TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ İLAÇLARIN TİROZİNAZ İNHİBİSYONUNDAKİ ROLLERİNİ İNCELEMEK AMAÇLI ELEKTROKİMYASAL NANOBİYOSENSOR VE MİKROÇİP TASARIMI

Sevinç KURBANOĞLU

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

ANKARA
2016

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ İLAÇLARIN TİROZİNAZ İNHİBİSYONUNDAKİ ROLLERİNİ İNCELEMEK AMAÇLI ELEKTROKİMYASAL NANOBİYOSENSOR VE MİKROÇİP TASARIMI

Sevinç KURBANOĞLU

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 14L0237002 proje numarası ile desteklenmiştir.

2016-ANKARA

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Çeşitli İlaçların Tirozinaz İnhibisyonundaki Rollerini İncelemek Amaçlı Elektrokimyasal Nanobiyosensör ve Mikroçip Tasarımı" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri 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: Sevinç KURBANOĞLU

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalında
Sevinç KURBANOĞLU tarafından hazırlanan
"Çeşitli İlaçların Tirosinaz İnhibisyonundaki Rollerini İncelemek Amaçlı Elektrokimyasal Nanobiyosensor ve Mikroçip Tasarımı" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21.09.2016

Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN-GÖĞER
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ
Karatay Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Fatma Duygu ÖZEL DEMİRALP
Ankara Üniversitesi
Üye

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

Prof. Dr. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Kabul ve Onay iii
İçindekiler iv
Önsöz vi
Simgeler ve Kisaltmalar ix
Şekiller xi
Çizelgeler xv

1. GİRİŞ 1

1.1. Biyosensörler 3
1.2. Enzimler 7
1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması 10
1.2.2. Enzim Kinetiği 11
1.2.3. Enzim İmmobilizasyonu 14
1.2.4. Enzim İnhibisyonu 20
1.2.5. Tirozinaz Enzimi 27
1.2.5.1. Tirozinaz Enzimini İnhibe Eden İlaçlar 28
1.2.5.1.1. Metimazol 29
1.2.5.1.2. Kaptopril 35
1.2.5.1.3. Sildenafil 41
1.3. Elektrokimyasal Biyosensörler 46
1.4. Modifiye Elektrokimyasal Biyosensörler 50

2. GEREÇ VE YÖNTEM 54

2.1. Deneylerde kullanılan araç ve gereçler 54
2.2. Deneylerde kullanılan kimyasallar 55
2.3. Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması 56
2.3.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması 56
2.3.2. Tirozinaz enzim çözeltisinin hazırlanması 57
2.3.3. Gluteraldehit çözeltisinin hazırlanması 57
2.3.4. Katekol çözeltisinin hazırlanması 57
2.3.5. Grafen Oksit çözeltisinin hazırlanması 57
2.3.6. N-Hidroksisaksiimid ve N-(3-Dimetilaminopropil))-N′-etilkarbodiimid çözeltisinin hazırlanması 58
2.3.7. Tiyonin çözeltisinin hazırlanması 58
2.3.8. Karbon nanotüp çözeltisinin hazırlanması 58

2.3.9. İridyum oksit çözeltisinin hazırlanması 58
2.3.10. Standart madde ve ilaç çözeltilerinin hazırlanması 59
2.3.11. İnsan serumu çözeltilerinin hazırlanması 59
2.3.12. Girişim çalışmaları için askorbik asit, ürik asit ve parasetamol çözeltilerinin hazırlanması 60
2.4. Perde Baskılı Elektrotların hazırlanması 60
2.5. Mikroçiplerin hazırlanması 62
2.6. Kullanılan yöntem 64
2.6.1. Amperometri 64
2.7. Biyosensörlerde validasyon 65

3. BULGULAR 75

3.1. Metimazol tayinine yönelik çalışmalar 75
3.1.1. Katekol Tayini 75
3.1.2. Metimazol tayini 84
3.2. Kaptopril tayinine yönelik çalışmalar 100
3.2.1. Katekol Tayini 100
3.2.2. Kaptopril tayini 110
3.3. Sildenafil tayinine yönelik çalışmalar 117
3.3.1. Katekol Tayini 117
3.3.2. Sildenafil Tayini 125

4. TARTIŞMA 129
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 138
ÖZET 141
SUMMARY 142
KAYNAKLAR 143
ÖZGEÇMİŞ 161

ÖNSÖZ

Bu tez kapsamında enzim bazlı elektrokimyasal biyosensörler geliştirilip, enzim inhibisyonu yöntemi kullanılarak, çeşitli ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Enzim olarak Tirozinaz enzimi kullanılmış, Tirozinaz enziminin substratı olan Katekol'e duyarlı geliştirilen biyosensörler karakterize edilmiş ve biyosensörlerin validasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu deneyleri takiben Tirozinaz enzimini inhibe eden, Metimazol, Kaptopril ve Sildenafil sitrat ilaçlarının inhibisyon etkileri, geliştirilen Tirozinaz bazlı elektrokimyasal biyosensörler üzerinde incelenmiştir. Taşıyıcı olarak kullanılan perde baskılı elektrotların yüzeyleri, biyosensör duyarlılığını arttırmak için, farklı malzemeler ile modifiye edilmiştir. Geliştirilen biyosensörler Metimazol, Kaptopril ve Sildenafil sitratın, farmasötik dozaj formlarından ve insan serumundan analizlerinde kullanılmıştır.

Öncelikle, tezimin her aşamasında güç aldığım, bilgi, birikim ve tecrübesiyle bana yol gösteren, moral ve destek veren, bilimsel her kapıyı açan ve hatta yeni kapılar yaratan, beni koruyup kollayan, desteğini yurtdışında olduğum sürelerde dahi eksik etmeyen, kendisini bilimsel ve insani yönüyle örnek aldığım çok değerli, saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Sibel ÖZKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

I gratefully thank to my precious co-advisor, Prof. Dr. Arben Merkoçi who made everything possible for me. I am thankful to him, for his guidance and advices, never-ending support, valuable discussions, patience during my studies and for being there whenever I need. I would also like to thank to my precious sisters, Dr. Carmen Mayorya MARTINEZ, Dr. Mariana Medina SANCHEZ, Dr. Lourdes RIVAS for their eternal support, motivation and precious friendship.

Doktoraya başladığım ve S&B Araştırma Grubu'muzun üyesi olduğum andan itibaren beni destekleyen, güçlendiren, sayın hocam Prof. Dr. Bengi USLU'ya, her türlü aktivitede beraber güzel zaman geçirdiğimiz ve daha önümüzde güzel günlerin bizi beklediği S&B Araştırma Grubu'muzun çok değerli üyeleri, Doç. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL, Dr. Burçin BOZAL PALABIYIK, Nurgül KARADAŞ BAKIRHAN, Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ, Leyla KARADURMUŞ, Cem ERKMEN, Ayşen GÜMÜŞTAŞ ve Göksu ÖZÇELİKAY'a teşekkür ederim.

Fakültemizde aile ortamı sağlayan Dekanımız sayın Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY'a, Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Feyyaz ONUR'a, değerli hocam Prof. Dr. Sibel SÜZEN'e, desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN ve Prof. Dr. Ayhan SAVAŞER'e, tanıştığımız ilk günden beri pozitif enerjisiyle bana güç veren sayın hocam Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP'e teşekkür ederim. Anabilim dalımız araştırma görevlileri, Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ, Dr. M. Gökhan ÇAĞLAYAN, Engin ER, Z. Ceren ERTEKİN, Ali Kemal ATEŞ'e, fakültemiz araştırma görevlisi arkadaşlarıma, anabilim dalımızın değerli öğretim üyelerine ve idari personeline yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Sevgili dostlarım, Gülnur EKŞİ, Dr. Gülin AMASYA ve Yrd. Doç. Dr. Filiz BAKAR'a her türlü sıkıntımda ve mutluluğumda yanımda oldukları için, eşsiz yardımları ve daha birçok güzel hatıra için teşekkür ederim. GATA'daki çalışma arkadaşlarım, Yrd. Doç. Dr. Cansel KÖSE ÖZKAN'a ve Özgür EŞİM'e her an ve saat sorun çözümleri, moral, motivasyonları için, ayrıca, Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ'a lisans hayatımdan beri bitmeyen desteği için teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarıma 14L0237002 nolu proje desteği ile katkıda bulunan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Beni kitaplar ile tanıştıran, bana karşı sonsuz sabır, anlayış ve yol gösteren, ilk öğretmenim, annem Emine TUNÇAĞIL'a, beni bu günlere getiren, destek ve cesaret veren, doğru ya da yanlışımda hep yanımda olan, durumdan vazife çıkarmayı öğreten, babam Ali İhsan TUNÇAĞIL'a minettarım.

Son olarak, bu tezi adına ithaf ettiğim, yurtdışında bile tezime ilaç bulmak için uğraşan fedakâr eşim, sonsuz destekçim, hayat sponsorum Anıl KURBANOĞLU'na bana bu serüvenimde gösterdiği anlayışı, sabrı ve desteği için, sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Askorbik Asit
BDEE	Bor ile dope edilmiş elmas elektrot
BH	Bağıl hata
BR	Britton-Robinson
BSS	Bağıl standart sapma
CKE	Camsı karbon elektrot
cm	Santimetre
ÇDKNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
dk	Dakika
EiGO	Elektrokimyasal indirgenmiş grafen oksit
g	Gram
GR	Grafen
GO	Grafen Oksit
HSF	Hekzasayanoferrat
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IrOkNP	İridyum Oksit
IS	İyonik Sıvı
KNT	Karbon nanotüp
KPE	Karbon pasta elektrot
L	Litre
m	maksimum
m	Eğim
M	Molar
µA	Mikroamper
mg	Miligram
µg	Mikrogram

µM	Mikromolar
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
µm	Mikrometre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PDMS	poli(dimetilsiloksan)
pg	pikogram
Pp	polipirol
PR	parasetamol
r	Korelasyon katsayısı
sn	Saniye
Ss	Standart Sapma
TAS	Tayin alt sınırı
TDKNT	Tek duvarlı karbon nanotüp
Tir	Tirozinaz
USP	United States Pharmacopeia (Birleşik Devletler Farmakopesi)
UV	Ultraviyole
ÜA	ürik asit
V	Tarama hızı
YS	Yakalama Sınırı
V	Volt

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Biyosensörün şematik gösterimi. 6
Şekil 1.2. Enzim substrat ilişkisinin şematik gösterimi. 9
Şekil 1.3. Enzim kinetiği. 12
Şekil 1.4. Lineweaver-Burk grafiği. 14
Şekil 1.5. İmmobilizasyon yöntemleri. A) Kovalent Bağlama (B) Fiziksel Adsorpsiyon (C) Çapraz Bağlama (D) Kapsülleme E) Tutuklama 16
Şekil 1.6. Yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi. 22
Şekil 1.7. Yarışmalı inhibisyon için enzim kinetiği (a serbest, b inhibitör varlığında). 22
Şekil 1.8. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterimi. 24
Şekil 1.9. Yarışmasız inhibitörler için enzim kinetiği (a serbest, b inhibitör varlığında). 24
Şekil 1.10. Yarışmaz inhibisyonun şematik gösterimi. 25
Şekil 1.11. Yarışmaz inhibitörler için enzim kinetiği (a serbest, b inhibitör varlığında).26
Şekil 1.12. Tirozinaz enzim mekanizması. 27
Şekil 1.13. Metimazol ilaç etken maddesinin kimyasal formülü 29
Şekil 1.14. Kaptopril ilaç etken maddesinin kimyasal formülü. 35
Şekil 1.15. Sildenafil ilaç etken maddesinin kimyasal formülü. 41
Şekil 1.16. (A) 1. nesil (B) 2. nesil (C) 3. nesil amperometrik enzim biyosensörlerinin şematik gösterimi. 49
Şekil 2.1. Perde baskılı elektrot (nano elektrot). 60
Şekil 2.2. Perde baskılı elektrotların hazırlanması. 62
Şekil 2.3. Perde baskılı elektrot ile kombine edilmiş mikroçipin hazırlanması. 63
Şekil 2.4. Amperometrik ölçüm. 65
Şekil 2.5. Doğrusallık grafiği. 70

Şekil 3.1. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörünün tasarımı. 76
Şekil 3.2. Farklı yöntemlerle hazırlanan PBE/IrOkNP/MNP biyosensörlerinin kalibrasyon eğrileri. 77
Şekil 3.3. 1mM Katekol'e ait dönüşümlü voltammogramlar (A) PBE (B) PBE-MNP-Tir (C) PBE-MNP-Tir-IrOkNP. 78
Şekil 3.4. Amperometrik cevaplar (A) PBE/MNP (B) PBE/MNP/Tir (C) PBE/MNP/IrOkNP/Tir. 78
Şekil 3.5. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensöründe IrOkNP miktarının optimizasyonu. 79
Şekil 3.6. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensöründe enzim miktarının optimizasyonu. 79
Şekil 3.7. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörüne ait kalibrasyon amperomogramı. 80
Şekil 3.8. SEM görüntüleri (A) PBE-MNP-Tir (B) PBE-Tir-IrOkNP (C)PBE-MNP-Tir-IrOkNP. 81
Şekil 3.9. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörüne girişim etkisi. 82
Şekil 3.10. Katekol'e ve Metimazol'e ait dönüşümlü voltamogramlar. 84
Şekil 3.11. Metimazol'un inhibisyon reaksiyonu. 85
Şekil 3.12. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tiyokinon oluşumuyla inhibisyonda Katekol miktarının optimizasyonu. 86
Şekil 3.13. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tiyokinon oluşumuyla Metimazol tayinine ait kalibrasyon grafiği. 87
Şekil 3.14. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyona ait amperomogramlar. 89
Şekil 3.15. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyon için inkübasyon süresi optimizasyonu. 90
Şekil 3.16. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyon için Katekol derişimi optimizasyonu. 90
Şekil 3.17. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyonla Metimazol tayininin analitik karakterizasyonu. 91
Şekil 3.18. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile geliştirilen mikroçip tasarımı. 94
Şekil 3.19. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçip ile 0,5 μM Katekol cevabı. 95
Şekil 3.20. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçipinin analitik karakterizasyonu. 95

Şekil 3.21. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçipini kullanarak tiyokinon oluşumu ile inhibisyonda Metimazol tayini. 97
Şekil 3.22. İkili mikroçip sistemi. 99
Şekil 3.23. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensörün şematik gösterimi 100
Şekil 3.24. Grafen oksitten indirgenmiş grafen oksit elde etmek için alınan dönüşümlü voltamogramlar. 101
Şekil 3.25. (A) PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe grafen oksit yüzde miktarının (B) Döngü sayısının optimizasyonu. 102
Şekil 3.26. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe IrOkNP miktarının optimizasyonu. 103
Şekil 3.27. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe Tirozinaz miktarının optimizasyonu. 104
Şekil 3.28. 1mM Katekol'e ait dönüşümlü voltammogramlar (A) PBE, (B) PBE-EiGO-Tir (C) PBE-EiGO-Tir IrOkNP. 105
Şekil 3.29. Artan derişimlerde Katekol eklenmesi ile elde edilen amperomogramlar a)PBE-Tir b)PBE-EiGO-Tir c) PBE-EiGO- IrOkNP-Tir. 106
Şekil 3.30. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensörünün analitik karakterizasyonu. 107
Şekil 3.31. SEM görüntüleri (A) EiGO and IrOkNP (B), EiGO/IrOkNP NP/Tir 200 nm. 108
Şekil 3.32. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensörüne girişim etkisi. 109
Şekil 3.33. Kaptopril'in tiyokinon oluşturarak inhibisyon mekanizması. 110
Şekil 3.34. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tiyokinon oluşturarak inhibisyonda Kaptoril tayinine ait kalibrasyon grafiği. 111
Şekil 3.35. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon inkübasyon süresi optimizasyonu. 113
Şekil 3.36. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe 0,6 μM Katekol ile tersinmez inhibisyonun amperometrik takibi. 114
Şekil 3.37. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon ile Kaptopril tayininin analitik karakterizasyonu. 115
Şekil 3.38. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensörünün şematik gösterimi 117

Şekil 3.39. Tiyonin monomerinin polimerleşmesi. 118
Şekil 3.40. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe döngü sayısı optimizasyonu. 119
Şekil 3.41. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe IrOkNP miktarı optimizasyonu. 120
Şekil 3.42. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe enzim miktarı optimizasyonu. 121
Şekil 3.43. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensörünün analitik karakterizasyonu. 122
Şekil 3.44. SEM görüntüleri (A) KNT/IrOkNP (B) KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir 200 nm (C) KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir 2,5 Kat büyütülmüş. 123
Şekil 3.45. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensörüne girişim etkisi. 124
Şekil 3.46. Sildenafil'in KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensör cevabına etkisi. 125
Şekil 3.47. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon için inkibüsyon süresi optimizasyonu. 126
Şekil 3.48. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon ile Sildenafil tayininin kalibrasyon grafiği. 127

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıfları. 11
Çizelge 1.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması. 19
Çizelge 1.3. Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Metimazol analizine yönelik geliştirilen bazı sensörler. 31
Çizelge 1.4. Diğer analiz yöntemleri ile Metimazol analizi. 32
Çizelge 1.4. Devam. Diğer analiz yöntemleri ile Metimazol analizi. 33
Çizelge 1.4. Devam. Diğer analiz yöntemleri ile Metimazol analizi. 34
Çizelge 1.5. Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Kaptopril analizine yönelik geliştirilen sensörler. 37
37
Çizelge 1.5. Devam. Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Kaptopril analizine yönelik geliştirilen sensörler. 38
Çizelge 1.6. Diğer analiz yöntemleri ile Kaptopril analizi. 39
Çizelge 1.6. Devam. Diğer analiz yöntemleri ile Kaptopril analizi. 40
Çizelge 1.7. Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Sildenafil analizine yönelik geliştirilen sensörler. 43
Çizelge 1.8. Diğer analiz yöntemleri ile Sildenafil analizi. 44
Çizelge 1.8. Devam. Diğer analiz yöntemleri ile Sildenafil analizi. 45
Çizelge 2.1. Deneylerde kullanılan araç ve gereçlerin adı markası ve kullanım amacı. 54
Çizelge 2.2. Yüzey modifikasyonu deneylerinde kullanılan kimyasalların adı ve markası. 55
Çizelge 2.3. Örnek uygulama yapmak için kullanılan kimyasalların adı ve markası. 55
Çizelge 2.4. Çözelti hazırlamak için kullanılan kimyasalların adı ve markası. 56

Çizelge 3.1. Metimazol tayinine yönelik farklı stratejiler ile geliştirilen biyosensörlerin analitik karakterizasyonu. 83
Çizelge 3.2. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tiyokinon oluşumuyla ile Metimazol tayinine ait validasyon sonuçları. 87
Çizelge 3.3. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tiyokinon oluşumuyla gerçek örneklerde Metimazol tayini. 88
Çizelge 3.4. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyonla Metimazol tayinine ait validasyon sonuçları. 92
Çizelge 3.5. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyonla gerçek örneklerde Metimazol tayini. 93
Çizelge 3.6. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçipini kullanarak tiyokinon oluşumu ile inhibisyonda Metimazol tayinine ait validasyon sonuçları. 96
Çizelge 3.7. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçipi kullanarak tiyokinon oluşumu ile inhibisyonda gerçek örneklerde Metimazol tayini. 98
Çizelge 3.8. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tiyokinon oluşturarak inhibisyon ile Kaptopril tayinine ait validasyon sonuçları. 112
Çizelge 3.9. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon ile Katekol tayinine ait validasyon sonuçları. 116
Çizelge 3.10. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensörü ile gerçek numunelerde Kaptopril tayini. 116
Çizelge 3.11. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensörü ile gerçek numunelerde Sildenafil tayini. 128

1. GİRİŞ

Beş duyu organımız olan "algılayıcılarımız" ile edindiğimiz bilgileri değerlendirerek davranışlarımıza yön verdiğimiz için bu algılayıcılar yaşamımızın en önemli kavramları arasındadır. İlk biyolojik algılayıcı, 1956 yılında Leland Clark ve Champ Lyons tarafından, glikoz tayininde kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Clark ve Lyon, 1962). Prof. Clark, +0,6 V'da hidrojen peroksit oluşturabilen glikoz oksidaz enzimini, platin elektrot üzerinde, diyaliz membranı yardımı ile immobilize ederek, ilk enzim elektrodunu oluşturmuştur (Clark ve Lyon, 1962). Bu çalışma sonrasında immobilize enzimin kullanıldığı ilk biyosensör 1963 yılında Guilbault ve arkadaşları tarafından, çözünmeyen kolinesteraz ve platin elektrot kullanarak, atmosferde bulunan sinir sistemi ajanlarının tayinine yönelik geliştirilmiştir (Guilbault ve ark., 1962).

Stuart J. Updike ve George P. Hicks tarafından, 1967 yılında "enzim elektrodu" kavramı, glikoz oksidaz enziminin, poliakrilamit jel içerisine immobilize edilmesi ve oksijen elektrodunun plastik membranı ile birleştirilmesi sonucu genişletilmiş ve geliştirilmiştir. Bu fikir sonucunda bilim adamları patent almıştır (Washington, DC, U.S. Patent and Trademark Office. Patent No. U.S. Patent No. 3, 542, 662., 1970). 1969 yılında JACS adlı dergide üre analizi için üreaz enzimi tutuklanarak oluşturulan ilk potansiyometrik biyosensöre ait bilgiler paylaşılmıştır (Guilbault ve Montalvo, 1969).

Leland Clark'ın fikri olan, dünya çapında ilk basit biyosensör, 1974 yılında "Yellow Springs" şirketi tarafından piyasaya sürülmüştür (Weetall ve Royer, 1980). Bununla birlikte, 1974 yılında termal biyosensörler de ortaya çıkmış, termal enzim propları ve enzim termistörleri geliştirilmiştir (Danielsson ve ark., 1981; Ramanathan ve Danielsson, 2001). 1975 yılında, karbon dioksit tayini yapan oksijen bazlı sensörler Lübbers ve Opitz

tarafından geliştirilmiştir (Lübbers ve ark., 1975). Takip eden yıllarda çok fazla çalışma yapılmış ve 1982 yılında glikoz biyosensörlerinin *in vivo* uygulamaları Shichiri ve arkadaşları tarafından başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Shichiri ve ark., 1982). Sonraki yıllarda, Liedberg ve arkadaşları, yüzey plasmon rezonans yöntemini biyosensör uygulamalarında afinite reaksiyonları takip etme amacı ile kullanmıştır (Liedberg ve ark., 1983). 1980 ve ortalarına doğru araştırmalar modifiye elektrotlar konusuna yoğunlaşmış (Gorton, 1986 ve Jönsson ve Gorton, 1985) ve modifikasyon oluşturmak amacıyla, çeşitli polimerler (Gerard ve ark., 2002 ve Trojanowicz, ve ark., 1990), nanopartiküller (Arregui 2010; Ashby, 2009; Sivanesan ve John, 2009; Tiwari ve ark., 2015; Wang, 2005), parçacıklar (Murray, 1980 ve Xu ve ark., 2012) biyosensör dünyasına katılmıştır (Bartlett ve Whitaker 1987 ve Turner ve ark., 1987). İlk mikroçip, "lab-on-a-chip" diye adlandırılan tüm algılama işleminin küçük bir yüzeyde gerçekleştiği, kompakt cihazlar 1999 yılında Agilent Şirketi tarafından piyasaya sürülmüştür (Figeys ve Pinto, 2000). Son yıllarda bilim ve teknolojideki hızlı gelişmeler biyosensör alanında önemli gelişmelere yol açmıştır (Gerard ve ark., 2002). Artık, vücuda takılabilen mikroçipler ile sıcaklık ve şeker kontrolü yapılmaya başlanmış, hastaneye gitmeden hasta kendi takibini yapabilir duruma gelmiştir (Chen ve ark., 2013; Tamayo ve ark., 2013 ve Turner, 2013). Cam ya da farklı polimerlerden oluşabilen mikroçiplerin, geleceğin biyosensörleri olarak daha da ilerleyeceği düşünülmektedir (Mirasoli ve ark., 2014; Pires ve ark., 2014; Yoon, 2016).

Bu tez kapsamında enzim bazlı elektrokimyasal biyosensörler geliştirilip, çeşitli ilaçların inhibisyon etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Enzim inhibisyonu yöntemi kullanılarak, ilaç analizi yapılmış, çeşitli ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Enzim olarak Tirozinaz enzimi kullanılmış ve Tirozinaz enziminin substratı olan Katekole karşı geliştirilen biyosensörler karakterize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra Tirozinaz enzimini inhibe eden, Metimazol, Kaptopril ve Sildenafil sitrat ilaçlarının inhibisyon etkileri, geliştirilen Tirozinaz bazlı elektrokimyasal biyosensörler üzerinde incelenmiştir. Taşıyıcı olarak kullanılan perde baskılı elektrotların yüzeyleri, duyarlılığı arttırmak için, grafen, karbon nanotüp iletken polimer, iridyum oksit nanopartikül gibi malzemelerle modifiye edilmiştir. Geliştirilen elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak

Tirozinaz inhibisyonu yöntemi ile Metimazol, Kaptopril ve Sildenafil sitrat etken maddelerinin farmasötik dozaj formlarından ve insan serumundan analizleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Giriş bölümünde biyosensörlere ve biyosensörlerin bileşenleri olan biyokomponentlere ve çeviricilere değinilmiştir. Biyokomponent olarak enzim kullanılmasından dolayı, enzimlerin; sınıflandırılması, kinetiği ve inhibisyonu ayrıntılı olarak incelenmiştir. Geliştirilen biyosensörlerin çevirici kısmının elektrokimyasal olmasından dolayı elektrokimyasal yöntemler kısaca tanımlanıp, bu tezde kullanılan amperometrik elektrokimyasal biyosensörler ayrıntılı olarak incelenmiştir. Takip eden kısımlarda modifiye biyosensörler incelenmiş, iletken polimerler, grafen, karbon nanotüp, iridyum oksit nanopartikül gibi modifiye biyosensör hazırlamak için kullanılan malzemelerden bahsedilip, gereç ve yöntem kısmına geçilmiştir. Enzim bazlı elektrokimyasal biyosensörlerin hazırlanışı ayrıntılı bir şekilde gereç ve yöntem kısmında anlatılmış, tezin son bölümü olan bulgular kısmında sonuçlar paylaşılmıştır.

1.1. Biyosensörler

Sensörler, kontrol ve süreç elektroniği, yazılım ve algılayıcı ağı içeren cihaz ya da sistemlerdir. İnsan burnu, kulağı, gözü, dili ve derisi, sensörü tanımlayan temel örneklerdendir. Laboratuvarlarda kullanılan, numunenin asitliği ve bazlığı hakkında bilgi veren litmus kâğıdı en çok bilinen sensörlerden biridir. Kimyasal ve elektronik cevaplar, genellikle gözümüzün algılayabileceği sinyallere dönüştürülür (Arregui, 2010; Clark, 2013; Dubach ve Edmonds, 2013). Litmus kâğıdındaki sensör cevabı, kimyasal reaksiyondan ötürü, görünür ışıktaki absorbans değişikliğinden meydana gelir. Diğer yandan, pH metrede sensör sinyali potansiyel değişimine bağlı olarak elde edilir ve pH metrede dijital bir cevaba dönüştürülür (Borisov ve Wolfbeis, 2008; Malhotra ve ark., 2005;Ramanathan, ve ark., 2001; Sethi, 1994; Thevenot ve ark., 2001).

Sensörler, maruz kaldıkları ortam içerisindeki fiziksel veya kimyasal değişikliklere, ortamdaki madde miktarına bağlı olarak cevap verirler. Fiziksel sensörler, kimyasal sensörler ve biyosensörler genel olarak kullanılan sensör tipleridir. Fiziksel sensörler, mesafe, kütle, sıcaklık pH gibi değişimleri ölçen sensörlerdir. Kimyasal sensörler, kimyasal değişimleri ölçen sensörlerdir. Biyosensörler ise genel olarak, biyolojik bir reaksiyon sonucu ortaya çıkan değişimi ölçer (Borisov ve Wolfbeis, 2008; Edmonds, 2013; Janata ve ark., 1994; Khanna, 2011; Malhotra ve ark., 2005; Ramanathan, ve ark., 2001; Sethi, 1994; Thevenot ve ark., 2001).

Biyosensörler, bir başka deyişle biyoanalitik cihazlar, modern elektronik teknikler ile biyolojik moleküllerin seçicilik özelliklerini birleştiren, aynı zamanda biyoloji, fizik, biyokimya, mühendislik gibi birçok bilimsel alandaki bilgiden faydalanabilen, multidisipliner bir çalışma alanıdır. Algılama mekanizması biyosensörler için temeldir. Canlıların olağanüstü algılama özellikleri vardır. Örneğin, köpeklerin koku alma duyuları insanlarınkinden yüz bin kat daha fazladır. Mürenler tonlarca suda bulunan küçük bir damla yabancı maddeyi algılayabilirler. Kelebekler, partnerlerinin bıraktığı az miktarda maddeyi algılayabilirler. Yosunlar ise toksik maddelere karşı çok fazla duyarlıdırlar. Biyolojik maddelerin analiz sistemleri bileşimi, canlılara bu tür dürtüleri hissetmelerini sağlama özelliklerini veren biyosensörlerin oluşumudur (Buerk, 1995; Chen ve ark., 2013; Eggins, 2002; Gronow, 1991; Tamayo ve ark., 2013; Turner, 2013).

Biyosensörler, biyolojik sistemler ve bu sistemlerden gelen bilgiyi analitik olarak kullanışlı bir sinyale dönüştüren iletici sistemlerden meydana gelir. İçindeki biyokimyasal reaksiyonu analitik ve ölçülebilir, görülebilir, bir sinyale dönüştürme özelliğine sahip kompakt sistemler biyosensörler olarak adlandırılırlar. Biyosensörler, spesifik bir analit ya da analitler grubunun derişimine bağlı olarak sinyal oluşturur (Scheller, ve ark., 1989 ve Sharma ve ark., 2003).

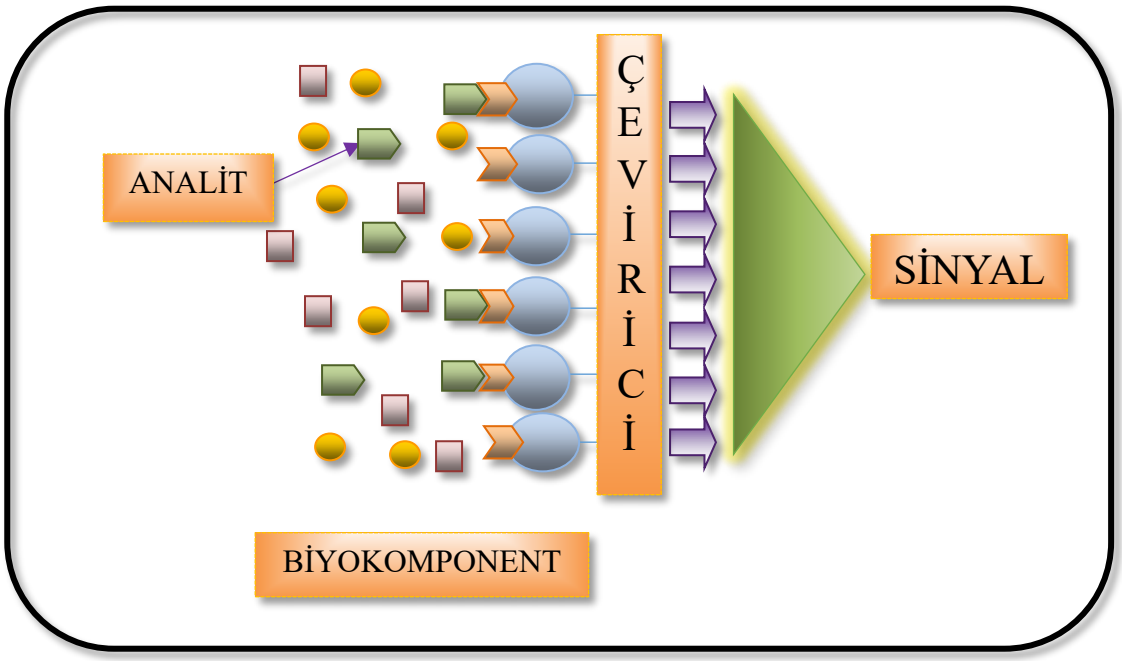
Biyosensörler biyokomponentler (reseptör, almaç) ile fiziksel komponentlerden (çevirici) oluşurlar. Enzimler, çoklu enzim kompleksleri, dokular, mikroorganizmalar, organeller, hücre reseptörleri, antikorlar, nükleik asitler ya da tüm hücre (bakteri, fungus, hayvan ya da bitki) analitlerin tayini için kullanılan biyolojik malzemeler yani biyokomponentlerdir. Biyosensörlerin biyolojik bileşeni; katalitik ve affinite özellik taşıyan biyomateryaller olarak iki önemli gruba ayrılır (Buerk, 1995; Eggins, 2002; Gronow, 1991). Katalitik özellikteki grup enzim, mikroorganizma ve dokuları içerirken, affinite özellik gösteren grup ise antikorlar, reseptörler ve nükleik asitlerden oluşur. Biyosensörlerin, analit tayini için gerekli olan çevirici kısmı ise elektrokimyasal, optik, termal, piezolelektrik ya da manyetik özellikteki gruplardan oluşabilir (Scheller ve ark., 1985; Sethi, 1994; Ramanathan, ve ark., 2001; Thevenot ve ark., 2001; Malhotra ve ark., 2005; Borisov ve Wolfbeis, 2008). Biyosensörlerin çalışma mekanizması, temel olarak, analitin çözeltiden biyoreseptöre doğru difüzyonla taşınmasına, duyarlı bir şekilde reaksiyona girmesine bağlıdır (Scheller ve Schubert, 1992). Analit ile biyoreseptör biyokimyasal reaksiyon sonucu çevirici yakınında bir değişim meydana gelir ve çevirici bu değişimi, kendi özelliğine göre optik, elektrokimyasal gibi anlamlı bir sinyale dönüştürür (Buerk, 1993 ve Buerk, 1995).

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)'a göre biyosensör, bir çevirici ile doğrudan temas halinde bulunan, bir biyolojik tanıma elemanı kullanarak ayrıntılı kantitatif ya da yarı kantitatif analitik bilgi temin edilen, kendi kendine yetebilen entegre bir cihazdır. Aynı zamanda biyosensörler, hücreler, hücre reseptörleri, membranlar, organeller, enzimler, dokular ve organizma gibi biyolojik malzemelerin, bir "çevirici" ile birleştirilmesi ya da temas halinde bulunması ile oluşan analitik cihazlardır. Kimyasal ve biyolojik maddeleri hızlı analiz ve algılama yeteneğine sahip olan biyosensörler, sahip olunmak istenen ana bilgiyi, çevirici yardımı ile "sinyal" adı verilen ürüne çevirir (Thevenot ve ark., 1999; Thevenot ve ark., 2001).

Biyosensörler iki kısımdan oluşur;

- ✓ Biyolojik malzemelerden oluşan ve bir biyokimyasal mekanizmaya sahip olan algılayıcı sistem,
- ✓ Algılayıcı sistemde gelen bilgileri anlamlı bir sinyale dönüştüren çevirici sistem (Şekil 1.1).

Biyosensörlerin görevi, biyolojik bir olayın elektriksel bir sinyale dönüştürülmesidir. Biyosensörler, spesifik bir analit ya da analitler grubunun derişimine bağlı olarak sinyal oluşturur. İdeal bir biyosensör seçici, uzun kullanım ömürlü, minimum kalibrasyon gereksinimli, tekrarlanabilir, kararlı, yüksek duyarlılığa ve yeterli düzeyde tayin sınırına sahip, geniş ölçüm aralıklı, kısa cevap ve hızlı geriye dönme zamanlı, basit, ucuz, küçültülebilir ve sterilize edilebilir olmalıdır (Ramanathan, ve ark., 2001; Thevenot ve ark., 2001; Malhotra, 2005).



Şekil 1.1. Biyosensörün şematik gösterimi.

1.2. Enzimler

Enzimler çok az miktar ve üstün katalitik güçleri ile biyolojik sistemdeki biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran protein katalizörleridir. Genel olarak, bütün kimyasal reaksiyonlar enzimler ile kataliz edilirler. Enzimler, ribozimler hariç, protein yapısında olan organik katalistlerdir. RNA enzimi denilen, Ribozimler, kendi fosfodiester bağlarının hidrolizini kataliz eder ya da RNA'da bulunan bağlardaki hidrolizi kataliz eder. Enzimler reaksiyonların hızlarını enzim kullanılmayan reaksiyonlarla karşılaştırıldığında 10^6-10^{12} kat arttırmaktadırlar. Enzimlerin en önemli özellikleri, biyokimyasal reaksiyonlarda miktarlarında değişiklik olmamasıdır (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Vargas-Bernal ve ark., 2012). Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı biyokimyasal reaksiyonlara spesifik olmalarıdır. Başka bir ifade ile enzimler reaksiyon-spesifik katalistlerdir. Bazı enzimler, kendine özgü ve uyumlu tek bir substrat ile bağlanıp sonuçta tek bir ürün oluşturarak, mutlak spesifisite göstermektedirler. Bazı enzimler ise belli bir gruba sahip maddeleri, substrat olarak algılayıp ürüne çevirebilirler (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).

