TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİKANSER ETKİLİ AKTİF MADDELERİN ANALİZİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Wiem BOUALI

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nevin ERK

ANKARA

2025

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİKANSER ETKİLİ AKTİF MADDELERİN ANALİZİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Wiem BOUALI

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün TDK-2023-3036 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2025

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Antikanser Etkili Aktif Maddelerin Analizi için Elektrokimyasal ve Kromatografik Yöntemlerin Geliştirilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.
Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Wiem BOUALI
Tarih: 15.05.2025
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalında
Wiem BOUALI tarafından hazırlanan "Antikanser Etkili Aktif Maddelerin Analizi için Elektrokimyasal ve Kromatografik Yöntemlerin Geliştirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.05.2025

İmza
Prof. Dr. Filiz KURALAYS
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Nevin ERK
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Doç.Dr. Gizem TIRIS
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Üye

İmza
Doç. Dr. Burçin BOZAL PALABIYIK
Ankara Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Antikanser Etkili Aktif Maddelerin Analizi İçin Elektrokimyasal Ve Kromatografik Yöntemlerin Geliştirilmesi

Doktora tez çalışması kapsamında, farmasötik ve biyolojik örneklerdeki Ribosiklib (RIBO) ve Alpelisib (ALP) etken maddelerinin tespitine yönelik üç farklı analitik yöntem geliştirilmiştir: elektrokimyasal sensörler, spektrofotometrik analiz ve yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK). Geliştirilen yöntemler, etken maddelerin doğru ve hassas bir şekilde belirlenmesine olanak tanımış ve analitik performans açısından yüksek başarı göstermiştir. Elektrokimyasal analizlerde, ALP ve RIBO'nun elektrokimyasal davranışlarını incelemek amacıyla dönüşümlü voltametri (DV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopi (EIS) tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu yöntemler, hem elektrot yüzeyindeki olayların anlaşılmasını sağlamış hem de analitlerin düşük konsantrasyonlarda tespitini mümkün kılmıştır. Bu tez kapsamında, RIBO ve ALP için elektrokimyasal yöntemlerin ilk kez kullanıldığı elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. ALP için MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE ve PEDOT:PSS/CPE elektrotları, RIBO için ise CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE ve MWCNTs/GCE elektrotları kullanılmıştır. Elektrotların performansını artırmak amacıyla kullanılan nanokompozitler, elektrot yüzey alanını büyütmüş, elektron transfer hızını yükseltmiş ve elektrokatalitik aktiviteyi artırarak daha düşük tespit limitlerine ulaşılmasını sağlamıştır. Geliştirilen sensörler, farmasötik örneklerde yüksek doğruluk, seçicilik ve hızlı yanıt süreleri ile başarılı sonuçlar vermiştir. Spektrofotometrik analizde, RIBO ve ALP'nin karakteristik absorbans spektrumları kullanılarak, UV-Gör. yöntemiyle her iki etken maddenin doğru ve ekonomik biçimde tespiti gerçekleştirilmiştir. YPSK yöntemiyle, her iki ilacın farmasötik formlardaki içerikleri optimize edilmiş kolon ve hareketli faz koşullarıyla hassas şekilde belirlenmiştir. YPSK yöntemi, özellikle kompleks örnek matrislerinde yüksek çözünürlük ve ayrım kabiliyeti sunarak, RIBO ve ALP'nin diğer bileşenlerden net şekilde ayrılmasını sağlamıştır. Sonuç olarak, bu tez kapsamında geliştirilen elektrokimyasal, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler, antikanser ilaçların analizi için yüksek doğruluk, hassasiyet, düşük tespit limitleri ve uygulama kolaylığı ile yenilikçi ve güvenilir yaklaşımlar sunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Alpelisib, Elektrokimyasal sensörler, Ribosiklib, UV-Gör. spektrofotometri, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

SUMMARY

Development of Electrochemical and Chromatographic Methods for the Analysis of Active Compounds with Anticancer Effect

Within the scope of this PhD thesis, three different analytical methods were developed for the detection of the active pharmaceutical ingredients Ribociclib (RIBO) and Alpelisib (ALP) in pharmaceutical and biological samples: electrochemical sensors, spectrophotometric analysis, and high-performance liquid chromatography (HPLC). The developed methods enabled the accurate and precise determination of the analytes and demonstrated high analytical performance. In electrochemical analyses, techniques such as cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were employed to investigate the electrochemical behavior of ALP and RIBO. These methods facilitated a better understanding of the processes occurring at the electrode surface and allowed the detection of analytes at low concentrations. In this study, electrochemical sensors utilizing electrochemical techniques for the first time determination of RIBO and ALP were successfully developed. For ALP detection, MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE and PEDOT: PSS/CPE electrodes were employed, while CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE and MWCNTs/GCE electrodes were used for RIBO detection. The nanocomposites incorporated into the electrode design enhanced the surface area, increased the electron transfer rate, and improved electrocatalytic activity, leading to significantly lower detection limits. The developed sensors achieved high accuracy, selectivity, and rapid response times in pharmaceutical samples. In spectrophotometric analysis, the characteristic absorbance spectra of RIBO and ALP were utilized, enabling the accurate and cost-effective determination of both compounds using a UV-Vis spectrophotometric method. Using the HPLC method, the content of both drugs in pharmaceutical formulations was precisely determined under optimized column and mobile phase conditions. HPLC offered high resolution and excellent separation capability, allowing the clear distinction of RIBO and ALP from other matrix components in complex pharmaceutical samples. In conclusion, the electrochemical, spectrophotometric, and chromatographic methods developed in this thesis provide innovative and reliable approaches for the analysis of anticancer drugs, offering high accuracy, precision, low detection limits, and practical applicability.

Keywords: Alpelisib, Electrochemical Sensors, High-Performance Liquid Chromatography, Ribociclib, UV-Vis Spectrophotometry

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ii
KABUL VE ONAY iii
ÖZET iv
SUMMARY v
İÇİNDEKİLER vi
ÖNSÖZ ix
SİMGELER ve KISALTMALAR x
ŞEKİLLER xii
ÇİZELGELER xvi

1. GİRİŞ 1
1.1. Giriş ve Amaç 1
1.2. Kanserin Gelişimi ve Tedavisi 2
1.3. Tez Kapsamında Kullanılan Antikanser Etken Maddelerle İlgili Bilgiler 5
1.3.1. ALP: Kimyasal Yapısı, Etki Mekanizması ve Uygulama Alanları 5
1.3.2. RİBO: Kimyasal Yapısı, Etki Mekanizması ve Uygulama Alanları 6
1.4. Literatürde Tez Maddelerine Yönelik Yapılmış Çalışmalar 7
1.4.1. ALP Antikanser Etken Maddesine Ait Literatür Çalışmaları 7
1.4.2. RİBO Antikanser Etken Maddesine Ait Literatür Çalışmaları 8

2. GEREÇ VE YÖNTEM 9
2.1. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler 9
2.1.1. Elektrokimyasal Yöntemler 9
2.1.1.1. Dönüşümlü Voltametri (DV) 10
2.1.1.2. Diferansiyel Puls voltametri (DPV) 10
2.1.1.3. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopi (EIS) 10
2.1.1.4. Elektrokimyasal Sistemler 11
2.1.2. Spektrofotometrik Yöntemler 12
2.1.3. YPSK Yöntemi 12
2.1.3.1. YPSK Sistemindeki Temel Bileşenler 13
2.1.3.2. YPSK Kolonundaki Hareketli ve Sabit Fazları 14
2.2. Tez Kapsamında Kullanılan Nanomalzemeler 14
2.3. Analitik Yöntem Validasyonu 15
2.3.1. Doğruluk 16
2.3.2. Kesinlik 16
2.3.3. Teşhis Sınırı (TS) 16
2.3.4. Tayin Alt Sınırı (TAS) 17
2.3.5. Doğrusallık 17

2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Araç ve Gereçler 17
2.4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 17
2.4.2. Kullanılan Ekipmanlar 18
2.4.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 19
2.4.3.1. Destek Elektrolitlerin Hazırlanması 19
2.4.3.2. Etken Maddelerin Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 19
2.4.3.3. Ticari Plazma, Tablet, ve İdrar Çözeltilerinin Hazırlanması 19
2.4.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Modifiye Elektrotlerin Hazırlanması 20
2.4.4.1. MWCNTs/GCE Elektrotun Hazırlanması 20
2.4.4.2. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE Elektrotun Hazırlanması 21
2.4.4.3. PEDOT:PSS/CPE Elektrotun Hazırlanması 22
2.4.4.4. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/CPE Elektrotun Hazırlanması 23
2.5. Kompozitlerin Sentezi 24
2.5.1. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ Sentezi 24
2.5.2. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC Sentezi 25
3. BULGULAR 26
3.1. ALP Etken MaddesineAit Bulgular 26
3.1.1. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini 26
3.1.1.1. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ Karakterizasyonu 26
3.1.1.2. Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu 29
3.1.1.3. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu 31
3.1.1.4. Modifiye Edilmiş Sensörün Analitik Performansının Değerlendirilmesi 35
3.1.1.5. Tablet Formuna, İdrar, ve Ticari Plazma Numunelerine Uygulanması 37
3.1.2. PEDOT:PSS/CPE Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini 38
3.1.2.1. Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu 38
3.1.2.2. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu 39
3.1.2.3. Modifiye Edilmiş Sensörün Analitik Performansının Değerlendirilmesi 43
3.1.2.4. Tablet Formuna, İdrar ve Ticari Plazma Numunelerine Uygulanması 45
3.1.3. Dogrudan UV-Gör. Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini 45
3.1.3.1. Geliştirilen Yöntemin Optimizasyonu 45
3.1.3.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu 46
3.1.4. YPSK Yöntemi Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini 48
3.1.4.1. Geliştirilen Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu 48
3.1.4.2. Geliştirilen Kromatografik Yöntemin Validasyonu 49
3.2. RİBO Etken MaddesineAit Bulgular 52
3.2.1. MWCNTs/GCE Kullanılarak RİBO Etken Maddesinin Tayini 52
3.2.1.1. Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu 52
3.2.1.2. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu 54

3.2.1.3. Modifiye Edilmiş Sensörün Analitik Performansının Değerlendirilmesi 58
3.2.1.4. Tablet Formuna, İdrar ve Ticari Plazma Numunelerine Uygulanması 60
3.2.2. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini 61
3.2.2.1. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC Karakterizasyonu 61
3.2.2.2. Sensörlerin Elektrokimyasal Karakterizasyonu 63
3.2.2.3. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu 65
3.2.2.4. Modifiye Edilmiş Sensörün Analitik Performansının Değerlendirilmesi 67
3.2.2.5. Tablet Formuna ve İdrar Numunelerine Uygulanması 69
3.2.3. Dogrudan UV-Gör. Spektrofotometrik Yöntemi Kullanılarak RİBO Etken Maddesinin Tayini 70
3.2.3.1. Geliştirilen Yöntemin Optimizasyonu 70
3.2.3.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu 71
3.2.4. YPSK Yöntemi Kullanılarak RIBO Etken Maddesinin Tayini 72
3.2.4.1. Geliştirilen Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu 72
3.2.4.2. Geliştirilen Kromatografik Yöntemin Validasyonu 73
4. TARTIŞMA 77
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 80
KAYNAKLAR 82
ÖZGEÇMİŞ **Error! Bookmark not defined.**

ÖNSÖZ

Günümüzde ilaçların doğru ve hassas bir şekilde belirlenmesi, farmasötik analizler ve klinik tanı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu doktora tez çalışmasında, çeşitli yapay ve doğal kaynaklı malzemeler kullanılarak özgün elektrokimyasal sensör sistemleri geliştirilmiş; antikanser etkili ilaçların seçici tayini amaçlanmıştır. Ayrıca bu ilaçların belirlenmesine yönelik olarak YPSK ve spektrofotometrik analizler de gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerin farmasötik ve biyolojik örneklerde uygulanabilirliği gösterilmiş, yöntemlerin doğruluğu kapsamlı analizlerle ortaya konmuştur. Bu çalışmanın, sürdürülebilir ve çevre dostu ilaç analiz yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sunacağı değerlendirilmektedir.

Doktora eğitimim süresince yol göstericiliği, sabrı ve desteğiyle üzerimde büyük emeği olan, akademik bakış açımı şekillendiren, bana ilham veren, her zaman yapıcı yaklaşımıyla yanımda olan çok kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Nevin ERK'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Sadece akademik anlamda değil, hayatımın her anında bana destek olarak ailemden uzak olduğumu hiç hissettirmemiş, her türlü zorlukta yanımda durmuş ve her konuda bana yardımcı olmuştur. Bu uzun ve zorlu süreçte gösterdiği anlayış, sabır ve özveri sayesinde, bu tezi tamamlayabilme gücünü kendimde bulabildim. Kendisine minnettarım.

Zor zamanlarımı kolaylaştıran, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, bilgi ve dostluklarını paylaşan ekip arkadaşlarım Marwah NASER, Çiğdem Aybüke ÖZATA, Elif Naz ÖVEN, ve Asena Ayse GENÇ'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimime başlama ve bu süreci tamamlama fırsatını bana sunarak, yalnızca maddi destek sağlamakla kalmayıp bilimsel gelişimimi de çeşitli eğitim, etkinlik ve araştırma imkanlarıyla güçlendiren Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na (YTB) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca doktora tez projem kapsamında sağladığı maddi katkı ile araştırmamın hayata geçmesine olanak tanıyan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Son olarak, bu sürecin her anında yanımda olan, sabırları, sevgileri ve dualarıyla beni her zaman destekleyen, varlıklarıyla güç bulduğum sevgili aileme; özellikle bana her zaman inanan ve koşulsuz sevgilerini hissettiren annem ve babama, kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreçte her zaman yanımda olan, verdikleri manevi destekle güç bulmamı sağlayan sevgili kardeşlerim Mariem ve Nour El Houda'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Varlıkları, anlayışları ve moral desteği, karşılaştığım zorlukları aşmamda ve akademik hedeflerime ulaşmamda önemli bir rol oynamıştır.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALP	Alpelisib
BPAC	Muz kabuğu aktif karbonu
B-R	Britton–Robinson tampon
C	Konsantrasyon
$CoFe_2O_4$	Kobalt ferrit
CPE	Karbon Pasta Elektrot
$CuAl_2O_4$	Bakır alüminyum oksit
c^0	Konsantrasyon, mol/cm³
ÇE	Çalışma Elektrot
ΔEp	Potansiyel farkı
DV	Dönüşümlü voltametri
D	Redoks prob molekülünün difüzyon katsayısı
DPV	Diferansiyel puls voltametri
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopi
E_{pa}	Anodik pik potansiyeli
E_{pc}	Katodik pik potansiyeli
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopi
$[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$	Ferrosiyanür
Fe_3O_4	Demir oksit
FDA	US Food and Drug Administration
FTIR	Fourier transform infrared spektroskopi
GCE	Camsı karbon elektrot
HCl	Hidroklorik asit
H_2SO_4	Sülfürik asit
*I*p	Pik akımı, amper
KCl	Potasyum klorür
KNO_3	Potasyum nitrat
LC/MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometri/kütle spektrometri
µg/ml	Mikrogram/mililitre
MOF	Metal organik kafesler
MWCNTs	Çok duvarlı karbon nanotüpler
n	Elektrokimyasal tepkime sırasında aktarılan elektron sayısı
NaOH	Sodyum hidroksit
$Ni(NO_3)_2{\cdot}6H_2O$	Nikel nitrat heksahidrat
nM	Nanomolar

FT	Fosfat tamponu
PEDOT:PSS	Poli(3,4-etilen dioksitiyofen): poli(stiren sülfonik asit)
R^2	Korelasyon katsayısı
Rct	Yük transfer direnci
RIBO	Ribosiklib
BSS	Bağıl Standart Sapma
TS	Teşhis sınırı
TAS	Tayin alt sınırı
UV	Ultraviyole
υ	Tarama hızı, v/s
XRD	X-ışını kırınımı
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. ALP'in kimyasal yapısı 5
Şekil 1.2. RİBO 'in kimyasal yapısı 6
Şekil 2.1. Elektrokimyasal sistem 12
Şekil 2.2. YPSK sistemi 14
Şekil 2.3. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi 21
Şekil 2.4. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi 22
Şekil 2.5. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi 23
Şekil 2.6. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi 24
Şekil 3.1. MWCNT'lerin (A), MWCNTs@Fe_3O_4'ün (B) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün (C) nanomalzemelerinin XRD desenleri 27
Şekil 3.2. MWCNT'lerin (a), MWCNTs@Fe_3O_4'ün (b) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün (c) nanomalzemelerinin FT-IR spektrumları 28
Şekil 3.3. MWCNT'lerin (a & d), MWCNTs@Fe_3O_4'ün (b & e) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün (c & f) nanomalzemelerinin SEM görüntüleri ve SEM-EDX analizleri 28
Şekil 3.4. MWCNTs@Fe_3O_4'ün (A) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün (B) elementel dağılımı 29
Şekil 3.5. (A); KCl (0,1 M) ve $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi (5,0 mM) içerisinde çıplak GCE (a), MWCNTs/GCE (b) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE (c) DV (50,0 mV/s) ve (B); EIS grafikleri 30
Şekil 3.6. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ve 0,1 M KCl içeren çözelti içerisinde farklı tarama hızlarında kaydedilen DV eğrileri: (A); çıplak GCE, (B); MWCNTs/GCE, ve (C); MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE 31
Şekil 3.7. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ kompozit konsantrasyonun (A) ve miktarının (B), 0,1 mM ALP'nin pik akımları üzerindeki etkisi 32
Şekil 3.8. Destek elektrolitinin, 0,1 mM ALP'nin pik akımları üzerindeki etkisi 32
Şekil 3.9. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE kullanarak B-R (0,1 M) ve 0,1 mM ALP içeren çözeltide farklı pH seviyelerinde elde edilen DPV eğrileri (A), ve pik potansiyeli (Ep) ile pH değeri arasındaki ilişki (B) 33
Şekil 3.10. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE elektrotu üzerinde, B–R tampon çözeltisi (0,1 M, pH 3,0) içerisinde 0,1 mM ALP varlığında farklı tarama hızlarında elde edilen (A) DV eğrileri, (B) Ipa ile $\upsilon^{1/2}$, (C) log Ipa ile log υ ve (D) Epa ile ln υ grafikleri 34
Şekil 3.11. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyinde, ALP'in olası elektro-oksidasyon mekanizması 35
Şekil 3.12. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyinde B-R tamponunda (0,1 M, pH 3,0) 0,5-13,6 µM ALP'nin DPV eğrileri (A) ve Ipa ile ALP konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren grafik (B) 35

Şekil 3.13. B-R tamponunda (pH 3,0) MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE üzerinde 1,0 µM ALP'nin tekrarlanabilirliği (A) ve tekrar üretilebilirliği (B) 36
Şekil 3.14. B-R tamponunda (pH 3,0) MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE üzerindeki 1,0 µM ALP'nin seçiciliği 37
Şekil 3.15. KCl (0,1 M) ve $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi (5,0 mM) içerisinde çıplak CPE, ve PEDOT:PSS/CPE elektrotlarının (A); DV (50,0 mV/s) ve (B); EIS grafikleri 38
Şekil 3.16. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde, çıplak CPE (A,B) ve PEDOT:PSS/CPE (C,D) elektrotlarında farklı tarama hızlarında kaydedilen DV eğrileri 39
Şekil 3.17. Destekleyici elektrolitinin, 0,01 mM ALP'nin yükseltgenme pik akımları üzerindeki etkisi 40
Şekil 3.18. PEDOT:PSS/CPE kullanarak B-R (0,1 M) ve 0,1 mM ALP içeren çözeltide farklı pH seviyelerinde elde edilen DPV eğrileri (A), ve pik potansiyeli (Ep) ile pH değeri arasındaki ilişki (B) 40
Şekil 3.19. PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde 0,01 mM ALP'nin pik akımı üzerindeki (A) biriktirme potansiyelinin, ve (B) biriktirme süresinin etkisi 41
Şekil 3.20. Farklı tarama hızlarında, B-R tamponunda (0,1 M, pH 3,0) 0,01 mM ALP'nin dönüşümlü voltametri eğrileri (A), Ipa ile $\upsilon^{1/2}$ arasındaki ilişki (B), log Ipa ile log υ grafiği (C) ve Epa ile ln υ grafiği (D) PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde 42
Şekil 3.21. PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde, ALP'in olası elektro-oksidasyon mekanizması 42
Şekil 3.22. PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde B-R tamponunda (0,1 M, pH 3,0) 0,01-5,0 µM ALP'nin DPV eğrileri (A) ve Ipa ile ALP konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren grafik (B) 43
Şekil 3.23. B-R tamponunda (pH 3,0) PEDOT:PSS/CPE üzerinde 1,0 µM ALP'nin tekrarlanabilirliği (A) ve tekrar üretilebilirliği (B) 44
Şekil 3.24. B-R tamponunda (pH 3,0) PEDOT:PSS/CPE üzerindeki 1,0 µM ALP'nin seçiciliği 44
Şekil 3.25. ALP standart çözeltisinin UV spektrumu (λmax = 313,6 nm) 46
Şekil 3.26. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntem için ALP spektrumu (10-40 µg/ml) 47
Şekil 3.27. ALP standart formunun (A) ve tablet formlarının (B) kromatogramları 48
Şekil 3.28. YPSK yöntemi ile 100–600 µg/mL konsantrasyon aralığında elde edilen ALP kalibrasyon eğrisi 51
Şekil 3.29. KCl (0,1 M) ve $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi (5,0 mM) ortamında modifiye edilmemiş GCE (a) ve MWCNTs/GCE (b) elektrotlarının (A) DV (50 mV/s) ve (B) EIS diyagramları 53
Şekil 3.30. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl ortamında, MWCNTs/GCE üzerinde farklı tarama hızlarında elde edilen (A) DV eğrileri ve (B) I_{pa} ile $\nu^{1/2}$ arasındaki ilişki grafiği 54
Şekil 3.31. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl ortamında, modifiye edilmemiş GCE üzerinde farklı tarama hızlarında elde edilen (A) DV eğrileri ve (B) I_{pa} ile $\nu^{1/2}$ arasındaki ilişki grafiği 54
Şekil 3.32. Destek elektrolitinin (A), MWCNTs kompozitinin konsantrasyonunun (B) ve miktarının (C) 0,01 mM RIBO'nun oksidasyon pik akımları üzerindeki etkisi 55

Şekil 3.33. MWCNTs/GCE yüzeyinde 0,01 mM RIBO'nin pik akımı üzerindeki (A) biriktirme potansiyelinin, ve (B) biriktirme süresinin etkisi 55
Şekil 3.34. 0,1 mM RIBO'nun MWCNTs/GCE üzerindeki DPV voltammogramları farklı pH seviyelerinde (A), Ip ile pH arasındaki ilişki (B), ve Ep ile pH arasındaki eğri (C) 56
Şekil 3.35. MWCNTs/GCE üzerinde 0,01 mM RIBO ile 0,1 M BR (pH 2,0) ortamında 10'dan 275 mV/s'ye kadar tarama hızlarında elde edilen DV eğrileri (A), RIBO'nun pik akımı ile tarama hızının karekökü ($\upsilon^{1/2}$) arasındaki ilişki (B), log υ ile log I'nin değişimi (C), ve ln υ ile pik potansiyelinin değişimi (D) 57
Şekil 3.36. MWCNTs/GCE üzerindeki RIBO'nun elektrookidasyonu için önerilen mekanizma 57
Şekil 3.37. MWCNTs/GCE yüzeyinde 0,1 M BR tamponunda artan RIBO konsantrasyonlarına karşılık gelen DPV tepkileri (A) ve RIBO konsantrasyonlarına bağlı olarak pik akımlarının değişimi (B) 58
Şekil 3.38. 1,0 μM RIBO (BR tamponu, pH 2,0) içinde MWCNTs/GCE'nin tekrarlanabilirliğine ait DPV'ler 59
Şekil 3.39. 1,0 μM RIBO (BR tamponu, pH 2,0) içindeki MWCNTs/GCE'nin yeniden üretilebilirliğine ait DPV'ler 59
Şekil 3.40. 1,0 μM RIBO (BR tamponu, pH 2,0) varlığında MWCNTs/GCE'nin seçiciliğine ait DPV'ler 60
Şekil 3.41. (a) BPAC, $CoFe_2O_4$/BPAC ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC nanokompozitinin FT-IR spektrumları. (b) BPAC, $CoFe_2O_4$/BPAC ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC nanokompozitinin XRD grafiği 62
Şekil 3.42. BPAC (a, d), $CoFe_2O_4$/BPAC (b, e) ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC nanokompozitinin (c, f) SEM görüntüleri ve EDX spektrumları 63
Şekil 3.43. Farklı CPE elektrotlarında elektrolit olarak 0,1 M KCl içerisinde 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi için elde edilen (A) DV eğrileri ve (B) EIS spektrumları 64
Şekil 3.44. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl varlığında farklı tarama hızlarında kaydedilen DV eğrileri: boş CPE (A) ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE (B) 64
Şekil 3.45. Destek elektrolitinin 0,1 mM RIBO'nun oksidasyon pik akımları üzerindeki etkisi 65
Şekil 3.46. (A) 0,1 mM RIBO içeren 0,1 M FT ortamında farklı pH değerlerinde (1,0'den 8,0'e kadar) elde edilen CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE üzerindeki DPV'ler ve (B) pik akımlarının pH'ye bağlı değişimi 66
Şekil 3.47. 0,1 mM RIBO içeren FT çözeltisinde, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE üzerinde 10–200 mV/s aralığında farklı tarama hızlarında kaydedilen DV eğrileri (A), Ipa ile $\upsilon^{1/2}$ (B), log Ipa ile log υ (C) ve Epa ile ln υ (D) arasındaki grafikler 67
Şekil 3.48. (A) 0,1 M FT (pH 1,0) çözeltisinde, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE ile 0,2–9,7 μM RIBO konsantrasyon aralığında elde edilen DPV eğrileri ve (B) pik akımı ile RIBO konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon grafiği 68
Şekil 3.49. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE'nin tekrarlanabilirlik (A) ve yeniden üretilebilirlik (B) grafikleri 68

Şekil 3.50. RIBO standart çözeltisinin UV spektrumu (λmax = 271,4 nm) 70
Şekil 3.51. Doğrudan UV-Gör. spektrofotometrik yöntem için RIBO spektrumu (10-30 µg/ml) 71
Şekil 3.52. RIBO standart formunun kromatogramı 73

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Kanser tedavilerinin ana kategorilerine ilişkin sınıflandırmalar 4
Çizelge 1.2. ALP için çeşitli yöntemler ile yapılan çalışmalar 7
Çizelge 1.3. RIBO için çeşitli yöntemler ile yapılan çalışmalar 8
Çizelge 3.1. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyinde, tablet, idrar ve ticari plazma numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları 37
Çizelge 3.2. PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde, tablet, idrar ve ticari plazma numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları 45
Çizelge 3.3. Doğrudan UV spektrofotometri ile ALP için doğrusallık verileri 46
Çizelge 3.4. Spektrofotometrik yöntemle ALP'nin belirlenmesi için elde edilen geri kazanım 47
Çizelge 3.5. ALP yönteminin sağlamlık değerlendirmesi 49
Çizelge 3.6. YPSK yöntemiyle ALP tayini için elde edilen geri kazanım 50
Çizelge 3.7. ALP için YPSK yöntemiyle doğrusallık verileri 51
Çizelge 3.8. MWCNTs/GCE yüzeyinde, RIBO tablet, idrar ve ticari plazma numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları 61
Çizelge 3.9. Çeşitli girişimcilerin CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE üzerindeki 1,0 µM RIBO'nin oksidasyon akımı üzerindeki etkisi 69
Çizelge 3.10. Gerçek numunelerde RIBO analizi 70
Çizelge 3.11. Doğrudan UV-Gör. spektrofotometri ile RIBO için doğrusallık verileri 71
Çizelge 3.12. Spektrofotometrik yöntemle RIBO'nin belirlenmesi için elde edilen geri kazanım 72
Çizelge 3.13. RIBO yönteminin sağlamlık değerlendirmesi 74
Çizelge 3.14. YPSK yöntemiyle RIBO tayini için elde edilen geri kazanım 75
Çizelge 3.15. RIBO için YPSK yöntemiyle doğrusallık verileri 76
Çizelge 4.1. ALP için geliştirilen yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirmesi 78
Çizelge 4.2. RİBO için geliştirilen yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirmesi 79

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Kanser, dünya genelinde en yaygın ölüm nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Tedavi yöntemlerindeki ve yeni gelişmelere ve ortaya çıkan yeni etken maddelere rağmen, kanserin tedavisi halen büyük bir tıbbi zorluk teşkil etmektedir. Özellikle, hedefe yönelik tedavi ajanları, kanser tedavisinde önemli bir yer tutmakta olup daha efektif bir tedavi ve tolere edilmesi daha kolay olan yan ettki profili sunmaktadır (Debela vd., 2021). Bu hedefe yönelik tedavi ajanlarından Alpelisib (ALP) ve Ribosiklib (RİBO), kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engelleyerek kanser tedavisinde devrim yaratmaktadır. Her iki ilaç da, belirli hedeflere yönelerek kanser hücrelerinin büyüme yollarını engellemeyi amaçlamakta olup, meme kanseri gibi hastalıkların tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır.

ALP, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolunun inhibisyonu ile hücre bölünmesini engellerken (Xi vd., 2015), RİBO, siklin bağımlı kinaz 4 ve 6 (CDK4/6) inhibitörü olarak hücre döngüsünün G1 fazında durmasına sebep olur (Bortolozzi vd., 2018). Bu ilaçlar, kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek, kanser tedavisinde önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Ancak, bu ilaçların etkinliği ve hastalar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi, doğru bir şekilde ölçülmesi gereken biyolojik parametrelerle yakından ilişkilidir.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların etkinliğinin değerlendirilmesinin en önemli aşamalarından biri, ilaçların biyolojik örneklerdeki ve farmasötik formülasyonlardaki derişimlerinin doğru ve hassas bir şekilde ölçülmesidir (Siddiqui vd., 2017). İlaçların farmasötik formülasyonlarındaki etkinliği ve biyolojik örneklerdeki derişimleri, tedavi süreçlerinin izlenmesi için kritik bilgilerdir. Bu nedenle, ALP ve RİBO gibi ilaçların analiz edilmesinde kullanılan analitik teknikler, tedavi sürecinin doğru bir şekilde izlenmesi açısından hayati bir rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, ALP ve RİBO'in biyolojik örneklerde ve farmasötik preparatlarda tespitini sağlamak için elektrokimyasal, spektrofotometrik yöntemler ve YPSK teknikleri kullanılmaktadır.

Elektrokimyasal sensörler, ilaçların tespitinde hassas, hızlı ve düşük maliyetli bir analiz sunar. Elektrokimyasal yöntem, elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonları temel alarak analitlerin konsantrasyonlarını belirler. Bu yöntem, özellikle düşük

derişimlerdeki ilaçların tespiti için son derece etkilidir ve biyolojik örneklerdeki karmaşık matrixlerden bile doğru sonuçlar elde edilmesini sağlar. ALP ve RİBO gibi ilaçların elektrokimyasal tespiti, bu ilaçların biyolojik sıvılardaki varlığını hızlı bir şekilde belirlemek için ideal bir yaklaşım sunmaktadır. Elektrokimyasal sensörler, genellikle voltametrik ya da amperometrik tekniklerle çalışır ve elektrot yüzey modifikasyonları ile daha yüksek duyarlılık ve seçicilik sağlanabilir. Bu çalışma kapsamında, literatürde ilk kez, modifiye elektrotlar kullanılarak ALP ve RIBO'in elektrokimyasal tespiti gerçekleştirilmiş ve bu ilaçların farmasötik ve biyolojik örneklerdeki izlenebilirliği sağlanmıştır. Böylece, bu ilaçların daha önce literatürdeki mevcut yöntemlerle yapılmayan bir şekilde seçici ve hassas bir şekilde tayini mümkün hale getirilmiştir.

Spektrofotometri, analitlerin ışıkla etkileşimi sonucu elde edilen emilim veya yayılan ışık miktarını ölçerek bileşenlerin konsantrasyonlarını belirler. Bu yöntem, genellikle ilaçların belirli dalga boylarındaki emilim değerlerinden faydalanarak analiz yapar. ALP ve RİBO gibi ilaçların spektrofotometrik analizi, özellikle hızlı ve pratik sonuçlar elde edilmesini sağlar. Bu yöntem, özellikle farmasötik preparatlarda aktif bileşenlerin belirlenmesi için kullanılır. Spektrofotometrik tespit, genellikle düşük maliyetli ve çevre dostu bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Ayrıca, bu yöntem ile ilaçların yüksek doğrulukla ve güvenilir şekilde analiz edilmesi mümkündür. Bu çalışmada, ALP ve RİBO'in spektrofotometrik yöntemle analizi, ilaçların farmasötik preparatlardaki derişimlerinin doğru bir şekilde tespit edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

YPSK, özellikle karmaşık örneklerde yüksek çözünürlükle analitlerin ayrılmasını, tespit edilmesini ve kantitatif olarak belirlenmesini sağlayan güçlü bir tekniktir. Bu yöntem, farmasötik analizlerde yaygın olarak kullanılmakta olup, ilaçların doğru ve hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlar. ALP ve RİBO'in tespiti için YPSK, özellikle ilaçların farmasötik örneklerdeki düşük derişimlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu teknik, özellikle farmasötik ürünlerin kalite kontrolü ve doğrulama süreçlerinde yaygın olarak kullanılır. ALP ve RİBO'in YPSK ile yapılan analizleri, ilaçların derişimlerini izlemek için güvenilir bir yaklaşım sunmaktadır.

1.2. Kanserin Gelişimi ve Tedavisi

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve yayılımı ile tanımlanan bir grup hastalıktır (Nobili vd., 2009). Kanser hücrelerinin yayılımı, yani metastaz kontrol altına alınmazsa, hastalık ölümle sonuçlanabilir. Tütün, kimyasallar, radyasyon ve patojen organizmalar gibi dış etkenler ile rastgele mutasyonlar, kalıtsal mutasyonlar, hormonlar ve immünolojik durumlar

gibi bazı iç faktörler kansere neden olur. Beslenme faktörleri, bazı patojenler, azalmış fiziksel aktivite, obezite ve toksik metaller gibi birçok değişkenin kanser riskini artırdığı bilinmektedir. Bu değişkenler, insan vücudunda karsinogenezi başlatmak veya hızlandırmak için etkileşime girebilir ve sonuç olarak, kanser en yaygın ölüm nedeni olarak görülmektedir (Reagan, 2019). Yaşam tarzlarımız, alışkanlıklarımız ve daha uzun yaşam beklentimiz nedeniyle kanserin görülme sıklığı son yıllarda giderek artmaktadır (Irigaray vd., 2007).

Toplam kanser insidans oranları hala artarken, tedavi seçenekleri ve hayatta kalma oranları da artmaktadır (Torre vd., 2016). Kanser tedavisini belirleyen birçok faktör bulunmaktadır; bunlar arasında kanserin evresi, tümörün boyutu ve son olarak tümörün sadece bir tümör mü yoksa metastatik bir kanser mi olduğu yer almaktadır. Önceki kavramlara bağlı olarak, kanser tedavisi aşağıdaki yöntemlerden biri veya birkaçı olabilir: cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi, hormon terapisi ve immünoterapi (Debela vd., 2021). Çizelge 1.1, Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yapılan ve Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından yürütülen mevcut klinik kanser tedavilerinin ana kategorilerini özetlemektedir (Santosh vd., 2018).

Çizelge 1.1. Kanser tedavilerinin ana kategorilerine ilişkin sınıflandırmalar

Tedavi Türü	**Açıklama**	**Açıklama**
Cerrahi	Manuel olarak tümörün çıkarılması veya dondurma, ısıtma, lazer veya fotodinamik terapi ile tümörün yok edilmesi.	Sadece bilinen ve erişilebilir yerlerdeki iyi sınırlanmış tümörler için geçerlidir.
Radyoterapi	Kanser hücrelerine saldırmak için yüksek dozda radyasyonun harici veya dahili uygulanması.	Sağlıklı hücrelere zarar veren geniş yan etkiler.
Kemoterapi	Farmasötik ajanlar kullanarak kanser hücrelerine kimyasal olarak saldırılması.	Sağlıklı hücrelere zarar veren geniş yan etkiler.
Hedefe Yönelik Tedavi	Kanserlerin benzersiz hücresel özelliklerini kullanarak çok spesifik tedaviler geliştirilmesi.	Geniş olası hedefler nedeniyle zorlu ilaç geliştirme süreci; tedaviye direnç gelişimi; sağlıklı hücrelerin yanlış hedeflenmesinden kaynaklanan yan etkiler.
Hormon Terapisi	Hastanın hormonlarını değiştirerek kansere faydalı olan hormonları azaltmak	Sadece hormonlarla güçlü bir şekilde ilişkili kanserler için geçerlidir; hormon dengesizliğiyle ilgili yan etkiler.
İmmünoterapi	Hastanın kendi bağışıklık sistemini, monoklonal antikorlar, sitokinler, benimsetici T hücre transferi veya diğer biyolojik yöntemler kullanarak kanser hücrelerine saldırmaya yardımcı olma.	Diğer tedaviler kadar yaygın kullanım; bağışıklık sistemi ile ilgili yan etkiler.

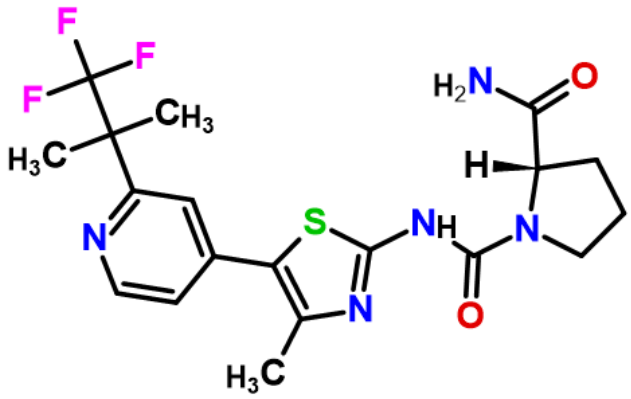
Kanser kemoterapisi, kanserin tedavisinde en önemli yöntemlerden biridir. Cerrahi ve radyoterapi lokalize kanser hücrelerinin eliminasyonunu sağlarken, kemoterapi hem lokalize hem de metastatik kanser hücrelerinin eliminasyonuna neden olur (Saini vd., 2020). Kemoterapi, bir hastalığı tedavi etmek için kimyasalların veya ilaçların kullanılması anlamına gelir. Kanser durumunda ise, ilaçların kanser hücrelerini öldürmek ve mümkünse seçici olarak öldürmek amacıyla kullanılması anlamına gelir (Alam vd., 2018). Kemoterapi, esas olarak kanser hücrelerinin büyümesini ve bölünmesini engelleyerek çalışır. Kanser hücreleri genellikle normal hücrelere kıyasla çok daha hızlı bir şekilde bölünür ve büyürler ve fizyolojik olarak çok yüksek endojen stres taşırlar. Bu nedenle, ilaçlar bu hücreleri çevresindeki diğer hücrelere kıyasla daha hızlı ve etkili bir şekilde yok edebilir.

