T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MATEMATİK VE FEN BİLİMLERİ EĞİTİMİ ANABİLİM DALI

BİR ANTİPARKİNSON İLAÇ ETKEN MADDESİ OLAN ENTAKAPON'UN KALEM GRAFİT ELEKTROTLA ELEKTROKİMYASAL TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KADER VURAL

Tez Danışmanı
Doç. Dr. DİDEM GİRAY DİLGİN

ÇANAKKALE – 2024

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MATEMATİK VE FEN BİLİMLERİ EĞİTİMİ ANABİLİM DALI

BİR ANTİPARKİNSON İLAÇ ETKEN MADDESİ OLAN ENTAKAPON' UN KALEM GRAFİT ELEKTROTLA ELEKTROKİMYASAL TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KADER VURAL

Tez Danışmanı
Doç. Dr. DİDEM GİRAY DİLGİN

Bu çalışma, BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri) kurumu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2022-4277

ÇANAKKALE – 2024

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Kader VURAL tarafından Doç. Dr. Didem GİRAY DİLGİN yönetiminde hazırlanan ve **08/08/2024** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Bir Antiparkinson İlaç Etken Maddesi Olan Entakapon'un Kalem Grafit Elektrotla Elektrokimyasal Tayini**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Doç. Dr. Didem GİRAY DİLGİN (Danışman)	……
Doç. Dr. Serkan KARAKAYA	……
Doç. Dr. Füsun PELİT	…….

Tez No : 10660908
Tez Savunma Tarihi : 08/08/2024

……
Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL
Enstitü Müdürü

../../20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Kader VURAL
08/08/2024

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Didem GİRAY DİLGİN'e, yolculuğumda bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren Prof. Dr. Yusuf DİLGİN ve Doç. Dr. Serkan KARAKAYA'ya, laboratuvarda hocam, kahve yanında arkadaşım, derdim olduğunda sırdaşım olan Arş. Gör. Gamze EMİR GÜNAY, Arş. Gör. Selen AYAZ ve Doktora öğrencisi Teslime ERŞAN'a, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen canım dostum Dilara TONYA'ya, hayatımın her evresinde bana destek olan okuyup ayaklarımın üzerinde durmam için elinden gelen maddi ve manevi desteği veren kıymetlim canım annem Hatice ÇİFTCİ'ye ve kardeşim Bahar VURAL'a, her konuda desteğini esirgemeyen beni sürekli motive edip elimi tutan biricik yol arkadaşım Mustafa BAŞTÜRK'e ve son olarak bu yolda azimle devam eden kendime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecimde TÜBİTAK 120Z963 numaralı projede 15 ay bursiyer olarak çalışmış olup, desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca Laboratuvar olanaklarından yararlandığım Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Anabilim Dalı, Kimya Eğitimi Bilim Dalı Bölüm Başkanlığı'na ve Fen Fakültesi Kimya Bölüm Başkanlığı'na da teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezinin tamamı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2022-4277 proje numarasıyla desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı BAP'a teşekkürü borç bilirim.

Kader Vural

Çanakkale, 2024

ÖZET

BİR ANTİPARKİNSON İLAÇ ETKEN MADDESİ OLAN ENTAKAPON'UN KALEM GRAFİT ELEKTROTLA ELEKTROKİMYASAL TAYİNİ

Kader VURAL
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Matematik Ve Fen Bilimleri Eğitimi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Didem GİRAY DİLGİN
08/08/2024, 69

Bu tez çalışmasının amacı, kolay temin edilebilen, tek kullanımlık, elektrokimyasal olarak oldukça reaktif ve çok avantajlı kalem grafit elektroda (PGE) dayalı olarak entakapon'un (ETK) seçici ve oldukça hassas tayinini gerçekleştirmektir. ETK tayini için çeşitli modifiye elektrotlar rapor edilmiş olmasına rağmen, PGE hem yükseltgenmeye hem de indirgenmeye dayalı ETK tayini için kullanılmamıştır. Bu nedenle, ilk olarak, ETK'nın elektrokimyasal davranışı, destek elektrolitin pH'sına ve tarama hızlarına bağlı olarak ETK'nın döngüsel voltammogramları kaydedilerek incelenmiştir. Sonuçlar, PGE'de ETK'nın hem yükseltgenmesinin hem de indirgenmesinin difüzyon kontrollü bir süreçle gerçekleştiğini göstermiştir, çünkü her iki pik akımı da tarama hızının karekköüne bağlı olarak doğrusal bir şekilde artmıştır. Analitik performans çalışmaları, optimize edilmiş koşullar altında 0,1 M H_2SO_4 içinde ETK'nın diferansiyel puls voltammogramları (DPV'ler) kaydedilerek gerçekleştirilmiştir. Puls zamanı, puls genliği, basamak potansiyeli ve tarama hızı +530 mV'deki katodik pik (K1) ve -120 mV'deki ikinci katodik pik (K2) için 1 ms, 200 mV, 10 mV ve 50 mV/s olarak optimize edilmiştir. Benzer şekilde +550 mV'deki anodik pik (A1) için 1 ms, 200 mV, 7 mV ve 50 mV/s olarak optimize edilmiştir. Yaklaşık +530 mV'daki K1, -120 mV'deki K2 ve +550 mV'deki A1 sırasıyla 1 -1000 nM, 2,5 - 1500 nM ve 2,5- 1000 nM aralığında doğrusal yanıtlara ve 0,36, 0,79 ve 0,69 nM belirtme alt sınırlarına (Limit of Dedection, LOD) sahip olduğu tespit edilmiştir. İki farklı konsantrasyonda (50 ve 250 veya 500 nM) ETK için % 5'in altındaki RSD değerleri, önerilen elektrodun kabul edilebilir gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermiştir. Son olarak, önerilen yöntem karbidoba, levodapa ve ETK'yı birarada içeren

farmasötik tablette ETK'yı tayin etmek için uygulanmış ve tablette belirtilen 200 mg değerine oldukça yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, ETK eklenmiş yapay idrar örneği ile yapılan çalışmalarda ise % 100'e yakın geri kazanımlar elde edilmiştir. Tüm bu sonuçlar, geliştirilen voltammetrik yöntemle ETK'nın doğru, seçici ve hassas bir şekilde gerçek örneklerde tayin edilebileceğini yansıtmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Entakapon, Kalem Grafit Elektrot, Voltammetri, Farmasötik Analiz

ABSTRACT

ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF ENTACAPONE, AN ANTIPARKINSON DRUG ACTIVE INGREDIENT, USING PENCIL GRAPHITE ELECTRODE

Kader VURAL

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Department of Mathematics and Science Education

Advisor: Doç. Dr. Didem GİRAY DİLGİN

08/08/2024, 69

The aim of this thesis is to perform selective and highly sensitive determination of entacapone (ETC) based on an easily available, disposable, electrochemically highly reactive, and very advantageous pencil graphite electrode (PGE). Although various modified electrodes have been reported for the determination of ETC, PGE has not been used for the determination of ETC based on both its oxidation and reduction. Thus, firstly, the electrochemical behavior of ETC was studied by recording cyclic voltammograms of ETC based on the pH of the supporting electrolyte and scan rates. The results show that both oxidation and reduction of ETC at PGE are performed by a diffusion-controlled process, because both peak currents increased linearly based on the square root of the scan rate. Analytical performance studies were performed by recording differential pulse voltammograms (DPVs) of ETC in 0.1 M H_2SO_4 under optimized conditions. Pulse time, pulse amplitude, step potential and scan rate were optimized as 1 ms, 200 mV, 10 mV and 50 mV/s for the cathodic peak at +530 mV (C1), the second cathodic peak at -120 mV (C2) and as 1 ms, 200 mV, 7 mV and 50 mV/s for an anodic peak at +550 mV (A1), respectively. K1 at +530 mV, K2 at -120 mV and A1 at +550 mV have linear responses in the range of 1-1000 nM, 2.5-1500 nM and 2.5-1000 nM with a limit of detection (LOD) of 0.36, 0.79 and 0.69 nM, respectively. The relative standart deviation (RSD) values below 5 % for two different concentrations (50 and 250 or 500 nM) of ETC indicated that the proposed electrode has acceptable intra- and inter-day reproducibility. Finally, the proposed method was applied to the determination of ETC in a pharmaceutical tablet containing carbidoba,

levodopa and ETC together and results were obtained very close to the 200 mg value that labelled on the tablet. In addition, nearly 100 % recoveries were obtained from the studies performed for the artificial urine sample spiked wtih ETK. All these results reflect that the developed voltammetric method can be used for the accurate, selective and sensitive determination of ETC in real samples.

Keywords: Entacapone, Pencil Graphite Electrode, Voltammetry, Pharmaceutical Analysis

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI……... i
ETİK BEYAN…… ii
TEŞEKKÜR…….. iii
ÖZET ……..…….. iv
ABSTRACT …….. vi
İÇİNDEKİLER ……..…… viii
SİMGELER ve KISALTMALAR……..…… xi
TABLOLAR DİZİNİ…….…. xv
ŞEKİLLER DİZİNİ……..……...…….….. xvi

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ

1.1. Parkinson Hastalığı ve Belirtileri ...…….…….. 1
1.2. Entakapon ....……..……... 3

İKİNCİ BÖLÜM
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
MATERYAL YÖNTEM 10

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ....…….…….…..... 10
3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler …… 10
3.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler …… 12
3.3.1. 0,1 M H_2SO_4 Çözeltisinin Hazırlanması ……... 12
3.3.2. 0,5 M H_2SO_4 Çözeltisinin Hazırlanması ……... 12
3.3.3. Britton Robinson Tampon (BRT) Çözeltisi (pH: 2,0-12,0 arası) …… 12

3.3.4. Stok 13 mM ETK Çözeltisinin Hazırlanması …… 13
3.3.5. ETK'nın Voltammetrik Yanıtına Girişim Yapabilecek Maddelerin Hazırlanması …….. 13
3.3.6. ETK'nın Geri Kazanım Çalışmasında Kullanılan Yapay İdrar Çözeltisinin Hazırlanması ……. 13
3.3.7. Farmasötik Tablet Çözeltisinin Hazırlanması …… 14
3.4. Gerçekleştirilen Elektrokimyasal Ölçümler …….. 14
3.5. ETK'nın Elektrokimyasal Davranışının CV Yöntemi ile İncelenmesi ……. 14
3.5.1. CV'de pH Optimizasyonu Çalışması …… 15
3.5.2. CV'de Tarama Hızı Çalışmaları ……... 15
3.6. ETK'nın Elektrokimyasal Davranışının DPV Yöntemi ile İncelenmesi …….. 15
3.7. DPV'de pH Optimizasyonu Çalışmaları ..……..... 15
3.8. DPV'de Çeşitli Parametrelerin Optimizasyonu ..……..... 16
3.8.1. Puls Zamanı (t_{pulse}: Pulse Time) ……..…… 16
3.8.2. Pulse Genliği (E_{amp}: Pulse Amplitude) …….. 16
3.8.3. Basamak Potansiyeli (E_{step}: E Step) …… 16
3.8.4. Tarama Hızı (*v*: Scan rate) ……..…… 17
3.9. ETK'nın Voltammetrik Tayinine Yönelik Analitik Performans Çalışmaları ……. 17
3.10. Girişim Çalışmaları ……...……..... 17
3.11. Yapay İdrarda ETK'nın Geri Kazanım Çalışmaları …….... 18
3.12. ETK'nın Farmasötik Tablette Tayini ……. 18

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI 20

4.1. ETK'nın Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi ……... 20
4.1.1. Yalın PGE'de Destek Çözelti pH'sının Optimizasyonu …… 20
4.1.2. Tarama Hızının (*v*) ETK'nın Elektrokimyasal Davranışına Etkisinin İncelenmesi …… 23
4.1.3. ETK'nın DPV Yöntemiyle Katodik Bölgedeki Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi …….. 26
4.1.4. ETK'nın DPV Yöntemiyle Anodik Bölgedeki Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi …….. 36
4.1.5. Optimum Koşullar Altında DPV Yöntemiyle ETK'nın Analitiksel Parametrelerinin Belirlenmesi ……... 40
4.1.6. Girişim Etkisinin İncelenmesi ….……..…… 48

4.1.7. ETK'nın Farmasötik Tablette Tayini ……..…… 51
4.1.8. ETK'nın Yapay İdrarda Geri Kazanım Çalışmaları ……... 53

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER 57

KAYNAKÇA ...……. 61

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde Oranı
°C	Santigrat Derece
A1	Birinci Yükseltgenme Piki
Ag	Gümüş
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş Klorür
Ag@Met-MWCNT/GCE	Metformin Tutturulmuş Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Yüzeyine Gümüş Nanoparçacıkları Elektrokimyasal Olarak Biriktirilmiş Camsı Karbon Elektrot
$AgNO_3$	Gümüş Nitrat
AgNPs	Gümüş Nanoparçacıklar
Ar	Argon
BRT	Britton Robinson Tampon
$C_{10}H_{14}N_2O_4$	Karbidopa
$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sükroz
$C_5H_4N_4O_3$	Ürik Asit
$C_6H_{12}O_6$	Glikoz
$C_6H_{12}O_6$	Fruktoz
$C_6H_8O_6$	L-Askorbik Asit
$C_8H_{11}NO_2$	Dopamine
$C_9H_{11}NO_4$	Levodopa
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
CH_3COOH	Asetik Asit
CH_4N_2O	Üre
cm	Santimetre
cm^2	Santimetre Kare
COMT	Katekol -O- Metiltransferaz
CPE	Karbon Pasta Elektrot
$CuCl_2$	Bakır (II) Klorür
CV	Döngüsel Voltammetri (Cyclic voltammetry)
d	Yoğunluk
dk	Dakika

DME	Damlayan Cıva Elektrot (Dropping Mercury Electrode)
DMF	Dimetilformamid
DPCAdSV	Diferansiyel Puls Katodik Adsorptif Sıyırma Voltammetrisi
DPV	Diferansiyel Puls Voltammetrisi
DPP	Diferansiyel Puls Polarografi
E	Elektrokimsayal Potansiyel
e^-	Elektron
E_{amp}	Puls Genliği (Pulse Amplitude)
EDX	Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektroskopisi
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
E_{step}	Basamak Potansiyeli (E Step)
ETK	Entakapon
g	Gram
g/ml	Gram/Mililitre
GCE	Camsı Karbon Elektrot
GNPs	Grafen Nanoplatletler
grCNTs	Çok Dalgalı Karbon Nanotüpler
H^+	Proton
H_2SO_4	Sülfürik Asit
H_3BO_3	Borik Asit
H_3PO_4	Fosforik Asit
HCl	Hidrojen Klorür
HMDE	Asılı Cıva Damla Elektrodu (Hanging Mercury Drop Electrode)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Hz	Hertz
I	Akım Şiddeti
K1	Birinci İndirgenme Piki
K2	İkinci İndirgenme Piki
KCl	Potasyum klorür
KHz	Kilohertz
L	Litre
LC/MS-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
Ln	Doğal Logaritma

LOD	Gözlenebilme Sınırı (LOD; Limit of Detection)
Log	Logaritma
LOQ	Tayin Sınırı (LOQ; Limit of Quantification)
M	Molar
Met/Pd/CPE	Metiyonin/Paladyum Nanopartikülleri Modifiye Karbon Pasta Elektrot
Met@MWCNT	Metformin Tutturulmuş Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
mg	Miligram
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
MIP	Moleküler Baskılı Polimer
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mol/L	Mol/Litre
ms	Milisaniye
mV	Milivolt
mV/s	Milivolt/Saniye
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
N	Azot
Na_2HPO_4	Disodyum Fosfat
Na_2SO_4	Sodyum Sülfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaH_2PO_4	Monosodyum Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
ng/L	Nanogram/Litre
NH_2	Amino Radikal
NH_2-*f* MWCNT	NH_2 ile Fonksiyonelleştirilmiş Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
NH_4Cl	Amonyum Klorür
nM	Nanomolar
O_2	Oksijen
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffer Solution)
PGE	Kalem Grafit Elektrot

Pt	Platin
RGO	İndirgenmiş Grafen Oksit
RSD	Bağıl Standart Sapma
S@SnO_2NP	Sülfür-Kalay Oksit Nanopartikül
SD	Standart Sapma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
$s_{kör}$	Kör Standart Sapması
SPE	Ekran Baskılı Elektrot (Screen Printed Electrode)
SWCAdSV	Kare Dalga Katodik Adsorptif Sıyırma Voltammetrisi
SWV	Kare Dalga Voltammetrisi
t_{pulse}	Puls Zamanı (Pulse Time)
UPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
V	Volt
V	Tarama Hızı (Scanrate)
XRD	X-Işınları Difraksiyonu
A	Alfa
µA	Mikroamper
µM	Mikromolar
Ω	Ohm

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Yayınlanmış diğer ETK sensörleri ile bu çalışmada elde edilen analitik performans değerlerinin karşılaştırılması.	46
Tablo 2	Anodik ve katodik bölgeden (Katodik bölgede 50 ve 500 nM; Anodik bölgede 50 ve 250 nM ETK için) edilen gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları (n= 3).	49
Tablo 3	Girişimcilerin yalın PGE'de ETK'nın yükseltgenme (A1) DPV yanıtı üzerindeki etkisi (sabit ETK konsantrasyonu 0,5 µM ve n= 3).	50
Tablo 4	Girişimcilerin yalın PGE'de ETK'nın indirgenme (K1) DPV yanıtı üzerindeki etkisi (sabit ETK konsantrasyonu 0,25 µM ve n= 3).	51
Tablo 5	Girişimcilerin yalın PGE'de ETK'nın indirgenme (K2) DPV yanıtı üzerindeki etkisi (sabit ETK konsantrasyonu 0,25 µM ve n= 3).	52
Tablo 6	Farmasötik örnekten elde edilen uygulanabilirlik sonuçları (n= 3).	54
Tablo 7	Yapay idrardan elde edilen uygulanabilirlik sonuçları (n= 3).	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	ETK'nın kimyasal yapısı.	3
Şekil 2	A) Kalem grafit elektrodun mekanik kaleme sabitlenmesi ve elektriksel bağlantısı ve B) üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi.	11
Şekil 3	Yalın PGE'de pH'sı A) 2,0-6,0 ve B) 7,0-10,0 arasında değişen 0,1 M KCl içeren BRT çözeltisi, C) 0,1 M ve 0,5 M H_2SO_4 çözeltileri ortamında 250 µM ETK'nın kaydedilen CV'leri (ν= 50 mV/s).	21
Şekil 4	A) ETK için önerilen elektrokimyasal yükseltgenme mekanizması B) ETK için önerilen elektrokimyasal indirgeme mekanizması.	22
Şekil 5	Şekil 3'de kaydedilen CV'lerden A) +730 mV'daki yükseltgenme B) -220 mV'daki indirgenme pikleri için elde edilen I(µA)- pH ve E(mV) – pH grafikleri. (a) 0,1 M H_2SO_4 (b) 0,5 M H_2SO_4 (n= 3).	23
Şekil 6	Yalın PGE'de 250 µM ETK'nın 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit ortamında artan tarama hızlarına bağlı kaydedilen CV'leri.	24
Şekil 7	Anodik bölge için Şekil 6'da kaydedilen CV'lerden elde edilen (A) I(µA) – ν(mV/s), (B) I(µA) – $\nu^{1/2}$, (C) logI – logv ve (D) E(mV) – lnν grafikleri.	25
Şekil 8	Katodik bölge için Şekil 6'da kaydedilen CV'lerden elde edilen (A) -I(µA) – ν(mV/s), (B) -I(µA) – $\nu^{1/2}$, (C) -logI – logv ve (D) -E(mV) – lnν grafikleri.	26
Şekil 9	Yalın PGE'de 0,1 µM ETK'nın 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit ortamında katodik bölgede DPV yöntemiyle kaydedilen voltammogramı (K1: +530 mV'da 1.indirgenme piki, K2: -120 mV'da 2.indirgenme piki).	27
Şekil 10	A) Yalın PGE'de 0,5 µM ETK'nın 0,1 M H_2SO_4 (a) ve 0,1 M KCl içeren (pH 2,0-6,0) BRT çözeltisi ortamında kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV; t_{pulse}= 2 ms) B) K1 ve C) K2 indirgenme pikleri için elde edilen -I(µA)-pH histogramları (n= 3).	28
Şekil 11	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı puls zamanlarında K1 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50	29

	mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – t_{pulse}(ms) grafiği (n= 3).	
Şekil 12	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı puls genliklerinde K1 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; t_{pulse}= 1 ms), B) -I(µA) – E_{Amp}(mV) grafiği (n= 3).	30
Şekil 13	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı basamak potansiyellerinde K1 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – E_{step}(mV) grafiği (n= 3).	31
Şekil 14	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı tarama hızlarında K1 için kaydedilen DPV'leri (t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – ν(mV/s) grafiği (n= 3).	32
Şekil 15	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı puls zamanlarında K2 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – t_{pulse}(ms) grafiği (n= 3).	33
Şekil 16	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı puls genliklerinde K2 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; t_{pulse}= 1 ms), B) -I(µA) – E_{Amp}(mV) grafiği (n= 3).	34
Şekil 17	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı basamak potansiyellerinde K2 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – E_{step}(mV) grafiği (n= 3).	35
Şekil 18	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı tarama hızlarında K2 için kaydedilen DPV'leri (t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – ν(mV/s) grafiği (n= 3).	36
Şekil 19	A) Yalın PGE'de 1 µM ETK'nın 0,1 M H_2SO_4 (a) ve 0,1 M KCl içeren (pH 2,0-5,0) BRT çözeltisi ortamında A1 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV; t_{pulse}= 2 ms), B) A1 için I-pH histogramı (n= 3).	37
Şekil 20	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,5 µM ETK'nın farklı puls zamanlarında A1 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) I(µA) – t_{pulse}(ms) grafiği (n= 3).	38
Şekil 21	A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,5 µM ETK'nın farklı puls genliklerinde A1 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50	39

mV/s; E_{step}= 5 mV; t_{pulse}= 1 ms), B) I(µA) – E_{Amp}(mV) grafiği (n= 3).

Şekil 22 A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,5 µM ETK'nın farklı basamak potansiyellerinde A1 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{Amp}= 200 mV), B) I(µA) – E_{step}(mV) grafiği (n= 3). 40

Şekil 23 A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,5 µM ETK'nın farklı tarama hızlarında A1 için kaydedilen DPV'leri (t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) I(µA) – ν(mV/s) grafiği (n= 3). 41

Şekil 24 A) Yalın PGE'de 1. indirgenme (K1) piki için 0,1 M H_2SO_4 çözeltisinde değişen 1-2000 nM arasında artan ETK derişimlerinde kaydedilen DPV'ler (ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV) B) Artan ETK derişimine karşı pik akım grafiği, C) Doğrusal kalibrasyon eğrisi. 42

Şekil 25 A) Yalın PGE'de 2. indirgenme (K2) piki için 0,1 M H_2SO_4 çözeltisinde değişen 2,5-3000 nM arasında artan ETK derişimlerinde kaydedilen DPV'ler (ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV) B) Artan ETK derişimine karşı pik akım grafiği, C) Doğrusal kalibrasyon eğrisi. 43

Şekil 26 A) Yalın PGE'de yükseltgenme (A1) piki için 0,1 M H_2SO_4 çözeltisinde değişen 2,5-5000 nM arasında artan ETK derişimlerinde kaydedilen DPV'ler (ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV) B) Artan ETK derişimine karşı pik akım grafiği, C) Doğrusal kalibrasyon eğrisi. 44

Şekil 27 Elektrokimyasal hücrede 50 nM ETK içerecek şekilde seyreltilmiş farmasötik tablet çözeltilerine 50 nM standart ETK çözeltisi eklenmiş ((A), A1 piki; (C), K1 piki; (E), K2 piki için) standart ekleme DPV'leri. Voltammogramlar, 0,1 M H_2SO_4 içinde optimize edilmiş koşullar altında (K1 ve K2 piki için: v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV, A1 piki için: v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV) kaydedilmiştir. A1 (B), K1 (D) ve K2 (F) piklerine 50 nM standart ETK spike edilmiş farmasötik numune çözeltilerinin standart ekleme eğrileri. 53

Şekil 28 Elektrokimyasal hücrede 25 nM ETK içeren yapay idrar çözeltilerine 25 nM standart ETK çözeltisi eklenmiş ((A), A1 piki (C), K1 piki (E), K2 piki için) standart ekleme DPV'leri. Voltammogramlar, 0,1 M H_2SO_4 içinde optimize edilmiş koşullar altında (K1 ve K2 piki için: v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV, A1 piki için: v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV) kaydedilmiştir. A1 (B), K1 55

(D) ve K2 (F) piklerine 25 nM standart ETK spike edilmiş yapay idrar çözeltilerinin standart ekleme eğrileri.

Şekil 29 Elektrokimyasal hücrede 50 nM ETK içeren yapay idrar çözeltilerine 50 nM standart ETK çözeltisi eklenmiş ((A), A1 piki (C), K1 piki (E), K2 piki için) standart ekleme DPV'leri. Voltammogramlar, 0,1 M H_2SO_4 içinde optimize edilmiş koşullar altında (K1 ve K2 piki için: v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV, A1 piki için: v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV) kaydedilmiştir. A1 (B), K1 (D) ve K2 (F) piklerine 50 nM standart ETK spike edilmiş yapay idrar numune çözeltilerinin standart ekleme eğrileri. 56

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ

1.1. Parkinson Hastalığı ve Belirtileri

Parkinson hastalığının belirtileri çok eski belgelerde bulunmasına rağmen, ilk kesin tıbbi tanım 1817 yılında Dr. James Parkinson tarafından yazılmıştır (Goetz, 2011). İngiliz Dr. James Parkinson tarafından gerçekleştirilen "Titremeli Felç Üzerine Bir Deneme" adlı çalışmayla parkinson "titremeli felç" şeklinde tanımlanmıştır. Fakat felç hastalığı, parkinson hastalığı gibi vuku bulmadığı anlaşılmakta ve Dr. James'in felç tanımı hastalığı yanlış tanımlamaktadır (Çolakoğlu, 2012).

Parkinson hastalığı, 65 yaş üstü insanların yaklaşık % 1'inde, 85 yaş üstü insanlarda ise % 4-5 oranında görülen, ilerleyen dönemde sakatlığa yol açan yaygın nörolojik hastalıktır. Hastalığın en sık görüldüğü başlangıç yaşı yaklaşık 70 olmasına rağmen hastaların % 4'ünün 50 yaş altı bireyler olduğu saptanmıştır. Her yüz bin kişiden 16-19 kişide bu hastalık teşhis edilmektedir (Farrer, 2006; Patel vd., 2019).