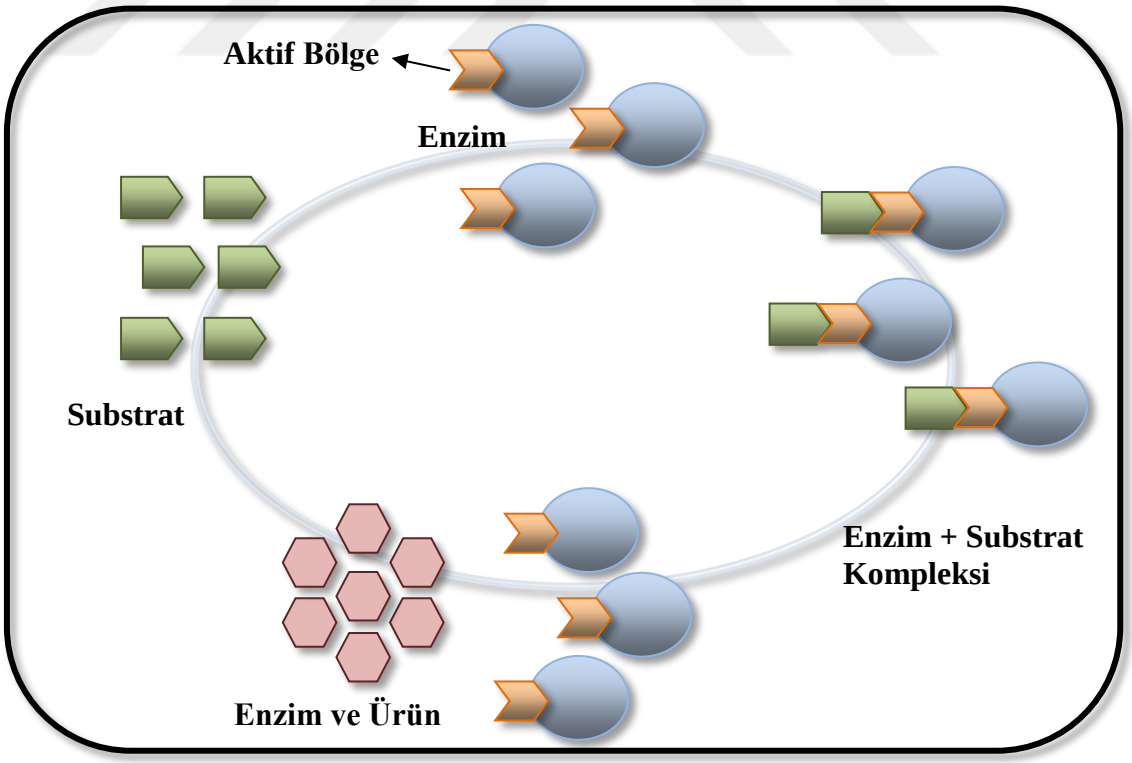
Ribozimler hariç, enzimler, ileri derecede organize olmuş protein moleküleridir ve tüm canlı organizmalarda bulunur. Organizmada enzimlerin spesifik bir dokuda bulunmaları o dokunun fonksiyonuna bağlıdır. Hücre içinde ise organelden organele farklılık gösterirler. Enzimlerin molekül kütleleri yaklaşık 12,000 -1,000,000 Dalton'dur. Enzimler reaksiyon katalizinde seçimli ve spesifiktir, sulu ortamlarda, uygun koşullarda aktivite gösterirler (Hart, 1990; Vargas-Bernal ve ark., 2012).

Enzimler 19. yüzyılın sonlarına doğru keşfedilmiştir. 1800'lerin ilk yıllarında enzimlerin varlığı, etin sindirilmesi, nişastanın şekere dönüştürülmesi gibi biyolojik kataliz araştırmaların sonucunda tanınmıştır. 1850'li yıllarda Louis Pasteur, şekerin alkole fermantasyonunun fermentler yardımı ile olduğunu öne sürmüş ve bu fermentlerin canlı yapısında olduğunu iddia etmiştir. Bu iddia bilim adamlarını, birçok farklı enzimin

izolasyonunu ve katalitik özelliklerini inceleme konusuna yöneltmiştir (Maryott, 1915). Nitekim 1878 yılında Kuhle tarafından "enzim" kelimesi yunanca "enzume" denilen ve ferment anlamına gelen kelimeden türetilmiştir. Enzim, mayanın içinde anlamındaki "in yeast" kelimesinden türetilmiştir. Ekstre edilmiş ferment hücreleri yaşayan hücrelerin olduğu deney ortamına eklenmiş ve sonunda şeker fermantasyonun gerçekleştiği görülmüştür. 1883 yılında şeker dekompoze edilmesi sonucu yapı taşlarına ayrılmış ve izole edilmiştir. 1926 yılında, Sumner, üreaz enzimini fasulyeden izole etmiş ve kristal hale getirmiştir. Üreaz kristallerinin tamamen protein yapıda olduğunu iddia eden Sumner, bütün enzimlerin de protein olduğunu söylemiştir. 1930'lu yıllarda Northrop ve çalışma arkadaşları pepsin ve tripsin enzimlerini kristalize hale getirip bunların da birer protein olduğunu kanıtlamıştır. Bu çalışmalar ile Sumner ve arkadaşları 1947 yılında Nobel ödülü almıştır (Larson ve Kallio, 1954; Sumner ve Somers, 1947).

Ribozimler dışındaki, bütün enzimler protein yapısındadır ve enzimler proteinlere ait tüm özellikleri gösterirler. Proteinler, bütün canlıların birçok göreve sahip olan temel yapıtaşıdır. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, proteinlerin primer, sekonder, tersiyer ya da kuartener yapılarına doğrudan bağlıdır. Proteinler, binlerce aminoasitten meydana gelen makro moleküllerdir. Aminoasitler, karbon atomuna bağlı amin grubu ($-NH_2$) ile karboksil grubu içerir. Karbona bağlı olan diğer yan grup (-R) farklılığı ile meydana gelen, selenosistein ve pirolizin'in de eklenmesi ile 23 adet aminoasit bulunmaktadır. Tüm aminoasitlerin temel yapısı aynıdır. Büyüklükleri, şekilleri, yükleri, hidrofilik ya da hidrofobik özellikleri yan gruplarının birbirlerinden farklı olmasından kaynaklanır. Bazı enzimler sadece protein yapısında olup, bazıları ise kofaktör denilen bir kimyasal yapı ile birlikte bulunurlar. Kofaktörler, inorganik yapısında olan, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} gibi iyonlar ya da koenzim olarak da adlandırılan vitamin türevleri olabilirler. "Holoenzim" kofaktör ile birlikte katalitik özellikte olan enzimlere denilmektedir. Holoenzimin inaktif protein kısmı "apoenzim" olarak adlandırılmaktadır. Holoenzimin protein kısmı kofaktör yokluğunda, enzim özelliğini koruyamaz (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).

Enzimlerin, doğrudan katalitik aktivite gösteren, spesifik bağlanma özelliklerine sahip kısımlarına, "aktif bölge" denir. Katalitik (aktif) merkez, daima bir oluk veya yarık şeklindedir. Aktif kısımda bulunan aminoasitlerin dizilişi spesifik bağlanma özeliğini enzimlere kazandıran kısımdır. Enzimlerle reaksiyona giren, katalizlenen, dönüşüme uğrattıkları moleküllere "substrat" denir (Şekil 1.2). Enzimlerin spesifikliği yalın spesifiklik, grup spesifikliği, bağ spesifikliği, stereo spesifiklik, olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. Yalın spesifiklikte, enzim sadece belli bir substrata özgündür. Enzim, benzer fonksiyonel özellikteki substratlara özgün ise grup spesifikliği şeklinde adlandırılır. Bağ spesikliğinde ise enzim, proteinlerde bulunan peptit bağı ya da karbohidratlardaki glikozit bağı gibi belli bağlara özgündür. Stereo spesifiklik ise substratın optik özellikleri ile ilgilidir. D ve L özellikteki glukoz buna örnek olarak verilebilir (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).



Şekil 1.2. Enzim substrat ilişkisinin şematik gösterimi.

1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Günümüzde 2000'den fazla enzim izole ve karakterize edilmiştir. En küçük organizma olarak bilinen *Mycoplasma Genitalium*, 470 gene sahiptir ve bunların 145 tanesi replikasyon ve transkripsiyondan sorumludur. Mayada 7000 gen bulunmaktadır ve bu genler yaklaşık 300 enzimi kodlamaktadır. Doğada binlerce tür enzim varyantı bulunmaktadır ve gün geçtikçe raporlanan 3-boyutlu enzim yapısı artmaktadır (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).

Enzimler iki şekilde adlandırılmaktadır. Bunlar, pratik veya geleneksel adlandırma ile sistematik adlandırmadır. Geleneksel adlandırma en basit adlandırma yöntemidir. Oksidaz, kinaz gibi bazı enzimlere geleneksel isimler verilmiştir fakat enzim sayısı arttıkça isimlerin yeterli olmamasından dolayı sistematik adlandırma ortaya çıkmıştır. 1965'te uluslararası enzim komisyonu tarafından sistematik adlandırma oluşturulmuştur. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin Enzim Komisyonu tarafından, enzimler 6 sınıfa ayrılırlar ve bu sınıflar kendi içinde, enzimlerin katalizlediği reaksiyon tipine göre alt sınıflara ayrılırlar (Çizelge 1.1) (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).

Enzim sınıflandırılmasında her bir enzime enzim komisyonu tarafından 4 rakamlı kodlar verilmiştir. Bu kodlardan ilki enzimin sınıf adını ya da tepkimenin tipini, ikincisi donörün cinsini, üçüncüsü akseptörün cinsini, dördüncüsü akseptör olan substratı ifade eder. Örneğin glukoz oksidaz enzimi 1.1.3.4 ile gösterilir. 1 rakamı oksidoredüktaz sınıfından olduğunu, diğer 1 rakamı CH-OH grubunun donör olduğunu, 3 rakamı oksijenin akseptör olduğunu ve 4 rakamı substratın β-D-glukoz olduğunu ifade eder (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).

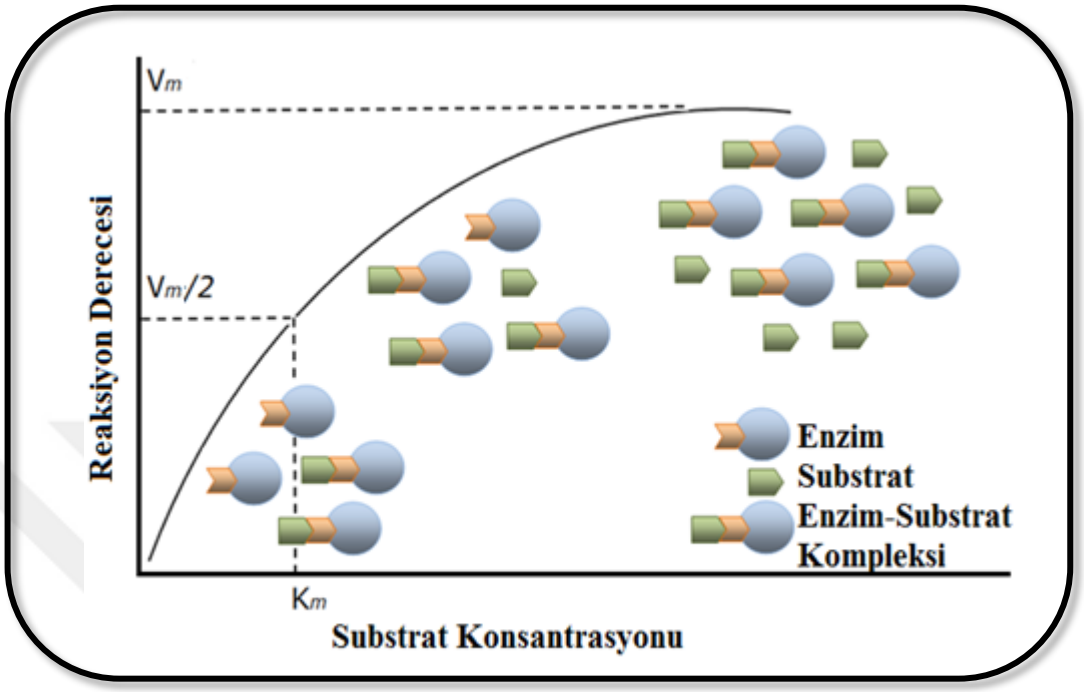
Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıfları.

No	Sınıf	Katalizlenen Reaksiyon Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektron transferi
2	Transferazlar	Grup transferi
3	Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonu
4	Liyazlar	Çift bağlara grup eklenmesi ya da çıkması
5	İzomerazlar	İzomer formların oluşması
6	Ligazlar	C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

1.2.2. Enzim Kinetiği

Enzimatik reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise ürün adı verilir. Enzimle kataliz edilen reaksiyonların hızı üzerine birçok fiziksel etkenin rolü vardır. Bunlar enzim ve substrat derişimleri, sıcaklık, pH ve inhibitör olabilir. Bütün bu etmenler enzimatik reaksiyonların kinetiğini etkiler. Enzim yokluğunda enerji yüksek iken, enzim varlığındaki reaksiyonda, aktivasyon enerjisi düşer. Reaksiyon daha kolay bir şekilde gerçekleşir.

Düşük substrat derişiminde, genellikle her enzim bazlı reaksiyon, 1. derece kinetiğe sahiptir. Bu, substrat ile reaksiyon hızı arasında doğrusal bir ilişki olduğu anlamına gelir. Belli bir substrat derişiminden sonra substrat derişiminin artırılması, tepkime hızını etkilemez, tepkime hızının sabit değerde kalmasını sağlar. Derişim arttıkça, reaksiyon hızının değişmediği bu bölgeye doygunluk bölgesi denir. Doygunluk bölgesinde reaksiyon sıfırıncı derecedendir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Enzim kinetiği.

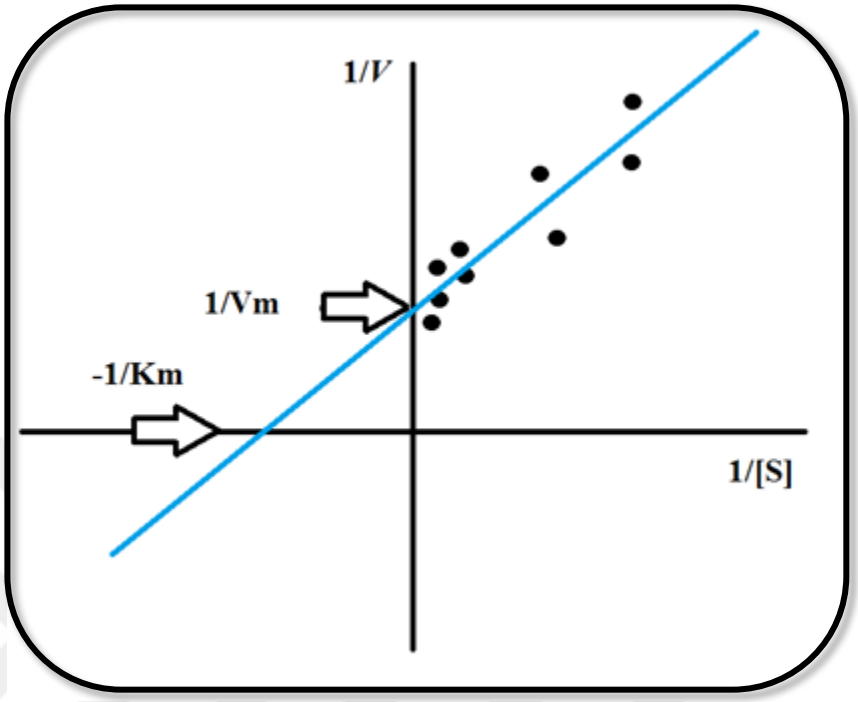
Fransız fizikokimyager, Victor Henri'nin, 1903 yılında, enzimatik reaksiyonların, enzim-substrat ilişkisi ile başladığını keşfetmesini takiben (Henri, 1903), Amerikalı biyokimyager Leonor Michaelis ve Kanadalı hekim Maud Menten, 1913 yılında, sükrozun invertaz enzimi ile glikoz ve früktoz olarak parçalanmasını incelemişlerdir. Michaelis ve Menten, daha sonraları adları ile anılacak, Eşitlik 1'de gösterildiği gibi, enzim ve substratın bağlanıp enzim substrat kompleksi oluşturmasına yönelik bir mekanizma önermişlerdir (Menten ve Michaelis, 1913). Substratın aktif bölgeye bağlanması sonucunda enzim substrat kompleksi oluşur. Enzim ile substrat arasında hidrojen, elektrostatik ve Van der Waals bağları gibi non kovalent bağlar vardır. Bu reaksiyon sonucunda ES kompleksi serbest enzim ve ürüne dönüşmektedir.

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + Ü \qquad (1)$$

$$V_0 = \frac{V_m\,[S]}{K_m + [S]} \qquad (2)$$

Eşitlik 2, substrat derişimi ile reaksiyon hızı arasındaki ilişkiyi ifade eden Michaelis-Menten eşitliği şeklinde adlandırılır. Bu eşitlikteki "V_m", reaksiyonun ulaştığı maksimum hızı ve "K_m" ise Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılır. K_m yüksek ise enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla demektir. Bu çok fazla istenen bir durum değildir, enzim ile substratın kısa sürede ürün oluşturması beklenir. K_m yüksek yani enzim ile substratın ilgisi yüksek ise çok düşük substrat derişimlerinde, enzim substrat kompleksi oluşur.

Lineweaver ve Burk, 1934 yılında, Michaelis ve Menten' in yaptıkları çalışmaları değerlendirip, doğrusal bir denklemin elde edilmesinin Michaelis ve Menten eşitliğinden daha yararlı olacağı sonucuna varmışlardır. Çalışmaları doğrultusunda 1/V'ye karşılık 1/[S] derişim grafiği elde etmişlerdir ve bu grafik "Lineweaver ve Burk Grafiği" olarak adlandırılmaktadır (Lineweaver ve Burk, 1934). (1/[S]) değerine karşı (1/V) grafiği çizildiğinde enzimin K_m değeri bulunurken Lineweaver-Burk çiziminden yararlanılır (Şekil 1.4).



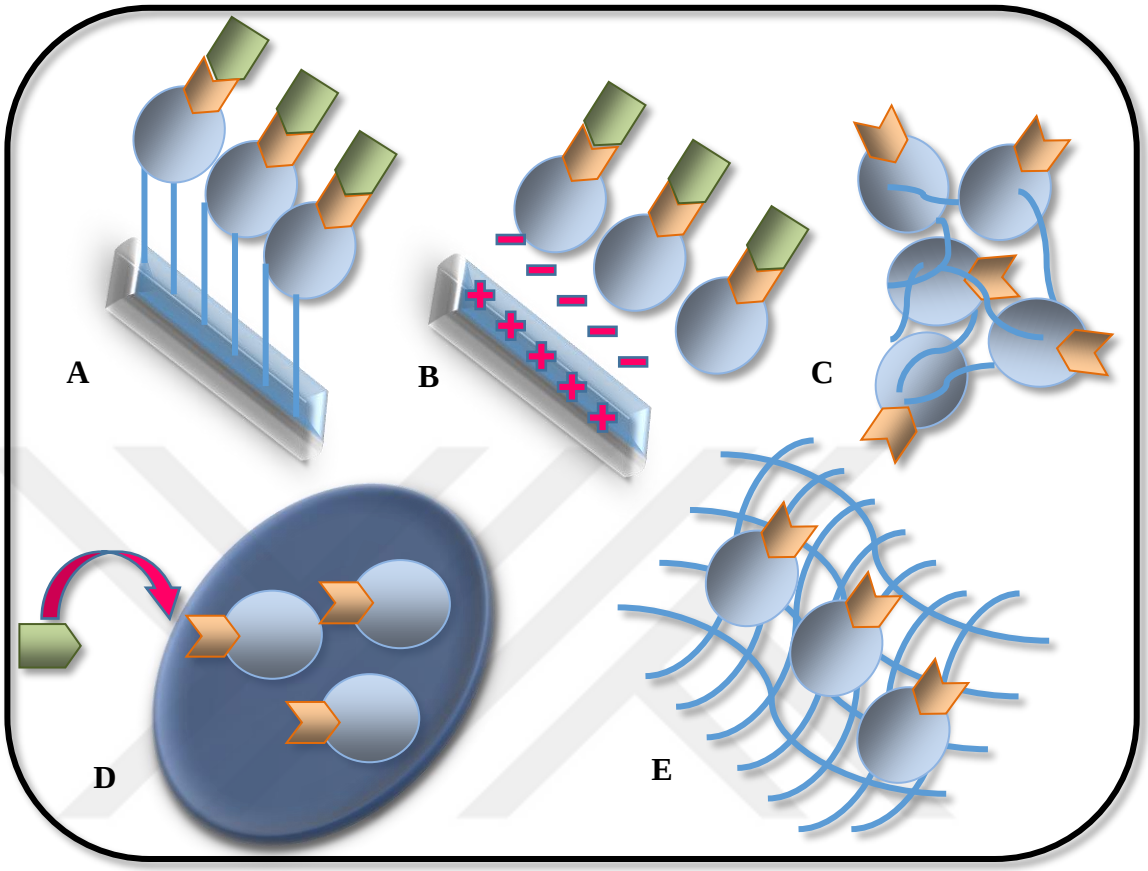
Şekil 1.4. Lineweaver-Burk grafiği.

1.2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Bir biyosensörün fonksiyonu biyolojik aktif materyalin biyokimyasal spesifikliğine bağlıdır. Biyolojik materyalin seçimi spesifiklik, depolama, operasyonel kararlılık gibi birçok faktöre bağlıdır. Aynı zamanda kimyasal bileşikler, antijenler, mikroplar, hormonlar, nükleik asitler ya da analit biyolojik materyalin seçimini etkiler. Biyolojik sistem ve iletici sistemin iyi bir şekilde etkileşmesi yani başarılı bir immobilizasyon tekniğinin kullanılması etkili bir biyosensörün hazırlanmasında önemlidir (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Sharma ve ark., 2003; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).

Enzim bazlı biyosensörler geniş kullanım alanına sahip olmalarından dolayı, ekonomik açıdan enzimlerin immobilize edilmeleri, tekrar kullanımları bakımından önem taşımaktadır. Ayrıca, enzimlerin doğal ortamlarında kararlı olmamaları, kolayca inhibe olabilmeleri, sadece belli substratlara özgü olmaları ve belirli fiziksel koşullarda reaksiyona girmeleri açılarından da immobilize edilerek kullanılmaları önemlidir. İmmobilizasyon, "hareket sınırlandırılması" ya da "hareket edemez hale getirmek" anlamına gelmektedir. "İmmobilize enzim" kavramı enzimlerin katalizör özelliklerini kaybetmeden, sürekli ve tekrar kullanıma olanak sağlayan, belli bir yerde sabit olarak durabilecek şekilde lokalize olmaları demektir. Bir başka deyişle, immobilizasyon biyokatalizörlerin, fiziksel olarak lokalize olması, çözünmeyen bir matrise bağlanması ya da tutulması anlamına gelmektedir (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Sharma ve ark., 2003; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).

Bu biyomoleküllerin immobilizasyonu için çeşitli metotlar kullanılabilir. En fazla kullanılan teknikler; fiziksel adsorpsiyon, tutuklama, intermoleküler çapraz bağlama ve kovalent bağlamadır (Şekil 1.5) (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Sharma ve ark., 2003; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).



Şekil 1.5. İmmobilizasyon yöntemleri. A) Kovalent Bağlama (B) Fiziksel Adsorpsiyon (C) Çapraz Bağlama (D) Kapsülleme E) Tutuklama

Enzim immobilizasyon sürecinin, üç ana bileşeni vardır; enzim, matris ve immobilizasyon modu. İdeal bir matris, inert, fiziksel olarak güçlü, kararlı, iyileştirici, enzim aktivitesini arttıran, inhibisyon olanağını düşüren, mikrobiyal kontaminasyonu ve nonspesifik adsorpsiyonu azaltan özelliklere sahip olan matristir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar, organik ve inorganik taşıyıcılar olarak iki ayrı gruba ayrılırlar. Organik taşıyıcılar, selüloz, agar, kitin, alginatlar, kolajen ve albümin gibi proteinler, polimetilmetaklat poliakrilamit, poliamit, vinil ve alil gibi polimerler olabilir. İnorganik taşıyıcılar ise, doğal minerallerden, silikon, kum, işlenmiş

materyallerden, cam, metaller ya da metal oksitler olabilir. Enzimlerin kimyasal karakterleri, substratların farklı özellikleri, immobilize enzimin kullanım alanı gibi parametreler seçilecek immobilizasyon yöntemini belirler. İmmobilizasyon yöntemleri, enzimlerin taşıyıcılara bağlanmaları ya da tutuklanmaları yönüyle ikiye ayrılır. Tutuklama, matriste ya da membran içine hapsolma şeklinde olabilir. Bağlanma ise adsorpsiyon ve kovalent bağlanma şeklinde olur (Ferapontova ve ark., 2005; Hart, 1990; Sharma ve ark., 2003; Vargas-Bernal ve ark., 2012; Weetall ve Royer, 1980).

Enzim immobilizasyonu, birçok avantaja sahiptir, bunlar şu şekilde özetlenebilir;

- ✓ İmmobilize enzimlerin kararlılığı artar,
- ✓ Enzimler reaksiyon ortamından kolayca alınabilir, ayrılabilir,
- ✓ İmmobilize enzimler tekrar tekrar kullanılabilir,
- ✓ İmmobilize enzimlerin katalitik özellikleri serbest enzimlere göre daha kolay kontrol edilebilir,
- ✓ Enzimlerin reaksiyon sonucu oluşan üründen etkilenmeleri önlenebilir.

Adsorbsiyon: Fiziksel adsorpsiyon bilinen en eski ve basit immobilizasyon metodudur. İmmobilizasyon, taşıyıcı ile enzimi uygun pH'de, iyonik şiddette, inkübasyon süresinde bir araya getirerek elde edilebilir. Hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, Van der Waals bağları ve elektron transisyon kompleksleri oluşumu sayesinde bağlanma gerçekleşir. Taşıyıcı ve enzim arasındaki yüzey kimyası sayesinde, immobilizasyon sağlanır. Bu immobilizasyon yönteminde herhangi bir aktivasyon ya da kimyasal modifikasyona ihtiyaç yoktur, bu sebeple bu yöntem en basit immobilizasyon yöntemidir. Selüloz, silika jel, cam, hidroksiapatit ve kollagen enzimleri adsorblamak için kullanılan başlıca yapılardır. Enzimin taşıyıcı ile fiziksel adsorpsiyon ilişkisi geri dönüşümlü bir ilişki olduğundan, pH'de, substrat derişiminde, iyonik şiddette ya da sıcaklıktaki değişikler, enzimlerin yüzeyden uzaklaşmasına sebep olabilir. Bu sebeplerle, adsorpsiyon tekniğinin bazı kullanım limitleri vardır.

Kovalent bağlama: Kovalent bağlama yönteminde kovalent bağların oluşması bu yöntemin temel prensibidir. Taşıyıcı yüzeyde bulunan -NH_2, -COOH gibi fonksiyonel gruplara enzimler sahip oldukları aminoasitleri vasıtası ile kovalent olarak bağlanır. Taşıyıcı yüzeyde bu fonksiyonel gruplar yok ise aktivasyon yöntemleri ile yüzey aktive edilebilir.

Tutuklama: Tutuklama yöntemi enzim yapısında herhangi değişiklik olmadan immobilizasyon gerçekleşmesinden ötürü en kolay immobilizasyon yöntemidir. Tutuklama, çevirici üzerine enzimle kaplandıktan sonra membran geçirilmesi ile yapılabilir. Ayrıca, enzim içeren çözelti içinde polimerik jel hazırlandığı zaman jelin donmasıyla biyomolekül jel matris içinde tutuklanmış olur. Poliakrilamit, nişasta, naylon ve siliastik jel enzim tutuklanması için kullanılabilir. Tutuklama yöntemi ilk defa Bernfeld ve Wan tarafından 1963 yılında sentetik polimerlere enzim tutuklaması ile gerçekleştirilmiştir. Tutuklama yönteminin en basit yöntem olmasının sebebi, enzimin herhangi bir şekilde bağlanmamasıdır. En büyük dezavantajı, membrandan geçişlerin difüzyon ile olmasından dolayı analiz süresinin uzun olabilmesidir.

Çapraz Bağlama: Çapraz bağlama en yaygın kullanılan immobilizasyon metodudur. Gluteraldehit, hekzametilen di-izosiyanat, 1,5-difloro, 2,4 nitrobenzen ve bis-diazobenzidin-2,2'-disulfonik asit gibi bifonksiyonel ve multifonksiyonel reaktiflerin kullanılmasıyla enzimlerin intermoleküler çapraz bağlanması sağlanır. Bu reaktifler, katı desteklere enzimleri bağlayabilir. Çapraz bağlamanın derecesi kontrol edilemediğinden, enzimin aktif kısmında kimyasal değişiklikler meydana gelebilir, enzim aktivitesi düşme riski taşır ve bu tekniğin en büyük dezavantajı bu risktir.

Kapsülleme: Enzimi bir yarı geçirgen membran arkasında hapsetme şeklinde olur, substrat içeri girer ürün dışarı çıkar iken, enzim membran arkasında hapsolmuş olarak aktivitesini yapar. Tutuklama yöntemi ile benzerlik gösterir. Dezavantajı, substrat ya da ürün difüzyonu fazla ise yarı geçirgen membran kolaylıkla hasar görebilir.

Enzimin immobilizasyon yöntemi, enzim aktivitesinin kalitesini etkilediği için, biyosensörün kalitesini de doğrudan etkiler. Uygun immobilizasyon yöntemi, enzimin doğasına, çeviricinin tipine, analitin fiziksel özelliklerine, enzim biyosensörünün kullanım alanına göre seçilir. Biyosensörün analitik karakterizasyonun güçlü olabilmesi için en doğru immobilizasyon yönteminin seçilmesi gerekmektedir. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması çizelge 1.2'de yapılmıştır.

Çizelge 1.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması.

İmmobilizasyon Yöntemi	**Avantaj**	**Dezavantaj**
Adsorpsiyon	Kolaydır. Enzimde kimyasal değişime yol açmaz. Geri dönüşümlüdür. Genellikle ucuzdur.	Zayıf bir bağlanma olduğu için enzim yüzeyden akabilir. Zayıf kararlılık oluşur. Spesifik olmayan bağlanma oluşur.
Kovalent bağlama	Taşıyıcı ve enzim arasında kuvvetli bir bağ oluşur. Çeşitli taşıyıcı ve kovalent bağlayıcı ile modifikasyona açıktır. Enzim miktarı kontrol edilebilir.	Enzimde kimyasal değişim gerçekleşir. Genellikle pahalıdır. Enzim aktivitesinde düşme yaşanabilir.
Tutuklama ve Kapsülleme	Kolaydır. Enzimde kimyasal değişime yol açmaz.	Zayıf kararlılık oluşur. Çevre koşullarından kolaylıkla etkilenir.
Çapraz bağlama	Enzim ve çapraz bağlayıcı ajan arasında kuvvetli bir bağ oluşur. Sıcaklık gibi değişkenlere daha dayanıklıdır. Taşıyıcı ile arasında sıkı bir bağa gerek yoktur.	Enzimde kimyasal değişim gerçekleşir. Bağlanma derecesi takip edilemez.

1.2.4. Enzim İnhibisyonu

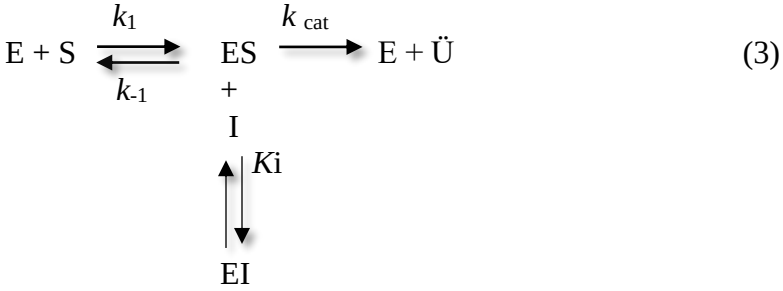
Enzimlerin katalitik etkileri, bazı kimyasal bileşiklerle değişikliğe uğrar veya tamamıyla yok edilir. Latincede sınırlamak anlamına gelen "inhebere" den türetilen inhibisyon kelimesi bir işlemin durdurulması veya sınırlandırılması anlamına gelmektedir. Enzim aktivitesinin azalmasına ya da yok olmasına yol açan bileşiklere inhibitörler denir. Bir protein olan enzim molekülü inhibe edildiği zaman, enzimin 3 boyutlu yapısı bozulur, enzimin aktif bölgesini oluşturan fonksiyonel grupların yapısı değişir ve enzimin aktivitesi değişir. İnhibitörler ile yapılan çalışmalar, enzimlerin substratlarına olan spesifiteleri, katalitik aktivite için gerekli aminoasit kalıntılarının identifikasyonu, katalitik aktivite mekanizmasının aydınlatılması ve de metabolik yolların aydınlatılması hakkında bilgi verir (Luque De Castro ve Herrera, 2003; Li ve Miao, 2013; Maryott, 1915; Wang ve ark., 1998).

Çoğu ilaç enzim inhibitörü olarak etki göstermektedir. Bu ilaçlar enzimlerin katalizledikleri reaksiyonları substrata, ürüne ya da enzime bağlanarak inhibe ederler. Enzim inhibisyonu tersinir ve tersinmez olarak ikiye ayrılır. Genellikle ilaçlar, daha az yan etkileri olması için tersinir inhibitör olarak tasarlanmışlardır. Pestisit gibi tarım ilaçları ise genellikle tersinmezdir.

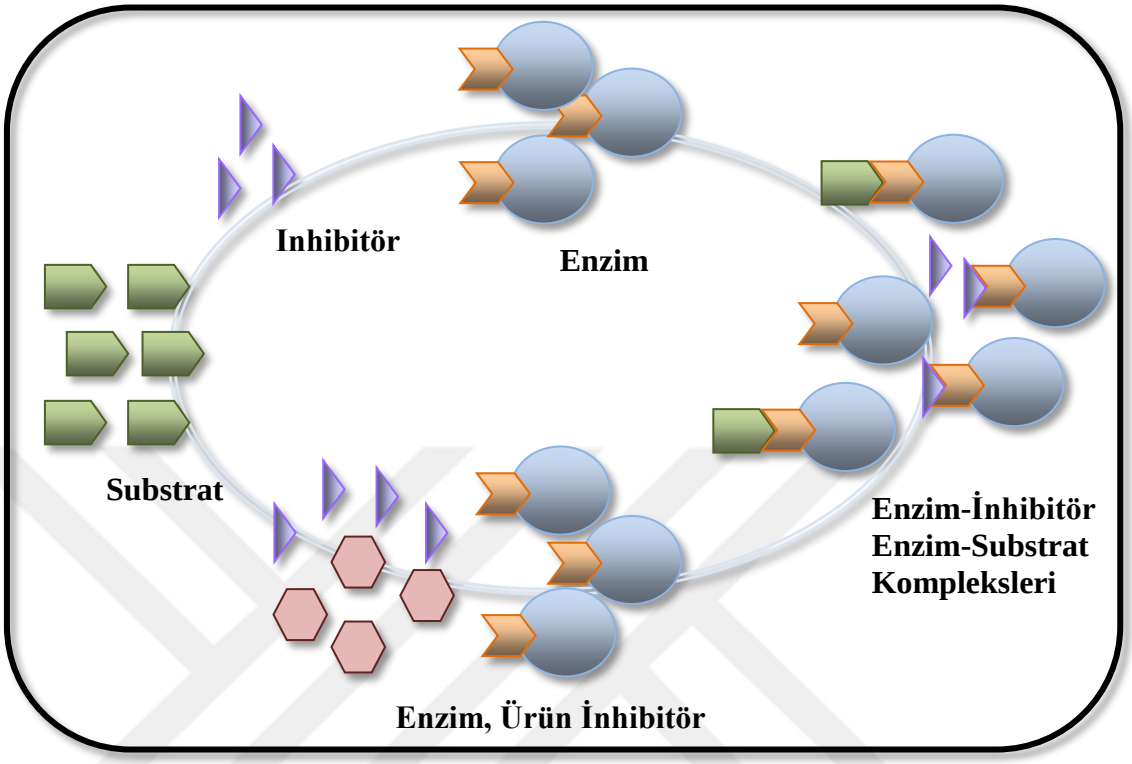
İnhibitörler, enzim ile ilişkilerine bağlı olarak yarışmalı (kompetitif), yarışmasız (nonkompetitif) ve yarışmaz (unkompetitif) olarak 3'e ayrılır. Yarışmalı (kompetitif), inhibitörler, genellikle enzimlerin aktif alanlarına bağlanırlar ve substrat ile yarış içinde bulunurlar. Başka bir deyiş ile inhibitör (I) ve substrat (S) enzimin bulunduğu ortama aynı zamanda ilave edildikleri zaman inhibitör ve substrat ayrı ayrı enzimin aktif bölgesine bağlanmak için birbirleriyle yarışırlar (Luque De Castro ve Herrera, 2003; Li ve Miao, 2013; Maryott, 1915; Wang ve ark., 1998).