Kemoterapötik ilaçların veya ilaç kombinasyonlarının seçimi, genellikle kanserin türüne ve evresine bağlı olarak yapılır. Bu ilaçların temel amacı, kanserli hücreleri nötralize etmek ve tümörün büyümesiyle oluşan stresi hafifletmektir. Tedavinin dozu ve süresi, dikkate alınması gereken iki önemli noktadır. İlaçların çok yüksek dozlarda verilmesinin, birçok yan etkiye ve sağlıklı hücrelere zarar vermeye neden olduğu gözlemlenmiştir (Anand vd., 2022).

1.3. Tez Kapsamında Kullanılan Antikanser Etken Maddelerle İlgili Bilgiler

1.3.1. ALP: Kimyasal Yapısı, Etki Mekanizması ve Uygulama Alanları

ALP (BYL719), pürin türevi bir yapıya sahip, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) p110α izoformunu hedefleyen güçlü bir küçük molekül inhibitörüdür (Meng vd., 2021). Kimyasal adı, (2S)-N1-(4-Metil-5-(2-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-yl)piridin-4yl)-1,3-tiazol-2 yl)pirolidin-1,2-dikarboksamid olan ALP'in moleküler formülü $C_{19}H_{22}F_3N_5O_2S$ olup, moleküler ağırlığı 441.47 g/mol'dür (Şekil 1.1.; CAS # 1217486-61-7). ALP, beyaz renkte bir tozdur ve pH'a bağlı olarak suda oldukça düşük çözünürlük gösterir. Biopharmaceutics Classification System (BCS) sınıflandırmasında, ALP Class II bileşik olarak tanımlanır (Royer vd., 2023).



Şekil 1.1. ALP'in kimyasal yapısı

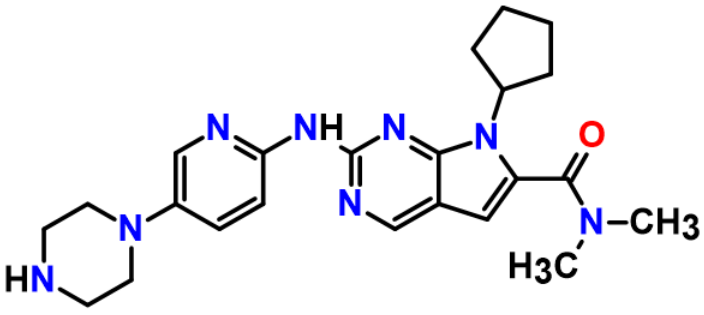
ALP, PI3K p110α izoformunun adenozin trifosfat bağlanma bölgesine bağlanarak bu enzimi seçici bir şekilde inhibe eder. PI3K enzimi, hücre büyümesi, hayatta kalma ve metabolizma gibi kritik hücresel süreçlerde rol oynayan fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3) üretiminden sorumludur (Shafiq vd., 2024). PIP3 düzeylerinin artışı, özellikle PIK3CA mutasyonları veya PTEN kaybı nedeniyle, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine ve hayatta kalmasına yol açar. ALP, bu düzensizlikleri hedefleyerek PIP3 üretimini engeller ve

hücresel sinyal yolaklarını düzenler. Bu mekanizma, özellikle PIK3CA mutasyonları taşıyan meme kanseri hücrelerinde yüksek etkinlik göstermektedir (Juric vd., 2018).

ALP, 2019 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, hormon reseptörü (HR) pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) negatif ve PIK3CA mutasyonu taşıyan ileri evre veya metastatik meme kanseri tedavisi için onaylanmıştır (Fritsch vd., 2014). Bunun yanı sıra, preklinik çalışmalar, PIK3CA mutasyonuna sahip diğer kanser türleri, örneğin yumurtalık, akciğer ve prostat kanserlerinde de ALP'in etkili olduğunu göstermiştir. Klinik araştırmalar, ALP'in ileri düzey katı tümörlerde aktivitesini ve güvenliğini doğrulamış, bu molekülün kanser tedavisinde geniş bir kullanım potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur (Juric vd., 2018).

1.3.2. RİBO: Kimyasal Yapısı, Etki Mekanizması ve Uygulama Alanları

RİBO (LEE011, Şekil 1.2), CDK4/6 inhibitörleri sınıfına ait bir antineoplastik ajan olup, 2017 yılında FDA tarafından ER pozitif / HER2 negatif ilerlemiş veya metastatik meme kanseri tedavisinde kullanım için onaylanmıştır. Kimyasal formülü $C_{23}H_{30}N_8O$, moleküler ağırlığı 434,5 g/mol olup, farmasötik formu genellikle tartrat tuzu şeklindedir. Sulu asitlerde çözünebilen, hafif higroskopik ve sarıdan kahverengiye değişen kristal bir toz formundadır. RIBO, sikline bağımlı kinazlar (CDK4 ve CDK6) üzerinde seçici inhibitör etkisi göstererek, hücre döngüsünün G1 fazında durmasını sağlar ve tümör hücre proliferasyonunu engeller. CDK4/6 inhibisyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesinde kritik rol oynayan retinoblastoma proteininin (pRb) fosforilasyonunu azaltarak gerçekleşir. Bu mekanizma, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini önlemede etkili olup, özellikle ER pozitif meme kanseri hücre hatlarında daha belirgin bir etki göstermektedir (Qureshi vd., 2024).



Şekil 1.2. RİBO 'in kimyasal yapısı

Klinik öncesi çalışmalarda, RIBO'in tek başına veya letrozol ve fulvestrant gibi antiöstrojen ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldığında, tümör büyümesini anlamlı şekilde

inhibe ettiği ve kalıcı tümör regresyonuna yol açtığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, kombinasyon tedavileri ile tümör büyümesinde gecikme sağlanmış ve tedavi sonrası yeni tümör oluşumunun önüne geçilmiştir. RIBO'in etkinliği için intakt pRb'nin gerekli olduğu belirlenmiş olup, hücre döngüsü düzenleyicilerinde meydana gelen değişikliklerin endokrin direnç ve kötü prognoz ile ilişkilendirildiği ER pozitif meme kanserlerinde CDK4/6 inhibisyonunun önemli bir tedavi stratejisi olduğu gösterilmiştir (Baghermanesh vd., 2024).

Farmakokinetik özellikleri incelendiğinde, RIBO'in oral yolla alındıktan sonra 1-4 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaştığı ve yaklaşık 8 gün içinde kararlı duruma eriştiği belirlenmiştir. Doza bağlı olarak maruziyette hafif artış gözlemlenirken, uzun süreli kullanımda birikme gösterdiği tespit edilmiştir. RIBO, büyük ölçüde CYP3A4 enzimi tarafından hepatik olarak metabolize edilmekte olup, bu durum ilacın farmakokinetik profili üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. CDK4/6 inhibitörleri, tümör hücrelerini proliferatif fenotipten bölünemeyen hücrelere dönüştürerek yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. RIBO, hormonal tedavilerle kombinasyon halinde kullanıldığında, hücre çoğalmasını azaltarak ve hücre döngüsünü durdurarak, meme kanseri tedavisinde önemli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır (Schlam vd., 2024).

1.4. Literatürde Tez Maddelerine Yönelik Yapılmış Çalışmalar

1.4.1. ALP Antikanser Etken Maddesine Ait Literatür Çalışmaları

Literatürde, ALP'in analizi YPSK ve LC-MS/MS yöntemleriyle kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte, ALP'in elektrokimyasal ve spektrofotometrik kantitatif analizi üzerine herhangi bir araştırma mevcut değildir. ALP belirlenmesi için kullanılan analitik yöntemlerin örnekleri Çizelge 1.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. ALP için çeşitli yöntemler ile yapılan çalışmalar

Yöntem	Doğrusal Aralık	Teşhis Tayin Sınırı	Uygulama	Kaynak
YPSK-FLD	1–1000 ng/mL	0,3 ng/Ml	sıçan plazması	(Seo vd., 2021)
LC-MS/MS	145-5800 ng/ml	145 ng/ml	Tavşanlar plazması	(Majumder & Gubbiyappa, 2023)

1.4.2. RİBO Antikanser Etken Maddesine Ait Literatür Çalışmaları

RIBO'in farklı matrislerde, tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde, kantitatif analizine yönelik birkaç LC–MS/MS ve YPSK yöntemi bildirilmiştir. Bununla birlikte, RIBO'in spektrofotometri veya elektrokimyasal sensör kullanılarak kantitatif analizi üzerine herhangi bir çalışma yayınlanmamıştır. RIBO belirlenmesi için kullanılan analitik yöntemlerin örnekleri Çizelge 1.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. RIBO için çeşitli yöntemler ile yapılan çalışmalar

Yöntem	Doğrusal Aralık	Teşhis Tayin Sınırı	Uygulama	Kaynak
YPSK-UV	10-1000 ng/ml	10 ng/ml	İnsan Plazması	(Shelke & Rishipathak, 2023)
LC-MS/MS	1,008–1027,624 ng/mL	1,088 ng/mL	sıçan plazması	(Alshogran vd., 2023)
LC–MS/MS	1–3000 ng/mL	0,98 ng/mL	insan karaciğer mikrozomları	(Attwa vd., 2023)

Bu tez çalışmasında; elektrokimyasal, spektrofotometrik ve YPSK yöntemleri kullanılarak ALP ve RİBO etken maddelerinin farmasötik ve biyolojik örneklerde duyarlı ve güvenilir biçimde tayin edilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntemlerin, yüksek uygulanabilirlik, doğruluk ve kesinlik ile bu ilaçların seçici ve hassas belirlenmesine etkili bir çözüm sunduğu; ayrıca hızlı analiz süresi, düşük maliyet ve verimli analitik sinyal üretimi açısından başarılı sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler

2.1.1. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimya, kimyasal ve elektriksel etkiler arasındaki ilişkileri inceleyen bir kimya dalıdır. Elektrokimyasal hücreler aracılığıyla kimyasal enerjinin elektrik enerjisine dönüştürülmesini içerir. Elektrokimya, organik kimyada güçlü bir araç olup, elektron transfer davranışının analiz edilmesine ve organik reaksiyonların değerli ürünler üretmek üzere yönlendirilmesine olanak tanır. Elektrokimya prensipleri, sanayi elektroliz süreçleri, elektrokaplama, piller, yakıt hücreleri, korozyon koruma, kimyasal sentez ve kimyasal analiz gibi çeşitli alanlarda geniş uygulama bulur (Yammine vd., 2024). Elektrokimya, özellikle yük transfer reaksiyonlarını ve ara yüzey reaktivitesini anlama konusunda teori, modelleme ve deneysel çalışmalarda ilerlemelerle karakterize edilir. Elektrokimya, kimyasal ve elektriksel etkiler arasındaki ilişkileri anlamada ve çeşitli bilimsel ve teknolojik uygulamalarda kullanmada kritik bir rol oynar (Warburton vd., 2022).

Elektrokimyasal yöntemler, malzemelerin elektrokimyasal özelliklerinden yararlanarak nitel ve nicel analizlerini yapmaya ve çok düşük tespit limitlerine ulaşmaya olanak tanır. Elektrokimyasal yöntemler; kimyasal reaksiyonların hız ve denge sabitleri, kütle transfer hızı, yük transfer hızı ve sistemi karakterize eden elektrot-çözeltisi ara yüzeylerindeki stokiyometri gibi sistemler hakkında birçok bilgi sağlayabilir. Diğer analitik yöntemlerle karşılaştırıldığında, elektrokimyasal yöntemlerin, farklı oksidasyon aşamalarına sahip maddelerin kolayca eşzamanlı olarak analiz edilmesi, kullanılan cihaz ve yazılımların nispeten daha ucuz olması ve birçok elektrokimyasal yöntemin aynı cihazda uygulanabilmesi gibi çeşitli avantajları vardır. Analitlerin nitel ve nicel belirlenmesinin yanı sıra elektrot reaksiyon mekanizmaları da incelenebilir ve çözeltideki maddelerin stabilite ve fizikokimyasal sabitleri belirlenebilir (Jadon vd., 2016).

Elektrokimyasal sensörlerde, elektrot bir dönüştürücü eleman olarak kullanılmaktadır. Sensör, elektrot üzerinde immobilize edilen veya kimyasal olarak modifiye edilen reseptör ile hedef analitler arasındaki tanıma olayından kaynaklanan akım ve/veya gerilim ölçümüne dayanmaktadır (Thévenot vd., 2001). Elektrokimyasal dönüştürücüler başlıca dönüşümlü voltametri (DV), amperometri, doğrusal tarama voltametri (LSV), diferansiyel puls voltametri

(DPV), kare dalga voltametri (SWV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopi (EIS) gibi tekniklerle çalıştırılmaktadır.

2.1.1.1. Dönüşümlü Voltametri (DV)

DV, çalışma elektroduna (ÇE) değişen bir potansiyelin uygulandığı ve bunun sonucunda oluşan akım tepkisinin zaman fonksiyonu olarak izlendiği bir potansiyostatik tekniktir. DV, pozitif bir potansiyel taraması (anodik) uygulanmasıyla başlatılan ve ardından negatif bir potansiyel taraması (katodik) ile devam eden tersinir bir tekniktir, bu sayede döngüsel bir voltammogram oluşturulur. DV ayrıca karmaşık elektrot reaksiyonları hakkında bilgi edinmek için de kullanılabilir. Örneğin, DV tarama hızı çalışmaları, bir sürecin difüzyon kontrollü mü yoksa adsorpsiyon kontrollü mü olduğu, standart heterojen hız sabitleri ve elektroaktif yüzey alanı gibi elektrokimyasal reaksiyonların kinetiği hakkında daha fazla bilgi sağlayabilir (Navashree & Parthasarathy, 2023).

2.1.1.2. Diferansiyel Puls voltametri (DPV)

DPV, kronoamperometri ve lineer taramalı voltammetrenin özelliklerini birleştiren, yüksek seçicilik ve hassasiyet gösteren bir elektrokimyasal tekniktir. Bu yöntemde, sabit genlikteki (20–50 mV) küçük gerilim darbeleri, lineer bir potansiyel taraması üzerine saniyede 3–5 kez bindirilir. Akım ölçümü, her darbeden hemen önce ve darbenin sonunda yapılır; ardından, bu iki değer arasındaki fark, potansiyele karşı çizdirilerek voltammogram elde edilir. Bu ölçüm yaklaşımı, DPV'nin kronoamperometrinin en önemli avantajı olan yükleme akımının bastırılması özelliğini, lineer taramalı voltammetrenin yüksek çözünürlük kabiliyetiyle birleştirmesini sağlar. Yöntem, lineer voltametre ile elde edilen voltammogramın yerel türevini alarak daha net pikler oluşmasına olanak tanır. Eğer iki oksitlenebilir bileşik yeterince farklı potansiyellerde (en az 50–100 mV farkla) oksitleniyorsa, bu yöntem ile aralarındaki örtüşme ortadan kaldırılabilir. Böylece, her bileşiğin oksidasyonu geniş pikler veya platolar yerine, keskin ve ayırt edilebilir voltametrik sinyallerle ifade edilir; bu da daha yüksek çözünürlük sağlar (Pletcher vd., 2001).

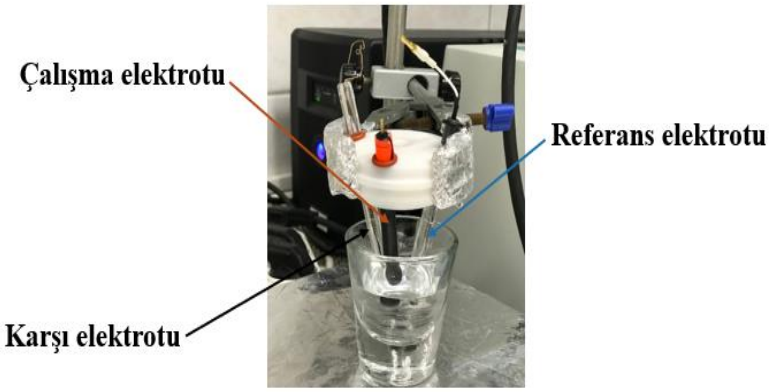
2.1.1.3. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopi (EIS)

EIS, bir sistemin denge durumunu küçük genlikli sinüzoidal bir uyarı aşırı potansiyeli uygulayarak bozan ve faz bilgisi içeren akım yanıtını ölçen bir empedimetrik tespit tekniğidir. Bu teknik, biyolojik tabakanın hem direnç hem de kapasitif özelliklerinin analizi için kullanılabilir. EIS yoluyla tanıma olaylarında tespit elemanı olarak çeşitli biyomoleküller

kullanılmıştır ve bu yöntem farklı başarı dereceleriyle sonuçlanmıştır. Bu biyomoleküller arasında enzimler, antikorlar, nükleik asitler, hücreler ve mikroorganizmalar yer almakta olup, yeni biyosensörler geliştirmek amacıyla metal yüzeylere immobilize edilmektedir. EIS, olgun bir teknik olduğu için çalışmalarda doğrulama amacıyla da kullanılmaktadır. Hücre içinde bir reaksiyon gerçekleştiğinde, redoks türlerinin kütle taşınımı denge koşullarının korunması nedeniyle difüzyon, göç ve konveksiyon yoluyla çözelti fazında gerçekleşir (Vivier & Orazem, 2022).

2.1.1.4. Elektrokimyasal Sistemler

Elektrokimyasal sistemler, bir veya daha fazla elektrolit içerisinde yer alan ve konumsal olarak birbirinden ayrılmış iki veya daha fazla elektrottan oluşan hücreler ve düzeneklerden oluşur. Bu tür bir sistemdeki elektrotlar, elektronların akışıyla birlikte yükseltgenme veya indirgeme reaksiyonlarına katılır ve iyonların ortamda hareket etmesiyle sistem genelinde bir yük transfer dengesi sağlanır. Voltametrik yöntemler, bir çalışma elektrotu, bir referans elektrot ve bir karşı elektrot içeren iki veya üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücre kullanılarak gerçekleştirilir (Porada vd., 2020). Genellikle çalışma elektrotu karbon malzemeden yapılır, ancak platin veya altın gibi metaller de kullanılabilir. Referans elektrot, tipik olarak Ag/AgCl'den oluşur ve çalışma elektrotuna uygulanan voltajın izlenmesi ve kontrol edilmesi için kararlı bir potansiyel sağlar. Karşı elektrot, elektrolit çözeltisiyle aşırı reaktiviteden kaçınmak için iletken bir maddeden yapılmıştır. Karşı elektrotlar için yaygın olarak kullanılan malzemeler platin veya gümüş telden oluşur. Karşı elektrotun birincil amacı, çalışma elektrotuna elektrik akımı sağlamaktır ve çalışma elektrodundan daha büyük olmalıdır. Elektrokimyasal hücre Şekil 2.1.'de gösterilmiştir. Karşı elektrot ile çalışma elektrotu arasında tutarlı bir elektrik akımı akışını sağlamak için, karşı elektrot genellikle çözücünün veya kütle elektrolitinin yükseltgenme veya indirgenmesi işlemine tabi tutulur. Karşı elektrot ile referans elektrot arasında küçük bir akım akışı bulunur ve bu, referans elektrotun potansiyelinin değişmeden kalmasını sağlar (Privett vd., 2010).



Şekil 2.1. Elektrokimyasal sistem

2.1.2. Spektrofotometrik Yöntemler

Spektrofotometri, özellikle küçük ölçekli sanayiler tarafından tercih edilmektedir çünkü ekipmanın maliyeti düşük ve bakım sorunları minimaldir. Analiz yöntemi, renksiz bileşiklerin spektrumun yakın ultraviyole (UV) bölgesinde (200-380 nm) monokromatik ışığı absorplamasını ölçmeye dayanmaktadır. Beer-Lambert Kanunu ($A = \varepsilon\ b\ C$), absorbans spektroskopinin temelini oluşturur ve bir çözeltinin absorbansının doğrudan analiz edilen maddenin konsantrasyonu ile orantılı olduğunu belirtir. Tek bir dalga boyu için, A absorbans, ε bileşiğin ya da molekülün çözeltideki molar absorptivitesidir ($M^{-1}\ cm^{-1}$), b küvetin ya da numune tutucunun yol uzunluğudur (genellikle 1 cm), ve C çözeltinin konsantrasyonudur (M). UV bölgesini kapsayan bir spektrofotometrinin temel çalışma prensibi, belirli bir dalga boyu aralığındaki ışığın çözücü ile dolu bir hücreden geçerek fotoelektrik hücreye düşmesi ve bu hücredeki ışınım enerjisinin elektrik enerjisine dönüştürülmesi ile ölçülmesidir. UV-görünür spektroskopi, bir bileşiğin çözeltide veya katı halde absorbans spektrumlarını elde etmek için kullanılır. Spektroskopik olarak gözlemlenen, ışık enerjisi veya elektromanyetik radyasyonun absorpsiyonudur; bu enerji, bileşiğin ya da malzemenin elektronlarını temel halden birinci tekil uyarılmış hale çıkarır. Elektromanyetik spektrumun UV-görünür enerji bölgesi, 1,5 – 6,2 eV aralığını kapsar ve bu, 800 - 200 nm dalga boyu aralığına karşılık gelir. (Verma & Mishra, 2018).

2.1.3. YPSK Yöntemi

YPSK, küçük hacimli sıvı numunenin, çapı 3-5 µm olan ve sabit faz olarak adlandırılan partiküllerle doldurulmuş bir kolona enjekte edilmesiyle gerçekleştirilen bir ayırma tekniğidir (Şekil 2.2). Numunenin bileşenleri, bir pompa aracılığıyla yüksek basınç altında kolona

gönderilen hareketli faz ile taşınarak kolon boyunca ilerler. Bileşenlerin birbirinden ayrılması, kolon dolgu malzemesi ile bileşen molekülleri arasındaki çeşitli kimyasal ve/veya fiziksel etkileşimler sonucunda gerçekleşir. Kolondan çıkan ayrılmış bileşenler, bir akış hücreli dedektör tarafından algılanarak miktarları belirlenir. Dedektörden elde edilen sinyal, "sıvı kromatogramı" olarak adlandırılır (Reuhs, 2017).

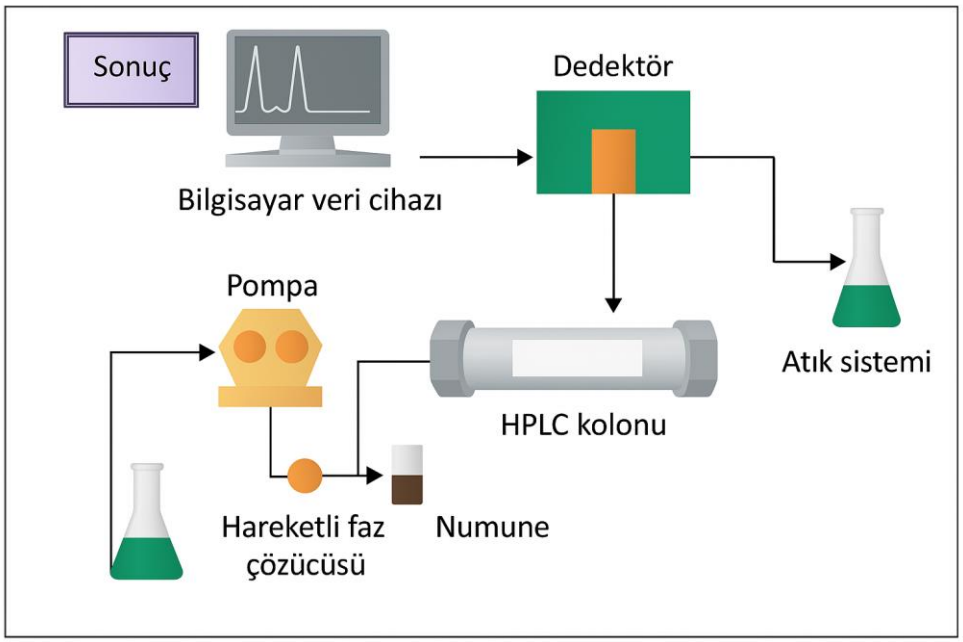
2.1.3.1. YPSK Sistemindeki Temel Bileşenler

Pompa: Pompanın temel görevi, hareketli faz olarak adlandırılan sıvıyı belirli bir akış hızında (mL/dakika cinsinden) sıvı kromatografi sistemine iletmektir. YPSK'de tipik akış hızları 1-2 mL/dakika aralığında olup, kullanılan pompalar genellikle 6000-9000 psi (400-600 bar) basınç üretebilir.

Enjektör: Enjektör, sıvı numunenin hareketli faz akışına dahil edilmesini sağlar. Genellikle 5-20 mikrolitre (µL) hacmindeki numuneler enjekte edilir. Enjektör, sıvı sistemin yüksek basıncına dayanacak şekilde tasarlanmalıdır. Manuel enjeksiyonun pratik olmadığı durumlarda veya çok sayıda numunenin analiz edilmesi gerektiğinde, otomatik numune alıcı (auto sampler) kullanılır (Foster vd., 2000).

Kolon: kolon, sabit faz kullanarak numune bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal etkileşimler aracılığıyla ayrılmasını sağlar. Kolon içindeki küçük partiküller, normal akış hızlarında yüksek arka basınç oluşturur ve pompanın hareketli fazı kolondan geçirebilmesi için yüksek basınç uygulaması gerekir.

Dedektör: Dedektör, kolondan elüe olan bireysel molekülleri algılar ve miktarlarını ölçerek analistin numune bileşenlerini nicel olarak analiz etmesini sağlar. Dedektör çıkışı, kaydedici veya bilgisayara iletilerek sıvı kromatogram elde edilir. UV-Gör. dedektörü, YPSK'de en yaygın kullanılan dedektördür. Belirli bileşiklere veya bileşik sınıflarına özgü yanıt verir. Çoğu organik bileşik, dedektörün dalga boyu aralığında belirli dalga boylarında ışığı absorbe eder. Işık absorplayan fonksiyonel gruplara sahip olmayan bileşikler, kolon sonrası türevlendirme ile uygun absorpsiyon özellikleri kazandırılarak tespit edilebilir (Sobolewska & Biesaga, 2023).



Şekil 2.2. YPSK sistemi

2.1.3.2. YPSK Kolonundaki Hareketli ve Sabit Fazları

YPSK'de, ayrım işlemi sabit faz ve hareketli faz arasındaki etkileşimlere dayanır. Sabit faz, genellikle silika bazlı destek materyalleri üzerine bağlanmış kimyasal gruplardan (örneğin C18, C8, fenil) oluşur ve analitlerin kolonda tutulmasını sağlar. Analitlerin sabit fazla olan etkileşim gücü, alıkonma süresini ve ayrım verimliliğini doğrudan etkiler. Uygulanan kromatografi türüne bağlı olarak sabit fazın kutupsallığı değişir; ters faz kromatografide apolar, normal fazda ise polar sabit fazlar tercih edilir. Hareketli faz, sabit faz ile analit arasındaki etkileşim dengesini düzenleyerek ayrımın gerçekleşmesini sağlar. Bu fazın bileşimi, pH'ı, iyonik gücü ve içerdiği organik çözücüler, analitlerin iyonlaşma durumunu ve adsorpsiyon davranışını belirgin biçimde etkiler. Ters faz kromatografide genellikle suya metanol veya asetonitril gibi organik çözücüler ilave edilerek hareketli faz hazırlanır. Ayrıca, pH ayarı ve tampon kullanımı, özellikle iyonlaşabilen bileşiklerin ayırımı açısından kritik öneme sahiptir (Sharma vd., 2022).

2.2. Tez Kapsamında Kullanılan Nanomalzemeler

Elektrot yüzeylerinin nanomalzemeler, polimer filmler, nanopartiküller, nanokompozitler ve kendi kendine birikimli monolayerlerle modifikasyonu, elektrokimyasal sensörlerin performansını artırmak için yaygın bir yaklaşımdır. Nanomalzeme ile modifiye edilmiş elektrotlar, bu elektrotların ara yüzeyinde gerçekleşen elektron transfer kinetiğindeki

iyileşme, elektrokimyasal olarak aktif yüzey alanındaki artış, nanomalzemelerin kolaylaştırdığı elektrokatalitik etkiler ve yüzey geometrisindeki değişiklikler gibi nedenlerle performans sunabilir (Iqbal vd., 2024).

Karbon nanomalzemeler, yüksek yüzey-hacim oranı, yüksek elektriksel iletkenlik, kimyasal stabilite, biyouyumluluk ve sağlam mekanik dayanıklılık gibi birçok alanda benzersiz avantajlar sunmaktadır. Çok katmanlı karbon nanotüpler (MWNT'ler), farklı çaplara sahip çoklu iç içe geçmiş grafen tabakalarından oluşur ve çapları 100 nm'ye kadar çıkabilir. Bu nanotüplerin uzunlukları ise birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar değişebilmektedir. Geniş yüzey alanlarına sahip, kimyasal olarak değiştirilebilir yüzey özellikleri, benzersiz fiziksel özellikleri ve ayarlanabilir uzunluklarıyla MWNT'ler, biyomedikal uygulamalar için güçlü adaylar olarak öne çıkmaktadır (Chen & Chatterjee, 2013).

Ayrıca, geçiş metal oksit nanoparçacıkları (NP'ler), elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesinde elektrot modifikasyonu amacıyla kullanılabilir. En yaygın kullanılan geçiş metallerinden bazıları demir, bakır, kobalt, nikel, manganez, titanyum, gümüş, vanadyum, zirkonyum, çinko ve tungstendir (Tonelli vd., 2019).

Ayrıca, elektrokimyasal sensörlerde en yaygın kullanılan malzemelerden biri, yüksek elektriksel iletkenlik, yeterli mekanik dayanım ve iyi işlenebilirlik gibi cazip özelliklere sahip olan iletken polimerlerdir. Özellikle, PEDOT : PSS olarak bilinen poli(3,4-etilendioksitiyofen): polistiren sülfonat, elektrokimyasal sensörlerin tasarım ve üretimi için en ilgi çekici iletken polimerlerden biridir. PEDOT : PSS'in mükemmel iletkenlik, kimyasal kararlılık, uygun oksidasyon potansiyeli ve bant aralığı gibi benzersiz özellikleri büyük ilgi toplamıştır (Krzyczmonik vd., 2014).

2.3. Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon, bir cihazın, yöntemin veya ürünün tanımlanmış parametreler ve gerekliliklere uygunluğunu belirlemek amacıyla elde edilen sonuçların değerlendirilmesine yönelik işlemler bütünü olarak tanımlanabilir. İlaç üretimi ve kalite kontrol süreçlerinde uygulanan analitik yöntemlerin validasyonu, gerçekleştirilen işlemlerin doğruluğu ve güvenilirliği açısından kritik bir öneme sahiptir. Analitik yöntem validasyonu, analiz sırasında değerlendirilen parametreler aracılığıyla geliştirilir ve kullanılan yöntemlerin doğruluk, duyarlılık ve uygulanabilirliğini kanıtlamayı amaçlar. Analitik validasyon, ilaç etkin maddelerinin her aşamada doğruluk, kesinlik, dayanıklılık ve saflığını garanti altına almak için

yapılan testlerle ürün kalitesinin değerlendirilmesini sağlar. Rutin analizlerde, analizi gerçekleştiren kişinin deneyimi, kullanılan cihazlar, malzemeler ve zamanlama gibi birçok faktör analiz sonuçları üzerinde doğrudan etkilidir (Kakad vd., 2020).

Analitik yöntem validasyonunda değerlendirilen en önemli parametreler arasında doğruluk, kesinlik, teşhis sınırı, tayin alt sınırı ve doğrusalık yer almaktadır. Bu parametreler, yöntemin güvenilirliğini ve uygulanabilirliğini kanıtlamak açısından kritik öneme sahiptir.

2.3.1. Doğruluk

Bir analitik prosedürün doğruluğu (gerçekliği), numunedeki analitin hesaplanan değeri ile gerçek değeri arasındaki yakınlığı ifade eder. Doğruluğun belirlenmesi için çeşitli yöntemler önerilmiştir. Doğruluk, hesaplanan konsantrasyonun bir referans standartla karşılaştırılması, başka bir iyi doğrulanmış analitik yöntemin sonucuyla karşılaştırılması, boş bir numune matrisine eklenen analitin geri kazanım değerinin belirlenmesi veya standart ekleme yöntemiyle belirlenebilir. Doğruluk, aynı zamanda analitik yöntemin kesinlik, doğrusalık ve özgüllüğü kanıtlanmışsa da çıkarılabilir. Doğruluk genellikle yüzdelik geri kazanım olarak rapor edilir. Yüzdelik geri kazanım, numunede bilinen bir miktarda analit eklenerek yapılan analizle hesaplanır. Başka bir şekilde, doğruluk, ortalama değer ile kabul edilen gerçek değer arasındaki farkın, güven aralıkları ile birlikte hesaplanmasıyla belirlenebilir (Gupta & Pathak, 2024).

2.3.2. Kesinlik

Analitik yöntemlerde kesinlik, aynı homojen numuneden yapılan bir dizi ölçüm arasındaki veri saçılımının ölçülmesi anlamına gelir. Kesinlik çalışması, nihai yöntemde kullanılacak numune ve standart hazırlık prosedürleri kullanılarak gerçekleştirilmelidir. Kesinlik genellikle tekrar edilebilirlik, ara kesinlik ve yeniden üretilebilirlik gibi terimlerle tanımlanır. Tekrar edilebilirlik, kısa bir süre içinde aynı çalışma koşulları altında gerçekleştirilen bir kesinlik çalışmasına atıfta bulunabilir. Ara kesinlik, farklı günlerde, farklı analistler tarafından veya farklı ekipmanlar aracılığıyla gerçekleştirilen laboratuvar içi varyasyonu ifade eder. Yeniden üretilebilirlik, laboratuvarlar arası kesinlik çalışmalarını ifade eder ve metodolojinin standardizasyonuna uygulanır (Badzoka vd., 2025).

2.3.3. Teşhis Sınırı (TS)

Teşhis sınırı, belirlenebilir ancak tam olarak ölçülemeyen analitin en düşük konsantrasyonunu ifade eder. Bir analitik yöntem için teşhis sınırının belirlenmesi için çeşitli

yöntemler mevcuttur. Görsel değerlendirme yöntemi, en düşük analit konsantrasyonunun test edildiği ve güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği minimum seviyenin (konsantrasyonun) belirlendiği bir yaklaşımdır. Teşhis sınırı (TS), yanıtın standart sapması (σ) ile kalibrasyon eğrisinin eğimi (S) kullanılarak TS = 3,3 σ / S formülüyle hesaplanır. Eğim (S), analitin kalibrasyon eğrisinden elde edilirken; standart sapma (σ) ise boş numunelerin standart sapmasından, regresyon doğrusu üzerindeki artıkların standart sapmasından veya y-kesme noktasının standart sapmasından tahmin edilebilir. Boş numune yanıtı için, analitik arka plan yanıtının büyüklüğü bir dizi boş numune alımı yoluyla ölçülür ve bunların standart sapması değerlendirilir. Regresyon çizgisinin standart sapması veya y-kesmelerin standart sapması için, bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur ve bir regresyon çizgisinin artık standart sapması veya regresyon çizgilerinin y-kesmesinin standart sapması, yanıtın standart sapması olarak kullanılabilir (Krull & Swartz, 1999).

2.3.4. Tayin Alt Sınırı (TAS)

Tayin alt sınırı (TAS), analitin bir numunedeki en düşük miktarının doğru ve kesin olarak ölçülebildiği minimum konsantrasyonu ifade eder. Teşhis sınırına benzer şekilde TAS da görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı (genellikle 10:1) ve kalibrasyon eğrisine dayalı matematiksel yöntemlerle belirlenebilir. Kalibrasyon eğrisine dayalı hesaplamada kullanılan formül TAS = 10σ/S'dir; burada S, kalibrasyon eğrisinin eğimi, σ ise yanıtın standart sapmasıdır. σ değeri; boş numune yanıtlarının, regresyon çizgisinin artıklarının veya y-kesimlerinin standart sapmasından elde edilebilir (Krull & Swartz, 1999).

2.3.5. Doğrusallık

Bir analitik prosedürün doğrusalığı, numunedeki analit konsantrasyonuna/miktarına orantılı olarak test sonuçları/yanıt elde etme yeteneğidir. Analitik yöntemin doğrusalığı, en küçük kareler yöntemi ile regresyon doğrusu katsayısının belirlenmesi yoluyla istatistiksel olarak gerçekleştirilir (Lim vd., 2024).

2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Araç ve Gereçler

2.4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup herhangi bir ön saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanılmıştır. Glukoz (%99,5), L-arjinin (%98,0), L-metiyonin, sodyum hidroksit, hekzasiyanoferrat (Fe $(CN)_6]^{3-/4-}$, %99,5), hidroklorik asit,

sodyum asetat, askorbik asit, ürik asit (%99,0), asetik asit, potasyum klorür, sodyum fosfat, sodyum sülfat, PEDOT:PSS, Sigma Aldrich Co.'dan (https://www.sigmaaldrich.com, Almanya) satın alınmıştır. Ayrıca, Nikel (II) nitrat hekzahidrat ($Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), Lantan nitrat hekzahidrat ($La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$) ve sitrik asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) Sigma Aldrich Co.'dan (Almanya) temin edilmiştir. MWCNTs (Ürün No: 677248–5 G), alüminyum nitrat nonahidrat ($Al(NO_3)_3.9H_2O$), bakır (II) nitrat trihidrat ($Cu(NO_3)_2.3H_2O$), sitrik asit, demir (II) klorür tetrahidrat ($FeCl_2 4H_2O$), demir klorür hekzahidrat ($FeCl_3 .6H_2O$), amonyak çözeltisi, nitrik asit ve sülfürik asit Merck Company'den (Darmstadt, Almanya) elde edilmiştir. Grafit tozu, sodyum nitrat (%99) $NaNO_3$, hidrojen peroksit (H_2O_2), sülfürik asit (%95,5-96,5) (H_2SO_4) ve potasyum permanganat ($KMnO_4$) Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. RIBO ve ALP selleckchem.com'dan satın alınmıştır. İnsan plazma örnekleri de Sera-Flex Inc.'den temin edilmiştir. Metanol, asetonitril ve analitik saflık derecesine sahip triflorasetik asit, Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanması ve numune seyreltmeleri için gerekli ultra saf su, Millipore Milli-Q sistemi (Milford, MA, ABD) kullanılarak sağlanmıştır. YPSK analizlerinden önce, tüm hareketli faz çözeltileri 0,22 µm gözenek çapına sahip membran filtreler kullanılarak, vakum pompası yardımıyla dikkatlice süzülmüştür. Ayrıca, hava kabarcıkları ya da olası diğer düzensizliklerin giderilmesi amacıyla süzülen hareketli faz çözeltileri sonikasyona tabi tutulmuştur.