Parkinson hastalığı, temelde dopamin içeren nöronların (sinir hücresi) dejenerasyonu ve bu hücrelerin azalması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu durum hareketin başlamasından ve düzenlenlenmesinden sorumlu olan bazal ganglionlar ve onun önemli bir parçası olan ‘‘substantia nigra’’ (kara çekirdek) denen yapıdaki nöronların kaybı sonucu ortaya çıkar. Beyin kabuğu altında iki yanlı olarak yer alan kara çekirdeklerde sinirler arası iletiyi sağlayan dopamin adlı nörotransmitter madde üretilmektedir. Dopamin aracılığıyla her bir kara çekirdek ve bağlantıları karşı beden yapısına etki eder. Bu hücrelerin azalması ile kara çekirdekte yeteri kadar dopamin salgılanamaz bu sebeple beden yapısında hareket yavaşlığı, kas sertliği, titreme ve ilerleyen süreçte duruş bozukluğu gibi Parkinson hastalığına ilişkin belirtileri ortaya çıkmaktadır. Genç yaştan itibaren insan hücrelerinde bu kayıp başlamaktadır, fakat beyin bu kaybı yüksek derecede tolere etme eğilimindedir. Ancak, bu kayıp % 80 ve üstü olduğunda belirtiler belirgin hale gelir. Nöronların dejenerasyonu yani ölümü sonucu, substantia nigra bölgesi karakteristik kara çekirdek formunu kaybederek yerine Lewy cisimciği denen mikroskobik olarak görülebilen patolojik yapılar oluşur. Lewy

cisimciği, beynin ve omuriliğin birçok değişik bölgesinde farklı oranlarda meydana gelmektedir ve mikroskop altında görülmesi sayesinde parkinson hastalığının patolojik tanısında önemli bir yere sahiptir. Günümüz teknolojisi, ileri görüntüleme cihazları ile substantia nigra bölgesindeki bu bozunmayı saptayarak hastalığı teşhis etmede önemli rol oynamaktadır (Apaydın vd., 2013; Çolakoğlu, 2012).

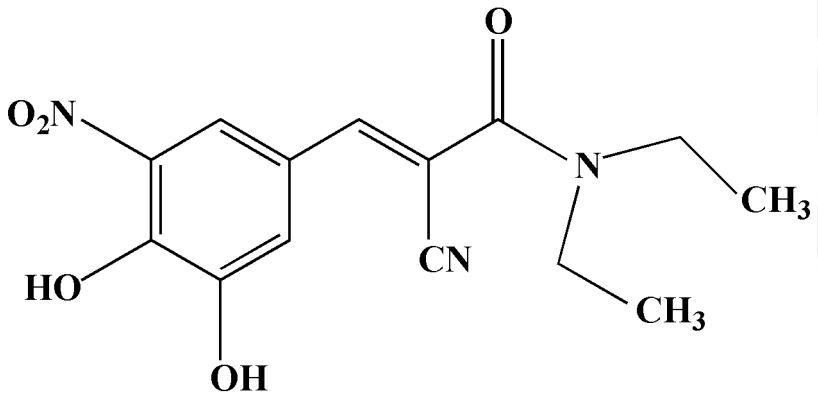
Parkinson hastalığı sinsice başlar ve son derece yavaş ilerleyerek yıllar içinde şiddeti artarak devam eder. Bu nedenle birçok hasta bunu yaşlılığın sebebi olarak düşünür ve hastalığının ne zaman başladığını tespit edemeyebilir. Hatta öyle ki hasta yakınları da bu belirtilerin yaşlılık kaynaklı olduğunu düşünebilir. Hastalığın ilk belirtileri kişiden kişiye değişebilmektedir. Hastaların % 70'lik büyük bir kısmı dinlenme halindeyken bacak, kol, el veya el parmaklarında meydana gelen titreme, geriye kalan % 30'luk kısmı ise günlük yaşamındaki hareketlerinde yavaşlama ve uzuv hareketlerinde kısıtlamalar ile hastalığın ilk belirtilerini yaşamaktadır. Hastalığın ilk belirtileri nasıl her insanda farklı ise ilerleme şekli, hızı ve şiddeti kişiden kişiye değişmektedir.

Parkinson hastalığının temelindde; titreme, denge bozukluğu, sertlik ve hareket yavaşlığı olmak üzere dört önemli belirtisi vardır. Titreme (tremor), hastalığın en temel belirtilerindendir ve hastalar en sık bu şikayet ile doktora başvurmaktadır. Genellikle elde ve ayakta titreme olarak kendini gösterir, fakat her hastada titreme bulgusu olmayabilir. Denge bozukluğu (postural instabilite), hastalığın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan ve hastaların öne doğru eğik bir şekilde durma eğilimidir. Sertlik (rijitide), parkinson hastalığına özel bir durum olup, uzuvlardaki kaslar dinlenme halindeyken yani gevşek haldeyken bile kasılı olma durumudur. Genellikle el ve ayak bileği, dirsek ve dizde gözlemlenir. Hareketlerde yavaşlama (bradikinezi), hasta günlük faaliyetleri sırasında yaptıkları yürüme, oturma, yazı yazma vb. fonksiyonlarında yavaşlama/azalma şeklinde gözlenir (Clarke, 2008; Hauser, 2007).

Parkinson hastalığının tedavisinde birçok yöntem ve strateji uygulanmaktadır. İlaç tedavisi, hastalığın belirtilerini önemli ölçüde azaltmaktadır. Dopamin, kan-beyin bariyerini geçemediği için dışardan dopamin takviyesi, parkinson hastalığının tedavisinde etkisizdir. Ancak, dopaminin eksikliği mevcut ilaç takviyesi ile dopamini taklit ederek hastalığın etkilerini azaltır.

1.2. Entakapon

Entakapon (ETK), idiyopatik parkinson hastalığından muzdarip hastalarda levodopa/karbidopa farmasötik formülasyonu ile kombinasyon halinde kullanılan bir katekol -O- metiltransferaz (COMT) inhibitörü olan bir nitrokatekol bileşiğidir (Aftab vd., 2019). Yeşilimsi sarı ya da sarı renkte toz formundadır. Kapalı formülü $C_{14}H_{15}N_3O_5$ ve kimyasal adı (2E)- 2- siyano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)-N,N-dietilprop-2-enamid ya da (E)-α-siyano-N,N-dietil-3,4-dihidroksi-5-nitrosinnamamid olan ETK'nın kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir (Burmaoğlu, 2017).



Şekil 1. ETK'nın kimyasal yapısı.

Parkinson hastalığı, beynin bir bölgesinde 'dopamin' adlı kimyasalın eksilmesi/salgılanmaması ile ilişkilidir (Öztürk Mutlu, 2019). Dopamin kan-beyin bariyerini geçemediği için dışardan dopamin takviyesi parkinson hastalığının tedavisinde etkisizdir. Ancak dopaminin bir öncüsü olan levodopa, kan-beyin bariyerini geçebilir ve dopaminerjik nöronlarda dopa dekarboksilaz tarafından dopamine dönüştürülebilir (Holm ve Spencer, 1999). Karbidopa, levodopayı beyne taşınması için daha uygun hale getiren ve tedavinin iyileştirilmesine neden olan dekarboksilaz inhibitörlerinden biridir (Shoghi Kalkhoran vd., 2018). Levodopa, karbidopa ve ETK üçlüsü parkinson hastalığının tedavisinde en etkin yöntemdir (Burmaoğlu, 2017).

Parkinson hastalığı tedavisinde ETK beklenen özelliklerinin dışında kritik yan etkilere de sahiptir (Naghian vd., 2021). Antiparkinsonizm için kullanılan aktif farmasötik bileşenlerin önemli bir bileşeni olan ETK'nın hem ilaç kalitesi ve kontrolünü sağlamak için farmasötik formülasyonlarda hem de insan sağlığı üzerindeki etkilerini görmek için idrar ve kan gibi biyolojik sıvılarda belirlenmesi çok önemlidir. (Piccini vd., 2000). Literatür incelendiğinde, HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), UPLC (Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi), LC/MS-MS (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi) gibi kromatografik yöntemler kullanılarak ve hassas ETK tayinleri gerçekleştirilmiştir (Paim vd., 2010; Bugamelli vd., 2011; Soukhova vd., 2011, Gumustas vd., 2014; Burmaoğlu ve Sağlık Aslan, 2020; Ramakrishna vd., 2005; Ribeiro vd., 2015; Belal vd., 2018; Wollmer ve Klein, 2017; Kumar vd., 2017; Devika vd., 2016; Purnachand vd., 2016; Konduru vd., 2018; Yadav vd., 2009; Mantena vd., 2015), Ayrıca, spektrofotometrik ve florimetrik tekniklerin kullanımına dayalı birçok analitik yöntemler de geliştirilmiştir (Koradia vd., 2009; Paim vd., 2008; Abdel Ghany vd., 2017; Magdy vd., 2024; Belal vd., 2017; Ahmadi vd., 2019; Chalikwar vd., 2012; Zolfagharifar vd., 2023). Kromatografik yöntemler, ETK'nın seçici, tekrarlanabilir ve hassas ölçümlerini sağlamakla birlikte, kromatografik ekipman ve yedek parçaların (kolon, dedektör, mobil faz vb.) yüksek maliyeti, iyi eğitimli personel ihtiyacı, fazla organik çözücü tüketimi ve bunla ilişkili olarak çevre dostu olmaması, uzun ve karmaşık numune hazırlama süreçleri gibi dezavantajları da beraberinde getirmektedir (Budak vd., 2023; Radi ve Ragaa Abd Ellatief, 2021). Spektroskopik yöntemler kromatografik yöntemlere göre daha basit ve daha az maliyetli olmasına rağmen, düşük seçicilik ve hassasiyet ve uzun numune hazırlama prosedürleri göz ardı edilememektedir (Budak vd., 2023). Bu iki geleneksel yöntemin aksine, elektroanalitik yöntemler son zamanlarda farmasötik bileşiklerin hassas ve seçici tayinlerinde daha fazla tercih edilmektedir (Budak vd., 2023; Radi ve Ragaa Abd Ellatief, 2021). Bunun nedeni, elektroanalitik yöntemlerin düşük maliyet, çevre dostu olma, uygulama ve kullanım kolaylığı, çok yönlülük, daha az numune ve çözücü tüketimi, hassasiyet, taşınabilirlik, kısa analiz süresi ve numunelerin sıkıcı ve uzun süreli ön işleme tabi tutulmadan tespit edebilmesi gibi avantajları sunmasıdır (Budak vd., 2023; Radi ve Ragaa Abd Ellatief, 2021). Dolayısıyla bu tezde voltammetrik yöntemler kullanılarak ETK'nın tayinini sağlayan ve hızlı, basit, düşük maliyetli ve oldukça duyarlı bir elektrokimyasal yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Bir elektrokimyasal sensörün kayda değer algılama hassasiyeti ve verimliliği, çoğunlukla elektrot ve modifikasyon malzemelerinin elektrokatalitik aktivitesine bağlıdır. Farmasötik bileşiklerin voltammetrik tayinlerinde başta karbon bazlı elektrotlar olmak üzere farklı katı elektrotlar, modifiye elektrotlar ve kompozit elektrotlar da kullanılmıştır. Son zamanlarda ise kalem grafit çubuklar verimli bir elektrot malzemesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır, çünkü elde edilen kalem grafit elektrotlar (Pencil graphite electrode, PGE'ler) diğer karbon bazlı veya katı elektrotlara göre tek kullanımlık, düşük maliyet, iyi mekanik sertlik, basitlik, ticari olarak kolay bulunabilirlik ve yüzey modifikasyon kolaylığı gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Dilgin ve Karakaya, 2016; Zhou ve Guo, 2015; Shakoori vd., 2015; Uygun ve Dilgin, 2013; Baghayeri vd., 2013; Adabi vd., 2015; Sağlam vd., 2016; Yang vd., 2015; Wang vd., 2000; Dede vd., 2014; Uslu ve Ozkan, 2011). Buna ek olarak, kurşun kalem elektrotlar, katı elektrotlarda gerekli olan ve yaygın bir şekilde kullanılan parlatma ve temizleme prosedürlerini içermediği, bu elektrotlardan daha basit ve daha hızlı bir yenileme yüzeyi sunduğu ve her bir yüzey için iyi bir tekrarlanabilirlik sağladığı bildirilmiştir (Wang vd., 2000; Kawde vd., 2016). Bu tez çalışmasında, modifikasyona gerek duyulmaksızın yalın PGE ile ETK'nın yüksek duyarlıkta ve doğrulukta, seçici, hassas ve hızlı elektrokimyasal tayininin gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır. Literatürde ETK'nın daha çok yükseltgenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak, ETK bileşiği karbidopa ve dopamine yapısal olarak oldukça benzer olup, aromatik yapıdaki katekol gruplarının yükseltgenmesi bu bileşiklerin tamamında görülmektedir ve birbirine girişim yapma olasılığı yüksektir. Bunun yanında, bu iki bileşikte olmayıp ancak entokaponda bulunan aromatik nitro grubu (Ar-NO_2) mevcuttur. Dolayısıyla tezin konusu ETK'ya yapısal olarak benzer gruplardan farklı olarak Ar-NO_2 grubunun indirgenmesine bağlı seçici bir elektrokimyasal ETK tayinini gerçekleştirmektir. İndirgenmeye ek olarak ETK'nın PGE'de yükseltgenmesine ilişkin davranışının incelenmesi de tez konusu kapsamındadır.

İKİNCİ BÖLÜM
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Literatürde ETK tayini üzerine çok sayıda çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunlar arasında tez konusu ile alakalı olan elektrokimyasal çalışmalara yer verilmiştir. Bu çalışmaların birinde sırasıyla metformin tutturulmuş çok duvarlı karbon nanotüp (Met-MWCNT) yüzeyine gümüş nanoparçacıkları elektrokimyasal olarak biriktirilmiş (Ag@Met-MWCNT), elde edilen nanokompozit camımsı karbon elektrot yüzeyine modifiye edilmiş (Ag@Met-MWCNT/GCE) ve bu elektrot kullanılarak ETK'daki Ar-NO_2 elektrokatalitik indirgenmesine bağlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Baghayeri vd., 2016). Ag@Met-MWCNT nanokompozit, alan emisyon taramalı elektrokimyasal mikroskopu ile karakterize edilmiştir. Modifiye elektrot, ETK'nın indirgenmesi için iyi bir elektrokatalitik aktivite göstermiştir. Bu gelişmiş aktivitede, Met@MWCNT'nin, Ag nanoparçacıklarının camımsı karbon elektrot (glassy carbon electrode, GCE) üzerinde dağılımının ve kararlılığının çok önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür. ETK'nın tayini için tasarlanmış Ag@Met-MWCNT/GCE kompozit modifiye elektrodun elektrokimyasal karakterizasyonu döngüsel voltammetri (CV) ile incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda, yalın GCE ile ETK yokluğunda ve varlığında elde edilen CV'lerde hiçbir karakteristik pik gözlenmemiştir. Met-MWCNT/GCE ile Ag@Met-MWCNT/GCE'deki ETK'nın indirgeme akımı karşılaştırıldığında, Ag@Met-MWCNT/GCE'nin en iyi yanıtı verdiği (yaklaşık -1,25 V'da indirgenme piki gözlenmiştir) ve ETK'nın analizinde iyi bir katalitik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ag@Met-MWCNT/GCE'de ETK'nın indirgenme mekanizması, ETK'nın yapısındaki Ar-NO_2 $4e^-$ ve $4H^+$ alarak N-hidroksil amine indirgenmesi şeklinde açıklanmıştır.

ETK'nın hassas ve hızlı analizi için geliştirilen diğer bir çalışma ise NH_2 ile fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (NH_2-*f* MWCNT) modifiye edilmiş GCE kullanılarak optimize edilen koşullar altında ETK'nın elektrokimyasal tayinidir (Aftab vd., 2019). NH_2-*f*MWCNT/GCE'nin yüzey morfolojisi, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (Energy Dispersive X-ray, EDX) analizi ve taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy, SEM) ile incelenmiştir. Modifiye edilmiş elektrotlar ve yalın elektrotların elektron transfer kapasitesini araştırmak için ferro/ferri siyanür $(Fe(CN)_6^{3-}$

$^{/4-}$) redoks probu ortamında elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak Nyquist eğrileri kaydedilmiştir. Yalın ve modifiye elektrotların yüzeyinde ETK'nın elektrokimyasal davranışını karşılaştırmak için CV yöntemi kullanılmıştır. ETK'nın elektrokimyasal davranışı, modifiye edilmiş ve edilmemiş GCE'de 0,5 M H_2S0_4 ortamında 100 mV/s tarama hızında CV'leri kaydedilerek araştırılmış, her iki elektrotta +0,69 V civarında bir yükseltgenme ve +0,37 V civarında indirgeme akımı gözlemlenmiştir. Yalın GCE'de yükseltgenme akımı, yavaş elektron transferi nedeniyle 0,1 mM ETK için çok küçük görülmüştür (+0,7 V'de 4,05 μA). Bu çalışmada kaydedilen voltammogramlardan ETK'nın NH_2-*f*MWCNT/GCE ile anodik pik akımının 4,05 μA'dan 27,05 μA'ya yükseldiği ve pik potansiyelinin daha negatife kaydığı rapor edilmiş ve sonuç olarak NH_2-*f*MWCNT'nin ETK'nın yükseltgenme ve indirgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada doğrusal çalışma aralığı ilaç, serum ve idrar için sırasıyla 1–50×10^{-9}, 5–70×10^{-9} ve 5–70×10^{-9} M bulunurken LOD değerleri de sırasıyla $1{,}45\times10^{-11}$, $9{,}39\times10^{-10}$ ve $9{,}93\times10^{-10}$ M bulunmuştur.

Jain vd. tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise ETK'nın asılı cıva damla elektrodu (Hanging mercury drop electrode, HMDE) üzerindeki elektrokimyasal davranışı CV, diferansiyel puls katodik adsorptif sıyırma voltammetrisi (Differential pulse cathodic adsorptive stripping voltammetry, DPCAdSV) ve kare dalga katodik adsorptif sıyırma voltammetrisi (Square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry, SWCAdSV) yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada, ETK içeren elektrolite çeşitli yüzey aktif maddeleri (nötr, anyonik ve katyonik) ilâve edilerek etkileri incelenmiş ve nötr yüzey aktif maddesi olan Tween 20 diğer yüzey aktif maddeleri içerisinde en iyi yanıtı verdiği rapor edilmiştir. ETK'nın yüzey aktif maddeler (nötral, katyonik ve anyonik tip) varlığındaki voltammetrik davranışı karşılaştırıldığında, ETK'nın pik akımında önemli bir artış gösterdiği ve tespit limitinin nötral yüzey aktif madde Tween 20'de daha düşük olduğu ve ayrıca katyonik ve anyonik yüzey aktif maddelerin ise ters bir etki gösterdiği belirlenmiştir. ETK'ya doğrusal yanıt aralıkları SWCAdSV yönteminde 5×10^{-4} mol/L ile $1{,}8\times10^{-5}$ mol/L ve DPCAdSV yönteminde ise $1{,}6\times10^{-4}$ ile $1{,}6\times10^{-5}$ mol/L olarak belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,13 ng/mL ve 0,42 ng/mL olarak bulunmuştur. Farmasötik formülasyonundaki ETK analizinde indirgenme piki için % 99'luk bir ortalama geri kazanım elde edilmiştir.

Naghian vd. tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise sülfür-kalay oksit nanopartikülleri (S@SnO_2NP) ile modifiye edilmiş bir perde baskılı elektrot (Screen printed electrode, SPE) kullanılmıştır. S@SnO_2NP/SPE'nin yüzey morfolojisi SEM, EDX ve XRD ile incelenmiştir. Yalın ve S@SnO_2NP/SPE'nin elektrotların yüzeyinde ETK'nın elektrokimyasal davranışını karşılaştırmak için CV yöntemi kullanılmıştır. İlgili modifiye elektrodun elektrokimyasal karakterizasyonu için $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ortamında Nyquist diyagramı kaydedilmiştir. ETK'nın elektrokimyasal davranışı ilk olarak CV yöntemi ile daha sonra diferansiyel puls voltammetrisi (DPV) yöntemi ile incelenmiştir. Optimize edilmiş deneysel koşullar altında, 0,46 V'da sensör yüzeyindeki ETK'nın yükseltgenmesine ilişkin anodik pik akımı, 100 nM ile 75 µM aralığında farklı ETK konsantrasyonlarına karşı doğrusal yanıt elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,010 µM ve 0,035 µM olarak saptanmıştır. Sensörün uygulanabilirliği, levodopa, karbidopa ve pramipeksol dahil olmak üzere diğer geleneksel ilaçların varlığında ETK tayini üzerinden test edilmiştir. Geliştirilen sensörün insan idrarı örneğine ve farmasötik formülasyona uygulanmasından elde edilen sonuçların HPLC standart yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

Nigović tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise parkinson hastalığı tedavisinde levodopa ve ETK içeren ve en çok reçete edilen pimavanserinin basit ve hassas bir şekilde belirlenmesi için yeni bir elektrokimyasal sensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Nafyon matrisinde grafitleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüplerin (grCNTs) ve grafen nanotabakaların (GNPs) birleşimi kullanılarak hazırlanan (grCNTs/GNPs) nanokompozit sensörün üç antiparkinsonik ilaca karşı elektrokimyasal davranışı, eşzamanlı tayinleri için ilk analitiksel yöntemi geliştirmek amacıyla adsorptif sıyırma SWV kullanılarak incelenmiştir. Pimavanserinin elektrokimyasal davranışı ilk olarak CV kullanılarak farklı karbon nanomalzemelerle hazırlanan modifiye GCE'nin yüzeyinde ilaç molekülünün yükseltgenmesi üzerinden incelenmiştir. En iyi nanosensörü tasarlamak üzere, GNPs, grafen oksit nanoparçacığı, karbon nanofiberler, elmas nanoparçacıklar ve karbon nanotüplerle karıştırılmış aktif karbon nanopartiküller gibi çeşitli modifikasyon materyalleri test edilmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında pimavanserin, levodopa ve ETK için sırasıyla 1×10^{-7}- 9×10^{-6} M, 5×10^{-7}- 4×10^{-5} M ve 5×10^{-7}- 1×10^{-5} M aralıklarında doğrusal yanıtlar elde edilmiştir. Pimavanserin, levodopa ve ETK için LOD değerleri ise sırasıyla $9{,}7\times10^{-9}$ M,

$8,5\times10^{-8}$ M, $3,2\times10^{-8}$ M, LOQ değerleri ise sırasıyla $3,2\times10^{-8}$ M, $2,8\times10^{-7}$ M, $1,1\times10^{-7}$ M olarak bulunmuştur.

Literatür incelendiğinde ETK'nın farklı modifiye ya da modifiye edilmemiş elektrot kullanımına dayalı çok sayıda voltammetrik ETK tayini gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu çalışmalardan birkaçına ait bilgiler yukarıda özet halinde sunulmuştur. Bunun dışında geliştirdiğimiz PGE ile ETK'nın analitik performans çalışmalarının literatürde rapor edilen elektrotlarla karşılaştırılması 3. Bölümde Tablo 1'de detaylı olarak sunulmuştur. Dolayısıyla ETK'nın voltammetrik tayinine ait çalışmaların birçoğuna ait analitik performans parameterleri ve bazı bilgiler (kullanılan elektrotlar, yöntemler, destek elektrolit, elde edilen doğrusal yanıt aralıkları ve LOD değerleri) Tablo 1'de verilmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve tedarik edildiği firmalar aşağıda açıklanmıştır.

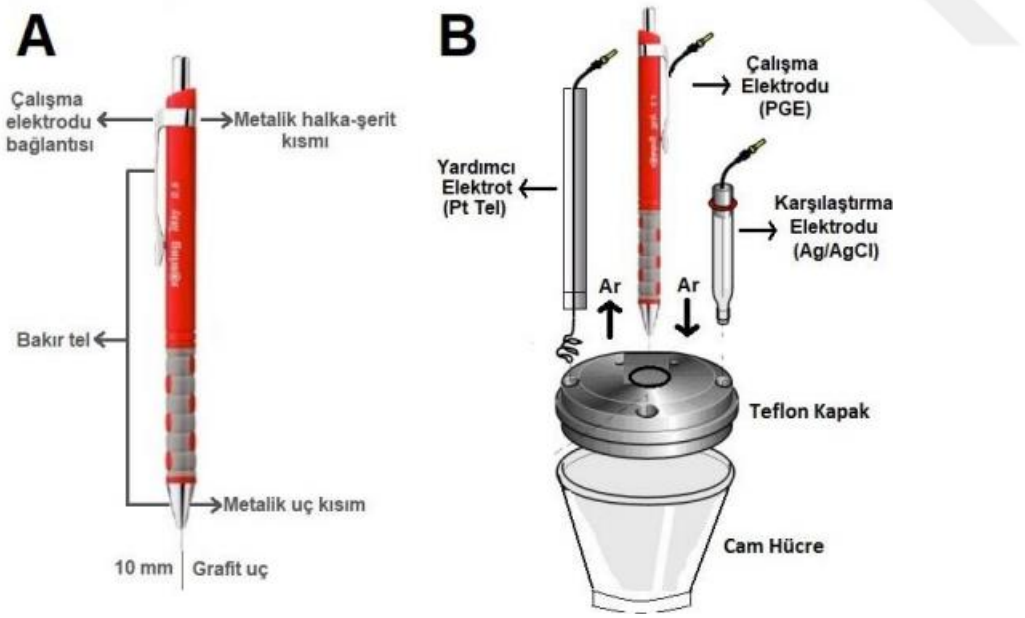
Çalışmalarda kullanılan ETK (MA: 305,29 g/mol CAS: 130929-57-6), Levodopa ($C_9H_{11}NO_4$) ve Dopamine ($C_8H_{11}NO_2$) MedChemExpress firmasından temin edildi. Britton Robinson Tampon (BRT) çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan asetik asit (CH_3COOH, (% 96, d:1,05 g/mL)), fosforik asit (H_3PO_4), borik asit (H_3BO_3), sodyum hidroksit (NaOH), potasyum klorür (KCl) ile birlikte L-askorbik asit ($C_6H_8O_6$), fruktoz ($C_6H_{12}O_6$), ürik asit ($C_5H_4N_4O_3$), disodyum fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$), monosodyum fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4.2H_2O$), magnezyum klorür ($MgCl_2$) gibi bazı kimyasallar da MERCK ve ISOLAB firmalarından temin edildi. Glikoz ($C_6H_{12}O_6$), karbidopa ($C_{10}H_{14}N_2O_4$), sodyum klorür (NaCl), üre (CH_4N_2O), amonyum klorür (NH_4Cl) Sigma Aldrich firmasından temin edildi. Kalsiyum klorür ($CaCl_2$), bakır (II) klorür ($CuCl_2$), sodyum sülfat (Na_2SO_4), sükroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ISOLAB firmasından temin edildi. Farmasötik formülasyonda kullanılan Dopalevo tablet ilaç, Abdi İbrahim firmasından temin edilmiştir. Sülfürik asit (H_2SO_4) % 95 saflıkta olup VWR chemicals'den temin edildi. BRT çözeltileri, her biri 0,1 M KCl içeren 0,4 M CH_3COOH, H_3PO_4, H_3BO_3, ve 0,1 M KCl içeren 0,2 M NaOH çözeltilerinin bir pH metre kontrolünde uygun hacimlerde karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler

Tüm elektrokimyasal ölçümler, Ivium Compactstat Interface (Hollanda) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Elektrokimyasal ölçümlerde klasik üç elektrotlu sistem olarak Pt tel (BASI MW-1033; uzunluk: 23 cm ve çap: 0,5 mm) yardımcı elektrodu, Ag/AgCl (doygun KCl) (ALS 013429 RE-1CP uzunluk: 7,5 cm, çap: 6 mm) referans elektrodu kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak kullanılan grafit içerikli TOMBOW MONO LEAD

Classic Ultra Polimer 2B kurşun kalem uçları (Çap: 0,5 mm ve uzunluk: 6 cm) ise bir kırtasiyeden tedarik edildi. Kalem uçlarını tutturmak amacıyla Rotring Model T 0,5 mm mekanik kalem kullanıldı ve tüm deneysel çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Kalem uçlarının elektriksel bağlantısı, uçları tutan metal gövdeye bakır bir telin lehimlenmesi ile sağlandı (Şekil 2). Elektrokimyasal ölçümlerin yapıldığı cihazın bağlantı uçları (krokodil), çalışma elektrodunun bağlantı kısmına tutturularak üçlü elektrot sistemi kullanıma hazırlandı. Elektrokimyasal ölçümlerde, kalem ucunun 1 cm'lik kısmı (Geometrik yüzey alanı= 0,159 cm^2) destek çözeltiye daldırılarak kullanıldı.