Bu tür inhibisyon yapı bakımından substrata benzeyen maddeler tarafından yapılır. İnhibitör aktif merkeze bağlanarak enzim-inhibitör (EI) kompleksi oluşturur (Şekil 1.6.). Ancak bu reaksiyon sırasında enzim substrat (ES) ya da enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksleri oluşmaz. Çünkü enzim ve inhibitör aynı anda aktif bölgeye bağlanamaz, ancak sadece biri bağlanabilir. Enzim-İnhibitör komplesinin oluşması substrat ile reaksiyona girebilecek mevcut enzim moleküllerinin miktarında azalmaya sebep olur (Luque De Castro ve Herrera, 2003; Li ve Miao, 2013; Maryott, 1915; Wang ve ark., 1998).

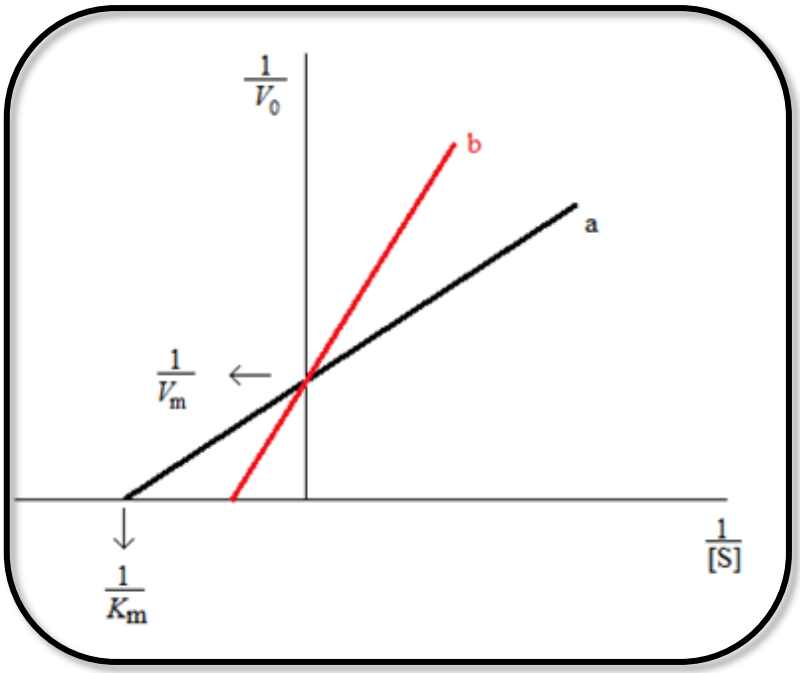
Eşitlik 3'te de gösterildiği gibi, enzimin inhibitör madde ile birleşmesi geriye dönüşümü olabilen bir reaksiyondur. Dolayısı ile yarışmalı (kompetitif) inhibisyon substrat derişimini arttırmakla tersine çevrilebilir. Yüksek substrat varlığında yarışmalı inhibisyon gerçekleşmez. Yarışmalı inhibitör kataliz hızını, ES kompleksi oranını düşürerek azaltır. K_m değeri artarken V_m değerinde herhangi bir değişme olmaz (Şekil 1.7).



(3)



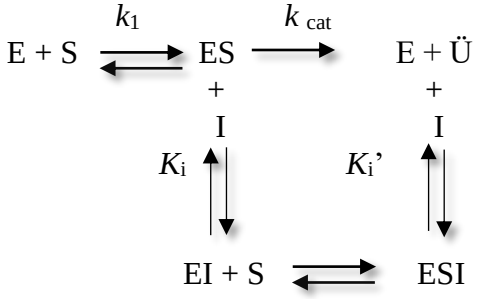
Şekil 1.6. Yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi.



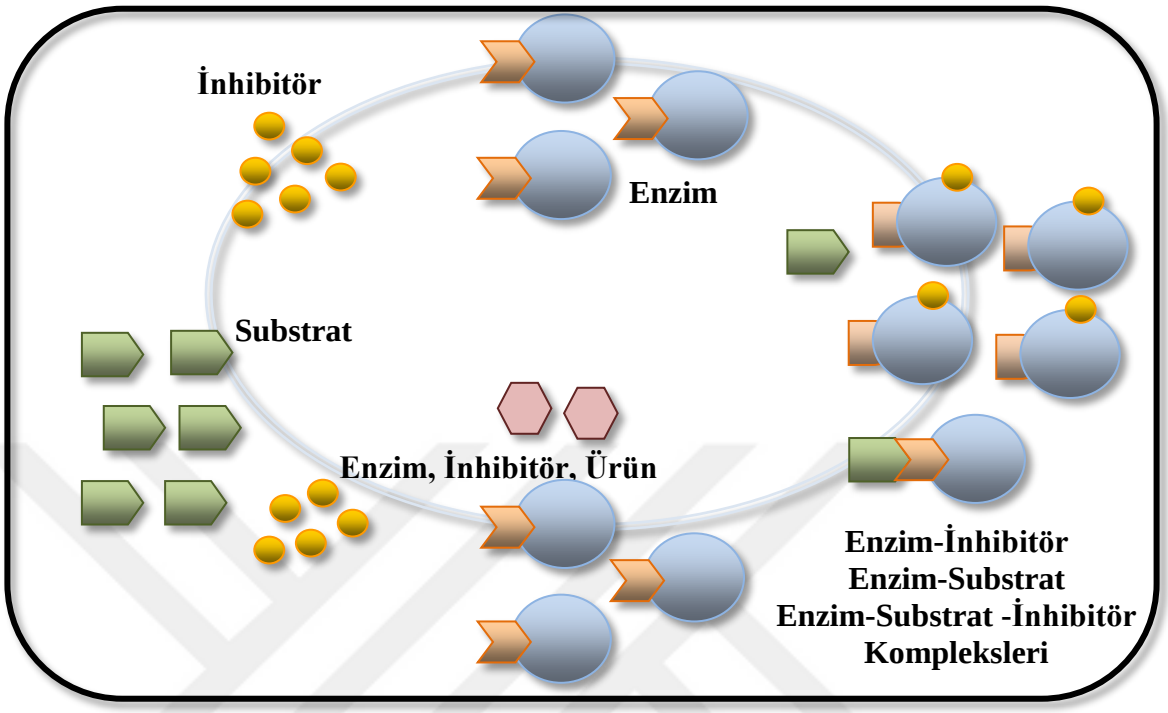
Şekil 1.7. Yarışmalı inhibisyon için enzim kinetiği (a serbest, b inhibitör varlığında).

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibitörler serbest enzimin aktif bölgelerinden uzağa, spesifik başka bir yere bağlanırlar. Başka bir deyişle, inhibitörle enzim ayrı ayrı yerlere bağlanırlar. Bu nedenle inhibitör ve enzim yarışma halinde değildir. Bundan dolayı bu inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon olarak adlandırılır.

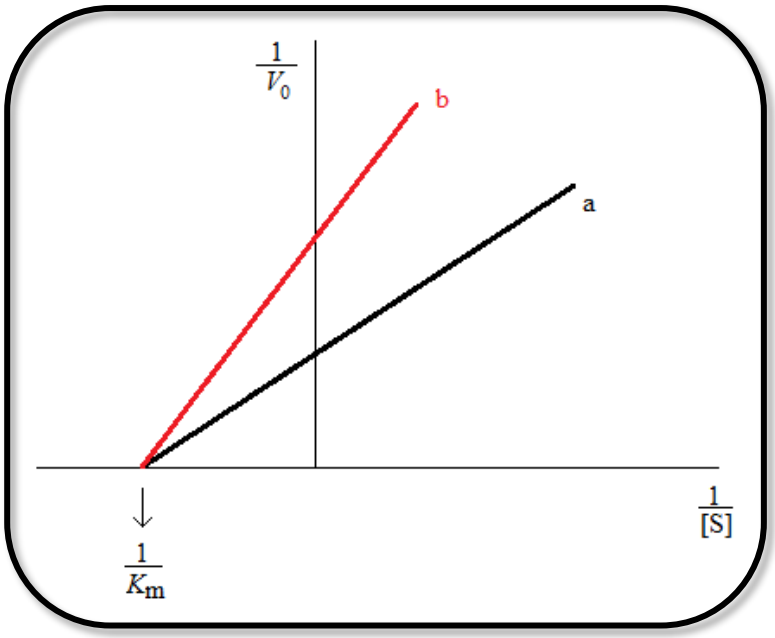
Inhibitör ve substrat arasında yapısal bir benzerlik yoktur. Genellikle aktif bölgede yapısal bir değişiklik meydana getirirler. Substrat enzimin aktif bölgesine bağlanamaz ve enzim inhibisyona uğrar (eşitlik 4, Şekil 1.8). Yarışmalı inhibisyonun aksine yarışmasız inhibisyon, yüksek substrat varlığında da gerçekleşir. İnhibisyon derecesi ile substrat derişimi arasında bir ilişki yoktur. K_m değişmez (Şekil 1.9).Yarışmasız inhibisyon yalnızca inhibitör derişimine bağlıdır. Enzim-Substrat-Inhibitör kompleksi inaktif olduğundan ürün oluşmaz (Luque De Castro ve Herrera, 2003; Li ve Miao, 2013; Maryott, 1915; Wang ve ark., 1998).



(4)



Şekil 1.8. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterimi.

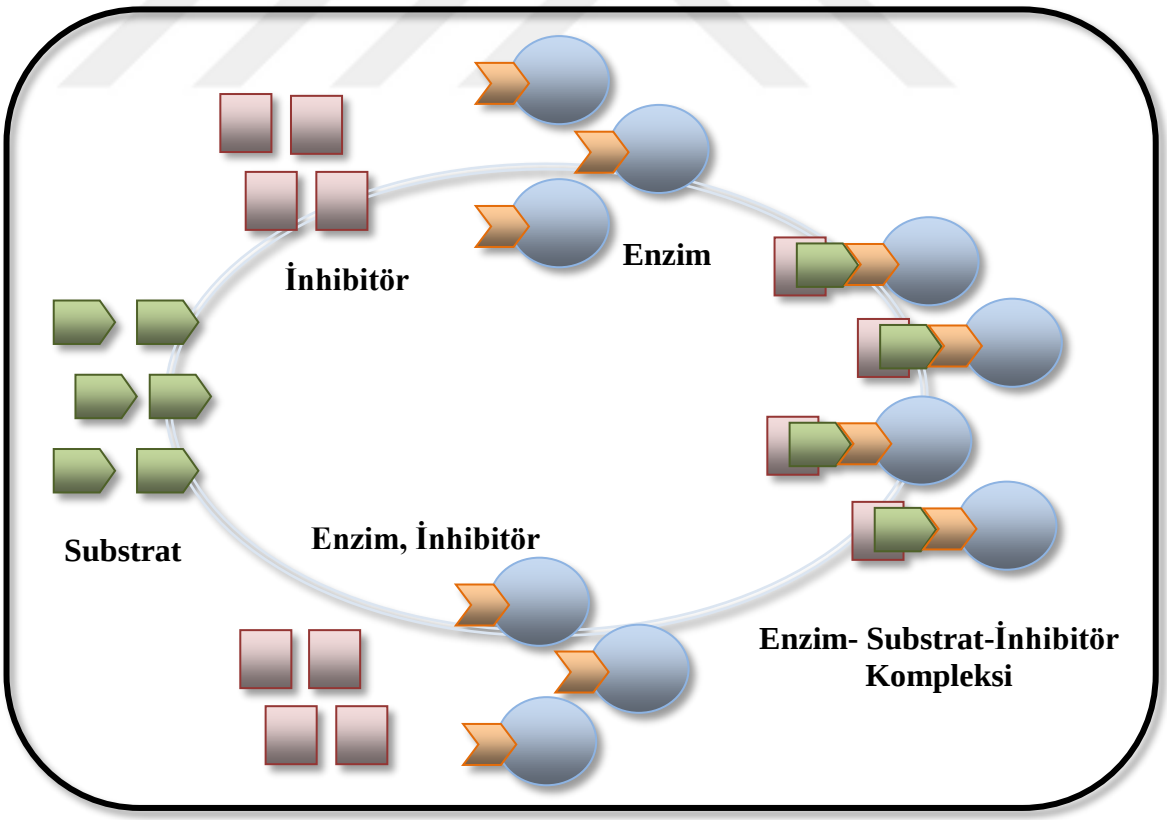


Şekil 1.9. Yarışmasız inhibitörler için enzim kinetiği (a serbest, b inhibitör varlığında).

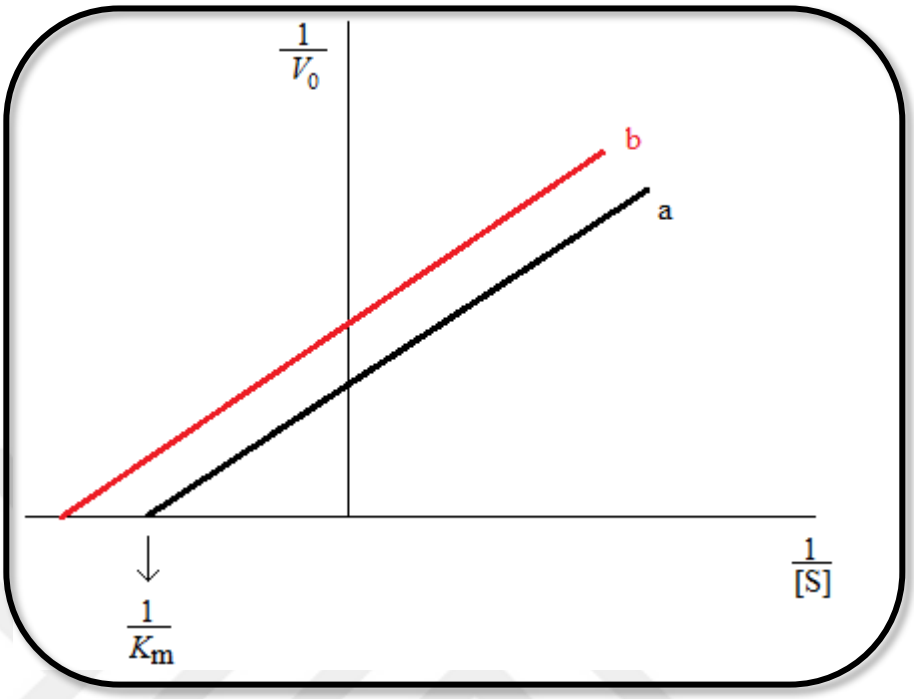
Yarışmaz (unkompetitif) inhibitörler ise yapısı gereği sadece ES kompleksine bağlanabilir ve bunun sonucunda ürün oluşumu gözlenmez (eşitlik 5, şekil 1.10). Bu inhibisyonda, inhibitör varlığında ES kompleksi sürekli olarak ortamdan uzaklaştığı için K_m azalır. Aynı zamandan ortamda sürekli olarak ESI kompleksi olacağı için V_m de düşer (Şekil 1.11) (Luque De Castro ve Herrera, 2003; Li ve Miao, 2013; Maryott, 1915; Wang ve ark., 1998).

$$E + S \underset{}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{cat}} E \qquad (5)$$

$$ES + I \rightleftharpoons ESI$$

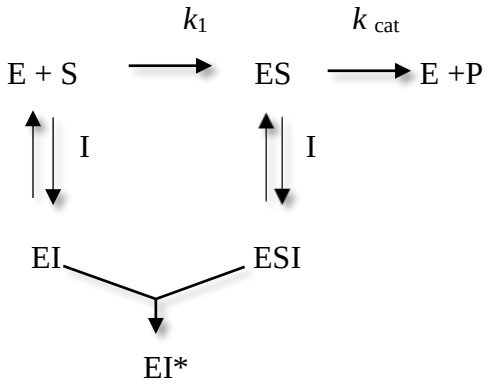


Şekil 1.10. Yarışmaz inhibisyonun şematik gösterimi.



Şekil 1.11. Yarışmaz inhibitörler için enzim kinetiği (a serbest, b inhibitör varlığında).

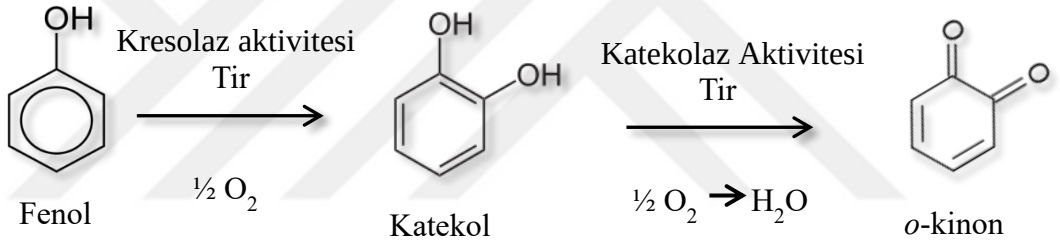
Bir diğer inhibisyon sınıfı olan tersinmez inhibisyon, tersinmez bir inhibitörün, enzim üzerinde bulunan ve aktivite için esas olan bir fonksiyonel grubu yıkması veya onunla tersinmez olarak birleşmesi sonucu meydana gelir (Luque De Castro ve Herrera, 2003; Li ve Miao, 2013; Maryott, 1915; Wang ve ark., 1998).



(5)

1.2.5. Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz, (polifenol oksidaz, Katekolaz, fenolaz, Katekol oksidaz, fenol oksidaz, EC.1.14.18.1), oksidoredüktaz sınıfına ait, yapısında kofaktör olarak bakır içeren bir enzimdir. Tirozinaz enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur (Whitaker, 1972). Tirozinaz moleküler oksijen varlığında iki reaksiyonu katalizler; monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi) ve *o*-fenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu (Katekolaz aktivitesi) (Şekil 1.12) (Audrey ve ark., 2012; Chang, 2009; Whitaker, 1972).



Şekil 1.12. Tirozinaz enzim mekanizması.

Melanin pigmentinin fazla salgılanmasından dolayı bazı dermatolojik bozukluklar ortaya çıkabilmektedir. Melanin biyosentezinin engellenmesi bu dermatolojik bozuklukların giderilmesine yardımcı olabilmektedir. Bunun için, Tirozinaz inhibisyonu, melanosit metabolizmasının ve proliferasyonunun engellenmesi veya melanin giderimi ve de UV ışınlarından korunulması gerekmektedir. Hiperpigmentasyonun giderilmesi için, hidrokinonlarla beyazlatma, retinoidlerle anti-inflamatuvar tedavi ve Tirozinaz inhibitörlerinin kullanılması gerekmektedir. dermal melanin üretimini baskılayan Tirozinaz inhibitörleri, beyazlatıcı veya anti-hiperpigment ajanları olarak tercih edilmektedirler ve kozmetik/medikal endüstrilerinde Tirozinaz inhibitörleri giderek önem kazanmaktadır. Tirozinaz inhibitörlerinden olan Arbutin ve Aloesin kozmetik

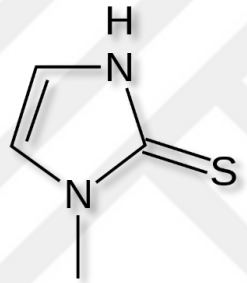
endüstrisinde sıklıkla kullanılır. Doğal kaynaklı veya sentetik birçok Tirozinaz inhibitörü keşfedilmiştir (Baurin ve ark., 2002; Hassan Khan, 2007; Krueger, 1954; Sanchez-Ferrer ve ark., 1995; Seo ve ark., 2003; Van Gelder ve ark., 1997).

1.2.5.1. Tirozinaz Enzimini İnhibe Eden İlaçlar

Doğal ve sentetik kaynaklı birçok Tirozinaz inhibitör bulunmaktadır. Farklı özelliklerinden dolayı bazı maddeler, Tirozinaz inhibitör özelliği gösterebilir. Askorbik asit gibi dopakinonların indirgenmesine sebep olan indirgeyici ajanlar Tirozinaz inhibitörleridir. Askorbik asit, aynı zamanda o-dopakinonlarının dopaya tekrar indirgenme özelliklerinden dolayı dopakrom ve melanin formasyonunu da engeller. Sülfür içeren bazı maddelerin, melanin oluşumunu engellediği bilinmektedir. Sülfür içeren bazı maddeler dopakinon ile reaksiyona girerek renksiz bir ürün oluştururlar. Bunlara alternatif olarak, Tirozinaz enziminin substratı olan fenolik maddelerin kimyasal yapısına benzeyen maddelerin de Tirozinaz enzimine güçlü bir şekilde afiniteleri vardır. Bu maddeler bağlandıkları zaman dopakrom oluşumu engellenir. Ayrıca, asit ve baz gibi spesifik olmayan enzim inaktivitörleri de Tirozinaz enzimini inaktive edebileceklerinden inhibe ettikleri de bazı kaynaklarda söylenmektedir. Geri dönüşümsüz olarak Tirozinaz enzimini inhibe eden maddeler kovalent olarak Tirozinaz enzimine bağlanır, dolayısıyla Tirozinaz enzimi substratına bağlanamaz ve melanin oluşumu engellenmiş olur. Kojik asit, Tropolon, *L*-Minosin, Polifenoller (Kersetin, Taksifolin, Kuraridin, Kumarin vb.), benzaldehit, benzoate türevleri (Aloesin, Kloroporin, Oksiresveratrol vb.), uzun yapılı lipitleri ve steroitler (Trilinoleyein, Arjunilik asit vb.), sentetik kaynaklı maddeler (okzadiazol türevleri, okzalon türevleri, tetraketon türevleri, Sildenafil türevleri vb.), sülfür içeren bazı maddeler (Kaptopril, Metimazol vb.), geri dönüşümsüz bağlanabilen (setilpiridinklorit, 3,5-dihidroksifeniş dekanot vb.) maddeler bilinen Tirozinaz enzimi inhibitörleridir (Aytemir ve Karakaya, 2012; Baurin ve ark., 2002; Genç ve ark., 2014; Krueger, 1954; Sanchez-Ferrer ve ark., 1995; Seo ve ark., 2003; Van Gelder ve ark., 1997).

1.2.5.1.1. Metimazol

Metimazol oral yoldan kullanılan antitiroid bir ilaçtır (Şekil 1.13). Antitiroid ajanlar değişik tipte hipertiroidi olgularında kullanılırlar. Metimazol, propiltiyoürasil ile karşılaştırıldığında daha düşük agranülositoz riski taşır. Ayrıca, Metimazol'ün serum tiroksin ve triiyodotironin derişimlerini propiltiyoürasil'e göre daha hızlı düşürdüğü kabul edilmektedir (Andrawis ve Kahn, 1996; Martindale, 2009; Reynolds, 1989; RxMediaPharma® 2016; Shleev ve ark., 2005; Weetman ve ark., 1984).



Şekil 1.13. Metimazol ilaç etken maddesinin kimyasal formülü

Metimazol tiroid bezindeki tiroid hormon biyosentezinin ilk aşamasını doğrudan engeller. Katalizör tiroid peroksidazın substratı gibi hareket ederek iyodürün tiroid hormon prekürsörü olan tiroglobülin'e katılımını inhibe eder. Sonuçta ilaç iyodize edilir ve tiroid bezi içinde parçalanır. Okside iyot tiroglobülinden uzaklaştırılır ve tiroid hormon biyosentezi etkin bir şekilde azalır. Metimazol dolaşımda veya tiroid bezindeki depolarda önceden var olan tiroksin (T_4) ve triiyodotironin (T_3)'ün etkilerini değiştirmez. Benzer şekilde ekzojen olarak uygulanan tiroid hormonlarının etkinliği üzerinde de herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Andrawis ve Kahn, 1996; Edward, 1992; RxMediaPharma® 2016; Shleev ve ark., 2005).

Metimazol oral yoldan verilir ve gastrointestinal kanaldan hızla absorbe olarak 1-2 saat sonra serumda doruk derişimine ulaşır. Absorbe olan Metimazol tiroid bezi tarafından alınarak burada yoğunlaştırılır. Metimazol'un proteinlere bağlanması önemsiz düzeydedir ve bunun bir sonucu olarak anne sütüne bu gruptaki diğer ilaçlara göre çok daha hızlı bir şekilde geçer. Plasenta engelini fetusta zarar oluşturacak derecede aşabilir (Andrawis ve Kahn, 1996; RxMediaPharma® 2016; Shleev ve ark., 2005).

Metimazol karaciğerde metabolize edilir, ancak bu metabolizma sonucunda aktif metabolitleri oluşmaz. Ana ilaç ve metabolitleri renal yoldan elimine olur. Metimazol'ün yarı ömrü yaklaşık 5 saattir. Bununla birlikte etki süresi tiroid hücrelerinde birikime uğraması nedeniyle 40 saat kadar devam eder. Eliminasyon yarı ömrünün 13 saate kadar uzayabileceği bildirilmiştir. Renal veya hepatik hastalık bu parametre üzerinde değişikliğe yol açabilir. Bu nedenle renal veya hepatik hastalığı olan hastalarda dozun azaltılması gerekebilir (Hengstmann ve Hohn 1985; RxMediaPharma® 2016).

Metimazol, Tirozinaz'ın hem kresolaz aktivitesini hem de Katekolaz aktivitesini inhibe eder. Tirozinaz enzimini, aktif merkezdeki bakır atomlarına bağlanarak geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe eder (Andrawis ve Kahn, 1996 ve Shleev ve ark., 2005). Aynı zamanda tiyol gruplarından Katekol'e bağlanarak, substrat özelliğini kaybettirerek de inhibe etkisi vardır (Andrawis ve Kahn, 1996; Gallo ve ark., 1983; Seo ve ark., 2003; Whiteman ve Halliwell, 1997). Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Metimazol ilaç etken maddesinin analizine yönelik geliştirilen sensörler çizelge 1.3'de verilmiştir. Ayrıca çizelge 1.4'de çeşitli analiz yöntemleri ile Metimazol ilaç etken maddesinin analizlerine ait sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 1.3. Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Metimazol analizine yönelik geliştirilen bazı sensörler.

Elektrot modifikasyonu	Elektrokimyasal Yöntem	Ortam	Potansiyel (V)	YS/TAS (M)	Uygulama	Kaynak
Florin dope kalay oksit elektrot	Kare dalga voltametri	Britton–Robinson tampon (pH 3,0)	0,85	$1,98x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form	Molero ve ark., 2013
CdSNPs–iGO/IS–KPE	Doğrusal taramalı voltametri	Asetat Tamponu (pH 6,5)	0,65	$5,5x10^{-10}$	-	Norouzi ve ark. 2014
poli(pivalik asit)-CoNPs/ÇDKNT/CKE	Dönüşümlü voltametri	0,1 M Fosfat Tamponu (pH 7,2)	0,26	$9,36x10^{-9}$	Farmasötik dozaj form	Kutluay ve Aslanoglu, 2012
Asetilensiyah/kitosan/CKE	Diferansiyel puls voltametri	Fosfat Tamponu (pH 7,0)	0,63	$2,0x10^{-8}$	Rat serum	Yazhen 2011
ÇDKNT/CKE	Amperometri	Fosfat Tamponu (pH 8,0)	0,22	$18x10^{-9}$	Farmasötik dozaj form ve serum	Dorraji ve Jalali, 2015
ÇDKNT/CKE	Adsoptif sıyırma dpv	0,1 M Fosfat Tamponu (pH 6,86)	0,43	$3,01x10^{-8}$	Farmasötik dozaj form, serum ve idrar	Xi ve ark., 2010
ÇDKNT/TiO_2 NP/KPE	Dönüşümlü voltametri	Evrensel Tampon (pH 7)	0,66	$0,17x10^{-6}$	Farmasötik dozaj form ve serum	Fouladgar ve Mohammadzadeh, 2014
Pt Disk Elektrot	Kare dalga voltametrisi	0,1 M Tris/HCl (pH 7,2)	0,8	$0,5x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form	Aslanoglu ve Peker, 2003

Çizelge 1.4. Diğer analiz yöntemleri ile Metimazol analizi.

Yöntem	Analiz Şartları/Metod	Ortam	YS/TAS	Uygulama	Kaynak
Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Saçılması	Raman spektroskopik sistemi Lab Ram HR Evolution Raman He-Ne 17 mW lazer 633 nm egzitasyon dalga boyu.	Substrat: Grafen ile fonksiyonlandırılmış polyamidoamit dendrimeri ve gümüş nanopartiküller	1,43 x10^{-12} M	Farmasötik dozaj form	Saleh ve ark., 2016
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - UV	Kolon: Zorbax SB-C18 Sıcaklık: 25°C, Akış hızı: 1,2 ml dk^{-1} Dalga boyu: 345 nm.	Hareketli Faz A: 0,05 M Trikloroasetikasit tamponu (pH 3,2 0,05 M trikloroasetikasit ve 0,05 M LiOH), B: asetonitril. 0–1,5 dk %20 B; 1,5–2,5 dk %20–60 B; 2,5–3,5 dk %60–20 B; 3,5–6 dk %20 B.	Dokuda 0,1 mg kg^{-1} Plazmada 0,1 mgL^{-1}	Hayvan dokusu ve plazma	Chwatko ve ark., 2014
UV Spektrofotometrisi	Dalga boyu: 663 nm	Demir(III)Tiron pH 2,8	3,2 µg.mL^{-1}	Farmasötik dozaj form	Tu ve Wen, 2013
Hollov fiber sıvı faz mikroekstrasyon/YPSK -UV	Kolon: ODS-H C18 (250× 4.6 mm, id 5 µm) Akış hızı: 1 mL.dk^{-1} Enjeksiyon hacmi: 20 µL Dalga boyu: 254 nm.	Hareketli Faz: metanol ve ultradistile su (30:70, h/h),	Suda 0,1 µg.L^{-1} Plazmada 0,7 µg.L^{-1} İdrarda 0,5 µg.L^{-1} Süttte 0,7 µg.L^{-1} Hayvan yeminde 0,5 µg.L^{-1}	Plazma, idrar, süt, hayvan yemi	Ebrahimzadeh ve ark., 2012
Kemiluminesans	Dalga boyu 425 nm	Substrat: Altın NPs/luminol-H_2O_2	1.6 x 10^{-8} M	Farmasötik dozaj form ve domuz serumu	Sheng ve rak., 2011

Çizelge 1.4. Devam. Diğer analiz yöntemleri ile Metimazol analizi.

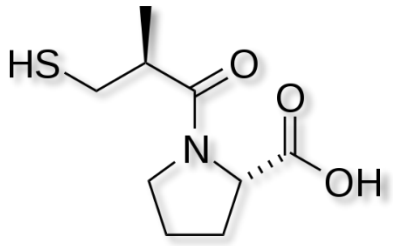
Yöntem	Analiz Şartları/Metod	Ortam	YS/TAS (M)	Uygulama	Kaynak
UV Spektrofotometrisi	Dalga boyu: 400 nm	N,N,-dimetil-p-fenilendiamin	0,125 $x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form ve saf madde	Skowron ve Ciesielski, 2011
UV Spektrofotometrisi	Dalga boyu: 735 nm	Potasyum ferrisayanit Demir(III)	0,015 $x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form, serum, idrar	Dong ve ark., 2010
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - UV	Kolon: Hypersil-ODS (4.6mm×250mm, Thermo) Enjeksiyon hacmi: 20 µL Akış hızı: 0,5mL.dk^{-1} Dalga boyu: 254nm	Hareketli Faz: Metanol ve 0,02 M KH_2PO_4 pH 3,2 3:7 (h/h).	Böbrek örneklerinde 0,63 µg.kg^{-1}, Ciğer örneklerinde, 0,51 µg.kg^{-1}, Kas örneklerinde 0,56 µg.kg^{-1}	Domuz örnekleri	Pan ve ark., 2010
Elektro kemiluminesans	Quantum Parçaları/KNT/CKE 390 nm egzitasyon dalga boyu	pH 8,5 fosfat tamponu	$1,0 \times 10^{-9}$	Farmasötik dozaj form	Hua ve ark., 2009
Floresans	380 nm egzitasyon dalga boyu	Substrat: CdSe quantum tanecikleri çözeltisi	$30x10^{-6}$	Farmasötik dozaj form ve rat idrar	Dong ve ark., 2009
Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -UV	Kolon: Symmetry C18 (150mm×3.9mm i.d., 5µm, Waters) Akış hızı: 0,5 mL/dk Dalga boyu:350 nm	Hareketli Faz: Asetonitril, sodyum azit çözeltisi (pH 5.5; %2,5, a/h) ve su (20:50:30, h/h/h)	İdrarda $1x10^{-6}$	İdrar	Zakrzewski, 2008

Çizelge 1.4. Devam. Diğer analiz yöntemleri ile Metimazol analizi.

Yöntem	Analiz Şartları/Metod	Ortam	YS/TAS	Uygulama	Kaynak
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - UV	Kolon: Zorbax SB C-18 Akış hızı: 1,2 ml/dk Kolon sıcaklığı: 25 °C Dalga boyu: 345 nm.	Hareketli Faz A: 0,05 mol/l, pH 3,2, trikloroasetikasit tamponu B: asetonitril. 0–3 dk %12 B, 3–9 dk %12–30 B, 9–12 dk %30–12 B	İdrarda 0,15 mg/L	İdrar	Kusmierek ve Bald, 2007
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - UV	Kolon: Atlantis dC18 column (150 mm x 4,0 mm, 5 µm Waters) Akış hızı: 1 mL/dk Dalga boyu: 255 nm Enjeksiyon hacmi: 10 µL	Hareketli Faz: Fosfat tamponu (pH 6,7): metanol Gradient: 100:0, 2 dk, 90:10 2 dk, 90:10 4 dk Başlangıça geri dönüş 2 dk	0,06 ng	Balık	Hollosi ve ark., 2004
UV Spektrofotometrisi	Dalga boyu: 325 nm	$5x10^{-3}$ M Pd(II)Cl, 0,5 M HC1	$1x10^{-5}$ M	Farmasötik dozaj form ve idrar	Sanchez- Pedreno ve ark., 1995

1.2.5.1.2. Kaptopril

Kaptopril bir anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörüdür (Şekil 1.14). Hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, nefropati ve skleroderma gibi değişik renal sendromların tedavisinde kullanılır. Kaptopril'in kalp yetmezliğindeki kullanımına ilişkin çalışmalar 1970'lerin sonlarından beri devam etmesine rağmen, ilacın kalp yetmezliği olan hastalarda mortaliteyi anlamlı bir şekilde azaltabildiği 1992 yılına kadar gösterilememiştir. Hipertansiyon tedavisinde kullanımın yaygınlaşması da oldukça yenidir. Kaptopril de genellikle günde 2 veya 3 kez alınarak kullanılır. Yapısında farmakolojik etkisine katkıda bulunan ve yüksek dozlarda kullanıldığında ortaya çıkan bazı yan etkilerinden de sorumlu tutulan bir sülfidril grubu taşır (Ensafi ve ark., 2012; Jankowski ve ark., 1995; Liu ve Song, 2015; Martindale, 2009; RxMediaPharma® 2016; Wittmer ve ark., 2015; Zicha ve ark., 2014).



Şekil 1.14. Kaptopril ilaç etken maddesinin kimyasal formülü.

Kaptopril arteriyolleri gevşetir ve buna bağlı olarak total periferik vasküler rezistansı düşürür. Hipertansif hastalarda kan basıncını kalp hızı, kalbin atım hacmi ve debisinde herhangi bir değişiklik yapmadan ya da çok hafif değişiklikler yaparak düşürür. Bununla birlikte konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda kalp debisi, kardiyak indeks, kalbin atım hacmi ve egzersize toleransı artırır. Kaptopril bu durumdaki hastalarda pulmoner ve basıncı, pulmoner vasküler rezistans ve sağ atriyum basıncını da düşürür.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri sol ventrikül hipertrofisini hafifletirler, insülin rezistansının ve hiperlipideminin kötüleşmesine neden olmazlar ve seksüel disfonksiyona yol açmazlar (Ensafi ve ark., 2012; Himmelmann ve ark., 2001; Jankowski ve ark., 1995; Liu ve Song, 2015; Plosker ve McTavish, 1995; RxMediaPharma® 2016).

