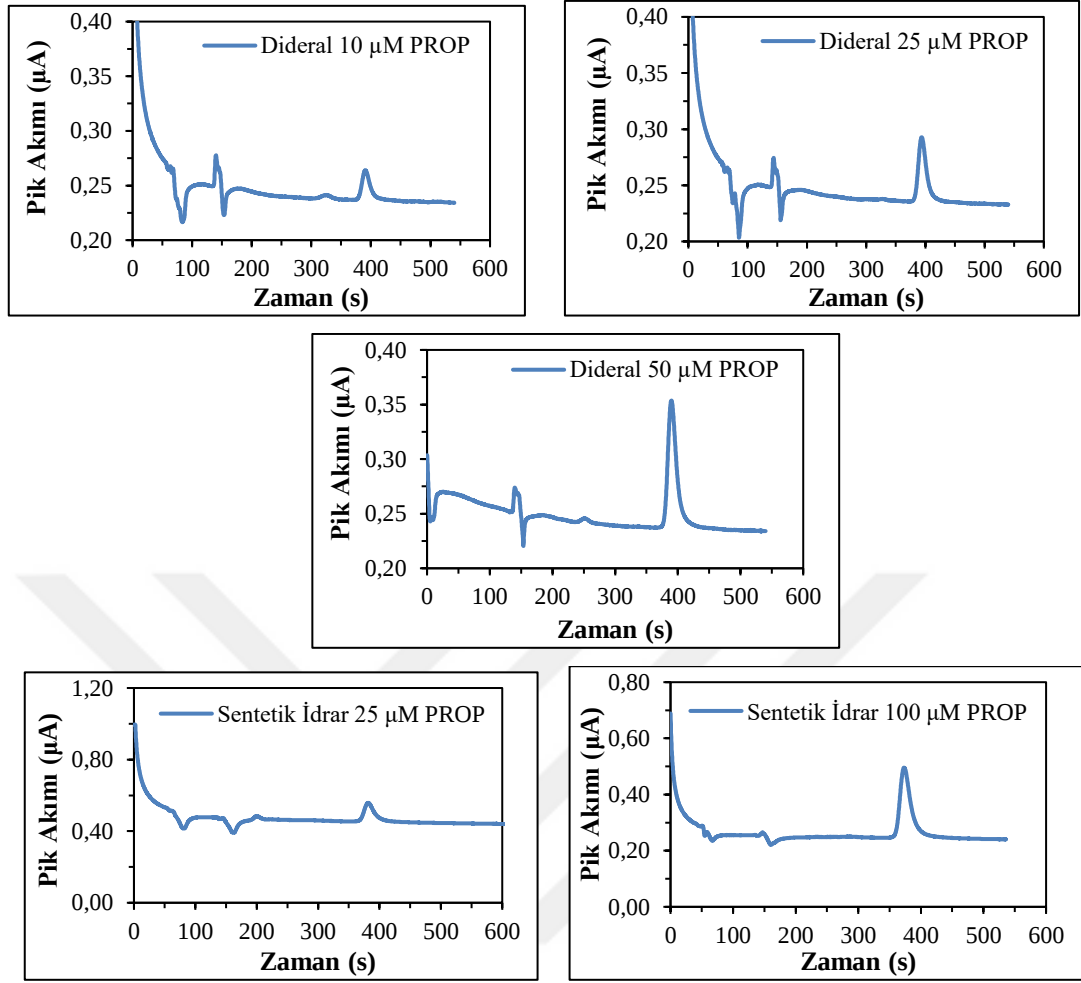
AEA-AD+C₁₈ sistemine optimum koşullarda artan derişimlerde PROP örnekleri enjekte edilmesi sonucu 0,5 ile 125 µM PROP derişim aralığında oluşturulan doğrusal kalibrasyon grafiği Şekil 4. 48'de verilmiştir. Alınan altı ölçüm sonucuna göre LOD değeri 0,118 µM PROP ve LOQ değeri 0,3956 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.48. AEA-AD+C₁₈ sistemine 0,5 ile 125 µM PROP derişim aralığında PROP enjeksiyonu ile elde edilen akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Gerilim: 0,9 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Hareketli faz: %65 CH₃OH ile %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v), Basınç: 85 bar)

4.2.3.4. AEA-AD+C₁₈ sistemi ile gerçek örnek analizleri

Farklı derişimlerde PROP içerecek şekilde hazırlanan sentetik idrar ve Dideral[®] ilacı örnekleri ile AEA-AD+C₁₈ sisteminde optimum koşullarda yapılan ölçümler sonucunda alınan akım zaman eēřileri Şekil 4.49’da gösterilmiştir. Alınan lm sonuçları kullanarak elde edilen geri kazanım deēřeri izelge 4.11’de verilmiştir. AEA-AD+C₁₈ sisteminde Dideral[®] rneēi için %101,256-108,04 aralıēında, sentetik idrar rneēi için ise %98,8-%100,46 aralıēında geri kazanım elde edilmiştir. Karşılaştırmak amacıyla HPLC cihazıyla da geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. PROP tayini için kullanılan AEA-AD+C₁₈ ve HPLC yöntemlerine ait sonuçların farklarını ortaya koymak için Minitab 19 programı kullanılarak t testi uygulanmıştır. Her iki yöntem için aynı konsantrasyonlarda yapılan geri kazanım deneylerinin sonuçları kullanılmış olup, analiz sonucunda AEA-AD+C₁₈ ($\bar{x}$ =43,0; SS=35,7) ve HPLC ($\bar{x}$ =43,4; SS=37,5) yöntemleri arasında $p>0,05$ ($p=0,985$) olduēundan istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.49. AEA-AD+C₁₈ sistemine PROP için optimum koşullarda Dideral® ve sentetik idrar gerçek örnekleri enjeksiyonu ile elde edilen akım-zaman eğrileri (Çalışma elektrodu: EÖİ/KUG, Gerilim: 0,9 V, Akış hızı: 1,1 mL/dk, Hareketli faz: %65 CH₃OH ile %35 0,075 M pH 7,4 fosfat tamponu (v/v))