Tüm çözeltilerin hazırlanmasında gerekli saf su, Elga Option Q7B (18.2 ΩM cm) marka saf su cihazından temin edildi. Tampon çözeltilerin pH değerlerinin ölçümünde kombine cam elektrotlu bir Hanna HI 221 pH metre cihazı kullanıldı. Elektrokimyasal ölçümlerde, destek elektrot ortamından girişim yapan O_2 gazını uzaklaştırmak amacıyla elektrolit ortamı yüksek saflıkta Ar gazı ile doyuruldu.



Şekil 2. A) Kalem grafit elektrodun mekanik kaleme sabitlenmesi ve elektriksel bağlantısı ve B) üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi (Emir, 2018).

3.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. 0,1 M H_2SO_4 Çözeltisinin Hazırlanması

H_2SO_4 (d:1,84 g/mL, % 95) bir pipet yardımıyla şişesinden 2,8 mL alınıp bir miktar saf su içeren 500 mL bir balon jojeye eklendi daha sonra ultra saf su ile belirtilen son hacme tamamlanmıştır.

3.3.2. 0,5 M H_2SO_4 Çözeltisinin hazırlanması

H_2SO_4 (d:1,84 g/mL, % 95) bir pipet yardımıyla şişesinden 2,8 mL alınıp bir miktar saf su içeren100 mL bir balon jojeye eklendi daha sonra ultra saf su ile hacme tamamlanmıştır.

3.3.3. Britton Robinson Tampon (BRT) Çözeltisi (pH: 2,0-12,0 arası)

pH değeri 2,0 ile 12,0 arasında olan BRT çözeltisi hazırlamak için aşağıda hazırlanışları açıklanan çözeltilerden uygun hacimler karıştırılarak pH metre kontrolünde istenilen pH'da tampon çözeltileri hazırlandı.

<u>0,1 M KCl içeren 0,04 M BRT Çözeltisi:</u> CH_3COOH (d:1,05 g/mL), H_3PO_4 (d:1,71 g/mL) 0,04 M olacak şekilde uygun miktarları 1,0 L'lik balon jojeye alınıp bir miktar ultra saf su ile karıştırıldı. Daha sonra beher içerisine çözeltide derişimi, 0,04 M olacak şekilde 2,47 g H_3BO_3 ve 0,1 M olacak şekilde 7,45 g KCl aktarıldı. Beher içerisine bir miktar ultra saf su eklenerek iyice çözüldükten sonra çözelti balon joje içerisine alındı. Son olarak balon joje ultra saf su ile hacim çizgisine kadar tamamlandı.

0,1 M KCl içeren 0,2 M NaOH Çözeltisi: Derişimi 0,2 M olacak şekilde NaOH ve 0,1 M olacak şekilde KCl'den tartılıp az miktarda ultra saf su ile çözüldükten sonra 1,0 L'lik balon jojeye alındı yine ultra saf ilave ederek balon jojenin çizgisine kadar tamamlandı.

3.3.4. Stok 13 mM ETK Çözeltisinin Hazırlanması

Hassas terazi yardımı ile 10 mg ETK katısı tartıldı. Daha sonra 2,5 ml etanolde çözüldü. Ara stok çözeltileri bu ana stok çözeltisinden 0,1 M H_2SO_4 ile seyreltilerek hazırlandı.

3.3.5. ETK'nın Voltammetrik Yanıtına Girişim Yapabilecek Maddelerin Hazırlanması

ETK'nın Tayininde Olası Girişim Etkisi Gösterebilecek Maddelerin Hazırlanması (0,01 M): $CuCl_2$ (0,134 g), $MgCl_2$ (0,095 g), $CaCl_2$ (0,111 g), KCl (0,074 g), NaCl (0,058 g), Na_2SO_4 (0,142 g), $C_6H_{12}O_6$ (0,180 g glikoz ve fruktoz), $C_{12}H_{22}O_{11}$ (0,342 g sükroz), $C_5H_4N_4O_3$ (0,017 g ürik asit), $C_6H_8O_6$ (0,176 g L-askorbik asit), ve $C_8H_{11}NO_2$ (0,189 g dopamin) maddelerinin her birinin yanında parantez içerisinde belirtilen miktarda tartılıp 100 mL ultra saf suda çözdürülerek hazırlandı. 0,01 M $C_9H_{11}NO_4$ (levodopa) hazırlamak için 0,0197 g tartılıp 10 mL 0,1 M HCl ile tamamlandı. 0,01 M $C_{10}H_{14}N_2O_4$ (karbidopa) hazırlamak için 0,0226 g tartılıp 10 mL metanolle tamamlandı, ardından 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Hazırlanan bazı çözeltiler +4 °C muhafaza edildi.

3.3.6. ETK'nın Geri Kazanım Çalışmasında Kullanılan Yapay İdrar Çözeltisinin Hazırlanması

Yapay idarar hazırlamak için literatürde yayınlanan bir çalışmadan yararlanıldı. Bu amaçla yapay idrar hazırlamak için 0,17 g Na_2SO_4, 0,025 g ürik asit, 1,5 g üre, 0,2308 g KCl, 0,0185 g $CaCl_2$, 0,1266 g NH_4Cl, 0,0831 g Na_2HPO_4, 0,2912 g NaH_2PO_4 tartıldı ve az

miktarda ultra saf su ile çözüldükten sonra 100 mL'lik balon jojeye alındı, yine ultra saf su ile balon jojenin çizgisine kadar tamamlandı (Sarigul vd., 2019).

3.3.7. Farmasötik Tablet Çözeltisinin Hazırlanması

İçerisinde 200 mg ETK olduğu bildirilen 1 tablet porselen bir havanda öğütülerek toz haline getirilip 10 mL dimetilformamid de (DMF) içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.4. Gerçekleştirilen Elektrokimyasal Ölçümler

Elektrokimyasal ölçümler yalın PGE kullanılarak yapılmıştır. ETK'nın elektrokimyasal davranışı ilk olarak yalın PGE'de CV'lerinin kaydedilmesiyle incelenmiştir. Daha sonra DPV yöntemi kullanılarak çeşitli parametreler optimize edilmiş ve ETK sensörünün elektrokimyasal performansını belirleyen önemli analitiksel parametreler belirlenmiştir.

3.5. ETK'nın Elektrokimyasal Davranışının CV Yöntemi ile İncelenmesi

ETK'nın elektrokimyasal davranışı ilk olarak CV yöntemi ile incelendi. ETK'nın elektrokimyasal davranışını incelemek için, farklı potansiyel aralıklarında 250 μM ETK içeren 0,1 M H_2SO_4 ortamında yalın PGE'de 2 döngü olacak şekilde CV yanıtları kaydedildi. Potansiyel aralık olarak önce 0 V'dan +1 V'a, sonra +1 V'dan – -0,65V'a son olarak -0,65 V'dan 0 V'a 50 mV/s tarama hızında CV döngüleri alındı.

3.5.1. CV'de pH Optimizasyonu Çalışması

Yalın çalışma elektrodu kullanılarak her bir BRT çözeltisi (pH:2,0-10,0) ortamında, ve ayrıca 0,1 M ve 0,5 M H_2SO_4 kuvvetli asidik ortamda hem ETK yokluğunda ve hem de

250 μM ETK varlığında CV'leri alınarak, ETK'nın indirgenme ve yükseltgenmesine etkisi incelendi. Destek elektrolit seçiminde pH'ya karşılık pik akımının yükseklikleri kaydedildi ve en yüksek pik akımının alındığı pH değeri en uygun destek elektrolit ortamı olarak seçildi.

3.5.2. CV'de Tarama Hızı Çalışmaları

Tarama hızının ETK'nın elektrokimyasal davranışı üzerindeki etkisini incelenmek amacıyla yalın PGE'de 250 μM ETK varlığında Ar ile doyurulmuş 0,1 M H_2SO_4 ortamında 10–1000 mV/s aralığında artan tarama hızlarında CV yanıtları kaydedildi.

3.6. ETK'nın Elektrokimyasal Davranışının DPV Yöntemi ile İncelenmesi

Yalın PGE'de ETK'nın DPV yöntemiyle katodik bölgedeki indirgenme pikleri (K1 ve K2) için +0,85 V ile -0,5 V ve anodik bölgedeki yükseltgenme piki (A1) için +0,35 V ile +0,8 V potansiyel aralığında DPV'leri kaydedildi.

3.7. DPV'de pH Optimizasyonu Çalışmaları

Yalın PGE'de ETK'nın elektrokimyasal davranışına pH'nın etkisini incelemek amacıyla anodik bölgede 1 μM ve katodik bölgede 0,5 μM ETK varlığında çalışmalar gerçekleştirildi. Çalışmalarda 0,1 M H_2SO_4 ve pH 2,0 ile pH 6,0 arasında değişen BRT çözeltisi ortamında DPV'leri kaydedildi. Elde edilen verilerden pH'ya karşılık pik akım yükseklikleri karşılaştırıldı ve en yüksek pik akımındaki destek elektrolit pH'sı optimum ortam olarak belirlendi.

3.8. DPV'de Çeşitli Parametrelerin Optimizasyonu

3.8.1. Puls Zamanı (t_{pulse}: Pulse Time)

Yalın PGE'de anodik bölgede 0,5 μM ve katodik bölgede 0,1 μM ETK'nın t_{pulse} değerleri 1 ms ile 10 ms arasında değişen yanıtları incelendi. Elde edilen verilerden t_{pulse} değerlerine karşılık gelen pik akımları karşılaştırılarak en uygun değer belirlendi. (Çalışılan K1, K2 ve A1 için t_{pulse} değerleri: 1, 2, 3, 5, 7 ve 10 ms). (Sabit tutulan diğer parametreler K1, K2 ve A1 için: ν= 50 mV/s, E_{step}= 5 mV, E_{Amp}= 200 mV).

3.8.2. Pulse Genliği (E_{amp}: Pulse Amplitude)

Yalın PGE'de anodik bölgede 0,5 μM ve katodik bölgede 0,1 μM ETK'nın E_{amp} değerleri 20 mV ile 300 mV arasında değişen yanıtları incelendi. Elde edilen verilerden E_{amp} değerlerine karşılık gelen pik akımları karşılaştırılarak en uygun değer belirlendi. (Çalışılan K1, K2 ve A1 için E_{amp} değerleri: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250 ve 300 mV). (Sabit tutulan diğer parametreler K1, K2 ve A1 için: ν= 50 mV/s, E_{step}= 5 mV, t_{pulse}= 1 ms).

3.8.3. Basamak Potansiyeli (E_{step}: E Step)

Yalın PGE'de anodik bölgede 0,5 μM ve katodik bölgede 0,1 μM ETK'nın E_{step} değerleri 1 mV ile 10 mV arasında değişen yanıtları incelendi. Elde edilen verilerden E_{step} değerlerine karşılık gelen pik akımları karşılaştırılarak en uygun değer belirlendi. (Çalışılan K1 ve K2 için E_{step} değerleri: 1, 2, 3, 5, 7 ve 10 mV; A1 için E_{step} değerleri: 1, 3, 5, 6, 7 ve 10 mV). (Sabit tutulan diğer parametreler K1, K2 ve A1 için: ν= 50 mV/s, t_{pulse}= 1 ms, E_{Amp}= 200 mV).

3.8.4. Tarama Hızı (*v*: Scan rate)

Yalın PGE'de anodik bölgede 0,5 μM ve katodik bölgede 0,1 μM ETK'nın *v* değerleri 10 mV/s ile 200 mV/s arasında değişen yanıtları incelendi. Elde edilen verilerden *v* değerlerine karşılık gelen pik akımları karşılaştırılarak en uygun değer belirlendi. (Çalışılan K1, K2 ve A1 için *v* değerleri: 10, 20, 50, 80, 100, 150 ve 200 mV/s). (Sabit tutulan diğer parametreler K1, K2 ve A1 için: t_{pulse}= 1 ms, E_{step}= 10 mV, E_{Amp}= 200 mV).

3.9. ETK'nın Voltammetrik Tayinine Yönelik Analitik Performans Çalışmaları

ETK'nın yükseltgenmesi (A1) üzerinden tayininde 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit ortamında optimize edilen koşullar altında (t_{pulse}= 1 ms, E_{amp}= 200 mV, E_{step}= 7 mV, v= 50 mV/s) ETK'nın bölüm 3.3.4'de hazırlanan stok çözeltisinden uygun pipetlemeler yapılarak son derişimi 0 ile 1000 nM aralığında artan derişimlerde DPV'leri kaydedildi (potansiyel tarama aralığı: +0,35 V- +0,8 V). ETK'nın indirgenme (K1 ve K2) üzerinden tayininde ise aynı destek elektrolit ortamında optimize edilen koşullar altında (t_{pulse}=1 ms, E_{amp}= 200 mV, E_{step}= 10 mV, v= 50 mV/s) ETK'nın aynı stok çözeltisinden uygun pipetlemeler yapılarak son derişimi K1 için 0 ile 1000 nM ve K2 için 0 ile 1500 nM aralığında artan derişimlerde DPV'leri kaydedildi (potansiyel tarama aralığı: +0,85 V– -0,5 V). ETK'nın indirgenmesi (K1, K2) ve yükseltgenmesinde (A1) kaydedilen DPV'lerden elde edilen verilerden ETK derişimine karşı pik akım grafikleri elde edildi.

3.10. Girişim Çalışmaları

ETK'nın yapısına benzer yapıda olan kimyasalların (levodopa, karbidopa), su numunelerinde bulunması olası bazı iyonların (Cu^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^{+}, Cl^{-}, Na^{+}, SO_4^{2-}), bazı şekerlerin (glikoz, fruktoz, sükroz), ürik asitin, askorbik asitin ve dopaminin ETK'nın indirgenme (K1, K2) ve yükseltgenme (A1) pik akımına olan olası girişim etkileri DPV'lerinin kaydedilmesiyle incelendi. Bu amaçla, katodik bölgede 0,25 μM anodik bölgede ise 0,5 μM ETK içeren 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit ortamında hem anodik hem

de katodik bölgede DPV'leri kaydedildi. Ardından olası girişim etkisi gösterecek maddenin stok çözeltisinden ETK'nın derişimine göre sırasıyla 1, 2, 5, 10, 25 ve 50 kat olacak şekilde uygun pipetleme yapılarak DPV'leri kaydedildi. Aynı deneysel basamaklar, olası girişim etkisi gösterebilecek tüm maddeler için tekrarlandı. Son olarak, ETK'nın indirgenmesine (K1, K2) ve yükseltgenmesine (A1) ilişkin DPV'lerinde pik akımlarındaki yüzde değişimleri, standart sapmaları ve % RSD değerleri her biri için ayrı ayrı hesaplandı.

3.11. Yapay İdrarda ETK'nın Geri Kazanım Çalışmaları

Yöntemin uygulanabilirliği, ETK'nın geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilerek incelendi. Bölüm 3.3.6'da hazırlanan yapay idrar örneğinin içerisine bilinen derişimde ETK (25 nM) eklendi (spike edildi). Optimize edilen koşullar altında hem katodik hemde anodik bölgede spike edilen yapay idrar çözeltisinin DPV'leri kaydedildi. Ardından, 10 μM, standart ETK çözeltisinden elektrokimyasal hücreye 25 nM ETK olacak şekilde 4 katım yapılarak standart katma yöntemi uygulandı. Her eklemeden sonra DPV'ler ETK'nın hem yükseltgenmesi (A1) hemde indirgenmesi (K1, K2) için ayrı ayrı kaydedildi. Deneysel basamaklar 50 nM spike edilen idrar numunesi için de aynı şekilde tekrarlandı. DPV'lerden yükseltgenme ve indirgenme akımları okunarak derişime derişime karşı akım değişimine ilişkin standart katma grafikleri çizildi. Son olarak her bir yapay idrar numunesi için ETK'nın indirgenmesi (K1, K2) ve yükseltgenmesi (A1) üzerinden geri kazanım değerleri ve % RSD değerleri hesaplandı.

3.12. ETK'nın Farmasötik Tablette Tayini

3.3.4'de hazırlanan stok çözeltisinden ara stok hazırlandı. ETK (tablet) çözeltisinden elektrokimyasal hücredeki son derişimi 50 nM olacak şekilde alındı ve 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit çözeltisi ile 5 mL'ye tamamlandı. Optimize edilen koşullar altında hem katodik hem de anodik bölgede DPV sonuçları kaydedildi. Ardından, 10 μM, standart ETK çözeltisinden elektrokimyasal hücreye bu defa 50 nM ETK olacak şekilde 4 katım yapılarak standart katma yöntemi uygulandı. DPV'ler ETK'nın hem yükseltgenmesi (A1) hem de indirgenmesi (K1, K2) için ayrı ayrı kaydedildi. DPV'lerden yükseltgenme ve indirgenme

akımları okunarak derişime karşı pik akımı grafikleri çizildi. Son olarak her bir tablet numunesi için ETK'nın indirgenmesi (K1, K2) ve yükseltgenmesi (A1) üzerinden standart katma grafikleri çizilerek tablette bulunan ETK miktarları ve % RSD değerleri hesaplandı.

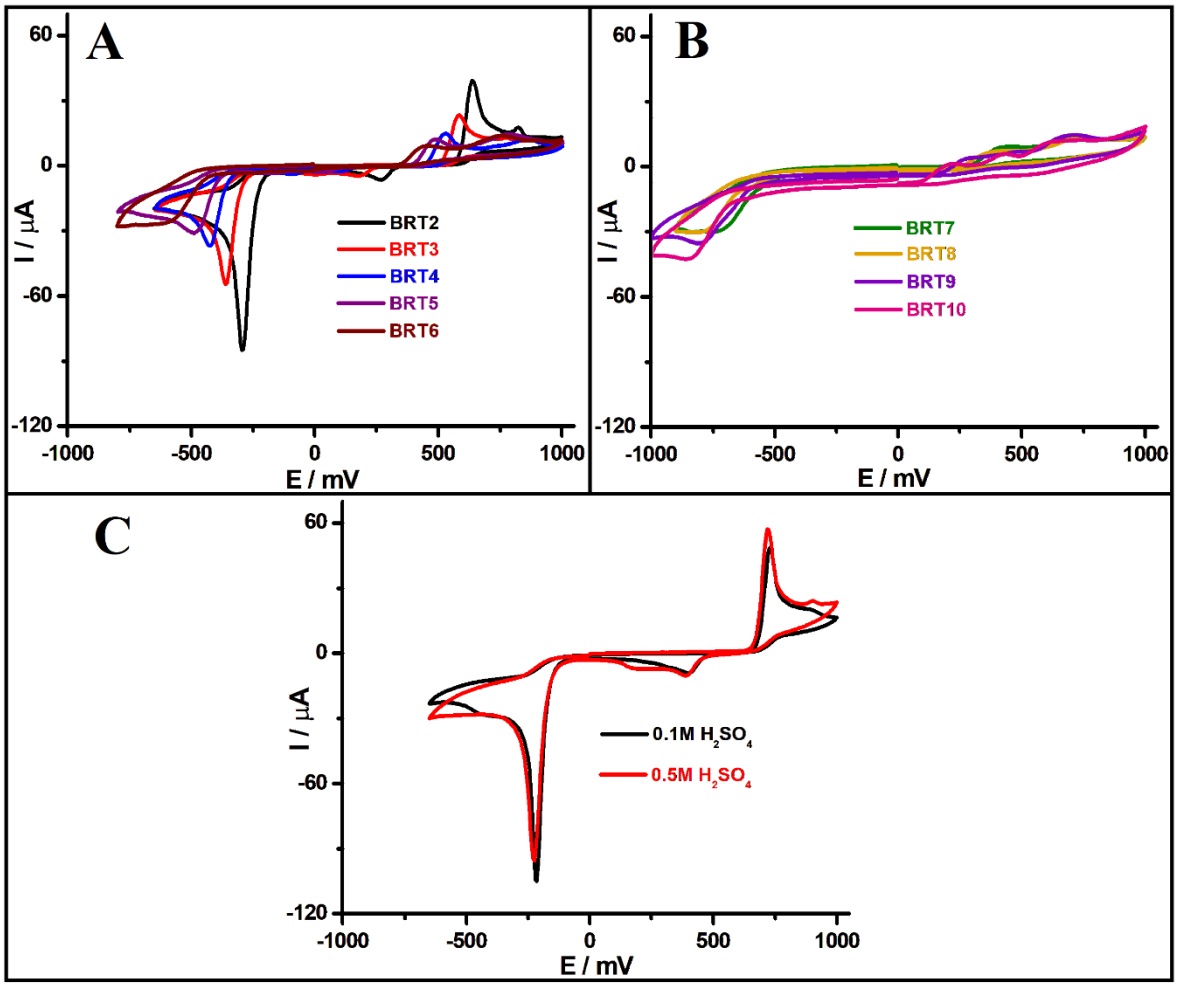
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. ETK'nın Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

ETK'nın elektrokimyasal davranışı ilk olarak yalın PGE'de CV'lerinin kaydedilmesiyle incelenmiştir. Daha sonra DPV yöntemi kullanılarak çeşitli parametreler optimize edilerek ETK sensörünün elektrokimyasal performansını belirleyen önemli analitiksel parametreler belirlenmiştir. Bu amaçla bazı optimizasyonları içeren döngüsel voltammetrik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ardından optimizasyon, analitik performans, girişim ve gerçek örnek uygulanması kısımlarını içerecek şekilde DPV çalışmaları yapılmıştır.

4.1.1. Yalın PGE'de Destek Çözelti pH'sının Optimizasyonu

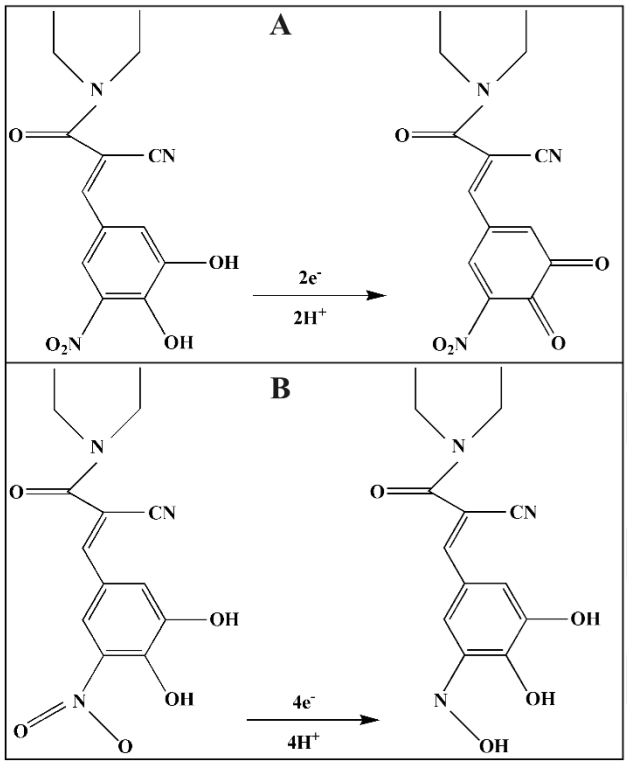
Yalın PGE'de destek elektrolit çözelti pH'sının ETK'nın yükseltgenmesine ve indirgenmesine olan etkisinin incelenmesi amacıyla 250 µM ETK içeren farklı pH'lardaki (pH 2,0-10,0) BRT çözeltisi ve 0,1 M ile 0,5 M H_2SO_4 çözeltilerinin CV'leri kaydedilmiş ve Şekil 3'de verilmiştir. Şekil 3 incelendiğinde ETK'nın yükseltgenme ve indirgenme pik potansiyelinin destek elektrolit pH'nın artmasıyla daha negatif potansiyellere kaydığı ve pik akımının azalarak pik şeklinin bozulduğu gözlenmiştir. pH 2'den pH 10'a doğru gidildikçe ETK'nın yükseltgenme pik potansiyelinin 640 mV'dan 205 mV'a kaydığı, indirgenme pik potansiyelinin ise -295 mV'dan -850 mV'da kaydığı gözlenmiştir. Yüksek pH değerlerinde çalışıldığında ETK'nın yükseltgenme ve indirgenme piklerinin negatif bölgeye kayması ETK'nın elektrokimyasal davranışının proton transferi içerdiğini göstermektedir. Düşük pH'larda çalışmak amacıyla 0,1 M ve 0,5 M H_2SO_4 ortamında çalışılmış ve alınan sonuçlardan en yüksek pik akımının H_2SO_4 ortamında olduğu gözlenmiştir. H_2SO_4 destek elektrolitinin derişiminin ETK'nın yükseltgenme ve indirgenme potansiyeline ve pik akımına kayda değer bir etki etmediği gözlenmiş ve ETK'nın yükseltgenmesi ve indirgenmesi için en uygun destek elektrolit ortamı olarak 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda destek elektrolit çözeltisi olarak 0,1 M H_2SO_4 çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Yalın PGE'de pH'sı A) 2,0-6,0 ve B) 7,0-10,0 arasında değişen 0,1 M KCl içeren BRT çözeltisi, C) 0,1 M ve 0,5 M H_2SO_4 çözeltileri ortamında 250 µM ETK'nın kaydedilen CV'leri (v= 50 mV/s).