Kaptopril oral yoldan uygulanır. Alındıktan sonra gastrointestinal kanaldan hızla emilir. Besinlerle birlikte alındığında absorbsiyonu %25-40 oranında azalır. Belirgin antihipertansif etkisi 15 dakika içinde başlar; etkisini tam olarak gösterebilmesi için birkaç haftalık bir tedavi dönemine gerek vardır. Kaptopril pek çok vücut dokusuna dağılır ve plazma proteinlerine yaklaşık % 25 oranında bağlanır. Karaciğerde metabolize edilir (% 50; değişmemiş ilaç ve metabolitleri idrarla atılıma uğrar. Verilen dozun etkisi genellikle 2-6 saat kadar devam eder; etki süresi böbrek fonksiyonu bozuk olan hastalarda uzayabilir. Yarı ömrü böbrek fonksiyonu normal hastalarda 2 saatten daha azdır, fakat anürik hastalarda 6 güne kadar uzayabilir (Ensafi ve ark., 2012; Jankowski ve ark., 1995; Liu ve Song, 2015; RxMediaPharma® 2016).

Kaptopril'in Tirozinaz enzimi üzerinde geri dönüşümsüz olarak yarışmalı ve yarışmasız şekilde inhibisyon etki bulunmuştur (Chu, 2012; Chu ve ark., 2012; Espin ve Wichers, 2001; Espin, 2001). Tirozinaz enziminin mono ve difenolaz aktivitesine etki eder, o-kinonunu renksiz konjugesine çevirir (Burestedt ve ark., 1996 ve Chang, 2009). Elektrokimyasal yöntemler ile Kaptopril ilaç etken maddesinin analizine yönelik geliştirilen sensörler çizelge 1.5'te verilmiştir. Ayrıca çizelge 1.6'da çeşitli analiz yöntemleri ile Kaptopril ilaç etken maddesinin analizlerine ait sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 1.5. Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Kaptopril analizine yönelik geliştirilen sensörler.

Elektrot modifikasyonu	Elektrokimyasal Yöntem	Ortam	Potansiyel (V)	YS/TAS (M)	Uygulama	Kaynak
PBE	Amperometri	0,1 M KNO_3	0,4	$4,27x10^{-3}$	-	Areias ve ark., 2016
N-4,4'-azodianilinferrosen/ ÇDKNT/KPE	Diferansiyel puls voltametri	0,05 M fosfat tamponu (pH 7,0)	0,55	$3,0x10^{-8}$	İdrar	Taei ve ark., 2015
ZnO-CuO NP/KPE	Kare dalga voltametri	0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0)	0,28	$9,0x10^{-8}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Beitollahi ve ark., 2015
1,4-fenilen-N,N′-bis (O,O-difenilfromidat)/CdS quantum parçacıkları/ÇDKNT/CKE	Amperometri	0,1 M fosfat tamponu (pH 9,0)	0,32	$15x10^{-9}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Paimard ve ark., 2015
CuO NP/ ÇDKNT/ Nanokompozit elektrot	Diferansiyel puls voltametri	0,02 M Britton–Robinson tamponu (pH 2,3)	0,50	$3,0x10^{-7}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Zargar ve ark., 2015
Rutenyum-Paladyum bimetalik ince film nanopor altın film	Amperometri	0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0)	-0,3	$1,25x10^{-9}$	Farmasötik dozaj form, serum ve idrar	Tavakkoli ve ark., 2015
N-(4-hidroksifenil)-3,5-dinitrobenzamit ZnO/KNT/KPE	Kare dalga voltametri	0,1 M fosfat tamponu (pH 6,0)	0,38	$1,0x10^{-8}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Bagheri ve ark., 2014

Çizelge 1.5. Devam. Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Kaptopril analizine yönelik geliştirilen sensörler.

Elektrot modifikasyonu	Elektrokimyasal Yöntem	Ortam	Potansiyel (V)	YS/TAS	Uygulama	Kaynak
NiO NP/(9,10-dihidro-9,10-ethanoantrasin-11,12-dikarboksimitdikarboksimido) -4-etil benzen-1,2-diol KPE	Kare dalga voltametri	0,1 M fosfat tamponu (pH 6,0)	0,31	$7,0x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Karimi-Maleh ve ark., 2014
Cu-Co HSF/KPE	Amperometri	0,1 M fosfat tamponu (pH 3,0)	0,7	$4,2\ x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form	Jalali ve Ranjbar, 2014
Mn/KPE	Doğrusal taramalı voltametri	0,1 M fosfat tamponu (pH 6,0)	0,65	$9,0\times10^{-8}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Habibi ve ark., 2013
GR/Cu HSF/CKE	Amperometri	0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0)	0,65	$0,09\ x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Gholivand ve ark., 2013
Klorpromazin/CKE	Amperometri	0,04 M Evrensel tamponu (pH 5)	0,63	$4,8\ x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Ensafi ve Arabzadeh, 2012
Vinil ferrosen/KNT/KPE	Kare dalga voltametri	0,1 M fosfat tamponu (pH 8,0)	0,43	$8,0x10^{-5}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Ensafi ve ark., 2012
Nano-TiO_2/Ferrosen Karboksilik asit/KPE	Amperometri	0,1 M fosfat tamponu	0,29	$0,0096x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Raoof ve ark., 2011
ÇDKNT/KPE	Diferansiyel puls voltametri	Fosfat Tamponu pH 9	0,3	$0,1x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Fouladgar, 2011
N-(3,4-dihidroksifeniletil)-3,5-dinitrobenzamit/KNT/KPE	Diferansiyel puls voltametri	0,1 M fosfat tamponu	0,2	$3,4\times10^{-8}$	Farmasötik dozaj form ve idrar	Ensafi ve ark., 2011

Çizelge 1.6. Diğer analiz yöntemleri ile Kaptopril analizi.

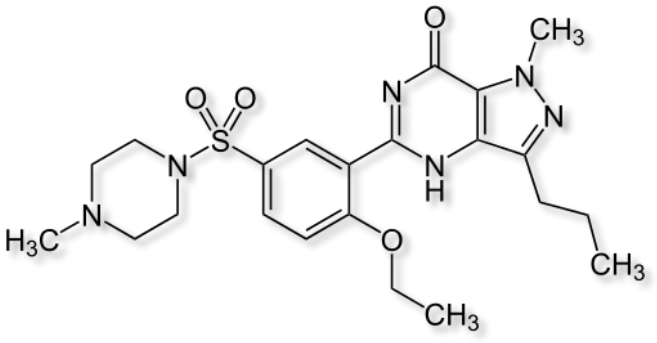
Yöntem	Analiz Şartları/Metod	Ortam	YS/TAS ($ng.mL^{-1}$)	Uygulama	Kaynak
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-UV	Kolon: 250x4,6mm Xterra RP8, 5 µm Dalga boyu: 210 nm Akış Hızı: 2 $mL.dk^{-1}$ Enjeksiyon hacmi: 20 µL	Hareketli Faz: pH 2,8, fosforik asit:metanol:asetonitril (6:2:2) h:h:h	$0,25x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form	El-Gindy ve ark., 2014
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -UV	Kolon: C18 (5 µm,150 mm x4,6 mm) Dalga boyu: 290 nm	Hareketli Faz: Metanol: pH 8, 0,01 M fosfat tamponu (75:25) h:h	3	Farmasötik dozaj form ve serum	Rastkari ve ark., 2013
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -UV	Kolon: Purospher Star RP-18 (250 mm, 4,6 mm) Akış Hızı: 1 $mL.dk^{-1}$ Dalga boyu: 218 nm	Hareketli Faz: Metanol ve su 50:50 (h/h)	$0,145x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form ve serum	Arayne ve ark., 2013
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -UV	Kolon: Bondapak C 18 (10 µm, 25 x 0,46 cm) Akış Hızı: 1 $mL.dk^{-1}$ Dalga boyu: 235 nm	Hareketli Faz: Metanol ve su 80:20 (h/h) pH 2	5,79	Farmasötik dozaj form ve serum	Sultana ve ark., 2013
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -UV	Kolon:150mmx4,6mm, 5µm fenil Akış Hızı: 1,2 $mL.dk^{-1}$ Enjeksiyon hacmi: 20 µL Dalga boyu: 220 nm	Hareketli Faz: Asetonitiril ve Fosforik asit (0,067 %)	$0,5x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form	Hess ve ark., 2011
UV- Spektrofotometrisi	Dalga boyu: 400 nm	N,N,-dimetil-p-fenilendiamin ile bağlanma	0,125	Farmasötik dozaj form ve saf madde	Skowron ve. Ciesielski, 2011

Çizelge 1.6. Devam. Diğer analiz yöntemleri ile Kaptopril analizi.

Yöntem	Analiz Şartları/Metod	Ortam	YS/TAS ($ng.mL^{-1}$)	Uygulama	Kaynak
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Elektrokimyasal Dedektör	Kolon: Phenomenex Luna 5µm (C18) Potansiyel: +600 mV,+950mV Akış Hızı: 1 $mL.dk^{-1}$	Hareketli Faz: Fosfat tampon (pH 3,0):Asetonitril 70:30(h:h)	$0,6x10^{-3}$	Farmasötik dozaj form	Khamanga ve Walker, 2011
Sıvı Kromatografisi -Kütle Spektrofotometrisi	Kolon: Cromolith RP 18e, 100mmx4.6mm I.D., 3µm m/z 415 Akış Hızı: 1 $mL.dk^{-1}$ Sıcaklık: 30 °C	Hareketli Faz: Asetonitril ve %1'lik formic asit suda 40:60 (h/h)	10,0	Plazma	Vancea ve ark., 2009
Sıvı Kromatografisi - Kütle/Kütle Spektrofotometrisi	Kolon: Chromolith C18 50mm x 4.6 mm, 5µm, m/z 218.04/116.0 Da Akış Hızı: 0,6 $mL.dk^{-1}$ Enjeksiyon hacmi: 20 µL	Hareketli Faz: metanol ve su (65:35, h/h)	10,0	Farmasötik dozaj form ve serum	Rezende ve ark., 2007
Ters Faz- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -UV	Kolon: C18 (Diamonsil 150 mm x 4mm,5µm) Dalga boyu: 263 nm Akış Hızı: 1,2 $mL.dk^{-1}$	Hareketli Faz: A: %0,2 trifloroasetikasit (pH 1,8) ve B:asetonitril 87:13 (A:B) 4dk B,% 60:40 4dk	7	Plazma	Huang ve ark., 2006
Sıvı Kromatografisi -Kütle Spektrofotometrisi	Kolon: C8 Waters Symmetry 5 µm, 150mmx4,6 mm. m/z 218 ve m/z 171,6 Akış Hızı: 1,5 $mL.dk^{-1}$	Hareketli Faz: Asetonitril: Su (70:30) (h/h) ve 13mM trifluoroasetik asit	25	Plazma	Salem ve ark., 2005
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -UV	Kolon: Spherisorb C18 250 x 4,6mm, 10 µm; Dalga boyu: 258 nm.	Hareketli Faz: Su:Asetonitril:Asetik Asit (44:55:0,2, h/h/h)	2	Plazma	Li ve ark., 1996

1.2.5.1.3. Sildenafil

Sildenafil sitrat (Sildenafil) bir fosfodiesteraz inhibitörüdür (Şekil 1.15). Erektil difonksiyon ve pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde oral yoldan kullanılır. Antianjinal etkiye de sahiptir. Sildenafil araştırma ilacı olarak sublingual apomorfin ile karşılaştırıldığında apomorfine göre daha etkilidir. Sildenafil'in çoklu antihipertansif ilaç rejimleri uygulanan hastalarda da etkili olduğu, bu hastalar tarafından iyi tolere edildiği ve ek güvenlik riski ile ilişkili olmadığı da bilinmektedir. Sildenafil'in egzersiz kapasitesi dışında ortalama pulmoner arter basıncını iyileştirmiş ve pulmoner arteriyel hipertansiyonlu hastalarda kardiyak fonksiyonun diğer parametrelerinde iyileştirme göstermiştir. Sildenafil pulmoner arter hipertansiyonunda erken dönem tedavi için oral yolla kullanılmak üzere onaylanan ilk ilaçtır. Sildenafil ayrıca yükseklik hastalığının tedavisinde de kullanılır (Martindale, 2009; Mezgebe ve Segawie, 2014; Moreland ve ark., 1999; RxMediaPharma® 2016; Stief, 2000; Truss ve Stief, 1998; Umrani ve Goyal 1999; Wallis, 1999).



Şekil 1.15. Sildenafil ilaç etken maddesinin kimyasal formülü.

Sildenafil siklik guanozin monofosfat (cGMP)-spesifik fosfodiesteraz tip 5 enziminin selektif inhibitörü olan bir ilaçtır. Sildenafil guanozin monofosfat (cGMP)-spesifik fosfodiesteraz tip 5 enzimini inhibe etmesine bağlı *Corpus Cavernosum*'da cGMP

derişimlerinin yükselmesini sağlayarak NO'nun etkisini arttırır. Sildenafil önerilen dozlarda insan izole *Corpus Cavernosum*'unda direkt gevşetici özellik göstermez. Sildenafil'in kan beyin engelini aşabildiği ve beyin damarlarındaki PDE5'i inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyon emosyonel, nörolojik ve psikolojik etkilere yol açabilir (Moreland ve ark., 1999; RxMediaPharma® 2016; Stief, 2000; Truss ve Stief, 1998).

Sildenafil, Tirozinaz enzimini inhibe ettiği yeni ortaya çıkan bir Tirozinaz inhibitörüdür. Sildenafil ve türevlerinin Tirozinaz inhibisyonu üzerine farmakolojik çalışmaları ve spektroskopik takibi yapılmıştır (Khan, ve ark., 2005a ve Khan ve ark., 2005b; Mojzych, 2014). Elektrokimyasal yöntemler ile Sildenafil ilaç etken maddesinin analizine yönelik geliştirilen sensörler çizelge 1.7.'de verilmiştir. Ayrıca çizelge 1.8'de çeşitli analiz yöntemleri ile Sildenafil ilaç etken maddesinin analizlerine ait sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 1.7. Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Sildenafil analizine yönelik geliştirilen sensörler.

Elektrot modifikasyonu	Elektrokimyasal yöntem	Ortam	Potansiyel (V)	YS/TAS (M)	Uygulama	Kaynak
Pp/KGE	Potansiyometri	0,1 mol L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$ (pH 4)	1,0	$3,0x10^{-5}$	Farmasötik dozaj form	Ochiai ve ark., 2016
Camsı Karbon Elektrot	Dönüşümlü voltametri	Britton-Robinson (pH 3,26)	1,22	-	-	Mezgebe ve Sergawie, 2014
Bizmuh film/CKE	Adsorptif sıyırma voltametri	0,1 M asetat tsmponu (pH 4,5)	-1,26	$1,8x10^{-8}$	-	Sopha ve ark., 2012
Karbon Pasta Elektrot Perde Baskılı Elektrot	Potansiyometri	Asetat tamponu (pH 5,0)	-	$9,0x10^{-8}$ $3,5x10^{-7}$	Farmasötik dozaj form	Frag ve ark., 2011
Bor ile katkılandırılmış Elmas Elektrot	Diferansiyel puls voltametri	0,1 M H_2SO_4	1,4	$6,4x10^{-7}$	Farmasötik dozaj form	Batista ve ark., 2010
Elmas Pasta Elektrot	Kare dalga voltametri	0,01 M $HClO_4$ and $NaClO_4$ (pH 2,00)	+0,175	$0,1x10^{-13}$	Farmasötik dozaj form	Stefan-van Staden ve ark., 2010
Kurşun Film/CKE	Kare dalga voltametri	Asetat tamponu (pH 5,0)	−1,33	$9x10^{-10}$	Farmasötik dozaj form	Tyszczuk ve Korolczu, 2010
Camsı Karbon Elektrot	Dönüşümlü voltametri Diferansiyel puls v. Kare dalga voltametri	Fosfat tamponu (pH 2)	1,3	$5,69x10^{-6}$ $6,92x10^{-7}$ $6,28x10^{-7}$	Farmasötik dozaj form	Özkan ve ark., 2004

Çizelge 1.8. Diğer analiz yöntemleri ile Sildenafil analizi.

Yöntem	Analiz Şartları/Metod	Ortam	YS/TAS ($ng.mL^{-1}$)	Uygulama	Kaynak
Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrofotometrisi	Kolon: KinetexC18 UPLC (50 mm × 2,1 mm, 1,3 µm) m/z 475,3 → 283,2 Akış hızı: 0,25 $mL.dk^{-1}$	Hareketli Faz: A: %0,1 Formik Asit Suda B: Metanolde 0-1dk %30 B, 4dk %90 B, 4,8 dk %30 B, 7 dk %30 B	5	Rat plazması	Rashid ve Ahsan, 2016
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-UV	Kolon: DS C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) Dalga boyu: 230 nm	Hareketli Faz: %3 su, % 37 asetonitril and 0,1% trietilamin (pH 7,7)	2	Plazma	Al-Hroub ve ark., 2016
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-UV	Kolon:C18 Inertsil ODS2 HPLC column (150 × 4,6 mm; 5 µm) Akış Hızı:1 $mL.dk^{-1}$ Dalga boyu: 230 nm	Hareketli Faz: Asetonitril, fosfat tamponu 30 m≻m pH 6.0; 47:53, h/h)	0,5	Plazma	Goffredo ve ark., 2016
Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrofotometrisi	Kolon: Acquity UPLC HSS T3 1.8 µm (2,1 x 150 mm) Akış Hızı:0,4 $mL.dk^{-1}$	A: %0,05 Formik asit suda B: Asetonitril %0,05 Formik Asit 0,1 dk% 10 B; 4,5 dk %30 B; %70 B; 6,5 dk %95 B ve 8,3 dk başlangıca dönüş	1,95	Plazma	Simiele ve ark., 2015
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -UV	Kolon: Supelcosil PCN cyanopropyl 250 x 4,6 mm x 5µM Dalga boyu: 230 nm Akış hızı: 1 $mL.dk^{-1}$	50 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 4.5) ve asetonitril (75:25, h/h)	5	Rat plazması	Strach ve ark., 2015

Çizelge 1.8. Devam. Diğer analiz yöntemleri ile Sildenafil analizi.

Yöntem	Analiz Şartları/Metod	Ortam	YS/TAS ($ng.mL^{-1}$)	Uygulama	Kaynak
Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrofotometrisi	Kolon: PLC BEH C18 (5 mmx2,1 mm; 1,7 µm) Akış hızı: 0,4 $mL.dk^{-1}$	Hareketli Faz: Asetonitril, Metanol, %3 Trifluroasetikasit suda, 0,05 M amonyum asetat (15:15:2:68, h/h/h/h).	7,25	Plazma	El-Bagary ve ark., 2014
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - UV	Kolon: ODS RP-C18 (250mmx4,6 mm, 5 µm) Dalga boyu: 254 nm Akış hızı: 1,2 $mL.dk^{-1}$	%40 metanol- %60 %1 Asetik asit içeren su	0,15	Plazma	Xiao ve rak., 2013
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Elektrokimyasal Dedektör	Kolon: Ascentis C18 3 µm, 100 mmx2,1 mm Elektrot ve potansiyel: BDEE, +1520 mV Akış hızı: 0,2 $mL.dk^{-1}$	Hareketli Faz: 20 mM sodyum dihidrojen fosfat. 40 mM sodyum perklorat/asetonitril (70:30, h/h), pH 3,5	3	Serum	Bartosova ve ark., 2011
Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrofotometrisi	Kolon: Zorbax Eclipse XDB-C18 (150mm x 4,6 mm, 5 mm) Enjeksiyon hacmi: 10 µL Akış hızı: 0,5 $mL.dk^{-1}$	Hareketli Faz: A:% 0,1 Asetik Asit B:Asetonitril 0–3 dk, %20 B; 3–8 dk, %20–95 B; 8–13 dk, % 95B; 13–13,01 dk, %95–20 B; 13,01–20 dk, %20 B.	10	Farmasötik dozaj form	Zhang ve ark., 2010
Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrofotometrisi	Kolon: CapcellPak phenyl (2,1mm x150mm, 5µm) 505,2→299,1 Akış hızı: 0,2 $mL.dk^{-1}$	Hareketli Faz: 5 mM amonyum format pH 6,0 (A) ve %90 asetonitril 5mM amonyum formatta pH 6,0 (B). %20 B, 0,5dk %80 B	3	Plazma ve doku	Lee ve ark., 2009

1.3. Elektrokimyasal Biyosensörler

Biyosensörlerin çeviri kısımları, biyokomponentlerden biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşan ürünleri, anlamlı birer sinyale çeviren kısımlardır. Biyosensör cevabı, oksijen harcanması, hidrojen peroksit oluşumu, NADH derişimindeki değişiklik, floresans ve absorpsiyon değişiklileri, pH, iletkenlik, sıcaklık ya da kütledeki değişiklikler ile takip edilebilir.

Optik, termal, piezoelektriksel ve elektrokimyasal olmak üzere pek çok çevirici tipi bulunmaktadır. Amperometrik, impedimetrik, potansiyometrik, voltametrik ve kondüktometrik teknikler biyosensör uygulamalarında sıkça kullanılan elektrokimyasal tekniklerdir (Lovo, 2015; Lvovich, 2012; Marken ve ark., 2010; Masuko ve ark., 1996; Wang, 1988).

Elektrokimyasal çeviriciler, Clark ve Lyons'un ilk biyosensörü keşfinden beri, yüksek duyarlılıkları, kolay modifiye edilmeleri, kütle azalımının kolayca takibi, ucuz ve kolaylıkla erişilebilir olmaları sebebiyle sıklıkla kullanılan çeviricilerdir (Chen, 2007; Chen ve ark., 2013; Ciobanu ve ark., 2007; Iwunze, 2008; Wang, 2006; Wendt ve Kreysa, 1999). Elektrokimyasal çeviriciler, genel olarak, iletken, yarı iletken olan ya da iyonik iletkenliğe sahip taşıyıcının biyokomponent ile bir araya gelmesi ile oluşur. Elektrokimyasal olarak aktif olan madde biyokimyasal tepkime sonucunda azalır ya da artarsa, elektrokimyasal dedektör tarafından yakalanabilir ve çevirici sayesinde sinyal olarak takip edilebilir. Elektrokimyasal çeviricilerin çalışma prensibi, elektroaktif substrat ya da üründür (Bagotsky, 2006; Bard ve ark., 2008; Bard ve Faulkner, 2001; Bond 2002; Dryhurst 1977; Greef ve ark., 1990; Goshorn, 1995; Lefrou ve ark., 2012; Olson ve Lacourse, 2004; Pletcher ve Walsh, 1990; Walsh, 1993).

Amperometrik elektrokimyasal biyosensörleri amperometrik tekniğin substrat eklenmesi ile hızlı, duyarlı ve tekrar edilebilir cevap vermesi dolayısıyla tercih edilen biyosensörlerdir. Amperometrik biyosensörlerde, sabit potansiyelde akım takibi yapılırken ortama eklenen substrat vasıtası ile enzimatik reaksiyon sonucundaki akımdaki değişiklik takip edilir. Amperometrik enzim bazlı biyosensörler oksijen harcayan enzimleri (oksidazlar), peroksit oluşturan enzimleri (su oluşturan oksidazlar hariç), indirgenmiş betanikotinamit adenin di nükleotit fosfat (NADH) oluşturan enzimleri, içerir. Bu özelliklerine göre amperometrik enzim biyosensörleri, 1. nesil, 2. nesil ve 3. nesil olmak üzere 3'e ayrılır (Bartlett ve Whitaker 1987; Davis, 1985; Jönsson ve Gorton, 1985; Kaunaves, 1997; Mostafa, 2010; Newman ve Thpmas-Alyea, 2004).

1. nesil amperometrik enzim biyosensörleri, sadece enzim ve taşıyıcıdan oluşarak tasarlanan biyosensörlerdir. Enzim, membran yardımı ile immobilize edilir. Clark ve Lyon'un önermiş olduğu biyosensör bilinen ilk 1. nesil amperometrik sensördür. Oksijenin hidrojen peroksite indirgenmesi ve substratın ürüne dönüşmesi takip edilir. Hidrojen peroksit oluşumu genel olarak +0,6-0,9 V aralığında, oksijen harcanması -0,6-0,9 V aralığında takip edilir. Sabit potansiyel altında akım değişikliği, substrat derişimi ile doğru orantılıdır. 1. nesil amperometrik biyosensörlerin en büyük dezavantajı, girişim yapabilecek maddelere açık olmalarıdır.

2. nesil biyosensörler oksijenden ziyade "medyatör" adı verilen malzemelerin vasıtası ile elektron taşımasını takip eden biyosensörlerdir. Medyatörler koenzimleri regenere ederler ve oksijenle tepki vermeden direk koenzimi indirgeyerek, kendileri indirgenirler. Medyatör olarak kullanılan madde çözelti ortamına eklenebilir ya da taşıyıcı yüzeye enzim ile birlikte immobilize edilebilir. 2. nesil biyosensörlerin en büyük dezavantajı, kompleks matrislerde kullanıldıkları zaman biyosensörde medyatör kaynaklı kontaminasyonlar oluşabilir.

İdeal bir medyatör;

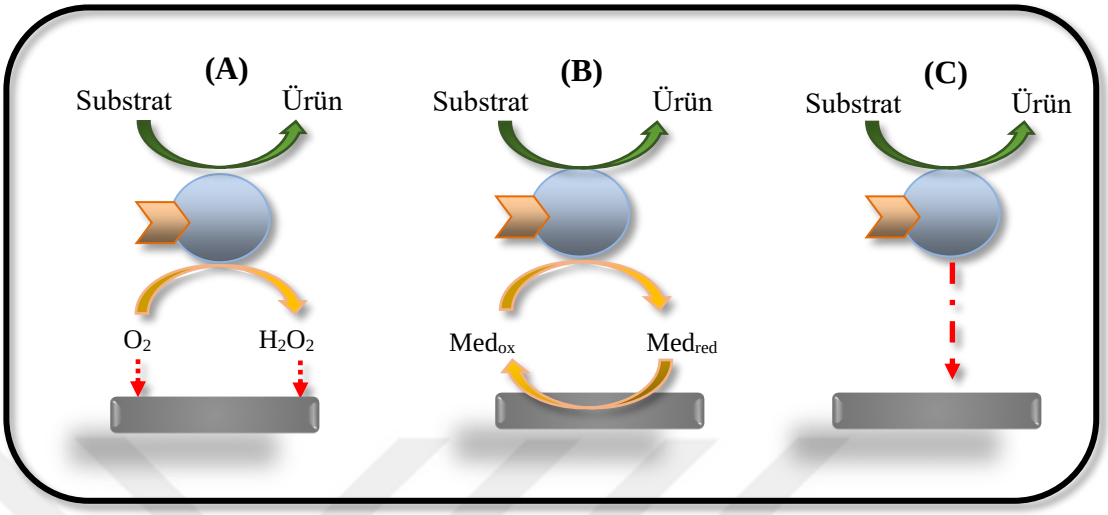
- ✓ Hızlı bir şekilde, indirgenmiş enzim ile reaksiyona girmelidir,
- ✓ Oksitlenmiş ve indirgenmiş yapıları kararlı olmalıdır,
- ✓ Çalışma koşullarında kararlı olmalıdır,
- ✓ Elektron taşınması sırasında yan reaksiyonlara girmemelidir,
- ✓ Redoks potansiyeli ortamda bulunan diğer elektroaktif maddelerden düşük olmalıdır,
- ✓ Toksik olmamalıdır.

3. nesil biyosensörlerde enzimlerin redoks merkezleri ile taşıyıcı yüzeylerin doğrudan teması söz konusudur. Redoks medyatör, enzimin redoks merkezine direk etki edebilecek şekilde seçilir. Küçük redoks proteinler de elektron transfer esnasında taşıyıcı olarak kullanılabilir. Doğrudan elektron transferi bazlı amperometrik enzim sensörleri 1977 yılında sitokrom C'nin dönüşümlü olarak kalay ile dope edilmiş indiyum oksit elektrodu üzerinde indirgenip yükseltgenmesi ile keşfedilmiştir. Amperometrik enzim biyosensörleri genel olarak şekil 1.16'daki reaksiyonlar oluşur.

$$\text{Substrat} + O_2 \xrightarrow{\text{Enzim}} \text{Ürün} + H_2O \qquad (6)$$

$$\text{Substrat} + O_2 \xrightarrow{\text{Enzim}} \text{Ürün} + H_2O_2 \qquad (7)$$

$$\text{Substrat} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Enzim}} \text{Ürün} + NADH + H^+ \qquad (8)$$



Şekil 1.16. (A) 1. nesil (B) 2. nesil (C) 3. nesil amperometrik enzim biyosensörlerinin şematik gösterimi.

Eşitlik 1 ve 2 Clark tipi elektrolar kullanarak +0,6 - 0,9 V aralığında oksijen harcanması ve 4 elektron aktarımı ile elde edilebilir. Peroksit oluşumu ise 2. eşitlik takip edilerek elde edilebilir. Hidrojen peroksidin anodik oksidasyonunun olduğu potansiyelde ürik asit, askorbik asit gibi maddelerde oksitleneceği için, biyosensörün seçiciliği düşmektedir. Dehidrogenaz bazlı biyosensörlerde, ölçülebilen NADH direk olarak analitin derişimi ile doğru orantılıdır. NADH'ın elektrokimyasal reaksiyonu tam olarak açıklanamamakla birlikte bu reaksiyon (eşitlik 11) kabul edilmektedir. Yaklaşık 250 adet (alkol dehidrogenaz, glikoz dehidrogenaz, aminosit dehidrogenaz, glutamat dehidrogenaz vb.) NADH bazlı dehidrogenaz enzimi bulunmasından ötürü, bu tür çalışmalar son zamanlarda artmıştır (Bartlett ve Whitaker 1987; Davis, 1985; Jönsson ve Gorton, 1985; Kaunaves, 1997; Mostafa, 2010; Newman ve Thpmas-Alyea, 2004).

$$O_2 + 2\,H_2O + 4e^- \longrightarrow 4\,OH^- \qquad (9)$$

$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\,H^+ + 2e^- \qquad (10)$$

$$NADH \xrightarrow{-e^-} NADH^{\bullet +} \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} NAD^{\bullet} \underset{+e^-}{\overset{-e-}{\rightleftharpoons}} NAD^+ \qquad (11)$$

1.4. Modifiye Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrot yüzeylerini modifiye etmek, her modifikasyon sonucunda yeni bir biyosensör elde edilmesi, istenilen şekilde biyosensöre yön verilebilmesi açısından çokça tercih edilen bir yöntemdir. Biyosensörün çalışma potansiyeli, duyarlılığı, gibi birçok biyosensör cevabını etkileyen etmen modifikasyon sonucunda geliştirilebilir. Elektrot malzemesi olarak bulunmayan malzemeler modifikasyonda kullanılarak, biyosensör araştırmalarına yeni kapılar açmaktadır (Edwards, 2002; Gooding ve ark., 2009; Gorton 1989; Lim ve Ramakrishna, 2006; Merkoçi, 2013; Metters ve Banks 2014; Özkan, 1993).

Biyosensör tasarımında farklı ajanlarla elektrotları modifiye ederek daha duyarlı tayinler yapılabilmektedir. Modifikasyonda nanomalzemeler, polimerler immobilizasyona uygun biyomalzemeler kullanılmaktadır. Nanomalzemeler, metal oksitler, metal sülfitler, iletken polimerler sıklıkla kullanılan malzemelerdir (Sadowski ve Maliszewska, 2011). Nanomalzemelerin elektrot yüzeylerini modifiye etmek için kullanılmaları 1990 yılında başlamıştır. Elektrodepozisyon, damlatma, içinde bekletme gibi farklı yöntemler ile modifikasyon sağlanabilir (Edwards, 2002; Gooding ve ark., 2009; Gorton 1989; Lim ve Ramakrishna, 2006; Merkoçi, 2013; Metters ve Banks 2014; Özkan, 1993).

Biyosensörler hazırlanırken, biyokomponentlerin immobilizasyonunda iletken polimerler, fonksiyonelleştirilmiş polimerler, kompozit malzemeler, sol-gel ve nanomalzemeler kullanılabilmektedir (Murray 1980; Wang, 2005). Polimerlerin başka bir deyişle, makromoleküllerin hem organik hem de inorganik dünyada son derece geniş bir yayılım alanı vardır. Selüloz, linyit, proteinler veya nükleik asitler organik polimerlerin; elmas, kuartz, feldispat gibi bazı maddeler de inorganik polimerlerin örneklerindendir. Bu maddelere ilave edilmesi gereken polietilen, poliüretan, polikarbonat, vb. gibi önemli sayıda birçok sentetik polimerler de vardır.

İletken bir polimerin temel özelliği polimerin omurgası (ana zincir) boyunca konjuge (ardışık sıralanmış) çift bağların olmasıdır. Konjugasyonda, karbon atomları arasındaki bağlar peşpeşe değişen tek ve çift bağlar şeklinde dizilmişlerdir. Her bir bağ kuvvetli bir kimyasal bağ olan "sigma" bağı içerir. İlaveten, her çift bağda daha zayıf (% 30) ve daha az lokalize olmuş bir "pi" bağı vardır. Bunlara rağmen, konjugasyon, polimer maddeyi iletken yapmak için yeterli değildir. Fakat bunlara dopant maddeleri eklenerek iletkenliği arttırılabilir. Dopantların yaptığı şey malzeme içerisinde elektron ve "boşluk" ların sayısını arttırmaktır. Bir elektron eksikliğinin olduğu konuma bir boşluk denir. Böyle bir "boşluk" komşu bir konumdan atlayan bir elektronla doldurulduğunda yeni bir boşluk oluşturulur ve bunun böyle devam etmesiyle yükün uzun bir mesafeye göç etmesi sağlanır (Gerard ve ark., 2002; Murray 1980; Wang, 2005).

Son yıllarda kullanılan bir başka modifiye edici ajan, grafendir. Grafen karbon atomunun bal peteği örgülü yapılarından bir tanesine verilen isimdir. Karbonun bal peteği örgülüsü yapıları olan grafen, grafit, karbon nanotüp ve fulleren sp^2 melezleşmesinin ürünüyken elmas ise sp^3 melezleşmesi ve dört-yüzlü ağ örgüsü ile öncekilerden farklı bir kategoride değerlendirilir (Ray, 2015). Grafen, iki boyutlu planar yapıların çok ender örneklerinden birisidir. Karbon atomları 1s ve 2p orbitallerinin birleşimi ile 120 derece açılı sp^2 melezleşmesi yaparken boşta kalan pz orbitalleri de grafen malzemesine sıra dışı özellikler kazandırmaktadır (Geim, 2009; Prasek ve ark., 2011; Rummeli ve ark., 2010).

Grafen yapısında karbon-karbon bağ uzaklığı yaklaşık olarak 1.42 A° iken grafen tabakalarının üst üste gelmesi ile meydana gelen grafitte iki grafen tabakası arasındaki mesafe yaklaşık 3,35 A°'dur. Grafendeki güçlü karbon bağları ona yeryüzündeki bilinen en sağlam malzemelerden biri olma özelliğini kazandırmıştır. Bununla birlikte grafitteki grafen katmanlar arasındaki bağlar oldukça zayıftır. Kurşun kalemi kağıda sürtünce bu zayıf bağlar kırılmakta ve kağıda yayılan grafen ve grafit tabakalar yazı izlerini oluşturmaktadır. Grafen bilinen ilk iki boyutlu malzemedir ve bu özelliğiyle teknolojik

uygulamalar hususunda oldukça ilgi çekmektedir (Geim, 2009; Prasek ve ark., 2011Suarez-Martinez, 2012; Sun ve ark., 2004).

Manyetik nanopartiküller de modifiye ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Manyetik nanopartiküller birçok biyomedikal uygulamalarda önem kazanmaktadır. Manyetik partiküllerin uygulanan manyetik alana cevap vererek istenilen şekilde hareket ettirilebilmeleri birçok uygulamada avantaj sağlamaktadır. -NH_2, -COOH gibi yapılarla fonksiyonlandırılmış manyetik nanopartiküller enzimler ile birleştirilerek, immobilizasyon kolayca sağlanmaktadır (Merkoçi, 2013; Metters ve Banks 2014).

İridyum oksit nanopartiküller, geniş pH aralığında kullanılabilmeleri ve elektrokimyasal olarak dönüşümlü olmaları sayesinde son yıllarda biyosensör uygulamalarında oldukça önem kazanmıştır. Metal nanopartiküller arasında, iridyum oksit nanopartikülleri, yüksek katalitik aktiviteye, kararlılığa ve farklı koşullarda seçiciliğe sahiptir. Ir(IV)/Ir(III) redoks çiftinin yüksek elektron transfer hız katsayısına sahip olması, elektrokimyasal biyosensör tasarımında medyatör olarak da kullanımı sağlamaktadır (Kurbanoglu ve ark., 2016; Lawrence ve Liang 2008; Mayorya-Martinez ve ark., 2014., Merkoçi, 2013; Metters ve Banks 2014).