2.4.2. Kullanılan Ekipmanlar

Elektrokimyasal deneyler, Hollanda menşeli Metrohm-Autolab PGSTAT128N model potansiyostat/galvanostat sistemi kullanılarak, 10 mL hacmindeki bir elektrokimyasal hücrede GCE elektrodu ile gerçekleştirilmiştir.

Spektrofotometrik ölçümler, Shimadzu UV Probe 2.7 sistem yazılımı ile entegre çalışan çift ışınlı Shimadzu UV 1800 UV-Gör. spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Numunelerin absorbans değerleri, 1 cm yol uzunluğuna sahip kuvars küvetler içerisinde ölçülmüştür.

Kromatografik analizler, Agilent 1100 Technologies model YPSK sistemi kullanılarak yürütülmüştür. Bu sistem; otomatik membranlı çözücü gaz giderici ünitesi içeren dörtlü pompa, otomatik örnekleyici, kolon fırını ve dedektör olarak diyot dizi dedektörü (DAD) ile donatılmıştır. Sistemin çalıştırılması ve verilerin kaydı, merkezi Palo Alto, Kaliforniya, ABD'de bulunan Agilent firmasına ait Chemstation Plus yazılımı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Hedef bileşiklerin optimum ayrımı ve analizi için, Supelco (ABD) üretimi, 4.6 × 150 mm boyutlarında ve 3 µm partikül büyüklüğünde Inertsil C8-3 kolon kullanılmıştır.

Deney süresince pH ölçümleri, yüksek kaliteli cam elektrot içeren Mettler Toledo marka pH metre ile gerçekleştirilmiştir.

İlgili Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FT-IR) spektrumları, Perkin-Elmer Spectrum 400 FT-IR spektrometre (Waltham, MA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Her bir örneğin faz yapıları, X-ışını kırınımı (XRD) analiz sistemi (Rigaku, Cu Kα radyasyonu; λ = 1,5418 Å) kullanılarak tespit edilmiştir. X-ışını fotoelektron spektroskopi (XPS), Thermo Scientific K-Alpha fotoelektron spektrometre ile ölçülmüştür. Yüzey alanlarının analizi için Brunauer-Emmet-Teller (BET) yöntemi kullanılmıştır. Örneklerin yapısal görselleştirilmesi ve Enerji Dağılımlı X-ışını spektroskopi (EDX), Geçirimli Elektron Mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen malzemelerin morfoloji ve yapısı, FEI Quanta 650 model alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilen görüntüler üzerinden yapılan SEM analiziyle incelenmiştir.

2.4.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.3.1. Destek Elektrolitlerin Hazırlanması

Britton-Robinson tamponunun hazırlanması için, 2,5 g borik asit, 2,8 ml fosforik asit, 3,7 g potasyum klorür ve 2,4 ml asetik asit çözeltileri kullanılarak toplamda 1000 ml destek elektrolit elde edilmiştir. Fosfat Tampon Salin (FT) hazırlanırken, 4,48 g Na_2HPO_4 ve 1,70 g KH_2PO_4 hassas terazide tartılarak bir miktar ultra saf su içeren 500 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Bileşenler, manyetik karıştırıcı üzerinde bir karıştırma mıknatısı ile karıştırılarak çözünmüştür. pH seviyelerini ayarlamak için 2,0 M NaOH ve 2,0 M HCl çözeltileri kullanılmıştır.

2.4.3.2. Etken Maddelerin Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

RIBO standart çözeltisi, metanol su (1:1) karışımında hazırlanmıştır, ALP stok çözeltisi ise asetonitril su (1:1) oranında hazırlanmıştır. Daha sonra, stok çözeltiler istenen konsantrasyonları hazırlamak amacıyla uygun çözücüler ile seyreltilmiştir.

2.4.3.3. Ticari Plazma, Tablet, ve İdrar Çözeltilerinin Hazırlanması

Plazma örneği hazırlamak için, 1 mL insan plazması 1 mL asetonitril ile karıştırıldı. Elde edilen karışım, homojen bir karışım sağlamak amacıyla 5 dakika boyunca şiddetli bir şekilde vortekslendi ve ardından 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu santrifüj işlemi,

büyük moleküllerin ve proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlayarak analiz için daha temiz bir örnek elde edilmesini sağladı.

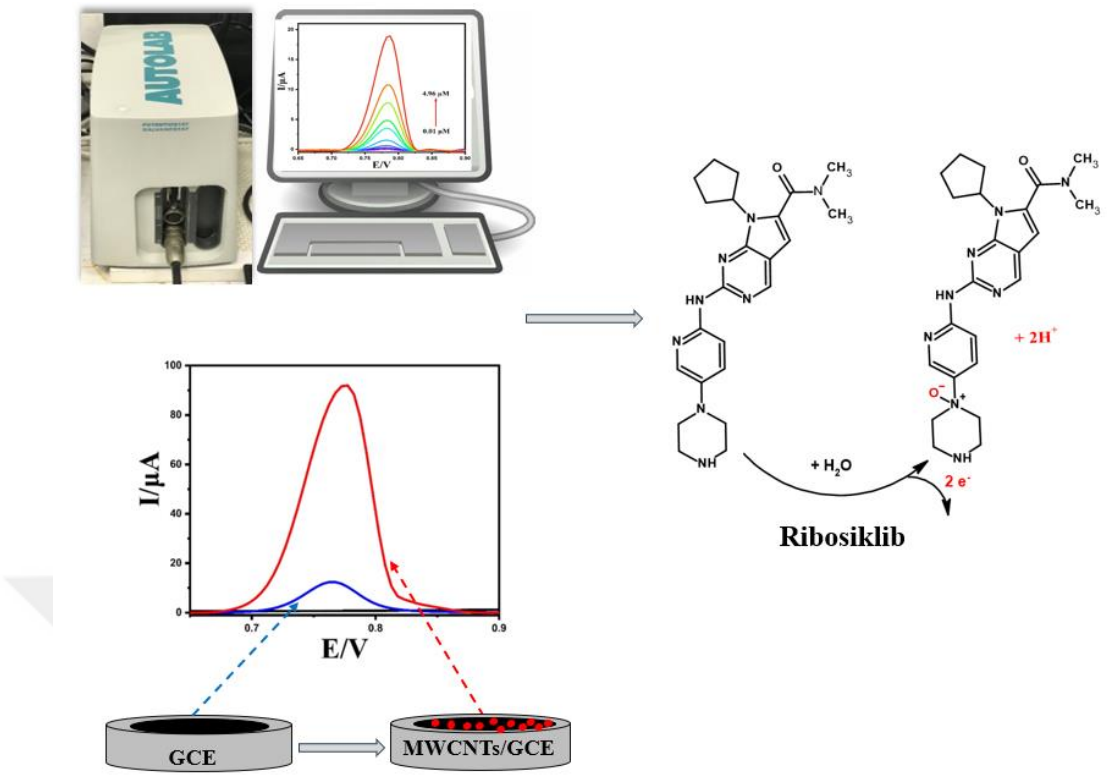
Beş adet farmasötik tablet dikkatlice tartılarak ince bir şekilde öğütüldü. Elde edilen toz, tablet içeriğinin tamamen çözünmesini sağlamak amacıyla metanol içinde çözündürüldü ve ultrasonik banyoda 30 dakika karıştırıldı. Elde edilen çözeltinin ardından 0,45-µm PTFE enjektör filtresi ile filtre edildi. İdeal koşullar altında destekleyici elektrolite ilacın farklı miktarları eklenerek gerekli ilaç konsantrasyonu elde edildi ve analiz edildi.

İdrar örnekleri, sağlıklı bir gönüllüden toplandı. Partikülleri veya safsızlıkları gidermek amacıyla idrar örnekleri 0,45-µm PTFE enjektör filtresi kullanılarak filtre edildi. Hazırlanan idrar örnekleri, önerilen DPV yöntemi ile analiz edildi ve analiz edilen ilacın farklı konsantrasyonlarıyla idrar örnekleri zenginleştirildi.

2.4.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Modifiye Elektrot Hazırlanması

2.4.4.1. MWCNTs/GCE Elektrotun Hazırlanması

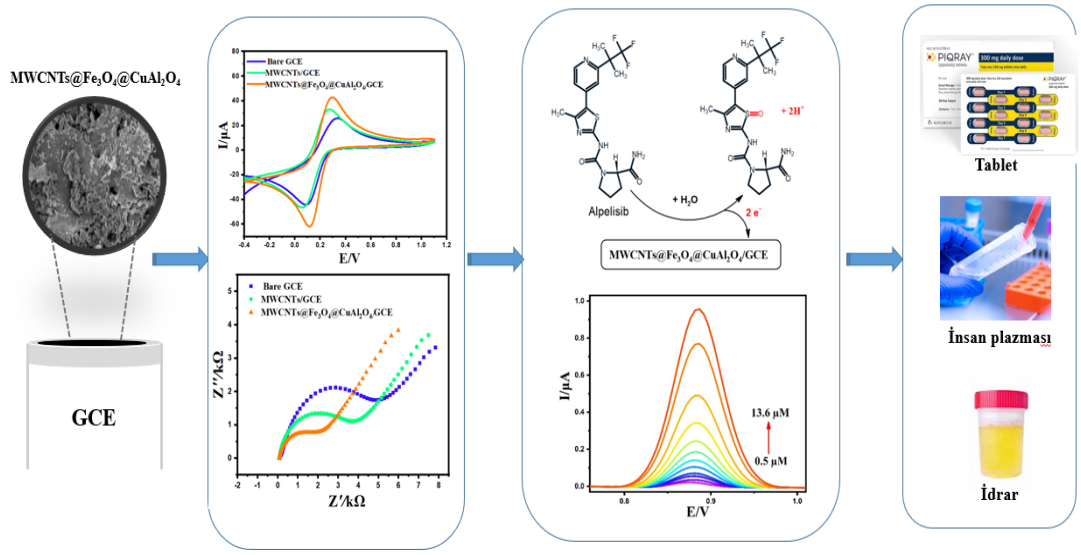
Modifiye elektrotun hazırlanmasında, GCE, 0,3 mm alümina süspansiyonu ile kaplanmış parlatma pedi kullanılarak dikkatli bir şekilde parlatılmış ve böylece yüksek düzeyde yüzey düzgünlüğü ve temizlik elde edilmiştir. Ardından, elektrot yüzeyinde kalabilecek partikül ve kirlerin tamamen uzaklaştırılması amacıyla, parlatılan yüzey eşit hacimlerde karıştırılmış deiyonize su ve etanol (1:1, h/h) çözeltisinde yıkanmıştır. Bunu takiben, 3 dakika süreyle ultrasonik banyo uygulanarak yüzeydeki kalıntıların tamamen giderilmesi ve elektrotun kontaminasyondan arındırılması sağlanmıştır. Temizleme işleminin ardından, MWCNTs deiyonize su içerisinde (1,0 mg/mL) ultrasonik dağıtımı ile homojen bir dispersiyon hazırlanmıştır. Bu dispersiyondan 5,0 µL'lik bir hacim dikkatlice GCE yüzeyine damlatılarak, nanomalzemenin yüzeye düzgün ve kontrollü biçimde uygulanması sağlanmıştır. Sonrasında, kurutmayı sağlamak amacıyla elektrot 15 dakika süreyle IR (kızılötesi) radyasyona maruz bırakılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

2.4.4.2. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE Elektrotun Hazırlanması

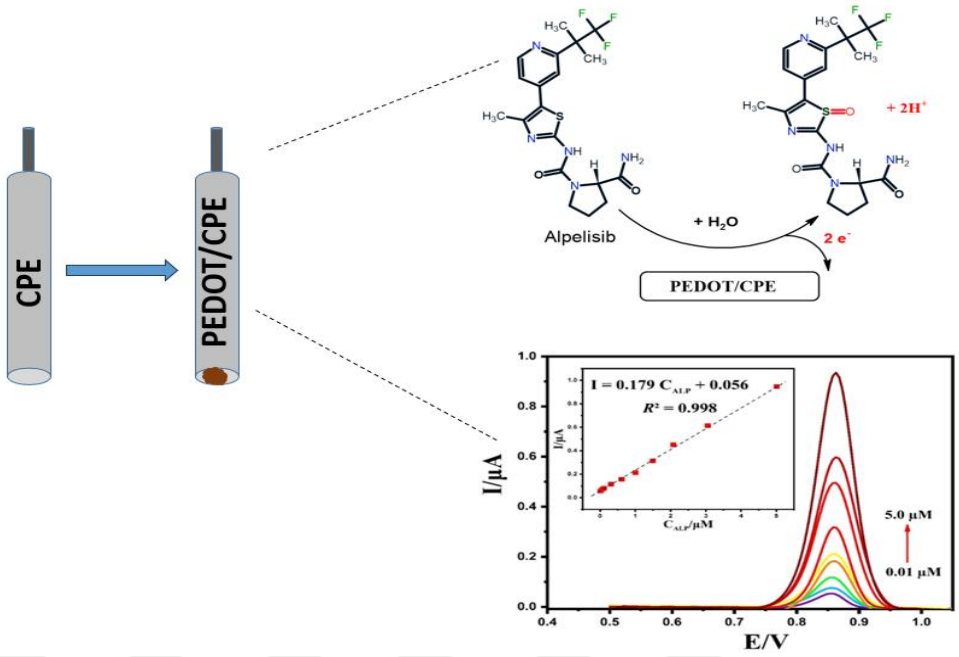
Elektrokimyasal platformun oluşturulmasında, GCE elektrot önce 0,3 mm alümina süspansiyonu ile cilalanmış, ardından deiyonize su ve etanol (1:1) karışımında ultrasonik banyo ile temizlenerek yüzeydeki kir ve kalıntılardan arındırılmıştır. Temizleme sonrası, 1,0 mg MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ nanokompoziti 1,0 mL deiyonize suda ultrasonik olarak disperse edilmiş ve bu süspansiyondan 6 µL GCE yüzeyine damlatılmıştır. Modifiye edilen elektrot oda sıcaklığında 15 dakika kurutularak stabil ve homojen bir yüzey elde edilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

2.4.4.3. PEDOT:PSS/CPE Elektrotun Hazırlanması

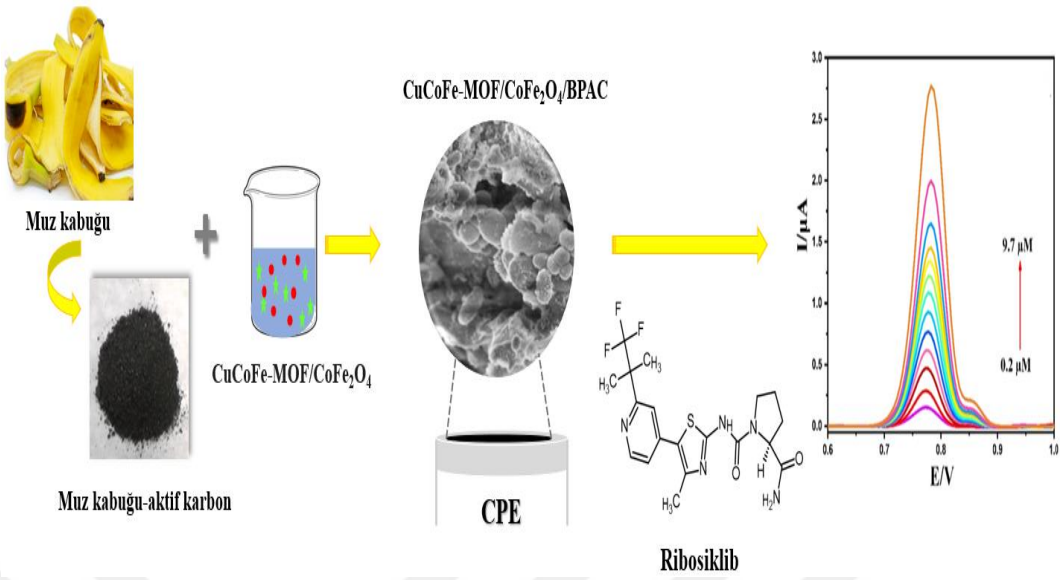
PEDOT:PSS ile modifiye edilmiş CPE elektrodunun hazırlanmasında ilk adım, 0,9 g grafit tozunun 0,1 g PEDOT:PSS ile mekanik olarak karıştırılmasını içermiştir. Bu işlem, porselen havan ve tokmak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, karışım dietil eter içinde çözülmüş ve bağlayıcı olarak kullanılan parafin yağı ile karıştırılmış, homojen bir doygunluğa sahip bir karbon pasta elde edilene kadar devam edilmiştir. Elde edilen karbon pasta, CPE elektroduna yerleştirilmiş ve fazla olan karbon pastanın çıkarılması sağlanarak taze bir yüzey elde edilmiştir. Buna karşılık, referans sensör olarak işlev gören modifiye edilmemiş bir CPE, aynı yöntem kullanılarak, ancak PEDOT:PSS ilave edilmeden üretilmiştir. Bu süreçte, her iki elektrodun üretiminde tutarlılık sağlanmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

2.4.4.4. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE Elektrotun Hazırlanması

Çıplak CPE, grafit tozu ve parafin yağı havan ve havan eli kullanılarak karıştırılarak hazırlandı. Homojenleştirilmiş macun, CPE'ye dolduruldu ve elektrot yüzeyi filtre kağıdında düzleştirildi. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE çalışma elektrodunu hazırlamak için, 0,10 g CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC kompoziti ile 0,90 g grafit tozu karıştırılarak iyice homojen hale getirildi. Karışım daha sonra dietil eterde çözülerek parafin yağı ile elle karıştırıldı, bu yağ bağlayıcı olarak kullanıldı, ve homojen bir şekilde doygun karbon pastası elde edilene kadar karıştırıldı. Bu pasta, CPE'ye dolduruldu ve fazla macun tüpten dışarı atılarak taze bir yüzey elde edildi (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Geliştirilen sensörlerin hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

2.5. Kompozitlerin Sentezi

2.5.1. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ Sentezi

Fonksiyonelleştirme amacıyla 0,75 g MWCNT, 60 mL H_2SO_4:HNO_3 (3:1) karışımı ile oda sıcaklığında 30 dakika süreyle ultrasonik işlem uygulanarak karıştırılmış, ardından 70 °C'de 10 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile reaksiyona alınmıştır. Elde edilen ürün, nötr pH'a ulaşıncaya dek deiyonize su ile yıkanmış, 4100 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve son olarak 80 °C'de 24 saat boyunca kurutularak hazır hale getirilmiştir (Ahmed vd., 2023).

1,67 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ve 0,912 g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 200 mL deiyonize suda ultrasonik banyoda çözündürülmüştür. Karışıma 0,6 g karboksile edilmiş MWCNT eklenmiş ve 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karıştırma, argon atmosferinde 10 dakika süreyle yapılmış ve ardından 35 mL amonyak çözeltisi yavaşça eklenmiştir. Süreç, 20 dakika boyunca argon gazı altında devam ettirilmiştir. Siyah ürün, 60-70 °C'de manyetik ısıtıcıda 24 saat karıştırılmış, ardından safsızlıkların ve fazla amonyağın uzaklaştırılması için deiyonize su ile yıkanmış ve mıknatısla ayrılmıştır. Ürün, santrifüj edilip etil alkol ile yıkandıktan sonra 85 °C'de bir gece boyunca kurutularak hazır hale getirilmiştir (Ulusoy vd., 2019).

$CuAl_2O_4$ nanoparçacıkları, $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (0,75 g), $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ (0,25 g) ve sitrik asit (3,0 g) kullanılarak sol-jel yöntemiyle sentezlenmiştir. Metal tuzları ve sitrik asit, deiyonize suda manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'ı amonyak ile 4'e ayarlandı ve 80 °C'de 30 dakika karıştırıldıktan sonra koyu mavi jel elde

edilmiştir. Jel, 90 °C'de kurutulup siyahlaşana kadar ısıtılıp ve daha sonra 800 °C'de 3 saat süreyle kalsine edilmiştir. Sonrasında, 0,7 g MWCNTs@Fe_3O_4 ve 0,3 g $CuAl_2O_4$ bir behere aktarılarak ve 50 mL deiyonize su ile etil alkol (1:1) karışımı eklenerek ultrasonik işlem uygulanmıştır. Karışım, 30 °C'de manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılmış ve santrifüj sonrası 80 °C'de 24 saat kurutulmuştur. Böylece, MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ nanokompoziti elde edilmiştir (Behnamian vd., 2022).

2.5.2. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC Sentezi

Muz kabuğu aktif karbonunun (BPAC) sentezi, önceki çalışmalara dayalı olarak bazı değişikliklerle gerçekleştirilmiştir (Ahmadi & Ganjidoust, 2021). İlk olarak, muz kabukları musluk ve saf su ile temizlenmiş, ardından 0,5×0,5 cm boyutlarında kesilerek 85 °C'de 24 saat süreyle kurutulmuştur. Kurutulan muz kabukları öğütülüp, 200 µm gözenek açıklığına sahip bir elek ile elenmiştir. Elde edilen toz, fırınında 550 °C'de 1,5 saat süreyle karbonize edilmiştir. Karbonize edilen örnek, soğutulduktan sonra %45 potasyum hidroksit çözeltisi ile 1:5 oranında karıştırılmış ve manyetik karıştırıcı ile 20 saat boyunca karıştırılmıştır. Karışım, oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra 100 °C'de 72 saat kurutulmuştur. Kurutulan örnek, fırında 750 °C'de 1,5 saat aktive edilmiştir. Son olarak, örnek hidroklorik asit ve saf su ile yıkanarak nötr pH'a ulaşana kadar temizlenmiş ve 100 °C'de 15 saat kurutulmuştur. Elde edilen BPAC, son üründür.

BPAC/$CoFe_2O_4$ nanomalzemeleri, 5,0 mmol $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 4,6 mmol $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ve 0,45 g BPAC'ın %80 (h/h) etanol içeren 60 mL'lik bir çözeltiye dağılmasıyla hazırlanmıştır. Karışım 30 dakika karıştırılmış ve homojen bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözelti, otoklavda 160 °C'de 20 saat süreyle ısıtılmıştır. Soğutulan numune, etanol ve saf su ile yıkandıktan sonra, 85 °C'de 24 saat kurutulmuş ve 800 °C'de 2 saat fırında kalsine edilerek BPAC/$CoFe_2O_4$ nanomalzemeleri elde edilmiştir.

BPAC/$CoFe_2O_4$/CuCoFe-MOF nanokompoziti, literatürdeki yönteme bazı değişikliklerle sentezlenmiştir (Liu vd., 2021). İlk olarak, 0,2 g BPAC/$CoFe_2O_4$, %50 (h/h) etanol içeren 50 mL'lik bir çözeltiye dağılmış ve karıştırılmıştır. 1,0 M HCl çözeltisinden 0.5 mL eklenmiş ve 10 dakika karıştırılmıştır. Ardından, 5,0 mmol $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ eklenmiş ve karıştırılmıştır. 0.5 g trimezik asit eklenerek karışım 10 dakika daha karıştırılmıştır. Bu karışım, Teflon kapta otoklavda 160 °C'de 12 saat süreyle ısıtılmıştır. Soğutulan numune, saf su ve etanol ile yıkandıktan sonra, 90 °C'de 10 saat kurutulmuştur. Bu işlemle son nanokompozit elde edilmiştir.

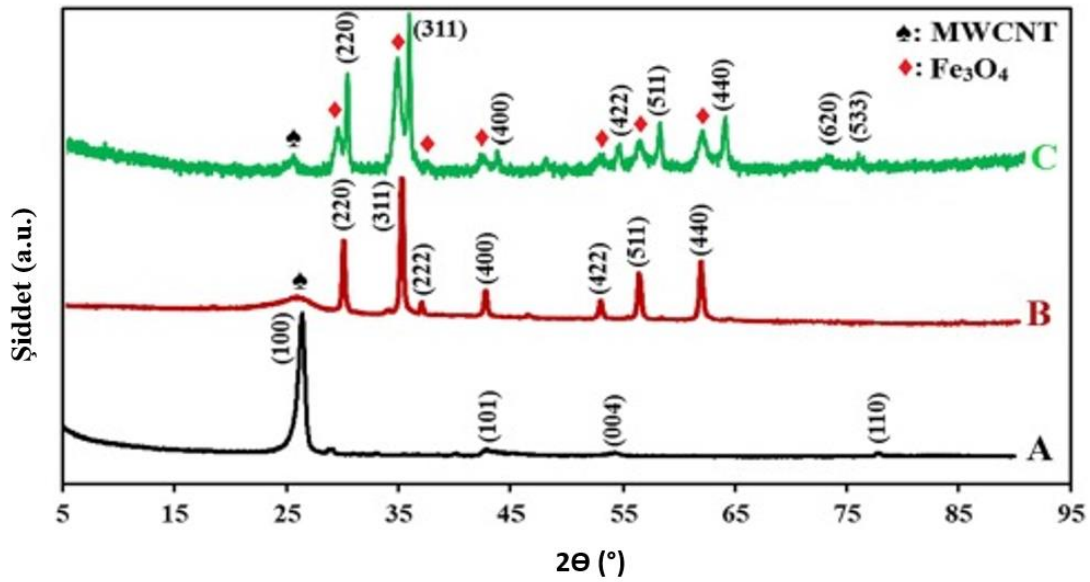
3. BULGULAR

3.1. ALP Etken MaddesineAit Bulgular

3.1.1. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini

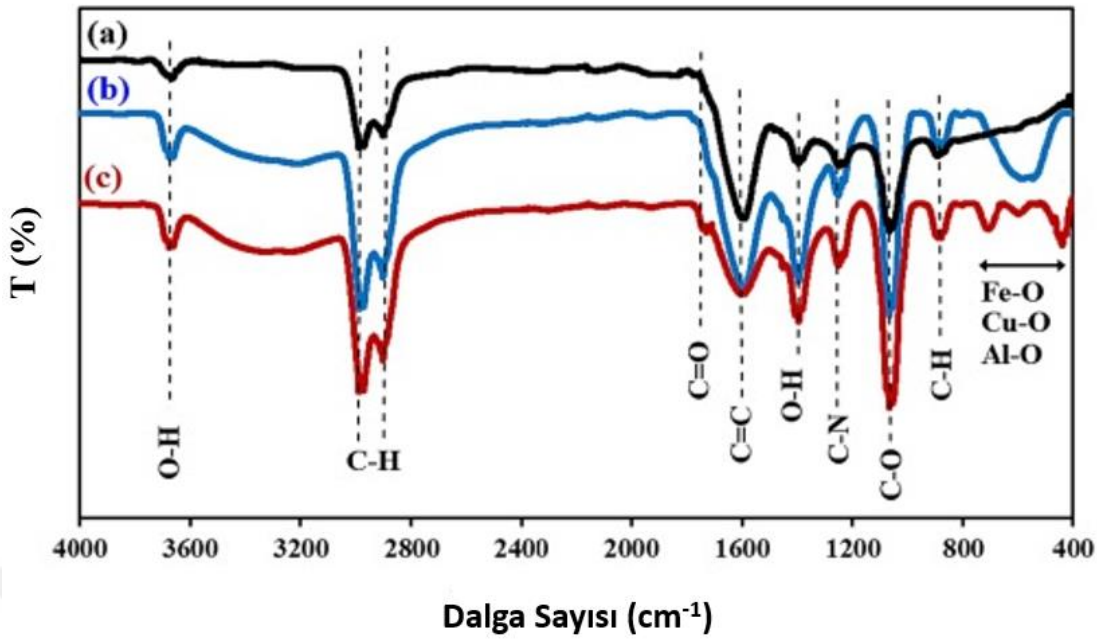
3.1.1.1. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ Karakterizasyonu

X-ışını kırınımı (XRD), kristal yapıya sahip malzemelerin yapısal analizinde önemli bir yöntemdir. Şekil 3.1'de yer alan XRD deseni, asitlerle fonksiyonlandırılmış MWCNT'ler XRD desenini göstermektedir. Desende, 26,28°'de belirgin bir kırınım pikinin yanı sıra, 42,70°; 54,61° ve 77,80°'de daha zayıf kırınım piki gözlemlenmektedir. Bu pikler sırasıyla (1 0 0); (1 0 1); (0 0 4) ve (1 1 0) kristal düzlemlerine karşılık gelmektedir ve MWCNT'lerde grafit benzeri bir yapının varlığını göstermektedir. Fonksiyonlandırma işleminin, MWCNT'lerin tübüler yapısında gözle görülür bir değişikliğe neden olmadığı dikkat çekicidir (Ahmed vd., 2023; Behnamian vd., 2022). Şekil 3.1.B, fonksiyonlandırılmış MWCNTs@Fe_3O_4 nanokompozitinin XRD desenini göstermektedir. Demir oksitlerin yaygın dört tipi olan manyetit (Fe_3O_4), maghemit (γ-Fe_2O_3), hematit (α-Fe_2O_3) ve goetit (FeO(OH))'in XRD desenleri dikkate alındığında, fonksiyonlandırılmış MWCNTs@Fe_3O_4 nanokompozitinin deseni, sırasıyla Fe_3O_4'e atfedilen (2 2 0); (3 1 1) ve (5 1 1) kristal düzlemleriyle ilişkili olarak 2θ = 30,06°; 35,44° ve 57,87°'de altı belirgin kırınım piki göstermektedir. Ayrıca, α-Fe_2O_3'e ait (4 0 0); (4 2 2) ve (4 4 0) düzlemleriyle ilişkili olan 2θ = 43,61°; 54,08° ve 63,40°'de de pikler gözlemlenmektedir. 2θ = 26,12°'deki bir pik ise fonksiyonlandırılmış MWCNT'lerin varlığını işaret etmektedir. MWCNTs@Fe_3O_4'ün XRD desenleri, literatürdeki önceki çalışmalarla tutarlılık göstermektedir (Loh vd., 2008; Zhuang vd., 2015). Şekil 1.3.C, MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ nanokompozitinin XRD desenini sunmaktadır. XRD analizi, $CuAl_2O_4$ fazının, özellikle alüminat spinel fazı (JCPDS 33-0448) olarak bilinen tek fazlı bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır. 2θ değerlerinde gözlemlenen başlıca kırınım pikleri; 31,31° (2 2 0); 37,12° (3 1 1); 44,08° (4 0 0); 55,40° (4 2 2); 59,74° (5 1 1); 65,45° (4 4 0); 74,77° (6 2 0) ve 77,80° (5 3 3) olup, bunlar Fd3m uzay grubuna sahip kübik spinel yapısına karşılık gelmektedir. Güçlü ve net bir şekilde tanımlanmış kırınım pikin varlığı, alüminat spinel yapısındaki uzun menzilli düzenin yüksek seviyede olduğunu göstermektedir. Ayrıca, XRD desenlerinde MWCNT ve Fe_3O_4 fazlarıyla ilişkili ek pikler de gözlemlenmektedir (Tangcharoen vd., 2018).



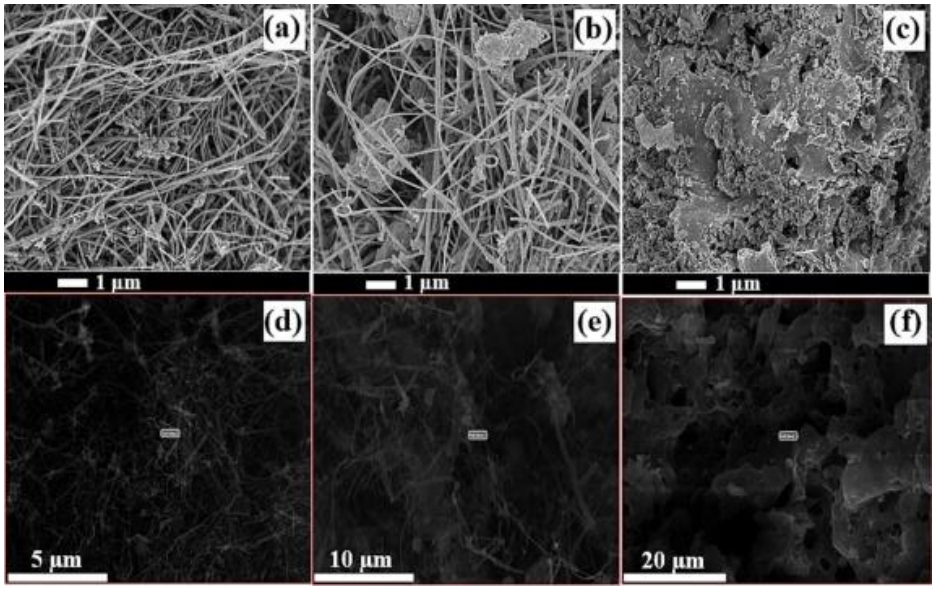
Şekil 3.1. MWCNT'lerin (A), MWCNTs@Fe_3O_4'ün (B) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün (C) nanomalzemelerinin XRD desenleri

Şekil 3.2, MWCNT (a), MWCNT@Fe_3O_4 (b) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ (c) nanomalzemelerinin IR spektrumlarını göstermektedir. Şekil 3.2.a'da, fonksiyonlandırılmış MWCNT'lere karşılık gelen karakteristik pikler gözlemlenmiştir. Bu pikler; 1067 cm^{-1} (C-O); 1608 cm^{-1} (C = C); 1730 cm^{-1} (C = O); 2988 cm^{-1} ve 2902 cm^{-1} (C-H); 3661 cm^{-1} ve 1394 cm^{-1}'dir (Castillo-Hernández vd., 2018). Ayrıca, 1250 cm^{-1}'de C-N gerilmesi ve 880 cm^{-1}'de C-H bükülmesi pikleri gözlemlenmiştir. İlgi çekici bir şekilde, yukarıda belirtilen tüm bu pikler, Şekil 3.2.b ve 3.2.c'de de mevcut olup, her iki nanokompozitte de fonksiyonlandırılmış MWCNT'lerin varlığını göstermektedir. Ayrıca, MWCNTs@Fe_3O_4 ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ nanokompozitlerinde, 712; 595 ve 436 cm^{-1}'deki pikler metal oksitlere (Fe-O, Cu-O ve Al-O) atfedilebilmektedir (Lv vd., 2009).



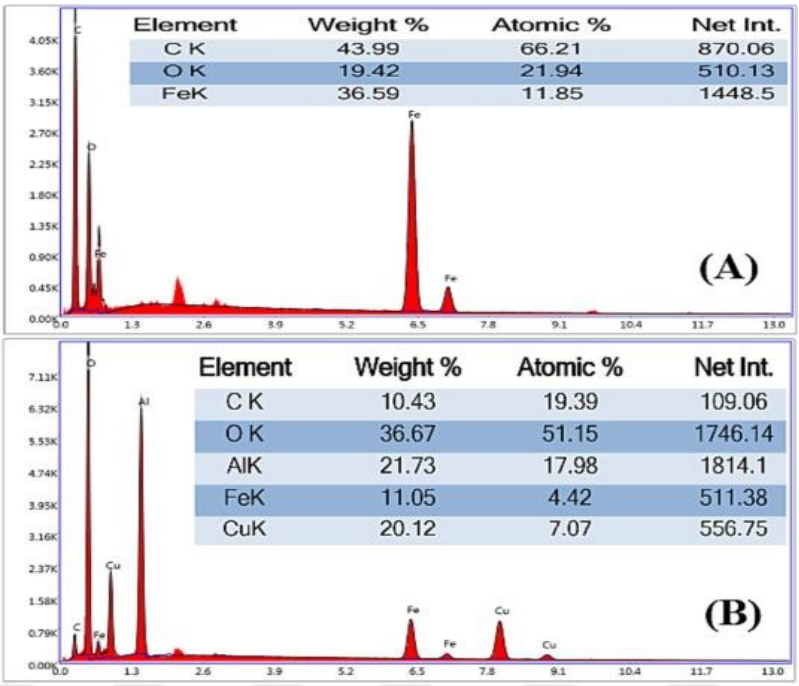
Şekil 3.2. MWCNT'lerin (a), MWCNTs@Fe_3O_4'ün (b) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün (c) nanomalzemelerinin FT-IR spektrumları

SEM ve SEM-EDX analizleri, sentezlenen nanokompozitlerin morfolojilerini incelemek için gerçekleştirilmiştir. MWCNT'ler, MWCNTs@Fe_3O_4 ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün SEM görüntüleri Şekil 3.3.a–c'de sunulmuştur. SEM gözlemleri, üç nanokompozit arasında belirgin farklılıklar ortaya koymaktadır (Ahmed vd., 2023). Ayrıca, Şekil 3.3.d–f yeni sentezlenen nanomalzemelerin SEM-EDX analizlerini göstermekte olup, bu malzemelerin yüzey morfolojileri hakkında bilgi sağlamaktadır.



Şekil 3.3. MWCNT'lerin (a & d), MWCNTs@Fe_3O_4'ün (b & e) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün (c & f) nanomalzemelerinin SEM görüntüleri ve SEM-EDX analizleri

MWCNTs@Fe_3O_4 ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün element bileşimleri sırasıyla Şekil 3.4.A ve 3.4.B'de gösterilmektedir. Elementlerin varlığı literatürle uyumludur ve önceki bulgularla örtüşmektedir.