Literatürde daha önceden yayınlanmış çalışmalar dikkate alınarak ETK'nın elektrokimyasal davranışına ait mekanizma Şekil 4'de önerilmiştir. Bu mekanizmaya göre önce ETK'daki -NO_2 $4e^-$ ve $4H^+$ alarak tersinmez bir şekilde aromatik N-hidroksil amin (Ar-NHOH) grubuna indirgenmiştir. Nitekim 0,1 M H_2SO_4 ortamında kaydedilen CV'de -220 mV'da görülen keskin pik bu indirgenmeyi temsil etmektedir. Pozitif yöne taramada ise iki alternatif söz konusudur. Birincisi, yapıda bulunan katekolik grubun kinona $2e^-$ ve $2H^+$ ile tersinmez olarak yükseltgenmesi ki buna ait keskin pik yine 0,1 M H_2SO_4 ortamında +730 mV civarında gözlenmiştir. İkinci alternatif ise ilk etapta tersinmez indirgenme ile oluşan Ar-NHOH'ın $2e^-$ ve $2H^+$'lu tersinir olarak aromatik nitroso grubuna (-N=O)

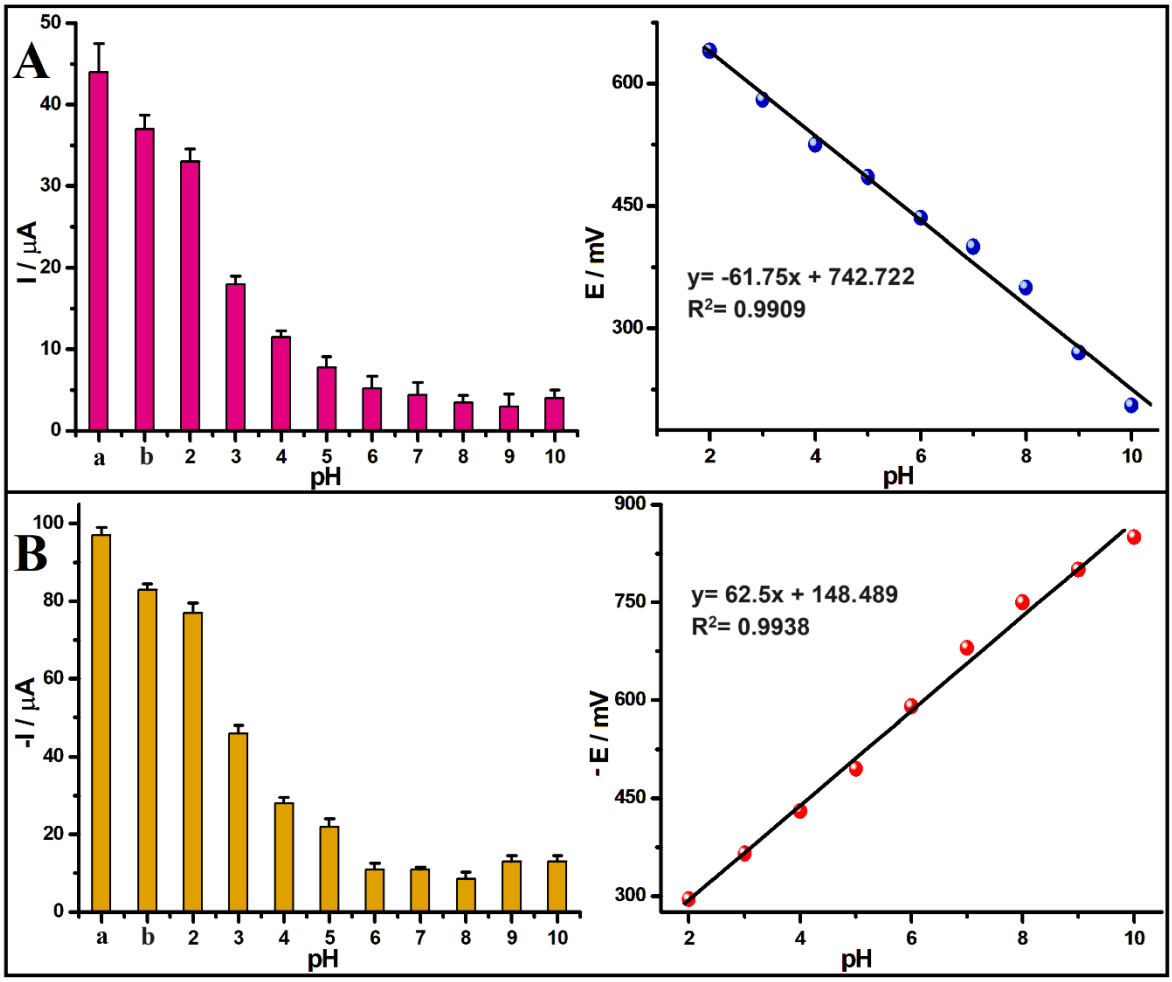
yükseltgenmesidir ki, yükseltgenme tam olarak belirgin değilken indirgenme 400 mV'da gözlenmiştir.



Şekil 4. A) ETK için önerilen elektrokimyasal yükseltgenme mekanizması B) ETK için önerilen elektrokimyasal indirgeme mekanizması.

Şekil 3'de kaydedilen CV'lerden elde edilen verilerle I(μA)-pH ve E(mV)-pH grafikleri çizilmiştir (Şekil 5). Her iki şekilden de görüldüğü gibi hem yükseltgenme (Şekil 5A) hem de indirgenme (Şekil 5B) pik akımlarının 0,1 M H_2SO_4 ortamında en yüksek olduğu görülmektedir. Şekil 5A'daki yükseltgenme pik potansiyelinin E(mV)–pH grafiği E(mV)= -61,75×pH + 742,72 ve R^2= 0,9909 göz önüne alındığında, elde edilen doğrunun eğiminin (61,75 mV/pH) teorik Nernst değerine (~59,0 mV/pH) oldukça yakın olduğu kaydedilmiştir. Bu durum göz önüne alındığında PGE yüzeyinde ETK'nın yükseltgenmesinde rol alan proton (H^+) ve elektron (e^-) sayıları arasında stokiyometrik oranın 1:1 olduğu sonucuna varılmıştır (Aftab vd., 2019; Naghian vd., 2021; Radi ve Ragaa Abd Ellatief, 2021). Şekil 5B'deki indirgenme pik potansiyelinin E(mV) – pH grafiği E(mV)= 62,5×pH +148,48 ve R^2= 0,9938 göz önüne alındığında, elde edilen doğrunun eğiminin (62,5 mV/pH) olması

ETK'nın indirgenmesinde rol alan H^+ ve e^- sayıları arasındaki stokiyometrik oranın yaklaşık yine 1:1 olduğunu göstermiştir (Şekil 5B).

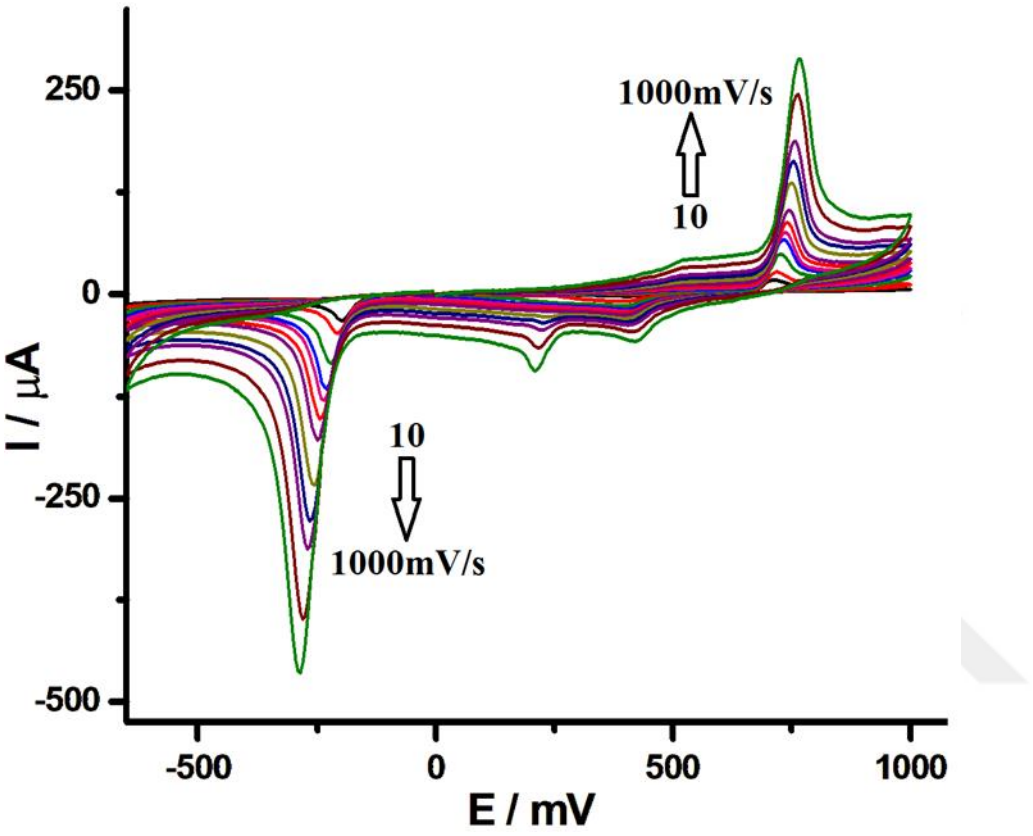


Şekil 5. Şekil 3'de kaydedilen CV'lerden A) +730 mV'daki yükseltgenme B) -220 mV'daki indirgenme pikleri için elde edilen I(µA)- pH ve E(mV) – pH grafikleri. (a) 0,1 M H_2SO_4 (b) 0,5 M H_2SO_4 (n= 3).

4.1.2. Tarama Hızının (*v*) ETK'nın Elektrokimyasal Davranışına Etkisinin İncelenmesi

Elektrokimyasal yükseltgenme ve indirgenme akım türünün difüzyon kontrollü mü yoksa adsorpsiyon kontrollü mü olduğunu belirlemek amacıyla yalın PGE'de 250 µM ETK'nın artan tarama hızlarına (10, 25, 50, 80, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 750 ve 1000

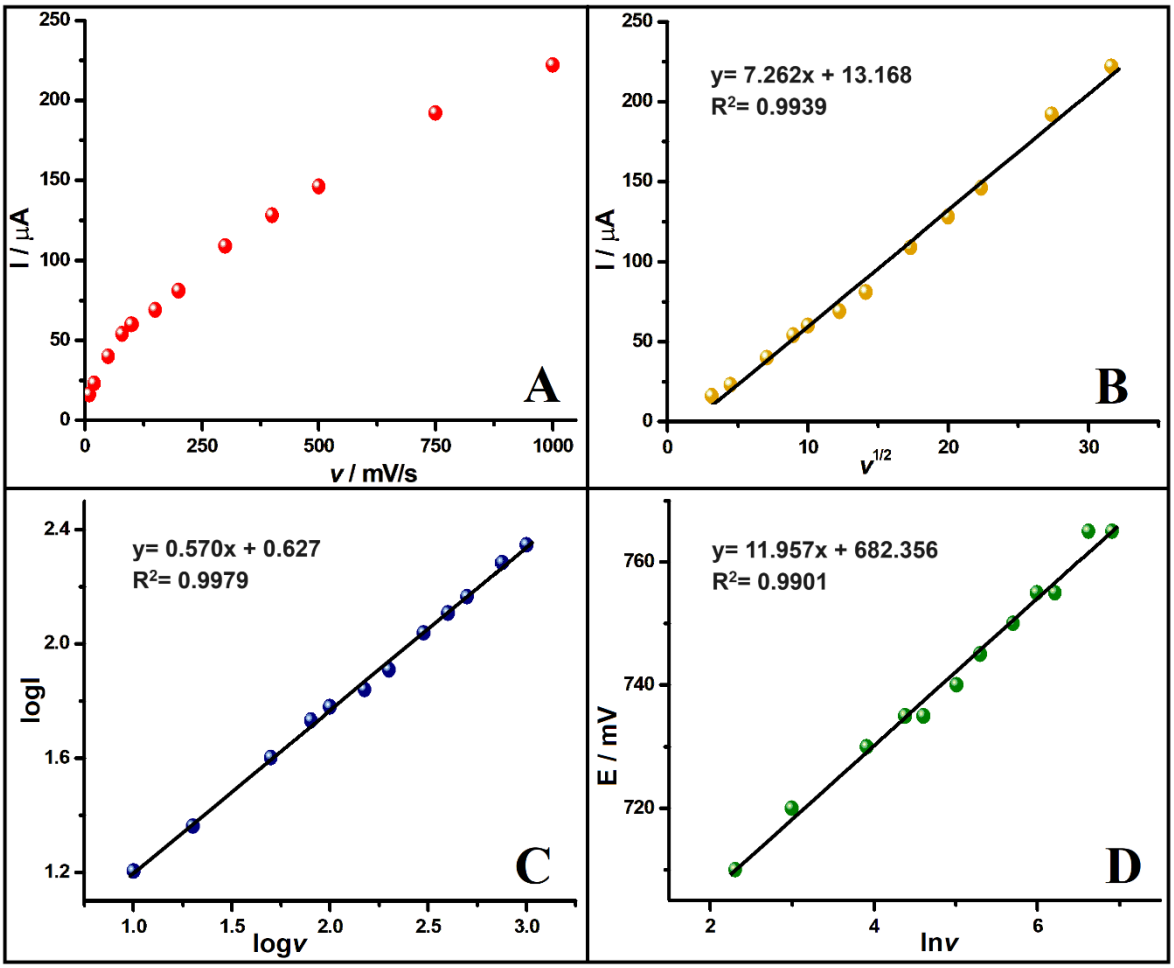
mV/s) bağlı CV'leri, 0,1 M H_2SO_4 destek çözeltisi ortamında kaydedilmiş ve Şekil 6'da verilmiştir. Şekil 6'da tarama hızının artmasıyla ETK'nın yükseltgenme ve indirgenme pik akımının giderek arttığı görülmektedir.



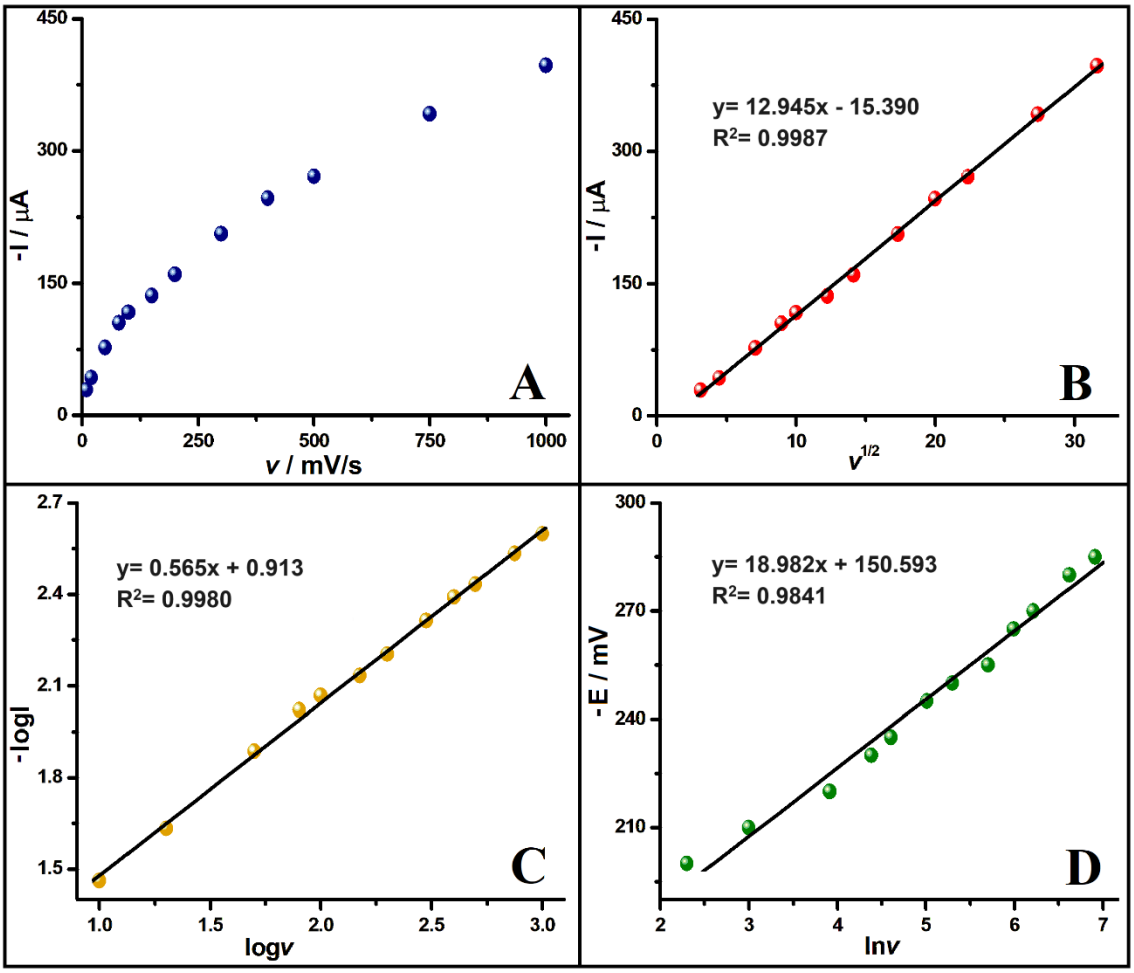
Şekil 6. Yalın PGE'de 250 µM ETK'nın 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit ortamında artan tarama hızlarına bağlı kaydedilen CV'leri.

Şekil 6'dan elde edilen verilerle hem anodik hem de katodik bölgedeki pikler için I(µA)- ν, I(µA)- $\nu^{1/2}$, log(I)-log(ν) ve E(mV)- ln(ν) grafikleri çizilmiş anodik ve katodik bölge için sırasıyla Şekil 7 ve Şekil 8'de verilmiştir. Kaydedilen CV'lerden her bir tarama hızı için hesaplanan anodik ve katodik pik akımlarının artan tarama hızlarıyla doğrusal bir ilişki göstermediği saptanmıştır (Şekil 7A ve Şekil 8A). Anodik ve katodik bölgeden hesaplanan akıma karşı tarama hızının karekökü grafiklerindeki yüksek doğrusallık ilişkisi sırasıyla (I(µA)= 7,26x $\nu^{1/2}$ -13,17 ve R^2= 0,9939) (+730 mV'daki anodik pik için) ve I(µA)= 12,95x $\nu^{1/2}$ -15,39 ve R^2= 0,9987(-220 mV'daki katodik pik için)) Şekil 7B ve Şekil 8B'de verilmiştir. Bu durum PGE yüzeyinde ETK'nın katekol grubunun tersinemez olarak kinona

yükseltgenmesine ve aynı zamanda Ar-NO_2 grubunun Ar-NHOH'a tersinmez olarak indirgenmesine ilişkin akım türünün her iki bölgede de difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Radi ve Ragaa Abd Ellatief, 2021; Shoghi Kalkhoran vd., 2018). Ayrıca, kaydedilen CV'lerden anodik bölge için çizilen LogI ile Log$v$ grafiğinden (LogI= 0,57×Log$v$ +0,6267 ve R^2= 0,9979) ve katodik bölge için çizilen LogI ile Log$v$ grafiğinden (LogI= 0,56×Log$v$ +0,9136 ve R^2= 0,998) elde edilen eğimlerin teorik değere (0,5) yakın olması da yükseltgenme ve indirgenme akımının difüzyon kontrollü olduğunu desteklemektedir (Şekil 7C ve Şekil 8C).



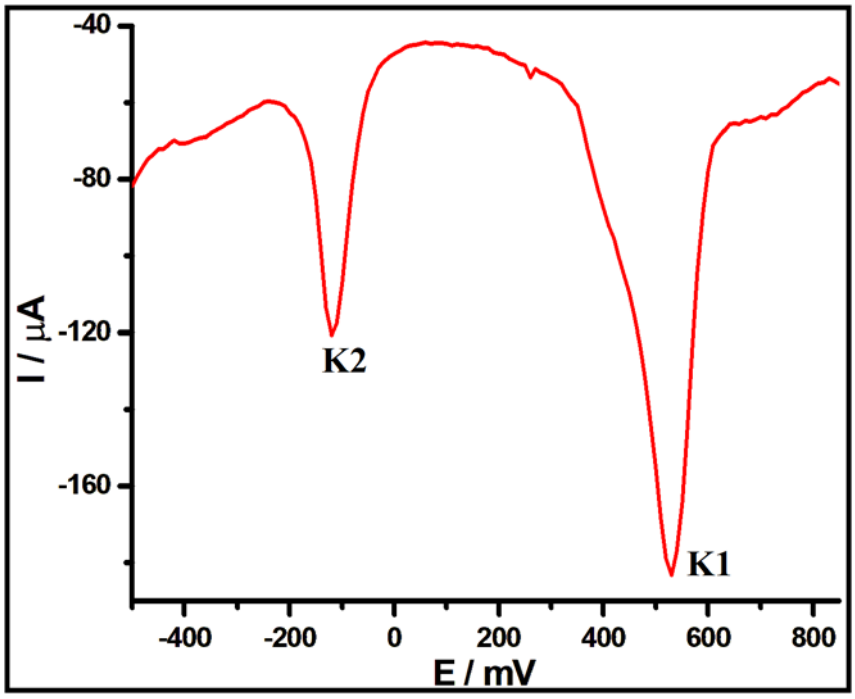
Şekil 7. Anodik bölge için Şekil 6'da kaydedilen CV'lerden elde edilen (A) I(µA) – v(mV/s), (B) I(µA) – $v^{1/2}$, (C) logI – log$v$ ve (D) E(mV) – ln$v$ grafikleri.



Şekil 8. Katodik bölge için Şekil 6'da kaydedilen CV'lerden elde edilen (A) -I(µA) – v(mV/s), (B) -I(µA) – $v^{1/2}$, (C) -logI – log$v$ ve (D) -E(mV) – ln$v$ grafikleri.

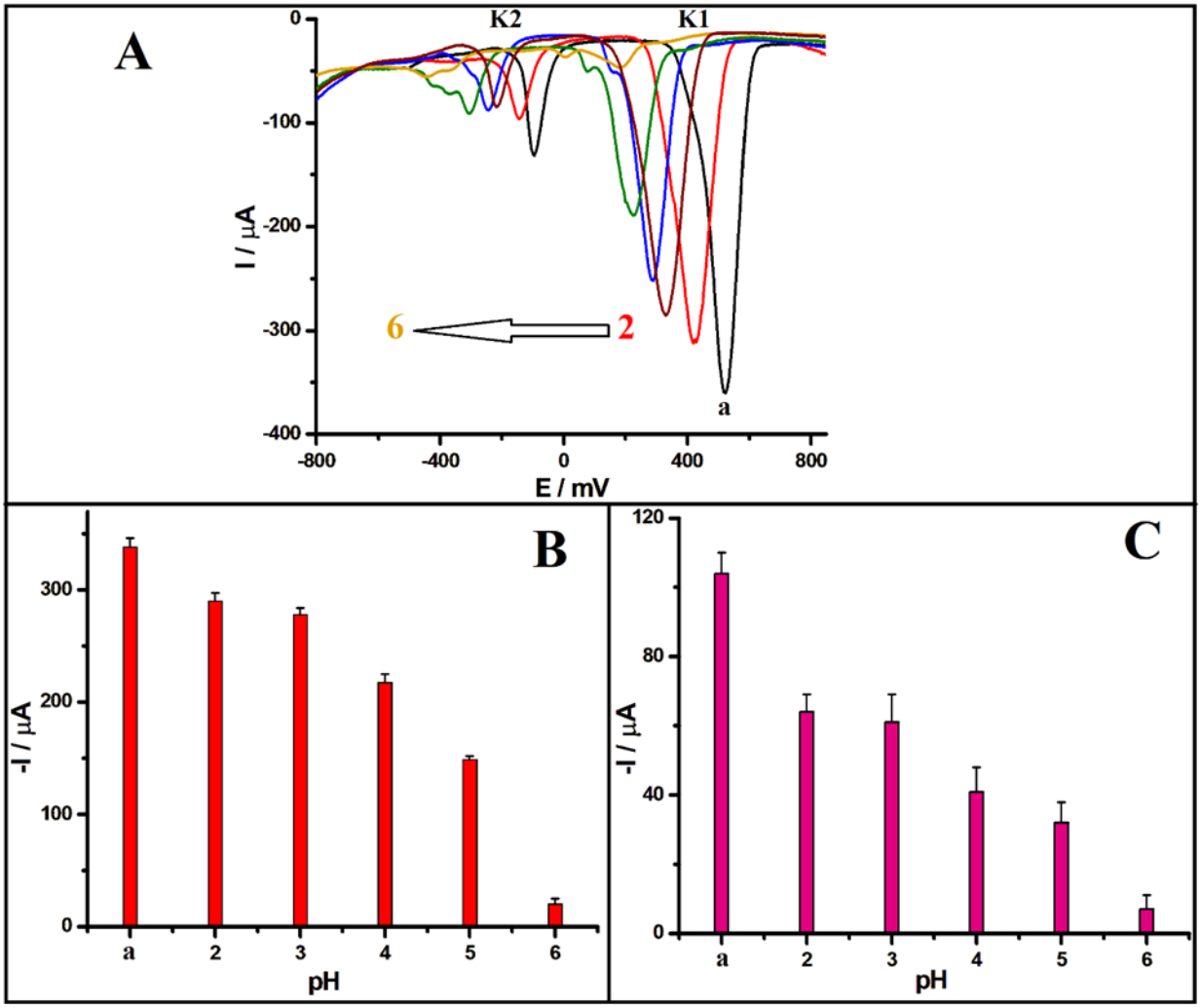
4.1.3. ETK'nın DPV Yöntemiyle Katodik Bölgedeki Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

ETK'nın DPV yöntemiyle katodik bölgedeki elektrokimyasal davranışı incelendiğinde 2 farklı indirgenme pikinin elde edildiği gözlenmiştir. Bu pikler Şekil 9'da verilerek sırasıyla +530 mV'da gözlenen Ar-N=O grubunun Ar-NHOH'a indirgenme piki K1 ve -120 mV'da gözlenen Ar-NO_2 grubunun Ar-NHOH'a indirgenme piki K2 olarak adlandırılmıştır.



Şekil 9. Yalın PGE'de 0,1 µM ETK'nın 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit ortamında katodik bölgede DPV yöntemiyle kaydedilen voltammogramı (K1: +530 mV'da 1.indirgenme piki, K2: -120 mV'da 2.indirgenme piki).

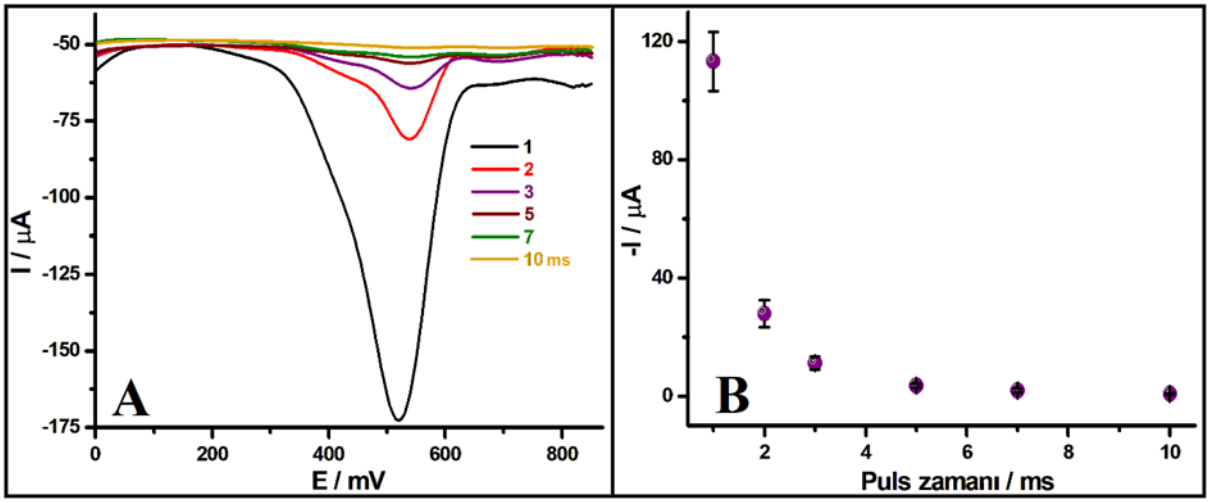
Yalın PGE'de destek elektrolit çözelti pH'sının ETK'nın indirgenmesine olan etkisinin incelenmesi amacıyla 0,5 µM ETK içeren farklı pH'lardaki (pH 2,0-6,0) BRT çözeltisi ve 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ortamında DPV'leri kaydedilmiş ve Şekil 10'da verilmiştir. Şekil 10A incelendiğinde ETK'nın indirgenme piklerine (hem K1 hem de K2) ait potansiyellerin destek elektrolit pH'nın artmasıyla daha negatif potansiyellere kaydığı ve pik akımının azalarak pik şeklinin bozulduğu gözlenmiştir. pH 2,0 den pH 6,0'ya doğru gidildikçe ETK'nın K1 için pik potansiyelinin +420 mV'dan +185 mV'a kaydığı K2 için pik potansiyelinin ise -160 mV'dan -440 mV'a kaydığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan en yüksek pik akımının (+530 mV'da K1 ve -120 mV K2) 0,1 M H_2SO_4 ortamında olduğu gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda destek elektrolit çözeltisi olarak 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 10. A) Yalın PGE'de 0,5 µM ETK'nın 0,1 M H_2SO_4 (a) ve 0,1 M KCl içeren (pH 2,0-6,0) BRT çözeltisi ortamında kaydedilen DPV'leri (v= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV; t_{pulse}= 2 ms) B) K1 ve C) K2 indirgenme pikleri için elde edilen -I(µA)-pH histogramları (n= 3).