Karbon bazlı malzemelerden karbon nanotüpler (KNT) 1991 yılında Ijima tarafından keşfedildiğinden beri kimyasal, fiziksel ve malzeme bilimi araştırma alanlarında birçok araştırmaya konu olmuştur. Karbon nanotüpler kimyasal kararlılık, büyük boy oranı, mükemmel elektriksel iletkenlik ve son derece yüksek mekanik dayanma gücü ve sertlik gibi özelliklerinden dolayı bilimsel ve endüstriyel alanlarda büyük ilgi kazanmışlardır (Valcarcel ve ark.). Karbon nanotüp temelli elektrokimyasal sensörler, karbon nanotüplerin büyük yüzey alanları, düşük aşırı gerilimleri ve hızlı elektrot kinetikleri gibi özelliklerinden dolayı düşük tespit sınırı, hızlı analiz cevabı gösterirler (Pérez-López ve ark.).

Karbon nanotüpler yüksek ısı kapasiteleri, mekanik dayanıklılıkları ve kimyasal kararlıkları ile sinyal kalitesini yükseltmektedirler. Karbon nanotüplerin yüksek yüzey hacim oranı tek bir molekülün analizini kolaylaştırması dolayısıyla biyoalgılayıcıların tasarımında oldukça iyi bir elektrot materyali olarak kullanılmaktadırlar. Grafenin rulo haline gelmiş formu olan karbon nanotüpler ile alakalı günümüze kadar elektronikten sağlığa kadar birçok alanda binlerce kullanım alanı düşünülmüştür (Han, 2005; Hennrich ve ark., 2006).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneylerde kullanılan araç ve gereçler

Deneylerde kullanılan araç ve gereçler çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Deneylerde kullanılan araç ve gereçlerin adı markası ve kullanım amacı.

Adı	Markası	Kullanım Amacı
Perde baskılı elektrot makinası	DEK 248, DEK International, İsviçre	Perde baskılı elektrot hazırlanması
AUTOLAB PGSTAT100N	Eco Chemie, Hollanda	Elektrokimyasal analizör
Taramalı elektron mikroskobu	Zeiss Evo® 40	Yüzey morfolojisini incelemek için
Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı	Ikamag RH (Jange and Kungel IKA-Labor Technic)	Çözelti hazırlamak için
Hassas terazi	Labor Alliance ve Shimadzu Libror AEG –220	Çözelti hazırlamak için
pH metre	Model 526 (WTW, Austria)	pH ayarlaması için
Balonjoje, deney tüpü, cam ve porselen havan, beher	Isolab	Çözelti hazırlamak için
Otomatik ve mikro pipetler	Ependorf	Çözelti hazırlamak için

2.2. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasallar, yüzey modifikasyonunda, çözelti hazırlamada ve örnek uygulamada kullanılan maddeler olmak üzere 3 ayrı tabloda sınıflandırılmış ve verilmiştir (Çizelge 2.2-2.4).

Çizelge 2.2. Yüzey modifikasyonu deneylerinde kullanılan kimyasalların adı ve markası.

Adı	**Markası ve Kodu**
Gluteraldehit	Sigma Aldrich G6257
Grafen Oksit	Sigma Aldrich- 777676
Tiyonin Mavisi	Sigma Aldrich- R310360
Manyetik Nanopartikül	Chemicell GmbH-fluidMAG
N-Hidroksisaksiimid	Sigma Aldrich- 130672
N-(3-Dimetilaminopropil))-N′-etilkarbodiimid	Sigma Aldrich- E7750
Tirozinaz	Sigma Aldrich- T3824

Çizelge 2.3. Örnek uygulama yapmak için kullanılan kimyasalların adı ve markası.

Adı	**Markası ve Kodu**
Insan serumu	Sigma Aldrich- H4522
Tirodril®	Laboratoria aldo-Union SA.
Kaptopril®	Deva Holding AŞ.
Viagra®	Pfizer Ilaçları Ltd. Şti.

Çizelge 2.4. Çözelti hazırlamak için kullanılan kimyasalların adı ve markası.

Adı	Markası ve Kodu
Potasyum Fosfat Monobazik	Sigma Aldrich-60220
Potasyum Fosfat Dibazik	Sigma Aldrich- 60356
Asetik Asit	Sigma Aldrich- 537020
Potasyum Klorit	Sigma Aldrich-P9541
Sodyum Hidroksit	Riedel de Haen-50600
Kitosan	Sigma Aldrich- 448877
Katekol	Sigma Aldrich- C9510
Metimazol	Sigma Aldrich- M8506
Kaptopril	Sigma Aldrich-C8856
Sildenafil Sitrat	Sigma Aldrich-Y0001578

2.3. Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

2.3.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması

0,1 M, pH 6,5 fosfat tamponu, monobasik ve dibazik potasyum fosfattan hazırlanmıştır. 8,383 g potasyum fosfat monobazik ve 6,675 g potasyum fosfat dibazik 1000 mL ultra distile suda çözülmüş ve pH 6,5'a ayarlanmıştır. Elektrokimyasal çalışmalarda tampona 0,1 M KCl eklenmiştir.

2.3.2. Tirozinaz enzim çözeltisinin hazırlanması

Tirozinaz enzimi, son derişim 1 mg Tirozinaz 50 µL pH 6,5 fosfat tamponun çözeltisi içerisinde olacak şekilde hazırlandı. Elde edilen Tirozinaz çözeltisi 20 µL'lik ependorf tüplere bölünerek -20 °C'de saklanmıştır.

2.3.3. Gluteraldehit çözeltisinin hazırlanması

% 25 stok Gluteraldehit çözeltisinden 10 µL alınmış, 990 mL ultra distile su çözeltisi içerisine ilave edilmiş ve % 0,25 gluteraldehit içeren bu çözelti çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır.

2.3.4. Katekol çözeltisinin hazırlanması

Katekol çözeltisi 0,1 M KCl içeren pH 6,5 fosfat tamponunda hazırlanmıştır.

2.3.5. Grafen Oksit çözeltisinin hazırlanması

4 mg/mL stok çözeltiden ultra distile su ile seyrelterek %5'lik ara stok hazırlanmıştır. Bu çözeltiden % 0,05, % 0,1, % 0,5 % 1 grafen oksit içeren çözeltiler hazırlanmıştır.

2.3.6. N-Hidroksisaksiimid ve N-(3-Dimetilaminopropil))-N′-etilkarbodiimid çözeltisinin hazırlanması

10 mM N-Hidroksisaksiimid çözeltisi (NHS) 6 mg NHS'yi 5 mL ultra distile suda çözerek hazırlanmıştır. 5 mM N-(3-Dimetilaminopropil))-N′-etilkarbodiimid çözeltisi (EDC) 7,4 mg EDC'yi 5 mL ultra distile suda çözerek hazırlanmıştır.

2.3.7. Tiyonin çözeltisinin hazırlanması

5 mM tiyonin stok çözeltisi 2,4 mg tiyonini 10 mL pH 6,5 potasyum fosfat tamponunda çözerek hazırlanmıştır.

2.3.8. Karbon nanotüp çözeltisinin hazırlanması

Öncelikle % 0,5'lik kitosan çözeltisi % 1'lik asetik asit çözücüsü yardımı ile hazırlanmış daha sonra, 0,5 mg karbon nanotüp, 1 mL kitosan çözeltisi (% 0,5) içerisine eklenmiştir. Bu çözelti iki saat ultrasonik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

2.3.9. İridyum oksit çözeltisinin hazırlanması

İridyum oksit çözeltisi, Dr. Lourdes Rivas'ın doktora tezi kapsamında sentezlenmiş ve Dr. Rivas'tan alınmıştır. Sentezi özetlemek gerekir ise, 2,6 $x10^{-5}$ M potasyum hekzakloroiridat solüsyonu, $1,6x10^{-2}$ M sodyum hidrojen sitrat solüsyonu ile karıştırılmıştır. Elde edilen kırmızı-kahverengi çözeltinin pH'si 7,5'e 0,25 M NaOH ile ayarlanmış ve 30 dk boyunca karıştırılarak geri dönüştürülmüştür. Bu işlem pH 7,5'da sabitleninceye kadar tekrar edilmiştir. Sonunda çözeltiden 2 saat boyunca oksijen geçirilmiştir ve açık mavi renkte iridyum oksit çözeltisi elde edilmiştir. İridyum oksit

nanopartiküllerin sentezi ve ayrıntılı karakterizasyonu Dr. Lourdes Rivas'ın tezinde bulunmaktadır (Rivas, 2015).

2.3.10. Standart madde ve ilaç çözeltilerinin hazırlanması

Metimazol, Kaptoril ve Sildenafil ilaç etken maddeleri suda çözünür özellikte oldukları için $1x10^{-3}$ M ilaç stok çözeltileri, pH 6,5 fosfat tamponu çözücüsü kullanılarak hazırlanmıştır. İstenilen derişimler yine bu çözelti ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Metimazol, Kaptoril ve Sildenafil etken maddelerinin farmasötik dozaj formları (10 adet Tirodril©, Kaptopril®, Viagra®) havanda ezilerek toz haline getirilmiş, tek bir tablet ağırlığına eşdeğer miktar hassas bir şekilde tartılıp, balon jojeye alınmış, 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiş ve süzülerek üsteki berrak çözelti kullanılmıştır. İstenilen derişime pH 6,5 fosfat tamponu ile seyrelterek kullanılmıştır.

Farmasötik dozaj formları içerisindeki yardımcı maddelerin analize etkisinin anlaşılabilmesi için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım çalışmaları için farmasötik dozaj formu içeren çözeltilerin üzerine bilinen miktarda ilaç etken maddesi eklenmiş ve daha önceden analiz edilmiş tablet miktarı çıkarılarak, eklenen saf maddenin geri kazanım değerleri % olarak hesaplanmıştır.

2.3.11. İnsan serumu çözeltilerinin hazırlanması

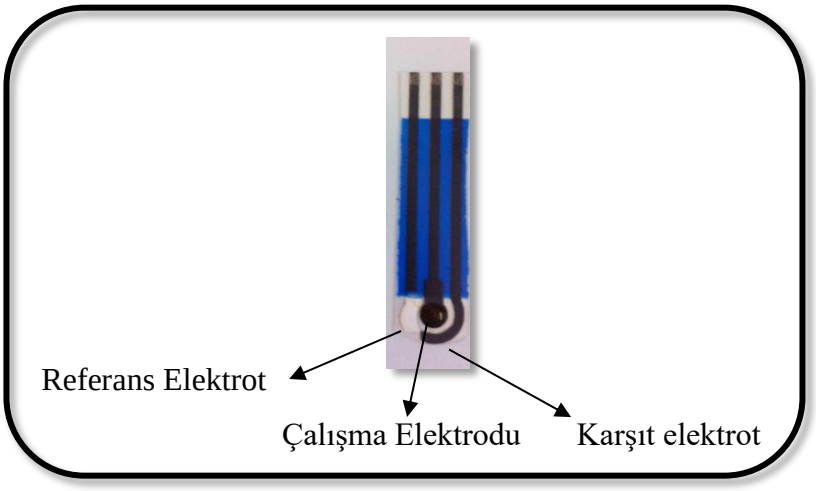
Serum çözeltileri Sigma Aldrich firmasından alındığı şekilde doğrudan kullanılmıştır. Serum örneklerine geri kazanıma uygun derişimde etken madde ilave edilmiş ve doğrudan son derişimin geri kazanımına, standart kalibrasyon denkleminden akım değeri yerine koyarak, derişime geçilerek % geri kazanım hesaplanmıştır.

2.3.12. Girişim çalışmaları için askorbik asit, ürik asit ve parasetamol çözeltilerinin hazırlanması

Girişim çalışmaları için $1x10^{-3}$ M askorbik asit, $1x10^{-3}$ M ürik asit ve $1x10^{-3}$ M parasetamol ultra distile suda çözülmüştür. İstenilen son derişime pH 6,5 fosfat tamponu ile seyreltilip kullanılmıştır.

2.4. Perde Baskılı Elektrotların hazırlanması

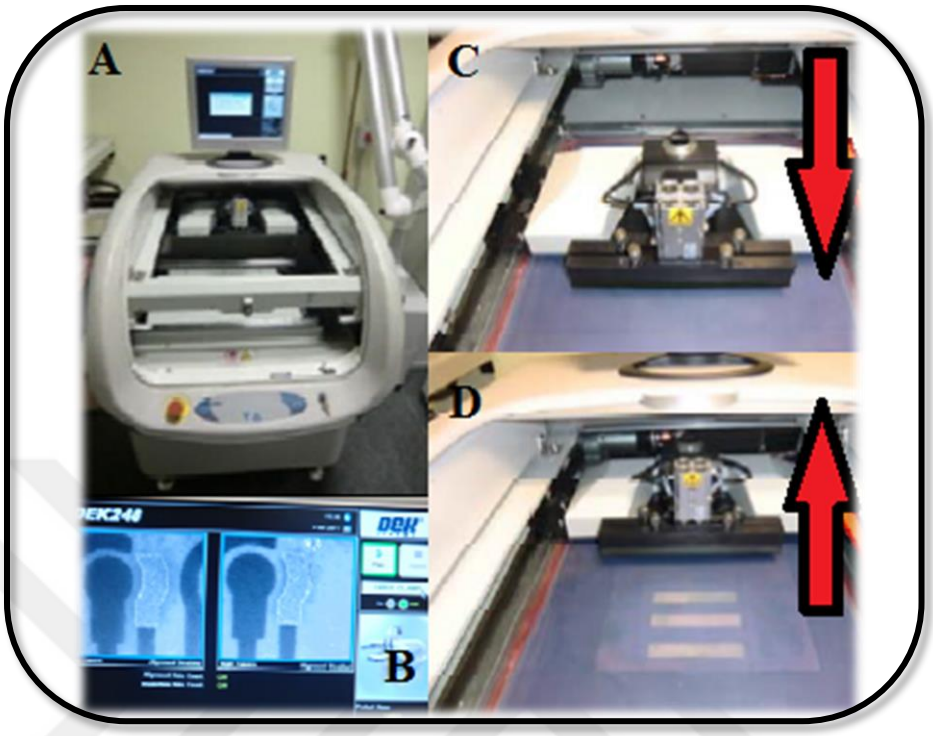
Perde baskılı elektrotlar, üzerinde çalışma elektrodu, yardımcı elektrot ve referans elektrodu aynı anda bulunduran elektrotlardır (Şekil 2.1). Perde baskılı elektrotlar, günümüzde kullanılan katı elektrotlara göre birçok avantaja sahiptirler. Öncelikle üç'lü elektrot sistemlerindeki makro düzeyindeki yüksek yüzey alanını bu elektrotlar ile nano düzeye indirilebilmektedir. Tek kullanımlık olarak tasarlanan bu elektrotlar herhangi bir uzun ön işleme gerek duyulmadan kullanılabilir ve imha edilebilir. Üç'lü elektrot sistemini tek bir platformda birleştirir, minyatüre eder ve daha küçük hacimde analiz yapılmasını sağlar (Hart, 1997; Komorsky-Lovric, 2010; Metters ve Banks, 2013; Swain, 2007; Uslu ve Özkan, 2007).



Şekil 2.1. Perde baskılı elektrot (nano elektrot).

Elektrot malzemesinin seçiminde önemli olan parametreler elektriksel iletkenlik ve malzemenin sertliğidir. Bu nedenle, altın (folyo ya da çubuk), platin (folyo ya da çubuk) ya da karbon (kâğıt, çubuk, pasta, metallenmiş karbon, camımsı karbon, karbon fiber, nanotüp film) gibi katı destek elektrotlar ya da bu üç'lü elektrot sistemini tek bir platformada birleştiren, küçültülmüş ve daha küçük hacimde analiz yapılmasını sağlayan perde baskılı elektrotlar kullanılır.

Perde baskılı elektrolar, poliester bir alt tabaka üzerine, tek tek ve tabaka tabaka, grafit, Ag/AgCl ve yalıtkan mürekkebin maske yardımı ile şekillendirilmesi sonucu perde baskılı elektrot makinesinde (Şekil 2.2. A) oluşturulur. Öncelikle, maske üzerine grafit mürekkep damlatılmış ve bu işlemler sırasında mikroskop yardımı ile süreç takip edilmiştir (Şekil 2.2. B). Maskedeki boşlukları dolduracak şekilde, perde baskılı elektrot makinesi ile mürekkep dağıtılmış, (Şekil 2.2. C ve D), ve 120°C'de 45 dk kurutulmuştur. İkinci katman olarak, referans elektrodu oluşturacak maske üzerine Ag/AgCl mürekkebi damlatılarak, boşluklar Ag/AgCl mürekkebi ile doldurulmuştur. 30 dk 120°C'de kurulmuştur. Son olarak yalıtkan mürekkep damlatılarak ve yine 30 dk 120°C'de kurularak perde baskılı elektrotlar hazırlanmıştır (Şekil 2.2). Hazırlanan perde baskılı elektrotlar ile 50 µL çözeltide analizler yapılabilmektedir.



Şekil 2.2. Perde baskılı elektrotların hazırlanması.

2.5. Mikroçiplerin hazırlanması

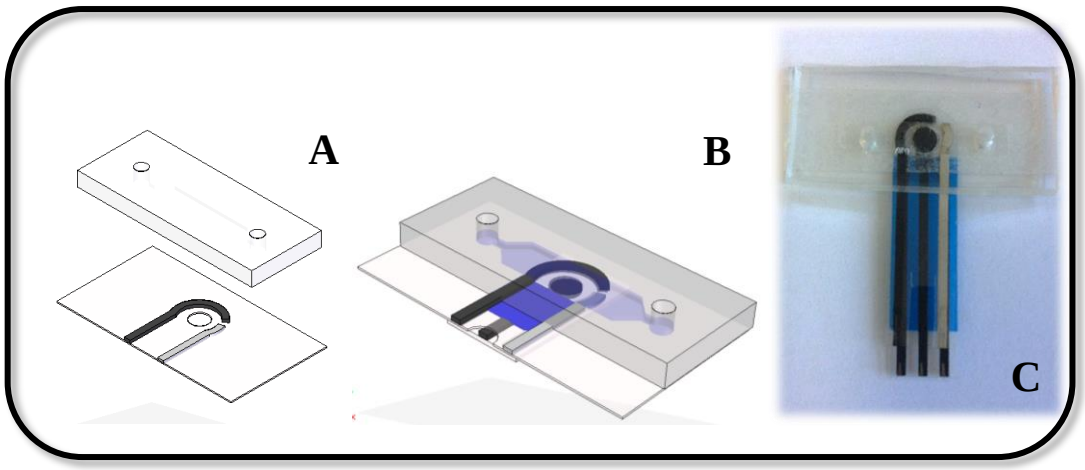
Elektrokimyasal biyosensörler geliştirilirken, en büyük hedef, tamamıyla bütünleşmiş elektroanalitik bir cihaz geliştirmektir. Bu amaçla, mikro toplam analiz sistemleri tasarlanmaktadır. Analitik bir sistemde olan, numune girişi, hazırlanması, filtre edilmesi, dedeksiyonu gibi basamakları kısa sürede yapabilen cihazlar tasarlanmaktadır. Analiz süresinin çok kısa olması, harcanan tampon miktarının az olması, hızlı olması, taşınabilir olması ve düşük tayin alt sınırlarına erişilmesi mikroçiplerin avantajlarındandır.

Mikroçip tasarımı için, öncelikle bir analiz için gerekli olan bütün cihazların minyatürize edilmesi gerekmektedir. Mikroçipler altyapılarına göre farklılık göstermektedirler. Mikroçipler, silikon bazlı ya da polimer bazlı olarak tasarlanabilmektedirler. Silikon bazlı mikroçiplerin en büyük avantajı kimyasal

kararlılıklarıdır fakat polimerik bazlı mikroçipler herhangi bir ileri teknoloji gerektirmeyip, kolayca hazırlanabilir olduklarından silikon bazlı mikroçiplere göre daha çok tercih edilirler. Elektrokimyasal cihazlar ile kombine edildiklerinde tek kullanımlık, ucuz, hızlı ve düşük derişimleri analiz edebilen, mekanik dayanıklılığa sahip mikroçipler elde edilmektedir. Mikroçip yapımında en çok kullanılan polimerler, poli(metilmetakrilat), poli(dimetilsiloksan), poli(etilen tereftalat) ve de polietilendir.

Deneylerde kullanılan mikroçipler, elastik poli(dimetilsiloksan) (PDMS) kullanılarak hazırlanmıştır. Elastik poli(dimetilsiloksan), katalizör ile karıştırılıp, çip maskesine damlatılmış, 2 saat 65 °C'de bekletilmiştir (Şekil 2.3 A). Çip altında perde baskılı elektrot yerleştirileceğinden, çalışma elektrodu olmayan bir alt tabaka hazırlamıştır. Bu tabakaya, çalışma elektrodu büyüklüğünde bir delik açılmış, referans ve karşıt elektrot oluşturulmuştur.

Elde edilen iki çip parçası birbirine sabitlenmiştir (Şekil 2.3 B). Alt kısmına perde baskılı elektrot yerleştirilerek, bir mikroçip elde edilmiştir. Elde edilen mikroçipin gerçek görüntüsü şekil 2.3 C'deki gibidir. Geliştirilen mikroçip ile 6 µL örnekte analiz yapılmaktadır.



Şekil 2.3. Perde baskılı elektrot ile kombine edilmiş mikroçipin hazırlanması.

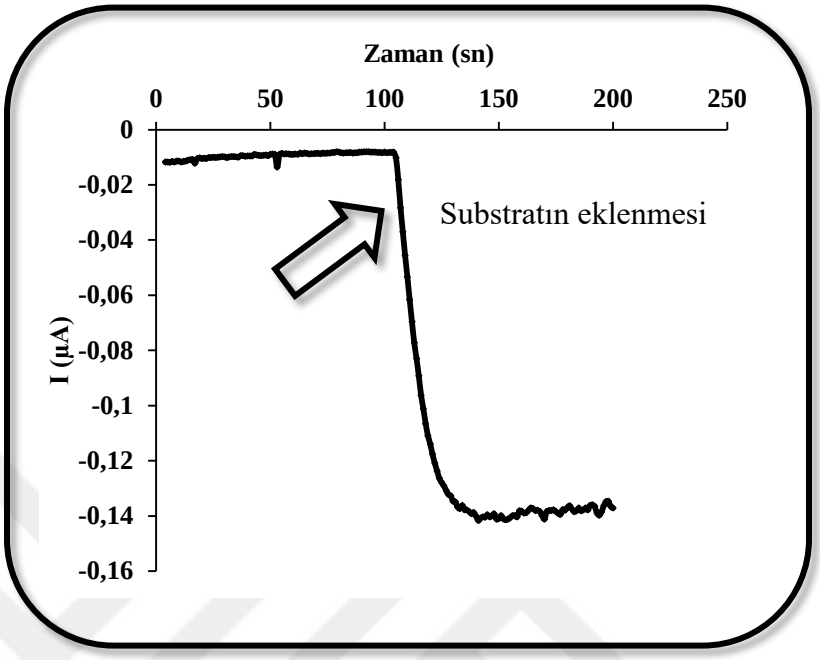
2.6. Kullanılan yöntem

2.6.1. Amperometri

Enzim ile modifiye edilmiş elektrotlar amperometrik biyosensörlerin temel parçalarındandır. Enzim elektrotlar, elektrokimyasal süreci immobilize enzimin aktivitesi ile kombine eden minyatür kimyasal iletici sistemlerdir. Bu sistemler enzimin biyolojik fonksiyonu sayesinde biyolojik orijinli olan substrat moleküllerine karşı genellikle yüksek seçimlilik gösterir. Bu nedenle, enzimlerin sahip olduğu bu özellik enzim sensörleri oluşturulmasında avantaj sağlar (Buerk, 1993; Buerk, 1995).

Tipik olarak, enzim reaksiyonunun kinetiği ürün oluşumunun ya da reaktantın eksilmesinin hızı olarak izlenir. Eğer ürün ya da reaktant elektroaktif ise reaksiyon direkt olarak amperometri ile izlenebilir. Böylece bu tip elektrokimyasal reaksiyonlar amperometrik biyosensörlerin oluşturulmasında kullanılabilir. Elektrokimyasal biyosensörlerin büyük bir kısmı katalitik reaksiyon sırasında elektronlar kullanan ya da üreten oksidoredüktaz sınıfı enzimleri içerir. Bu elektrokimyasal reaksiyonlar elektrot yüzeyinde gerçekleşir ve akım oluşturmak için kullanılır. Enzimatik oksidasyon sonucu açığa çıkan elektronlar anoda transfer edilir. Burada, oksijen gibi yüksek bir elektron alıcısına taşınır (Bagotsky, 2006; Bard ve ark., 2008; Bond 2002; Lefrou ve ark., 2012; Olson ve Lacourse, 2004; Özkan ve al., 2015).

Tez kapsamında analiz edilen ilaçlar için, modifiye elektrotlar hazırlandıktan sonra enzimin reaksiyon akımını ne kadar değiştirdiğine dönüşümlü voltametri yöntemi ile karar verilmiş, bu potansiyelde amperometrik ölçümler yapılmıştır. Amperometri için çözeltinin karışması, sabit potansiyelde çalışılması gerekli olup, çalışmamızda bu koşullar sağlanmıştır (Özkan ve ark.,2015) . Tirozinaz enzimi 200 mV civarı Katekol'e karşı cevap vermektedir. 300 rpm sabit karışma hızı ile amperometrik ölçümler alınmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Amperometrik ölçüm.

2.7. Biyosensörlerde validasyon

Metot validasyonu, ilaçların ve diğer kimyasalların analizleri için geliştirilen metotların geçerliliği demektir. Uluslararası kurallar ile validasyon çalışmaları yapılmış bir analiz yöntemi, uluslararası geçerliliğe sahiptir. Metot geliştirilirken, kullanılan kimyasallar, ekipman, referans maddeler, biyolojik maddeler, kurallara uygun ve sertifikalı olmalıdır. Biyolojik maddeler ile çalışırken, biyolojik maddelerin kolaylıkla bozulmaları veya kontamine olmaları dolayısıyla özel bir dikkat ve önem gerekmektedir. Biyolojik maddeler genellikle hassas, saklama koşulları zor, yüksek ya da düşük sıcaklıkta tepkimeleri farklıdır.

Biyosensörler, genellikle tek kullanımlık, ya da bir gün boyunca çok kullanımlık olarak hazırlanır ve validasyon işlemleri yapılır. Raf ömrü yapılmak istenen biyosensör günde sadece üç ölçüm alınıp dikkatli bir şekilde, başka maddelerden kontamine

olmayacak koşullarda muhafaza edilmelidir. Tekrarlanabilirlik deneyleri için ise farklı biyosensörler hazırlanır. Bu sebeple bağıl hata ve bağıl standart sapma limitleri normal ilaç analizlerine göre daha geniştir (Aboul-Enein ve ark., 2000; Huber, 2007; ICH Rehberi, 1994; Mcpolin, 2009; Peters ve Maurer, 2002; Pickering, 2002; Selinger, 1996; Srinubabu ve ark., 2006; Swartz ve Krull, 2012; Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015; Willets ve Wood, 2000).

İlaç ve kimyasal madde analizleri için validasyon işlemlerinin gerekliliği ilk defa 1978 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde ortaya atılmıştır. Biyoanalitik metotlar için validasyon üzerine ilk çalışma 1991 yılında Karnes tarafından, biyokimyacılara yol göstermesi için yapılmıştır (Karnes ve ark., 1991; Peters ve Maurer, 2002). Takip eden yıllarda, Shah ve arkadaşları, "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies" adlı kongrenin birincisinde bir rapor yayımlamıştır (Shah ve ark., 1992). Bu raporda, validasyon parametrelerinde kabul edilme ve değerlendirme kriterleri belirlenmiştir. Kromatografik yöntemlerin de çok fazla kullanılması sebebi ile, deneysel tasarım ve istatistiksel metotlar ile biyoanalitik yöntemlerin birleştirilmesi ve validasyon kriterlerinin belirlenmesi uzun zaman almıştır (Peters ve Maurer, 2002; Pickering, 2002; Srinubabu ve ark., 2006).

Biyoanalitik kromatografik yöntem validasyonu üzerine 1998 yılında Hartmann ve arkadaşları tarafından teorik ve pratik validasyon parametreleri değerlendirilmiş (Hartmann ve ark., 1998) ve sonrasında, yine Shah ve arkadaşları tarafından 2000 yılında, "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies" adlı kongrenin ikincisinde, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA, Food and Drug Administration)'nin de taslak olarak kullandığı, son rapor yayımlanmıştır (Shah ve ark., 2000). Uluslararası uyum konferansı'nda, (ICH, International Conference on Harmonization), ve çeşitli farmakopelerde biyoanalitik yöntemlerin validasyonundan ziyade, analitik yöntemlerin validasyonu daha çok yer almaktadır (ICH Rehberi, 1994; ICH Rehberi 2003; USP 31, 2008).

İstatistiksel yaklaşım

Bazı istatistiksel hesaplamalar, validasyon sonuçlarını yorumlamada yardımcı olmaktadır. Bunlar; ortalama, bağıl hata, standart sapma ve Bağıl Standart Sapma'dır (BSS) (Riley, 1996). Ortalama, gerçek ortalama (μ) ve numune ortalaması ($\overline{X}$) olarak hesaplanabilir. Gerçek ortalama, sonsuz sayda numune ortalaması ile, eşitlik 12'den hesaplanmaktadır. Bu formülde, (μ) gerçek ortalamayı, (n) numune sayısını, (X_i) numunelerin ölçüm sonuçlarını ifade etmektedir (Riley, 1996; Swartz ve Krull, 2012; Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015).

$$\mu = \frac{\sum_{i-1}^{n} X_i}{n} \qquad (12)$$

Numune ortalaması olan ($\overline{X}$), 13. nolu eşitlikte de gösterildiği gibi sınırlı sayıda elde edilmiş sonuçların deney sayısına bölünmesi ile elde edilir.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i-1}^{n} X_i}{n} \qquad (13)$$

Standart sapma; elde edilen sonuçların "dağılımı" ile doğrudan ilgilidir. Dağılım, sonuçların birbirine yakınlığını gösterir, dağılım yaygınlaşması standart sapmanın büyümesine, daralması ise küçülmesine sebep olur. Standart sapma; gerçek standart sapma (σ) ve numunenin standart sapması (S) olarak iki farklı şekilde hesaplanabilir. Gerçek ortalama (μ), numune sayısı (n) ve ölçümlerin sonuçları (X_i) kullanılarak gerçek standart sapma eşitlik 14'teki formül ile hesaplanabilir (Riley, 1996; Swartz ve Krull, 2012; Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \mu)^2}{n}} \qquad (14)$$

Genellikle, pratik olarak sonsuz sayıda numune ile ölçüm yapılamayacağı için, hesaplamalarda numunenin standart sapması (S) kullanılır ve eşitlik 15'teki formülden hesaplanır.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \qquad (15)$$

Bağıl standart sapma, ölçümler arasındaki belirsizliği ifade eden bir istatistiksel terimdir. Dağılımın, olması gereken değere uzaklığını belirtir ve bağıl olması sebebiyle yüzde cinsinden rapor edilir. Veriler arasındaki dağılımı ortalamaya göre kıyaslar, eşitlik 16'daki gibi hesaplanır (Riley, 1996; Swartz ve Krull, 2012; Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015).

$$\%\, BSS = \frac{S}{\bar{X}} \quad x100 \qquad (16)$$

Bağıl Hata (BH, %Sapma); doğruluk ile ilişkili bir kavramdır. Kaynağı bilinen ve ölçülebilen hatalara bağıl hata denir. Hata sonucunda, verilerin ortalaması olması gereken gerçek değerden uzaklaşır ve bu uzaklaşma % cinsinden ifade edilebilir. Bağıl hata, doğru kabul edilen değer (μ), numune ortalaması ($\bar{X}$) kullanılarak eşitlik 17'deki gibi hesaplanabilir (Riley, 1996; Swartz ve Krull, 2012; Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015).

$$BH=\%Sapma=\left[\frac{\mu-\bar{X}}{\mu}\right]x100 \qquad (17)$$

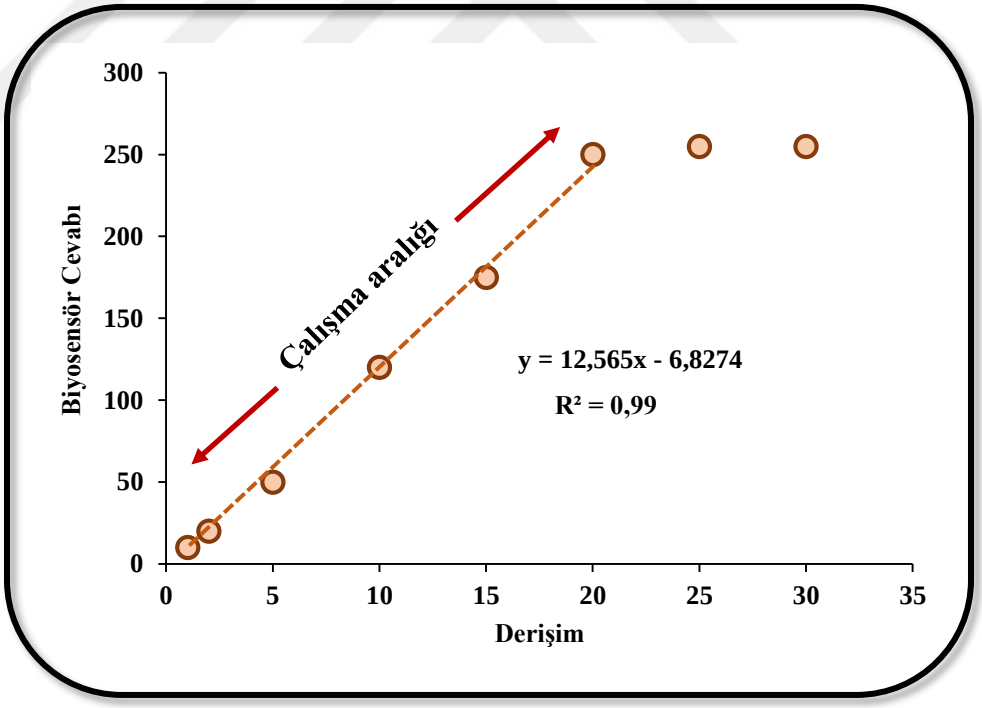
Biyoanalitik yöntemlerin birçok validasyon parametresi, analitik yöntemlerin validasyon parametresi ile aynı iken uygulanış yönünden farklılık gösterebilir. Biyoanalitik yöntemler ile yapılan özellikle kantitatif analizler için seçicilik, doğruluk, Doğrusallık ve kesinlik validasyon parametrelerinin mutlaka sağlanması gerekmektedir (ICH Rehberi, 1994; ICH Rehberi, 2003; FDA, 2015).

Seçicilik

Seçicilik, biyoanalitik yöntem validasyonunda ilk önce sağlanması gereken validasyon parametresidir. Biyolojik maddeler genellikle tek bir biyokimyasal reaksiyona özgü oldukları için spesifik reaksiyonlardır fakat, bazı enzimlerin birden fazla substratı olmasından dolayı, aynı metot ile substrat seçiciliği sağlanamayabilir. Bu bakımdan seçicilik olarak, substratın cevabını, metabolit, safsızlık, bozunma ürünleri gibi diğer kimyasal maddelerin etkilememesi, yani girişim etkisi olmaması olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca, kör matristen gelen bir etki olmadığını göstermek de seçicilik sonucu olarak değerlendirilir (FDA, 2015; Huber, 2007; ICH Rehberi, 1994; ICH Rehberi, 2003; Peters ve Maurer, 2002; Pickering, 2002; Srinubabu ve ark., 2006).

Doğrusallık

Orantılı bir şekilde artan derişimlerde biyokimyasal reaksiyonun substratına karşılık biyosensör cevabı elde edilir. Elektrokimyasal biyosensörler için akım değerlerine karşılık substrat derişimi grafiği ile doğrusallık elde edilir. Bu doğrusal olan grafikten, korelasyon (ilgi) (r) ve/veya tanımlayıcılık (determinasyon) (R^2) katsayısı hesaplanarak doğrusallık rapor edilebilir. Korelasyon ve determinasyon katsayıları 1'e yakın olmalıdır. Doygunluk noktası olarak adlandırılan noktadan sonra, doğruluk elde edilemez ve yapılan deneylerde doğru sonuç elde etmek için mutlaka doğrusal aralıkta çalışılması gerekmektedir. Bu aralığa "çalışma aralığı" da denir (şekil 2.5).



Şekil 2.5. Doğrusallık grafiği.