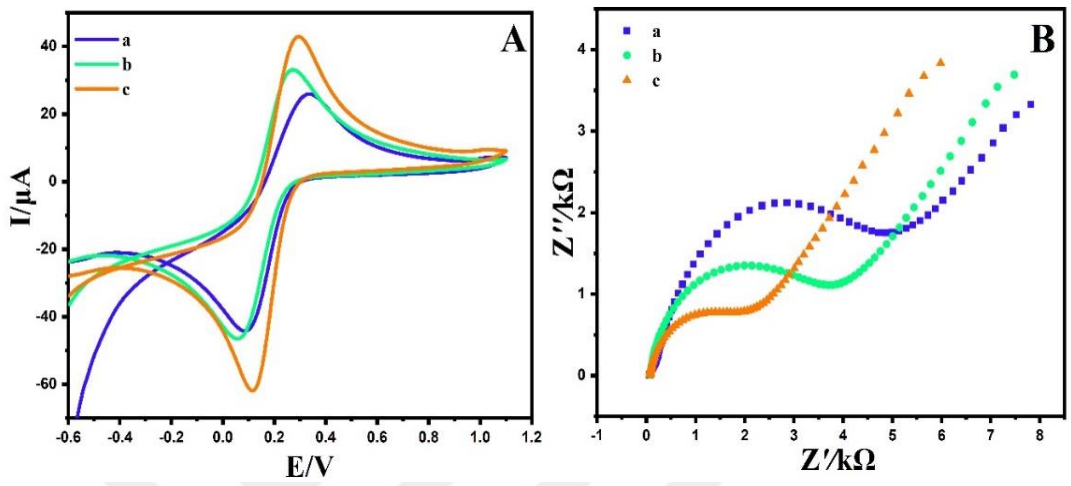


Şekil 3.4. MWCNTs@Fe_3O_4'ün (A) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'ün (B) elementel dağılımı

3.1.1.2. Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Bu çalışmada, 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi kullanılarak DV ve EIS deneyleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). İlk olarak, modifiye edilmemiş GCE üzerinde tipik anodik ve katodik pikler gözlemlenmiş ve ΔEp 234 mV olarak belirlenmiştir. Daha sonra, MWCNTs modifiye edilmiş GCE ile yapılan elektrokimyasal karakterizasyonlarda, çıplak GCE'ye kıyasla daha belirgin anodik ve katodik sinyaller elde edilmiştir. Bu artan elektrokimyasal aktivite, MWCNT'lerin yüksek redoks aktivitesi, iletkenliği ve geri dönüşümlü yapısına bağlanabilir. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ ile modifiye edilmiş elektrotların $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ varlığında yapılan voltamogramlarında, bu elektrotun çıplak GCE ve MWCNTs/GCE'ye kıyasla en yüksek elektrokimyasal aktiviteyi sergilediği gözlemlenmiştir. ΔEp çıplak GCE için 244 mV, MWCNTs/GCE için 202 mV ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE için 173 mV olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, GCE yüzeyine MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ eklenmesiyle elde edilen elektrokimyasal performansın artışını doğrulamaktadır.

EIS analizi, Rct'nin çıplak GCE'de 5,8 kΩ, MWCNTs/GCE'de 3,7 kΩ ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE'de 2,3 kΩ olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'nin GCE yüzeyine dahil edilmesinin elektriksel iletkenliği iyileştirdiğini ve redoks sürecindeki Rct değerini azalttığını ortaya koymaktadır.



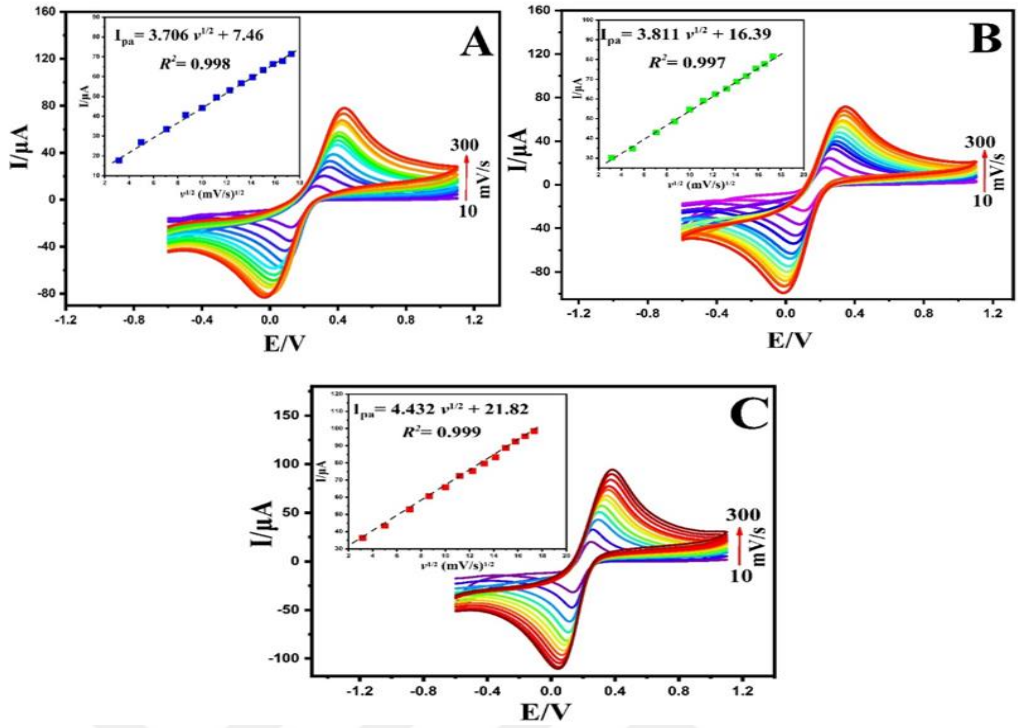
Şekil 3.5. (A); KCl (0,1 M) ve $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi (5,0 mM) içerisinde çıplak GCE (a), MWCNTs/GCE (b) ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE (c) DV (50,0 mV/s) ve (B); EIS grafikleri

Son olarak, çıplak GCE, MWCNTs/GCE ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE'nin elektrokimyasal aktif yüzey alanları, Randles-Sevcik denklemi (1) kullanılarak ve tarama hızının karekökü ile pik akımı arasındaki eğim analizi ile belirlenmiştir (Şekil 3.6). Elde edilen sonuçlara göre, çıplak GCE için 0,99 cm^2, MWCNTs/GCE için 1,028 cm^2 ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE için 1,2 cm^2 yüzey alanı bulunmuştur.

$$I = (2.69 \times 10^5)\, n^{\frac{3}{2}}\, A\, D^{\frac{1}{2}}\, v^{\frac{1}{2}}\, C_0 \qquad (1)$$

A, elektrot yüzey alanını (cm^2); D, difüzyon katsayısını (cm^2/s); n, elektron sayısını (n = 1); *v*, potansiyel tarama hızını (V/s); C_0 ise derişimi (mol/cm^3) göstermektedir.

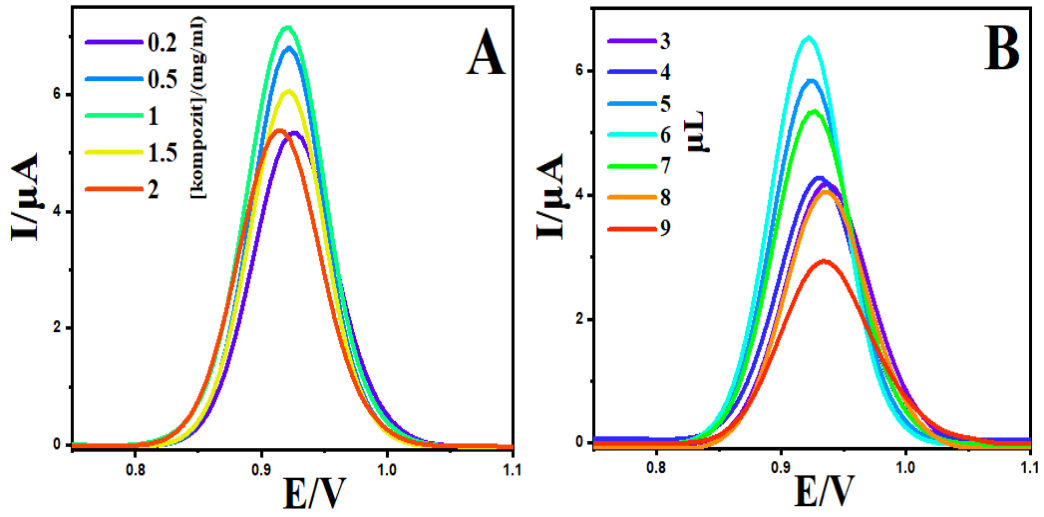
Bu bulgular, MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$'nin daha fazla reaksiyon bölgesi sağlayarak elektron transferini hızlandırdığını ve elektrot performansını önemli ölçüde artırdığını göstermektedir.



Şekil 3.6. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ve 0,1 M KCl içeren çözelti içerisinde farklı tarama hızlarında kaydedilen DV eğrileri: (A); çıplak GCE, (B); MWCNTs/GCE ve (C); MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE

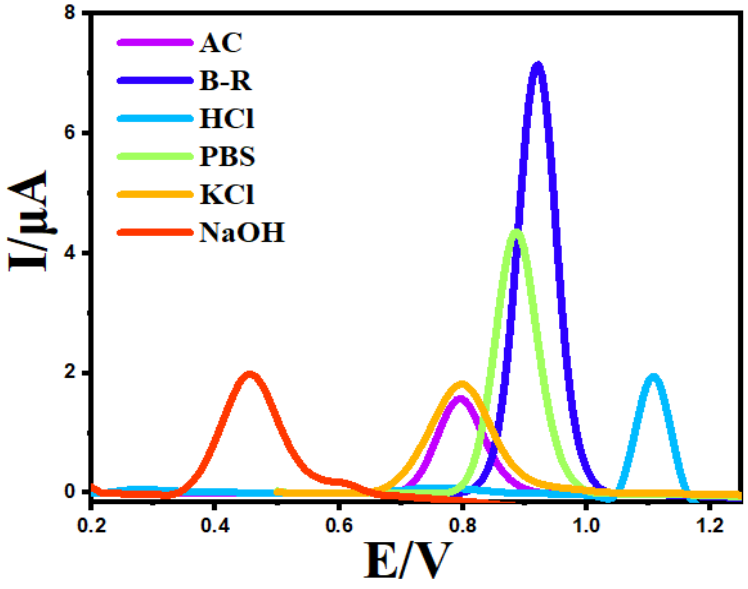
3.1.1.3. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

Farklı konsantrasyonlardaki MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ kompoziti (0,2-2,0 M) kullanılarak GCE modifikasyonu yapılmış ve ALP'nin elektro-oksidasyon akımında bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.7.A). Ancak, kompozit konsantrasyonu 1,0 M'nin üzerine çıktığında, önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu nedenle, ALP tayini için 1,0 M, en uygun kompozit konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Ayrıca, GCE yüzeyine 3,0–9,0 µL arasında değişen miktarlarda MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ kompoziti damlatılarak modifiye edilmiştir ve elektrokimyasal ölçümler 0,1 M Britton–Robinson (B-R) tampon çözeltisi (pH = 3,0) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.7.B'de gösterildiği üzere, kompozit miktarındaki artış 6 µL'ye kadar oksidasyon pik akımında önemli bir yükselmeye yol açmış, bu da yüzey alanı ve katalitik bölge sayısındaki artışı işaret etmiştir. Ancak kompozit miktarı daha da artırıldığında, ALP pik akımında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Bu optimize edilmiş parametreler altında geliştirilen elektrot, ALP tayini için yüksek duyarlılık ve seçicilik sergileyerek pratik uygulamalarda kullanılabilirliğini göstermektedir.



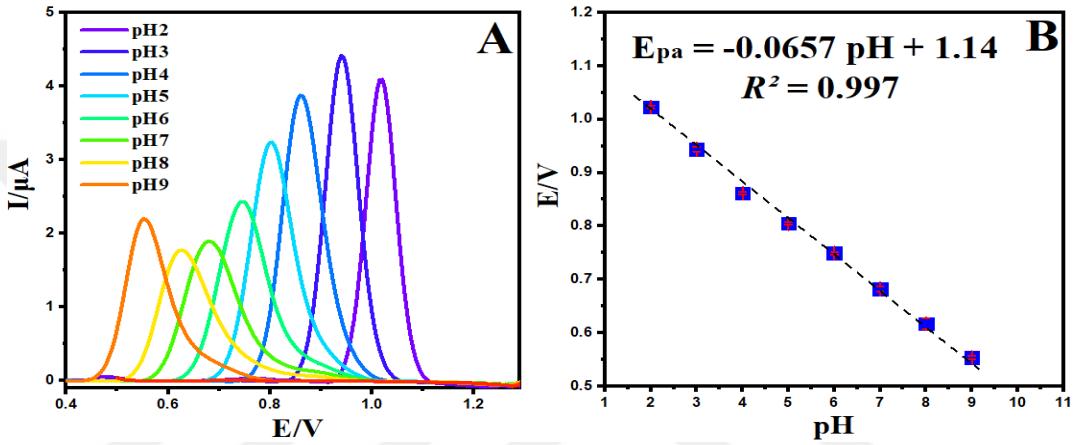
Şekil 3.7. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ kompozit konsantrasyonun (A) ve miktarının (B), 0,1 mM ALP'nin pik akımları üzerindeki etkisi

Destekleyici elektrolit ve pH seçimi, elektrokimyasal ölçümlerin doğruluğu ve güvenilirliği açısından kritik bir rol oynamaktadır. FT (pH = 3,0) , B-R (pH = 3,0), KCl (pH = 5,0), HCl (pH = 1,0), NaOH (pH = 10,0) ve AC (pH = 5,0) gibi çeşitli tampon çözeltilerinin etkileri incelenmiştir. Şekil 3.8, farklı destekleyici elektrolitlerle ALP'nin oksidasyon akımı ve potansiyel piki arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, 0,1 mM ALP varlığının hem akım hem de potansiyel piki üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle, incelenen tamponlar arasında en yüksek akım pikini B-R tamponu (pH = 3,0) elde etmiş olup, bu durum, ALP'nin önerilen elektrottaki elektro-analitik çalışmalar için en uygun elektrolit olarak B-R tamponunun seçilmesini sağlamıştır.



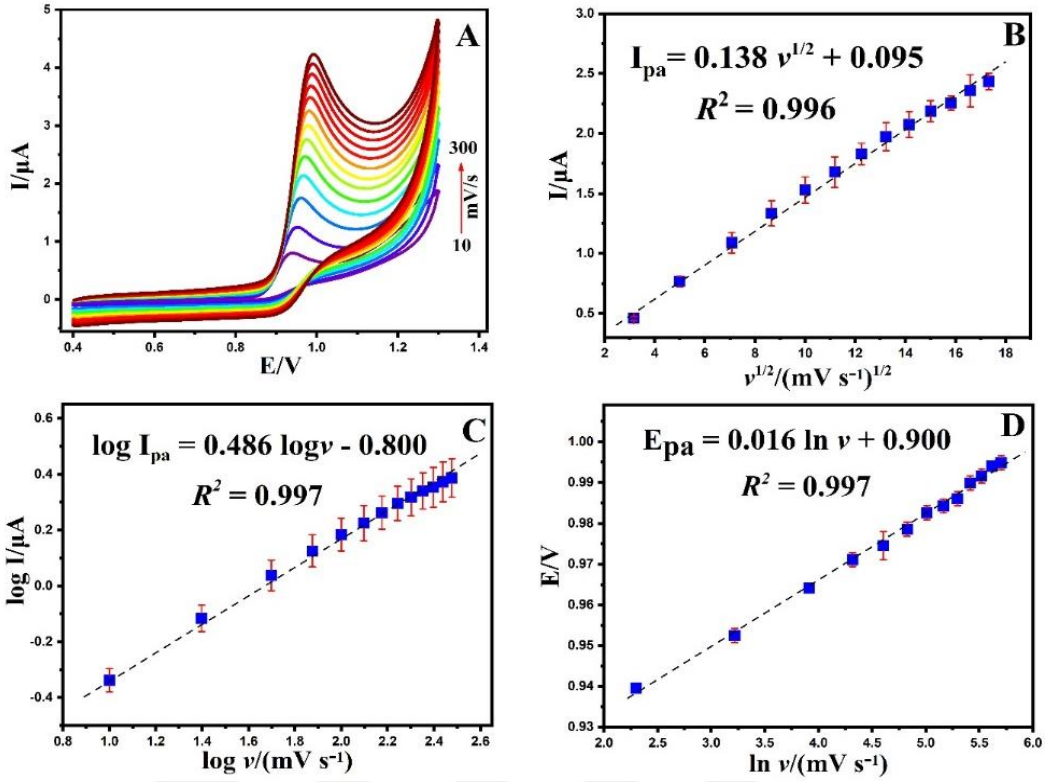
Şekil 3.8. Destek elektrolitinin, 0,1 mM ALP'nin pik akımları üzerindeki etkisi

Ayrıca, pH etkisini incelemek amacıyla, MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyinde 0,1 mM ALP'nin elektrokimyasal tepkimesi 2–9 pH aralığında araştırıldı (Şekil 3.9). Oksidasyon sürecinde daha negatif bir pik potansiyeli (Ep) kaydedilirken, ALP'nin en yüksek akımı pH 3,0'da gözlemlendi ve bu durum, ALP tayini için tüm sonraki elektrokimyasal deneyler için ideal pH olarak belirlendi. Şekil 3.9.B'de, oksidasyon pik potansiyeli ile çözeltinin pH'ı arasında yaklaşık 65 mV eğimle doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir; bu, teorik değerle (59 mV/pH) benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla, oksidasyon mekanizmasının proton ve elektron oranının eşit olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 3.9. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE kullanarak B-R (0,1 M) ve 0,1 mM ALP içeren çözeltide farklı pH seviyelerinde elde edilen DPV eğrileri (A), ve pik potansiyeli (Ep) ile pH değeri arasındaki ilişki (B)

ALP moleküllerinin elektrokimyasal davranışını değerlendirmek ve transfer edilen elektron sayısını belirlemek amacıyla, MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$ ile modifiye edilmiş GCE yüzeyinde DV analizleri gerçekleştirilmiştir. ALP'ye ait voltamogramlar, 10–300 mV/s aralığında uygulanan farklı tarama hızlarında kaydedilmiş ve karakteristik voltametrik yanıtlar gözlemlenmiştir (Şekil 3.10.A). Özellikle, pik akımının tarama hızının artmasıyla birlikte belirgin şekilde yükseldiği, ayrıca pik akımı ile tarama hızının karekökü arasında güçlü bir doğrusal ilişki (R^2 = 0,996) bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.10.B). Bu ilişki aşağıdaki regresyon denklemiyle tanımlanmıştır: log (IµA) = 0,138 $\upsilon^{1/2}$ (mV s^{-1}) + 0,095; R^2 = 0,996. Bu bulgu, elektrokimyasal sürecin difüzyon kontrollü bir mekanizmaya uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, log(IµA) ile log(υ) arasındaki grafikten elde edilen regresyon denklemi: log (IµA) = 0,486 log(υ) – 0,80; R^2 = 0,997 olup (Şekil 3.10.C), bu denklemdeki eğim değeri (~0,486), teorik olarak difüzyon kontrollü sistemler için beklenen 0,5 değerine oldukça yakın bulunmuştur. Elde edilen veriler, ALP'nin MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE elektrot yüzeyinde difüzyon kontrollü bir elektrokimyasal süreç sergilediğini açıkça ortaya koymaktadır.



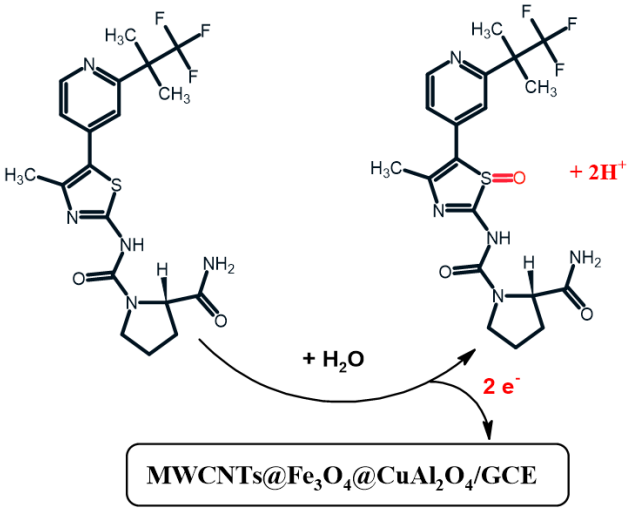
Şekil 3.10. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE elektrotu üzerinde, B–R tampon çözeltisi (0,1 M, pH 3,0) içerisinde 0,1 mM ALP varlığında farklı tarama hızlarında elde edilen (A) DV eğrileri, (B) Ipa ile $\upsilon^{1/2}$, (C) log Ipa ile log υ ve (D) Epa ile ln υ grafikleri

ALP'nin MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyindeki elektrokimyasal oksidasyon sürecine katılan elektron sayısı, Laviron denkleminden (2) yararlanılarak ve anodik pik potansiyeli (Epa) ile tarama hızının doğal logaritması (ln υ) arasındaki ilişkinin eğimi analiz edilerek hesaplanmıştır (Şekil 3.10.D).

$$E_{pa} = E^{\circ} + \left(\frac{RT}{\alpha nF}\right)\ln\left(\frac{RTK^{\circ}}{\alpha nF}\right) + \left(\frac{RT}{\alpha nF}\right)\ln v \qquad (2)$$

Burada, E° formal redoks potansiyelini, α yük transfer katsayısını, n elektron sayısını, k° standart heterojen hız sabitini ve υ ise tarama hızını ifade etmektedir.

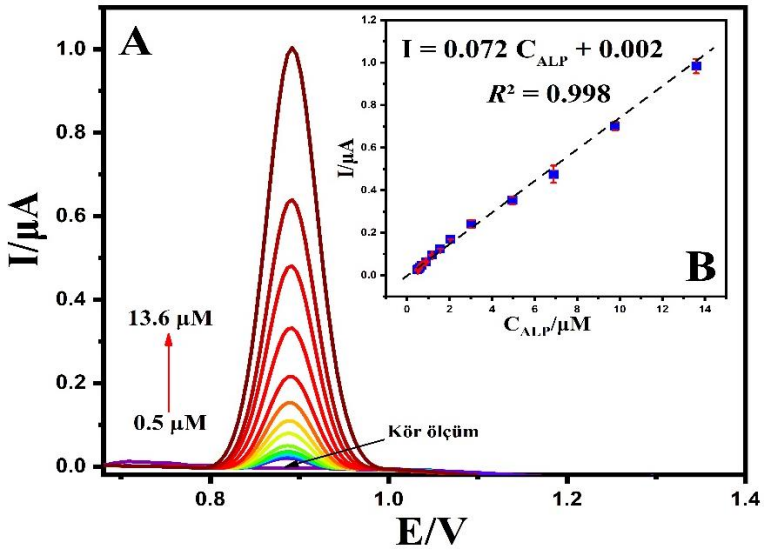
Elde edilen bulgular, ALP'nin elektro-oksidasyon sürecinde iki elektronun transfer edildiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, pH tarama çalışmaları ile birlikte değerlendirildiğinde, bu sonuçlar ALP'nin elektrokimyasal oksidasyon mekanizmasının iki elektron ve iki protonun transferini içerdiğine işaret etmektedir. ALP'nin MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyinde gerçekleşen önerilen oksidasyon mekanizması Şekil 3.11'de sunulmaktadır (Moghaddam vd., 2021).



Şekil 3.11. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyinde, ALP'in olası elektro-oksidasyon mekanizması

3.1.1.4. Modifiye Edilmiş Sensörün Analitik Performansının Değerlendirilmesi

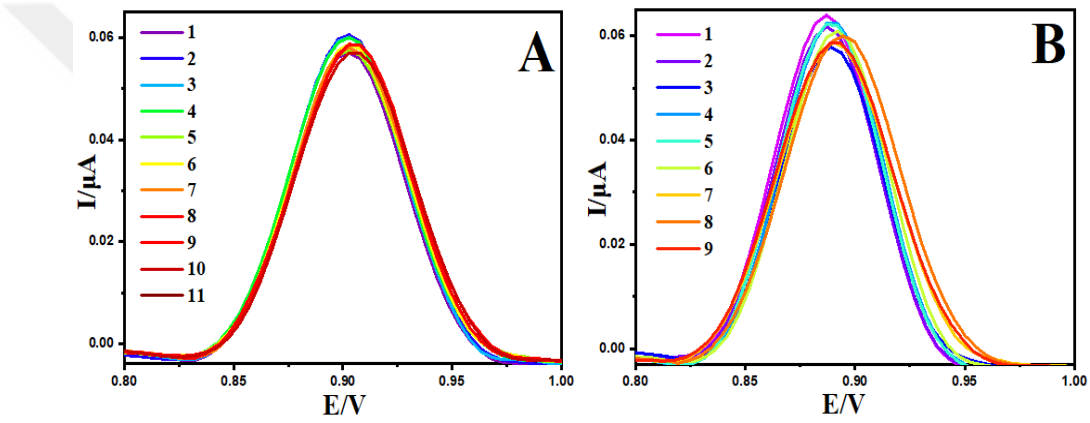
MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE için farklı ALP konsantrasyonlarında DP voltamogramları elde edildi ve bulgular Şekil 3.12'de sunuldu. ALP oksidasyon akımı, 0,5-13,6 µM aralığında konsantrasyona bağlı olarak doğrusal bir artış gösterdi ve MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyinde şu denklemle ifade edildi: Ipa = 0,072 C_{ALP} + 0,002 (R^2 = 0,998). TS ve TAS şu formüller kullanılarak belirlendi: TS = 3 s/m ve TAS = 10 s/m. TS ve TAS değerleri sırasıyla 0,036 µM ve 0,12 µM olarak belirlendi. Bu sonuçlar, geliştirilen sensörün hassasiyeti hakkında değerli bilgiler sunmaktadır.



Şekil 3.12. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyinde B-R tamponunda (0,1 M, pH 3,0) 0,5-13,6 µM ALP'nin DPV eğrileri (A) ve Ipa ile ALP konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren grafik (B)

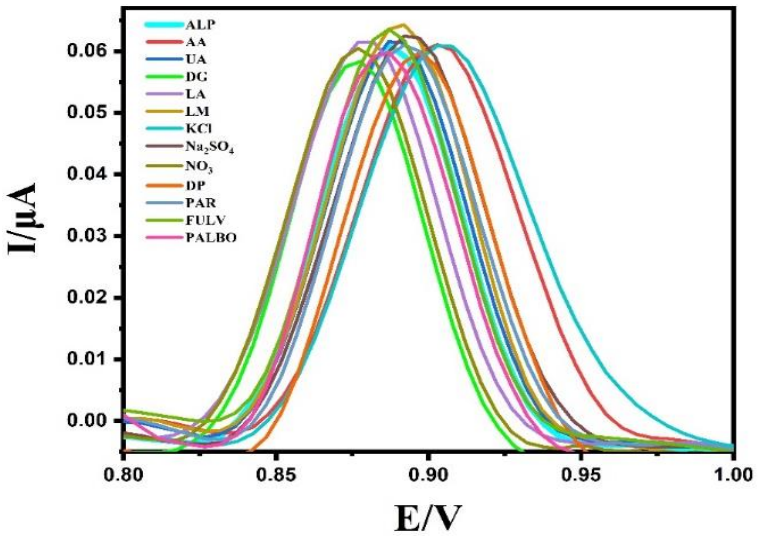
Geliştirilen MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE elektrodunun tekrarlanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, aynı koşullarda gerçekleştirilen 11 ardışık voltametrik döngü sonucunda elde edilen pik akım değerleri üzerinden %BSS değeri hesaplanmıştır (Şekil 3.13.A). Elde edilen %BSS değeri 2,33 olarak bulunmuş olup, bu sonuç geliştirilen elektrotun yüksek düzeyde tekrarlanabilir bir sinyal üretme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE elektrodunun yeniden üretilebilirliğini değerlendirmek amacıyla, aynı koşullar altında dokuz ayrı elektrot hazırlanarak her biri için DPV ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.13.B). Elde edilen pik akım değerlerine ait %BSS 2,86 olarak hesaplanmıştır. Bu düşük BSS, geliştirilen elektrotun yüksek düzeyde yeniden üretilebilir bir sinyal elde etme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.13. B-R tamponunda (pH 3,0) MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE üzerinde 1,0 µM ALP'nin tekrarlanabilirliği (A) ve tekrar üretilebilirliği (B)

Geliştirilen modifiye sensörün yüksek düzeyde tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirliğe sahip olmasının yanı sıra, hedef analite karşı seçicilik göstermesi de kritik bir özelliktir. Bu bağlamda, sensörün seçiciliğini değerlendirmek amacıyla, gerçek örneklerde yaygın olarak bulunan çeşitli girişim yapabilecek bileşikler elektrokimyasal hücreye ilave edilmiştir (Şekil 3.14). İncelenen potansiyel girişimciler arasında askorbik asit, ürik asit, D-glukoz, L-arginin, L-metiyonin, potasyum klorür, sodyum sülfat, sodyum nitrat, dopamin ve parasetamol yer almaktadır. Bu maddelerden büyük çoğunluğu ALP'ye kıyasla 1000 kat daha yüksek konsantrasyonlarda, askorbik asit, parasetamol, dopamin, fulvestrant ve palbosiklib ise 100 kat daha yüksek düzeylerde test edilmiştir. Oksidasyon pik akımındaki değişim oranlarının %5'in altında kalması, bu maddelerin ALP'ye ait voltametrik yanıt üzerinde belirgin bir girişim oluşturmadığını göstermektedir. Bu bulgular, geliştirilen MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE elektrotun ALP tayininde yüksek seçicilik sunduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 3.14. B-R tamponunda (pH 3,0) MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE üzerindeki 1,0 μM ALP'nin seçiciliği

3.1.1.5. Tablet Formuna, İdrar, ve Ticari Plazma Numunelerine Uygulanması

MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE elektrotunun ALP'nin eklenmiş örneklerdeki kantitatif tayin performansını ve güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla, standart ekleme yöntemi kullanılarak insan plazması, idrar ve tablet örneklerinde analiz gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.1, elde edilen kalibrasyon verilerini sunmaktadır. Elde edilen bulgular, geri kazanım oranlarının %98,57 ile %102,63 arasında değiştiğini ve BSS değerlerinin %3'ün altında olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, geliştirilen sensörün hem doğruluk hem de hassasiyet açısından tatmin edici bir performans sergilediğini ortaya koymaktadır.

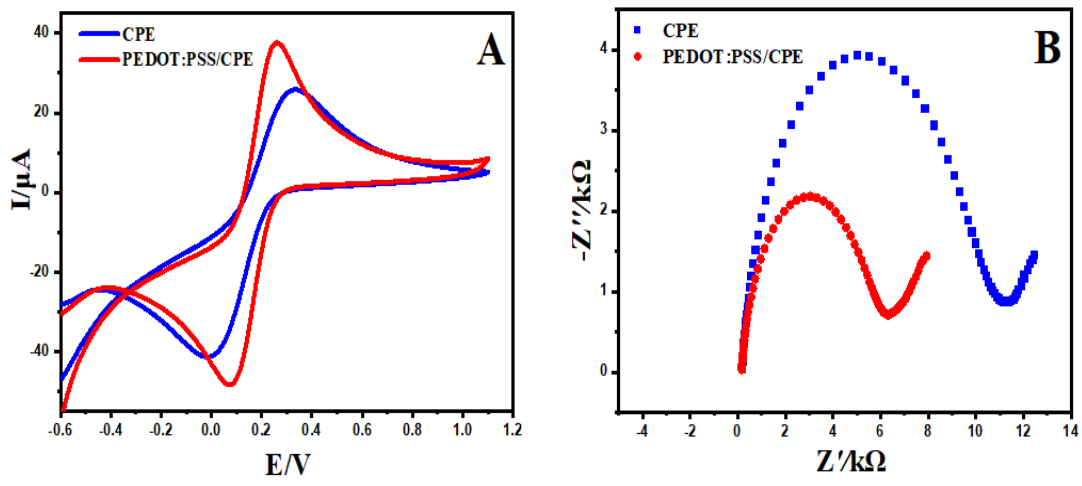
Çizelge 3.1. MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/GCE yüzeyinde, tablet, idrar ve ticari plazma numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları

Numune	Derişim (μM)	Bulunan derişim (μM)	BSS (%) (n = 3)	Geri Kazanım (%)
Ticari Plazma	2,0	1,99	2,82	99,82
	4,0	4,12	2,24	98,57
	8,0	8,18	2,27	102,25
İdrar	6,0	6,13	0,17	102,17
	8,0	8,09	0,22	101,09
	10,0	10,26	1,49	102,63
Tablet	6,0	6,05	0,99	100,89
	8,0	7,95	0,49	99,42
	10,0	9,98	1,73	99,7

3.1.2. PEDOT:PSS/CPE Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini

3.1.2.1. Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

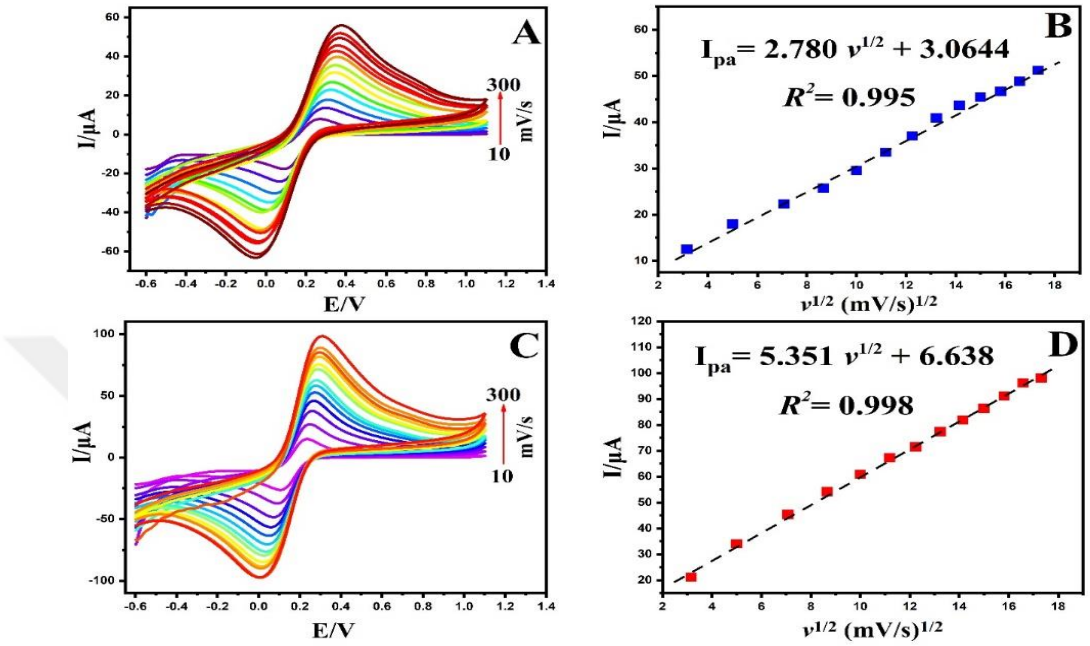
PEDOT ile modifiye edilmiş CPE'nin elektrokimyasal özellikleri, 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ve 0,1 M KCl içeren destek elektrolit ortamında DV yöntemiyle kapsamlı şekilde incelenmiştir. Şekil 3.15(A)'da sunulan voltamogramlar, PEDOT modifikasyonunun ardından anot ve katot pik akımlarında belirgin bir artış meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ redoks çift sistemi için çıplak CPE'de elde edilen ΔEp değeri 0,31 V iken, PEDOT ile modifiye edilmiş CPE'de bu değerin 0,17 V'ye düştüğü gözlemlenmiştir. Bu azalma, elektrot yüzeyinde elektron transfer kinetiğinin iyileştiğini ve elektrokatalitik etkinliğin arttığını göstermektedir. Yüzeydeki yük transfer özelliklerini ve sensörlerin iletkenlik performansını daha ayrıntılı olarak değerlendirmek amacıyla EIS analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.15(B)'de gösterilen Nyquist diyagramları, çıplak CPE ve PEDOT/CPE sistemleri için elde edilen yarı daire çapları temelinde, CPE > PEDOT/CPE sıralamasını ortaya koymuştur. Elde edilen Rct değerleri sırasıyla 6,5 kΩ ve 3,2 kΩ olarak belirlenmiştir. Bu azalma, modifiye yüzeyde yük taşıyıcılarının iletiminde önemli bir artış olduğunu, dolayısıyla iletkenliğin geliştiğini ve yük transferinin daha verimli hale geldiğini göstermektedir.



Şekil 3.15. KCl (0,1 M) ve $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi (5,0 mM) içerisinde çıplak CPE, ve PEDOT:PSS/CPE elektrotlarının (A); DV (50,0 mV/s) ve (B); EIS grafikleri

Ayrıca, elektrot yüzeyinin efektif aktif alanı, Randles-Sevcik denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu hesaplama, 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilen döngüsel voltametri ölçümlerine dayanarak yapılmıştır. Ipa ile $\upsilon^{1/2}$ arasındaki doğrusal ilişkiye ait grafiğin eğiminden yararlanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda, çıplak

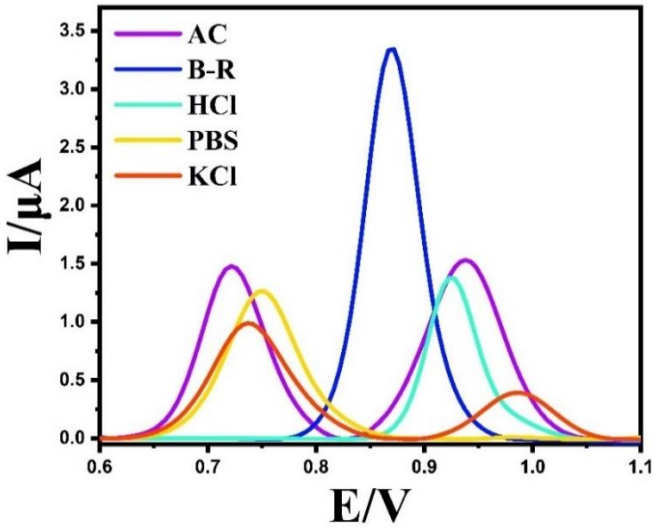
CPE'nin aktif yüzey alanı 0,079 cm², PEDOT ile modifiye edilmiş CPE'nin ise 0,154 cm² olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.16). Elde edilen bu değerler, PEDOT modifikasyonunun yüzey alanını yaklaşık iki kat artırdığını ve bu durumun ALP'nin elektrokimyasal oksidasyonuna yönelik yüzeyde daha fazla aktif bölge sağladığını açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 3.16. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde, çıplak CPE (A,B) ve PEDOT:PSS/CPE (C,D) elektrotlarında farklı tarama hızlarında kaydedilen DV eğrileri

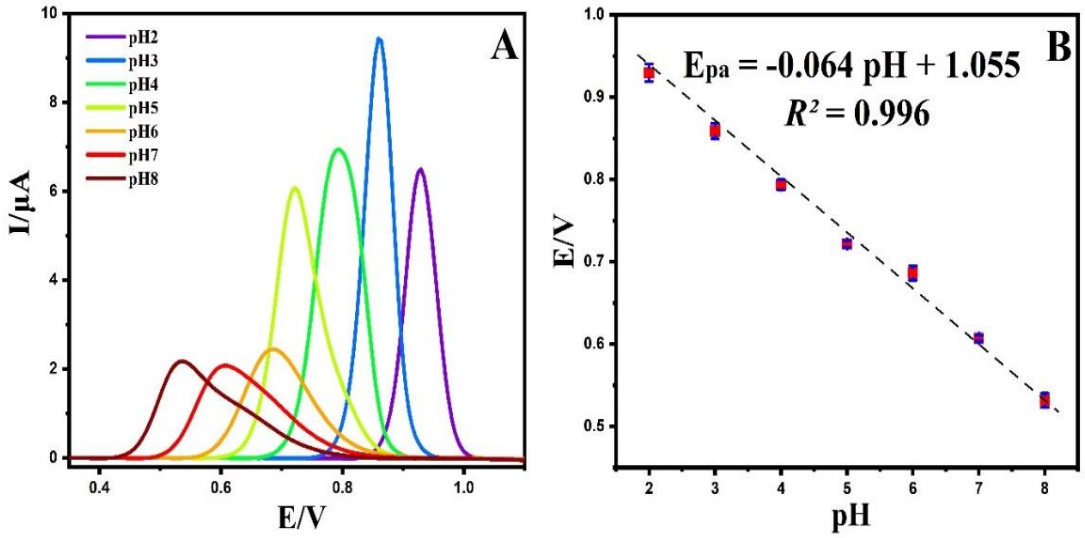
3.1.2.2. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

Farklı tampon çözeltileri, AC, KCl, FT, NaOH, HCl ve B-R dahil olmak üzere kapsamlı bir analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ALP varlığının hem akım hem de potansiyel piki üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 3.17). Değerlendirilen çeşitli tamponlar arasında, B-R çözeltisi belirgin akım piki ile en yüksek etkinliği göstermiştir.