Çizelge 4.11. AEA-AD+C₁₈ sistemi ve HPLC ile Dideral® ve sentetik idrar gerçek örneklerinde PROP için optimum koşullarda gerçekleştirilen ölçümler sonucu bulunan geri kazanım değerleri

Örnek	AEA-AD+C ₁₈ sistemi			HPLC (UV dedektör kullanılan sistem)		
	Bulunması Gereken PROP Derişimi (µM)	Bulunan PROP Derişimi (µM)	%Geri Kazanım	Bulunması Gereken PROP Derişimi (µM)	Bulunan PROP Derişimi (µM)	%Geri Kazanım
Dideral®	10,0000	10,8040	108,0400	10,0000	8,6030	86,0330
Dideral®	25,0000	25,3140	101,2560	25,0000	22,9900	91,9610
Dideral®	50,0000	53,4760	106,9520	50,0000	52,9020	105,8050
Sentetik İdrar	25,0000	24,7000	98,8000	25,0000	28,2880	113,1530
Sentetik İdrar	100,0000	100,4600	100,4600	100,0000	104,1690	104,1690

5. SONUÇLAR

Endokrin sistem bozucu kimyasallardan birisi olan DES'in vücuda alınması durumunda özellikle üreme sisteminde ciddi sağlık sorunlarına yol açması sebebiyle DES'in tayin edilebilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmakta ve yeni yöntemler geliştirilmektedir. Gerçekleştirilen tez çalışmasının ilk kısmında DES'in elektrokimyasal olarak tayini için iki basamaktan oluşan bir çalışma planlanmıştır. İlk basamakta, DES'in elektrokimyasal tayinine yönelik modifiye elektrot temelli elektrokimyasal sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda KUG elektrot yüzeyinde altının indirgenmesi ile KUG-Au modifiye elektrot hazırlanmış ve DV, SEM ve EİS ölçümleri ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan ölçümler ile KUG yüzeyine ortalama $11,648 \pm 5,623$ nm çaplarındaki altın nanopartiküllerle kaplandığını ve elektrot performansını arttırdığını göstermiştir. Ayrıca farklı tarama hızlarında alınan ölçümler sonucu Randles-Sevcik denklemi kullanılarak etkin yüzey alanları sırasıyla KUG ve KUG-Au elektrotlar için $0,04792 \text{ cm}^2$ ve $0,05989 \text{ cm}^2$ olarak hesaplanmış, dolayısıyla modifikasyon ile etkin yüzey alanının arttığı görülmüştür. KUG-Au elektrodun DES'e cevabı incelendiğinde KUG elektroda göre 4,9621 kat daha yüksek cevap verdiği görülmüştür. Belirlenen optimum şartlarda yapılan çalışmalarda $0,25 \text{ }\mu\text{M}$ ile $25 \text{ }\mu\text{M}$ derişim aralığı DES için doğrusal çalışma aralığı ve $6,29 \text{ nM}$ LOD değeri olarak belirlenmiştir. Hazırlanan modifiye elektrodun analite olan seçiciliğini değerlendirebilmek için modifiye elektrot ile matriks ortamında DES'in tayini gerçekleştirilmiş ve keskin köyünden temin edilen su örneğinde %89,69-102,68 değerleri arasında geri kazanım ve yerel bir marketten temin edilen süt tozu örneğinde ise %77,98-89,61 değerleri arasında geri kazanım elde edilmiştir.

DES'in tayini için yapılan çalışmanın ikinci kısmını ise amperometrik dedeksiyon ile kombine akışa enjeksiyon analiz sistemi oluşturmaktadır. Bu kapsamda ilk olarak AEA-AD sistemi test edilmiştir. Sistemde DES'in tayin edilebilmesi için gerekli koşullar belirlenmiştir. Gerçek örneklerde matriks ortamı fazla olduğundan daha seçici ve daha iyi bir ayırım gerçekleştirebilmek amacıyla AEA-AD sisteminin sıvı kromatografide dedektör olarak kullanılması hedeflenmiş ve sisteme bir de C_{18} kolon ilave edilmiştir. AEA-AD+ C_{18} sisteminde optimum koşullarda alınan ölçümler sonucunda DES için 1 ve $500 \text{ }\mu\text{M}$ derişim aralığında bir doğrusallık elde edilmiş ve LOD değeri $0,52 \text{ }\mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Süt, süt tozu ve su gerçek örneklerinde

yapılan analizler sonucunda %89,01-102,9 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. Sonuçlar, klasik HPLC analizleriyle karşılaştırılarak kontrol edilmiştir.