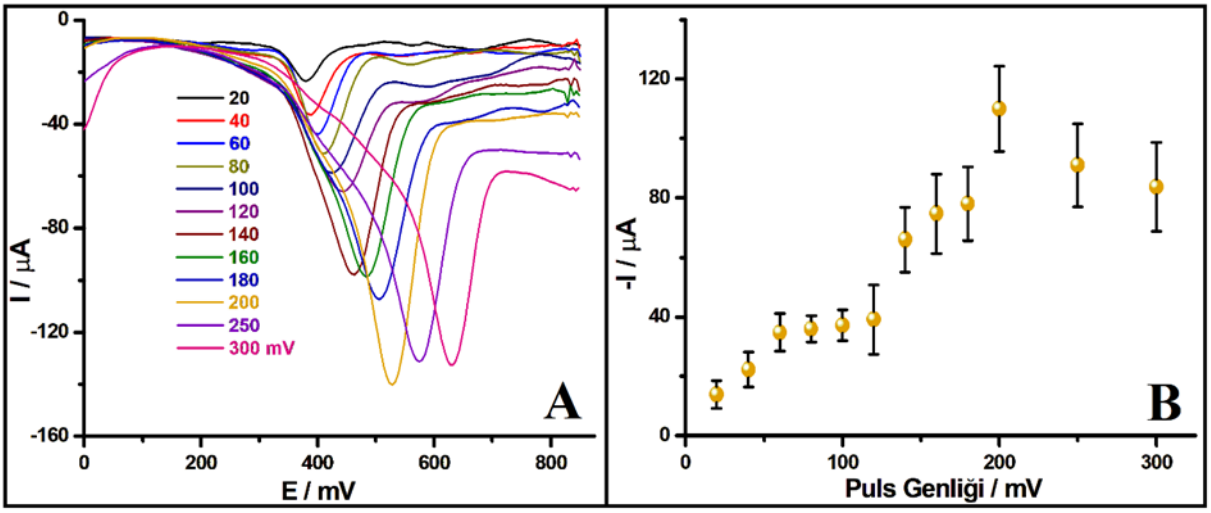
Her iki indirgenme piki için DPV yönteminde kullanılan parametreler; E_{step}, E_{amp}, t_{pulse} ve v optimize edilmiştir. Bu amaçla ilk olarak katodik bölgedeki ETK'nın 1. indirgenme pikinde (K1) diğer parametreler sabit tutularak puls zamanı optimize edilmiş ve yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK kullanılarak elde edilen grafikler Şekil 11'de verilmiştir. Şekil 11 incelendiğinde 1, 2, 3, 5, 7 ve 10 ms puls zamanları denenmiş ve puls zamanının artmasıyla elde edilen indirgenme akımlarının ciddi oranda azaldığı görülmektedir. En yüksek pik akımı 1 ms puls zamanında alındığı için optimum puls

zamanın 1 ms olmasına karar verilmiş ve diğer parametreler optimize edilirken puls zamanı 1 ms olarak kullanılmıştır.



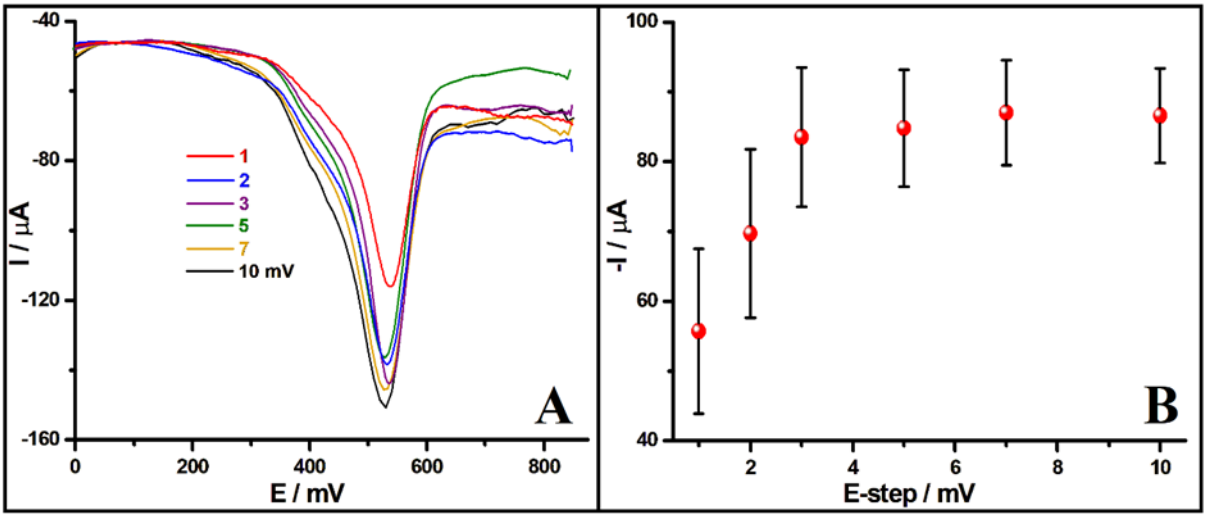
Şekil 11. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı puls zamanlarında K1 için kaydedilen DPV'leri (v= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – t_{pulse}(ms) grafiği (n= 3).

Puls zamanı 1 ms olarak optimize edildikten sonra puls genliği optimize edilmiştir. Bu amaçla 20 ile 300 mV arasında değişen puls genliği kullanılarak yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında voltammogramları kaydedilmiş ve Şekil 12A'da verilmiştir. Şekil 12 incelendiğinde puls genliğinin artmasıyla indirgenme pik potansiyellerinin pozitif bölgeye doğru kaydığı ve pik akımlarının 200 mV puls genliğine kadar arttığı 200 mV puls genliğinden sonra indirgenme pik akımlarında azalma olduğu kaydedilmiştir. Optimum puls genliği 200 mV olarak kaydedilmiştir.



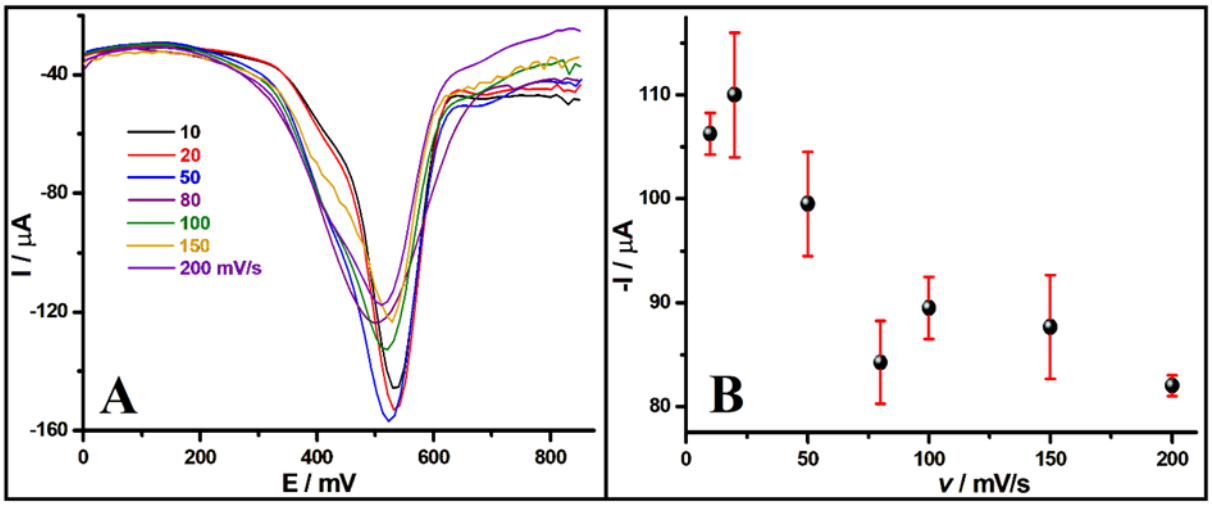
Şekil 12. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı puls genliklerinde K1 için kaydedilen DPV'leri (v= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; t_{pulse}= 1 ms), B) -I(µA) – E_{Amp}(mV) grafiği (n= 3).

Puls zamanı ve puls genliği optimize edildikten sonra basamak potansiyeli optimize edilmiştir. Bu amaçla 1, 2, 3, 5, 7 ve 10 mV basamak potansiyelleri kullanılarak yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın voltammogramları kaydedilmiş ve Şekil 13A'da verilmiştir. Şekil 13B incelendiğinde basamak potansiyelin 3 mV kadar arttığı 3 mV'dan sonra artışın azaldığı ve indirgenme pik akımını çok fazla etkilemediği gözlenmiştir. En yüksek indirgenme pik akımı 10 mV basamak potansiyelinde elde edildiği için E_{step}, 10 mV olarak belirlenmiştir.



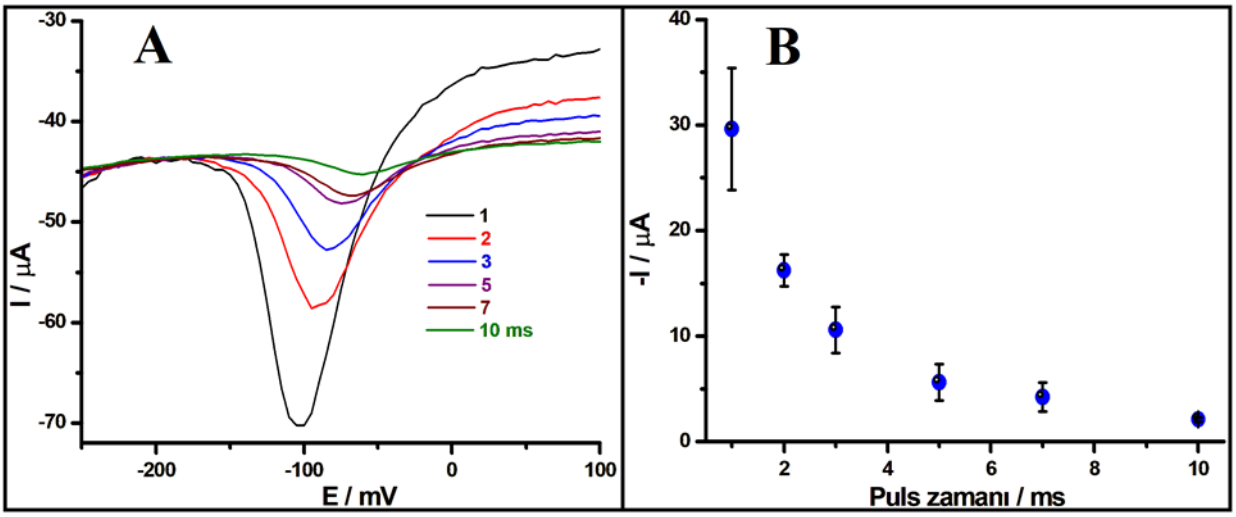
Şekil 13. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı basamak potansiyellerinde K1 için kaydedilen DPV'leri (v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – E_{step}(mV) grafiği (n= 3).

Son olarak tarama hızı optimize edilmek amacıyla 1 ms puls zamanı, 200 mV puls genliği ve 10 mV basamak potansiyeli kullanılarak değişen (10, 20, 50, 80, 100, 150 ve 200 mV/s) tarama hızlarında yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın yanıtları kaydedilmiş ve Şekil 14'de verilmiştir. Şekil 14 incelendiğinde en yüksek pik akımının 10, 20 ve 50 mV/s'de alındığı ve indirgenme pik akımlarında 10, 20 ile 50 mV/s arasında çok değişmediği gözlenmektedir. Daha hızlı çalışılmasına olanak tanımasından dolayı optimum tarama hızının 50 mV/s olmasına karar verilmiştir.



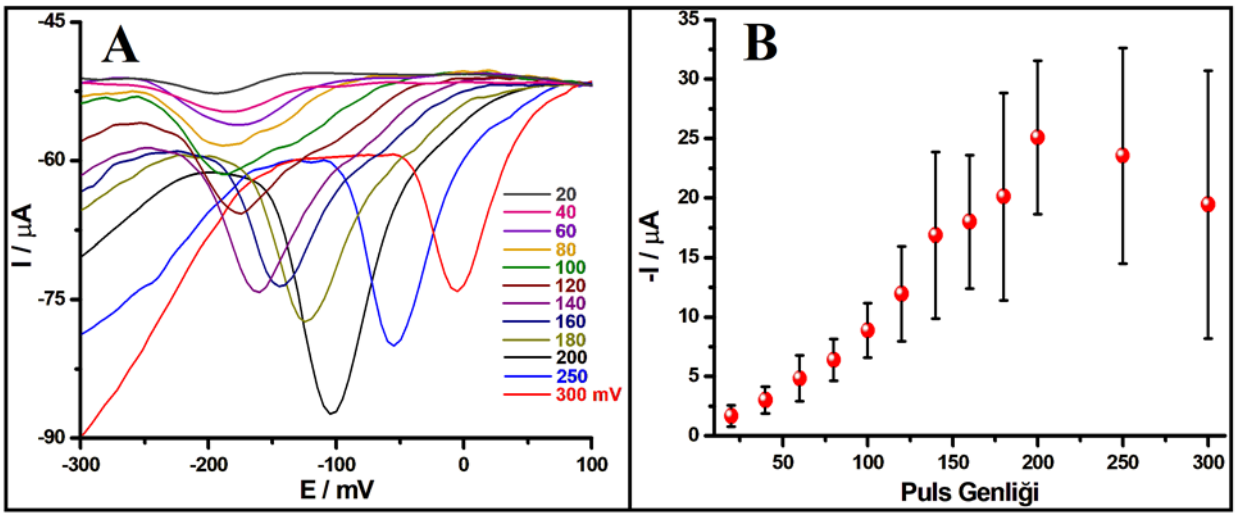
Şekil 14. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı tarama hızlarında K1 için kaydedilen DPV'leri (t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – *v*(mV/s) grafiği (n= 3).

Katodik bölgedeki ETK'nın 2. indirgenme pikinde (K2) diğer parametreler sabit tutularak puls zamanı optimize edilmiş ve yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK kullanılarak elde edilen grafikler Şekil 15'de verilmiştir. Şekil 15 incelendiğinde 1, 2, 3, 5, 7 ve 10 ms puls zamanları denenmiş ve puls zamanının artmasıyla elde edilen indirgenme akımlarında ciddi oranda azaldığı görülmektedir. En yüksek pik akımı 1 ms puls zamanında alındığı için optimum puls zamanın 1 ms olmasına karar verilmiş ve diğer parametreler optimize edilirken puls zamanı 1 ms olarak kullanılmıştır.



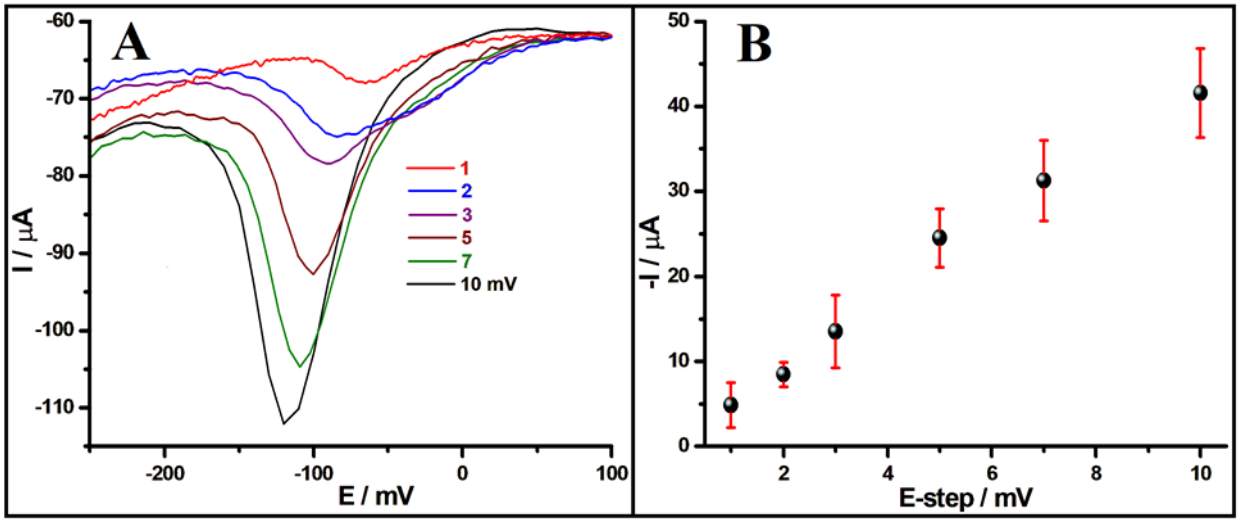
Şekil 15. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı puls zamanlarında K2 için kaydedilen DPV'leri (v= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – t_{pulse}(ms) grafiği (n= 3).

Puls zamanı 1 ms olarak optimize edildikten sonra puls genliği optimize edilmiştir. Bu amaçla 20 ile 300 mV arasında değişen puls genliği kullanılarak yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında voltammogramları kaydedilmiş ve Şekil 16A'da verilmiştir. Şekil 16 incelendiğinde puls genliğinin artmasıyla indirgenme pik potansiyellerinin pozitif bölgeye doğru kaydığı ve pik akımlarının 200 mV puls genliğine kadar arttığı 200 mV puls genliğinden sonra indirgenme pik akımlarında azalma olduğu kaydedilmiştir. Optimum puls genliği 200 mV olarak kaydedilmiştir.



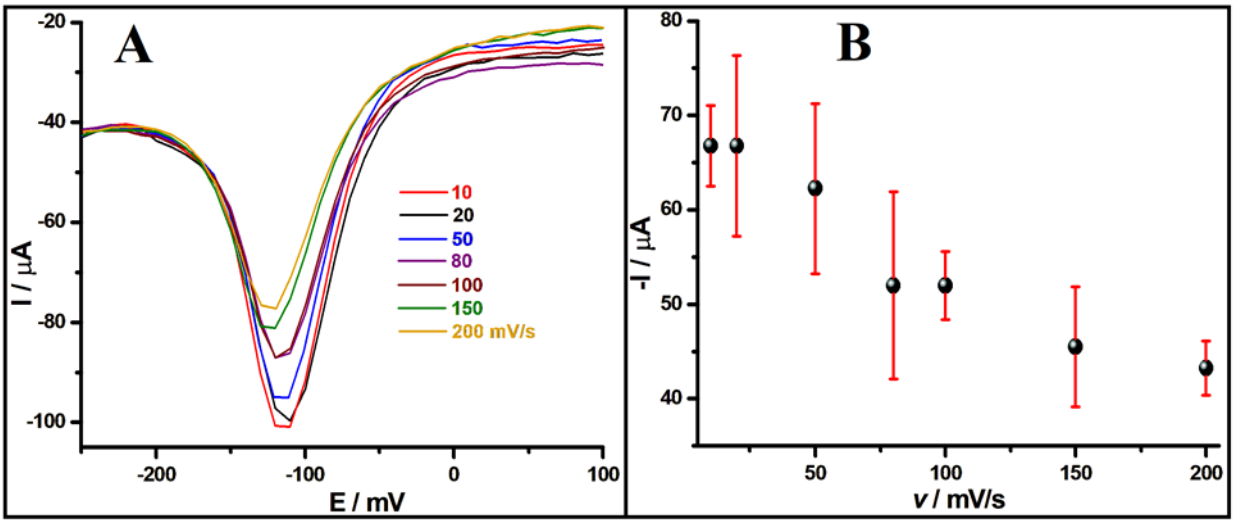
Şekil 16. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı puls genliklerinde K2 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; t_{pulse}= 1 ms), B) -I(µA) – E_{Amp}(mV) grafiği (n= 3).

Puls zamanı ve puls genliği optimize edildikten sonra basamak potansiyeli optimize edilmiştir. Bu amaçla 1, 2, 3, 5, 7 ve 10 mV basamak potansiyelleri kullanılarak yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın voltammogramları kaydedilmiş ve Şekil 17A'da verilmiştir. Şekil 17B incelendiğinde basamak potansiyelin artmasıyla indirgenme pik akımının arttığı gözlenmiştir. En yüksek indirgenme pik akımı 10 mV basamak potansiyelinde elde edildiği için E_{step}, 10 mV olarak belirlenmiştir.



Şekil 17. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı basamak potansiyellerinde K2 için kaydedilen DPV'leri (v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – E_{step}(mV) grafiği (n= 3).

Son olarak tarama hızı optimize edilmek amacıyla 1 ms puls zamanı, 200 mV puls genliği ve 10 mV basamak potansiyeli kullanılarak değişen (10, 20, 50, 80, 100, 150 ve 200 mV/s) tarama hızlarında yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın yanıtları kaydedilmiş ve Şekil 18'de verilmiştir. Şekil 18B incelendiğinde en yüksek pik akımının 10, 20 ve 50 mV/s'de alındığı ve indirgenme pik akımlarında 10, 20 ile 50 mV/s arasında çok değişmediği gözlenmektedir. Daha hızlı çalışılmasına olanak tanımasından dolayı optimum tarama hızının 50 mV/s olmasına karar verilmiştir.

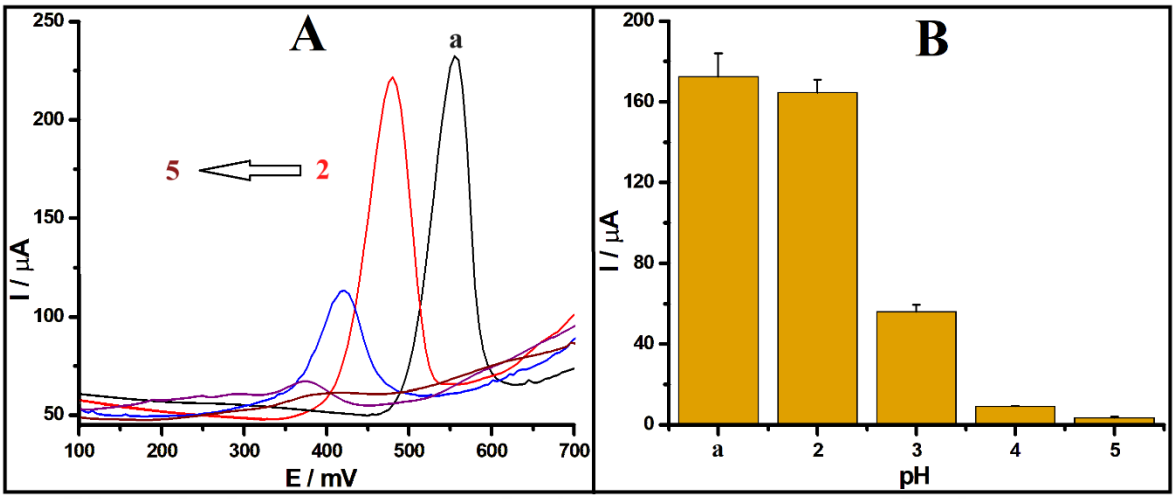


Şekil 18. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,1 µM ETK'nın farklı tarama hızlarında K2 için kaydedilen DPV'leri (t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) -I(µA) – *v*(mV/s) grafiği (n= 3).

Özetle 1. (K1) ve 2. (K2) indirgenme pik akımının optimum koşulları; puls zamanı 1 ms, puls genliği 200 mV, basamak potansiyeli 10 mV ve tarama hızı 50 mV/s olarak optimize edilmiştir.

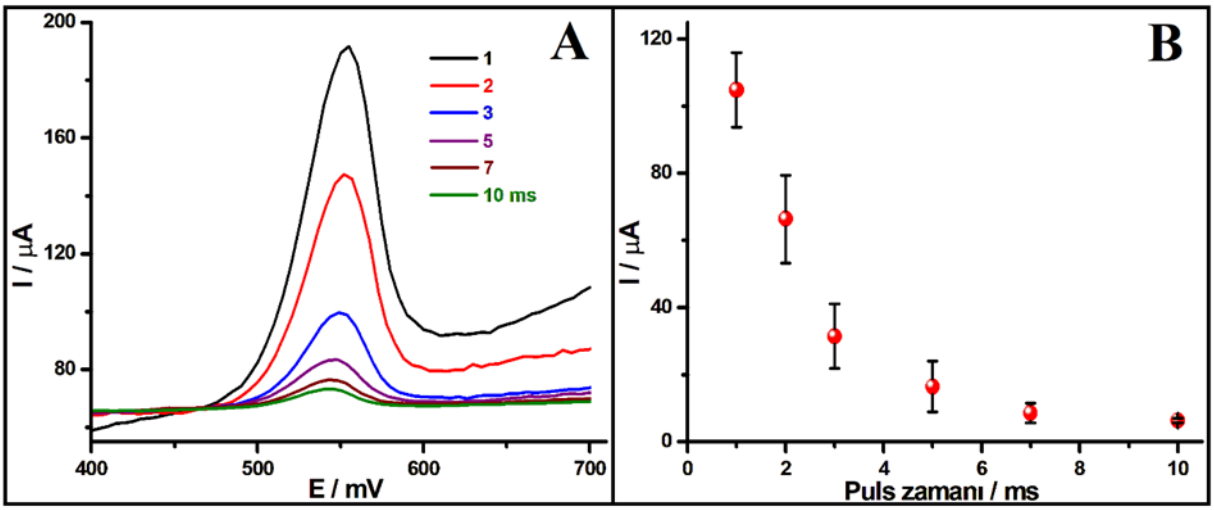
4.1.4. ETK'nın DPV Yöntemiyle Anodik Bölgedeki Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

Yalın PGE'de destek elektrolit çözelti pH'sının ETK'nın yükseltgenmeye olan etkisinin incelenmesi amacıyla 1 µM ETK içeren farklı pH'lardaki (pH 2,0-5,0) BRT çözeltisi ve (a) 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ortamında DPV'leri kaydedilmiş ve Şekil 19'da verilmiştir. Şekil 19A incelendiğinde ETK'nın yükseltgenme pik potansiyelinin destek elektrolit pH'nın artmasıyla daha negatif potansiyellere kaydığı ve pik akımının azalarak pik şeklinin bozulduğu gözlenmiştir. pH 2'den pH 5'e doğru gidildikçe ETK'nın anodik pik potansiyelinin +470 mV'dan +380 mV'a kaydığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan en yüksek pik akımının 0,1 M H_2SO_4 ortamında (yaklaşık +550 mV'da) olduğu gözlenmiştir. Yaklaşık olarak +550 mV'da gözlenen yükseltgenme piki A1 olarak adlandırılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda destek elektrolit çözeltisi olarak 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi kullanılmasına karar verilmiştir.