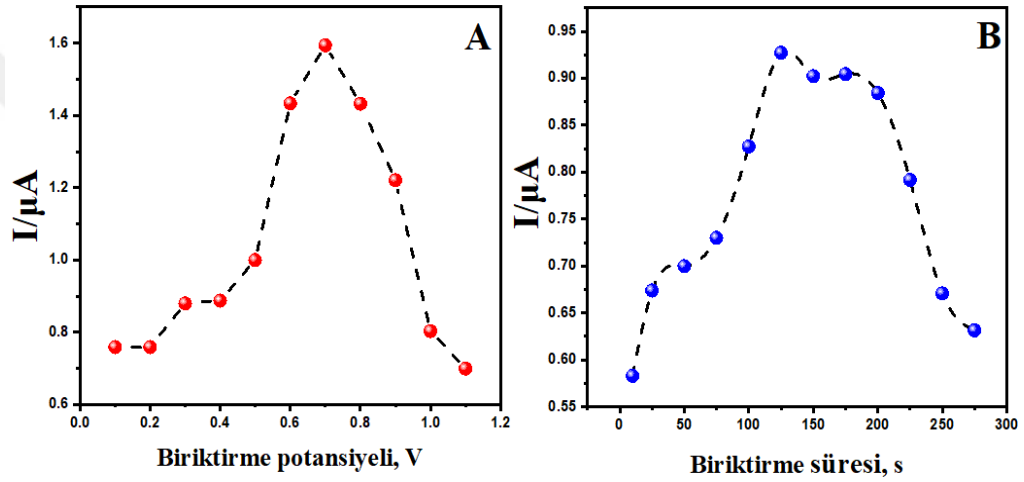
Şekil 3.17. Destekleyici elektrolitinin, 0,01 mM ALP'nin yükseltgenme pik akımları üzerindeki etkisi

ALP'nin elektrokimyasal oksidasyon davranışı, pH 2,0–8,0 aralığında PEDOT/CPE elektrotu üzerinde sistematik olarak incelenmiştir (Şekil 3.18). Oksidasyon pik potansiyelinin pH artışıyla birlikte negatif yönde kaydığı gözlemlenmiş ve bu kayma, pH'a karşı çizilen grafikte 64,0 mV/pH eğimi ile ifade edilmiştir. Elde edilen eğim değeri, elektron ve proton transferlerinin redoks mekanizmasına eşit oranda katıldığını gösteren teorik eğime oldukça yakın olup (Şekil 3.18.B), ALP'nin elektrokimyasal oksidasyonunun proton-destekli bir süreç olduğunu desteklemektedir. Öte yandan, pik akım değerleri pH 2,0'dan 3,0'a kadar artış göstermiş; bu değerin üzerinde ise belirgin bir azalma eğilimi sergilemiştir. Bu durum, pH 3,0 koşulunun ALP oksidasyonu açısından optimal ortamı sağladığını ve sonraki analizlerde bu pH değerinin tercih edilmesi gerektiğini açık bir biçimde ortaya koymaktadır.



Şekil 3.18. PEDOT:PSS/CPE kullanarak B-R (0,1 M) ve 0,1 mM ALP içeren çözeltide farklı pH seviyelerinde elde edilen DPV eğrileri (A), ve pik potansiyeli (Ep) ile pH değeri arasındaki ilişki (B)

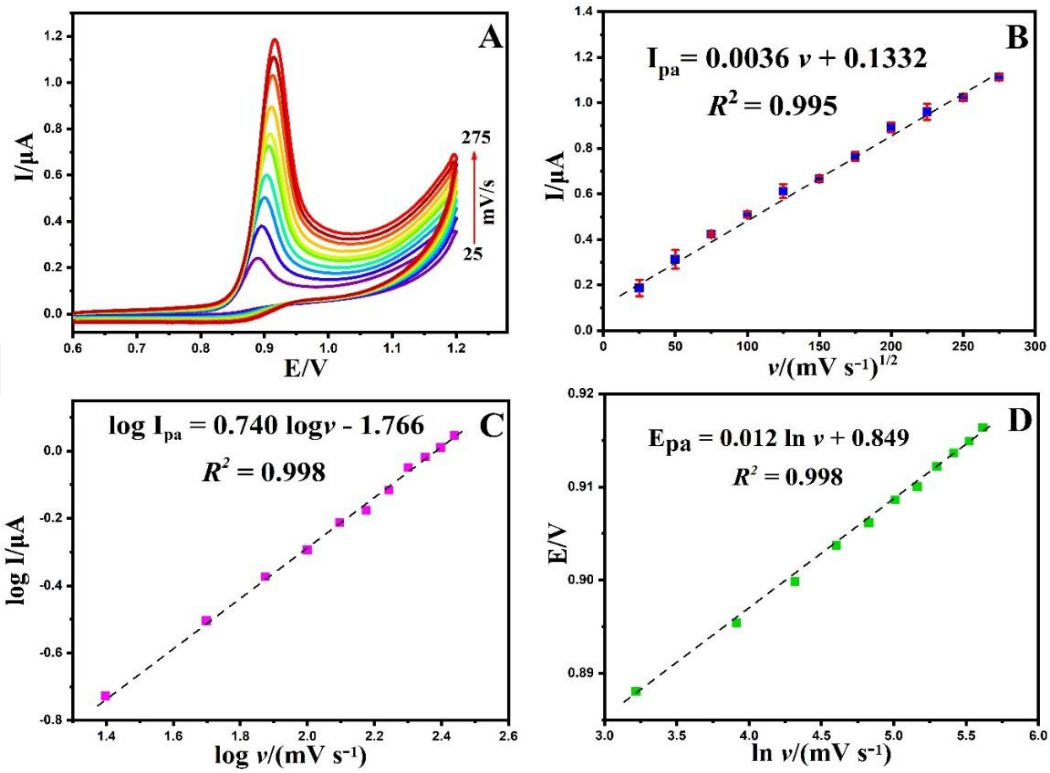
Şekil 3.19(A), farklı biriktirme potansiyellerinin ALP'nin oksidasyon pik akımı üzerindeki etkilerini ayrıntılı olarak göstermektedir. Biriktirme potansiyel işlemi sırasında uygulanan potansiyel 0,1–0,7 V aralığında arttıkça, pik akımında anlamlı bir yükselme gözlemlenmiş; ancak bu değerin ötesindeki 0,7–1,1 V aralığında ise akımda kademeli bir azalma meydana gelmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, 0,7 V biriktirme potansiyeli en uygun değer olarak belirlenmiştir. Öte yandan, biriktirme süresinin etkisini değerlendirmek amacıyla 10 ila 275 saniye arasında değişen süreler incelenmiştir. Şekil 3.19(B)'de görüldüğü üzere, biriktirme süresi arttıkça pik akımı da belirli bir süreye kadar artış göstermiş; yaklaşık 125 saniyeden sonra ise düşüş eğilimi sergilemiştir. Bu nedenle, biriktirme süresi açısından optimum koşulun 125 saniye olduğu sonucuna varılmıştır.



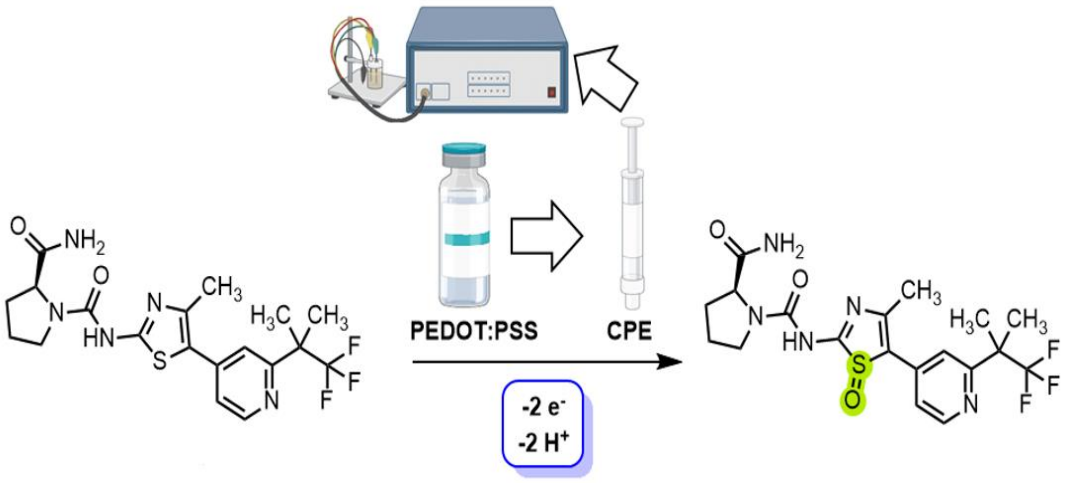
Şekil 3.19. PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde 0,01 mM ALP'nin pik akımı üzerindeki (A) biriktirme potansiyelinin, ve (B) biriktirme süresinin etkisi

ALP'nin elektrokimyasal mekanizmasına dair derinlemesine bilgi sağlamak amacıyla tarama hızı çalışması yapılmıştır. Bu araştırma kapsamında, 0,01 mM ALP içeren çözeltinin PEDOT/CPE yüzeyinde, 25 ile 275 mV/s arasındaki tarama hızlarında DV ile incelenmiştir. Tarama hızının (υ), B-R elektroliti (0,1 M) ve pH 3,0 ortamında ALP'nin oksidasyon akımları üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Şekil 3.20(A) gösterdiği gibi, ALP ile ilişkili Ipa, tarama hızı ile orantılı olarak belirgin bir şekilde artmaktadır. Şekil 3.20(B) de, oksidasyon akımları ile tarama hızları arasında güçlü bir doğrusal ilişki bulunduğunu göstermektedir, bu da ALP'nin elektrokimyasal sürecinin adsorpsiyon kontrollü bir mekanizmayla gerçekleştiğini işaret etmektedir. Ayrıca, tarama hızının logaritması ile pik akımının logaritmasının grafiksel ilişkilendirilmesiyle elde edilen doğrusal denklem ($\log (I) = 0{,}740 \log \upsilon - 1{,}766$; $R^2 = 0{,}998$), adsorpsiyonla kontrol edilen bir reaksiyon sürecine dair önemli bir gösterge sunmaktadır (Şekil 3.20(C)). Laviron'un denklemi kullanılarak yapılan hesaplamalar, ALP'nin oksidasyon sürecinde tam olarak 2 elektron transferi gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, pH tarama

çalışmaları ile birlikte değerlendirildiğinde, bu sonuçlar ALP'nin elektrokimyasal oksidasyon mekanizmasının iki elektron ve iki protonun transferini içerdiğine işaret etmektedir. ALP'nin PEDOT/CPE yüzeyinde gerçekleşen önerilen oksidasyon mekanizması Şekil 3.21'de sunulmaktadır (Moghaddam vd., 2021).



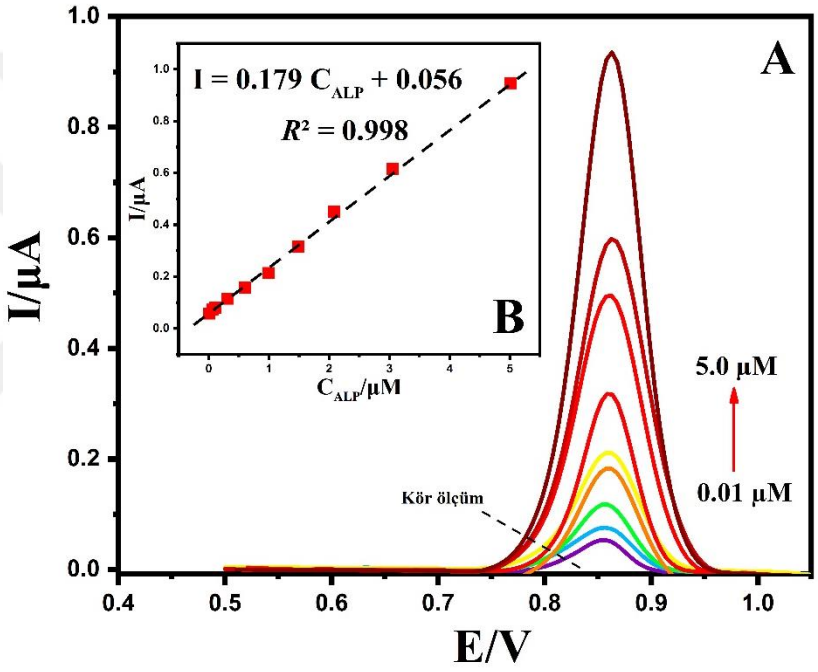
Şekil 3.20. Farklı tarama hızlarında, B-R tamponunda (0,1 M, pH 3,0) 0,01 mM ALP'nin dönüşümlü voltametri eğrileri (A), Ipa ile $\upsilon^{1/2}$ arasındaki ilişki (B), log Ipa ile log υ grafiği (C) ve Epa ile ln υ grafiği (D) PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde



Şekil 3.21. PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde, ALP'in olası elektro-oksidasyon mekanizması

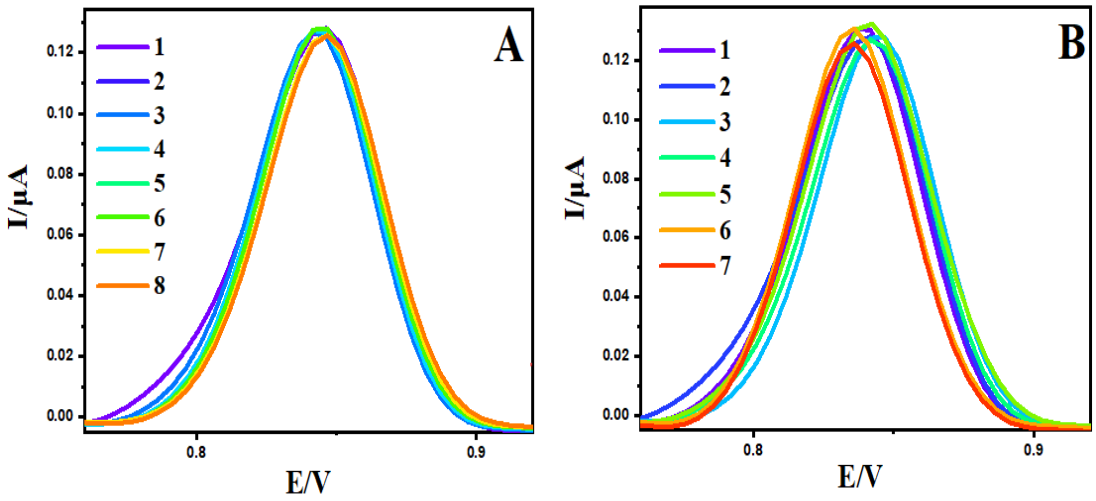
3.1.2.3. Modifiye Edilmiş Sensörün Analitik Performansının Değerlendirilmesi

PEDOT/CPE üzerindeki ALP için kalibrasyon grafiği, optimum deneysel koşullar altında DPV tekniği kullanılarak pH 3'te oluşturulmuştur (Şekil 3.22). 0,01–5,0 µM aralığında ALP konsantrasyonunu belirlemek için başarılı bir şekilde lineer bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen lineer denklem şu şekilde ifade edilebilir: Ipa = 0,179C + 0,056; R^2 ise 0,998 olarak bulunmuştur. TS 4,8 nM ve TAS ise 16 nM olarak belirlenmiştir. PEDOT/CPE tabanlı sensör, dikkate değer bir lineer aralık ve önemli ölçüde azaltılmış bir TS sergileyerek, ALP'nin doğru ve hassas bir şekilde ölçülmesi potansiyelini vurgulamaktadır.



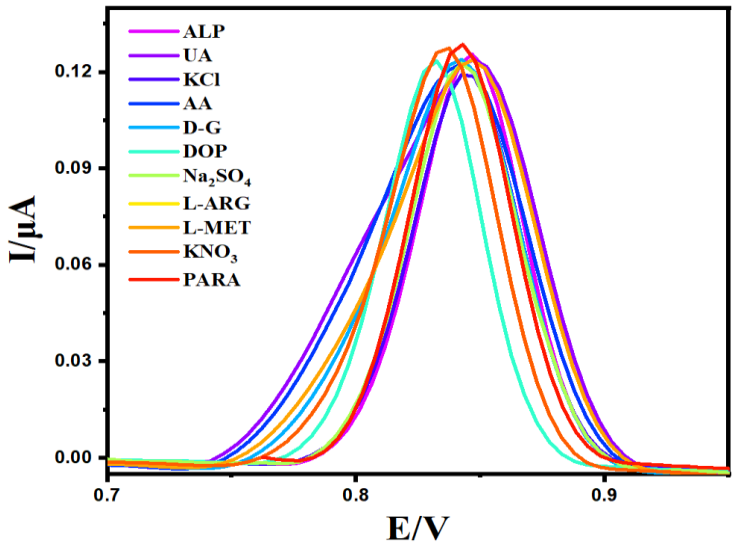
Şekil 3.22. PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde B-R tamponunda (0,1 M, pH 3,0) 0,01-5,0 µM ALP'nin DPV eğrileri (A) ve Ipa ile ALP konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren grafik (B)

PEDOT/CPE sisteminin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, 1 µM ALP içeren bir çözelti üzerinde art arda sekiz DPV ölçümü gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.23.A). Elde edilen oksidasyon akımlarının BSS değeri %2,04 olarak hesaplanmıştır. Bu bulgu, geliştirilen elektrotun yüksek düzeyde tekrarlanabilirlik sergilediğini göstermektedir. Ayrıca, PEDOT/CPE'nin yeniden üretilebilirliği ve uzun vadeli stabilitesi, gün içi ve günler arası analizlerle incelenmiştir. Gün içi analizlerde, aynı gün içinde aynı yöntemle hazırlanan yedi bağımsız elektrot kullanılmış ve elde edilen BSS değeri %2,13 olarak bulunmuştur (Şekil 3.23.B). Bu sonuçlar, PEDOT/CPE'nin güvenilir ve yeniden üretilebilir bir sensör platformu olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 3.23. B-R tamponunda (pH 3,0) PEDOT:PSS/CPE üzerinde 1,0 µM ALP'nin tekrarlanabilirliği (A) ve tekrar üretilebilirliği (B)

PEDOT/CPE sisteminin ALP tespitindeki seçiciliğini değerlendirmek amacıyla, yaygın girişim yapan maddelerin varlığında kapsamlı bir analiz gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, 1 µM ALP içeren standart bir çözeltiye, 1000 kat fazla konsantrasyonda çeşitli girişim yapan bileşikler eklenmiştir. İncelenen maddeler arasında ürik asit (UA), potasyum klorür (KCl), askorbik asit (AA), D-glukoz (D-G), dopamin (DOP), sodyum sülfat (Na_2SO_4), L-arginin (L-ARG), L-metiyonin (L-MET), potasyum nitrat (KNO_3) ve parasetamol (PARA) yer almaktadır. Şekil 3.24'te sunulan bulgular, bu bileşiklerin ALP'nin oksidasyon pik akımı üzerinde anlamlı bir girişime neden olmadığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen elektrokimyasal platformun, yaygın girişim yapan türlerin varlığında dahi ALP'yi seçici ve güvenilir bir şekilde tespit edebildiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 3.24. B-R tamponunda (pH 3,0) PEDOT:PSS/CPE üzerindeki 1,0 µM ALP'nin seçiciliği

3.1.2.4. Tablet Formuna, İdrar ve Ticari Plazma Numunelerine Uygulanması

PEDOT/CPE'nin gerçek örneklerde ALP tespiti için pratik uygulanabilirliğini ve güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla, geliştirilen elektrot insan plazması, insan idrarı ve tablet formülasyonlarının analizi için uygulanmıştır. Bu analizler, standart ekleme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2'de sunulan veriler, iyileşme oranlarının %96,69 ile %101,31 arasında değiştiğini açıkça ortaya koymaktadır. Gözlemlenen bu yüksek iyileşme oranları, PEDOT/CPE'nin elektrokimyasal sensör olarak etkinliğini ve duyarlılığını destekleyen önemli bulgular sunmaktadır. Elde edilen sonuçlar, bu sensörün biyolojik ve farmasötik örneklerde ALP konsantrasyonlarını doğru ve güvenilir bir şekilde tayin edebilme kapasitesini açıkça kanıtlamaktadır. PEDOT/CPE'nin gerçek örnek analizlerinde başarılı bir şekilde uygulanabilmesi, klinik ve farmasötik uygulamalarda potansiyel kullanımını güçlendirmekte ve sensörün pratik uygulanabilirliğini önemli ölçüde artırmaktadır.

Çizelge 3.2. PEDOT:PSS/CPE yüzeyinde, tablet, idrar ve ticari plazma numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları

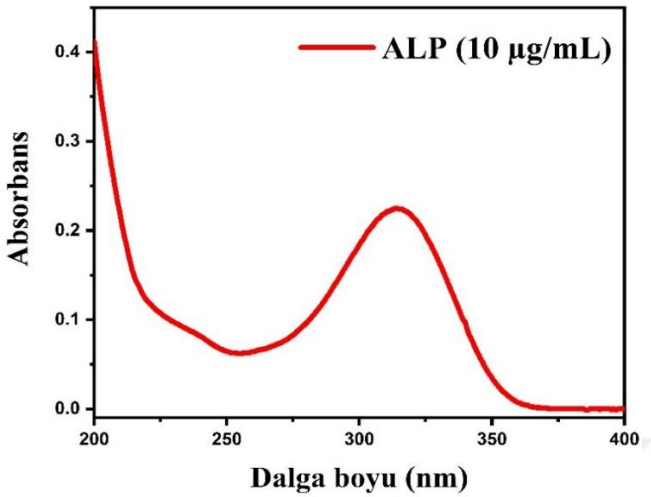
Numune	Derişim (µM)	Bulunan derişim (µM)	BSS (%) (n = 3)	Geri Kazanım (%)
Ticari Plazma	2,0	1,97	2,05	98,77
	3,0	2,91	1,53	96,99
	4,0	3,97	1,30	99,33
İdrar	2,0	2,03	1,22	101,3
	3,0	3,00	0,78	100,1
	4,0	3,87	0,54	96,69
Tablet	2,0	1,99	1,02	99,79
	3,0	3,00	0,66	100,0
	4,0	3,94	0,73	98,29

3.1.3. Dogrudan UV-Gör. Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini

3.1.3.1. Geliştirilen Yöntemin Optimizasyonu

UV-spektrofotometri prensibi, çeşitli analizlerin gerçekleştirilmesi için en basit yöntemlerden biridir. Standart ALP çözeltisi, 200-400 nm aralığında taranmıştır. 313,6 nm'de

bir absorbans spektrumu tespit edilmiştir ve bu dalga boyu, sonraki analizler için analitik dalga boyu olarak seçilmiştir. Kaydedilen spektrum, Şekil 3.25.'de gösterilmektedir.



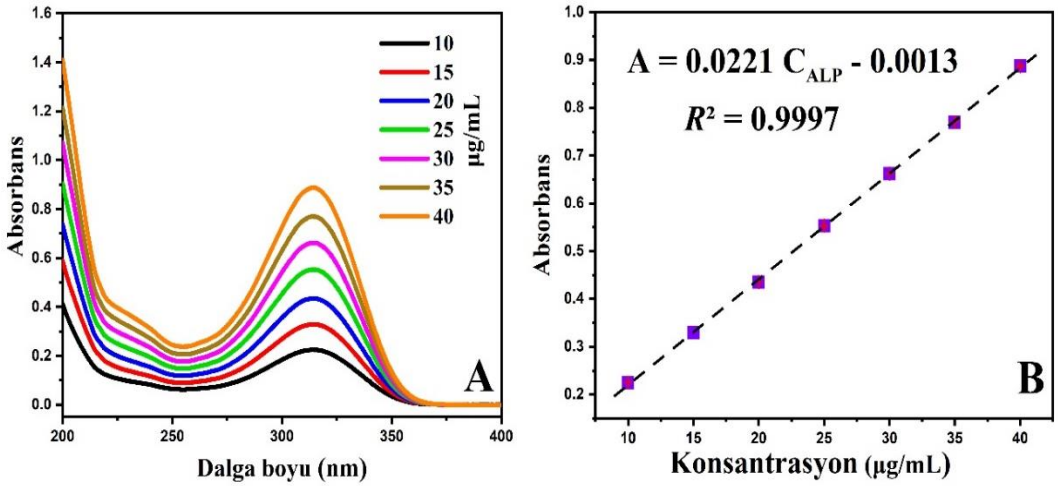
Şekil 3.25. ALP standart çözeltisinin UV spektrumu (λmax = 313,6 nm)

3.1.3.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Doğrusallık örnekleri, standart stok çözeltisinin çeşitli seyreltilmeleriyle hazırlanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle farklı konsantrasyonlarda ölçülen ALP yanıtları, doğrusal regresyon denklemleri oluşturmak için analiz edilmiştir. Çizelge 3.3., her bir süreç için temel istatistiksel parametreleri özetlemektedir. Sonuçlar, kaydedilen yanıtlar ile ilaç konsantrasyonları arasındaki mükemmel korelasyonu, yüksek korelasyon katsayıları ile göstermektedir. Ayrıca, Şekil 3.26'de görsel olarak temsil edilen doğrusal kalibrasyon eğrileri, yöntemin belirtilen konsantrasyon aralığında tutarlı ve orantılı yanıtlar üretebilme yeteneğini açıkça göstermektedir. TS ve TAS için hesaplanan değerler, sırasıyla 0,078 µg/mL ve 0,261 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, yöntemin yüksek duyarlılığını vurgulayarak, ALP'yi düşük konsantrasyonlarda güvenilir bir şekilde tespit etme yeteneğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.3. Doğrudan UV spektrofotometri ile ALP için doğrusallık verileri

Doğrusallık Aralığı (µg/ml)	10-40
Kalibrasyon Denklemi	y = 0,0221 x -0,001
Korelasyon Katsayısı (R^2)	0,9997
TS (µg/ml)	0,078
TAS (µg/ml)	0,261



Şekil 3.26. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntem için ALP spektrumu (10-40 µg/ml)

Önerilen yöntem, doğruluğu 25,0 ve 37,5 µg/mL'lik standart ekleme yöntemi ile nicel olarak belirlemiştir. Farklı tekrar ölçümleri, yüzde geri kazanımın kabul edilen aralıklar içinde olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.4.). Elde edilen tüm % BSS değerlerinin ICH onaylı sınırlar içinde olduğu dikkat çekicidir, bu da geliştirilen analitik metodolojinin sağlam doğruluğunu vurgulamaktadır.

Çizelge 3.4. Spektrofotometrik yöntemle ALP'nin belirlenmesi için elde edilen geri kazanım

Numune	Eklenen ALP (µg/mL)	Bulunan ALP (µg/mL)	Ortalama Geri Kazanım %	BSS %
1	25,0	24,71	99,2	0,33
2	25,0	24,89		
3	25,0	24,75		
4	25,0	24,84		
1	37,50	37,47	100,2	0,45
2	37,50	37,52		
3	37,50	37,52		
4	37,50	37,84		

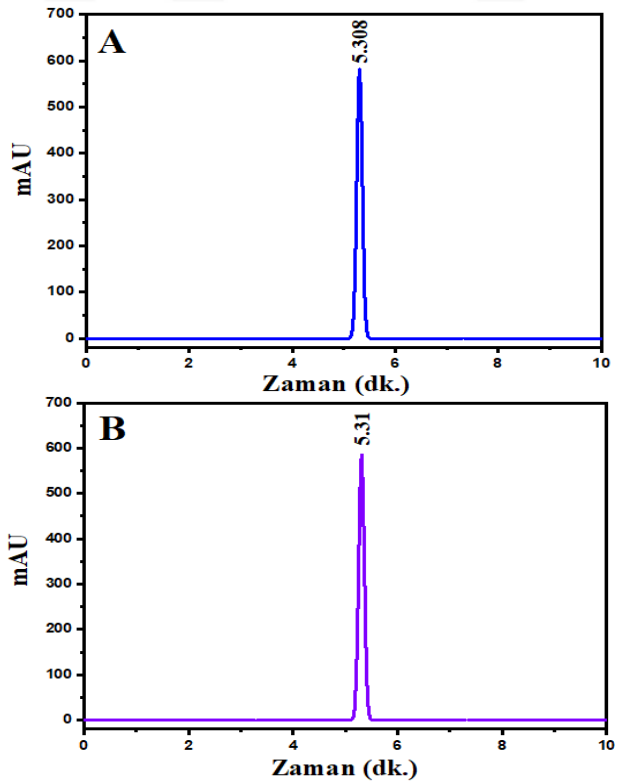
Altı standart ALP çözeltisi, spektrofotometrik yöntem kullanılarak gün içi ve günler arası kesinlik değerlendirmesi için analiz edilmiştir. Gün içi kapsamında, ICH sınırları olan ±2% içinde hesaplanan % BSS, %1,06 olarak bulunmuş ve bu da önerilen yöntemlerin kesinliğini önemli ölçüde güvence altına almıştır. Günler arası kesinlik performansı ve spektrofotometrik yöntemde altı tekrar ölçümünün yanıtı için % BSS, kabul edilebilir aralıklar içinde (0,96 %) kalmıştır. Bu sonuçlar, yöntemlerin yüksek kesinlikte olduğunu ve analitik

güvenilirliklerini gösterdiği gibi, analitik uygulamalar için güçlü bir temel oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

3.1.4. YPSK Yöntemi Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini

3.1.4.1. Geliştirilen Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu

ALP'nin hem standart formu (A) hem de tablet formu (B) için uygun bir ters faz-YPSK yöntemi geliştirmek ve tesis etmek amacıyla bir dizi titiz ön çalışmaya başvurulmuştur. Bu kapsamda çeşitli kromatografik koşullar sistematik bir şekilde değerlendirilmiş ve optimize edilmiş parametreler aşağıda sunulmuştur. Nihai analiz, hareketli faz olarak %0,1 triflorasetik asit, asetonitril ve metanolün 50:25:25 (h/h/h) oranlarında karışımının sabit 1 mL/dk akış hızıyla kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Analitik işlemde dedektör dalga boyu 310 nm olarak belirlenmiş ve kromatografik sisteme 10 µL enjeksiyon hacmi uygulanarak 10 dakikalık bir çalışma süresi elde edilmiştir. Sonuç olarak geliştirilen yöntem, iyi tanımlanmış ve ayrılmış keskin pikler sayesinde yüksek çözünürlük ve netlik sağlayarak etkinliğini kanıtlamıştır. Optimum koşullarda elde edilen kromatogram Şekil 3.27.'de sunulmuş olup, yöntemin hem ALP standardı hem de farmasötik formülasyonların analizine uygunluğunu ve doğruluğunu görsel olarak ortaya koymaktadır.



Şekil 3.27. ALP standart formunun (A) ve tablet formlarının (B) kromatogramları

3.1.4.2. Geliştirilen Kromatografik Yöntemin Validasyonu

Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) kılavuzlarına uygun olarak, geliştirilen yöntemler; sağlamlık, doğruluk, kesinlik, doğrusallık, duyarlılık ve stabilite parametreleri açısından valide edilmiştir.

Yöntemin kromatografik parametrelerdeki küçük ancak kasıtlı değişikliklere karşı dayanıklılığını gösteren sağlamlık değerlendirmesi titizlikle gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda; hareketli faz bileşimi, akış hızı, kolon sıcaklığı ve dedeksiyon dalga boyu gibi parametrelerde yapılan küçük değişikliklerin analitik performans üzerindeki etkileri sistematik olarak incelenmiştir. Alıkonma süresi dikkatle değerlendirilmiş ve önceden tanımlanmış kriterlere uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. Bu doğrultuda, yöntem tüm test edilen koşullarda değişkenliğe karşı dayanıklılığını kanıtlamış ve bu sonuçlar Çizelge 3.5.'de sunulan verilerle desteklenmiştir.

Çizelge 3.5. ALP yönteminin sağlamlık değerlendirmesi

Parametre		**Alıkonma Süresi (dk)**	
		Standart	**Numune**
Dedeksiyon dalga boyu (nm)	308,0	5,283	5,274
	310,0	5,286	5,292
	312,0	5,282	5,301
Kolon sıcaklığı (°C)	15,0	5,309	5,305
	20,0	5,286	5,292
	25,0	5,282	5,287
Akış (mL/dk)	0,9	5,862	5,857
	1,0	5,286	5,292
	1,1	4,838	4,839
Hareketli faz kompozisyonu (TFA/ACN/MeOH, h/h/h)	40/30/30	3,449	3,446
	50/25/25	5,286	5,292

YPSK yönteminin doğruluğu, bilinen derişimlerde ALP standart çözeltilerinin tablet çözeltisine ilavesi ile gerçekleştirilen yüzde geri kazanım çalışması ile belirlendi. Yöntemi kullanılarak yapılan çoklu tekrar ölçümleri sonucunda elde edilen yüzde geri kazanım değerlerinin izin verilen sınırlar içerisinde olduğu görülmüştür (Çizelge 3.6). Ayrıca, tüm yöntemler için elde edilen BSS (%) değerleri ICH tarafından belirlenen sınırların oldukça altında olup, geliştirilen analiz yöntemlerinin doğruluğunun sağlamlığını açıkça ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, yöntemin farklı derişim aralıklarında doğru ve güvenilir kantitatif sonuçlar elde etme kabiliyetini doğrulamaktadır.

Çizelge 3.6. YPSK yöntemiyle ALP tayini için elde edilen geri kazanım

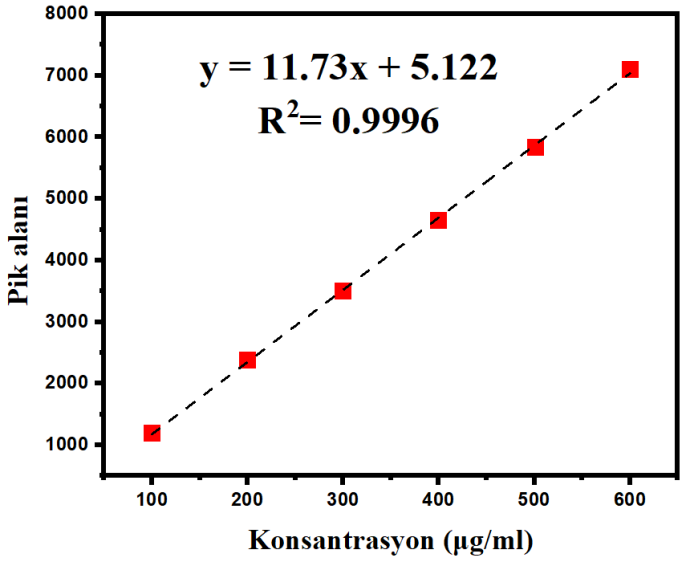
Numune	Eklenen ALP, mg/mL	Geri Kazanılan ALP		Ortalama Geri Kazanım	BSS %
		mg/mL	%		
1	0,2	0,199983	99,9	99,9	0,05
2	0,2	0,20034	99,9		
3	0,2	1,99827	99,8		
1	0,4	0,406281	101,5	101,1	0,32
2	0,4	0,403893	100,9		
3	0,4	0,40212	101,0		
1	0,6	0,599941	100,0	99,9	0,10
2	0,6	0,599763	99,9		
3	0,6	0,598956	99,8		

Bu çalışmada, YPSK yöntemi kullanılarak altı ALP standart çözeltisi analiz edilmiştir ve gün içinde ile günler arası kesinlik değerlendirilmiştir. Gün içi analizinde, ICH limitleri olan ±%2 içinde hesaplanan %BSS değeri %0,09 bulunmuş, bu da önerilen yöntemlerin hassasiyetini önemli ölçüde güvence altına almıştır. Altı günlük bir aranın ardından yapılan ara kesinlik analizinde, ALP standardı ile farmasötik hazırlık arasında belirgin farklar gözlemlenmiştir. ALP standardı, altı gün boyunca yalnızca %0,3'lük minimal bir değişim göstermiştir, bu da belirtilen depolama koşulları altında yüksek derecede kararlılığı işaret etmektedir. Buna karşın, farmasötik preparatdaki ALP %9.6'lık daha büyük bir değişim göstermiştir, bu da çevresel faktörlere karşı daha düşük bir hassasiyet gösterdiğini belirtmektedir. Bu bulgular, ilaç çözeltisindeki değişimlerin ek yardımcı maddeler veya etkileşimlerden etkilenebileceği için, formülasyona özgü stabilitenin dikkate alınmasının önemini vurgulamaktadır. ALP standardındaki minimal değişim, kararlılığının sağlam olduğunu teyit ederken, ilaç çözeltisindeki gözlemlenen değişiklik, ara kesinlik koşulları altında stabilitesini etkileyen faktörlerin daha ileri incelemelerini gerektirmektedir.