Tezin ikinci kısmını birçok sağlık sorununa yol açan yan etkilerinin yanı sıra bazı spor branşlarında doping ajanı olarak kullanılması sebebiyle Uluslararası Olimpiyat Komitesi ve Dünya Anti Doping Ajansı (WADA) tarafından yasaklan β -blokerlerden biri olan PROP oluşturmaktadır. PROP'un elektrokimyasal olarak tayini için iki basamaktan oluşan bir çalışma planlanmıştır. İlk basamakta PROP'un voltametrik olarak tayin edilebilmesi amacıyla KUG elektrot yüzeyine elektrokimyasal ön işlem uygulanmış ve EÖİ/KUG modifiye elektrotlar hazırlanmıştır. EÖİ/KUG elektrodun karakterizasyonunu yapmak için DV ve EİS ölçümleri alınmıştır. Alınan ölçümler elektrot yüzeyinin bir değişime uğrayarak elektrodun PROP'a ait cevabını arttırdığını göstermiştir. KUG ve EÖİ/KUG elektrotlar ile PROP varlığında alınan DPV ölçüm sonuçlarına bakıldığında, modifiye elektrodun 5,0763 kat daha yüksek cevap verdiği görülmektedir. EÖİ/KUG elektrot ile PROP tayini için gerekli olan elektrot hazırlama ve ölçüm koşulları belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda PROP için 0,1-2,5 μM ve 5-25 μM olmak üzere iki doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir. LOD değeri ise 0,0512 μM olarak hesaplanmıştır. Modifiye elektrot ile Şekil 4.15'de de görüldüğü gibi PROP'a ait tek bir pik görülürken Şekil 4.16'ya bakıldığında KUG elektrot ile PROP'a ait pikler ikili gelmekte dolayısıyla PROP'un tayini yapılamamaktadır. PROP tayininde girişim yapması muhtemel GLC (2000 μM), MNNT (2000 μM), KCl (2000 μM), üre (50 μM), ÜA (50 μM) ve AA (1000 μM) kimyasalları için girişim çalışmaları yapılmış ve bu maddelerin PROP'un tayinini etkilemediği görülmüştür.

PROP'un tayini için yapılan çalışmanın ikinci kısmını da amperometrik dedeksiyon ile kombine akışa enjeksiyon analiz sistemi oluşturmaktadır. AEA-AD sisteminde PROP'un tayin edilebilmesi için koşullar optimize edilmiştir. Optimum koşullarda alınan ölçümler sonucu çizilen kalibrasyon grafiğinde 0,5 ve 75 μM PROP derişim aralığı doğrusal çalışma aralığı olarak belirlenmiş ve LOD değeri 0,021 μM PROP olarak hesaplanmıştır. Daha iyi bir ayırım gerçekleştirebilmek amacıyla AEA-AD sisteminin sıvı kromatografide dedektör olarak kullanılması hedeflenmiş ve sisteme bir de C_{18} kolon ilave edilmiştir. AEA-AD+ C_{18} sisteminde optimum koşullarda alınan ölçümler sonucunda çizilen kalibrasyon grafiğinde 5 ile 125 μM derişim aralığında doğrusallık elde edilmiş ve 0,118 μM ise LOD değeri olarak belirlenmiştir. Yerel bir eczaneden temin edilen Dideral® tablette ve laboratuvar ortamında hazırlanan sentetik

idrar örneklerine yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda Dideral® örneği için %101,256- 108,04 aralığında ve sentetik idrar örneği için %98,8- %100,46 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. PROP tayini için geliştirilen bu yöntemi klasik HPLC yöntemiyle yapılan analiz sonuçları da desteklemektedir.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında seçilen DES ve PROP maddelerinin ilaç ve diğer örneklerde tayinlerine yönelik elektrokimyasal analiz yöntemleri geliştirilmiş ve başarılı olarak test edilmiştir. Elde edilen sonuçların bu alandaki çalışmalara öncülük etmesi beklenmektedir.



KAYNAKÇA

- [1] Donahue, P., (2020). Endocrine-disrupting chemicals. *Jaguara of the Northern Pantanal*, 18, 238-241.
- [2] Manzoor, R., Wang, L., Wang, H., Lei, Y., Sehrish, A., Khan, M. S., Ali, A., Wu, D., Wei, Q. (2020). Ultrasensitive competitive electrochemiluminescence immunosensor based on luminol-AuNPs@Mo₂C and upconversion nanoparticles for detection of diethylstilbestrol. *Microchem. J.*, 158, 105283.
- [3] Li, F., Sun, J., Jia, H., Zhang, Y., Pang, L., He, L., Chai, T. (2019). A disposable paper-based sample clean-up slides for the sensitive determination of trace diethylstilbestrol residues in aquatic products. *Microchem. J.*, 151, 104243.
- [4] Wang, M., Wang, Q., Li, X., Lu, L., Du, S., Zhang, H. (2020). Selection and identification of diethylstilbestrol-specific aptamers based on magnetic-bead SELEX. *Microchem. J.*, 159, 105354.
- [5] He, X., Mei, X., Wang, J., Lian, Z., Tan, L., Wu, W. (2016). Determination of diethylstilbestrol in seawater by molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Mar. Pollut. Bull.*, 102, 142–147.
- [6] Pang, S. ve Kan, X. (2020). One-pot synthesis of nitrogen doped graphene-thionine-gold nanoparticles composite for electrochemical sensing of diethylstilbestrol and H₂O₂. *Microchem. J.*, 157, 104924.
- [7] Aragão, J.S., Ribeiro, F.W.P., Portela, R.R., Santos, V.N., Sousa C.P., Becker H., Correia A. N., Limaneto P. (2017). Electrochemical determination diethylstilbestrol by a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine film electrode. *Sensors Actuators B Chem.*, 239, 933–942.
- [8] Yi, M., Sheng, Q., Sui, Q., Lu, H. (2020). β -blockers in the environment: Distribution, transformation, and ecotoxicity. *Environ. Pollut.*, 266, 115269.
- [9] Li, X.F. ve Mao, Y.M. (2020). Beta-blockers in COPD: A systematic review based on recent research. *Life Sci.*, 252, 117649.
- [10] Khorshed, A. A., Khairy, M. ve Banks, C.E. (2019). Electrochemical determination of antihypertensive drugs by employing costless and portable unmodified screen-printed electrodes. *Talanta*, 198, 447–456.