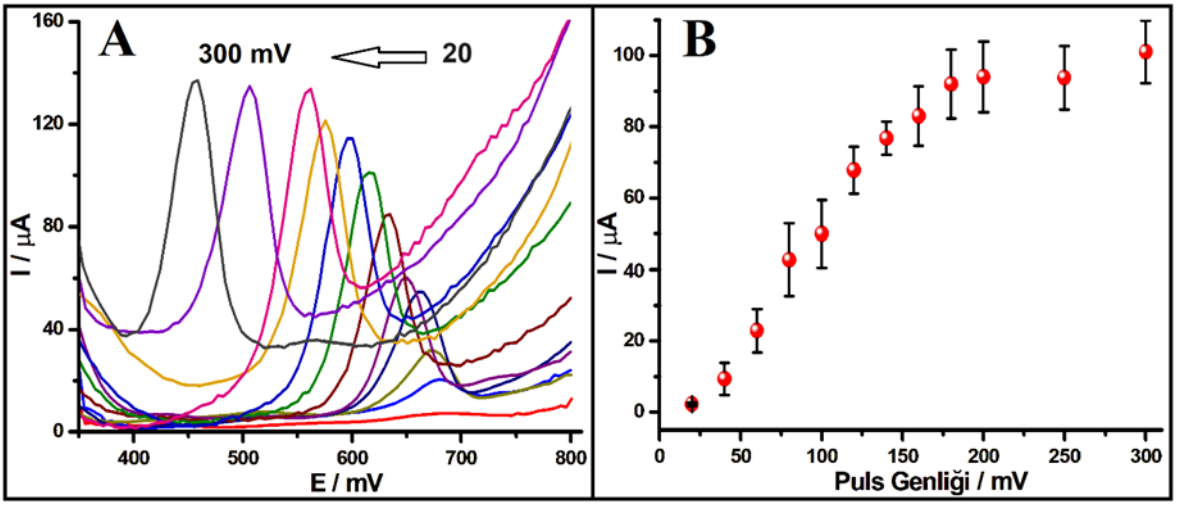
Şekil 19. A) Yalın PGE'de 1 µM ETK'nın 0,1 M H_2SO_4 (a) ve 0,1 M KCl içeren (pH 2,0-5,0) BRT çözeltisi ortamında A1 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV; t_{pulse}= 2 ms), B) A1 için I-pH histogramı (n= 3).

Katodik bölgede indirgenme piki için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarının aynısı anodik bölgedeki yükseltgenme piki içinde tekrarlanmıştır. Bu amaçla, ilk olarak, değişen puls zamanları kullanılarak (1, 2, 3, 5, 7 ve 10 ms) puls zamanı optimize edilmiş ve elde edilen voltammogramları Şekil 20A'da verilmiştir. Şekil 20B incelendiğinde indirgenme pik akımlarında gözlendiği gibi yükseltgenme pik akımında da puls zamanının artmasıyla pik akımları azalmıştır. En yüksek pik akımı 1 ms'de kaydedildiğinden optimum puls zamanı 1 ms olarak belirlenmiştir.



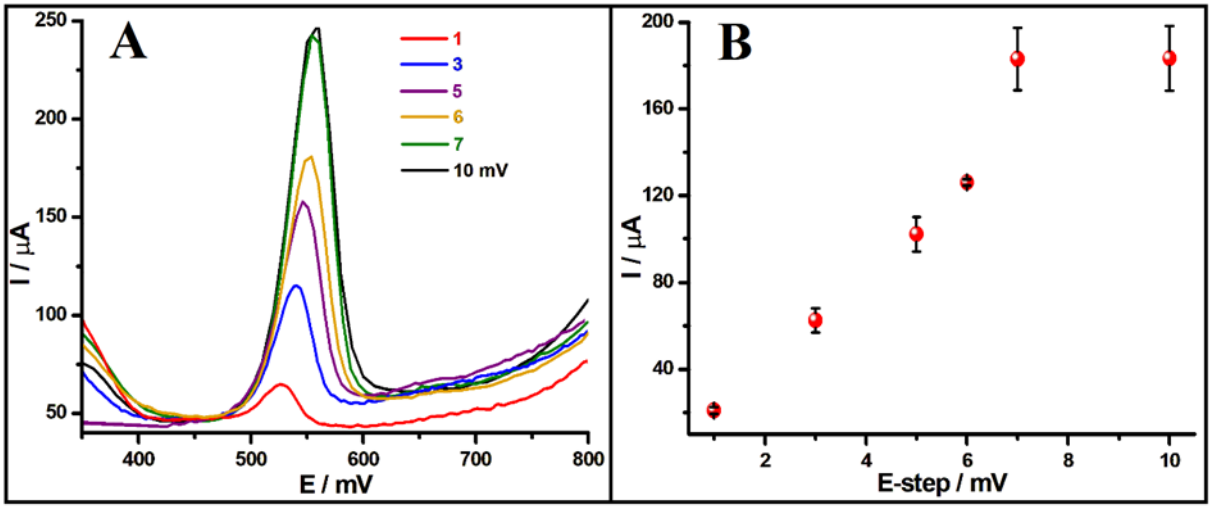
Şekil 20. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,5 µM ETK'nın farklı puls zamanlarında A1 için kaydedilen DPV'leri (v= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) I(µA) – t_{pulse}(ms) grafiği (n= 3).

Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 20 ile 300 mV arasında değişen puls genlikleri kullanılarak voltommogramları kaydedilmiş ve Şekil 21A'da verilmiştir. Şekil 21 incelendiğinde puls genliğinin artmasıyla yükseltgenme pik akımının arttığı pik potansiyelinin ise negatif bölgeye doğru kaydığı gözlenmiştir. Optimum puls genliği 200 mV olarak belirlenmiştir.



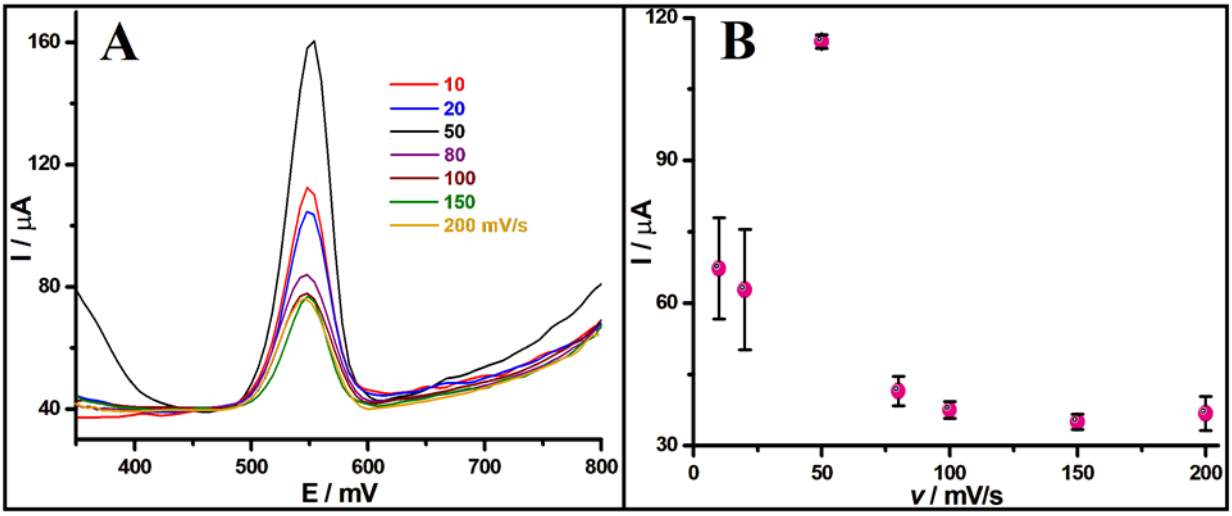
Şekil 21. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,5 µM ETK'nın farklı puls genliklerinde A1 için kaydedilen DPV'leri (ν= 50 mV/s; E_{step}= 5 mV; t_{pulse}= 1 ms), B) I(µA) – E_{Amp}(mV) grafiği (n= 3).

Puls zamanı 1 ms, puls genliği 200 mV olarak optimize edildikten sonra bu şartlar altında basamak potansiyeli optimize edilmiştir. Bu amaçla 1, 3, 5, 6, 7 ve 10 mV basamak potansiyelleri kullanılmış elde edilen sonuçlar Şekil 22'de verilmiştir. Şekil 22B incelendiğinde basamak potansiyelinin artmasıyla pik akımının arttığı 7 mV'dan sonra pik akımının artmadığı ve pik şeklinin bozulduğu gözlenmiştir. Optimum basmak potansiyeli 7 mV olarak belirlenmiştir.



Şekil 22. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,5 µM ETK'nın farklı basamak potansiyellerinde A1 için kaydedilen DPV'leri (v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{Amp}= 200 mV), B) I(µA) – E_{step}(mV) grafiği (n= 3).

Son olarak tarama hızı optimize edilmek amacıyla 1 ms puls zamanı, 200 mV puls genliği ve 7 mV basamak potansiyeli kullanılarak değişen (10, 20, 50, 80, 100, 150 ve 200 mV/s) tarama hızlarında yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,5 µM ETK'nın yanıtları kaydedilmiş ve Şekil 23'de verilmiştir. Şekil 23 incelendiğinde en yüksek pik akımının 50 mV/s'de alındığı gözlenmektedir. Optimum tarama hızının 50 mV/s olmasına karar verilmiştir.

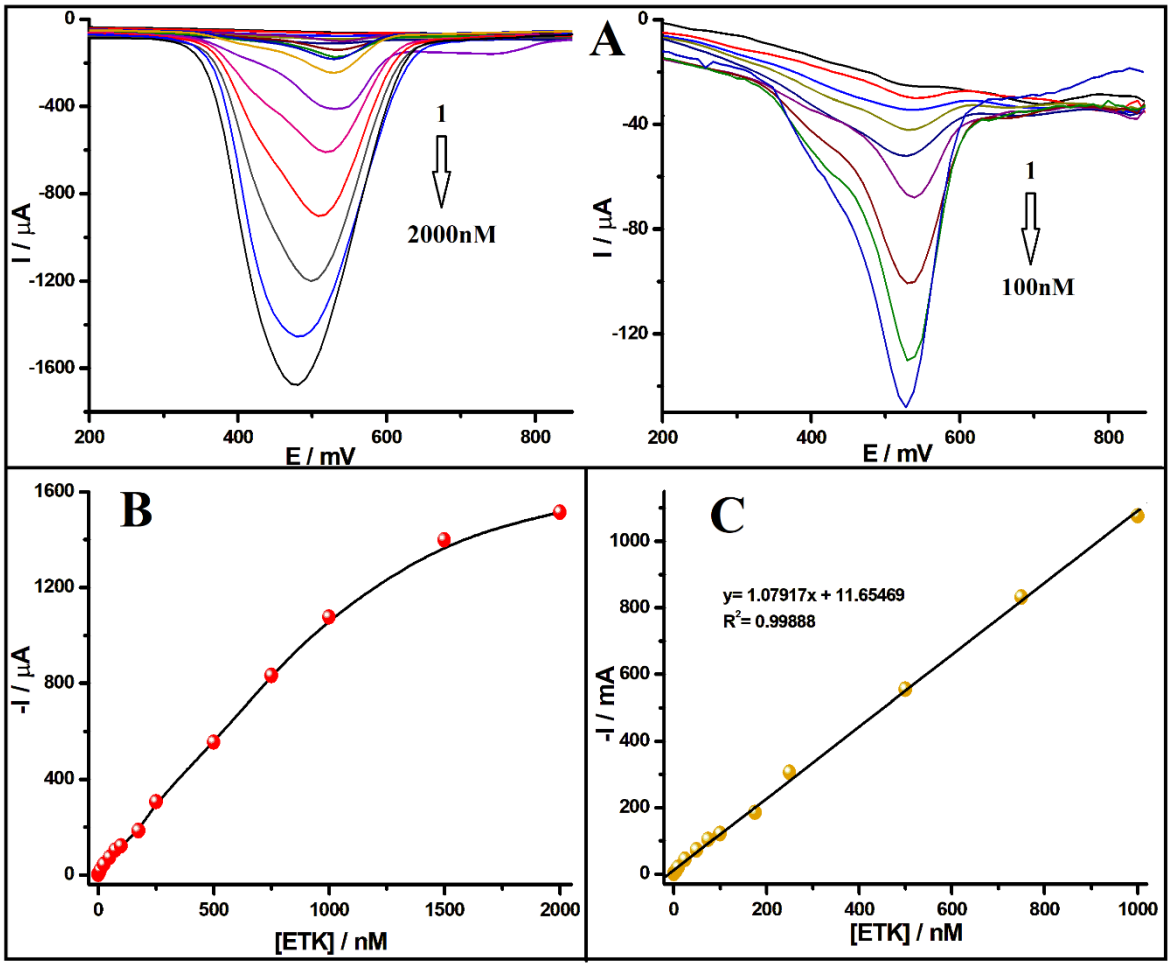


Şekil 23. A) Yalın PGE'de 0,1 M H_2SO_4 ortamında 0,5 µM ETK'nın farklı tarama hızlarında A1 için kaydedilen DPV'leri (t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) I(µA) – *v*(mV/s) grafiği (n= 3).

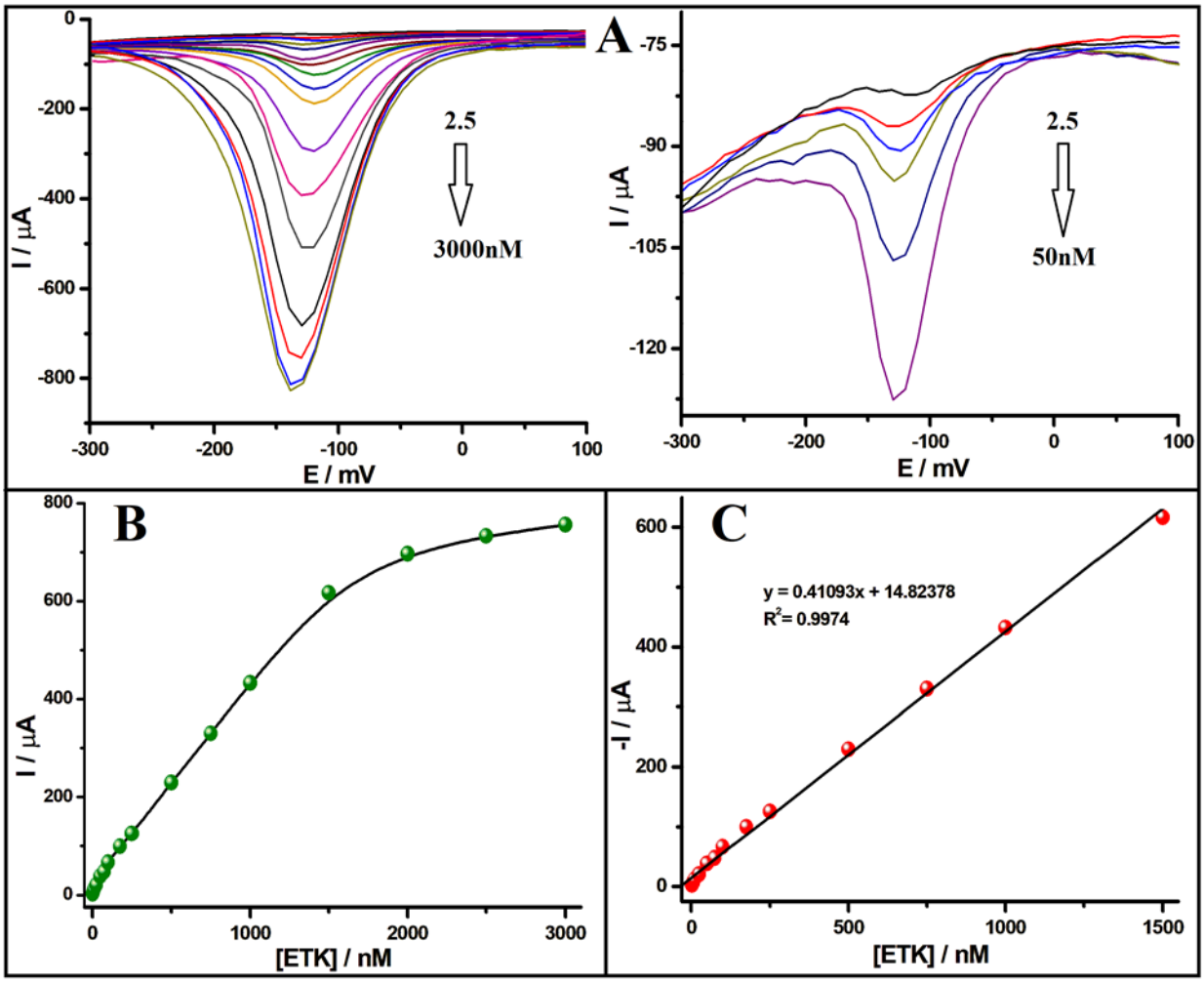
Özetle yükseltgenme (A1) pik akımı için optimum koşullar; puls zamanı 1 ms, puls genliği 200 mV, basamak potansiyeli 7 mV ve tarama hızı 50 mV/s olarak optimize edilmiştir.

4.1.5. Optimum Koşullar Altında DPV Yöntemiyle ETK'nın Analitiksel Parametrelerinin Belirlenmesi

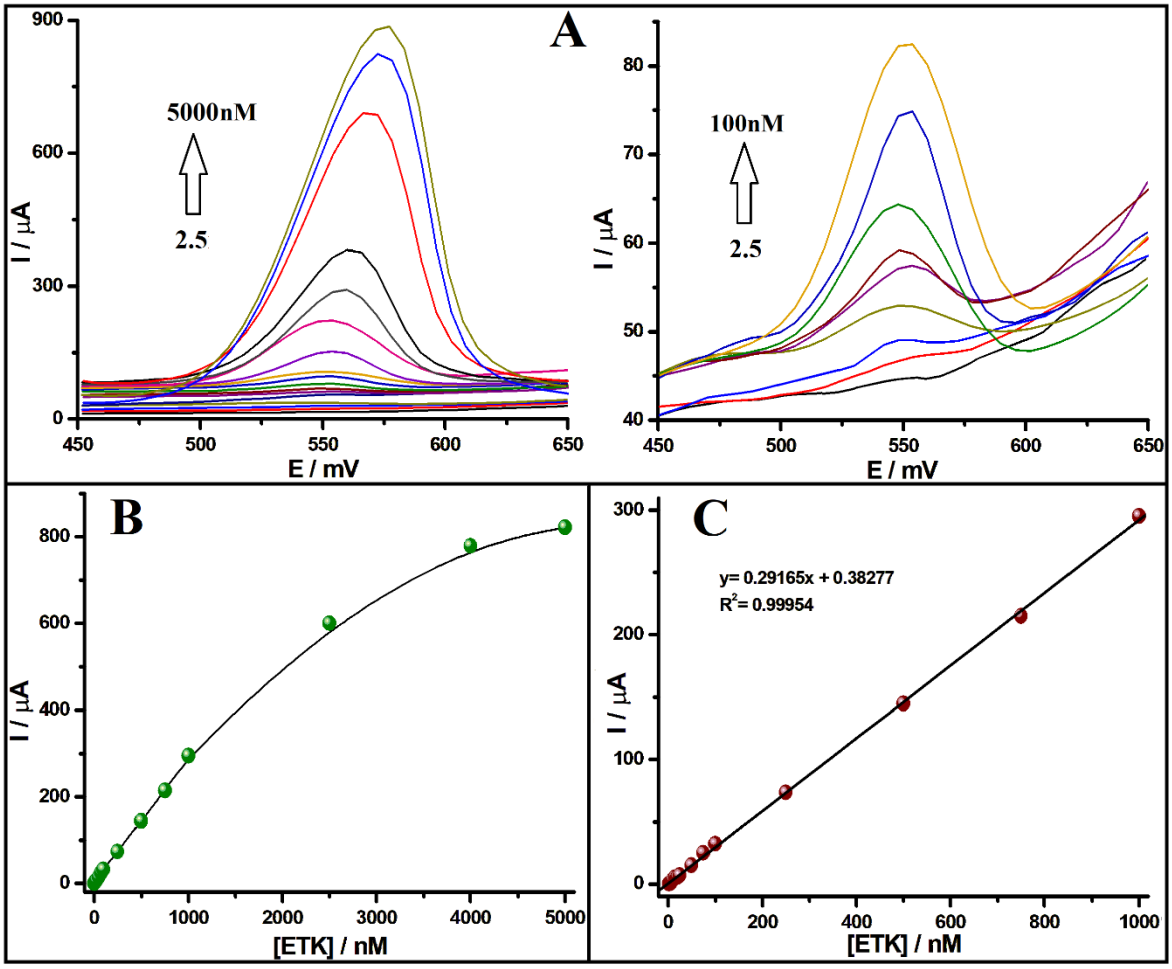
DPV yöntemiyle optimize edilen şartlar altında (K1 ve K2 indirgenme pikleri için optimum koşullar; puls zamanı; 1 ms, puls genliği; 200 mV, basamak potansiyeli; 10 mV ve tarama hızı 50 mV/s; A1 yükseltgenme piki için optimum koşullar; puls zamanı; 1 ms, puls genliği; 200 mV, basamak potansiyeli; 7 mV ve tarama hızı 50 mV/s) ETK'nın artan derişimlerine karşı kaydedilen DPV'ler Şekil 24A-26A arasında verilmiştir. Elde edilen voltammogramlardan pik akımları hesaplanarak derişime karşı akım değişim grafikleri Şekil 24B-26B arasında ve doğrusal değişimi ifade eden kalibrasyon grafikleri ise Şekil 24C-26C arasında verilmiştir.



Şekil 24. A) Yalın PGE'de 1. indirgenme (K1) piki için 0,1 M H_2SO_4 çözeltisinde değişen 1-2000 nM arasında artan ETK derişimlerinde kaydedilen DPV'ler (v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) Artan ETK derişimine karşı pik akım grafiği, C) Doğrusal kalibrasyon eğrisi.



Şekil 25. A) Yalın PGE'de 2. indirgenme (K2) piki için 0,1 M H_2SO_4 çözeltisinde değişen 2,5-3000 nM arasında artan ETK derişimlerinde kaydedilen DPV'ler (v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) Artan ETK derişimine karşı pik akım grafiği, C) Doğrusal kalibrasyon eğrisi.



Şekil 26. A) Yalın PGE'de yükseltgenme (A1) piki için 0,1 M H_2SO_4 çözeltisinde değişen 2,5-5000 nM arasında artan ETK derişimlerinde kaydedilen DPV'ler (v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV), B) Artan ETK derişimine karşı pik akım grafiği, C) Doğrusal kalibrasyon eğrisi.

Şekil 24C'de görüldüğü gibi K1 indirgenme piki için kalibrasyon eğrisi 1 ile 1000 nM aralığında doğrusal olarak değişmiş ve doğru denklemi ise 0,99888 regrasyon katsayısı ile doğru denklemi y= 1,07917x + 11,65469 olarak elde edilmiştir. Şekil 25C'de görüldüğü gibi K2 indirgenme piki için kalibrasyon eğrisi 2,5- 1500 nM aralığında doğrusal olarak değişmiş ve doğru denklemi y= 0,41093x + 14,82378 (R^2= 0,9974) olarak elde edilmiştir. Şekil 26C'de ise anodik bölgedeki ETK'nın yükseltgenme piki için doğrusal yanıt aralığı 2,5 ve 1000 nM olarak kaydedilmiştir. Elde edilen doğru denklemi y= 0,29165x + 0,38277 (R^2= 0,99954) bulunmuştur. Optimize edilen şartlar altında 0,1 M H_2SO_4 destek elektroliti ortamında en düşük ETK derişimi için kaydedilen voltammogramlardan pik akımları ve

standart sapma değerleri (kör standart sapması olarak kabul edilmiştir, $s_{kör}$) hesaplanarak belirtme alt sınırı (Limit of Detection, LOD) $3s_{kör}$/eğim ve kantitatif tayin sınırı (Limit of Quantification, LOQ) $10s_{kör}$/eğim formüllerinden hesaplanarak belirlenmiştir. Katodik bölgedeki K1 pikinden elde edilen analitiksel parametreler; doğrusal yanıt aralığı 1-1000 nM, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,36 ve 1,20 nM olarak bulunmuştur. K2 pikinden elde edilen analitiksel parametreler ise doğrusal yanıt aralığı 2,5- 1500 nM, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,79 ve 2,64 nM olarak hesaplanmıştır. Anodik bölgedeki ETK'nın yükseltgenme pikinden elde edilen verilerden hesaplanan LOD ve LOQ değerleri 0,69 ve 2,3 nM olarak hesaplanmış ve doğrusal yanıt aralığı 2,5 ve 1000 nM olarak kaydedilmiştir. ETK'nın daha çok yükseltgenmesine bağlı elektrokimyasal çalışmaların yapıldığı bununla birlikte az sayıda indirgenmesine bağlı çalışmaların olduğu literatür araştırmalarından görülmektedir. Bu tez çalışmasında, bir yükseltgenme bir de indirgenme olmak üzere iki örnek çalışmadan bahsedilmiştir. Farklı elektrotların kullanıldığı çok sayıdaki çalışmalar Tablo 1'de özetlenmiştir. Tablo incelendiğinde ETK'nın yükseltgenmesinde ve indirgenmesinde bağlı voltammetrik tayinler gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte farklı elektrotlar ve modifiye edici maddeler kullanıldığı görülmektedir. Yükseltgenmeye bağlı çalışmalarda dopamin, ürik asit, askorbik asit, karbidopa ve levodopa gibi moleküllerin potansiyel girişimcilerin olduğu dikkate alındığında ETK'nın indirgenme özelliğine bağlı çalışmanın girişimlerden daha az etkilenmesi adına daha mantıklıdır. ETK; dopamin, levodopa, ve karbidopa gibi moleküllere yakın molekül yapısına sahip olduğu ve bunlardan farklı olarak indirgenebilecek Ar-NO_2 sahiptir. Ar-NO_2 grubu ise 4 e^- ve 4 H^+ Ar-NHOH grubuna indirgenmekte (Şekil 4) ve buna ait -120 mV da keskin bir indirgenme piki vermektedir. Böylece dopamin, karbidopa ve levodopa varlığında entakopon bu indirgenme piki üzerinden seçici olarak tayin edilebilecektir. Tasarlanan yöntem, (A1) 2,5 -1000 nM, (K2) 2,5 - 1500 ve (K2)1-1000 nM olmak üzere üç geniş doğrusal aralık sergilemekte ve ETK'yı diğer prosedürlerle daha uyumlu olan nanomolar seviyelerde (LOD=0,69 nM (A1), 0,79 nM (K2) ve 0,36 nM (K1)) tespit etmektedir. Sonuç olarak literatür çalışmaları incelendiğinde ETK'nın indirgenmesine ve yükseltgenmesine birçok çalışma geliştirilmiştir. ETK'nın insan sağlığı açısından önemi göz önüne alındığında konuyla alakalı çalışmaların sayısının giderek artacağı düşünülmektedir.

Tablo 1

Yayınlanmış diğer ETK sensörleri ile bu çalışmada elde edilen analitik performans değerlerinin karşılaştırılması.