Validasyon sonuçları değerlendirilirken, biyoanalitik bir yöntemin performansı yakalama ve tayin alt sınırları açısından değerlendirilebilir. Eşitlik 18 ve 19'da gösterildiği gibi, hesaplamaya dayalı yöntemler ile yakalama sınırı en küçük derişimin elektrokimyasal en az üç cevabının, standart sapmasının doğrusallık grafiğinin eğimine oranının 3,3 katı ile tayin alt sınırı ise 10 katı ile elde edilir. Yakalama sınırı, tayin alt sınırından büyük olamaz. Tayin alt sınırı ise doğrusal olan kalibrasyon grafiğinin son derişiminden büyük olamaz (Özkan 2012; Özkan ve ark., 2015).

$$\mathrm{YS} = \frac{3{,}3 \times \sigma}{m} \qquad (18)$$

$$\mathrm{TAS} = \frac{10 \times \sigma}{m} \qquad (19)$$

Gözleme dayalı olarak yakalama sınırı, maddenin gözlenebildiği en düşük derişim olarak, tayin alt sınırı ise madde miktarının doğru ve kesin olarak tayin edilebildiği en düşük derişim olarak rapor edilebilir (Özkan 2012; Özkan ve ark., 2015). Sinyalin gürültüye oranı ile de yakalama sınırı ve tayin alt sınırı hesaplanabilir. Biyoanalitik cevabın, ortamdaki gürültüye oranının 3'e eşit olduğu derişime "yakalama sınırı", 10'a eşit olduğu derişime "tayin alt sınırı" denir (Özkan 2012; Özkan ve ark., 2015).

Duyarlılık

Biyoanalitik yöntem validasyonunda, diğer yöntemler ile kıyaslanmada kullanılması açısından duyarlılık en önemli validasyon parametrelerinden biridir. Doğru denkleminin eğimi, duyarlılık parametresi olarak rapor edilebilir.

Aynı zamanda yakalama sınırı da duyarlılığı göstermektedir. Eğim ne kadar büyükse ve yakalama sınırı ne kadar küçükse geliştirilen biyoanalitik yöntem o kadar duyarlıdır (Özkan 2012; Özkan ve ark., 2015).

Kesinlik

Kesinlik, tekrar edilebilirliğin, tekrar elde edilebilirliğin veya tekrarlanabilirliğin ölçüsüdür. Kesinlik, aynı gün içinde ya da farklı günlerde, birden fazla ölçümle elde edilebilir ve bu sonuçların birbirine yakınlığını ifade eder. Orta kesinlik, aynı gün içinde farklı çözeltiler kullanılarak ya da aynı günde, aynı veya farklı analizcilerden elde edilen bir kesinlik birimidir. Tekrar edilebilirlik, farklı analizciler tarafından farklı laboratuvarda hazırlanan numunelerin üç ölçümü sonucu elde edilen %BSS ile ifade edilir.

Bir başka kesinlik hesaplaması da, tutarlılık deneyleri ile yapılabilir. Zorunlu olmayan bu tutarlılık parametresi, daha önceki yıllarda ayrı bir validasyon parametresi iken, son yıllarda kesinliğin içerisinde gösterilmektedir. Tutarlılık, analizin farklı bir laboratuvarda, başka bir cihazla, kullanılan kimyasalların markalarının değiştirilmesi, ya da aynı laboratuvarda farklı analizciler tarafından yapılması ile deneylerin tekrarlanması sonucunda elde edilir (FDA, 2015; Heyden ve Massart, 1996; ICH Rehberi, 2003; Özkan 2012; Özkan ve ark., 2015; Peters ve Maurer, 2002).

Biyoanalitik yöntemin kesinliği % BSS kullanılarak ifade edilir. Kesinlik parametresi biyoanalitik yöntemler için, %10'dan küçük olmalıdır. Kesinlik, genellikle gün içi tekrar edilebilirlik ve günler arası tekrar edilebilirlik olarak rapor edilmektedir (FDA, 2015; ICH Rehberi, 2003; Peters ve Maurer, 2002).

Doğruluk

Doğruluk, biyoanalitik cevapların, referans değere yakınlığının ölçüdür. Cevaplar, referans değere mümkün olduğunca yakın olmalıdır ki doğru olsun. Doğruluk parametresi biyoanalitik yöntemlerde "geri kazanım" yolu ile hesaplanabilir. Ortama ilave edilen maddenin, çalışma ortamından hangi oranda geri kazanılabildiğini göstermek doğruluk göstergesidir.

Doğruluk validasyon parametresi, referans bir yöntem ile karşılaştırılarak, kör matris ortamına analizi yapılan madde ilave edilerek, standart ekle yöntemi ile numune içine saf madde ilave edilerek yapılabilir. Sonuçların ortalamaları, %BSS ve/veya %BH ile beraber verilir. Biyosensörler için geri kazanım değerleri %80-120 arasında ve %10 %BSS'den küçük olmalıdır (FDA, 2015; ICH Rehberi, 2003; Peters ve Maurer, 2002).

Sağlamlık

Biyoanalitik yöntemin sonuçlarının, çalışma koşullarının az miktarda bir değişiminden etkilenmeden anlamlı sonuç verebilmesi, yöntemin sağlam, kararlı olduğunu göstermektedir. Çalışma koşullarında pH, sıcaklık, karıştırma hızı gibi parametreler, az miktarda değiştirilerek, yeni sonuçlar elde edilir ve gerçek çalışma koşullarındaki sonuçlar ile karşılaştırılır. Zorunlu olmayan bir validasyon parametresidir (FDA, 2015; Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015).

Stabilite

Zorunlu olmayan bu validasyon parametresi, stabilite, biyoanalitik yöntemler için gerçekleştirilmesi oldukça zor bir validasyon parametresidir. Biyolojik maddeler kolay kontamine olur dolayısla, başka maddelerden kontamine olmayacak koşullarda muhafaza

edilmelidir. Genellikle tek kullanımlık, ya da bir gün boyunca çok kullanımlık biyosensörler hazırlanır. Stabilite çalışması için hazırlanan biyosensör, günde sadece üç ölçüm alınıp dikkatli bir şekilde muhafaza edilerek stabilite deneyleri yapılabilir (FDA, 2015; ICH Rehberi, 2003; Peters ve Maurer, 2002; Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015).

Validasyon çalışması sonuçları isteğe göre iki tabloda özetlenebilir. İlk tablo, doğrusal aralık, eğim, kesim, tanımlayıcılık katsayısı, eğimin standart hatası, kesimin standart hatası, yakalama sınırı, tayin alt sınırı, gün içi tekraredilebilirlik (% BSS), günler arası tekraredilebilirlik (% BSS) sonuçları içerirken, diğer tablo, uygulanabilirlik ve doğruluk çalışmasını özetleyecek şekilde, etiket miktarı, geliştirilen yöntem ile bulunan miktar, geri kazanım için ilave edilen miktar ve bulunan miktar, % geri kazanım, bunların % BSS ve % BH sonuçlarını içerebilir (Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015).

3. BULGULAR

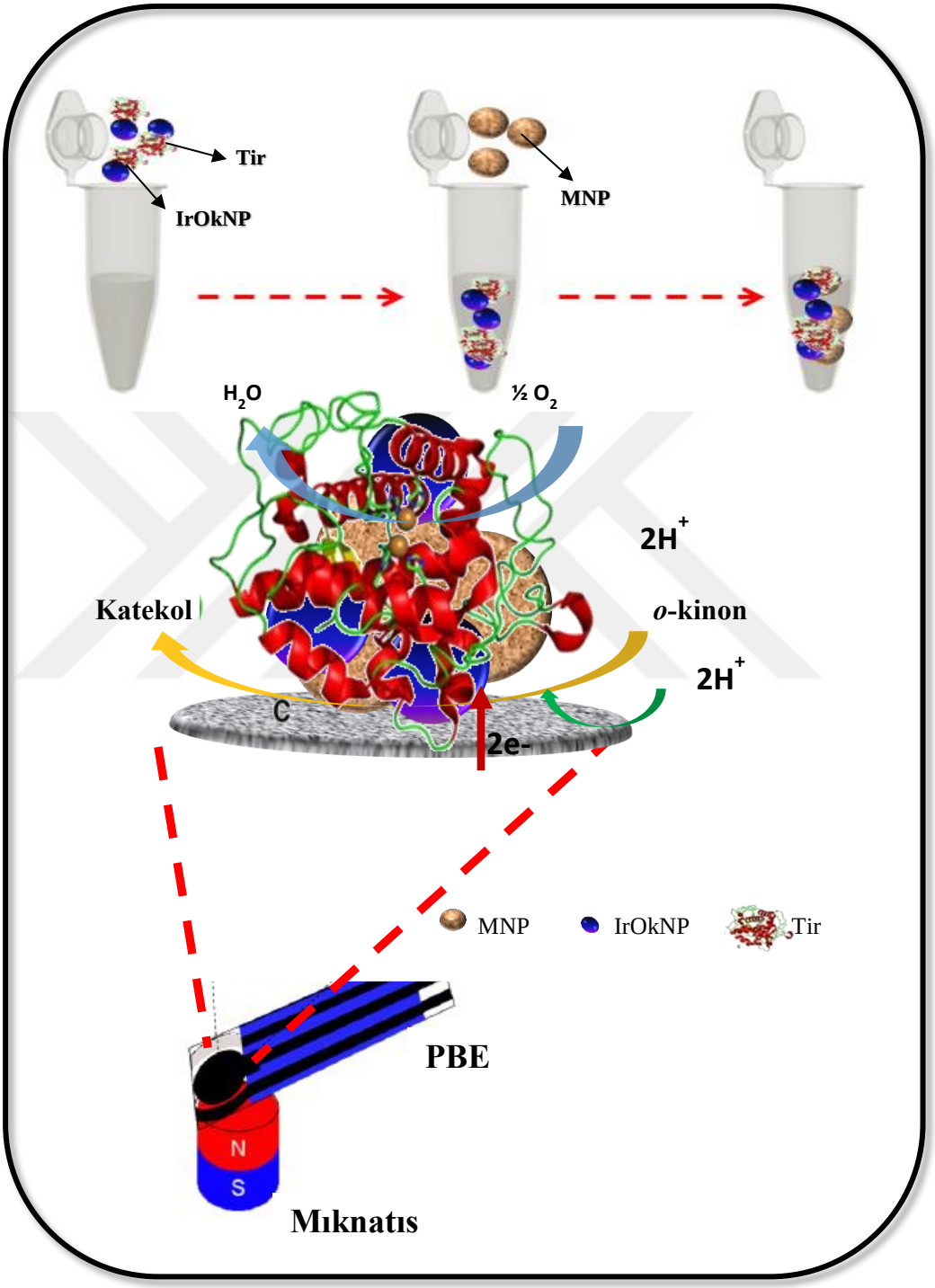
3.1. Metimazol tayinine yönelik çalışmalar

3.1.1. Katekol Tayini

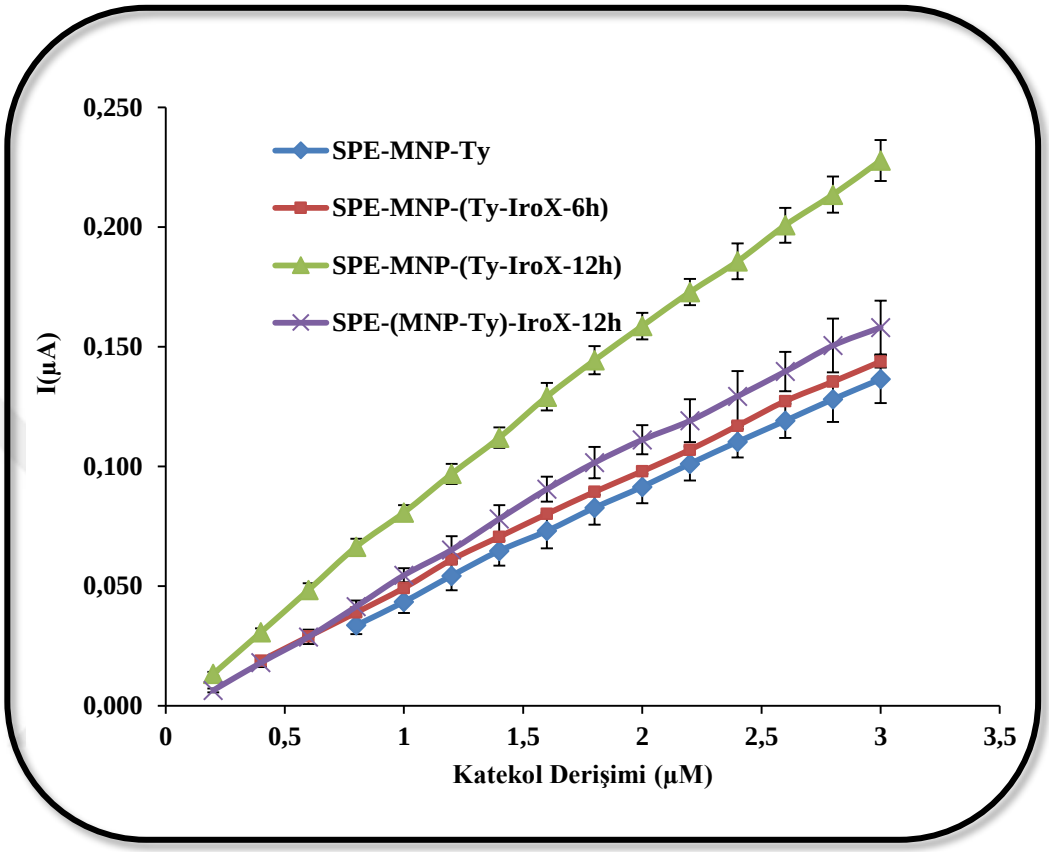
Metimazol tayini için öncelikle Katekol tayinine yönelik bir biyosensör geliştirilmiştir. Sonrasında Metimazol ilacının Tirozinaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi incelenmiştir. Öncelikle iridyum oksit nanopartikül (IrOkNP), manyetik nanopartikül (MNP), ve Tirozinaz (Tir) enzimini hangi metot ile hazırlanırsa en iyi biyosensör elde edilir sorusu üzerine çalışılmıştır. Bu amaçla farklı metotlar ile Tirozinaz enzimi immobilize edilmiştir.

- ✓ IrOkNP Tirozinaz ile 12 saat karıştırılıp, MNP eklenip 12 saat daha karıştırılmıştır.
- ✓ MNP Tirozinaz ile 12 saat karıştırılıp, IrOkNP eklenip 12 saat daha karıştırılmıştır.
- ✓ IrOkNP Tirozinaz ile 6 saat karıştırılıp, MNP eklenip 12 saat daha karıştırılmıştır.

Elde edilen nanokompozitler perde baskılı elektrot üzerine damlatılıp, elektrot altına yerleştirilen magnet sayesinde kompozit elektrot yüzeyinde tutulmuştur (Şekil 3.1). Performans karakterizasyonu için 3 farklı yöntem ile hazırlanan biyosensörlere devamlı olarak 0,2 µM Katekol ilave edilerek kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Bu biyosensörlerden en iyisi olarak 1. yöntem (IrOkNP Tirozinaz ile 12 saat karıştırılıp, MNP eklenip 12 saat tekrar karıştırılması) ile hazırlanan biyosensör seçilmiş ve ayrıntılı optimizasyon ve karakterizasyon deneylerine geçilmiştir (Şekil 3.2.). Dönüşümlü voltamogramlar (Şekil 3.3.) ve amperomogramlar (Şekil 3.4.) ile IrOkNP etkisi takip edilmiştir.

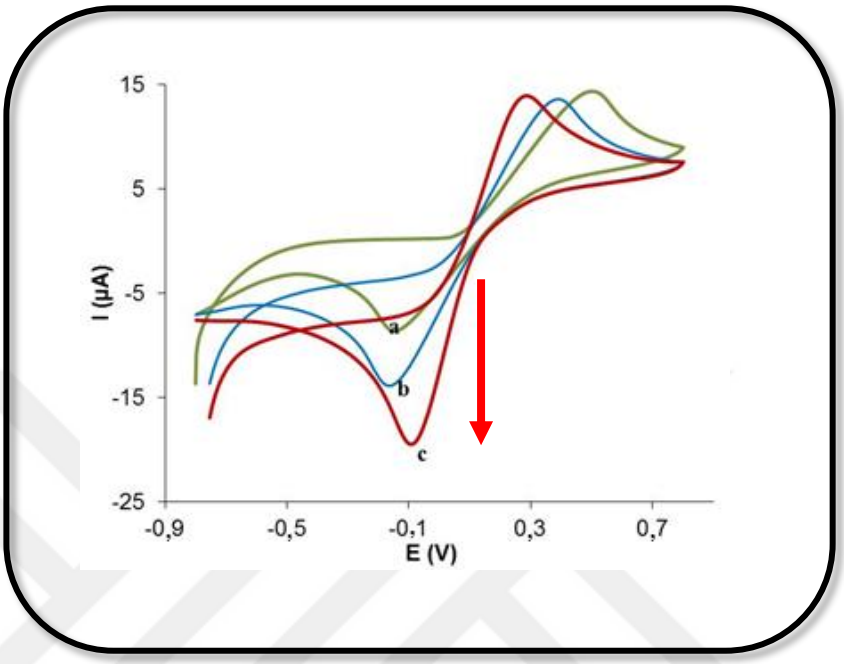


Şekil 3.1. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörünün tasarımı.

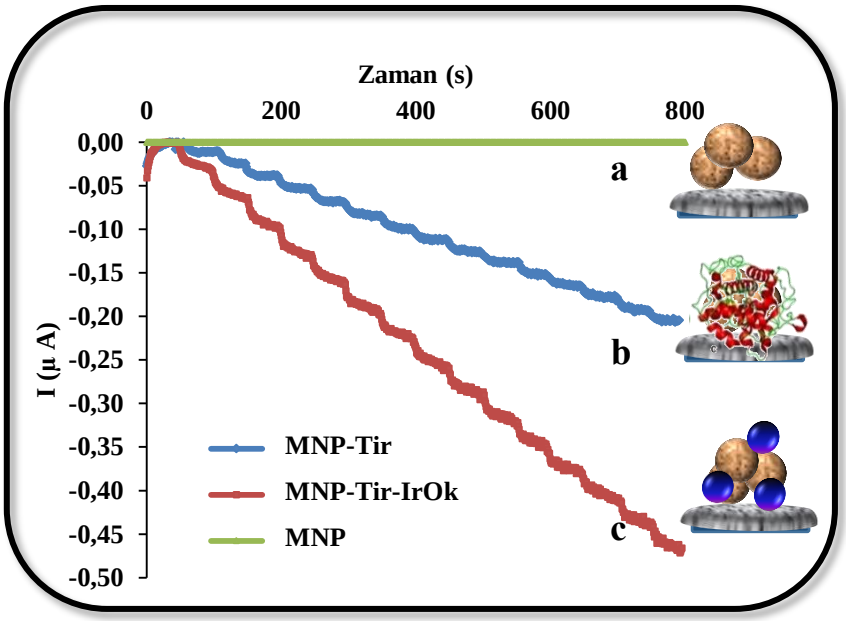


Şekil 3.2. Farklı yöntemlerle hazırlanan PBE/IrOkNP/MNP biyosensörlerinin kalibrasyon eğrileri.

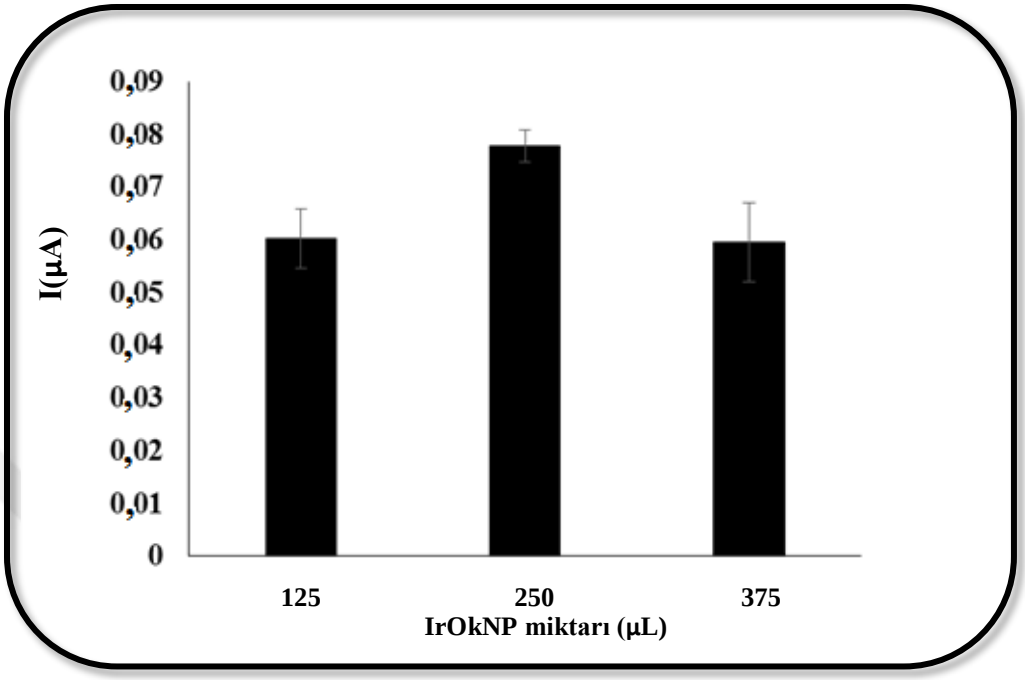
Modifikasyon stratejisi seçildikten sonra, ölçüme etki eden, uygulanan potansiyel, iridyum oksit miktarı ve Tirozinaz miktarı gibi parametreler optimize edilmiştir. 50 µL MNP için, 250 µL IrOkNP, 20 µL Tirozinaz varlığında maksimum Katekol cevabı elde edilmiştir (Şekil 3.4-3.6).



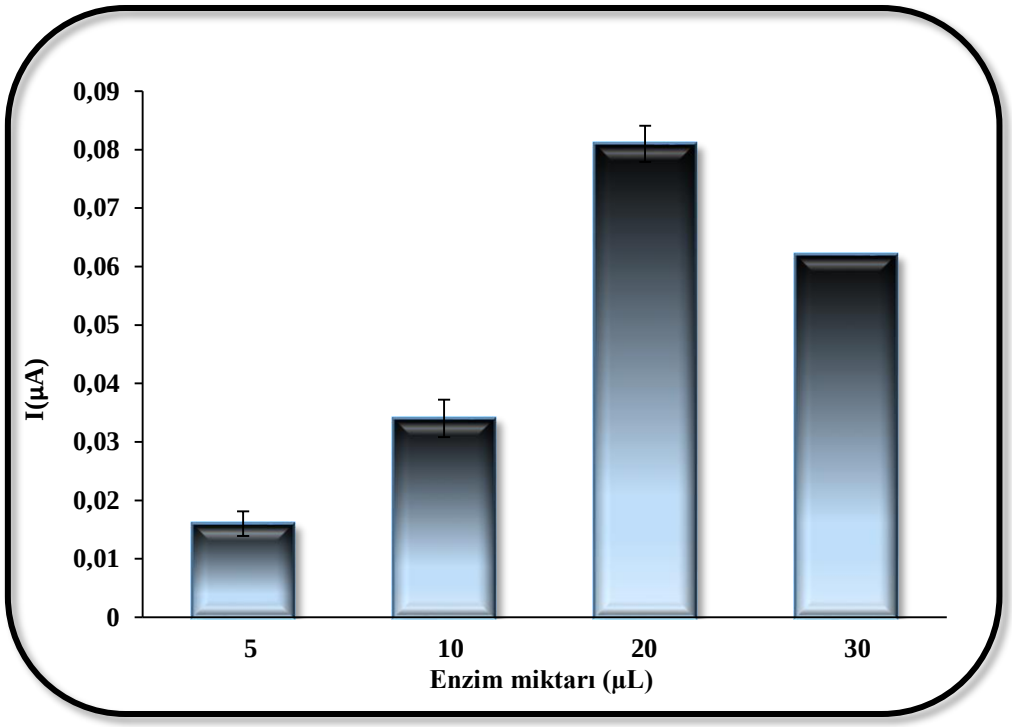
Şekil 3.3. 1mM Katekol'e ait dönüşümlü voltammogramlar (A) PBE (B) PBE-MNP-Tir (C) PBE-MNP-Tir-IrOkNP.



Şekil 3.4. Amperometrik cevaplar (A) PBE/MNP (B) PBE/MNP/Tir (C) PBE/MNP/IrOkNP/Tir.

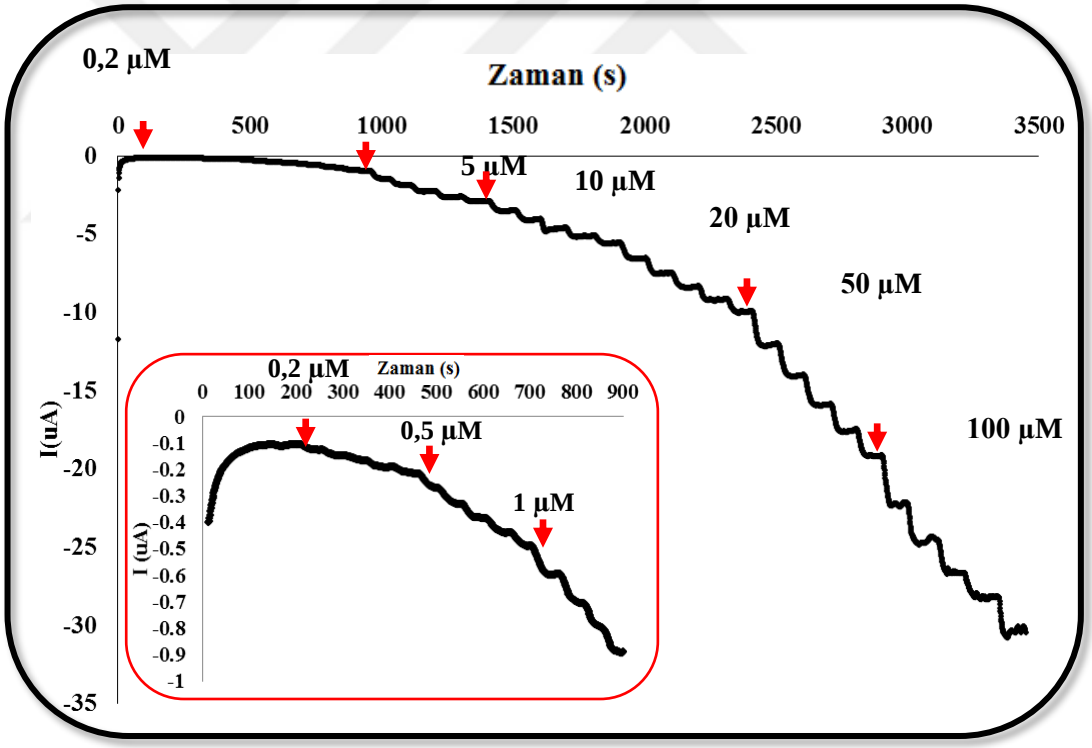


Şekil 3.5. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensöründe IrOkNP miktarının optimizasyonu.

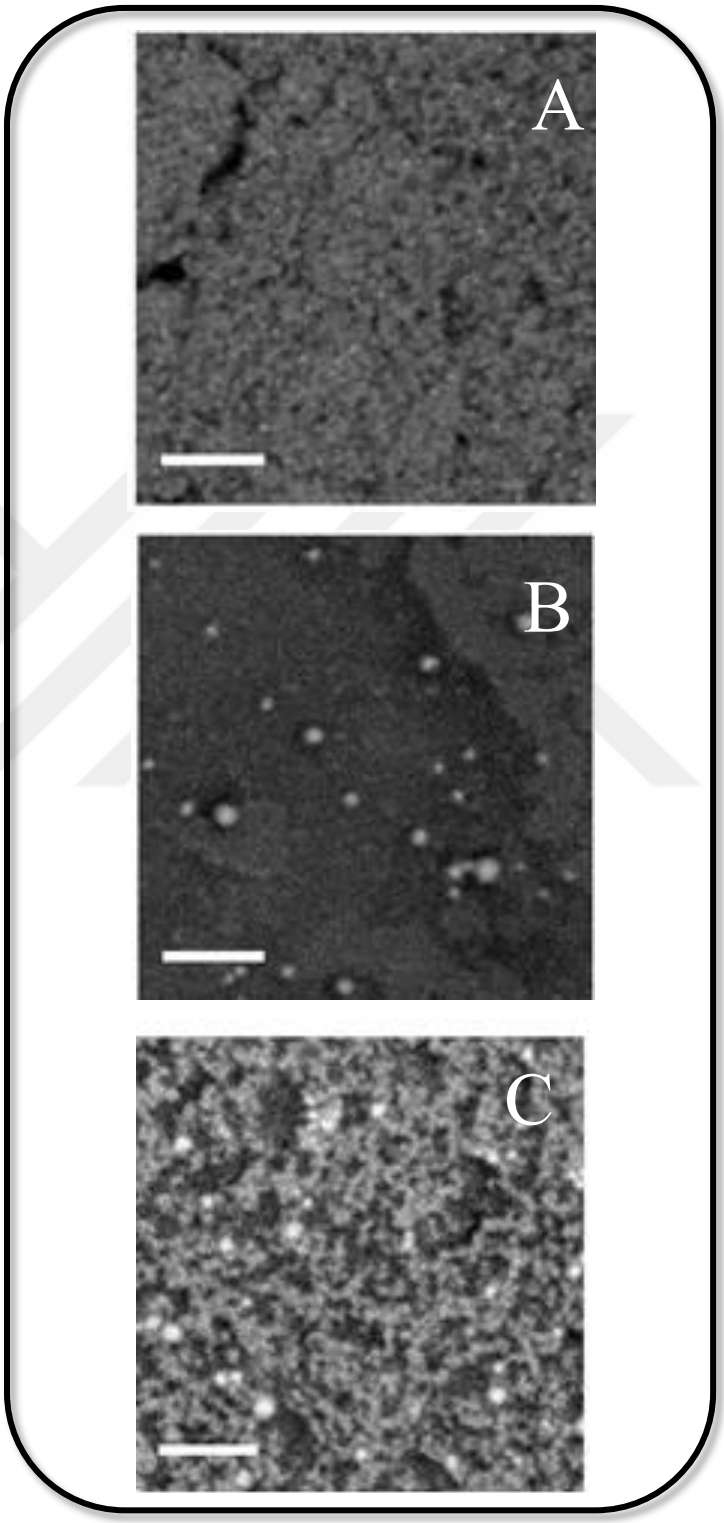


Şekil 3.6. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensöründe enzim miktarının optimizasyonu.

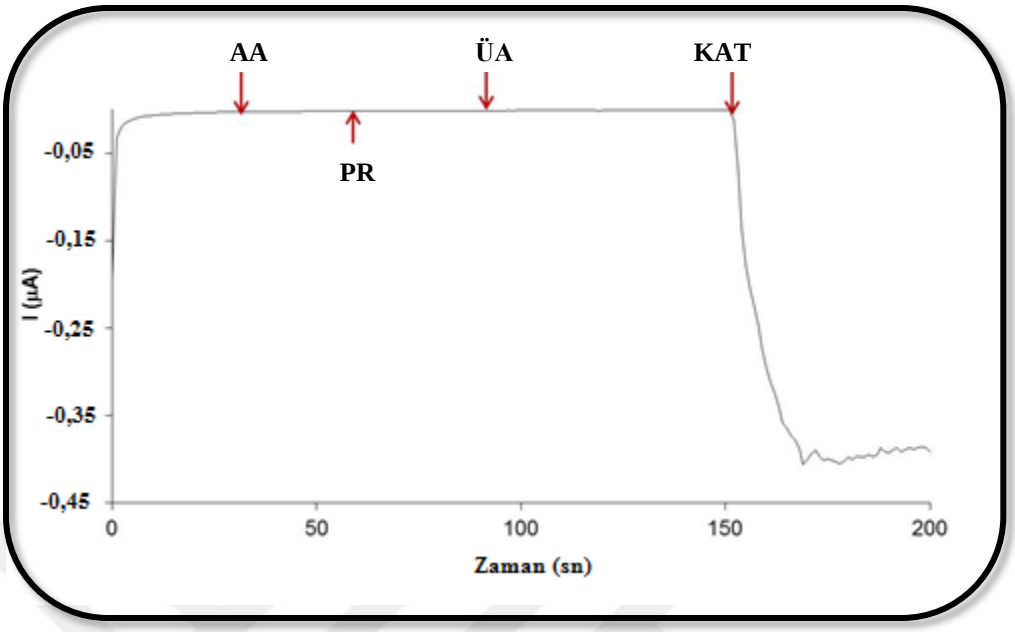
Elde edilen uygun şartlarda, Katekol tayin yönteminin validasyon çalışmaları yapılmıştır. 23,5 µM ile 433,50 µM Katekol derişimi aralığında doğrusal bir çalışma aralığı belirlenmiştir (Şekil 3.7). Katekol biyosensörü için yakalama sınırı 0,043 µM ve tayin alt sınırı 0,13 µM olarak hesaplanmıştır. Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneyleri %BSS olarak hesaplanmıştır. Elde edilen her biyosensörün analitik karakterizasyonu yapılmış ve çizelge 3.1'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. İnhibisyon çalışmaları için en iyi analitik karakterizasyona sahip olan biyosensör kullanılmıştır. Tasarlanan biyosensörün SEM görüntüleri alınarak yüzey morfolojileri incelenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.7. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörüne ait kalibrasyon amperomogramı.



Şekil 3.8. SEM görüntüleri (A) PBE-MNP-Tir (B) PBE-Tir-IrOkNP (C)PBE-MNP-Tir-IrOkNP.



Şekil 3.9. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörüne girişim etkisi.

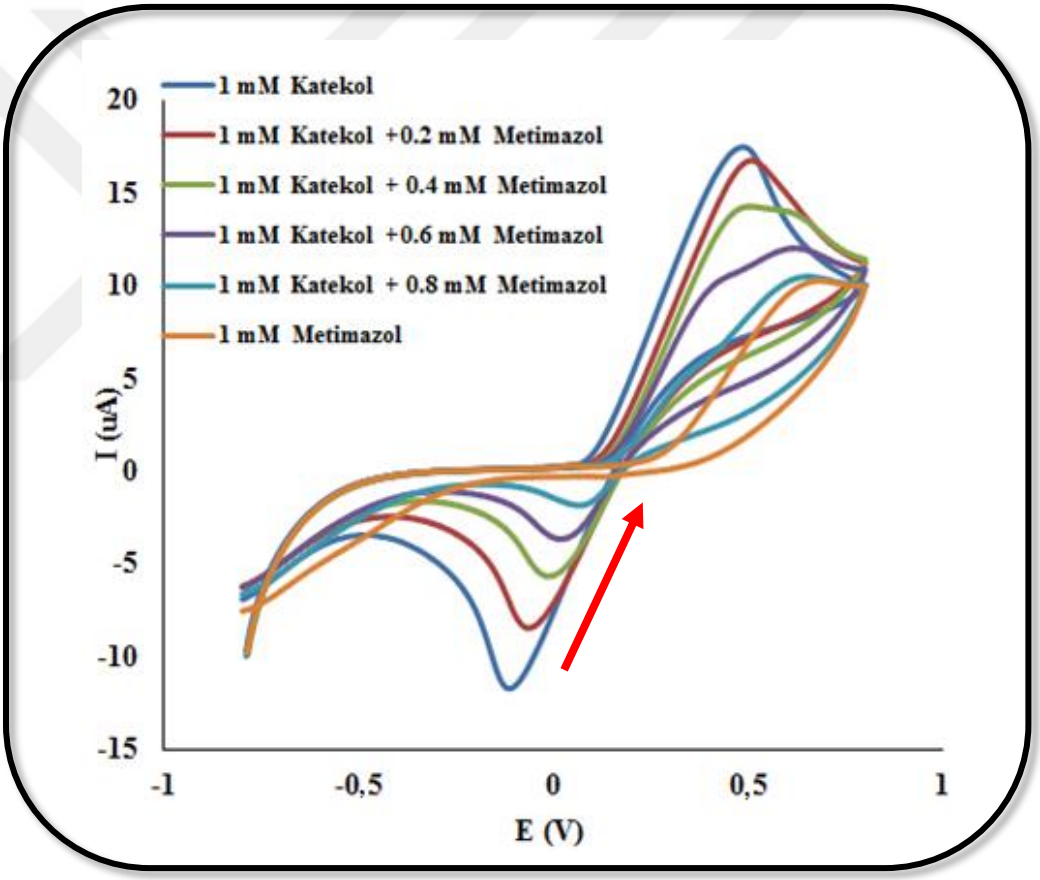
PBE/MNP/IrOkNP/Tir Biyosensörüne girişim çalışmalarında, 25 µM askorbik asit (AA), ürik asit (ÜA) ve parasetamol (PR) ilave edilip ardından 25 µM Katekol ilave edilmiştir. Potansiyel olarak girişim yapabilecek bu maddelerin Katekol cevabına herhangi bir etkisi görülmemiştir (Şekil 3.9).