Doğrusallık örnekleri, bir standart stok çözeltisinin çeşitli seyreltmeleri ile hazırlanmıştır. Geliştirilen yöntemler kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki ALP'nin ölçülen yanıtları, doğrusal regresyon denklemleri oluşturmak için analiz edilmiştir (Şekil 3.28). Çizelge 3.7, her işlem için temel istatistiksel parametreleri özetlemektedir. Sonuçlar, yüksek korelasyon katsayılarıyla belirtilen aralıkta kaydedilen yanıtlar ile ilaç konsantrasyonları arasında mükemmel bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Yöntemlerin duyarlılığı, TS ve TAS değerlendirilmesiyle başarıyla belirlenmiştir. Hesaplanan TS değeri 0,23 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, yöntemlerin yüksek duyarlılığını vurgulamakta ve ALP'yi düşük konsantrasyonlarda güvenilir bir şekilde tespit etme yeteneklerini ortaya koymaktadır. Bu duyarlılık seviyesi, özellikle düşük analit konsantrasyonları içeren örneklerle çalışırken yöntemlerin farmasötik ve kimyasal analizlerdeki etkinliği için hayati öneme sahiptir.

Çizelge 3.7. ALP için YPSK yöntemiyle doğrusallık verileri

Doğrusallık Aralığı (µg/ml)	100-600
Kalibrasyon Denklemi	y =11,73 x +5,122
Korelasyon Katsayısı (R^2)	0,9996
TS (µg/ml)	0,23
TAS (µg/ml)	0,78



Şekil 3.28. YPSK yöntemi ile 100–600 µg/mL konsantrasyon aralığında elde edilen ALP kalibrasyon eğrisi

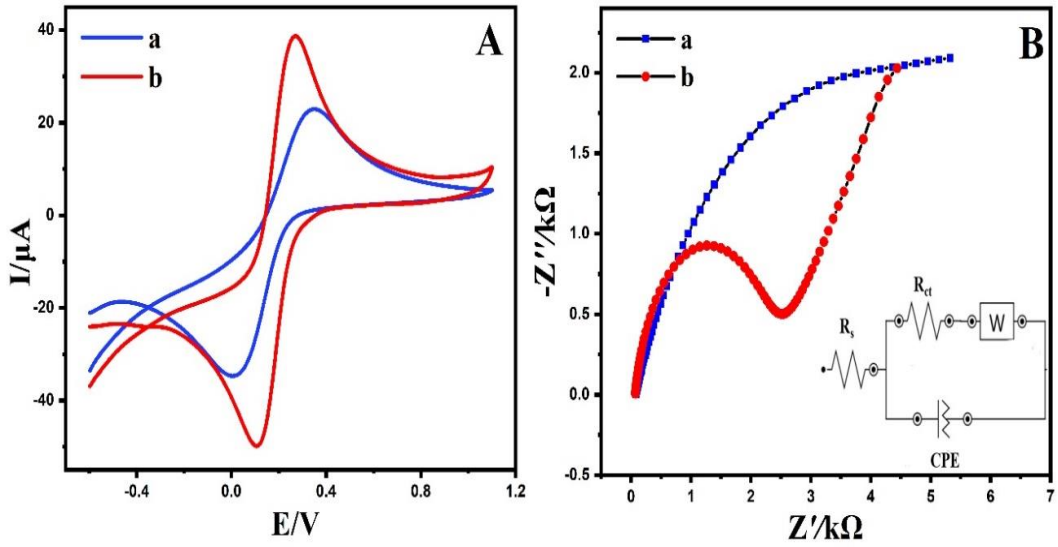
Standart ve farmasötik hazırlamanın 24 saat boyunca yapılan stabilite profillerinin dikkatlice incelenmesinin ardından, 2-8°C ve oda sıcaklığı gibi depolama koşullarında ALP'nin bu koşullar altında stabil olduğu belirlenmiştir. Bu denemeler sırasında kaydedilen en yüksek BSS % değeri 0,2% olarak bulunmuştur. Bu minimal değişkenlik, ALP'nin standart ve farmasötik hazırlama için belirli koşullar altında 24 saat boyunca yüksek bir stabilite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, analitik yöntemlerin sağlamlığını ve ALP'nin çeşitli formülasyonlar ve depolama koşulları altında kısa süreli stabilitesini koruma yeteneğini doğrulamaktadır.

3.2. RİBO Etken MaddesineAit Bulgular

3.2.1. MWCNTs/GCE Kullanılarak RİBO Etken Maddesinin Tayini

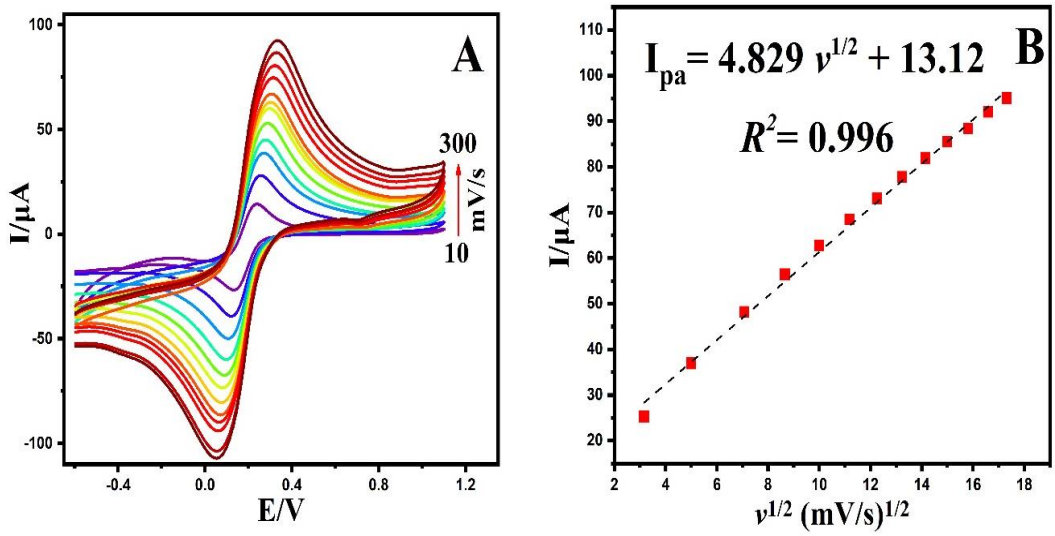
3.2.1.1. Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

$[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (5,0 mM) redoks probu kullanılarak elektrotların kapsamlı karakterizasyonu için DV ve EIS yöntemleri uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.29.A'da sunulmaktadır. Görüldüğü üzere, MWCNTs ile modifiye edilmiş GCE (eğri b), modifiye edilmemiş (çıplak) elektrota (eğri a) kıyasla belirgin derecede daha yüksek pik akımları sergilemiştir. Bu artış, MWCNTs/GCE'nin daha geniş spesifik yüzey alanı ve artan elektrokatalitik aktivitesine atfedilebilir; bu sayede elektron transfer süreçleri kolaylaştırılmakta ve hızlandırılmaktadır. Ayrıca, ΔEp dikkatle değerlendirilmiş; modifiye edilmemiş GCE için 315 mV olarak belirlenen bu değer, MWCNT'lerin yüzeye entegrasyonu ile 151 mV'ye düşmüştür. ΔEp'deki bu anlamlı azalma, MWCNT'lerin elektrot yüzeyine kazandırdığı gelişmiş elektrokimyasal performansı açıkça ortaya koymaktadır. DV analizine ek olarak, EIS tekniği modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş elektrotların Rct değeri karşılaştırmak için kullanılmıştır. Şekil 3.29.B'de görüldüğü üzere, çıplak GCE'nin Rct değeri 4959,3 Ω olarak tespit edilmiştir ve bu durum sınırlı elektrokimyasal özellikleri yansıtmaktadır. Buna karşılık, MWCNTs ile modifiye edilmiş GCE'nin Rct değeri 2468,9 Ω olarak gözlemlenmiş olup, bu durum MWCNT'lerin varlığı sayesinde elektrot yüzeyindeki iletkenliğin arttığını göstermektedir.

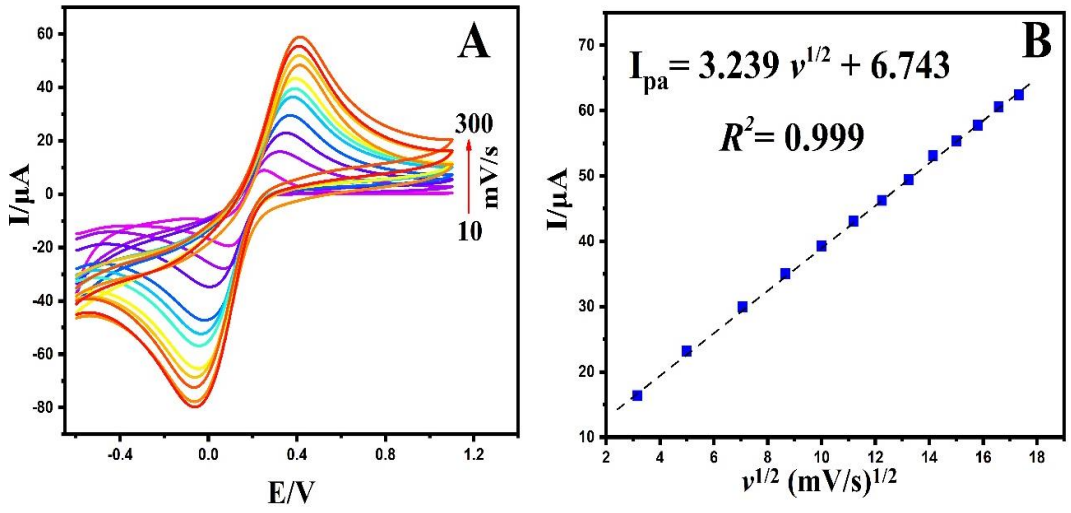


Şekil 3.29. KCl (0,1 M) ve $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi (5,0 mM) ortamında modifiye edilmemiş GCE (a) ve MWCNTs/GCE (b) elektrotlarının (A) DV (50 mV/s) ve (B) EIS diyagramları

Elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin daha kapsamlı şekilde değerlendirilmesi amacıyla, çıplak GCE ve MWCNTs/GCE elektrotlarının elektrokimyasal aktif yüzey alanları Randles–Sevcik denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla, MWCNTs/GCE elektrodu için 10 ila 300 mV s^{-1} arasında değişen tarama hızlarında kaydedilen redoks pik akımları analiz edilmiştir. Tarama hızındaki artışa paralel olarak redoks pik akımında gözlemlenen belirgin yükseliş, elektrot yüzeyinde hızlı elektron transferini destekleyen etkin bir kütle taşıma sürecine işaret etmektedir. Bu doğrusal ilişkinin eğiminden yararlanılarak MWCNTs/GCE elektrodunun elektrokimyasal aktif yüzey alanın değeri yaklaşık 0,138 cm^2 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.30). Bu değer, 0,092 cm^2 olarak belirlenen çıplak GCE'nin aktif yüzey alanından yaklaşık 1,5 kat daha büyüktür (Şekil 3.31). Elde edilen sonuçlar, MWCNTs modifikasyonunun elektrot yüzey alanını genişleterek elektron transfer kinetiğini önemli ölçüde iyileştirdiğini ve elektrokimyasal performansı güçlendirdiğini açık biçimde ortaya koymaktadır. Genişleyen yüzey alanı, analit ile elektrot yüzeyi arasında daha etkili bir elektron iletim yolu oluşturarak duyarlılığın artırılmasına katkı sağlamaktadır.



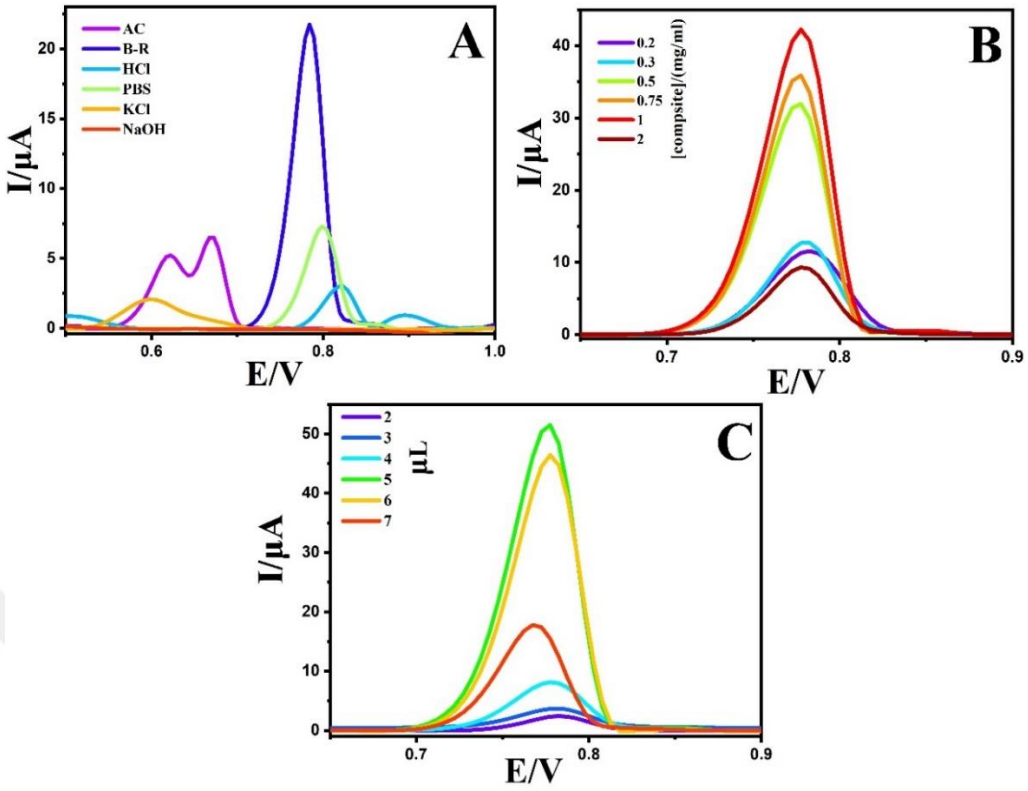
Şekil 3.30. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl ortamında, MWCNTs/GCE üzerinde farklı tarama hızlarında elde edilen (A) DV eğrileri ve (B) I_{pa} ile $v^{1/2}$ arasındaki ilişki grafiği



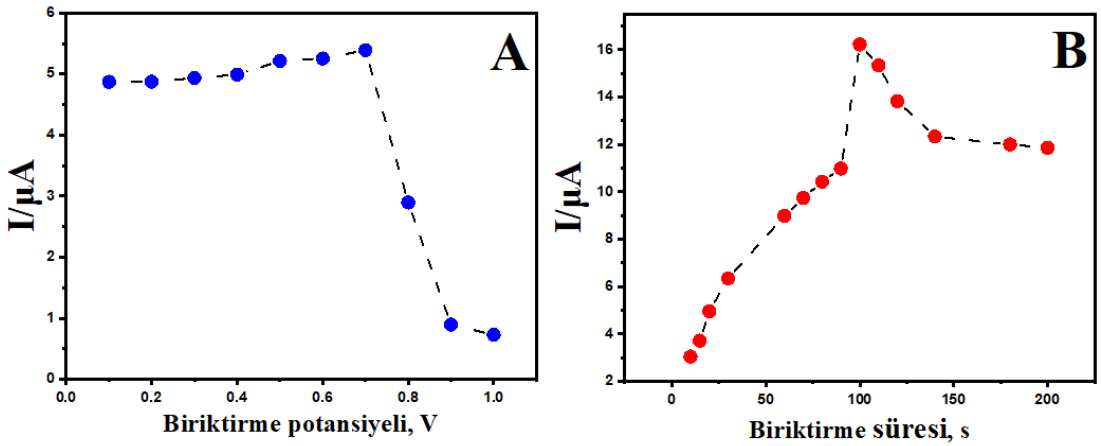
Şekil 3.31. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl ortamında, modifiye edilmemiş GCE üzerinde farklı tarama hızlarında elde edilen (A) DV eğrileri ve (B) I_{pa} ile $v^{1/2}$ arasındaki ilişki grafiği

3.2.1.2. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

Optimizasyon süreci kapsamında çeşitli parametreler değerlendirilmiştir: (A) uygun destek elektrolit seçimi, (B) MWCNT kompozit konsantrasyonunun belirlenmesi ve (C) MWCNT kompozit miktarının incelenmesi (Şekil 3.32). Sonuç olarak, en uygun deneysel koşullar şu şekilde belirlenmiştir: (A) destek elektrolit olarak BR tamponu, (B) ideal kompozit konsantrasyonu 1,0 M ve (C) optimum kompozit miktarı 5,0 µl. Buna ek olarak, adsorpsiyon için önerilen optimal biriktirme potansiyeli 0,7 V olarak tespit edilmiş olup, optimal biriktirme süresi 100 saniye olarak belirlenmiştir (Şekil 3.33).



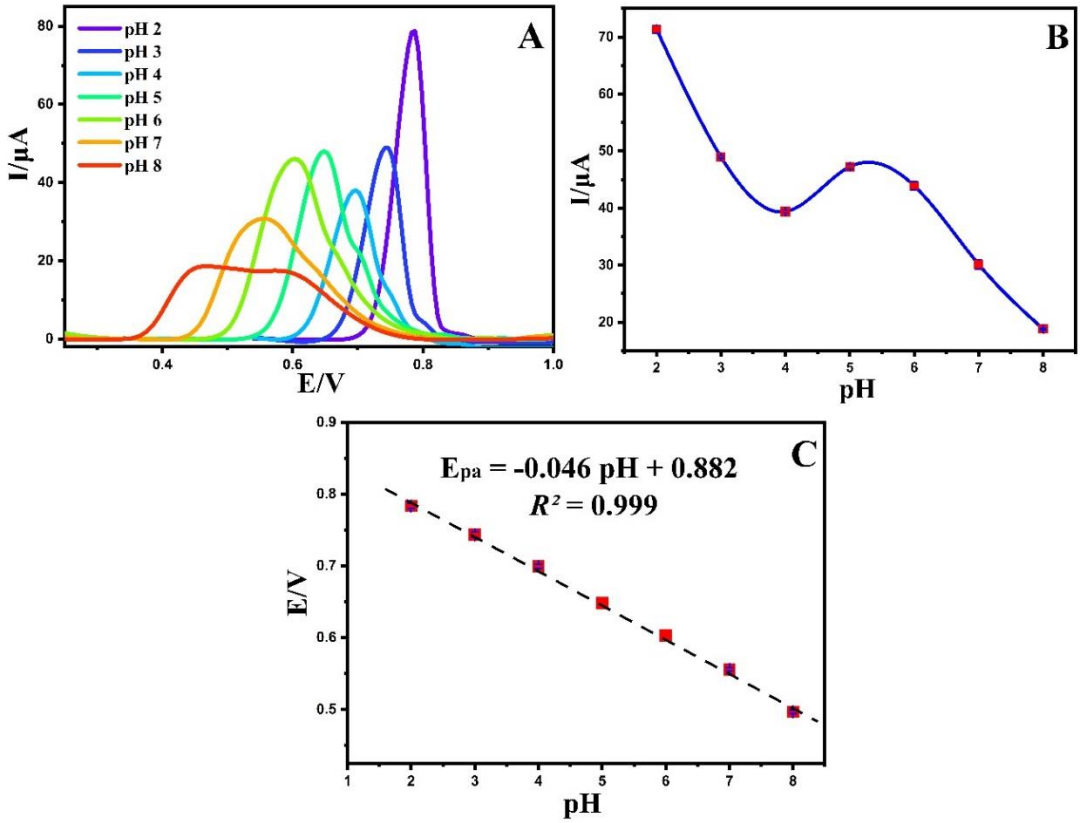
Şekil 3.32. Destek elektrolitinin (A), MWCNTs kompozitinin konsantrasyonunun (B) ve miktarının (C) 0,01 mM RIBO'nun oksidasyon pik akımları üzerindeki etkisi



Şekil 3.33. MWCNTs/GCE yüzeyinde 0,01 mM RIBO'nin pik akımı üzerindeki (A) biriktirme potansiyelinin, ve (B) biriktirme süresinin etkisi

Farklı pH değerlerinin (2,0–8,0 aralığında) pik akımı üzerindeki etkisi sistematik olarak incelenmiştir. Şekil 3.34.A ve 3.34.B'de gösterildiği üzere, pH 2,0'nin üzerindeki değerlerde sinyal akımında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda, pH 2,0 deneyler için optimum koşul olarak belirlenmiştir. Oksidasyon pik potansiyelinin pH'a karşı grafiğe dökülmesiyle (Şekil 3.34.C), yaklaşık 46 mV eğimli doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Nernst

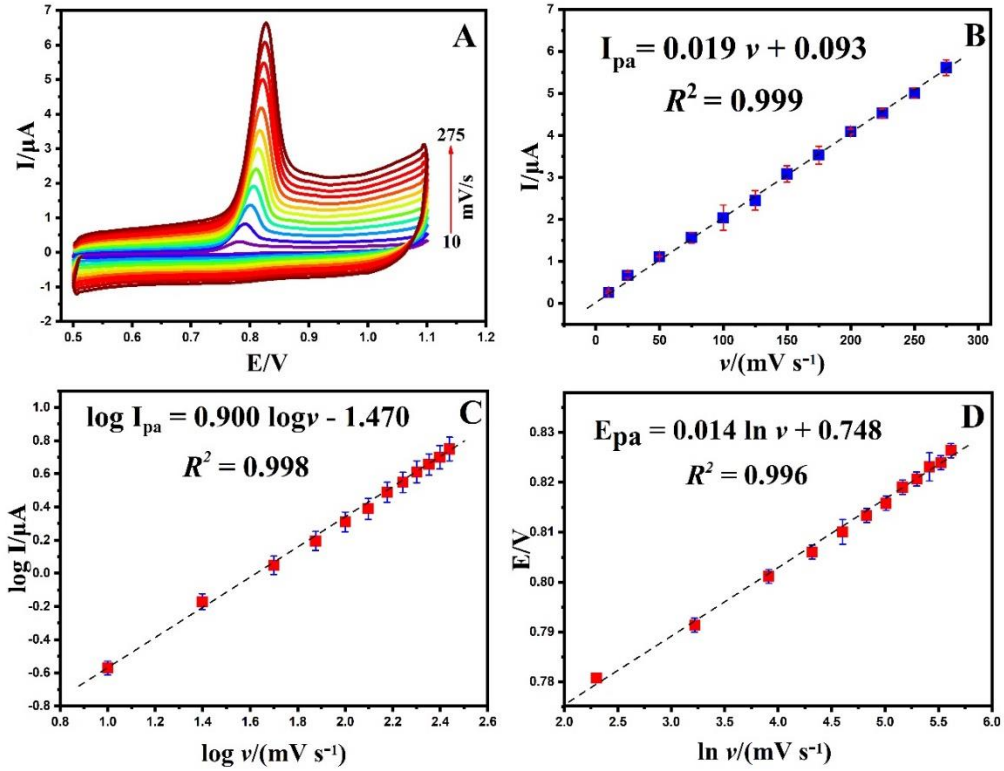
denklemi bağlamında değerlendirildiğinde, bu sonuç oksidasyon sürecine birer eşit sayıda elektron ve protonun katıldığını göstermektedir.



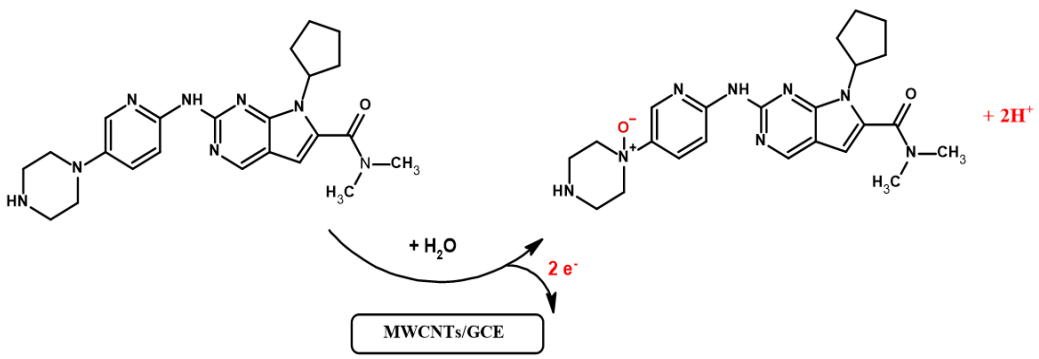
Şekil 3.34. 0,1 mM RIBO'nun MWCNTs/GCE üzerindeki DPV voltammogramları farklı pH seviyelerinde (A), Ip ile pH arasındaki ilişki (B), ve Ep ile pH arasındaki eğri (C)

Modifiye edilmiş elektrot üzerindeki elektrokimyasal süreci daha iyi anlamak amacıyla, farklı tarama hızlarında (υ) MWCNTs/GCE üzerinde DV eğrileri elde edilmiştir. Şekil 3.35.A'da görüldüğü üzere, RIBO'nun Ipa, artan tarama hızıyla birlikte yükselme göstermiştir. Ayrıca, tarama hızındaki artışla birlikte RIBO'nun anodik pik potansiyelinde pozitif yönde bir kayma gözlenmiş olup, bu durum RIBO'nun MWCNTs/GCE yüzeyindeki elektron transfer sürecinin geri dönüşümsüz karakterde olduğunu göstermektedir. Şekil 3.35.B, anodik pik akımları ile tarama hızları arasında mükemmel bir doğrusal ilişki ortaya koymakta olup, bu bulgu RIBO'nun elektrokimyasal davranışının adsorpsiyon kontrollü bir mekanizmaya dayandığını göstermektedir. Ek olarak, pik akımının logaritmasının tarama hızının logaritmasına karşı çizilen grafiği (Şekil 3.35.C) doğrusal bir denklem ile tanımlanmıştır. Elde edilen eğim değeri (0,9) 1'e oldukça yakın olup, bu da adsorpsiyon kontrollü süreci desteklemektedir. RIBO'nun elektrot yüzeyindeki elektro-oksidasyon sürecine katılan elektron sayısı, Epa ile tarama hızının doğal logaritması (ln υ) arasındaki doğrusal ilişkinin eğimi (Şekil

3.35.D) kullanılarak ve geri dönüşümsüz, adsorpsiyon kontrollü bir mekanizma için Laviron denklemi uygulanarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular, RIBO'nun elektro-oksidasyon mekanizmasının iki elektron transferini içerdiğini göstermektedir. Tarama hızı ve pH üzerine gerçekleştirilen çalışmaların bulguları birlikte değerlendirildiğinde, RIBO'nun MWCNTs/GCE yüzeyindeki elektrokimyasal oksidasyon sürecinin iki elektron ve iki proton transferini içerdiği sonucuna ulaşılmıştır. RIBO'nun olası elektro-oksidasyon mekanizması Şekil 3.36'da sunulmaktadır (James vd., 2020).



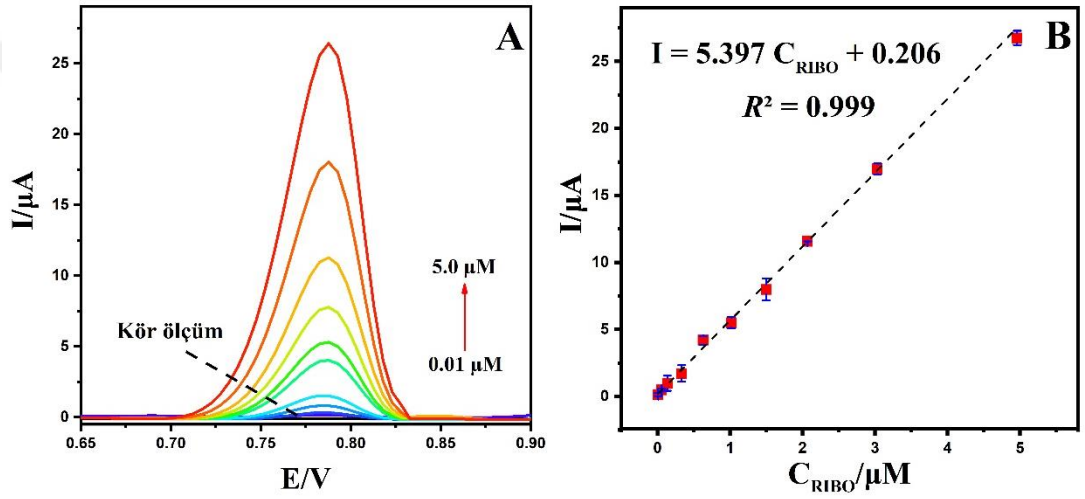
Şekil 3.35. MWCNTs/GCE üzerinde 0,01 mM RIBO ile 0,1 M BR (pH 2,0) ortamında 10'dan 275 mV/s'ye kadar tarama hızlarında elde edilen DV eğrileri (A), RIBO'nun pik akımı ile tarama hızının karekökü ($\upsilon^{1/2}$) arasındaki ilişki (B), log υ ile log I'nin değişimi (C), ve ln υ ile pik potansiyelinin değişimi (D)



Şekil 3.36. MWCNTs/GCE üzerindeki RIBO'nun elektrookidasyonu için önerilen mekanizma

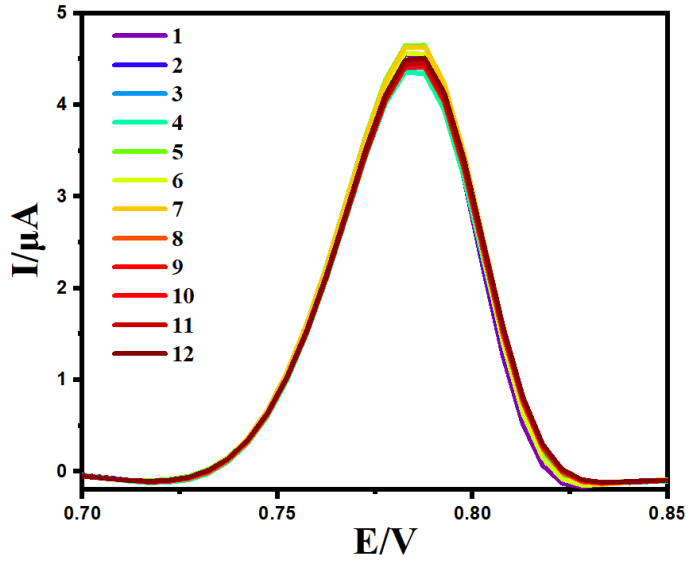
3.2.1.3. Modifiye Edilmiş Sensörün Analitik Performansının Değerlendirilmesi

Optimize koşullar altında DPV kullanılarak farklı RIBO konsantrasyonlarının tespiti gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.37.'de gösterildiği üzere, elektrokimyasal sensör MWCNTs/GCE kompoziti için 0,01 µM ile 5 µM arasında akım değerleri ile olumlu bir doğrusal ilişki sergilemiştir. Elde edilen doğrusal regresyon denklemi Ipa = 5,397 C_{RIBO}+ 0,206 olup, R^2 değeri 0,999'dur. TS ve TAS sırasıyla 0,69 nM ve 2,31 nM olarak hesaplanmıştır. MWCNTs/GCE sensörü, etkileyici bir doğrusal aralığa ve belirgin şekilde düşük bir teşhis sınırına sahip olup, RIBO'nun hassas ve güvenilir bir şekilde nicel belirlenmesi için potansiyelini vurgulamaktadır.

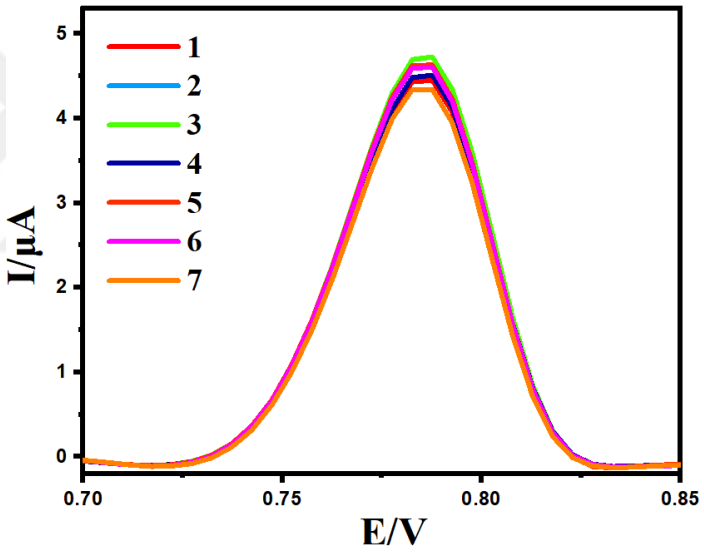


Şekil 3.37. MWCNTs/GCE yüzeyinde 0,1 M BR tamponunda artan RIBO konsantrasyonlarına karşılık gelen DPV tepkileri (A) ve RIBO konsantrasyonlarına bağlı olarak pik akımlarının değişimi (B)

Geliştirilen sensörün performansını daha iyi değerlendirebilmek için, aynı elektrot kullanılarak RIBO'nun on iki tekrarlı ölçümü yapılmış ve sensörün tekrarlanabilirliği incelenmiştir (Şekil 3.38). Bu ölçümler boyunca elde edilen pik akımları büyük ölçüde tutarlılık göstermiş ve %1,69'luk bir BSS değeriyle sensörün yüksek düzeyde tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, sensörün güvenilir ve tekrar edilebilir sonuçlar sunma yeteneğini doğrulamaktadır. Sensörün üretilebilirliği ise yedi yeni elektrot hazırlanarak değerlendirilmiş ve bu elektrotların pik akımları karşılaştırılmıştır (Şekil 3.39). Elde edilen %3,1'lik BSS değeri, sensörün üretilebilirliğinin başarılı olduğunu göstermekte ve üretilen sensörlerin güvenilir sonuçlar verebileceğini desteklemektedir.



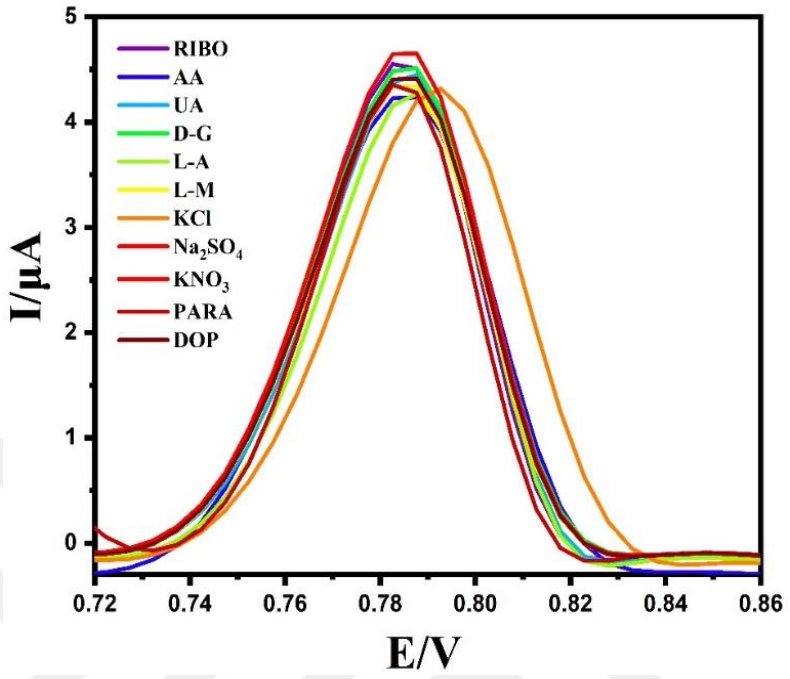
Şekil 3.38. 1,0 µM RIBO (BR tamponu, pH 2,0) içinde MWCNTs/GCE'nin tekrarlanabilirliğine ait DPV'ler



Şekil 3.39. 1,0 µM RIBO (BR tamponu, pH 2,0) içindeki MWCNTs/GCE'nin yeniden üretilebilirliğine ait DPV'ler

Gerçek örnekleri değerlendirmeden önce, farmasötik ve biyolojik örneklerde yaygın olarak bulunan birçok potansiyel girişim maddesinin 1 µM RIBO'nun oksidasyon sinyalleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla çeşitli testler gerçekleştirilmiştir. Çarpıcı bir şekilde, paracetamol (PARA), dopamin (DOP), L-arjinin, askorbik asit (AA), D-glukoz (D-G), ürik asit (UA), L-metiyonin, potasyum klorür (KCl), sodyum nitrat (KNO_3) ve sodyum sülfatın (Na_2SO_4) 1000 kat fazlalığının bile RIBO'nun Ipa sinyaline anlamlı bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.40). Ayrıca, bu girişim maddeleri için elde edilen %BSS değerlerinin 2'nin altında olması, MWCNTs/GCE sensörünün RIBO'ya karşı olağanüstü seçiciliğini

vurgulamaktadır. Bu bulgu, sensörün yüksek seçiciliğini ortaya koymakta olup, karmaşık biyolojik ve farmasötik örneklerin analizinde kullanılabilirliğini desteklemektedir.



Şekil 3.40. 1,0 μM RIBO (BR tamponu, pH 2,0) varlığında MWCNTs/GCE'nin seçiciliğine ait DPV'ler

3.2.1.4. Tablet Formuna, İdrar ve Ticari Plazma Numunelerine Uygulanması

Yeni bir sensörün gerçek örneklerde analitleri etkin bir şekilde izleyebilme yeteneği, yeni analitik araçların tanıtımında son derece önemlidir. Bu doğrultuda, geliştirilen sensörün RIBO tespitindeki uygulanabilirliği ve uygunluğu, insan plazması, idrar ve tabletlerin standart ekleme yöntemiyle analiz edilmesiyle incelenmiştir. Doğruluğun önemli bir göstergesi olan yüzde geri kazanım değerleri hesaplanmış ve Çizelge 3.8.'de sunulmuştur. İdrar örneklerinde geri kazanım oranları %99,72 ile %102,9 arasında değişirken, plazma örneklerinde geri kazanım oranları %97,8 ile %103,11 arasında gözlemlenmiştir. Ayrıca, tablet analizlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (%97,07–98,32), bu da sensörün RIBO tayininde farklı gerçek yaşam uygulamalarında dikkate değer güvenilirliğini ve doğruluğunu göstermektedir. Ayrıca, BSS değerleri %0,9–2,5 aralığında tespit edilmiştir. Geliştirilen sensörün sergilediği etkileyici performans, farmasötik bilimlerde potansiyel önemini pekiştirmekte ve farmasötik araştırmalar ile klinik analizlerde pratik kullanımına zemin hazırlamaktadır.