Elektrot	**Kullanılan Metod**	**Destekleyici Elektrolit**	**Doğrusal Aralık (µM)**	**Gözlenebilme Sınırı (µM)**	**Referans**
Molibdat nanoplate indirgenmiş grafen oksit nanokompozit modifiye camsı karbon elektrot	Yükseltgenme / Diferansiyel puls voltammetrisi	0,1 M PBS pH 3,0	9×10^{-3}-200	$3{,}18\times10^{-4}$	Shoghi Kalkhoran vd., 2018
Moleküler baskılı polimer camsı karbon elektrot	Yükseltgenme/ Diferansiyel puls voltammetrisi	0,2 M PBS, pH 3,0	0,1-5	0,05	Radi ve Ragaa Abd Ellatief, 2021
Karbon pasta elektrot	Yükseltgenme/ Diferansiyel puls voltammetrisi	BRT, pH 2,0	1-38	0,113	Rizk vd., 2015
Metiyonin/paladyum nanopartikülleri modifiye karbon pasta elektrot	Yükseltgenme/ Diferansiyel puls voltammetrisi	BRT pH 2,0	2×10^{-2}-800	$7{,}077\times10^{-4}$	Salama vd., 2015
Multi-Mode Elektrot	İndirgenme/ Diferansiyel puls polarografi	BRT pH 2,3	150-350	-	Abasq vd., 2008

Tablo 1'in devamı

Asılı Cıva Damla Elektrodu	İndirgenme/ Kare dalga katodik adsorptif sıyırma voltammetrisi	BRT pH 8,0	5×10^{-4}-$3,5\times10^{-1}$	$1,5\times10^{-4}$	Ghoneim ve El Desoky, 2015
Metformin tutturulmuş çok duvarlı karbon nanotüp yüzeyine gümüş nanoparçacıkları elektrokimyasal olarak biriktirilmiş camsı karbon elektrot	İndirgenme/Amperometri	0,1 M PBS, pH 7,0	0,05-70	$15,3\times10^{-3}$	Baghayeri vd., 2016
NH_2 ile fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüp camsı karbon elektrot	Yükseltgenme/ Döngüsel voltammetri	0,5 M H_2SO_4	$0,5\times10^{-3}$-5×10^{-2}	$3,13\times10^{-5}$	Aftab vd., 2019
Sülfür-kalay oksit nanopartikül ekran baskılı elektrot	Yükseltgenme/ Döngüsel voltammetri - Diferansiyel puls voltammetrisi	0,1 M PBS pH 2,0	0,1-75	0,01	Naghian vd., 2021
Nafyon matrisinde grafitleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüplerin ve grafen nanotabakaların birleşimi kullanılarak hazırlanan nanokompozit camsı karbon elektrot	Yükseltgenme/ Döngüsel voltammetri	0,1 M H_2SO_4	0,5-10	$3,2\times10^{-2}$	Nigović, 2023

Tablo 1'in devamı

Asılı Cıva Damla Elektrodu	İndirgenme/ Kare dalga voltammetrisi	BRT, pH 2,5	16-160	$1,3\times10^{-4}$	Jain vd., 2010
Yalın kalem grafit elektrot	Yükseltgenme/ Diferansiyel puls voltammetrisi	0,1M H_2SO_4	$2,5\times10^{-3}$-1 (A1)	$6,9\times10^{-4}$	Bu tez çalışması
	İndirgenme/ Diferansiyel puls voltammetrisi	0,1M H_2SO_4	10^{-3}-1 (K1)	$3,6\times10^{-4}$	
			$2,5\times10^{-3}$-1,5 (K2)	$7,9\times10^{-4}$	

Son olarak tasarlanan ETK sensörün tekrarlanabilirliğini araştırmak için, hem katodik hemde anodik bölgede optimize edilmiş koşullar altında 2 farklı derişimde (Katodik bölgede 50 ve 500 nM; Anodik bölgelde 50 ve 250 nm) gün içinde ve günler arasında ölçümler alınarak akım değerleri kaydedilmiştir. Akım değerlerinden hesaplanan % RDS değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2

Anodik ve katodik bölgeden (Katodik bölgede 50 ve 500 nM; Anodik bölgede 50 ve 250 nM ETK için) edilen gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları (n= 3).

Çalışılan Bölge	**K1**		**K2**		**A1**	
	50 nm	500 nm	50 nm	500 nm	50 nm	250 nm
Gün içi % RSD	2,78	2,20	2,92	2,72	3,72	2,57
Günler arası % RSD	4,40	3,22	4,22	3,93	4,88	4,81

% RSD değerleri incelendiğinde gün içinde alınan ölçümlerden tekrarlanabilirliklerin % 5'in altında olması, tasarlanan ETK sensörünün oldukça kararlı gün içi yanıtlar verdiğini göstermekte ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucu elde edilen % RSD değerlerinin % 5'in altında bulunması, tasarlanan ETK sensörünün oldukça iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak (RSD ≤ % 5), ETK tayini için kullanılan yalın PGE'nin hem anodik hem de katodik piklerine ait voltammetrik yanıtların yüksek ve kabul edilebilir kesinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.1.6. Girişim Etkisinin İncelenmesi

ETK'nın yapısına benzer yapıda olan kimyasalların (levodopa, karbidopa), su numunelerinde bulunması kuvvetle ihtimal bazı iyonların (Cu^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^{+}, Cl^{-}, Na^{+}, SO_4^{2-}), bazı şekerlerin (glikoz, fruktoz, sükroz), ürik asitin, askorbik asitin ve dopaminin ETK'nın indirgenme (K1, K2) ve yükseltgenme (A1) pik akımlarına olan olası girişim etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, katodik bölgede 0,25 μM ve anodik bölgede ise 0,5 μM ETK içeren 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit ortamında hem anodik hem de katodik bölgede DPV'leri kaydedildi. Ardından olası girişim etkisi gösterecek maddenin stok çözeltisinden ETK'nın derişimine göre sırasıyla 1, 2, 5, 10, 25 ve 50 kat olacak şekilde uygun

pipetleme yapılarak DPV'leri kaydedildi. Aynı deneysel basamaklar olası girişim etkisi gösterebilecek tüm maddeler için tekrarlandı. Son olarak ETK'nın indirgenme (K1, K2) ve yükseltgenme (A1) DPV'lerinde pik akımlarındaki yüzde değişimleri ve standart sapma değerleri her biri için ayrı ayrı hesaplandı.

Yalın PGE'de ETK'nın anodik bölgede yükseltgenme A1 piki için seçici tayini, günlük örneklerde bulunabilecek birçok iyonik ve moleküler türün varlığında test edilmiş ve sonuçlar Tablo 3'de DPV yanıtındaki yüzde değişim olarak gösterilmiştir. Sonuçlar, 50 kat Mg^{2+}, K^{+}, Cl^{-}, sükroz,10 kat Ca^{2+}, SO_4^{2-}, 5 kat Na^{+}, 2 kat Cu^{2+}, fruktoz, ürik asit, karbidopa ve 1 kat glikoz, askorbik asit, dopamin, levodopanın ETK'nın DPV yanıtı üzerindeki etkilerinin % 10'luk tolerans sınırına göre ihmal edilebilir düzeyde olduğunu kanıtlamaktadır. Elde edilen yüksek seçicilik, önerilen yöntemin söz konusu iyonik ve/veya moleküler türleri içeren günlük örneklerde ETK'nın seçici olarak belirleyebileceğini göstermektedir.

Tablo 3

Girişimcilerin yalın PGE'de ETK'nın yükseltgenme (A1) DPV yanıtı üzerindeki etkisi (sabit ETK konsantrasyonu 0,5 μM ve n= 3).

Girişimciler	**Girişimci Türlerin Katları**	**Yanıttaki Değişimler (%)**	**SD (±)**
Cu^{2+}	2,0	1,61	0,41
Mg^{2+}	50	-3,39	2,24
Ca^{2+}	10	-4,01	1,38
K^{+}	50	-5,00	0,36
Cl^{-}	50	-3,93	1,85
Na^{+}	5,0	-3,03	1,73
SO_4^{2-}	10	-2,98	2,15
Fruktoz	2,0	0,18	0,25
Glikoz	1,0	-3,79	1,03
Sükroz	50	-1,44	0,96
Ürik asit	2,0	3,82	2,91
Askorbik asit	1,0	-4,14	2,22
Dopamin	1,0	-1,63	1,42
Levodopa	1,0	4,09	1,49
Karbidopa	2,0	-1,70	2,41

Yalın PGE'de ETK'nın katodik bölgede K1 indirgenme piki için seçici tayini günlük örneklerde bulunabilecek birçok iyonik ve moleküler türün varlığında test edilmiş ve sonuçlar Tablo 4'de DPV yanıtındaki yüzde değişim olarak gösterilmiştir. Sonuçlar, 50 kat K^+, Cl^-, 25 kat fruktoz, levodopa, 10 kat sükroz, 5 kat Mg^{2+}, Ca^{2+}, SO_4^{2-}, glikoz, dopamin, 2 kat Na^+, karbidopa, 1 kat Cu^{2+}, ürik asit, askorbik asitin ETK'nın DPV yanıtı üzerindeki etkilerinin % 10'luk tolerans sınırına göre ihmal edilebilir düzeyde olduğunu kanıtlamaktadır. Elde edilen yüksek seçicilik, önerilen yöntemin söz konusu iyonik ve/veya moleküler türleri içeren günlük örneklerde ETK'nın seçici olarak belirleyebileceğini göstermektedir.

Tablo 4.

Girişimcilerin yalın PGE'de ETK'nın indirgenme (K1) DPV yanıtı üzerindeki etkisi (sabit ETK konsantrasyonu 0,25 µM ve n= 3).

Girişimciler	**Girişimci Türlerin Katları**	**Yanıttaki Değişimler (%)**	**SD (±)**
Cu^{2+}	1	-0,14	1,82
Mg^{2+}	5	4,11	2,03
Ca^{2+}	5	1,30	1,78
K^+	50	-2,33	1,62
Cl^-	50	-4,18	2,34
Na^+	2	1,57	2,22
SO_4^{2-}	5	5,88	0,81
Fruktoz	25	3,30	2,85
Glikoz	5	2,32	0,43
Sükroz	10	-1,92	1,5
Ürik asit	1	2,46	2,5
Askorbik asit	1	-2,07	1,96
Dopamin	5	3,12	2,66
Levodopa	25	2,41	2,16
Karbidopa	2	-5,20	2,86

Yalın PGE'de ETK'nın katodik bölgede indirgenme piki (K2) için seçici tayini günlük örneklerde bulunabilecek birçok iyonik ve moleküler türün varlığında test edilmiş ve sonuçlar Tablo 5'de DPV yanıtındaki yüzde değişim olarak gösterilmiştir. Sonuçlar, 50 kat K^+, Cl^-, 25 kat levodopa, 5 kat fruktoz, glikoz, 2 kat Ca^{2+}, Na^+, SO_4^{2-}, dopamin ve 1 kat Cu^{2+}, Mg^{2+}, sükroz, ürik asit, askorbik asit, karbidopanın ETK'nın DPV yanıtı üzerindeki etkilerinin % 10'luk tolerans sınırına göre ihmal edilebilir düzeyde olduğunu

kanıtlamaktadır. Elde edilen yüksek seçicilik, önerilen yöntemin söz konusu iyonik ve/veya moleküler türleri içeren günlük örneklerde ETK'nın seçici olarak belirleyebileceğini göstermektedir.

Tablo 5

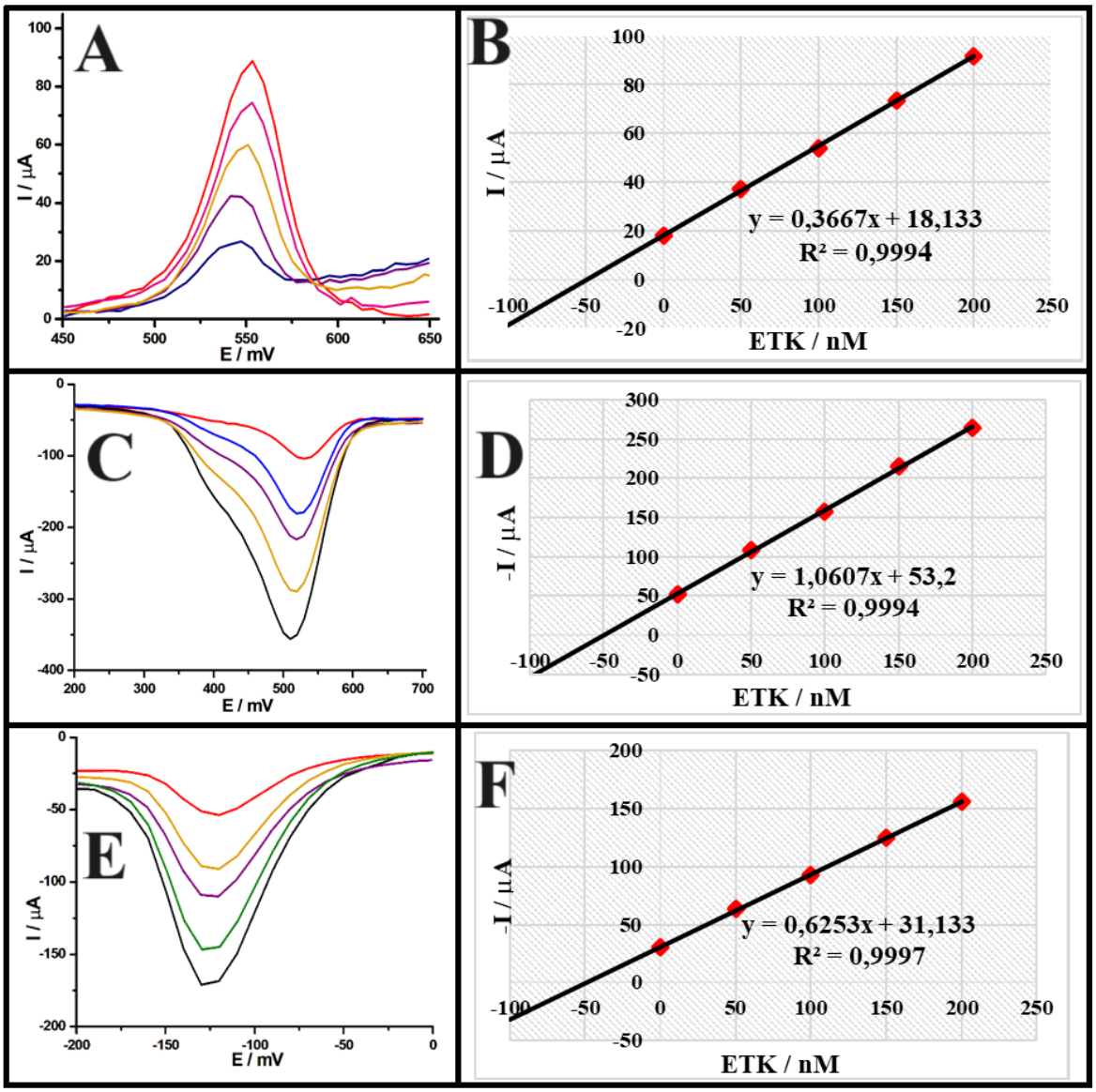
Girişimcilerin yalın PGE'de ETK'nın indirgenme (K2) DPV yanıtı üzerindeki etkisi (sabit ETK konsantrasyonu 0,25 μM ve n= 3).

Girişimciler	Girişimci Türlerin Katları	Yanıttaki Değişimler (%)	SD (±)
Cu^{2+}	1	-4,64	0,39
Mg^{2+}	1	-4,52	0,42
Ca^{2+}	2	-6,6	1,33
K^{+}	50	3,4	2,84
Cl^{-}	50	2,95	0,68
Na^{+}	2	-3,74	2,4
SO_4^{2-}	2	-5,86	0,44
Fruktoz	5	-1,7	1,52
Glikoz	5	-4,56	1,61
Sükroz	1	-3,09	0,99
Ürik asit	1	-1,9	1,78
Askorbik asit	1	-2,09	1,76
Dopamin	2	-2,47	1,89
Levodopa	25	-0,89	2,32
Karbidopa	1	-2,17	2,08

4.1.7. ETK'nın Farmasötik Tablette Tayini

Karbidoba, Levodapa ve ETK içeren tablet deneysel kısımda (Bölüm 3.3.7) bahsedildiği şekliyle hazırlanarak bir stok tablet çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden elektrokimyasal hücredeki son derişimi 50 nM olacak şekilde uygun hacimde alınarak, 5 mL 0,1 M H_2SO_4 destek elektrolit çözeltisi içeren elektrokimyasal hücreye eklendi. Optimize edilen koşullar altında hem katodik hemde anodik bölgede DPV'ler tablet çözeltisi eklenmeden önce ve sonra kaydedildi. Ardından, 50 nM olacak şekilde standart ETK çözeltisinden ard arda 4 kez elektrokimyasal hücreye ilâve edilerek ve tekrardan DPV'ler ETK'nın hem yükseltgenmesi (A1) hem de indirgenmesi (K1 ve K2) için ayrı ayrı kaydedildi. DPV'lerden yükseltgenme ve indirgenme pik akımları okunarak tablet numunesi için ETK'nın indirgenmesi (K1 ve K2) ve yükseltgenmesi (A1) üzerinden standart katma

eğrileri elde edildi (Şekil 27). Standart katma eğrilerinden tablette bulunan ETK miktarları ve % RSD değerleri hesaplandı (Tablo 6).



Şekil 27. Elektrokimyasal hücrede 50 nM ETK içerecek şekilde seyreltilmiş farmasötik tablet çözeltilerine 50 nM standart ETK çözeltisi eklenmiş ((A), A1 piki; (C), K1 piki; (E), K2 piki için) standart ekleme DPV'leri. Voltammogramlar, 0,1 M H_2SO_4 içinde optimize edilmiş koşullar altında (K1 ve K2 piki için: ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV, A1 piki için: ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV) kaydedilmiştir. A1 (B), K1 (D) ve K2 (F) piklerine 50 nM standart ETK spike edilmiş farmasötik numune çözeltilerinin standart ekleme eğrileri.

ETK sensörünün uygulanabilirliği, film tablet numune olarak farmasötik formülasyonlarda araştırılmıştır. Bu amaçla, bu numune ETK'nın yükseltgenme (A1), ve her iki indirgenme (K1 ve K2) pikleri için DPV-standart ekleme yöntemiyle analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 6'da özetlenmiştir. Görüldüğü üzere, elde edilen % RSD değerleri, önerilen yöntemin etkili bir şekilde uygulanabilirliğini ve güvenilirliğini göstermektedir.

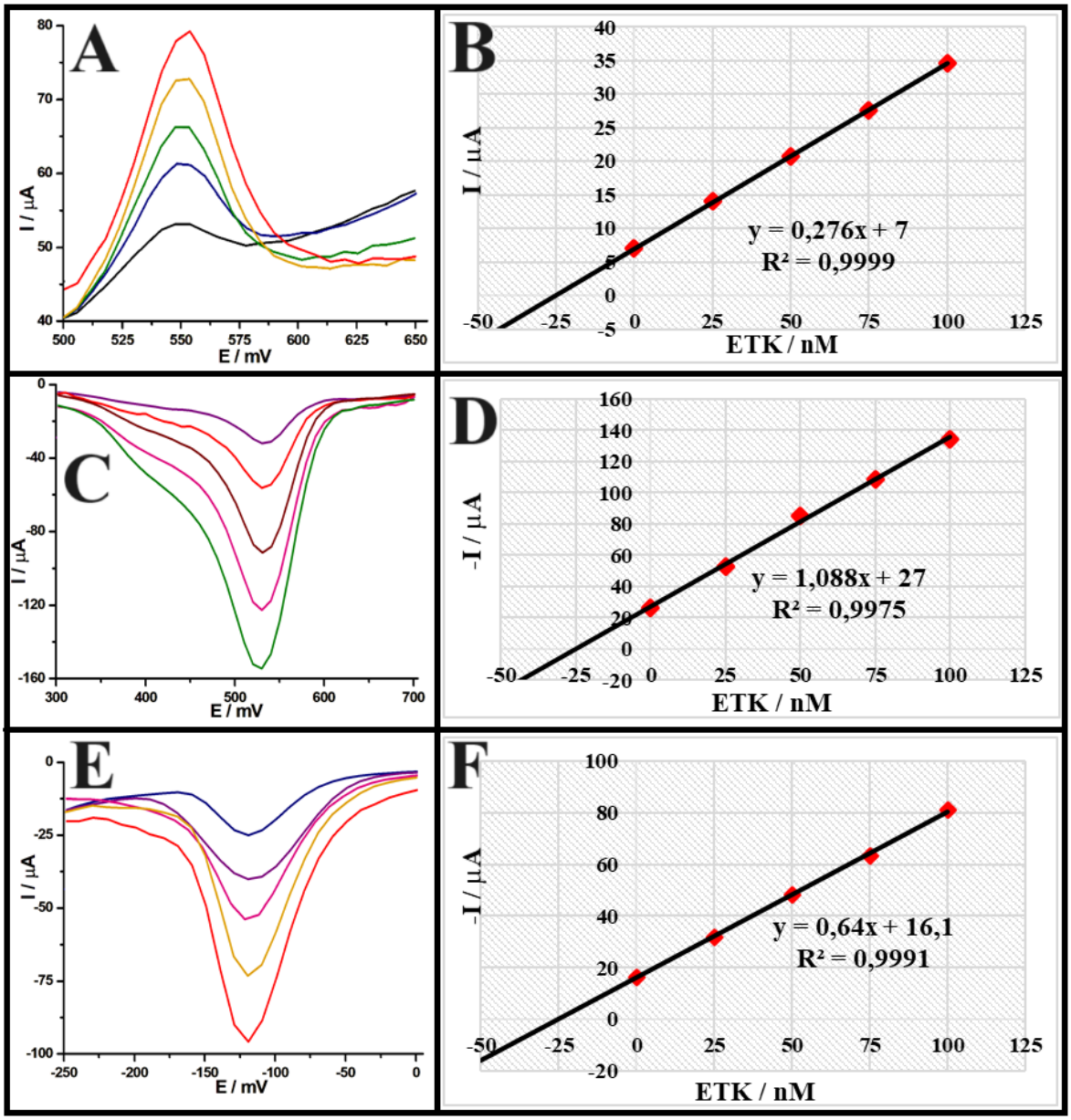
Tablo 6

Farmasötik örnekten elde edilen uygulanabilirlik sonuçları (n= 3).

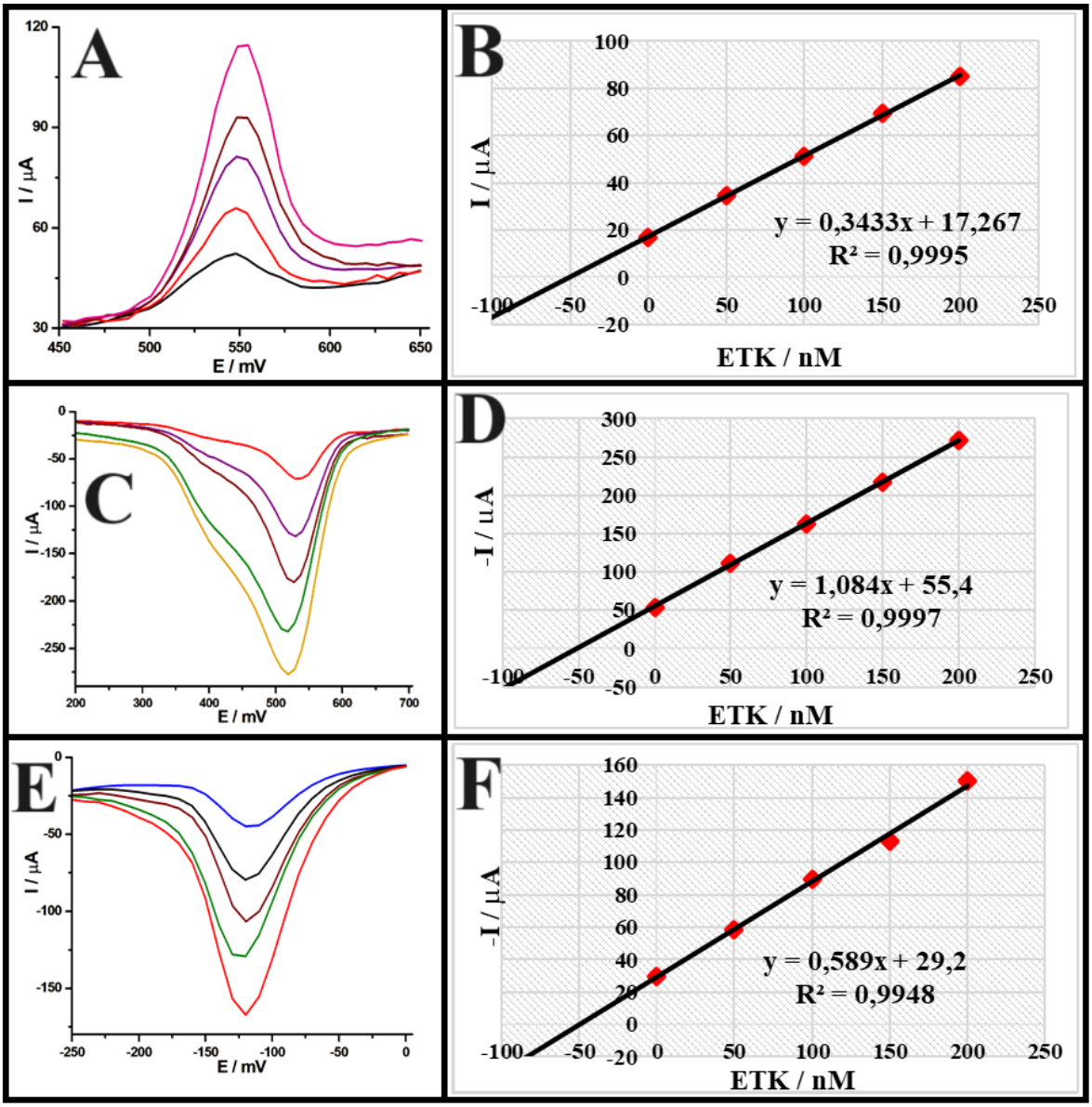
Örnek	**ETK miktarı (mg)**	**Bulunan miktar (mg) ± SD**	**RSD (%)**
Tablet	200	199,3 ±1,5 (A1)	0,77
		202,0 ±1,0 (K1)	0,49
		201,0 ±2,0 (K2)	0,99

4.1.8. ETK'nın Yapay İdrarda Geri Kazanım Çalışmaları

Yöntemin uygulanabilirliği yapay idrara spike edilen ETK'nın geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilerek de incelendi. Bölüm 3.3.6'da hazırlanan yapay idrar stok çözeltisinin içerisine bilinen derişimde ETK spike edildi. Bu yöntemle hazırlanan ve farklı iki derişimde ETK (25 ve 50 nM) spike edilen yapay idrarın optimize edilen koşullar altında 0,1 M H_2SO_4 ortamında hem katodik hem de anodik bölgede DPV sonuçları kaydedildi. Ardından, ard arda 4 kez hücrede 25 nM olacak şekilde 10μM ETK (standart) çözeltisinden ilave edildi ve DPV'ler ETK'nın hem yükseltgenmesi (A1) hemde indirgenmesi (K1, K2) için ayrı ayrı kaydedildi. Deneysel basamaklar 50 nM içinde aynı şekilde tekrarlandı. DPV'lerden yükseltgenme ve indirgenme pik akımları okunarak derişime karşı standart katma grafikleri çizildi (Şekil 28 ve Şekil 29). Son olarak her bir yapay idrar numunesi için ETK'nın indirgenmesi (K1, K2) ve yükseltgenmesi (A1) üzerinden geri kazanım değerleri ve % RSD değerleri hesaplandı (Tablo 7).



Şekil 28. Elektrokimyasal hücrede 25 nM ETK içeren yapay idrar çözeltilerine 25 nM standart ETK çözeltisi eklenmiş ((A), A1 piki (C), K1 piki (E), K2 piki için) standart ekleme DPV'leri. Voltammogramlar, 0,1 M H_2SO_4 içinde optimize edilmiş koşullar altında (K1 ve K2 piki için: ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV, A1 piki için: ν= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV) kaydedilmiştir. A1 (B), K1 (D) ve K2 (F) piklerine 25 nM standart ETK spike edilmiş yapay idrar çözeltilerinin standart ekleme eğrileri.