- [11] Fan, W., He, M., You, L., Zhu, X., Chen, B., Hu, B. (2016). Water-compatible graphene oxide/molecularly imprinted polymer coated stir bar sorptive extraction of propranolol from urine samples followed by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, 1443, 1–9 2016.
- [12] Farajmand, B., Dalali, N., Keshavarz, S., Lakmehsari, M.S. (2020). Application of MIL-53 (Al) prepared from waste materials for solid-phase microextraction of propranolol followed by corona discharge-ion mobility spectrometry (CD-IMS), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 189, 113418.
- [13] Santos, A.M., Wong, A. ve Fatibello-Filho, O. (2018). Simultaneous determination of salbutamol and propranolol in biological fluid samples using an electrochemical sensor based on functionalized-graphene, ionic liquid and silver nanoparticles. *J. Electroanal. Chem.*, 824, 1–8.
- [14] Ayaz, S. ve Dilgin, Y. (2017). Flow injection amperometric determination of hydrazine based on its electrocatalytic oxidation at pyrocatechol violet modified pencil graphite electrode. *Electrochim. Acta*, 258, 1086–1095.
- [15] Amran, M.B., Aminah, S., Rusli, H., Buchari, B. (2020). Bentonite-based functional material as preconcentration system for determination of chromium species in water by flow injection analysis technique. *Heliyon*, 6, e04051.
- [16] Darbre, P.D. (2015). What Are Endocrine Disrupters and Where Are They Found?. *Endocrine Disruption and Human Health*, 1, 3-26.
- [17] Pollard, B.J. ve Kitchen, G. (2017). Endocrine system, *Handb. Clin. Anaesthesia, Fourth Ed.*, 2007, 163–196.
- [18] Darbre, P.D. (2015). Endocrine Disruption and Disorders of Energy Metabolism. *Endocrine Disruption and Human Health*, 15, 273-285.
- [19] Dintzis, S.M. (2018). Endocrine System. *Comparative Anatomy and Histology*, 15, 251-273. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00015-4>
- [20] Lu, X., Zhu, Y. ve Zhu, T. (2017). Endocrine System. *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*, 14, 339-355. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809199-9.00014-8>
- [21] Cooke, P.S., Simon, L., ve Denslow N.D. (2013). Endocrine Disruptors, *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, 37, 1123-1154. 3. Baskı. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00037-6>

- [22] Miyagawa, S., Sato, T., ve Iguchi, T. (2016). Endocrine Disruptors. Y. Takei, H. Ando, & K. Tsutsui (Eds): *Handbook of Hormones*, 101, 571-572. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00101-X>
- [23] Wang, R. ve Kannady, C. (2018). Endocrine Disruptors in the Environment Affecting Erectile Function. *Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health*, 32, 503-512. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801299-4.00032-3>.
- [24] Evans T.J. (2017). Endocrine Disruption, *Reproductive and Developmental Toxicology*, 58, 1091-1110. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00058-5>.
- [25] Gore, A.C., Krishnan, K. ve Reilly, M.P. (2018). Endocrine-disrupting chemicals: Effects on neuroendocrine systems and the neurobiology of social behavior. *Horm. Behav.*, 1–16.
- [26] Pontelli, R.C.N., Souza, M.C.O., Fantucci, M.Z., Andrade, M., Rocha, E.M. (2019). The role of endocrine disruptors in ocular surface diseases. *Med. Hypotheses*, 122, 157–164.
- [27] Coppock, R.W. ve Dziwenka, M.M. (2017). Endocrine Disruption in Wildlife Species. *Reprod. Dev. Toxicol.*, 1373–1389.
- [28] Papalou, O., Kandaraki, E.A., Papadakis, G. ve Diamanti-Kandarakis, E. (2019). Endocrine Disrupting Chemicals: An Occult Mediator of Metabolic Disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 10, 1–14.
- [29] Darbre, P.D. (2015). An Introduction to the Challenges for Risk Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocrine Disruption and Human Health*, 16, 289-300. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801139-3.00016>
- [30] Mehrnia, M. (2016). *Sulu Çözeltilerdeki Endokrin Bozucu Kimyasalların UV/H₂O₂-Ozon Prosesleri ile Uzaklaştırılması*. Doktora Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [31] Göl, D.K. (2018). *Endokrin bozucuların doğumsal kalp hastalıkları üzerine etkisi*. Tıpta Uzmanlık Tezi. Kayseri: Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [32] Tran, T.K.A., Yu R.M.K., Islam R., Nguyen T.H.T., Bui T.L.H., Kong R.Y.C., O'Connor W., Leusch F.D.L., Andrew-Priestly M., Macfarlane G.R. (2019). The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Environ. Pollut.*, 248, 1067–1078.