Çizelge 3.8. MWCNTs/GCE yüzeyinde, RIBO tablet, idrar ve ticari plazma numuneleri için geri kazanım deneylerinin sonuçları

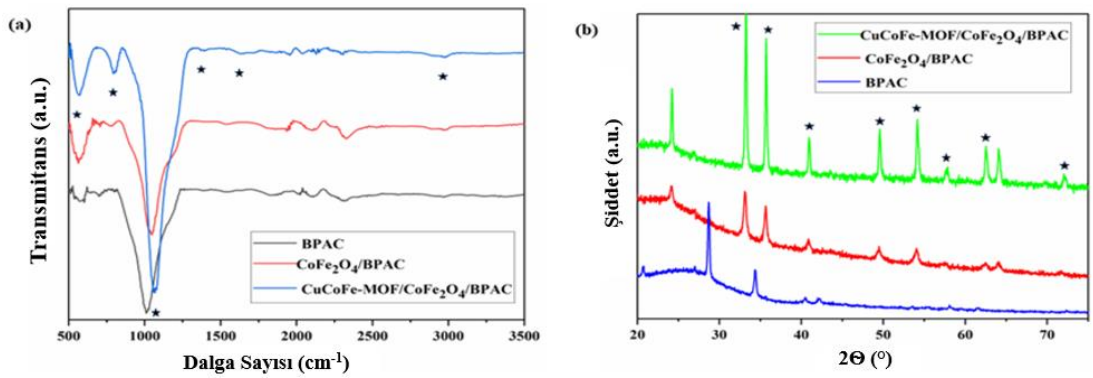
Numune	Derişim (µM)	Bulunan derişim (µM)	Geri Kazanım (%)	BSS (%) (n = 3)
Ticari plazma	0,06	0,062	103,11	1,3
	0,09	0,088	97,80	1,5
	0,10	0,102	102,24	2,2
İdrar	0,060	0,060	100,36	1,9
	0,09	0,090	99,72	2,1
	0,10	0,103	102,90	1,4
Tablet	0,06	0,059	97,55	2,5
	0,09	0,089	98,32	1,4
	0,10	0,097	97,07	0,9

3.2.2. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE Kullanılarak ALP Etken Maddesinin Tayini

3.2.2.1. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC Karakterizasyonu

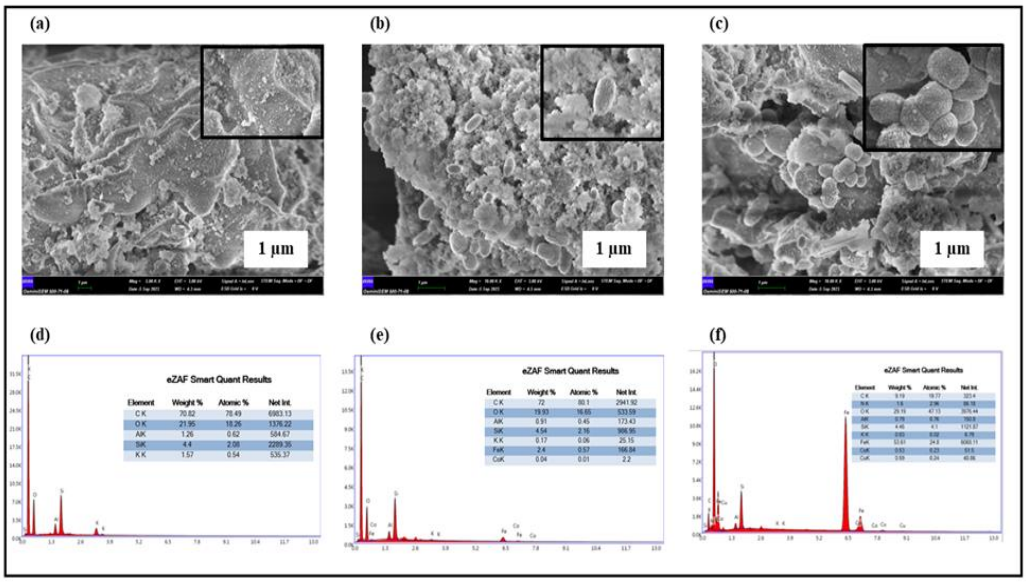
FT-IR spektroskopi, sentezlenen malzemelerde adsorpsiyon kapasitesini etkileyebilecek temel fonksiyonel grupların tanımlanması ve bağlanma özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılmıştır. Şekil 3.41.a'da, sırasıyla BPAC, $CoFe_2O_4$/BPAC ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC nanokompozitlerine ait spektrumlar sunulmaktadır. 2973 cm^{-1}'de gözlemlenen bant, C-H gerilme titreşimlerine, 1635 cm^{-1}'deki bant ise C=O gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Ayrıca, 1380 cm^{-1} civarındaki pik, aromatik halkalarda C-C gerilme titreşimlerini yansıtmaktadır. 1066 cm^{-1}'deki emilim, eterler, alkoller, asitler, esterler veya fenoller gibi bileşiklerdeki C–O gerilme titreşimlerini göstermektedir. Benzin halkasındaki C–H bağlarının titreşimlerinden kaynaklanan 797 cm^{-1} ve 566 cm^{-1}'deki zirveler, sırasıyla deformasyon titreşimlerine işaret etmektedir.

XRD analiziyle yapılan faz saflığı ve kristal yapı değerlendirmeleri, hazırlanan BPAC, $CoFe_2O_4$ ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC nanoparçacıklarının kristal yapılarının doğrulanmasına olanak tanımıştır (Şekil 3.41.b). $CoFe_2O_4$'e ait kırınım zirveleri, 2θ açılarında 33,26°; 35,70°; 40,96°; 54,22°; 57,87° ve 62,54° olarak gözlemlenmiş olup, bu değerler $CoFe_2O_4$'ün yüzey merkezli kübik yapısına işaret etmektedir. Cu içeriğine ait zirveler ise CuCoFe-MOF yapısında 49,57° ve 73,07° 2θ aralıklarında belirginleşmiştir.



Şekil 3.41. (a) BPAC, $CoFe_2O_4$/BPAC ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC nanokompozitinin FT-IR spektrumları. (b) BPAC, $CoFe_2O_4$/BPAC ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC nanokompozitinin XRD grafiği

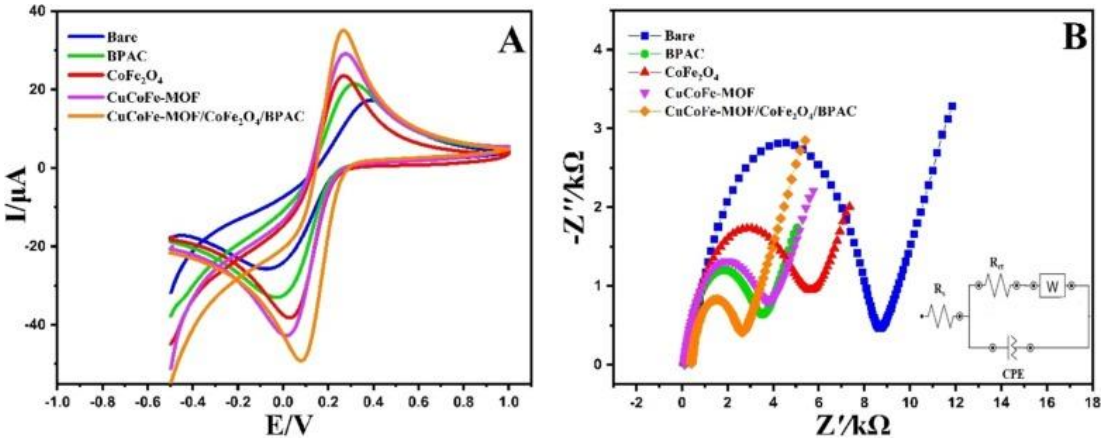
BPAC, $CoFe_2O_4$/BPAC ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC'in yüzey morfolojisi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir (Şekil 3.42). Tarama öncesinde, her bir adsorbanın iletkenliğini sağlamak amacıyla ince bir altın tabakası ile kaplama işlemi yapılmıştır. Şekil 3.42.a'da, BPAC'in morfolojisi gösterilmekte olup, sonuçlar, pürüzlü yüzeye sahip gözenekli bir malzeme yapısına işaret etmektedir. Morfolojik yapının, yaprak benzeri ve yuvarlak gözeneklerle heterojen bir yapı sergileyerek, karbon gözeneklerinden uçucu organik moleküller ve suyun aktivasyon işlemiyle uzaklaştırıldığını doğruladığı gözlemlenmiştir. Şekil 3.42.b ve Şekil 3.42.c'deki SEM sonuçları, $CoFe_2O_4$ ve CuCoFe-MOF ile yapılan kompozitleşme sonrasında BPAC yapısının değiştiğini ve modifikasyon sonrası nanokompozitlerin, çıplak BPAC'e kıyasla daha küçük boyutlarda oluştuğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, BPAC, $CoFe_2O_4$/BPAC ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC'in elementel kompozisyonlarını doğrulamak amacıyla SEM-EDX analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.42. BPAC (a, d), $CoFe_2O_4$/BPAC (b, e) ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC nanokompozitinin (c, f) SEM görüntüleri ve EDX spektrumları

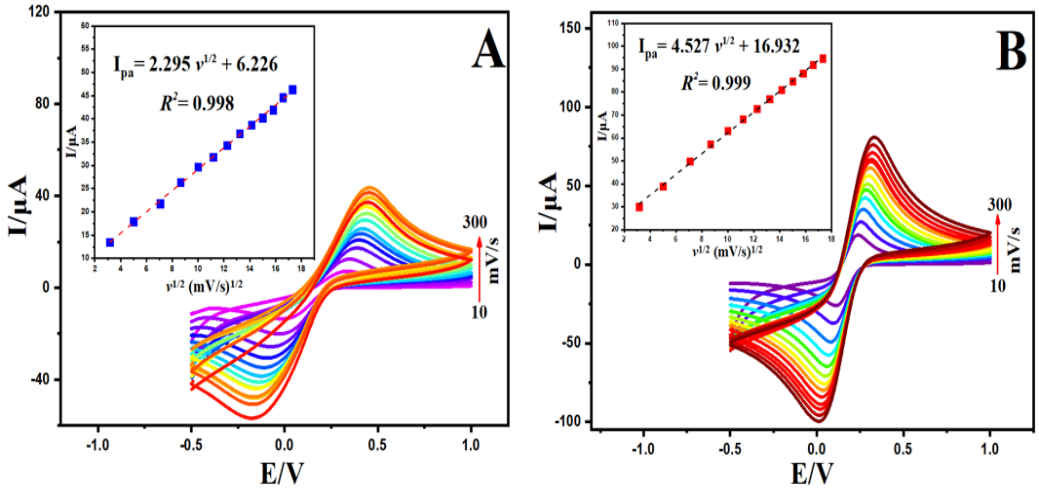
3.2.2.2. Sensörlerin Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Daha sonra, elektrotlar, destek elektrolit olarak 0,1 M KCl içeren 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılarak DV ve EIS ile karakterize edilmiştir. Şekil 3.43.A'da görüldüğü üzere, çıplak elektrot, destek ortamında azaltılmış bir redoks pik akım tepkisi sergilemiştir. Buna karşın, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE, artırılmış bir redoks pik akımı göstererek üstün iletkenlik ve daha düşük direnç sağladığını ortaya koymuştur. DV ölçümleri, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/BPAC kompozitinin dikkate değer elektrokatalitik davranışını göstermektedir. DV eğrileri için pik potansiyeli farkı (ΔEp = Epa − Epc), modifiye CPE için yaklaşık 0,18 V iken, çıplak CPE için bu değer yaklaşık 0,41 V olarak bulunmuştur. Bu bulgular, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE'nin, modifiye edilmemiş CPE'ye kıyasla elektron transfer kinetiklerini artırdığını göstermektedir. Şekil 3.43.B, EIS analizlerinden elde edilen Nyquist grafiğini sunmaktadır. Nyquist diyagramı, difüzyon ve elektron transfer süreçlerindeki farklılıkları yansıtan doğrusal ve yarım dairesel segmentler içermektedir. Yarım daire bölgesinin çapı, yüksek frekans bölgesindeki Rct temsil etmektedir. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE için Rct, 2290 Ω olarak belirlenmiştir ve bu, çıplak CPE için ölçülen 8170 Ω değerinden daha düşüktür. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE'deki Rct değerindeki bu azalma, daha verimli bir yük transfer hızını, dolayısıyla elektrot kinetiklerini hızlandıran ve elektrot arayüzünde iletkenliği artıran durumu önermektedir; bu durum da DV bulgularını desteklemektedir.



Şekil 3.43. Farklı CPE elektrotlarında elektrolit olarak 0,1 M KCl içerisinde 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi için elde edilen (A) DV eğrileri ve (B) EIS spektrumları.

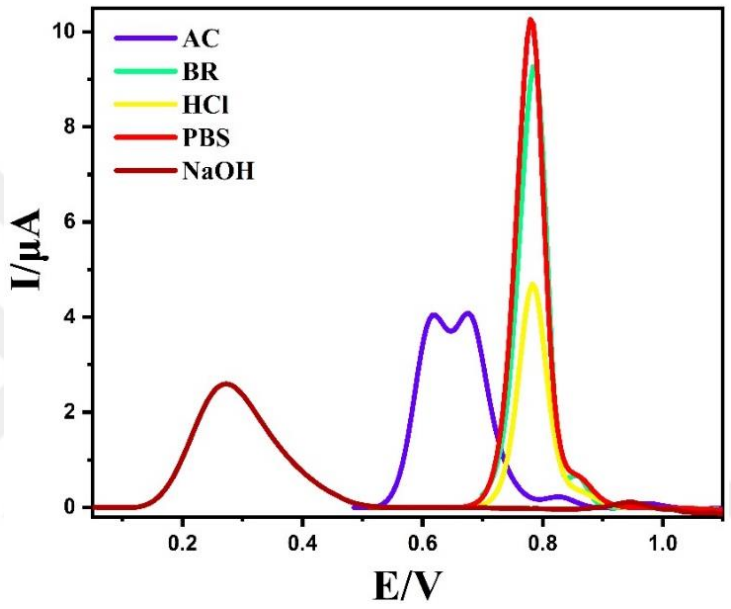
Ayrıca, çıplak ve modifiye edilmiş CPE'nin aktif yüzey alanları, 0,1 M KCl ve 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde kaydedilen DV incelenmesiyle değerlendirildi ve tarama hızı (v) 10 ile 300 mV/s arasında değiştirildi (Şekil 3.44). Pik akımları, tarama hızının karekökü ile orantılı olarak artmış ve bu durum, bu elektrotlar üzerindeki redoks sürecinin difüzyonla kontrol edildiğini önermektedir. Randles–Sevcik denklemi kullanılarak, Ip ile $v^{1/2}$ grafiğinin eğimleri ve $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ için difüzyon katsayısı (D) değeri ($7,6 \times 10^{-6}$ cm² s^{-1}) kullanılarak, elektroaktif yüzey alanları çıplak CPE için 0,06 cm² ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE için 0,13 cm² olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC ile modifiye edilmiş elektrotun elektroaktif yüzey alanının çıplak CPE'ye kıyasla yaklaşık iki kat daha fazla olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.44. 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl varlığında farklı tarama hızlarında kaydedilen DV eğrileri: boş CPE (A) ve CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE (B)

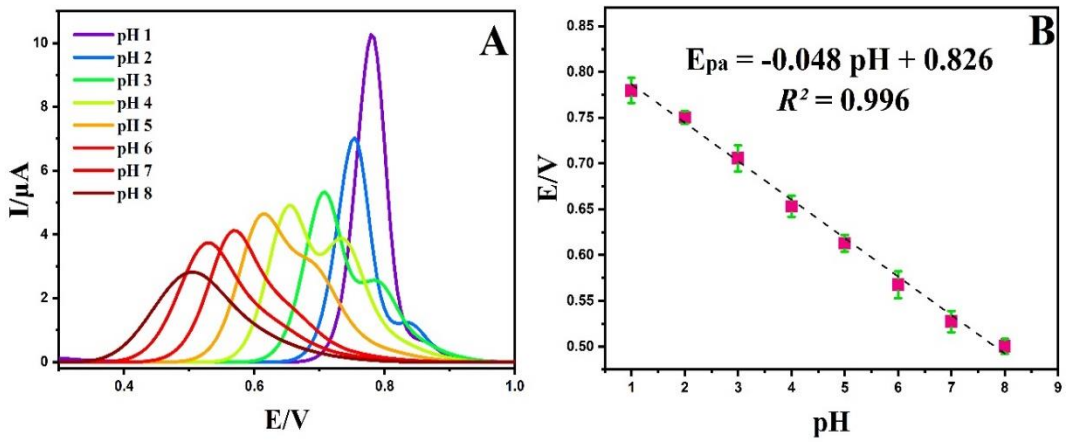
3.2.2.3. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

RIBO'nin Ipa yanıtı üzerindeki elektrolitlerin etkisini değerlendirmek amacıyla, farklı destek ortamları olarak fosfat tamponlu salin (FT), asetat tamponu (AC), sodyum hidroksit (NaOH), Britton-Robinson (BR) tamponu ve hidroklorik asit (HCl, 0,1M) incelenmiştir. Şekil 3.45, RIBO için en yüksek ve geliştirilmiş Ipa yanıtının FT çözeltisinde gözlemlendiğini göstermektedir. Bu nedenle, tüm elektrokimyasal ölçümler 0,1 M FT çözeltisinde gerçekleştirilmiştir.



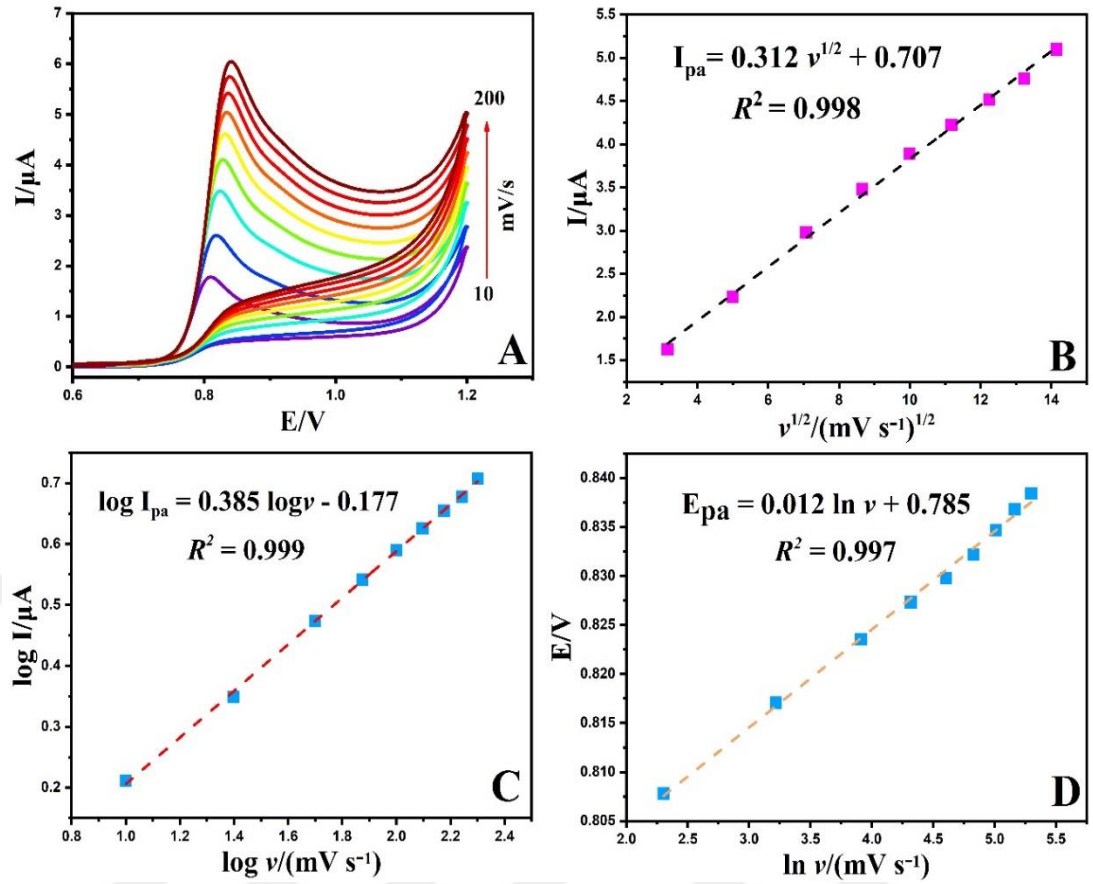
Şekil 3.45. Destek elektrolitinin 0,1 mM RIBO'nun oksidasyon pik akımları üzerindeki etkisi

Ayrıca, FT çözeltilerindeki değişen pH değerlerinin RIBO'nin oksidasyon pik akımı ve potansiyeli üzerindeki etkisi, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE kullanılarak 1,0'dan 8,0'a kadar olan pH aralığında incelenmiştir. Şekil 3.46, farklı pH seviyelerinde RIBO'nin DPV voltamogramlarını göstermekte olup, RIBO için pik akımının pH 1,0'da en yüksek olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, optimum performans için tüm elektrokimyasal ölçümler 0,1 M FT pH 1,0'de gerçekleştirilmiştir. Pik potansiyeli Epa'nın gözlemlenen kaymasının, artan pH ile daha negatif bir yönde değişmesi, süreçte protonların rol aldığını önermektedir. Bu kayma, şu denklemi tanımlayan lineer bir ilişki izlemekte olup: Epa (V) = (-0,048 ± 0,001) pH + (0,826 ± 0,006) ve yüksek bir korelasyon katsayısı (0,996) sergilemektedir (Şekil 3.46.B). Gözlemlenen 0,048 V/pH eğimi, RIBO'nin oksidasyonunda yer alan proton ve elektron sayısının yaklaşık olarak eşit olduğunu göstermektedir. Bu değerin teorik 0,059 V/pH değerinden sapması, transfer sürecinde neredeyse eşit sayıda elektron ve protonun yer aldığını önermektedir.



Şekil 3.46. (A) 0,1 mM RIBO içeren 0,1 M FT ortamında farklı pH değerlerinde (1,0'den 8,0'e kadar) elde edilen CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE üzerindeki DPV'ler ve (B) pik akımlarının pH'ye bağlı değişimi

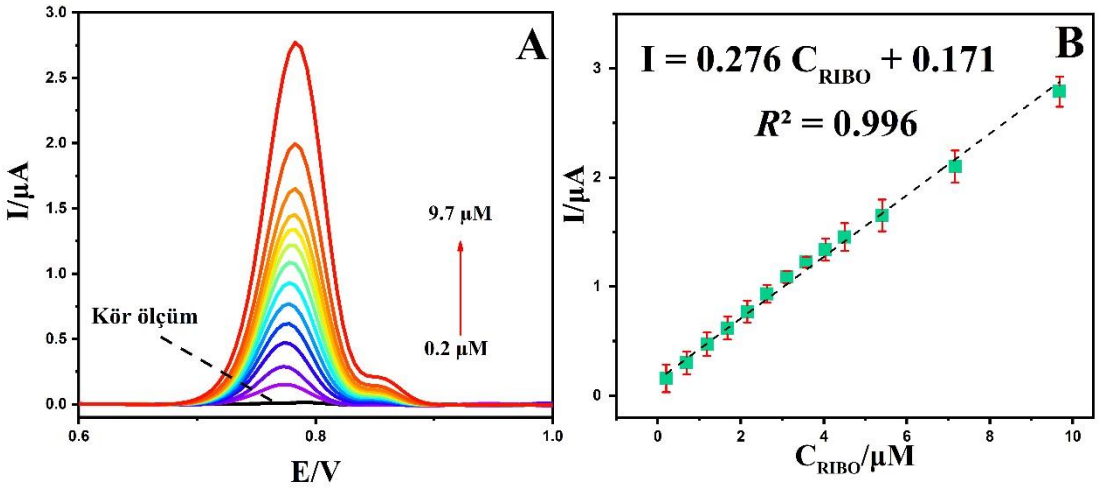
RIBO'nin elektrokimyasal davranışının tarama hızı üzerindeki etkisi, 0,1 M FT pH 1,0 ve 0,1 mM RIBO içeren bir çözeltide DV kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.47.A'da gösterildiği gibi, tarama hızı 10 mV/s'den 200 mV/s'ye yükseldiğinde, oksidasyon pik potansiyelinde hafif bir pozitif kayma gözlemlenmiştir. Epa'daki bu küçük pozitif kayma, RIBO'nin elektrot süreçlerinin geri döndürülemez doğası ile ilişkilendirilmektedir. Anodik pik akımı (Ipa) ile tarama hızlarının karekökü (υ½) arasındaki grafik, lineer bir ilişki göstermekte olup, RIBO'nin elektrot yüzeyindeki elektrooksidasyonunun difüzyon tarafından kontrol edildiğini ortaya koymaktadır (Şekil 3.47.B). Lineer regresyon analizi ile elde edilen denklem şu şekildedir: Ipa (µA) = (0,312 ± 0,005) υ½ + (0,707 ± 0,057), R^2 değeri 0,998'dir. Ayrıca, anodik pik akımının logaritması ile tarama hızının logaritması arasındaki grafiğin eğimi (Şekil 3.47.C), difüzyon kontrollü süreçler için teorik değer olan 0,5'den biraz daha az olan 0,385 olarak bulunmuştur. Bu durum, difüzyon kontrollü bir mekanizmayı işaret etmektedir. Bu ilişki şu denklemle tanımlanmaktadır: log Ipa (µA) = (0,385 ± 0,003) log υ (mV s^{-1}) – (0,177 ± 0,007); R^2 = 0,999. Anodik pik potansiyeli ile tarama hızının doğal logaritması arasındaki lineer ilişkinin eğimine (Şekil 3.47.D) ve Laviron teorisine dayanarak, transfer edilen elektron sayısının (n) yaklaşık 2 olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, protonların transfer sayısının elektron sayısı ile eşit olduğu çıkarımında bulunulmuştur. Bu nedenle, RIBO'nin elektrot reaksiyonu sırasında iki proton ve iki elektron transfer ettiği varsayılabilir.



Şekil 3.47. 0,1 mM RIBO içeren FT çözeltisinde, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE üzerinde 10–200 mV/s aralığında farklı tarama hızlarında kaydedilen DV eğrileri (A), Ipa ile $\upsilon^{1/2}$ (B), log Ipa ile log υ (C) ve Epa ile ln υ (D) arasındaki grafikler

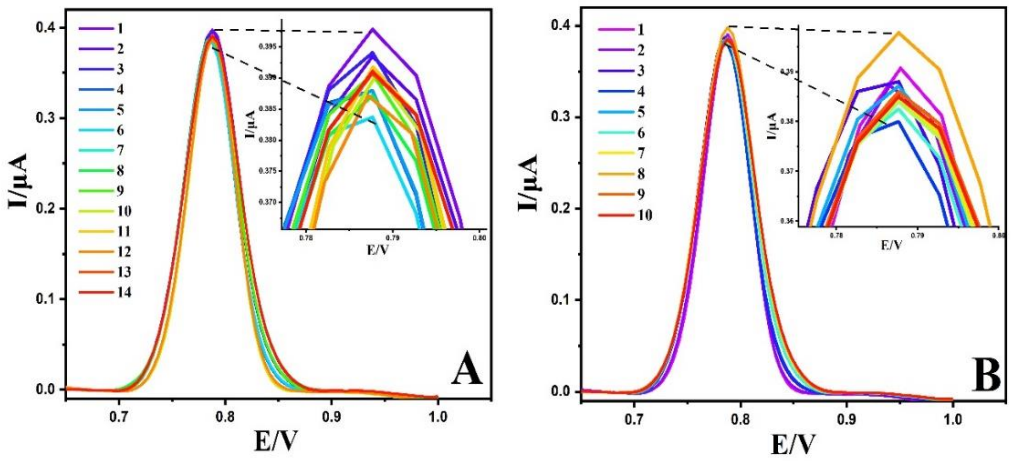
3.2.2.4. Modifiye Edilmiş Sensörün Analitik Performansının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, önerilen CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE sensörü kullanılarak RIBO konsantrasyonunu kantitatif olarak değerlendirmek için DPV yöntemi uygulanmıştır. Şekil 3.48.A, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE sensörü ile farklı RIBO konsantrasyonlarındaki DPV yanıtlarını göstermektedir. Kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.48.B), RIBO konsantrasyonu ile pik akımı (Ipa) arasında 0,2–9,7 μM aralığında lineer bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Bu ilişki, şu lineer regresyon denklemi ile tanımlanmıştır: I = 0,276 C + 0,171 (R^2 = 0,996). RIBO için TS ve TAS sırasıyla 0,025 μM ve 0,08 μM olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC kompoziti, geniş bir algılama aralığı ve düşük TS ile RIBO belirleme konusunda umut verici bir sensör malzemesi olarak öne çıkmaktadır.



Şekil 3.48. (A) 0,1 M FT (pH 1,0) çözeltisinde, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE ile 0,2–9,7 µM RIBO konsantrasyon aralığında elde edilen DPV eğrileri ve (B) pik akımı ile RIBO konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon grafiği

Ayrıca, geliştirilen CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE'nin tekrar edilebilirliği, aynı modifiye elektrot kullanılarak FT çözeltisinde (0,1 M, pH 1,0) 1 µM RIBO için 14 ölçüm gerçekleştirilerek değerlendirildi (Şekil 3.49.A). Elde edilen BSS değeri %0,8 olarak hesaplandı, bu da modifiye sensörün olağanüstü tekrar edilebilirliğini göstermektedir. Geliştirilen metodun yeniden üretilebilirliğini değerlendirmek amacıyla, FT çözeltisinde (0,1 M, pH 1,0) 0,1 µM RIBO'nin elektrokatalitik oksidasyonu, bağımsız olarak üretilen on adet CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE elektrodu kullanılarak incelendi (Şekil 3.49.B). Elde edilen bulgular, pik akımının BSS değeri %1,2 olduğu dikkate alındığında belirgin bir yeniden üretilebilirlik göstermektedir. Bu sonuçlar, önerilen sensörün sensörler arası değişkenliği etkili bir şekilde minimize ettiğini göstermektedir.



Şekil 3.49. CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE'nin tekrarlanabilirlik (A) ve yeniden üretilebilirlik (B) grafikleri

Önerilen elektrokinetik platformun seçiciliği, FT tamponunda pH 1,0'da RIBO çözeltisine %100 oranında fazlasıyla müdahale eden türlerin eklenmesiyle değerlendirildi (Çizelge 3.9). Elde edilen sonuçlar, potasyum klorür, L-arginin, L-metiyonin, sodyum sülfat, potasyum nitrat, D-glukoz, dopamin, ürik asit ve askorbik asidin RIBO tayininde herhangi bir müdahalede bulunmadığını göstermiştir. Bu türler, en yüksek konsantrasyonlarında bile RIBO sinyal hassasiyetine göre akımda kabul edilebilir bir hata payı olan ±%4'ü koruyarak önemli bir müdahale göstermemiştir. Ayrıca, elde edilen BSS değerleri %2'nin altında olup, geliştirilen sensörün olağanüstü seçiciliğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.9. Çeşitli girişimcilerin CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE üzerindeki 1,0 μM RIBO'nin oksidasyon akımı üzerindeki etkisi

Girişimciler	**RIBO: Girişimciler**	**Oksidasyon Akım Değişimi (%)**	**%BSS**
Potasyum klorür	1:100	-2,21	1,34
L-Arginin	1:100	+1,07	0,24
L-Metiyonin	1:100	+1,02	0,73
Sodyum sülfat	1:100	-1,30	0,71
Potasyum nitrat	1:100	-0,33	0,16
D-Glukoz	1:100	-1,43	1,38
Dopamin	1:100	-0,27	0,63
Ürik asit	1:100	-3,42	1,54
Askorbik asit	1:100	+2,32	0,34

3.2.2.5. Tablet Formuna ve İdrar Numunelerine Uygulanması

RIBO'in gerçek örneklerdeki miktarını belirleme yönteminin etkinliğini değerlendirmek için tablet ve idrar örnekleri incelendi. Miktar belirleme işlemi, standart ekleme yöntemi kullanılarak üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirildi ve sonuçlar Çizelge 3.10.'te özetlendi. Tablo 1'de sunulan verilere göre, geri kazanım oranları %98,6 ile %101,8 arasında değişirken, BSS %0,45 ile %1,96 arasında bulundu. Bu bulgular, sensörün hem farmasötik hem de biyolojik örneklerde RIBO'in miktarını yüksek hassasiyetle belirleme yeteneğini doğrulamaktadır.

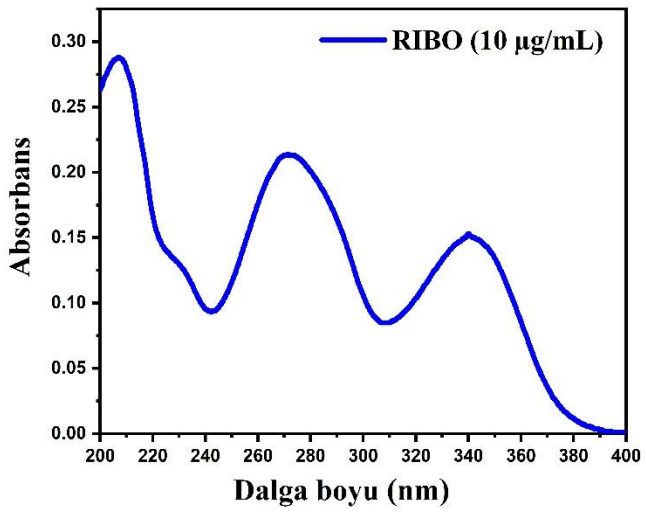
Çizelge 3.10. Gerçek numunelerde RIBO analizi

Numune	Derişim (µM)	Bulunan derişim (µM)	BSS (%)	Geri Kazanım (%)
İdrar	1	1,02	0,47	101,7
	2	2,04	1,25	101,8
	3	2,95	1,36	98,6
Tablet	1	1,01	1,96	100,6
	2	2,03	0,45	101,5
	3	3,01	1,66	100,3

3.2.3. Dogrudan UV-Gör. Spektrofotometrik Yöntemi Kullanılarak RİBO Etken Maddesinin Tayini

3.2.3.1. Geliştirilen Yöntemin Optimizasyonu

UV-spektrofotometri prensibi, çeşitli analizlerin gerçekleştirilmesi için en basit yöntemlerden biridir. Standart RIBO çözeltisi, 200-400 nm aralığında taranmıştır. 271,4 nm'de bir absorbans spektrumu tespit edilmiştir ve bu dalga boyu, sonraki analizler için analitik dalga boyu olarak seçilmiştir. Kaydedilen spektrum, Şekil 3.50.'de gösterilmektedir.



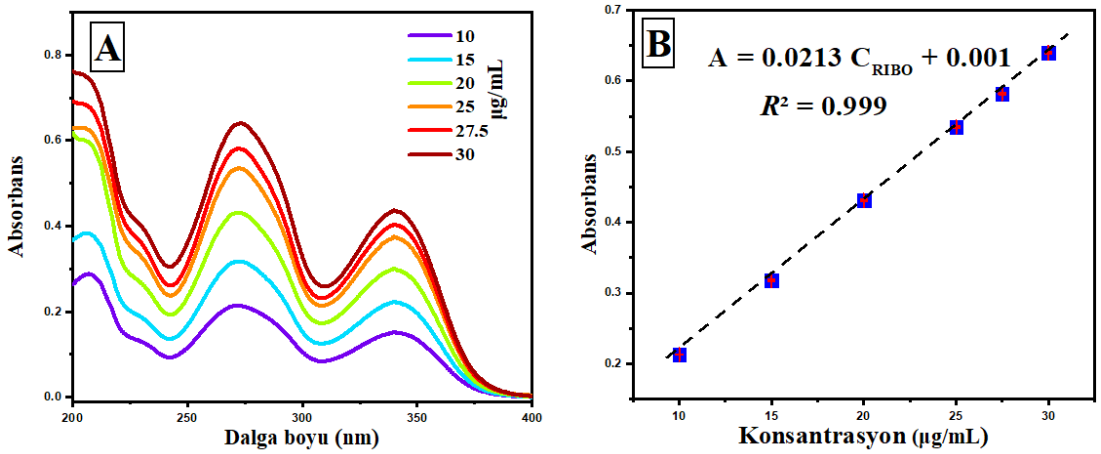
Şekil 3.50. RIBO standart çözeltisinin UV spektrumu (λmax = 271,4 nm)

3.2.3.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Doğrusallık örnekleri, standart stok çözeltisinin çeşitli seyreltilmeleriyle hazırlanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle farklı konsantrasyonlarda ölçülen RIBO yanıtları, doğrusal regresyon denklemleri oluşturmak için analiz edilmiştir. Çizelge 3.11, her bir süreç için temel istatistiksel parametreleri özetlemektedir. Sonuçlar, kaydedilen yanıtlar ile ilaç konsantrasyonları arasındaki mükemmel korelasyonu, yüksek korelasyon katsayıları ile göstermektedir. Ayrıca, Şekil 3.51.'de görsel olarak temsil edilen doğrusal kalibrasyon eğrileri, yöntemin belirtilen konsantrasyon aralığında tutarlı ve orantılı yanıtlar üretebilme yeteneğini açıkça göstermektedir. Hesaplanan TS ve TAS değerleri 0,08 ve 0,271 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, yöntemin yüksek duyarlılığını vurgulayarak, RIBO'yu düşük konsantrasyonlarda güvenilir bir şekilde tespit etme yeteneğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.11. Doğrudan UV-Gör. spektrofotometri ile RIBO için doğrusallık verileri

Doğrusallık Aralığı (µg/ml)	10-30
Kalibrasyon Denklemi	y = 0,0213 x +0,001
Korelasyon Katsayısı (R^2)	0,999
TS (µg/ml)	0,08
TAS (µg/ml)	0,271



Şekil 3.51. Doğrudan UV-Gör. spektrofotometrik yöntem için RIBO spektrumu (10-30 µg/ml)

Önerilen yöntem, doğruluğu 12,5 ve 22,5 µg/mL'lik standart ekleme yöntemi ile nicel olarak belirlemiştir. Farklı tekrar ölçümleri, yüzde geri kazanımın kabul edilen aralıklar içinde olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.12). Elde edilen tüm % BSS değerlerinin ICH onaylı sınırlar içinde olduğu dikkat çekicidir, bu da geliştirilen analitik metodolojinin sağlam doğruluğunu vurgulamaktadır.