Çizelge 3.1. Metimazol tayinine yönelik farklı stratejiler ile geliştirilen biyosensörlerin analitik karakterizasyonu.

Biyosensör	Doğrusal Aralık (µA)	Denklem	YS (µA)	TAS (µA)	%BSS
PBE-MNP-19,61U Tir	0,8-3	y=0,047x-0,0021 r^2= 0,999	0,12	0,36	10,42
PBE-MNP-(19,61UTir-250µLIrOkNP-6s)	0,4-3	y = 0,0482x + 0,0013 r^2 = 0,999	0,09	0,28	13,08
PBE-MNP-(19,61U Tir-250µLIrOkNP-12s)	**0,2-3**	**y=0,0739x+0,0026 r^2 = 0,998**	**0,04**	**0,12**	**4,52**
PBE-(MNP-19,61U Tir)-250µLIrOkNP-12s	0,2-3	y=0,0549x-0,0016 r^2 = 0,997	0,05	0,15	7,64
PBE-MNP-(19,61U Tir-125µLIrOkNP-12s)	0,2-3	y=0,0703x-0,0099 r^2 = 0,999	0,04	0,13	9,63
PBE-MNP-(19,61U Tir-375µLIrOkNP-12s)	0,2-3	y=0,0626x-0,0025 r^2 = 0,999	0,04	0,12	9,85
PBE-MNP-(4,90U Tir-250µLIrOkNP-12s)	1-3	y=0,0266x-0,0081 r^2 = 0,998	0,311	0,941	14,04
PBE-MNP-(9,81U Tir-250µLIrOkNP-12s)	0,6-3	y=0,045x-0,0084 r^2 = 0,999	0,161	0,488	5,58
PBE-MNP-(29,42U Tir-250µLIrOkNP-12s)	0,8-3	y=0,0708x-0,0087 r^2 =0,999	0,229	0,695	14,04

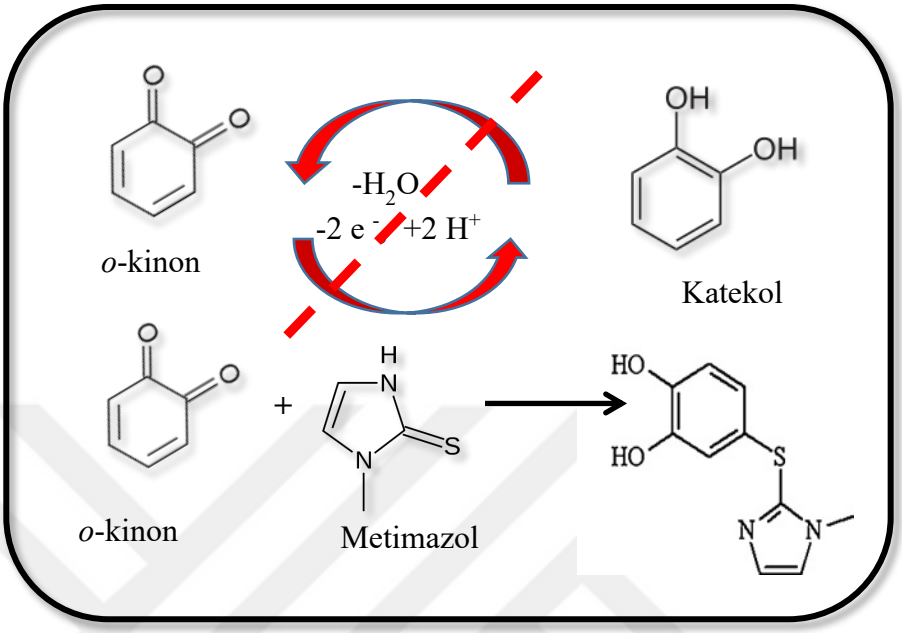
3.1.2. Metimazol tayini

Metimazol, Tirozinaz enziminin çalışma mekanizmasını iki şekilde inhibe eder. Birincisi kinonlar ile birleşmesi, substrata bağlanarak inhibisyon, ikincisi enzime bağlanması, tersinmez inhibisyondur. İlk olarak birinci inhibisyon yöntemi ile Metimazol tayini yapılmıştır.



Şekil 3.10. Katekol'e ve Metimazol'e ait dönüşümlü voltamogramlar.

1mM Katekol'e artan derişimlerde Metimazol eklendiğinde, dönüşümlü voltamogramda Katekol cevabında düşüş görülmüştür (Şekil 3.10). İlaç Katekol-o-kinon dönüşümü engelleyerek, tiyokinon oluşturarak, enzim inhibisyonunu sağlamaktadır.



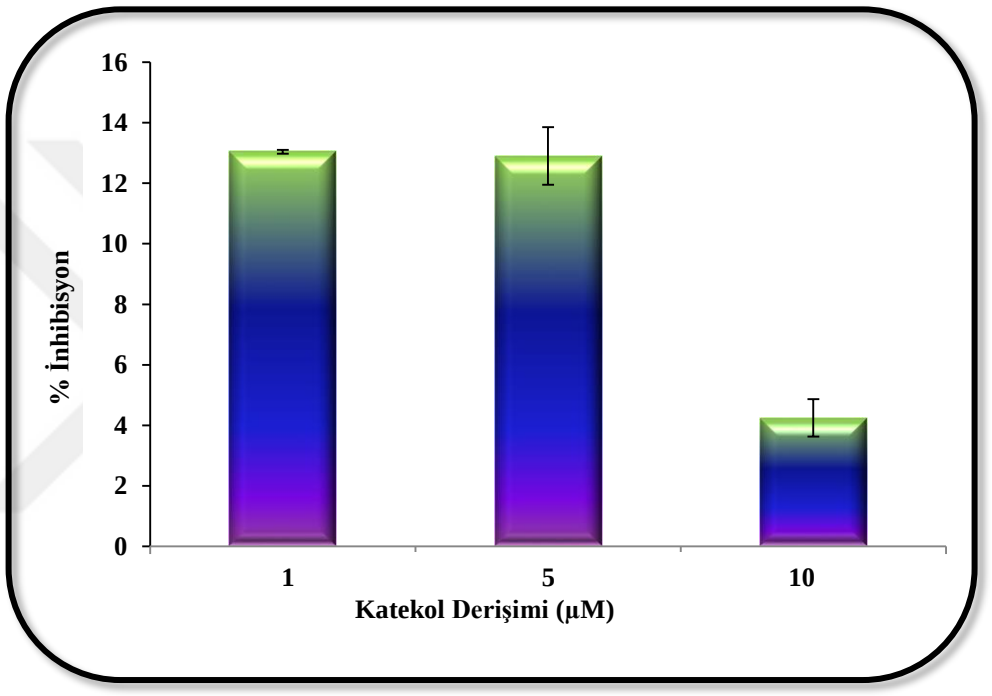
Şekil 3.11. Metimazol'un inhibisyon reaksiyonu.

Metimazol'un kinonlar ile birleşmesi, Katekol-o-kinon döngüsünü bozar ve biyosensör cevabında düşüş yani inhibisyon gerçekleşir (Şekil 3.11). Bu şekilde Metimazol ilaç etken maddesinin Tirozinaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi vardır. İnhibisyon yüzdesi 12 nolu eşitlikten hesaplanmıştır.

$$I(\%) = \left[\left(I_o - I_1 \right) / I_o \right] * 100 \qquad (12)$$

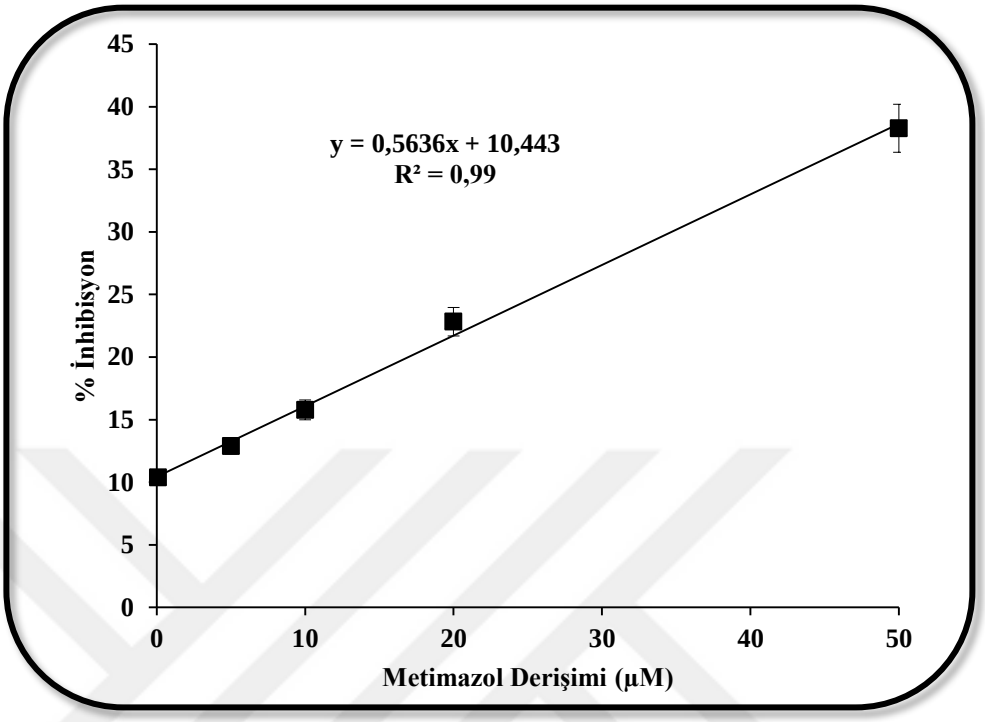
Bu denklemdeki I_o ilaç olmadan Katekol cevabının, I_1 ise ilaç varlığında, inhibisyon sonrası Katekol cevabı anlamına gelmektedir. Cevaplar akım cinsindendir. Bu denklem yardımı ile yüzde inhibisyon (% I) hesaplanmıştır.

İridyum oksit ve manyetik nanopartiküller ile geliştirilen biyosensör cevabına Metimazol ilacını etkisini incelemek substrata bağlanarak inhibisyon yöntemi 5 µM Metimazol varlığında Katekol cevapları alınmıştır. İnhibisyon en iyi 5 µM Katekol cevabında görülmüştür (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tiyokinon oluşumuyla inhibisyonda Katekol miktarının optimizasyonu.

Artan Metimazol derişimlerinde 5 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,125 -50 µM Metimazol derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırası ile 0,041 ve 0,125 µM olarak hesaplanmıştır. Günler arası tekrar edilebilirlik ve gün içi tekrar edilebilirlikler için %10'dan düşük %BSS değerleri elde edilmiştir. (Şekil 3.13) Tiyokinon oluşumu ile Metimazol tayinine ait validasyon sonuçları çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.13. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tiyokinon oluşumuyla Metimazol tayinine ait kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.2. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tiyokinon oluşumuyla ile Metimazol tayinine ait validasyon sonuçları.

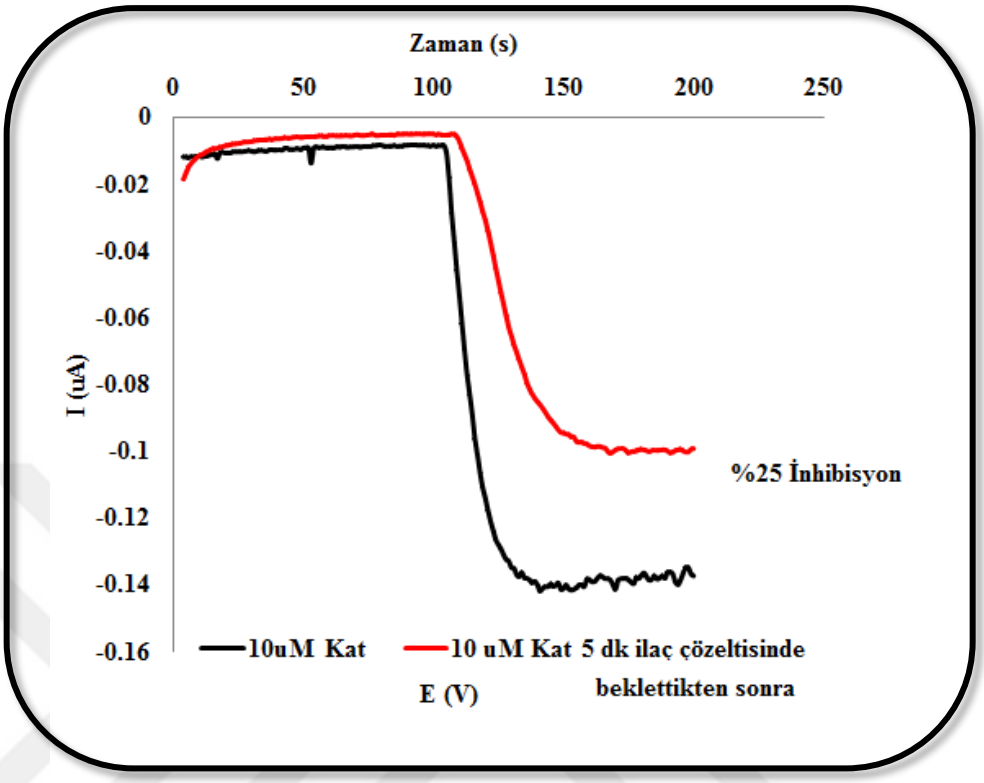
Doğrusal aralık (µM)	0,125-50
Eğim ($\mu A.M^{-1}$)	0,56
Kesişim (µA)	10,44
Eğimin standart hatası	$1,83x10^{-2}$
Kesişimin standart hatası	$4,51x10^{-1}$
Korelasyon katsayısı	0,99
Yakalama sınırı (µM)	0,041
Tayin alt sınırı (µM)	0,125
Gün içi tekrarlanabilirlik (%BSS)	3,62
Günler arası tekrarlanabilirlik (%BSS)	3,59

Geliştirilen biyosensörün örneklere uygulanabilirliği göstermek amaçlı, Metimazol içeren farmasötik dozaj formalardan Metimazol tayini yapılmıştır. Sentetik insan kanına ilave etme yöntemi ile Metimazol içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile yapılmış çizelge 3.3'de ayrıntılı olarak paylaşılmıştır.

Çizelge 3.3. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tiyokinon oluşumuyla gerçek örneklerde Metimazol tayini.

	Tirodril®	İnsan Serumu
Etiket miktarı (mg)	5,00	-
Bulunan (mg)	5,07	-
% BSS	6,58	-
% BH	-1,3	-
Eklenen (mg)	20,00	20,00
Bulunan (mg)	20,19	20,26
Geri kazanım (%)	100,95	101,32
% BSS	4,27	3,54
% BH	-0,95	-1,32

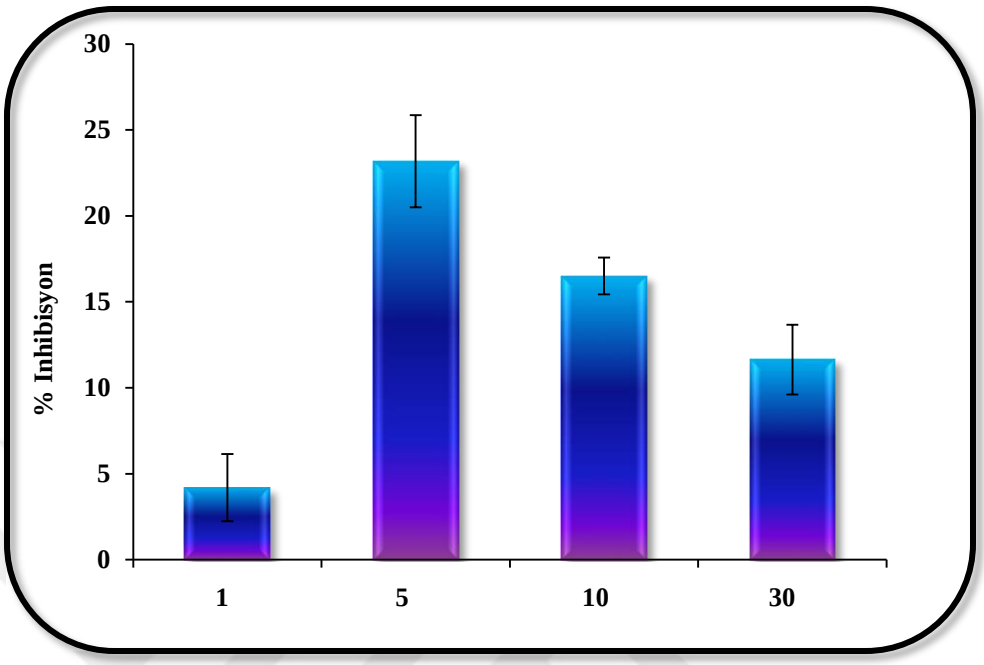
Tirozinazın ikinci tip inhibisyonu, Metimazol'ün Tirozinaz'da bulunan bakırlar ile şelat oluşturması ile olmaktadır. Bu inhibisyon tersinmezdir ve belli bir inkübasyon süresi gerektirir. Bu sebeple farklı sürelerde, Metimazol içeren çözeltilerde, geliştirilen biyosensör bekletilmiştir. İkinci tip inhibisyonu incelemek için, hazırlanan biyosensör, 5 dk ilaç çözeltisinde bekletilmiş ve %25 inhibisyon gözlenmiştir (Şekil 3.14).



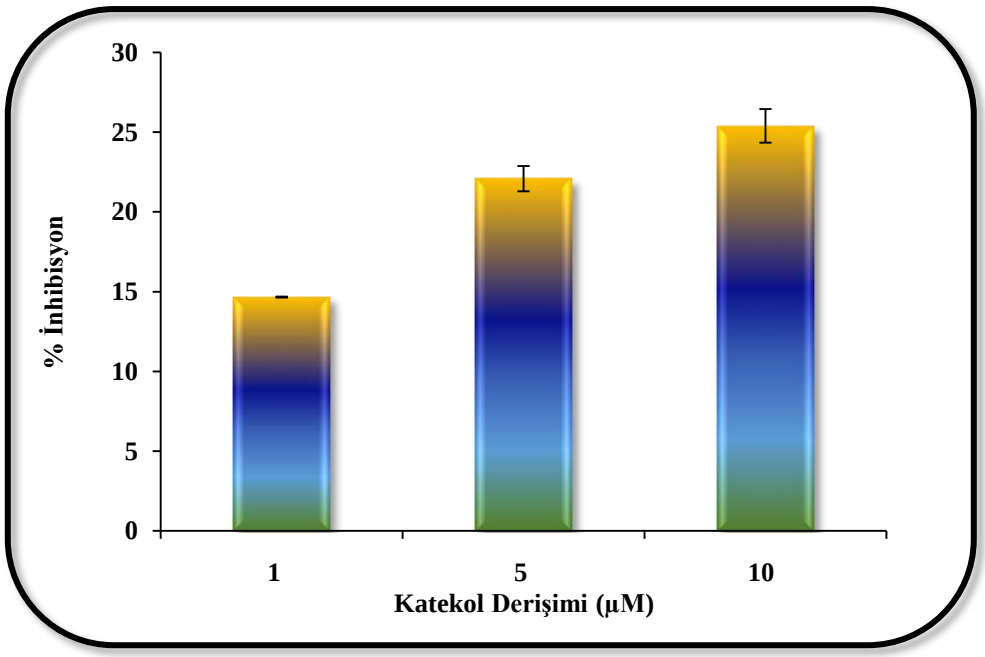
Şekil 3.14. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyona ait amperomogramlar.

Bu inhibisyonda Metimazol enzime bağlanarak, enzimde konformasyonel bir değişiklik meydana getirir. Geri dönüşümsüz olan bu inhibisyonda, biyosensör tek sefer kullanılabilir ve inhibisyonun olması için inkübasyon süresi gereklidir.

İridyum oksit ve manyetik nanopartiküller ile geliştirilen biyosensör 5 µM Metimazol çözeltisinde 1, 5, 10 ve 30 dakikalık farklı inkübasyon sürelerinde bekletilmiştir. Daha sonra 10 µM Katekol cevabı izlenmiştir. 5 dk inkübasyon süresi uygun bulunmuş ve takip eden deneylerde kullanılmıştır (Şekil 3.15). Katekol düşüşü takibinin anlamlı olması açısından Katekol miktarı optimize edilmiş ve 5 µM Metimazol uygun bulunmuştur (Şekil 3.16). Hazırlanan biyosensör 5 dk ilaç çözeltisinde bekletilmiştir ve %25 inhibisyon gözlenmiştir.

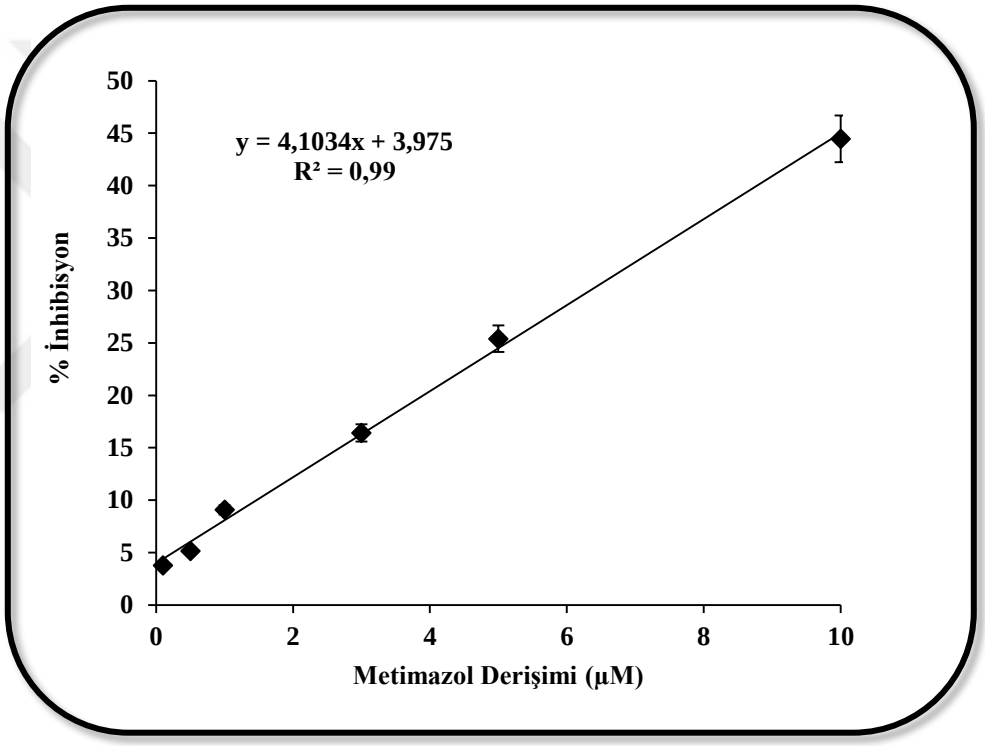


Şekil 3.15. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyon için inkübasyon süresi optimizasyonu.



Şekil 3.16. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyon için Katekol derişimi optimizasyonu.

Optimize edilen inhibisyon koşullarında, artan Metimazol derişimlerinde 5 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,1-10 µM Metimazol derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). YS ve TAS değerleri sırası ile 0,006 ve 0,017 µM olarak hesaplanmıştır. Günler arası tekrar edilebilirlik ve gün içi tekrar edilebilirlikler için %10'dan düşük %BSS değerleri elde edilmiştir ve çizelge 3.4'de ayrıntılı olarak validasyon sonuçları verilmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyonla Metimazol tayininin analitik karakterizasyonu.

Çizelge 3.4. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyonla Metimazol tayinine ait validasyon sonuçları.

Doğrusal aralık (µM)	0,1-10
Eğim ($\mu A.M^{-1}$)	4,10
Kesişim (µA)	3,96
Eğimin standart hatası	$1,07x10^{-1}$
Kesişimin standart hatası	$5,08x10^{-1}$
Korelasyon katsayısı	0,99
Yakalama sınırı (µM)	0,006
Tayin alt sınırı (µM)	0,02
Gün içi tekrarlanabilirlik (%BSS)	6,61
Günler arası tekrarlanabilirlik (%BSS)	6,64

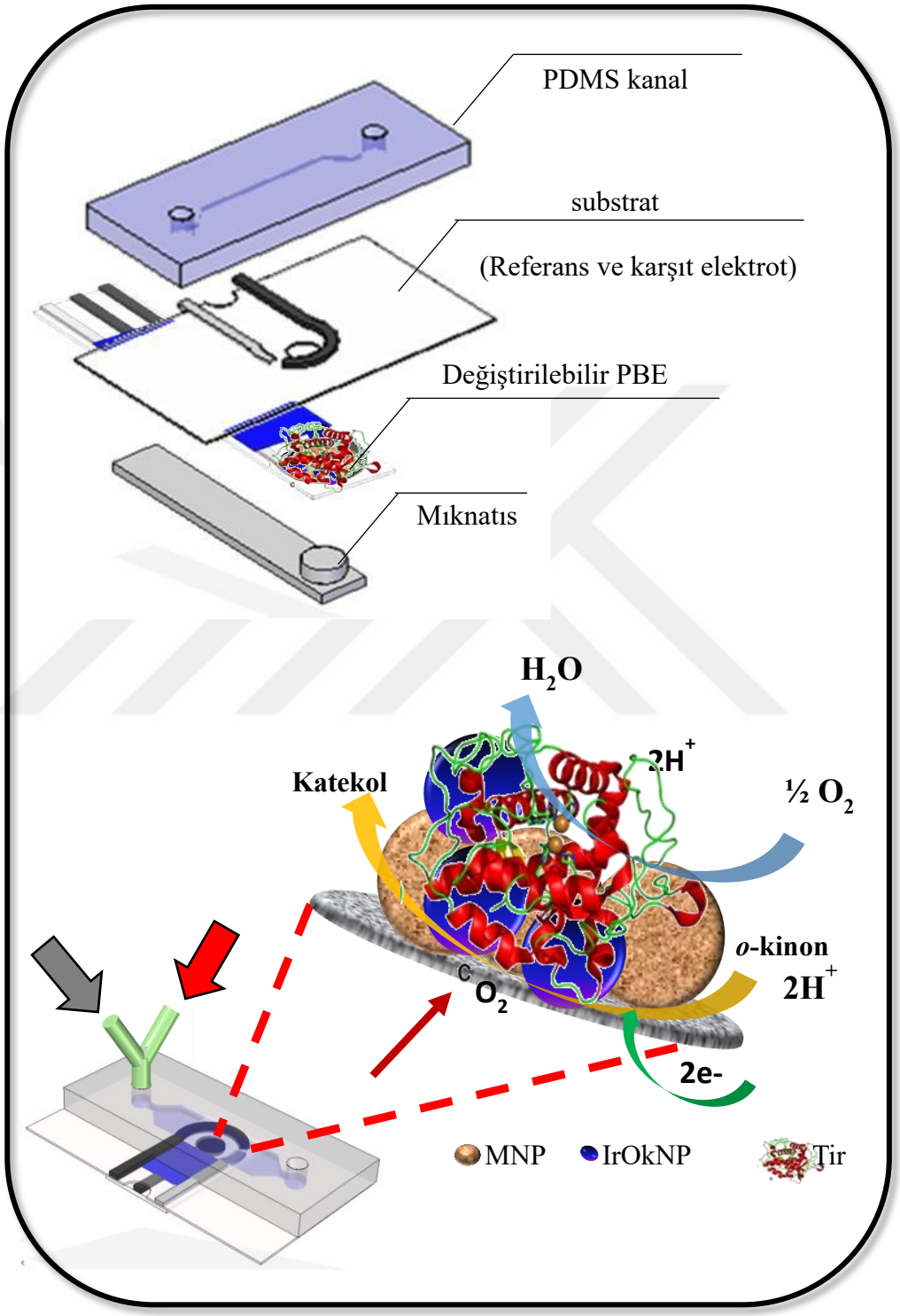
Geliştirilen biyosensörün örneklere uygulanabilirliği göstermek amaçlı, Metimazol içeren farmasötik dozaj formalardan Metimazol tayini yapılmıştır. Sentetik insan kanına ilave etme yöntemi ile Metimazol içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile yapılmış çizelge 3.5'de ayrıntılı olarak paylaşılmıştır.

Çizelge 3.5. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile tersinmez inhibisyonla gerçek örneklerde Metimazol tayini.

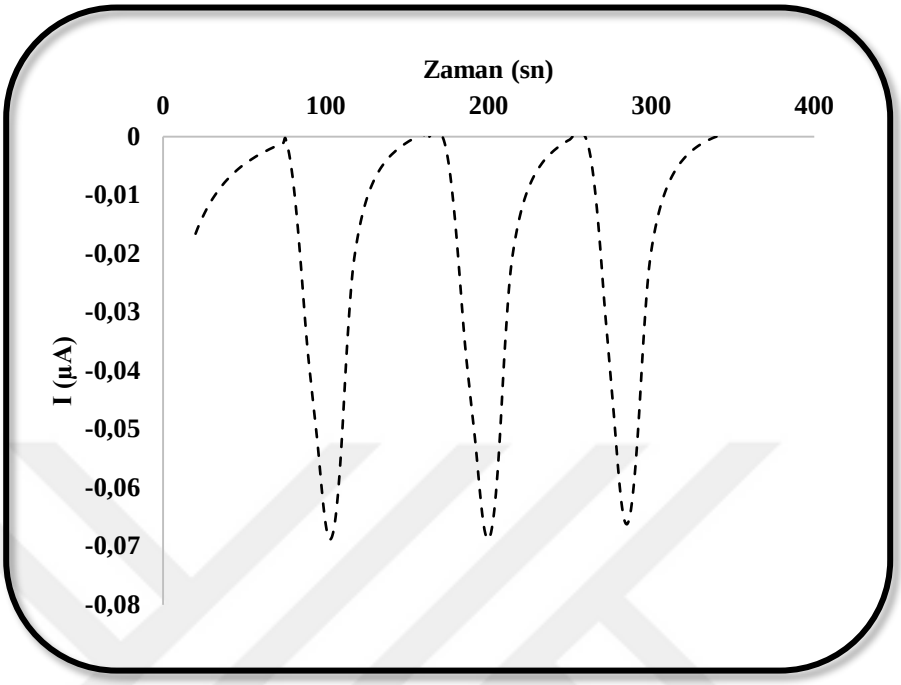
	Tirodril®	İnsan Serumu
Etiket miktarı (mg)	5,00	-
Bulunan (mg)	5,35	-
% BSS	5,44	-
% BH	-7,00	-
Eklenen (mg)	10,00	5,00
Bulunan (mg)	10,71	5,22
Geri Kazanım (%)	107,13	104,39
% BSS	6,89	3,43
% BH	-7,13	-4,40

Geliştirilen biyosensör ile Metimazol ilişkisini daha duyarlı, daha hızlı ve daha bütünleşmiş bir şekilde incelemek amaçlı polimerik mikroçip tasarlanmıştır. Poly(dimetilsiloksan) tabanlı mikroçip perde baskılı elektrot ile kombine edilmiş, elektrodun altına mıknatıs yerleştirilmiştir. Mıknatıs sayesinde elektrot yüzeyinde, iridyum oksit ve manyetik nanopartiküller ile immobilize edilmiş nanokompozit tutturulabilmektedir (Şekil 3.18).

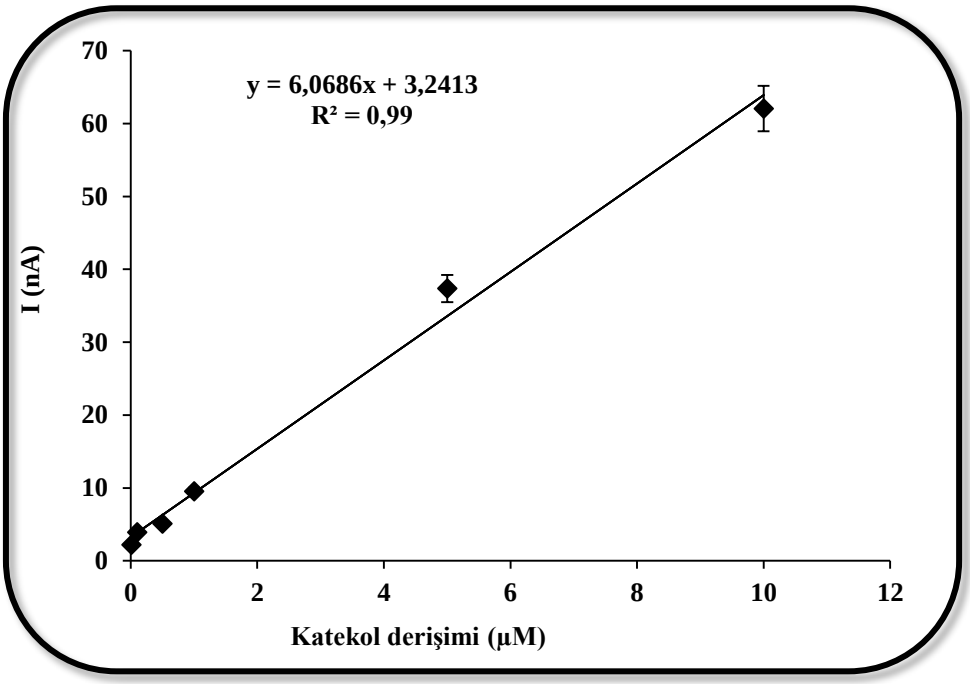
Optimize edilmiş olan enzim, iridyum oksit ve manyetik nanopartikül miktarları ile hazırlanan immobilizasyon matrisi, mikroçip içine yerleştirilmiştir. Katekol cevabı izlenmiş, 0,5 µM Katekol için akışa enjeksiyon pikleri şekil 3.19'de görülmektedir. Geliştirilen mikroçip ile 350 sn de üç anlamlı biyosensör cevabı alınmaktadır. 0,01 µM ve 10 µM Katekol derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir (r=0,99). YS ve TAS değerleri 0,003 ve 0,009 µM olarak hesaplanmıştır. Günler arası tekrar edilebilirlik ve gün içi tekrar edilebilirlikler için %10'dan düşük %BSS değerleri elde edilmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3.18. PBE/MNP/IrOkNP/Tir biyosensörü ile geliştirilen mikroçip tasarımı.



Şekil 3.19. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçip ile 0,5 µM Katekol cevabı.



Şekil 3.20. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçipinin analitik karakterizasyonu.

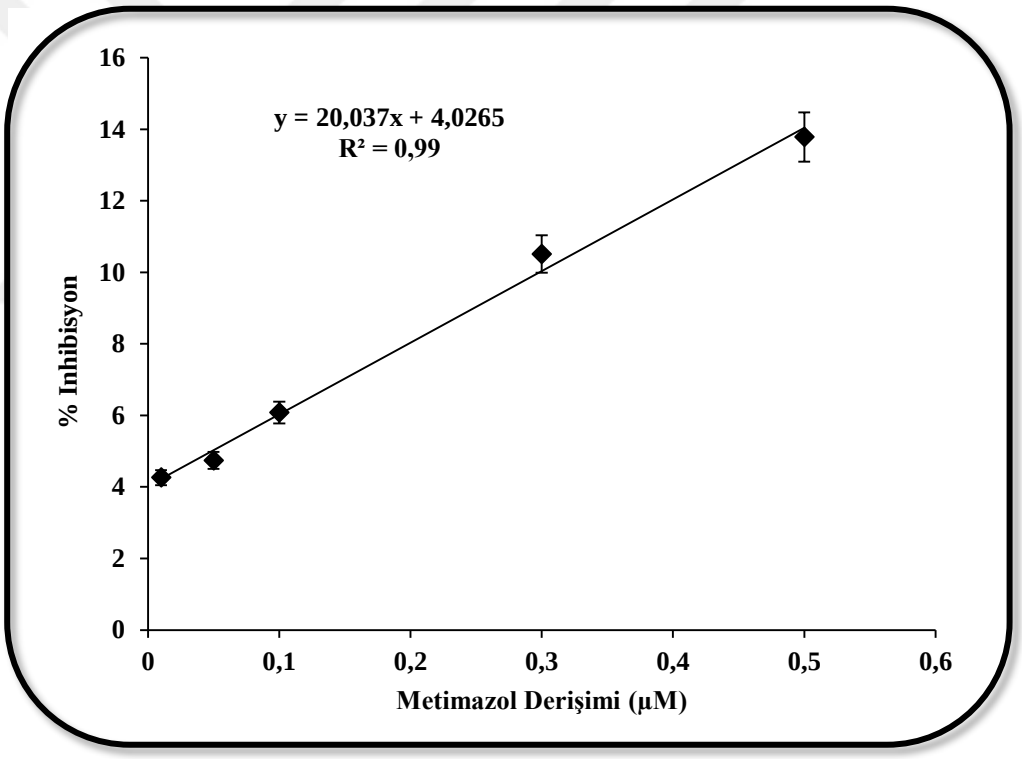
Geliştirilen mikroçipte Metimazol ile Tirozinaz inhibisyonu çalışmalarında İlk inhibisyon metodu olan substrata bağlanarak inhibisyonda artan Metimazol derişimlerinde 5 µM Katekol enjeksiyonu yapılmıştır. 0,01-0,5 µM Metimazol derişimi aralığında kalibrasyon denklemi (r=0,99) elde edilmiştir. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırası ile 0,003 ve 0,010 µM olarak hesaplanmıştır. Günler arası tekrar edilebilirlik ve gün içi tekrar edilebilirlikler için %10'dan düşük %BSS değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.6, Şekil 3.21).