- [33] Özen, S. ve Darcan, Ş. (2011). Effects of Environmental endocrine disruptors on pubertal Development. *JCRPE J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.*, 3, 1–6.
- [34] Kalkan, F.B. (2018). *Endokrin Sistem Üzerinde Bozucu Etki Gösteren Bazı Moleküllerin Önderiştirilmesi İçin Katı Faz Adsorbanlarının Hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [35] Schug, T.T., Janesick A., Blumberg B., Heindel J.J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, 204–215.
- [36] Çetinkaya, S. (2009). Endokrin çevre bozucular ve ergenlik üzerine etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*, 36, 59-66.
- [37] Li, Y.F., Canário, A.V.M., Power, D.M., Campinho, M.A. (2019). Ioxynil and diethylstilbestrol disrupt vascular and heart development in zebrafish. *Environ. Int.*, 124, 511–520.
- [38] Moharrami, P. (2014). *Dietilstilbestrol (DES) İçeren CuInP Kuantum Dot Nanoparçacıkların Sentezlenmesi, Tc-99m ile İşaretlenmesi ve İn-Vitro Biyoafinitelerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. İzmir: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [39] Jishi, T.Al ve Sergi, C. (2017). Current perspective of diethylstilbestrol (DES) exposure in mothers and offspring. *Reprod. Toxicol.*, 71, 71–77.
- [40] Papich, M.G. (2016). Diethylstilbestrol. *Saunders Handb. Vet. Drugs*, 236–238.
- [41] Dong, X., Zhao, G., Liu, L., Li, X., Wei, Q., Cao, W. (2018). Ultrasensitive competitive method-based electrochemiluminescence immunosensor for diethylstilbestrol detection based on Ru(bpy)₃²⁺ as luminophor encapsulated in metal–organic frameworks UiO-67. *Biosens. Bioelectron.*, 110, 201–206.
- [42] Karabulut, A.K. (2015). *Bazı Çevresel Kirleticilerin Drosophila Melanogaster’de Genotoksik ve Östrojen-İlişkili Reseptör (ERR) Gen İfadesine Etkisi*. Doktora Tezi. Malatya: İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [43] Wang, X., Ding, H., Yu, X., Shi, X., Sun, A., Li, D., Zhao, J. (2019). Characterization and application of molecularly imprinted polymer-coated quantum dots for sensitive fluorescent determination of diethylstilbestrol in water samples. *Talanta*, 197, 98–104.

- [44] Yin, K., Yu, F., Liu, D., Xie, Z., Chen, L. (2016). Cyanine-based colorimetric and fluorescent probe for the selective detection of diethylstilbestrol in seawater, shrimp and fish samples. *Sensors Actuators B Chem.*, 223, 799–805.
- [45] Zhao, W.R., Kang, T.F., Lu, L.P., Cheng, S.Y. (2018). Electrochemical magnetic imprinted sensor based on MWCNTs@CS/CTABr surfactant composites for sensitive sensing of diethylstilbestrol. *J. Electroanal. Chem.*, 818, 181–190.
- [46] Dawlaty, B. (2014). *Changes in the Vascular Tissue Protein Profile of the Diabetic Rats and the Protective Role of the Beta Blockers*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [47] Wright, A.M. ve King, L.G. (2014). Calcium channel blocker and β -blocker drug overdose. *Small Animal Critical Care Medicine*, 78, 407–414
- [48] Torul, H. (2009). *Farmasötik Formlarda İlaç Etken Maddelerinin HPLC İle Enantiyomer Tayinleri*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
- [49] Khan, M.G. (2006). Beta-Blockers. *Encyclopedia of Heart Diseases*, 159–167.
- [50] Mottram, D. R. (2018). Beta blockers. *Doping, Performance-Enhancing Drugs, and Hormones in Sport*, 9, 307–315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813442-9.00009-2>
- [51] Casella, I.G., Bonito, R. ve Contursi M. (2016). Determination of some β -Blockers by Electrochemical Detection on Polycrystalline Gold Electrode after Solid Phase Extraction (SPE). *Electroanalysis*, 28, 1060–1067.
- [52] Rivoira, L., Castiglioni, M., Del-Bubba, M., Bruzzoniti, M.C. (2018). 3D amperometry in the liquid chromatographic determination of trace pharmaceutical and herbicide emerging compounds. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 98, 1149–1159.
- [53] Ensafi, A. A., Kazemifard, N., ve Rezaei, B. (2017). Development of a nano plastic antibody for determination of propranolol using CdTe quantum dots. *Sensors Actuators B Chem.*, 252, 846–853.
- [54] Al-Majed, A.A., Bakheit, A.H.H., Abdel Aziz, H.A., Alajmi, F.M., AlRabiah, H. (2017). Propranolol. *Profiles Drug Subst. Excipients Relat. Methodol.*, 42, 287–338.

- [55] Orta, M., Martín, J., Medina-carrasco, S., Luis, J., Aparicio, I., Alonso, E. (2019). Applied Clay Science Adsorption of propranolol onto montmorillonite : Kinetic, isotherm and pH studies. *Appl. Clay Sci.*, 173, 107–114.
- [56] Faraj, M.M.A. (2017). *The Biochemical Analysis of Selective and Nonselective Beta-Adrenergic Receptor Inhibitors: Propranolol and Metoprolol*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Atılım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [57] Akbulut, Y. (2018). * ekil Hafızalı Kağıt Yüzeyler ile Kan  rneklerinde İlaç Etken Madde Tayini*. Yüksek Lisans Tezi. Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- [58] Chen, L., Li, K., Zhu, H., Meng, L., Chen, J., Li, M., Zhu, Z. (2013). A chiral electrochemical sensor for propranolol based on multi-walled carbon nanotubes/ionic liquids nanocomposite. *Talanta*, 105, 250–254.
- [59] Gupta, P., Yadav, S.K., Agrawal, B., Goyal, R.N. (2014). A novel graphene and conductive polymer modified pyrolytic graphite sensor for determination of propranolol in biological fluids. *Sensors Actuators B Chem.*, 204, 791–798.
- [60] Wong, A., Santos, A.M., Silva, T.A., Fatibello-Filho, O. (2018). Simultaneous determination of isoproterenol, acetaminophen, folic acid, propranolol and caffeine using a sensor platform based on carbon black, graphene oxide, copper nanoparticles and PEDOT:PSS. *Talanta*, 183, 329–338.
- [61] Yıldırım akar, D. (2018). * ocukluk  ağı hemanjiyomlarının klinik özellikleri ve tedavi yanıtlarının değerlendirilmesi*. Uzmanlık Tezi, Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [62] O’Mullane, A. P. (2013). Electrochemistry. *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.*, 2, 1–3.
- [63] Duman, E. (2014). *Sodyum Siklamat Yokluğunda ve Varlığında Okzasilinin Cu(II) ve Co(II) İyonları ile Etkileşiminin Voltametrik İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [64]  ztekin, Y. (2008). *Camsı Karbon Elektrot Yüzeyine  eşitli Fenantrolin Türevlerinin Modifikasyonu, Yüzey Karakterizasyonu, Elektrokimyasal ve Spektroskopik  zelliklerinin İncelenmesi*. Doktora Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [65] Say, R., Uysal  .D., Şahin, M., Diltemiz, S.E.,  zcan, A., Ers z, A.,  zcan, A.A., Şahin, Y. (2009). *Analitik Kimya*, Eskişehir: A ık ğretim Fakültesi Yayını.