Çizelge 3.12. Spektrofotometrik yöntemle RIBO'nin belirlenmesi için elde edilen geri kazanım

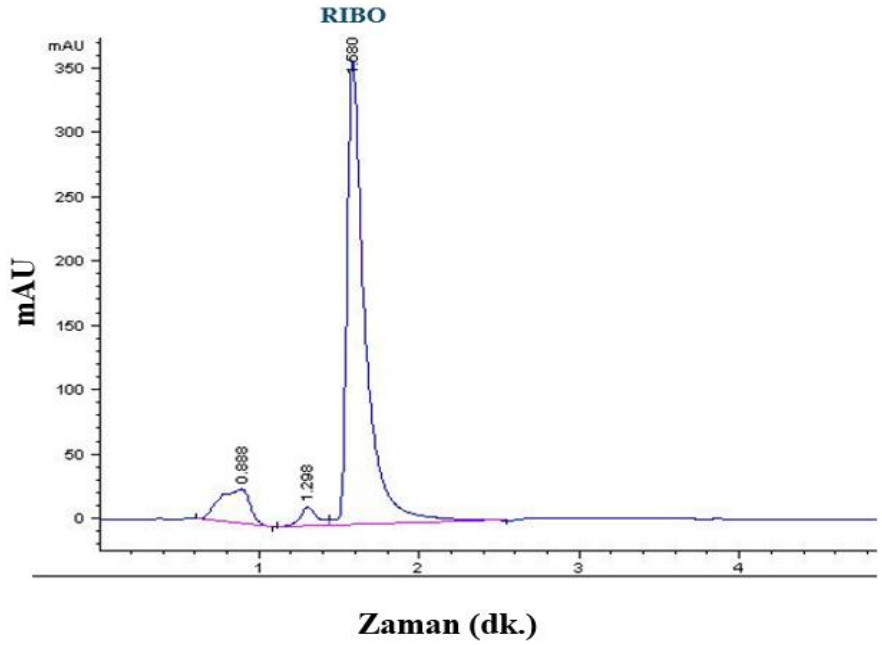
Numune	Eklenen RIBO (µg/mL)	Bulunan RIBO (µg/mL)	Ortalama Geri Kazanım %	BSS %
1	12,5	12,7		
2	12,5	12,8		
3	12,5	12,7	102,0	0,21
1	22,5	2,26		
2	22,5	2,25	100,5	0,36
3	22,5	2,26		

Altı standart RIBO çözeltisi, spektrofotometrik yöntem kullanılarak gün içi ve günler arası kesinlik değerlendirmesi için analiz edilmiştir. Gün içi kapsamında, ICH sınırları olan ±2% içinde hesaplanan % BSS, %0,86 olarak bulunmuş ve bu da önerilen yöntemlerin kesinliğini önemli ölçüde güvence altına almıştır. Günler arası kesinlik performansı ve spektrofotometrik yöntemde altı tekrar ölçümünün yanıtı için % BSS, kabul edilebilir aralıklar içinde (1,02 %) kalmıştır. Bu sonuçlar, yöntemlerin yüksek kesinlikte olduğunu ve analitik güvenilirliklerini gösterdiği gibi, analitik uygulamalar için güçlü bir temel oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

3.2.4. YPSK Yöntemi Kullanılarak RIBO Etken Maddesinin Tayini

3.2.4.1. Geliştirilen Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu

RIBO'nun hem saf standardı (A) hem de tablet formülasyonu (B) için YPSK yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu amacıyla kapsamlı bir çalışma yürütülmüştür. Bu kapsamda çeşitli kromatografik koşullar sistematik bir şekilde değerlendirilmiş ve optimize edilmiş parametreler aşağıda sunulmuştur. Hareketli faz bileşimi olarak %0,1 asetik asit içeren su (50:50, h/h) ile asetonitril karışımı (50:50, h/h), sabit 1 mL/dk akış hızıyla kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Analitik işlemde dedektör dalga boyu 260 nm olarak belirlenmiş ve kromatografik sisteme 10 µL enjeksiyon hacmi uygulanarak bir çalışma elde edilmiştir. Bu koşullar altında elde edilen kromatogramlarda, hem RIBO standardı hem de tablet örnekleri için keskin ve ayrışık pikler gözlenmiş; yüksek pik çözünürlüğü ve tekrarlanabilirlik elde edilmiştir. Optimum akış koşullarında üretilen örnek kromatogram Şekil 3.52.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.52. RIBO standart formunun kromatogramı

3.2.4.2. Geliştirilen Kromatografik Yöntemin Validasyonu

Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) kılavuzlarına uygun olarak, geliştirilen yöntemler; sağlamlık, doğruluk, kesinlik, doğrusallık, duyarlılık ve stabilite parametreleri açısından valide edilmiştir.

Metodun sağlamlığı; dedektör dalga boyu, kolon sıcaklığı, akış hızı, ve hareketli faz kompozisyonu gibi kritik parametrelerde yapılan küçük, kontrollü değişikliklere rağmen analitik sonuçların tutarlılığını koruduğunu göstermiştir. Akış hızı 1,0 mL/dk'den ±0,1 mL/dk sapmalarla 0,9 ve 1,1 mL/dk olarak test edildiğinde, yöntem performansında yalnızca sınırlı düzeyde değişim gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, kolon sıcaklığı 25 °C'den ±5 °C değiştirilerek 15 °C ve 25 °C'de çalışıldığında pik bant genişliği minimal artış göstermiştir. Dalga boyu ±2 nm sapmalarla test edildiğinde sinyal şiddeti ve pik şekli kriterleri korunmuştur. Bu doğrultuda, yöntem tüm test edilen koşullarda değişkenliğe karşı dayanıklılığını Çizelge 3.13.'de sunulan ampirik verilerle desteklenmiştir.

Çizelge 3.13. RIBO yönteminin sağlamlık değerlendirmesi

Parametre		Alıkonma Süresi (dk)	
		Standart	Numune
Dedeksiyon dalga boyu (nm)	258	1,579	1,573
	260	1,580	1,579
	262	1,576	1,586
Kolon sıcaklığı (°C)	15	1,356	1,589
	25	1,580	1,579
	30	1,486	1,592
Akış Hızı (mL/dk)	1.4	1,756	1,698
	1.5	1,580	1,579
	1.6	1,254	1,125
Hareketli faz kompozisyonu (asetik asit/asetonitril, h/h)	60/40	1,123	1,068
	50/50	1,580	1,579

Doğruluk değerlendirmesi, YPSK yönteminin gerçek değerle bulunan sonuç arasındaki yakınlığını %geri kazanım analizleriyle test etmek amacıyla yürütülmüştür. Düşük, orta ve yüksek seviyelerde bilinen derişimlerde hazırlanan RIBO standardı çözeltileri tablet matrisi içerisine eklenmiş; her bir seviyede üç paralel örnek hazırlanarak, bu örnekler üçer kez YPSK sistemine enjekte edilmiş ve ortalama geri kazanım yüzdeleri hesaplanmıştır. Elde edilen geri kazanım tüm seviyelerde ortalama geri kazanım değerleri %100,2 (0,74 % BSS), %100,3 (0,62 % BSS) ve %99,6 (0,3 % BSS) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.14). Bu geri kazanım değerleri, ICH Q2(R1) kılavuzunun önerisi doğrultusunda ve kabul kriteri olan %98–102 aralığında kalmış, bağıl standart sapma değerleri de ≤ %2 sınırının oldukça altında bulunmuştur. Bu sonuçlar, yöntemin farklı derişim aralıklarında doğru ve güvenilir kantitatif sonuçlar elde etme kabiliyetini açıkça ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, Elde edilen veriler, yöntemin düşük ve yüksek derişim düzeylerinde yüksek doğruluk sergilediğini ve analitin gerçek miktarına oldukça yakın sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur.

Çizelge 3.14. YPSK yöntemiyle RIBO tayini için elde edilen geri kazanım

Numune	Eklenen RIBO, mg/mL	Geri Kazanılan RIBO		Ortalama Geri Kazanım	BSS %
		mg/mL	%		
1	0,01	0,01004	100,4	100,2	0,74
2	0,01	0,00994	99,4		
3	0,01	0,01006	100,8		
1	0,2	0,19922	99,6	100,3	0,62
2	0,2	0,20160	100,8		
3	0,2	0,20104	100,5		
1	0,4	0,39835	99,6	99,6	0,3
2	0,4	0,39948	99,9		
3	0,4	0,39713	99,3		

Bu çalışmada, YPSK yöntemi kullanılarak altı RIBO standart çözeltisi analiz edilmiştir ve bir gün içinde ile günler arası kesinlik değerlendirilmiştir. Gün içi analizinde, ICH limitleri olan ±%2 içinde hesaplanan %BSS değeri %0,13 bulunmuş, bu da önerilen yöntemlerin hassasiyetini önemli ölçüde güvence altına almıştır. Altı günlük bir aranın ardından yapılan ara ke analizinde, RIBO standardı ile farmasötik hazırlık arasında belirgin farklar gözlemlenmiştir. RIBO standardı, altı gün boyunca yalnızca %0,08'lük minimal bir değişim göstermiştir, bu da belirtilen depolama koşulları altında yüksek derecede kararlılığı işaret etmektedir. Sonuç olarak, hem kısa vadeli hem de uzun vadeli ölçümlerde elde edilen düşük varyasyon değerleri, geliştirilen yöntemin yüksek düzeyde tekrarlanabilir ve güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Doğrusallık örnekleri, bir standart stok çözeltisinin çeşitli seyreltmeleri ile hazırlanmıştır. Geliştirilen yöntemler kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki RIBO'nin ölçülen yanıtları, doğrusal regresyon denklemleri oluşturmak için analiz edilmiştir. Çizelge 3.15., her işlem için temel istatistiksel parametreleri özetlemektedir. Yöntemin duyarlılığı, TS ve TAS değerlendirilmesiyle başarıyla belirlenmiştir. Hesaplanan TS değeri 0,012 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, yöntemlerin yüksek duyarlılığını vurgulamakta ve RIBO'yi düşük konsantrasyonlarda güvenilir bir şekilde tespit etme yeteneklerini ortaya koymaktadır. Bu duyarlılık seviyesi, özellikle düşük analit konsantrasyonları içeren örneklerle çalışırken yöntemlerin farmasötik ve kimyasal analizlerdeki etkinliği için hayati öneme sahiptir.

Çizelge 3.15. RIBO için YPSK yöntemiyle doğrusallık verileri

Doğrusallık Aralığı (µg/ml)	10-400
Kalibrasyon Denklemi	y =7,279 x – 39,66
Korelasyon Katsayısı (R^2)	0,9995
TS (µg/ml)	0,012
TAS (µg/ml)	0,04

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, ALP ve RİBO adlı iki önemli antikanser ajanın elektroanalitik, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle hassas ve seçici bir şekilde tayini başarıyla gerçekleştirilmiştir. Tezin öneri aşamasında belirlenen hedeflere tam anlamıyla ulaşılmış ve her iki bileşik için geliştirilen yöntemler, gerçek örneklerde (ilaç, plazma, idrar) başarıyla uygulanmıştır. Yöntemlerin performans parametrelerinin kıyaslandığı Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2, her bir yöntemin TS, doğrusal aralık, uygulama matriksi ve geri kazanım oranları gibi önemli özelliklerini sunmaktadır.

ALP elektrokimyasal tayinine yönelik literatürde ilk kez gerçekleştirilen özgün sensör çalışmaları kapsamında, iki farklı elektrot modifikasyonu ile yüksek duyarlılığa sahip analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan ilki, GCE yüzeyinin MWCNTs, demir oksit (Fe_3O_4) ve bakır-alüminyum spinel ($CuAl_2O_4$) ile modifiye edilmesiyle elde edilen sensördür. Bu yapı, ALP'in elektrokimyasal davranışını belirlemede yüksek verim göstermiştir. DPV tekniği ile yapılan ölçümlerde, 0,036 µM gibi düşük bir TS elde edilmiş; doğrusal yanıt aralığı ise 0,5–13,6 µM olarak belirlenmiştir. Ayrıca ticari tablet formülasyonlarının yanı sıra insan plazması ve idrarı gibi biyolojik örnek matrislerinde de başarıyla uygulanmış ve %98,57–102,6 aralığında yüksek geri kazanım oranları sağlanmıştır.

İkinci olarak, PEDOT:PSS ile modifiye edilen CPE tabanlı sensör geliştirilmiş; bu yapı ile daha da düşük bir TS olan 0,0048 µM seviyelerine ulaşılmış ve doğrusal çalışma aralığı 0,01–5,0 µM arasında belirlenmiştir. Bu elektrot da aynı şekilde farklı matrislerde test edilerek, özellikle ultra-düşük düzeylerde ALP tayininde yüksek seçicilik ve tekrarlanabilirlik göstermiştir.

Spektrofotometrik analizlerde ise ALP, maksimum absorbans dalga boyasında belirgin sinyaller vermiş, 10–40 µM doğrusal aralıkta yüksek korelasyon katsayısı elde edilmiştir. Yöntemin TS 0,078 µM olarak hesaplanmış ve tabletlerdeki uygulamalarda %99,2–100,2 arasında değişen yüksek geri kazanım oranları ile yöntemin geçerliliği desteklenmiştir. Bu yöntem, düşük maliyetli ve hızlı oluşuyla rutin analizler için uygun bir alternatif olarak değerlendirilmiştir.

YPSK yöntemiyle gerçekleştirilen çalışmalarda, ALP'in 100–600 µM aralığında doğrusal yanıt verdiği belirlenmiş ve 14 µM TS ile özellikle yüksek konsantrasyonlu örneklerde hassas ölçüm olanağı sağlanmıştır. Yöntem, ICH validasyon kriterlerine uygun

olarak değerlendirilmiş; kısa analiz süresi, yüksek tekrarlanabilirlik ve formülasyondaki yardımcı maddelerden etkilenmeme avantajlarıyla öne çıkmıştır. Tablet formülasyonlarında %99,9–101,1 oranında yüksek geri kazanım elde edilmiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen tüm yöntemlerin ALP analizi için hem özgün hem de güvenilir alternatifler sunduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. ALP için geliştirilen yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirmesi

Parametre	**Elektrokimyasal Yöntem (MWCNTs@Fe_3O_4 @$CuAl_2O$/GCE)**	**Elektrokimyasal Yöntem (PEDOT:PSS/CPE)**	**UV-Gör. Spektrofotometri**	**YPSK Yöntemi**
TS (µM)	0,036	0,0048	0,078	14
Doğrusal Aralık (µM)	0,5–13,6	0,01–5,0	10-40	100-600
Uygulama Matriksi	Ticari plazma, idrar ve tablet	Ticari plazma, idrar ve tablet	Tablet	Tablet
Geri Kazanım (%)	98,57-102,6	96,69-101,3	99,2-100,2	99,9-101,1
Yöntem Özellikleri	- Düşük TS ve geniş aralık. - Biyolojik örneklere doğrudan uygulanabilirlik.	- Ultra düşük TS (nM düzeyinde). - Biyolojik örneklere doğrudan uygulanabilirlik.	- Hızlı ve düşük maliyetli. - Basit örnek hazırlama.	-Yüksek doğruluk ve kesinlik. - Yaygın ve kabul görülmüş yöntem.

Benzer şekilde, RIBO için de elektrokimyasal tayin yöntemi ilk kez bu tez kapsamında geliştirilmiştir. MWCNTs ile modifiye edilmiş GCE elektrot, RIBO'in voltametrik analizi için başarılı bir sensör platformu sunmuştur. DV ve DPV teknikleriyle yapılan analizlerde, RIBO'in karakteristik oksidasyon pikleri belirgin bir şekilde gözlemlenmiş; lineer aralık 0,01–5,0 µM, TS ise 0,00069 µM olarak hesaplanmıştır. Elektrot, hem farmasötik ürünlerde hem de biyolojik örneklerde yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik göstermiştir.

Ayrıca CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE ile modifiye edilmiş CPE kullanılarak geliştirilen farklı bir elektrot yapısı, lineer aralık 0,2–9,7 µM arasında gerçekleşmiştir ve 0,025 µM gibi oldukça düşük bir teşhis sınırıyla RİBO'un ultra-duyarlı tayinine olanak sağlamıştır. Geliştirilen bu yöntemler, hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik örneklerde (idrar)

başarılı bir şekilde uygulanmış ve yüksek geri kazanım yüzdeleri elde edilmiştir (% 98,6-101,8).

RIBO'in spektrofotometrik tayininde, maksimum absorbans değerinde elde edilen kalibrasyon eğrisi doğrusal olup, korelasyon katsayısı oldukça yüksek bulunmuştur (R^2 > 0,999). TS düşük seviyelerde (0,08 µg/mL) hesaplanmış, bu da yöntemin yüksek duyarlılığını ortaya koymuştur. Tablet örneklerinde yapılan analizler sonucunda, geri kazanım oranları %100,5 ile %102,0 arasında değişmiş ve yöntem validasyon kriterlerini başarıyla karşılamıştır.

YPSK yöntemiyle yapılan analizlerde ise, yüksek çözünürlük, kısa sürede ayrılma ve stabilite testlerinde başarı sağlanmıştır. YPSK ile belirlenen teşhis sınırı, 0,012 µg/mL olarak hesaplanmış ve yöntem, tablet içerisindeki yardımcı maddeler varken bile doğru ve kesin sonuçlar vermiştir. Tablet formülasyonlarında %99,6–101,3 oranında yüksek geri kazanım elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. RİBO için geliştirilen yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirmesi

Parametre	**Elektrokimyasal Yöntem (MWCNTs/GCE)**	**Elektrokimyasal Yöntem (CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE)**	**UV-Gör. Spektrofotometri**	**YPSK Yöntemi**
TS (µM)	0,00069	0,025	0,08	0,012
Doğrusal Aralık (µM)	0,01-5,0	0,2-9,7	10-30	10-400
Uygulama Matriksi	Ticari plazma, idrar ve tablet	İdrar ve tablet	Tablet	Tablet
Geri Kazanım (%)	97,07-103,1	98,6-101,8	100,5-102,0	99,6-100,3
Yöntem Özellikleri	-Düşük TS ve geniş aralık. -Biyolojik örneklere doğrudan uygulanabilirlik.	-Stabil ve tekrar kullanılabilir elektrot. -Geniş aralık. -Biyolojik örneklere doğrudan uygulanabilirlik.	- Hızlı ve düşük maliyetli. - Basit örnek hazırlama.	-Düşük teşhis sınırı ve geniş aralık. -Yüksek doğruluk ve kesinlik. - Yaygın ve kabul görülmüş yöntem.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışmasında, ALP ve RİBO konsantrasyonlarını hassas bir şekilde belirlemek amacıyla elektrokimyasal yöntemle ilk kez ilk hassas bir şekilde tespit edilmesidir. Elektrokimyasal analizlerde, özellikle DPV ve DV teknikleri, etken maddelerin tespiti ve karakterizasyonu için etkili bir şekilde kullanılmıştır. DPV, yüksek duyarlılık ve düşük tespit limitleri sunarak RIBO ve ALP'nin izlenmesinde hassasiyet sağlarken, DV ise elektrot yüzeylerinin redoks davranışlarını ve etken maddelerin elektrokimyasal özelliklerini anlamada önemli bilgiler sunmuştur. Bu iki yöntem, elektrokimyasal sensörlerin performansını değerlendirmek için kritik rol oynamış ve her iki etken maddesinin farmasötik örneklerde ve biyolojik numunelerde doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlamıştır.

Elektrot modifikasyonu, ALP ve RIBO tespiti için elektrokatalitik aktiviteyi ve hassasiyeti artırmak amacıyla farklı nanokompozitlerin GCE ve CPE immobilize edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sentezlenen kompozitlerin yapısal ve morfolojik özelliklerini doğrulamak için FT-IR, XRD, SEM-EDX ve BET analizleri gibi çeşitli teknikler kullanılmıştır.

RIBO ve ALP'nin tespiti için farklı modifiye elektrotlar (MWCNTs@Fe_3O_4@$CuAl_2O_4$/CPE, PEDOT:PSS/CPE, CuCoFe-MOF/$CoFe_2O_4$/BPAC/CPE, MWCNTs/GCE) kullanılarak geliştirilmiş ve her iki etken madde için düşük tespit limitleri ile yüksek duyarlılık elde edilmiştir. Bu sensörler, farmasötik örneklerde yüksek hassasiyetle çalışırken, hızlı yanıt süreleri ve düşük interferans özellikleri ile dikkat çekmiştir. Ayrıca, farmasötik formlarda ve biyolojik numunelerde elde edilen iyi geri kazanım değerleri, sensörlerin bu numunelere başarılı bir şekilde uygulanabildiğini göstermiştir.

UV-Gör. spektrofotometrik analiz yöntemi, ALP ve RIBO için karakteristik absorbans spektrumlarını kullanarak her iki etken maddenin doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlamıştır. Bu yöntem, özellikle düşük miktarlarda bile yüksek doğrulukla sonuç elde edilmesini mümkün kılmaktadır. UV-Gör. spektrofotometri, pratikte hızlı, ekonomik ve kolay uygulanabilir bir alternatif sunmaktadır. Özellikle, etken maddelerin morfolojik veya kimyasal yapılarındaki belirgin absorbans pikleri üzerinden tespit yapılarak, RIBO ve ALP'nin farmasötik formülasyonlarda hızlı bir şekilde analiz edilmesi sağlanmıştır. Bu analizlerin avantajları arasında düşük maliyet, basit işlem adımları ve kısa işlem süresi yer almaktadır, bu da farmasötik numunelerde rutin kalite kontrol analizleri için ideal bir yöntem oluşturur.

YPSK ise, özellikle karmaşık farmasötik örneklerde RIBO ve ALP'nin tespitinde yüksek çözünürlük ve doğruluk sağlamaktadır. YPSK analizi, optimize edilmiş kolon koşulları ve uygun hareketli fazlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle, RIBO ve ALP'nin konsantrasyonları, farmasötik numunelerde hassas bir şekilde belirlenmiştir. YPSK'nin sağladığı yüksek çözünürlük, etken maddelerin diğer bileşenlerden etkili bir şekilde ayrılmasına olanak tanımıştır, bu da doğru ve güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada geliştirilen elektrokimyasal sensörler, UV-Gör. spektrofotometrik ve YPSK yöntemleri ile birlikte, biolojik ve farmasötik örneklerde RIBO ve ALP'nin tespiti için etkili ve güvenilir analiz yöntemleri sunmaktadır. Geliştirilen sensörler ve analiz yöntemleri, düşük tespit limitleri, yüksek doğruluk, maliyet etkinlik ve pratik uygulanabilirlik gibi üstün performans özellikleriyle öne çıkmıştır.

Bu çalışmada geliştirilen elektrokimyasal sensörler ve analiz yöntemlerinin, farmasötik endüstri ve klinik uygulamalar için önemli potansiyel sunduğu gözlemlenmiştir. Bu tür sensörlerin daha geniş bir yelpazede uygulanabilmesi için, farklı etken maddeler ve biyolojik örnekler üzerinde ek çalışmalar yapılması önerilmektedir. Özellikle, elektrokimyasal sensörlerin çeşitli farmasötik formülasyonlarda ve farklı biyolojik matrikslere uyarlanabilirliğinin araştırılması, bu sensörlerin daha da yaygın kullanımını mümkün kılacaktır. İleriye dönük olarak, sensörlerin farklı farmasötik sınıflarda ve kombinasyon tedavilerinde etkinliğinin araştırılması, daha fazla klinik uygulama fırsatı sunabilir.

KAYNAKLAR

Ahmed, H. E. H., Ozalp, O., & Soylak, M. (2023). Magnetic solid phase extraction of lead (II) from food and water samples on magnetic MWCNTs/MgAl2O4/TiO2. *Journal of Food Composition and Analysis*, *118*, 105163. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105163

Ahmadi, S., & Ganjidoust, H. (2021). Using banana peel waste to synthesize BPAC/ZnO nanocomposite for photocatalytic degradation of Acid Blue 25: Influential parameters, mineralization, biodegradability studies. Journal of Environmental Chemical Engineering, 9(5), 106010.https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106010

Alam, A., Farooq, U., Singh, R., Dubey, V., Kumar, S., Kumari, R., Kumar, K., Naik, B., & Dhar, K. (2018). Chemotherapy treatment and strategy schemes: A review. *Open Access Journal of Toxicology*, *2*(5). DOI: 10.19080/OAJT.2018.02.555600.

Alshogran, O. Y., Al-Shdefat, R., & Hailat, M. (2023). Simple and rapid quantification of ribociclib in rat plasma by protein precipitation and LC-MS/MS: An application to pharmacokinetics of ribociclib nanoparticles in rats. *Journal of Mass Spectrometry*, *58*(12), e4984. https://doi.org/10.1002/jms.4984

Anand, U., Dey, A., Chandel, A., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimalla, R., & Chaudhary, A. (2022). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. Genes Dis, 10(4), 1367-1401. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007

Attwa, M. W., Abdelhameed, A. S., & Kadi, A. A. (2023). A Sensitive, Green, and Fast LC–MS/MS Analytical Method for the Quantification of Ribociclib: Evaluation of the Metabolic Stability in HLMs. *Separations*, *10*(9), 472. https://doi.org/10.3390/separations10090472

Badzoka, J., Kappacher, C., Lauß, J., Obwaller, L., Pavun, A., & Huck, C. W. (2025). Enabling analytical precision in microplastic analysis: innovative solutions for precise method validation, evaluation and quality control. *Microplastics and Nanoplastics*, *5*(1), 2. https://doi.org/10.1186/s43591-024-00108-3

Baghermanesh, S. S., Barati, M., & Hosseini, A. (2024). The effect of ribociclib on the expression levels of miR-141 and CDK4/6-USP51 signaling pathway genes in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *PloS One*, *19*(8), e0309289. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309289

Behnamian, Y., Aghaie, E., Serate, D., Tolentino, Z., Niazi, H., & Mostafaei, A. (2022). Synthesis, characterization, and photocatalytic activity of $CuAl_2O_4$–Ag nanocomposite for water treatment. *Ceramics International*, *48*(19), 27988-27994. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.06.103

Bortolozzi, R., Mattiuzzo, E., Trentin, L., Accordi, B., Basso, G., & Viola, G. (2018). Ribociclib, a Cdk4/Cdk6 kinase inhibitor, enhances glucocorticoid sensitivity in B-acute lymphoblastic leukemia (B-All). Biochemical Pharmacology, 153, 230-241. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.050

Castillo-Hernández, G., Mayén-Hernández, S., Castaño-Tostado, E., DeMoure-Flores, F., Campos-González, E., Martínez-Alonso, C., & Santos-Cruz, J. (2018). CuAlO2 and $CuAl_2O_4$ thin films

obtained by stacking Cu and Al films using physical vapor deposition. *Results in Physics*, *9*, 745-752. https://doi.org/10.1016/j.rinp.2018.03.046

Chen, A., & Chatterjee, S. (2013). Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, *42*(12), 5425-5438. https://doi.org/10.1039/C3CS35518G

Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*, *9*, 20503121211034366. https://doi.org/10.1177/20503121211034366

Foster, M. D., Arnold, M. A., Nichols, J. A., & Bakalyar, S. R. (2000). Performance of experimental sample injectors for high-performance liquid chromatography microcolumns. *Journal of Chromatography A*, *869*(1-2), 231-241. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00957-7

Fritsch, C., Huang, A., Chatenay-Rivauday, C., Schnell, C., Reddy, A., Liu, M., Kauffmann, A., Guthy, D., Erdmann, D., & De Pover, A. (2014). Characterization of the novel and specific PI3Kα inhibitor NVP-BYL719 and development of the patient stratification strategy for clinical trials. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(5), 1117-1129. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00957-7

Gupta, A., & Pathak, S. (2024). Assessment of Analytical Techniques for Precise Quantification of Four Antiviral Drugs in Pharmaceutical Research and Development: A Comprehensive Review. *Current Pharmaceutical Analysis*, *20*(6), 409-424. https://doi.org/10.2174/0115734129302705240703052227

Iqbal, S., Jabeen, F., Kainat, S., Ashraf, S., Hussain, D., Sajid, M. S., Ashiq, M. N., & Najam-ul-Haq, M. (2024). Nanomaterials in electrochemical biosensors. *Handbook of Nanomaterials, 1* (483-511). https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95511-9.00006-8

Irigaray, P., Newby, J., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., & Belpomme, D. (2007). Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *61*(10), 640-658. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.10.006

Jadon, N., Jain, R., Sharma, S., & Singh, K. (2016). Recent trends in electrochemical sensors for multianalyte detection–A review. *Talanta*, *161*, 894-916. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.084

James, A. D., Schiller, H., Marvalin, C., Jin, Y., Borell, H., Roffel, A. F., Glaenzel, U., Ji, Y., & Camenisch, G. (2020). An integrated assessment of the ADME properties of the CDK4/6 Inhibitor ribociclib utilizing preclinical in vitro, in vivo, and human ADME data. Pharmacology Research & Perspectives, 8(3), e00599. https://doi.org/10.1002/prp2.599

Juric, D., Rodon, J., Tabernero, J., Janku, F., Burris, H. A., Schellens, J. H., Middleton, M. R., Berlin, J., Schuler, M., & Gil-Martin, M. (2018). Phosphatidylinositol 3-kinase α–selective inhibition with alpelisib (BYL719) in PIK3CA-altered solid tumors: results from the first-in-human study. *Journal of Clinical Oncology*, *36*(13), 1291. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.710

Kakad, S. B., Kolhe, M. H., & Dukre, T. P. (2020). A review on pharmaceutical validation. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, *11*(3), 338-342. DOI: 10.25258/ijpqa.11.3.6

Krull, I. S., & Swartz, M. (1999). Analytical method development and validation for the academic researcher. In Analytical Letters (Vol. 32, Issue 6, pp. 1067–1080). Marcel Dekker Inc. https://doi.org/10.1080/00032719908542878

Krzyczmonik, P., Socha, E., Skrzypek, S., Soliwoda, K., Celichowski, G., & Grobelny, J. (2014). Honeycomb-structured porous poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) composite layers on a gold electrode. *Thin Solid Films*, *565*, 54-61. https://doi.org/10.1016/j.tsf.2014.06.044

Lim, C. Y., Lee, X., Tran, M. T. C., Markus, C., Loh, T. P., Ho, C. S., Theodorsson, E., Greaves, R. F., Cooke, B. R., & Zakaria, R. (2024). Linearity assessment: deviation from linearity and residual of linear regression approaches. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *62*(10), 1918-1927. doi.org/10.1515/cclm-2023-1354

Liu, Q., Chen, J., Yu, F., Wu, J., Liu, Z., & Peng, B. (2021). Multifunctional book-like CuCo-MOF for highly sensitive glucose detection and electrocatalytic oxygen evolution. New Journal of Chemistry, 45(36), 16714-16721. https://doi.org/10.1039/D1NJ02931B

Loh, K.-S., Lee, Y. H., Musa, A., Salmah, A. A., & Zamri, I. (2008). Use of Fe3O4 nanoparticles for enhancement of biosensor response to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Sensors*, *8*(9), 5775-5791. https://doi.org/10.3390/s8095775

Lv, W., Liu, B., Qiu, Q., Wang, F., Luo, Z., Zhang, P., & Wei, S. (2009). Synthesis, characterization and photocatalytic properties of spinel CuAl2O4 nanoparticles by a sonochemical method. *Journal of Alloys and Compounds*, *479*(1-2), 480-483. https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2008.12.111

Majumder, T., & Gubbiyappa, S. K. (2023). Development and validation of LC-MS/MS method for alpelisib quantification in human plasma: Application to pharmacokinetics in healthy rabbits. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *13*(3), 089-096. DOI: 10.7324/JAPS.2023.75269

Meng, D., He, W., Zhang, Y., Liang, Z., Zheng, J., Zhang, X., Zheng, X., Zhan, P., Chen, H., & Li, W. (2021). Development of PI3K inhibitors: Advances in clinical trials and new strategies. *Pharmacological Research*, *173*, 105900. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105900

Moghaddam, A., Zamani, H. A., & Karimi-Maleh, H. (2021). A new electrochemical platform for dasatinib anticancer drug sensing using Fe3O4-SWCNTs/ionic liquid paste sensor. Micromachines, 12(4), 437. https://doi.org/10.3390/mi12040437

Navashree, N., & Parthasarathy, P. (2023). A comparative study on electrochemical behaviour of various electrolytes by cyclic voltammetry: GCE as electrode material. *Materials Today: Proceedings*. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.05.175

Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., & Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, *59*(6), 365-378. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.01.017

Pletcher, D., Greff, R., Peat, R., & Robinson, J. (2001). Instrumental Methods in Electrochemistry. Woodhead Publishing Limited. https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)87868-x

Porada, R., Jedlińska, K., Lipińska, J., & Baś, B. (2020). Voltammetric sensors with laterally placed working electrodes: A review. Journal of The Electrochemical Society, 167(3), 037536.DOI 10.1149/1945-7111/ab64d6

Privett, B. J., Shin, J. H., & Schoenfisch, M. H. (2010). Electrochemical sensors. *Analytical Chemistry*, *82*(12), 4723-4741. https://doi.org/10.1021/ac101075n

Qureshi, Z., Altaf, F., Safi, A., Khanzada, M., Ghazanfar, A., & Shah, S. (2024). Advancements in breast cancer management: a comprehensive review of ribociclib combined with endocrine therapy. *Annals of Medicine and Surgery*, *86*(12), 7290-7298. http://dx.doi.org/10.1097/MS9.0000000000002730

Reagan, M. (2019). Causes of cancer: Genetic, epigenetic, viral, microenvironmental, and environmental contributions to cancer. *Cancer: Prevention, Early Detection, Treatment and Recovery*, 53-74. https://doi.org/10.1002/9781119645214.ch3

Reuhs, B. L. (2017). High-performance liquid chromatography. *Food analysis*, 213-226. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_13

Royer, B., Kaderbhaï, C. G., & Schmitt, A. (2023). Pharmacokinetics and pharmacodynamic of alpelisib. *Clinical Pharmacokinetics*, *62*(1), 45-53. https://doi.org/10.1007/s40262-022-01195-2

Saini, A., Kumar, M., Bhatt, S., Saini, V., & Malik, A. (2020). Cancer causes and treatments. Int J Pharm Sci Res, 11(7), 3121-3134. http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11(7).3121-34

Santosh, S., Rajagopalan, M. D., Pallavi, B. A., Rudramurthy, G. R., Rajashekar, V., Sridhar, K. A., & Swamy, M. K. (2018). Cancer therapies: current scenario, management, and safety aspects. In Anticancer Plants: Clinical Trials and Nanotechnology, 3, 1-25. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8216-0_1

Schlam, I., Smith, D. M., Peer, C., Sissung, T., Schmidt, K. T., Tan, M., Chitalia, A., Bishopric, N. H., Steinberg, S., & Choo-Wosoba, H. (2024). Pharmacokinetics and pharmacogenomics of ribociclib in black patients with metastatic breast cancer the LEANORA study. *NPJ Breast Cancer*, *10*(1), 84. https://doi.org/10.1038/s41523-024-00692-w

Seo, S.-W., Kim, J.-M., Han, D.-G., Geum, D., Yun, H., & Yoon, I.-S. (2021). A sensitive YPSK-FLD method for the quantification of alpelisib, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in rat plasma: Drug metabolism and pharmacokinetic evaluation in vitro and in vivo. *Journal of Chromatography B*, *1163*, 122508. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122508

Shafiq, M., Sherwani, Z. A., Mushtaq, M., Nur-e-Alam, M., Ahmad, A., & Ul-Haq, Z. (2024). A deep learning-based theoretical protocol to identify potentially isoform-selective PI3Kα inhibitors. Molecular Diversity, 28(4), 1907-1924. https://doi.org/10.1007/s11030-023-10799-0

Sharma, U. D., Kumar, L., & Verma, R. (2022). Selection of stationary phase and mobile phase in high performance liquid chromatography. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, *15*(9), 4325-4332. DOI:10.52711/0974-360X.2022.00726

Shelke, R. U., & Rishipathak, D. D. (2023). Development and validation of a new bioanalytical method for quantification of CDK4/6 inhibitor in Spiked Human Plasma by YPSK-UV. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, *36*(2), 81-86. DOI: 10.2478/cipms-2023-0014

Siddiqui, M. R., AlOthman, Z. A., & Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. Arabian Journal of Chemistry, 10, S1409-S1421. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016

Sobolewska, E., & Biesaga, M. (2023). High-Performance Liquid Chromatography Methods for Determining the Purity of Drugs with Weak UV Chromophores–A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1-15. https://doi.org/10.1080/10408347.2023.2291815

Tangcharoen, T., T-Thienprasert, J., & Kongmark, C. (2018). Optical properties and versatile photocatalytic degradation ability of M Al 2 O 4 (M= Ni, Cu, Zn) aluminate spinel nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, *29*, 8995-9006. https://doi.org/10.1007/s10854-018-8924-4

Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(1-2), 121-131. https://doi.org/10.1081/AL-100103209

Tonelli, D., Scavetta, E., & Gualandi, I. (2019). Electrochemical deposition of nanomaterials for electrochemical sensing. *Sensors*, *19*(5), 1186. https://doi.org/10.3390/s19051186

Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, *25*(1), 16-27. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578

Ulusoy, H. İ., Yılmaz, E., & Soylak, M. (2019). Magnetic solid phase extraction of trace paracetamol and caffeine in synthetic urine and wastewater samples by a using core shell hybrid material consisting of graphene oxide/multiwalled carbon nanotube/Fe3O4/SiO2. *Microchemical Journal*, *145*, 843-851. https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.11.056

Verma, G., & Mishra, M. (2018). Development and optimization of UV-Vis spectroscopy-a review. World J. Pharm. Res, 7(11), 1170-1180.

Vivier, V., & Orazem, M. E. (2022). Impedance analysis of electrochemical systems. Chemical Reviews, 122(12), 11131-11168. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00876

Warburton, R. E., Soudackov, A. V., & Hammes-Schiffer, S. (2022). Theoretical modeling of electrochemical proton-coupled electron transfer. *Chemical Reviews*, *122*(12), 10599-10650. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00929

Xi, J.-C., Zang, H.-Y., Guo, L.-X., Xue, H.-B., Liu, X.-D., Bai, Y.-B., & Ma, Y.-Z. (2015). The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis. Journal of Receptors and Signal Transduction, 35(6), 640-645. https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1041647

Yammine, P., El-Nakat, H., Kassab, R., Mansour, A., El Khoury, B., Koumeir, D., Matar, Z., & Chmayssem, A. (2024). Recent Advances in Applied Electrochemistry: A Review. Chemistry, 6(3), 407-434. https://doi.org/10.3390/chemistry6030024

Zhuang, L., Zhang, W., Zhao, Y., Shen, H., Lin, H., & Liang, J. (2015). Preparation and characterization of Fe3O4 particles with novel nanosheets morphology and magnetochromatic property by a modified solvothermal method. *Scientific Reports*, *5*(1), 9320. https://doi.org/10.1038/srep09320