Şekil 29. Elektrokimyasal hücrede 50 nM ETK içeren yapay idrar çözeltilerine 50 nM standart ETK çözeltisi eklenmiş ((A), A1 piki (C), K1 piki (E), K2 piki için) standart ekleme DPV'leri. Voltammogramlar, 0,1 M H_2SO_4 içinde optimize edilmiş koşullar altında (K1 ve K2 piki için: v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 10 mV; E_{Amp}= 200 mV, A1 piki için: v= 50 mV/s; t_{pulse}= 1 ms; E_{step}= 7 mV; E_{Amp}= 200 mV) kaydedilmiştir. A1 (B), K1 (D) ve K2 (F) piklerine 50 nM standart ETK spike edilmiş yapay idrar numune çözeltilerinin standart ekleme eğrileri.

ETK'nun DPV yöntemiyle pratik uygulanabilirliği, yapay idrar örneği standart ekleme yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar, ETK'nın A1, K1 ve K2 pikleri için

Tablo 7'de geri kazanım yüzdeleri ve % RSD değerleri verilmiştir. Tablo 7 incelendiğinde, elde edilen % 98,7–101,5 arasındaki geri kazanım değerleri, önerilen yöntemin yapay idrar numunesinde ETK'nın hassas ve doğru olarak tayini için iyi bir uygulanabilirliğe sahip olduğunu yansıtmaktadır.

Tablo 7

Yapay idrardan elde edilen uygulanabilirlik sonuçları (n= 3).

	Eklenen (nM)	**Bulunan (nM) ± SD**	**Geri Kazanım (%)**	**RSD (%)**
Yapay İdrar	25	25,3 ±0,47 (A1)	101,3	1,86
		24,7 ±0,42 (K1)	98,7	1,69
		24,8 ±0,53 (K2)	99,2	2,13
	50	50,2 ±0,78 (A1)	100,5	1,55
		50,7 ±0,49 (K1)	101,5	0,97
		49,5 ±1,34 (K2)	99,1	2,71

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde ucuz, kolay bulunabilir, tek kullanımlık, yüksek elektrokimyasal reaktivite özelliğine sahip PGE kullanılarak ETK'nın seçici ve yüksek duyarlılıkta hassas tayinine yönelik voltammetrik ETK sensörü gerçekleştirmek için aşağıda özetlenen çalışmalar gerçekleştirildi ve bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar tartışıldı:

1) ETK'nın elektrokimyasal davranışı CV ve DPV yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Yalın PGE'de destek elektrot çözelti pH'sının ETK'nın yükseltgenmesine ve indirgenmesine olan etkisi, ETK'nın belli derişimini içeren farklı pH'lardaki BRT ve H_2SO_4 çözeltisi ortamında CV'lerinin kaydedilmesiyle incelenmiştir. ETK'nın yükseltgenme ve indirgenme pik potansiyelinin, pH'nın artmasıyla daha negatif potansiyellere kaydığı ve pik akımının azalarak pik şeklinin bozulduğu gözlenmiştir. ETK'nın yükseltgenmesi ve indirgenmesi için en uygun ortam olarak 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi belirlenerek sonraki basamaklarda destek elektrolit çözeltisi olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Kaydedilen CV'lerden yükseltgenme pik potansiyelinin (E(mV)) pH'ya karşı değişim grafiği çizilmiştir. Bu grafikten elde eğimin (61,75 mV/pH) teorik Nernst değerine (59 mV) yakın olması nedeniyle ETK'nın yükseltgenmesi ve indirgenmesinde rol alan proton (H^+) ve elektron (e^-) sayıları arasındaki stokiyometrik oranın 1:1 olduğu sonucuna varılmıştır. Kaydedilen CV'lerden indirgenme pik potansiyelinin pH'ya karşı değişim grafiği de çizilmiştir. Bu grafikten elde edilen eğimin (62,5 mV/pH) olması nedeniyle ETK'nın indirgenmesinde rol alan H^+ ve e^- sayıları arasındaki stokiyometrik oranın yine 1:1'e yakın olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre yaklaşık -250 mV'da gözlenen tersinmez indirgenme pikinin, ETK yapısındaki Ar-NO_2 $4e^-$ ve $4H^+$ alarak Ar-NHOH dönüşmesine atfedilirken, yaklaşık +400 mV'da gözlenen tersinmez yükseltgenme pikinin ise yapıdaki katekol gruplarının $2e^-$ ve $2H^+$ ile kinona dönüşümüne atfedilmiştir.

2) Belirli derişimde ETK içeren 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ortamında farklı tarama hızlarında ETK'nın kaydedilen CV'lerinden hem indirgenme hem de yükseltgenmeye ait pikler için I(μA)–ν, I(μA)–$\nu^{1/2}$, logI–logν ve E(mV) - lnν grafikleri çizilmiştir. ETK'nın hem

yükseltgenme hem indirgenme pik akımının tarama hızının kare köküne karşı yüksek doğrusallık ilişkisi elde edilmiştir. Ayrıca logI – logν grafiğinde elde edilen doğru denklemlerinde bulunan eğimlerin sırasıyla yükseltgenme ve indirgenme pik akımları için (0,57 ve 0,56) teorik değere (0,50) oldukça yakın olması, PGE yüzeyinde ETK'nın hem indirgenmesinin hem de yükseltgenmesinin difüzyon kontrollü olarak gerçekleştiğini doğrulamıştır.

3) ETK'nın DPV yöntemiyle yükseltgenme ve indirgenme pik akımlarının yanıtlarının optimum şartlarda alınması amacıyla DPV yönteminde kullanılan parametreler; basamak potansiyeli (step potential), puls genliği (pulse amplitude) ve puls zamanı (pulse time) optimize edilmiştir. Kaydedilen DPV'lerden, ETK'ya ait 1. indirgenme piki K1: +530 mV'da, 2.indirgenme piki K2: -120 mV'da olduğu (Şekil 9) ve anodik bölgede A1: +550 mV'da yükseltgenme piki kaydedildi. Bu amaçla, katodik bölgedeki ETK'nın 1. (K1) ve 2. (K2) indirgenme pik akımının optimum koşulları; puls zamanı 1 ms, puls genliği 200 mV, basamak potansiyeli 10 mV ve tarama hızı 50 mV/s olarak optimize edilmiştir. Anodik bölgedeki yükseltgenme pik akımı için optimum koşullar; puls zamanı 1 ms, puls genliği 200 mV, basamak potansiyeli 7 mV ve tarama hızı 50 mV/s olarak optimize edilmiştir. Optimize edilen şartlar altında artan ETK derişimi için kaydedilen voltammogramlardan pik akımları hesaplanarak doğrusal yanıt aralığı (Linear response range, LRR), belirtme alt sınırı (Limit of Detection, LOD) ve kantitatif tayin sınırı (Limit of Quantification, LOQ) belirlenmiştir. Katodik bölgedeki K1 pikinden elde edilen analitiksel parametreler; doğrusal yanıt aralığı 1-1000 nM, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,36 ve 1,20 nM olarak bulunmuştur. K2 pikinden elde edilen analitiksel parametreler ise doğrusal yanıt aralığı 2,5-1500 nM, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,79 ve 2,64 nM olarak hesaplanmıştır. Anodik bölgedeki ETK'nın yükseltgenme pikinden elde edilen verilerden hesaplanan LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,69 ve 2,30 nM olarak hesaplanmış ve doğrusal yanıt aralığı 2,5 ve 1000 nM olarak kaydedilmiştir.

4) Hem katodik hem anodik bölgede 2 farklı ETK derişimi için gün içi ve günler arasında ölçümler alınarak RSD değerleri hesaplanmış ve sonuçlar % 5'in altında bulunmuştur (Tablo 2). Bu sonuçlara göre hem yükseltgenme (A1 piki) hem de indirgenme

(K1 ve K2 pikleri) piklerine göre ETK'nın optimize edilen koşullardaki DP voltammetrik yanıtlarının iyi bir kesinliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

5) ETK ilaç etken maddelere girişim yapabilecek olası organik ve inorganik maddelerin (Cu^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^{+}, Cl^{-}, Na^{+}, SO_4^{2-}, fruktoz, glikoz, sükroz, ürik asit, askorbik asit, dopamin, levodopa, karbidopa) 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:25 ve 1:50 gibi farklı analit:girişimci oranlarında bir girişim etkisi gösterip göstermediği yani ilgili analitlerin pik akımlarını artırmaması ya da azaltmaması incelenmiştir. ETK'nın yükseltgenmesi A1, indirgenmesi K1 ve K2 piki için tüm girişimci etkileri incelendi ve tablo haline getirildi. Girişimcilerin ETK'nın indirgenmesinde ve yükseltgenmesinde DPV yanıtı üzerindeki etkileri standart sapmaları ile hesaplanmıştır. Böylece % 10'dan daha az tolerans dikkate alınarak, girişimcilerin analite göre kaç kata kadar tolere edilebildiği yani girişim düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen yüksek seçicilik, önerilen yöntemin söz konusu iyonik ve/veya moleküler türleri içeren günlük örneklerde ETK'nın seçici olarak tayin edilebileceğini yansıtmaktadır (Tablo 3, Tablo 4 ve Tablo 5).

6) Gerçek örnek olarak farmasötik tabletteki ETK miktarı önerilen yöntemle hem anodik (A1) hemde katodik pikler (K1 ve K2) dikkate alınarak tayin edilmiştir. Farmasötik formülasyonlarda ETK'nın indirgenmesi (K1, K2) ve yükseltgenmesi (A1) üzerinden standart katma eğrileri elde edilerek tablette bulunan ETK miktarları, standart sapmaları ve % RSD değerleri hesaplandı (Tablo 6). ETK'nın hem yükseltgenme (A1), hem de indirgenme (K1 ve K2) pikleri dikkate alınarak DPV-standart ekleme yöntemiyle hesaplanan ETK değerleri, gerçek örnekte bulunan 200 mg ETK değerine oldukça yakın bulunmuştur. Ayrıca edilen sonuçların RSD değerlerinin de % 5'in altında bulunması, gerçek örnek uygulamalarında da kesinliğin oldukça iyi olduğunu yansıtmaktadır. Sonuçta yalın PGE kullanımını içeren DP voltammetrik yöntemin gerçek örneklerde özellikle levodopa ve karbidopa içeren farmasötik tabletlerde ETK'nın etkili bir şekilde tayin edilebileceği ve yöntemin uygulanabilirliğinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği kanıtlanmıştır (Tablo 6). Son olarak DPV'lerden yükseltgenme ve indirgenme akımları okunarak derişime karşı standart katma grafikleri çizildi (Şekil 27).

7) Yöntemin uygulanabilirliği ETK'nın yapay idrarla geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilerek de incelendi. Optimize edilen koşullar altında hem katodik hemde anodik bölgede DPV çalışmaları yapıldı. DPV'ler ETK'nın hem yükseltgenmesi (A1) hem de indirgenmesi (K1 ve K2) için ayrı ayrı kaydedildi. DPV'lerden yükseltgenme ve indirgenme pik akımları okunarak derişime karşı standart katma grafikleri çizildi (Şekil 28 ve Şekil 29). Son olarak her bir yapay idrar numunesi için ETK'nın indirgenmesi (K1 ve K2) ve yükseltgenmesi (A1) üzerinden geri kazanım değerleri, standart sapmaları ve % RSD değerleri hesaplandı. ETK'nın yükseltgenmesinde ve indirgenmesinde elde edilen tablolar incelendiğinde % 98,7– 101,5 arasındaki geri kazanım değerleri, önerilen yöntemin yapay idrar numunesinde ETK'nın hassas ve doğru olarak tayini için iyi bir uygulanabilirliğe sahip olduğunu kanıtlamıştır (Tablo 7).

Sonuç olarak, bu tez çalışması çalışmasında, PGE kullanılarak ETK'nın DPV yöntemiyle hızlı, basit, düşük maliyetli ve oldukça duyarlı bir şekilde tayini gerçekleştirilerek, farmasötik tablet ve yapay idrar gibi iki farklı örnekte ETK tayinine başarıyla uygulanmıştır.

KAYNAKÇA

Abasq, M. L., Courtel, P. and Burgot, G. (2008). "Determination of entacapone by differential pulse polarography in pharmaceutical formulation". *Analytical Letters*, 41 (1), 56-65. https://doi.org/10.1080/00032710701746774.

Abdel Ghany, M. F., Hussein, L. A., Ayad, M. F. and Youssef, M. M. (2017). "Investigation of different spectrophotometric and chemometric methods for determination of entacapone, levodopa and carbidopa in ternary mixture". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 171, 236-245. https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.07.053.

Adabi, M., Saber, R., Naghibzadeh, M., Faridbod, F. and Faridi-Majidi, R. (2015). "Parameters affecting carbon nanofiber electrodes for measurement of cathodic current in electrochemical sensors: an investigation using artificial neural network". *RSC Advances*, 5 (99), 81243-81252. https://doi.org/10.1039/c5ra15541j.

Aftab, S., Ozcelikay, G., Kurbanoglu, S., Shah, A., Iftikhar, F. J. and Ozkan, S. A. (2019). "A novel electrochemical nanosensor based on NH_2-functionalized multi walled carbon nanotubes for the determination of catechol-orto-methyltransferase inhibitor entacapone". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 73-81. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.050.

Ahmadi, H., Faridbod, F. and Mehrzad-Samarin, M. (2019). "Entacapone detection by a GOQDs-molecularly imprinted silica fluorescent chemical nanosensor". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 1075-1084. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1534-4.

Apaydın, H., Özekmekçi, S., Oğuz, S. ve Zileli, İ. (2013). *Parkinson Hastalığı Hasta ve Yakınları İçin El Kitabı*. Bayçınar Tıbbi Yayıncılık: İstanbul, 1-17.

Baghayeri, M., Namadchian, M., Karimi-Maleh, H. and Beitollahi, H. (2013). "Determination of nifedipine using nanostructured electrochemical sensor based on simple synthesis of Ag nanoparticles at the surface of glassy carbon electrode: application to the analysis of some real samples". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 697, 53-59. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.03.011.

Baghayeri, M., Tehrani, M. B., Amiri, A., Maleki, B. and Farhadi, S. (2016). "A novel way for detection of antiparkinsonism drug entacapone via electrodeposition of silver nanoparticles/functionalized multi-walled carbon nanotubes as an amperometric sensor". *Materials Science and Engineering*, 66, 77-83. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.077.

Belal, F., Ibrahim, F., Sheribah, Z. A. and Alaa, H. (2017). "Micelle-enhanced spectrofluorimetric method for quantification of entacapone in tablets and human plasma". *Luminescence*, 32(5), 713-722. https://doi.org/10.1002/bio.3241.

Belal, F., Ibrahim, F., Sheribah, Z. A. and Alaa, H. (2018). "Micellar HPLC-UV method for the simultaneous determination of levodopa, carbidopa and entacapone in pharmaceuticals and human plasma". *Journal of Chromatography B*, 1091, 36-45. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.05.030.

Budak, F., Cetinkaya, A., Kaya, S. I. and Ozkan, S. A. (2023). "MIP-based electrochemical sensor for highly selective and sensitive determination of entacapone from the triple mixture in tablet dosage form". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Open*, 1, 100005. https://doi.org/10.1016/j.jpbao.2023.100005.

Bugamelli, F., Marcheselli, C., Barba, E. and Raggi, M. A. (2011). "Determination of l-dopa, carbidopa, 3-o-methyldopa and entacapone in human plasma by HPLC–ED". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54 (3), 562-567. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.042.

Burmaoğlu, R. E. and Sağlık Aslan, S. (2020). "A rapid liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of levodopa, carbidopa, entacapone and their six related compounds in film-coated tablets". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34 (12), e8782. https://doi.org/10.1002/rcm.8782.

Burmaoğlu, R.E. (2017). Levodopa, Karbidopa, Entakapon ve İlgili Bileşiklerinin Analizleri. Yayınlanmış Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Chalikwar, S. S., Shirkhedkar, A. A., Bagul, M. A., Jain, P. S. and Surana, S. J. (2012). "Development and validation of zero and first-order derivative area under curve

spectrophotometric methods for the determination of entacapone in bulk material and in tablets". *Pharmaceutical methods*, 3 (1), 14-17. https://doi.org/10.4103/2229-4708.97709.

Clarke, C. (2008). *Klinik Pratikte Parkinson Hastalığı*. Oğuz Tanrıdağ (çev.). The Royal Society of Medicine Press: İstanbul.

Çolakoğlu, Z. (2012). *Hasta ve Yakınları İçin Parkinson Hastalığı*. Bilkid Yayıncılık: İstanbul.

Dede, E., Sağlam, Ö. and Dilgin, Y. (2014). "Sensitive voltammetric determination of niclosamide at a disposable pencil graphite electrode". *Electrochimica Acta*, 127, 20-26. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.01.153.

Devika, G. S., Petchi, R. and Purushothaman, M. (2016). "Determination of entacapone in pharmaceutical formulations by RP-HPLC method". *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, 4 (3), 105-111.

Dilgin, D. G. and Karakaya, S. (2016). "Differential pulse voltammetric determination of acyclovir in pharmaceutical preparations using a pencil graphite electrode''. *Materials Science and Engineering*, 63, 570–576. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.079.

Emir, G. (2018). Aromatik Sülfonik Asit Grubu Boyar Madde Modifiye Kalem Grafit Elektrot Kullanarak Sülfürün Elektrokatalitik Tayini. Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.

Farrer, M. J. (2006). "Genetics of parkinson disease: paradigm shifts and future prospects". *Nature Reviews Genetics*, 7 (4), 306-318. https://doi.org/10.1038/nrg1831.

Ghoneim, E. M. and El-Desoky, H. S. (2015). "Electrochemistry of the COMT enzyme inhibitor entacapone and its determination in pharmaceutical formulation and human blood-pharmacokinetic study". *Journal of The Electrochemical Society*, 163 (2), H89. http://dx.doi.org/10.1149/2.0661602jes.

Goetz, C. G. (2011). "The history of parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1 (1). https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a008862.

Gumustas, M., Uslu, B., Ozkan, S. A., and Aboul-Enein, H. Y. (2014). "Validated stability-indicating HPLC and UPLC assay methods for the determination of entacapone in pharmaceutical dosage forms". *Chromatographia*, 77, 1721-1726. http://doi.org/10.1007/s10337-014-2758-x.

Hauser, R. (Ed.) (2007). *Parkinson Hastalığı Sorular ve Cevaplar*. Haşmet A. Hanağası (çev). Merit Publishing İnternational: İstanbul.

Holm, K. J. and Spencer, C. M. (1999). "Entacapone". *Drugs*, 58 (1), 159-177. https://doi.org/10.2165/00003495-199958010-00017.

Jain, R., Yadav, R. K. and Dwivedi, A. (2010). "Square-wave adsorptive stripping voltammetric behaviour of entacapone at HMDE and its determination in the presence of surfactants". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 359 (1-3), 25-30. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.01.047.

Kawde, A. N., Baig, N. and Sajid, M. (2016). "Graphite pencil electrodes as electrochemical sensors for environmental analysis: a review of features, developments, and applications". *RSC Advances*, 6, 91325–91340. http://dx.doi.org/10.1039/c6ra17466c.

Konduru, N., Gundla, R., Katari, N. K. and Madhuri, G. V. (2018). "Stability-indicating method of entacapone-related substances using UPLC in finished dosage form". *Current Science*, 644-649. http://dx.doi.org/10.18520/cs/v114/i03/644-649.

Koradia, S. K., Agola, A. S., Jivani, N. P., Manek, R. A. and Pandey, S. (2009). "Development and validation of derivative spectrophotometric method for determination of entacapone in pharmaceutical formulation". *Int J Pharm Res Dev*, 1, 1-8.

Kumar, G., Patrudu, T. B., Rao, T. N., and Rao, M. V. (2017). "A new analytical method validation and quantification of entacapone and its related substance in bulk drug product by HPLC". *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7 (1), 1-5. http://dx.doi.org/10.5958/2231-5675.2017.00001.1.

Magdy, G., Aboelkassim, E., El-Domany, R. A. and Belal, F. (2024). "A novel ultrafast synthesis of N, S-doped carbon quantum dots as a fluorescent nanoprobe for entacapone and clonazepam estimation in tablets and human plasma: Compliance

with greenness metrics and content uniformity testing". *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 38, 101488. https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101488.

Mantena, B. P., Rao, S. V., Rao, K. C. A., Ramakrishna, K. and Reddy, R. S. (2015). "Rapid separation technique for the determination of potential impurities present in levodopa, carbidopa, and entacapone in fixed dose combination drug product using trifunctionally bonded phase ethylene bridged sorbent column with smaller ion-pair reagent". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38 (10), 1073-1087. https://doi.org/10.1080/10826076.2015.1020166.

Naghian, E., Shahdost-Fard, F., Najafi, M., Manafi, M. R., Torkian, L. and Rahimi-Nasrabadi, M. (2021). "Voltammetric measurement of entacapone in the presence of other medicines against parkinson's disease by a screen-printed electrode modified with sulfur-tin oxide nanoparticles". *Microchimica Acta*, 188 (3), 1-8. https://doi.org/10.1007/s00604-021-04733-0.

Nigović, B. (2023). "New approach on sensitive analysis of pimavanserin, levodopa and entacapone based on synergistic effect of graphene nanoplatelets and graphitized carbon nanotubes in functionalized polymer matrix". *Electrochimica Acta*, 439, 141700. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.141700.

Öztürk Mutlu, N. (2019). Parkinson Hastalığında Görülen Hareket Bozukluklarının Tespitine Yönelik Yöntem Geliştirme. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Paim, C. S., Gonçalves, H., Lange, A., Miron, D. and Steppe, M. (2008). "Validation of UV spectrophotometric method for quantitative determination of entacapone in tablets using experimental design of plackett-burman for robustness evaluation and comparison with HPLC". *Analytical Letters*, 41 (4), 571-581. https://doi.org/10.1080/00032710801912730.

Paim, C. S., Martins, M. T., Malesuik, M. D. and Steppe, M. (2010). "LC determination of entacapone in tablets: in vitro dissolution studies". *Journal of Chromatographic Science*, 48 (9), 755-759. https://doi.org/10.1093/chromsci/48.9.755.

Patel, R. S., Bhela, J., Tahir, M., Pisati, S. R. and Hossain, S. (2019). "Pimavanserin İn Parkinson's Disease-Induced Psychosis: A Literature Review". *Cureus*, 11 (7). https://doi.org/10.7759%2Fcureus.5257.

Piccini, P., Brooks, D. J., Korpela, K., Pavese, N., Karlsson, M. and Gordin, A. (2000). "The catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitor entacapone enhances the pharmacokinetic and clinical response to sinemet CR in parkinson's disease". *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 68 (5), 589-594. https://doi.org/10.1136/jnnp.68.5.589.

Purnachand, D., Veerareddy, A., Ramadevi, B., Kameswarrao, C. V. and Madhusudhanreddy, B. (2016). "Development and validation of a RP-HPLC method for determination of related substances and degradants in entacapone". *Journal of chromatographic science*, 54 (8), 1310-1323. https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw083.

Radi, A. E. and Ragaa Abd-Ellatief, M. (2021). "Molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine electrochemical sensor for entacapone". *Electroanalysis*, 33 (6), 1578-1584. http://dx.doi.org/10.1002/elan.202100022.

Ramakrishna, N. V. S., Vishwottam, K. N., Wishu, S., Koteshwara, M. and Chidambara, J. (2005). "High-performance liquid chromatography method for the quantification of entacapone in human plasma". *Journal of Chromatography B*, 823 (2), 189-194. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.036.

Ribeiro, R. P., Gasparetto, J. C., de Oliveira Vilhena, R., de Francisco, T. M. G., Martins, C. A. F., Cardoso, M. A., Pontarolo, R. and Athayde Teixeira de Carvalho, K. (2015). "Simultaneous determination of levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3-O-methyldopa and dopamine in human plasma by an HPLC–MS/MS method". *Bioanalysis*, 7 (2), 207-220. https://doi.org/10.4155/bio.14.230.

Rizk, M., Attia, A. K., Elshahed, M. S. and Farag, A. S. (2015). "Validated voltammetric method for the determination of antiparkinsonism drug entacapone in bulk, pharmaceutical formulation and human plasma". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 743, 112-119. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.02.022.

Sağlam, Ö., Dilgin, D. G., Ertek, B. and Dilgin, Y. (2016). "Differential pulse voltammetric determination of eugenol at a pencil graphite electrode". *Materials Science and Engineering*, 60, 156-162. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.031.

Salama, N. N., Azab, S. M., Mohamed, M. A. and Fekry, A. M. (2015). "A novel methionine/palladium nanoparticle modified carbon paste electrode for simultaneous determination of three antiparkinson drugs". *RSC Advances*, 5 (19), 14187–14195. http://dx.doi.org/10.1039/C6RA90099B.

Sarigul, N., Korkmaz, F. and Kurultak, İ. (2019). "A new artificial urine protocol to better imitate human urine". *Scientific Reports*, 9 (1), 20159. http://doi.org/10.1038/s41598-019-56693-4.

Shakoori, Z., Salimian, S., Kharrazi, S., Adabi, M. and Saber, R. (2015). "Electrochemical DNA biosensor based on gold nanorods for detecting hepatitis B virüs". *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407, 455-461. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8303-9.

Shoghi Kalkhoran, M., Faridbod, F., Norouzi, P. and Ganjali, M. R. (2018). "Praseodymium molybdate nanoplates/reduced graphene oxide nanocomposite based electrode for simultaneous electrochemical determination of entacapone, levodopa and carbidopa". *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 29, 20-31. https://link.springer.com/article/10.1007/s10854-017-7882-6.

Soukhova, N., Kassymbek, Z., Bradby, S., Martin-Esker, A., White, P. and Wahab, S. (2011). "Development of characterization methods for entacapone in a pharmaceutical bulk". *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 54 (4), 860-865. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.10.019.

Uslu, B. and Ozkan, S. A. (2011). "Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments". *Analytical Letters*, 44 (16), 2644-2702. https://doi.org/10.1080/00032719.2011.553010.

Uygun, Z. O. and Dilgin, Y. (2013). "A novel impedimetric sensor based on molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for trace level determination of chlorpyrifos". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 188, 78-84. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.06.075.

Wang, J., Kawde, A. N. and Sahlin, E. (2000). “Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA”. *Analyst*, 125 (1), 5-7. http://dx.doi.org/10.1039/A907364G.

Wollmer, E. and Klein, S. (2017). “Development and validation of a robust and efficient HPLC method for the simultaneous quantification of levodopa, carbidopa, benserazide and entacapone in complex matrices”. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 20, 258-269. https://doi.org/10.18433/j3k923.

Yadav, M., Dixit, P., Trivedi, V., Gandhi, A., Senger, A., Guttikar, S., Singhal, P. And Shrivastav, P. S. (2009). “Chromatographic separation of (E)-and (Z)-isomers of entacapone and their simultaneous quantitation in human plasma by LC–ESI-MS/MS”. *Journal of Chromatography B*, 877 (5-6), 533-540. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.004.

Yang, C., Denno, M. E., Pyakurel, P. and Venton, B. J. (2015). “Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review”. *Analytica Chimica Acta*, 887, 17-37. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.049.

Zhou, M. and Guo, S. (2015). “Electrocatalytic interface based on novel carbon nanomaterials for advanced electrochemical sensors”. *ChemCatChem*, 7 (18), 2744-2764. https://doi.org/10.1002/cctc.201500198.

Zolfagharifar, M., Hariri, R., Souri, E. and Barazandeh Tehrani, M. (2023). “Development and validation of a derivative spectrophotometric method for simultaneous multicomponent determination of levodopa, carbidopa and entacapone”. *Iran. J. Chem. Chem. Eng*., 42 (9). https://doi.org/10.30492/ijcce.2023.1972617.5717.