- [66] Gupta, V.K., Jain, R., Radhapyari, K., Jadon, N., Agarwal, S. (2011). Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review. *Anal. Biochem.*, 408, 179–196.
- [67] Elgrishi, N., Rountree, K.J., McCarthy, B.D., Rountree, E.S., Eisenhart, T.T., Dempsey, J.L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.*, 95, 197–206.
- [68] Özcan, A., İlkbaş, S. ve Özcan, A.A. (2017). Development of a disposable and low-cost electrochemical sensor for dopamine detection based on poly(pyrrole-3-carboxylic acid)-modified electrochemically over-oxidized pencil graphite electrode. *Talanta*, 165, 489–495.
- [69] Ganesh, P.S., Kumara Swamy, B.E., Fayemi, O.E., Sherif, E.S.M., Ebenso, E. E. (2018). Poly(crystal violet) modified pencil graphite electrode sensor for the electroanalysis of catechol in the presence of hydroquinone. *Sens. Bio-Sensing Res.*, 20, 47–54.
- [70] Mengü, D. (2017). *Camsı Karbon ve Modifiye Edilmiş Camsı Karbon Elektrotlar Kullanılarak Sülfametoksazol'ün Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [71] Nagarajan, S., Vairamuthu, R., Angamuthu, R., Venkatachalam, G. (2019). Electrochemical fabrication of reusable pencil graphite electrodes for highly sensitive , selective and simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *J. Electroanal. Chem.*, 846, 113156.
- [72] Purushothama, H.T. ve Nayaka, Y.A. (2017). Electrochemical study of hydrochlorothiazide on electrochemically pre-treated pencil graphite electrode as a sensor. *Sens. Bio-Sensing Res.*, 16, 12–18.
- [73] Young, A.J., Eisen, C., Rubio, G.M.D.M., Chin, M., Reithofer, M.R. (2019). pH responsive histidin-2-ylidene stabilized gold nanoparticles. *J. Inorg. Biochem.*, 110707.
- [74] Firouzi, M., Reza, M. ve Izadi-najafabadi, R. (2019). Effect of low dose gamma ray on the plasmonic behavior of gold nanoparticle. *Radiat. Phys. Chem.*, 159, 190–194.

- [75] Anjana, P.M., Bindhu, M.R. ve Rakhi, R.B. (2019). Materials Science for Energy Technologies Green synthesized gold nanoparticle dispersed porous carbon composites for electrochemical energy storage. *Mater. Sci. Energy Technol.*, 2, 389–395.
- [76] Nazarpour, S., Hajian, R. ve Hosseini, M. (2020). A novel nanocomposite electrochemical sensor based on green synthesis of reduced graphene oxide / gold nanoparticles modified screen printed electrode for determination of tryptophan using response surface methodology approach. *Microchem. J.*, 154, 104634.
- [77] Ghoreishi, S.M., Behpour, M. ve Saedinejad, F. (2012). Electrochemical determination of tryptophan , uric acid and ascorbic acid at a gold nanoparticles modified carbon paste electrode. *Anal. Methods*, 4, 2447–2453.
- [78] Scott, K. (2016). Electrochemical principles and characterization of bioelectrochemical systems. *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*, 2, 29-66. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-375-1.00002-2>
- [79] İlkbaş, S. (2016). *Biyolojik Öneme Sahip Bazı Moleküllerin Vücut Sıvılarından Tayinine Yönelik Modifiye Elektrot Temelli Sensör Geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [80] Kurbanoglu, S., Uslu, B. ve Ozkan, S.A. (2017). Carbon-based nanostructures for electrochemical analysis of oral medicines. *Nanostructures for Oral Medicine*, 28, 885-938.
- [81] Catarino, S., Lima, R. ve Minas, G. (2017). Smart devices: Lab-on-a-chip. *Elsevier Ltd*.
- [82] Bayram, B. (2011). Effect of a Diet Rich in Olive Oil Phenolics on Age-Related Changes in Mouse Model of Ageing and HPLC Analysis of Olive Oil Phenolics with Electrochemical Detector. Doktora Tezi. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [83] Kurbanoglu, S., Altay, M. ve Ozkan, S.A. (2018). Electrochimica Acta Recent developments on electrochemical flow injection in pharmaceuticals and biologically important compounds. *Electrochim. Acta*, 287,135–148.
- [84] Mansour F.R. ve Danielson, N.D. (2012). Reverse flow-injection analysis. *Trends Anal. Chem.*, 40, 1–14.

- [85] Baval, D., Economou, A., Zima, J., Barek, J., Dejmekova, H. (2018). Simultaneous determination of tert -butylhydroquinone, propyl gallate, and butylated hydroxyanisole by flow-injection analysis with multiple-pulse amperometric detection. *Talanta*, 178, 231–236.
- [86] De Faria, L.V., Lisboa, T.P., de Farias, D.M., Araujo, F.M., Machado, M.M., de Sousa, R.A., Matos, M.A.C., Munoz, R.A.A., Matos, R.C. (2020). Direct analysis of ascorbic acid in food beverage samples by flow injection analysis using reduced graphene oxide sensor. *Food Chem.*, 319, 126509.
- [87] Ayaz, S., Dilgin, Y. ve Apak, R. (2020). Flow injection amperometric determination of hydrazine at a cupric- neocuproine complex / anionic surfactant modified disposable electrode. *Microchem. J.*, 159, 105457.
- [88] Ayaz, S., Karakaya, S., Emir, G., Giray, D., Dilgin, Y. (2020). A novel enzyme-free FI-amperometric glucose biosensor at Cu nanoparticles modified graphite pencil electrode. *Microchem. J.*, 154, 104586.
- [89] McCormick, W., Muldoon, C. ve McCrudden, D. (2021). Electrochemical flow injection analysis for the rapid determination of reducing sugars in potatoes. *Food Chem.*, 340, 127919.
- [90] Suprun, E.V., Karpova, E.V., Radko, S.P., Karyakin, A.A. (2020). Electrochimica Acta Advanced electrochemical detection of amino acids and proteins through flow injection analysis and catalytic oxidation on Prussian Blue. *Electrochim. Acta*, 331, 135289.
- [91] Liu, X., Hu, Y., Sheng, X., Peng, Y., Bai, J., Lv, Q., Jia, H., Jiang, H., Gao, Z. (2017). Rapid high-throughput detection of diethylstilbestrol by using the arrayed langasite crystal microbalance combined with gold nanoparticles through competitive immunoassay. *Sensors Actuators B Chem.*, 247, 245–253.
- [92] Han, H., Kim, B., Lee, S.G., Kim, J. (2013). An optimised method for the accurate determination of zeranol and diethylstilbestrol in animal tissues using isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Chem.*, 140, 44–51.
- [93] Bin Chen, X., Wu, Y.L. ve Yang, T. (2011). Simultaneous determination of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol in bovine milk by isotope dilution ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 879, 799–803.

- [94] Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A.V., Hernández-Borges, J. ve Rodríguez-Delgado, M.Á. (2017). Multiresidue determination of estrogens in different dairy products by ultra-high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1496, 58–67.
- [95] Bai, J., Zhang, X., Peng, Y., Hong, X., Liu, Y., Jiyang S., Ning B., Gao, Z. (2017). Ultrasensitive sensing of diethylstilbestrol based on AuNPs/MWCNTs-CS composites coupling with sol-gel molecularly imprinted polymer as a recognition element of an electrochemical sensor. *Sensors Actuators B Chem.*, 238, 420–426.
- [96] Liu, S., Lin, Q., Zhang, X., He, X., Xing, X., Lian, W., Li, J., Cui, M., Huang J. (2012). Electrochemical immunosensor based on mesoporous nanocomposites and HRP-functionalized nanoparticles bioconjugates for sensitivity enhanced detection of diethylstilbestrol. *Sensors Actuators, B Chem.*, 166–167, 562–568.
- [97] Chen, X., Shi, Z., Hu, Y., Xiao, X., Li, G. (2018). A novel electrochemical sensor based on Fe₃O₄-doped nanoporous carbon for simultaneous determination of diethylstilbestrol and 17 β -estradiol in toner. *Talanta*, 188, 81–90.
- [98] Peng, L., Dong, S., Xie, H., Gu, G., He, Z., Lu, J., Huang, T. (2014). Sensitive simultaneous determination of diethylstilbestrol and bisphenol A based on Bi₂WO₆nanoplates modified carbon paste electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 726, 15–20.
- [99] Ji, L., Wang, Y., Wu, K., Zhang, W. (2016). Simultaneous determination of environmental estrogens: Diethylstilbestrol and estradiol using Cu-BTC frameworks-sensitized electrode. *Talanta*, 159, 215–221.
- [100] Lu, D., Lin, S., Wang, L., Shi, X., Wang, C., Zhang, Y. (2012). Electrochimica Acta Synthesis of cyclodextrin-reduced graphene oxide hybrid nanosheets for sensitivity enhanced electrochemical determination of diethylstilbestrol. *Electrochim. Acta*, 85, 131–138.
- [101] He, X., Mei, X., Wang, J., Lian, Z., Tan, L., Wu, W. (2016). Determination of diethylstilbestrol in seawater by molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Mar. Pollut. Bull.*, 102, 142–147.

- [102] Yang, Y., Chen, J. ve Shi, Y. (2012). Talanta Determination of diethylstilbestrol in milk using carbon nanotube-reinforced hollow fiber solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 97, 222–228.
- [103] Reuvers, Th., Perogordo, E., Jimenez, R. (1991). Rapid screening method for the determination of diethylstilbestrol in edible animal tissue by column liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 564, 477–484.
- [104] Liao, S., Wu, X. ve Xie, Z. (2005). Determination of some estrogens by flow injection analysis with acidic potassium permanganate–formaldehyde chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 537, 189–195.
- [105] Passos, M.L.C. (2008). “Determination of Metoprolol, Acebutolol and Propranolol in Pharmaceutical Formulations using the Same SIA System. *J. Branz. Chem. Soc.*, 19, 563–568.
- [106] Tsogas, G.Z., Stergiou, D.V., Vlessidis, A.G., Evmiridis, N.P. (2005). Development of a sensitive flow injection-chemiluminescence detection method for the indirect determination of propranolol. *Anal. Chim. Acta*, 541, 151–157.
- [107] Sedghamiz, T., Ghalami, F., Sedghamiz, E., Bahrami, M. (2018). Chiral recognition of propranolol enantiomers by chiral ionic liquid: A quantum chemical calculation analysis. *Comput. Theor. Chem.*, 1140. 38–48.
- [108] Zhou, R.D., Li, L.S., Cheng, B.P., Nie, G.Z., Zhang, H.F. (2014). Enantioseparation and determination of propranolol in human plasma on a new derivatized β -cyclodextrin-bonded phase by HPLC. *Fenxi Huaxue/ Chinese J. Anal. Chem.*, 42, 1002–1009.
- [109] Venkatesh, G., Ramanathan S., Mansor S.M., Nair, N.K., Sattar, M.A., Croft, S.L., Navaratnam V. (2007). Development and validation of RP-HPLC-UV method for simultaneous determination of buparvaquone, atenolol, propranolol, quinidine and verapamil: A tool for the standardization of rat in situ intestinal permeability studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43, 1546–1551.
- [110] Gao, K., Fu, J., Xue, Q., Fu, J., Fu, K., Zhang, A., Jiang, G. (2019). Direct determination of free state low molecular weight compounds in serum by online TurboFlow SPE HPLC-MS/MS and its application. *Talanta*, 194, 960–968.

- [111] Yang, Y., Cao, Y., Jiang, J., Lu, X., Ma, J., Pang, S., Li, J., Liu, Y., Zhou, Y., Guan, C. (2019). Comparative study on degradation of propranolol and formation of oxidation products by UV/H₂O₂ and UV/persulfate (PDS). *Water Res.*, 149, 543–552.
- [112] Brunetto M.R., Clavijo, S., Delgado, Y., Orozco, W., Gallignani, M., Ayala, C., Cerda, V. (2015). Development of a MSFIA sample treatment system as front end of GC-MS for atenolol and propranolol determination in human plasma. *Talanta*, 132, 15–22.
- [113] Hadzija, B.W. ve Mattocks A.M. (1978). Quantitative TLC Determination of Propranolol in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 1307–1309.
- [114] Servais A., Rousseau A., Fillet, M., Loösadze, K., Salgado, A., Crommen, J., Chankvetadze, B. (2010). Separation of propranolol enantiomers by CE using sulfated β -CD derivatives in aqueous and non-aqueous electrolytes: Comparative CE and NMR study. *Electrophoresis*, 31, 1467–1474.
- [115] Yang, L., Tucker, I.G. ve Østergaard, J. (2011). Effects of bile salts on propranolol distribution into liposomes studied by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 56, 553–559.
- [116] Morris, K., Billiot, E., Billiot, F., Hoffman, C., Gladis, A., Lipkowitz, K., Southerland, W., Fang, Y. (2015). Molecular dynamics simulation and NMR investigation of the association of the β -blockers atenolol and propranolol with a chiral molecular micelle. *Chem. Phys.*, 457, 133–146.
- [117] El-Ries, M.A., Abou Attia, F.M. ve Ibrahim, S.A. (2000). AAS and spectrophotometric determination of propranolol HCl and metoprolol tartrate. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, 179–187.
- [118] Housaindokht, M.R., Rouhbakhsh Zaeri, Z., Bahrololoom, M., Chamani, J., Bozorgmehr, M.R. (2012). Investigation of the behavior of HSA upon binding to amlodipine and propranolol: Spectroscopic and molecular modeling approaches. *Spectrochim. Acta-Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 85, 79–84.
- [119] El-Ries, M.A., Abou-Sekkina, M.M. ve Wassel, A.A. (2002). Polarographic determination of propranolol in pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 837–842.

- [120] Pardo, M.T.A. (2003). Flow injection-chemiluminescence determination of propranolol in pharmaceutical preparations. *Anal. Chim. Acta*, 488, 81–88.
- [121] Hui-Xiang, L.I., Xiao-li, X.U., Hui, C., Song, Z., Ji-lie, K. (2012). Fabrication of Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor for Selective Detection of Propranolol Hydrochloride. *Chinese J. Anal. Chem.*, 40, 817–822.
- [122] Alizadeh, T. ve Allahyari, L. (2013). Electrochimica Acta Highly-selective determination of carcinogenic derivative of propranolol by using a carbon paste electrode incorporated with nano-sized propranolol-imprinted polymer. *Electrochim. Acta*, 111, 663–673.
- [123] Kun, Z., Shuai, Y., Dongmei, T., Yuyang, Z. (2013). Electrochemical behavior of propranolol hydrochloride in neutral solution on calixarene/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Jounal Electroanal. Chmistry*, 709, 99–105.
- [124] Hezard, T., Fajerweg, K., Evrard, D., Collière, V., Behra, P., Gros, P. (2012). Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg (II) trace analysis. *J. Electroanal. Chem.*, 664, 46–52.

ÖZGEÇMİŞ

ORCID No : 0000-0002-6218-8227
Adı Soyadı : Ayşegül ÖZBAL
Doğum Yeri ve Yılı : Söğüt, 1994
Yabancı Dil : İngilizce
E-Posta : aysegul.ozball@gmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi

Araştırma Görevlisi: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi–Fen Edebiyat Fakültesi-
Kimya Bölümü-Fizikokimya Anabilim Dalı

04.2020–Devam Ediyor

Araştırma Görevlisi: Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi-Eczacılık Fakültesi-Temel
Eczacılık Bilimleri Bölümü-Analitik Kimya Anabilim Dalı

04.2019–04.2020

Lisans : Anadolu Üniversitesi-Fen Fakültesi, Kimya (%30 İngilizce)
09.2012-06.2017

Lise : Gazi Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi, Kimya
09.2008-06.2012

Yayın Faaliyetleri:

Dergi Adı : Sensors and Actuators B: Chemical

Makale Adı: Preparation of a double-step modified carbon paste electrode for the
voltammetric determination of protham via bulk modification with fumed silica and
drop-casting of maghemite-modified fumed silica nanocomposite

Cilt : 255

Sayfa : 1517-1524

Ödülleri:

2017, Birinci, Fakülte Birinciliği, Anadolu Üniversitesi-Fen Fakültesi