Çizelge 3.6. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçipini kullanarak tiyokinon oluşumu ile inhibisyonda Metimazol tayinine ait validasyon sonuçları.

Doğrusal aralık (µM)	0,01-0,5
Eğim ($\mu A.M^{-1}$)	20,00
Kesişim (µA)	4,03
Eğimin standart hatası	$8,69x10^{-1}$
Kesişimin standart hatası	$2,31x10^{-1}$
Korelasyon katsayısı	0,99
Yakalama sınırı (µM)	0,003
Tayin alt sınırı (µM)	0,01
Gün içi tekrarlanabilirlik (%BSS)	4,33
Günler arası tekrarlanabilirlik (%BSS)	5,56

Geliştirilen mikroçipin gerçek örneklere uygulanabilirliği göstermek amaçlı, Metimazol içeren farmasötik dozaj formalardan Metimazol tayini yapılmıştır. Farmasötik dozaj formalar üzerine standart madde ekleme yöntemi ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

İnsan kanına ilave etme yöntemi ile Metimazol içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile de yapılmış çizelge 3.7'de ayrıntılı olarak paylaşılmıştır.

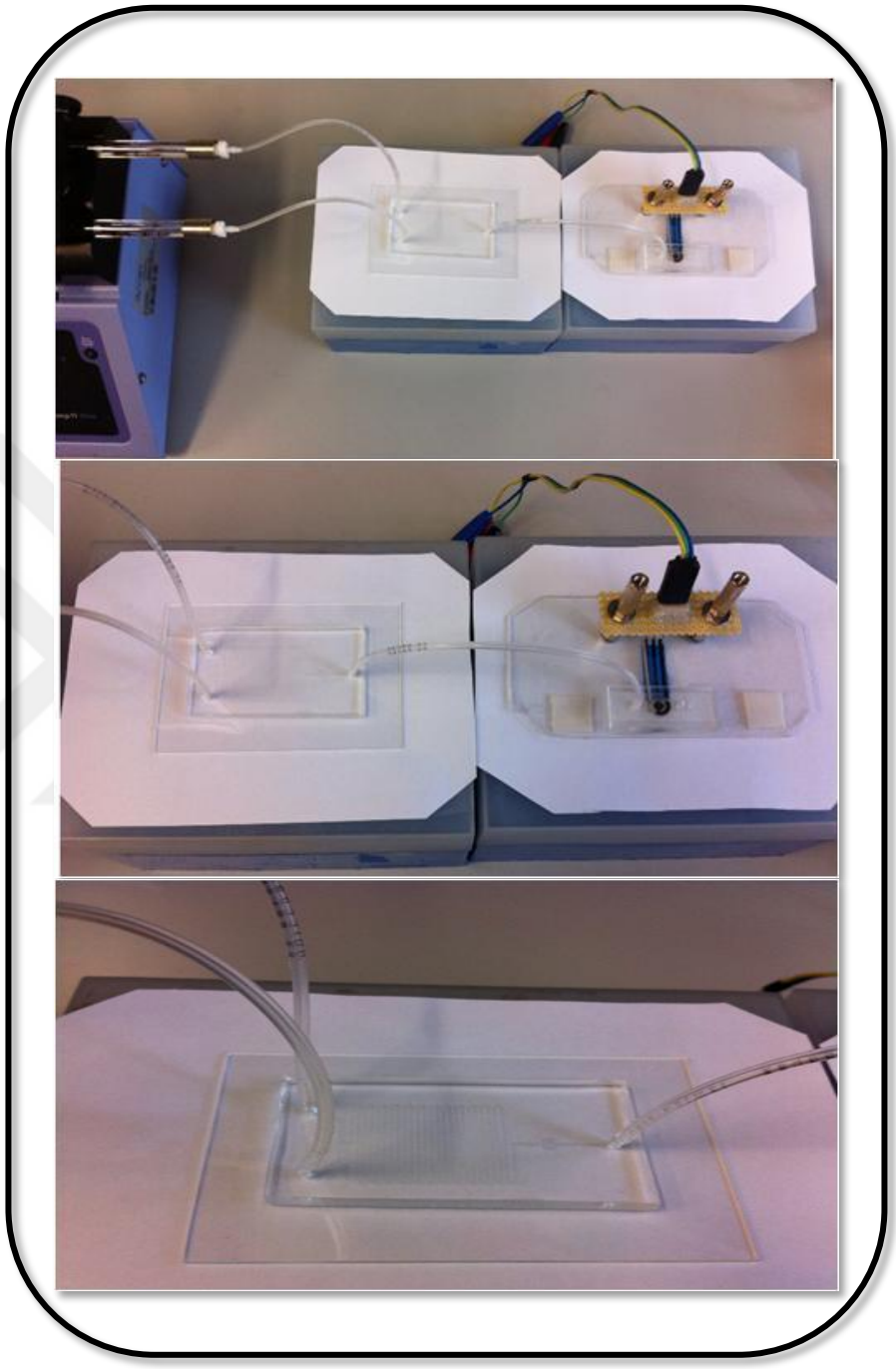


Şekil 3.21. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçipini kullanarak tiyokinon oluşumu ile inhibisyonda Metimazol tayini.

Çizelge 3.7. PBE/MNP/IrOkNP/Tir mikroçipi kullanarak tiyokinon oluşumu ile inhibisyonda gerçek örneklerde Metimazol tayini.

	Tirodril®	İnsan Serumu
Etiket miktarı (mg)	5,00	-
Bulunan (mg)	4,90	-
% BSS	3,37	-
% BH	2,00	-
Eklenen (mg)	0,50	0,50
Bulunan (mg)	0,50	0,52
Geri kazanım (%)	100,04	103,63
% BSS	3,74	4,29
% BH	-0,04	-4,00

Mikroçipler ile tersinmez inhibisyon çalışmaları inkübasyon süresi gerektirdiği için, inkübasyon yapılmak üzere ön çip hazırlanmış iki çip birbirine entegre edilmiştir (Şekil 3.22). Mikroçipler ile tersinmez inhibisyon çalışmalarında tek nokta için tek biyosensör tasarlanması ve mikroçip hazırlanması gereklidir. Bu durum, biyosensörlerin hızlı hazırlanma, hızlı cevap verme teorisine ters düştüğünden, inhibisyon yöntemi ile Metimazol tayini mikroçip ile çalışılamamıştır.

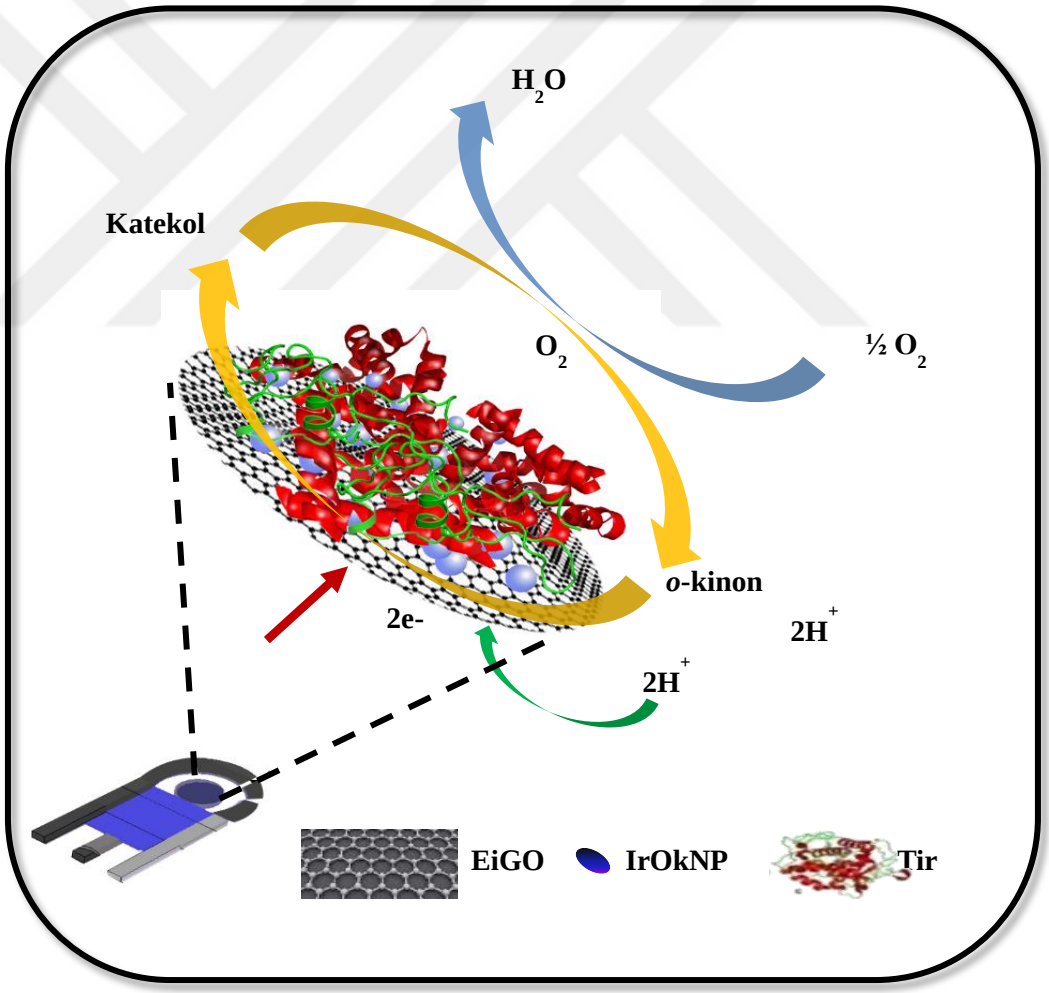


Şekil 3.22. İkili mikroçip sistemi.

3.2. Kaptopril tayinine yönelik çalışmalar

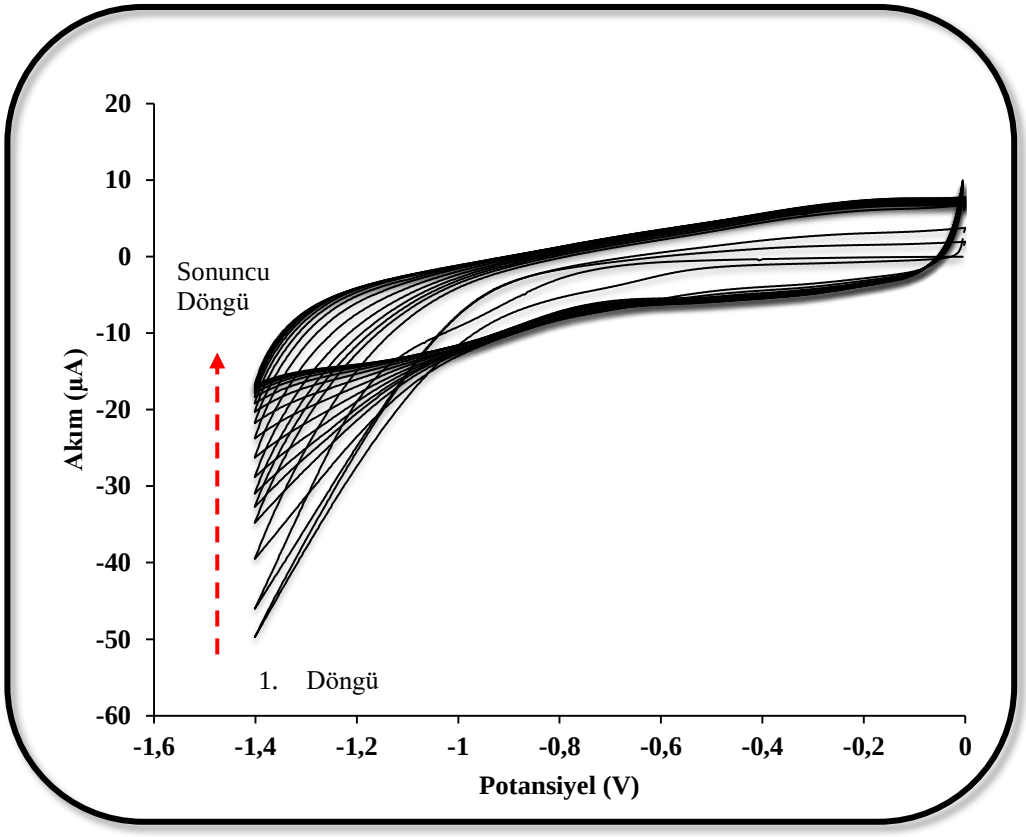
3.2.1. Katekol Tayini

Kaptopril tayinine yönelik, indirgenmiş grafen oksit ve iridyum oksit nanopartikülleri nanosensör oluşturmak üzere, Tirozinaz enzimi ise nanobiyosensör oluşturmak üzere kullanılmıştır (Şekil 3.23).



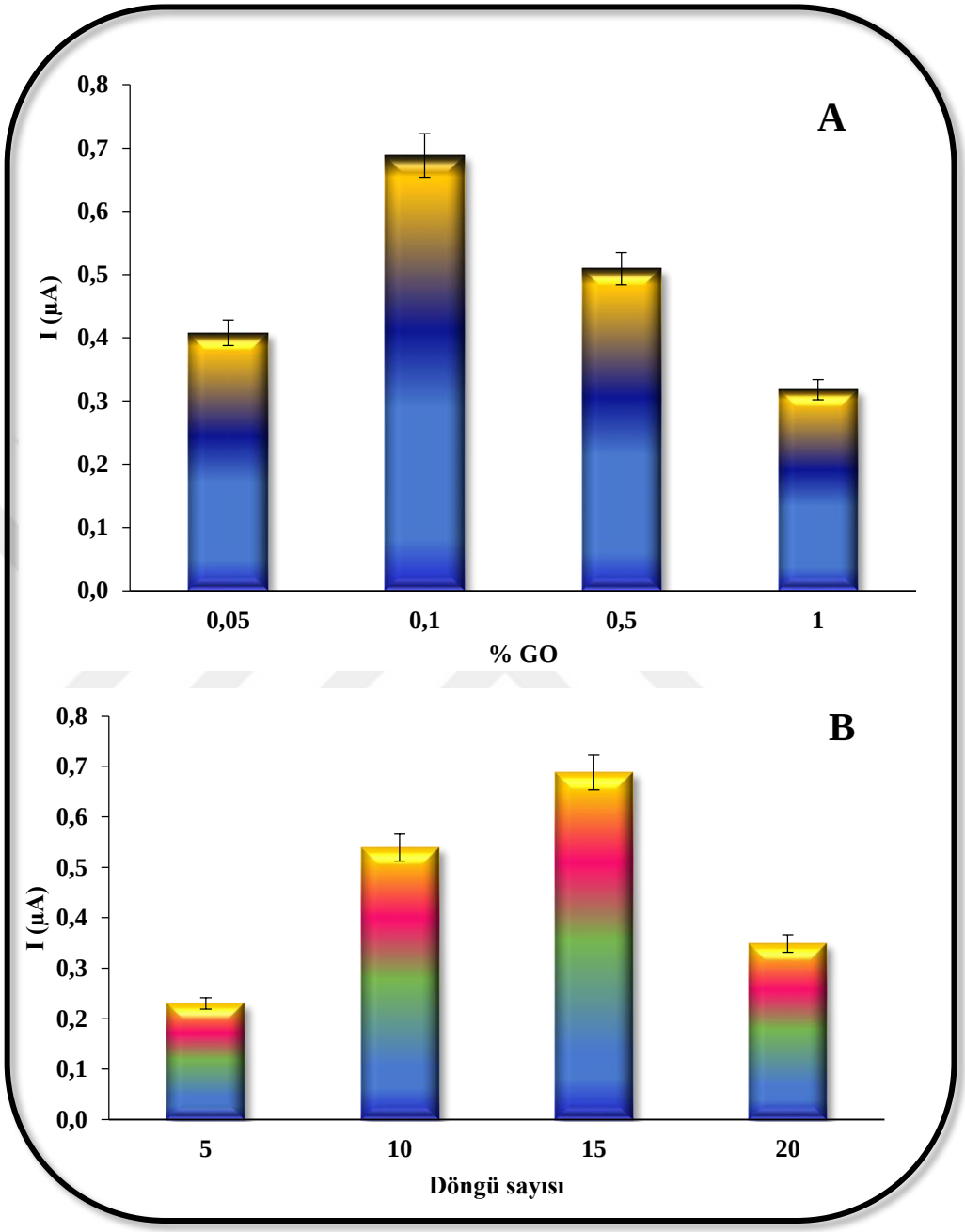
Şekil 3.23. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensörün şematik gösterimi

İndirgenmiş grafen oksit elde etmek amaçlı, farklı derişimlerde grafen oksit çözeltilerinden 0-1,4V arasında farklı döngü sayısında, pH 6,5 fosfat tamponunda dönüşümlü voltamogramlar alınarak indirgenmiş grafen oksit elde edilmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. Grafen oksitten indirgenmiş grafen oksit elde etmek için alınan dönüşümlü voltamogramlar.

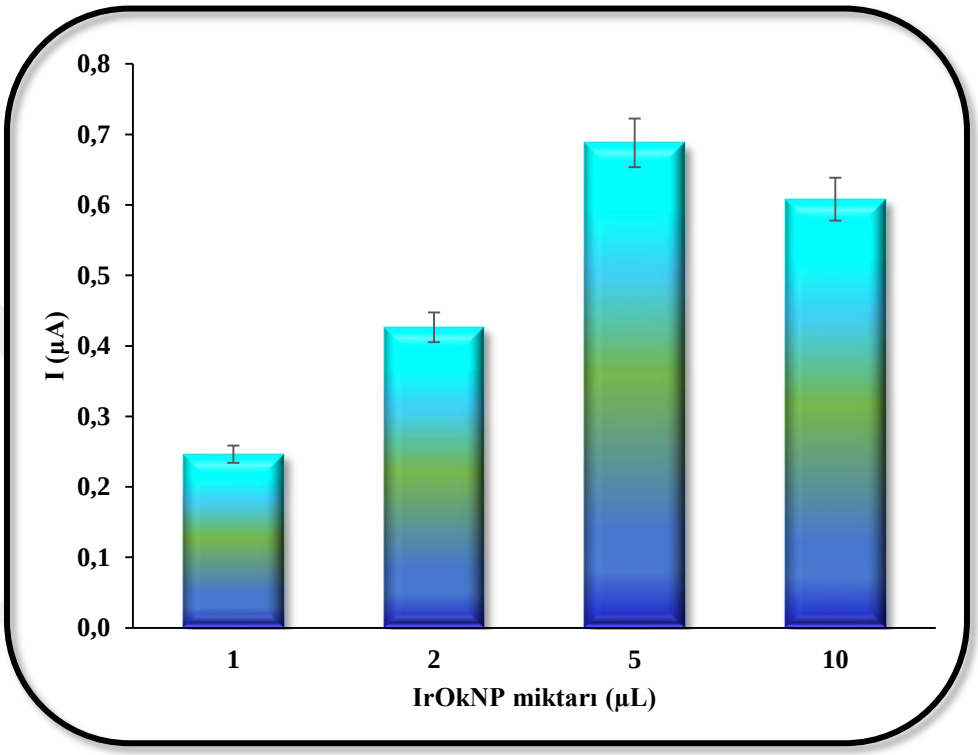
Tirozinaz ile hazırlanan biyosensörün Katekol cevabına etkisi incelenmiştir. En uygun şartın 15 adet dönüşümlü voltamogram ve 0,1 mg.mL^{-1} GO olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. (A) PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe grafen oksit yüzde miktarının (B) Döngü sayısının optimizasyonu.

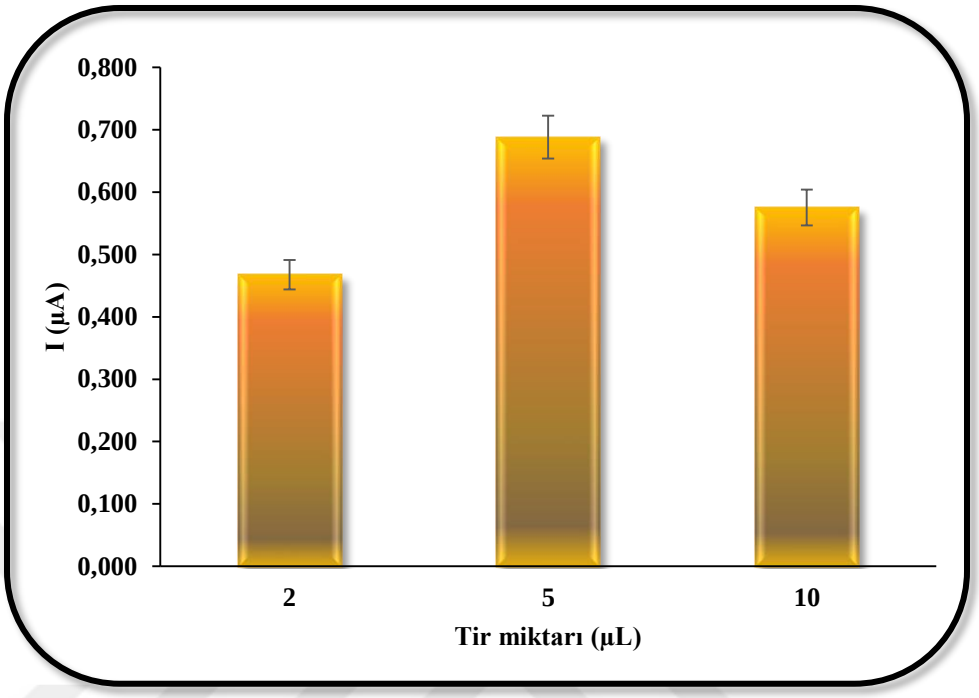
İridyum oksit miktarı optimize edilmiştir (Şekil 3.26). 5 µL iridyum oksit miktarı uygun olarak bulunmuştur. Tirozinaz enzimini immobilize etmek için amin gruplarının

bağlanması 1-etil-3[3-dimetilaminopropil]karbodiimid/N-Hidroksisüksünimid (EDC/ NHS) amid tipi çapraz bağlayıcı, çifti kullanılmıştır.



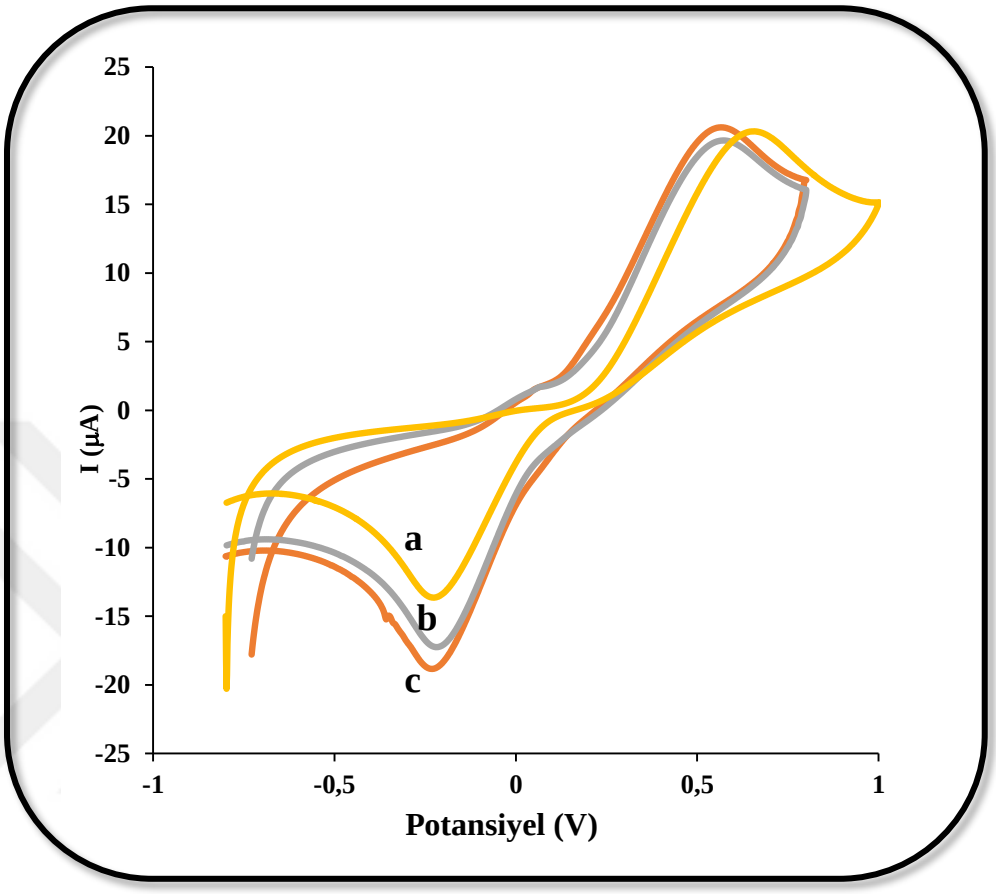
Şekil 3.26. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe IrOkNP miktarının optimizasyonu.

6 mM EDC, 10 mM NSH eklenerek, immobilizasyon sağlanması amacıyla 24 saat 4 °C de bekletilmiş, sonrasında ölçümler alınmıştır. Tir miktarı optimize edilmiş ve sonuçlar şekil 3.27'te paylaşılmıştır.



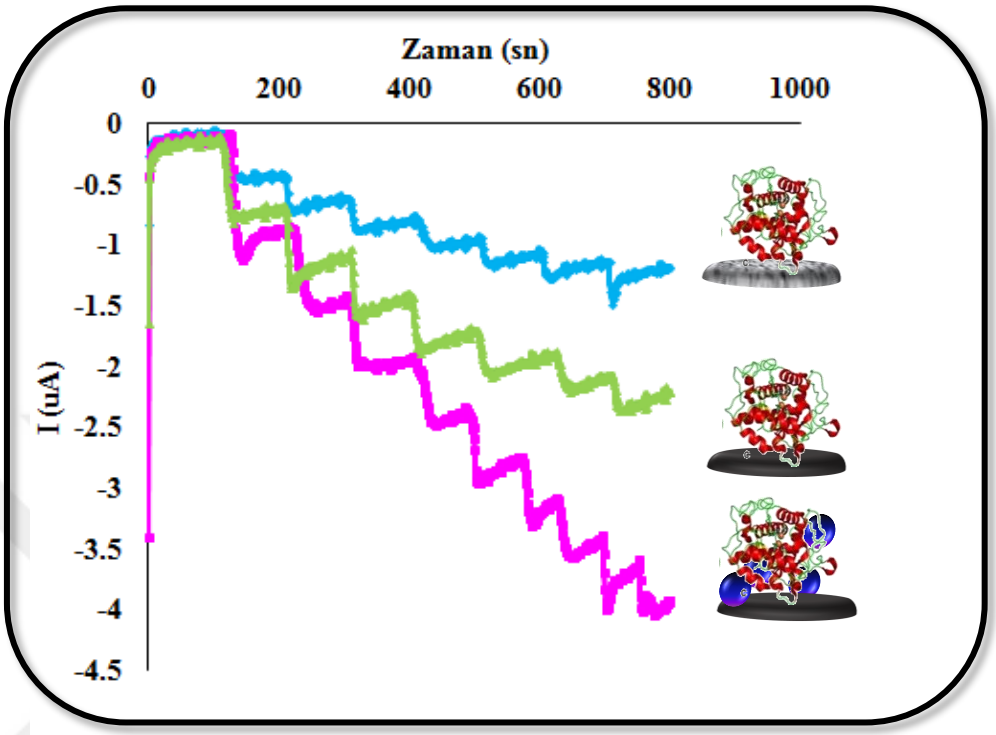
Şekil 3.27. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe Tirozinaz miktarının optimizasyonu.

İndirgenmiş grafen (iGO), iridyum oksit (IrOk) ve Tirozinaz (Tir) enzimi miktarları optimize edilmiş, en uygun şartlarda nanobiyosensör cevabı karakterize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır.



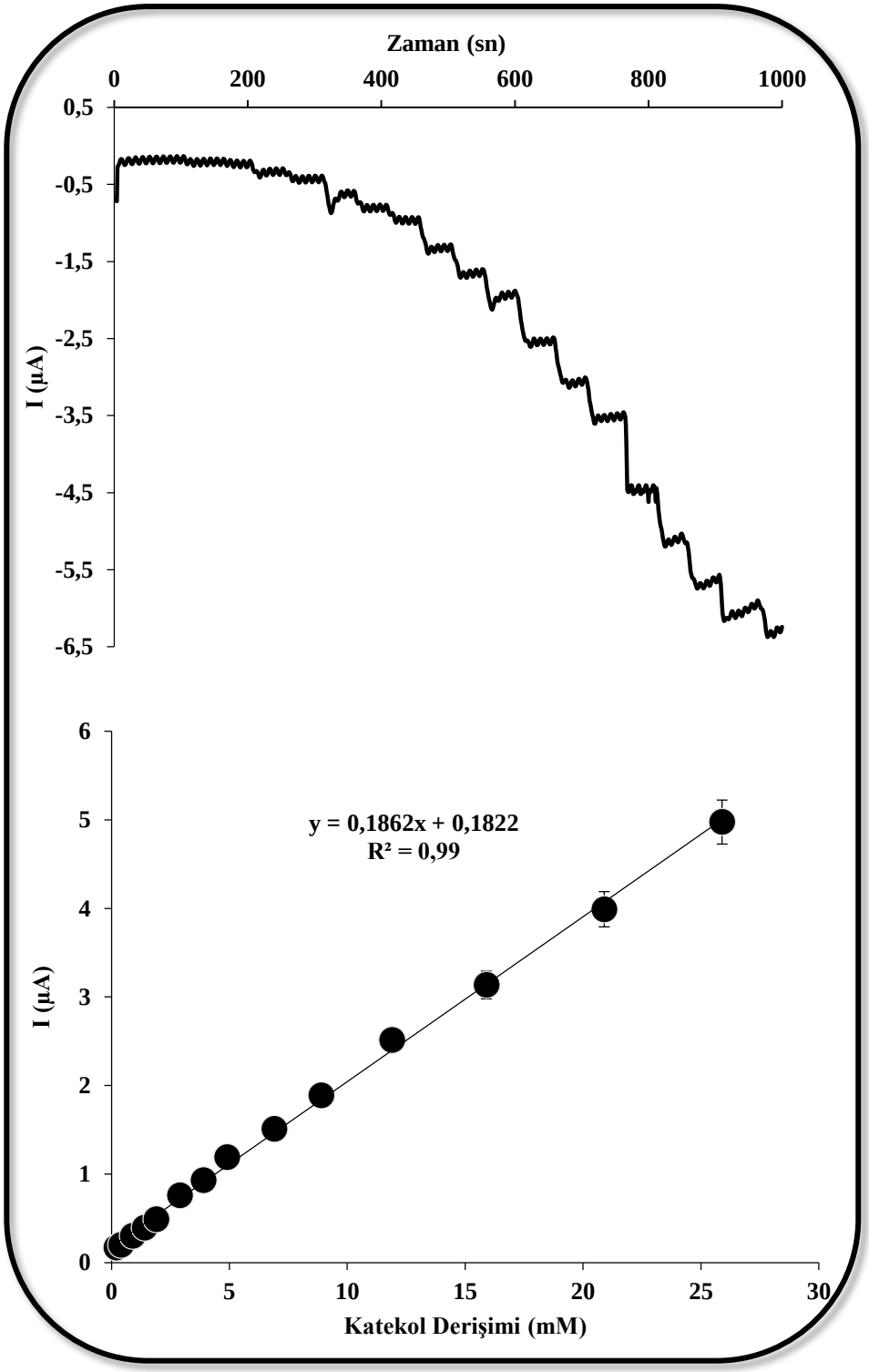
Şekil 3.28. 1mM Katekol'e ait dönüşümlü voltammogramlar (A) PBE, (B) PBE-EiGO-Tir (C) PBE-EiGO-Tir IrOkNP.

Nanopartikül etkisi ve rGO etkisi alınan CV ölçümleri ile desteklenmiştir (Şekil 3.28). Biyosensörün modifiye edilmesi ile Katekol cevabındaki bu artışlar, amperometrik olarak da takip edilmiştir (Şekil 3.29).

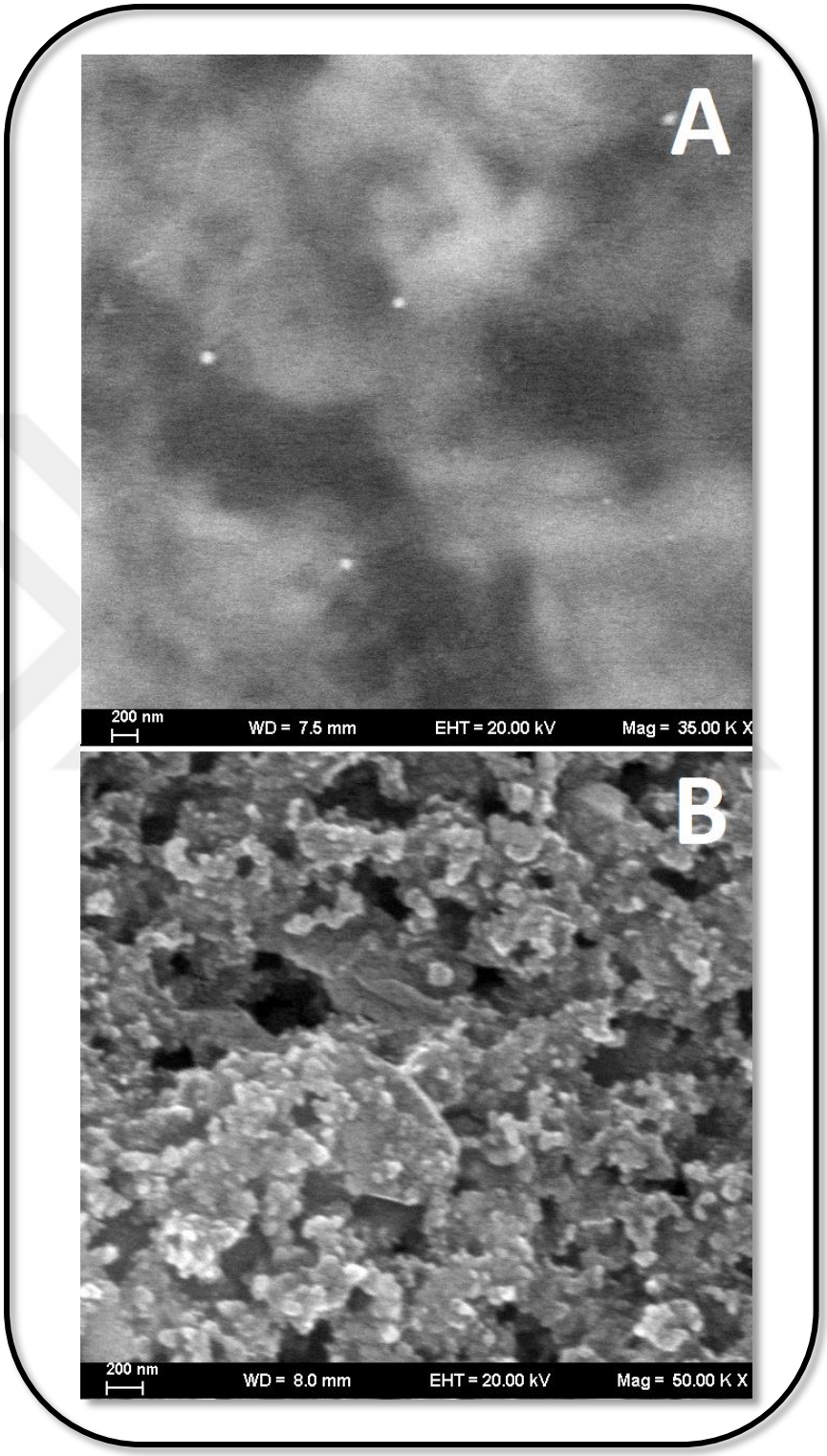


Şekil 3.29. Artan derişimlerde Katekol eklenmesi ile elde edilen amperomogramlar a)PBE-Tir b)PBE-EiGO-Tir c) PBE-EiGO- IrOkNP-Tir.

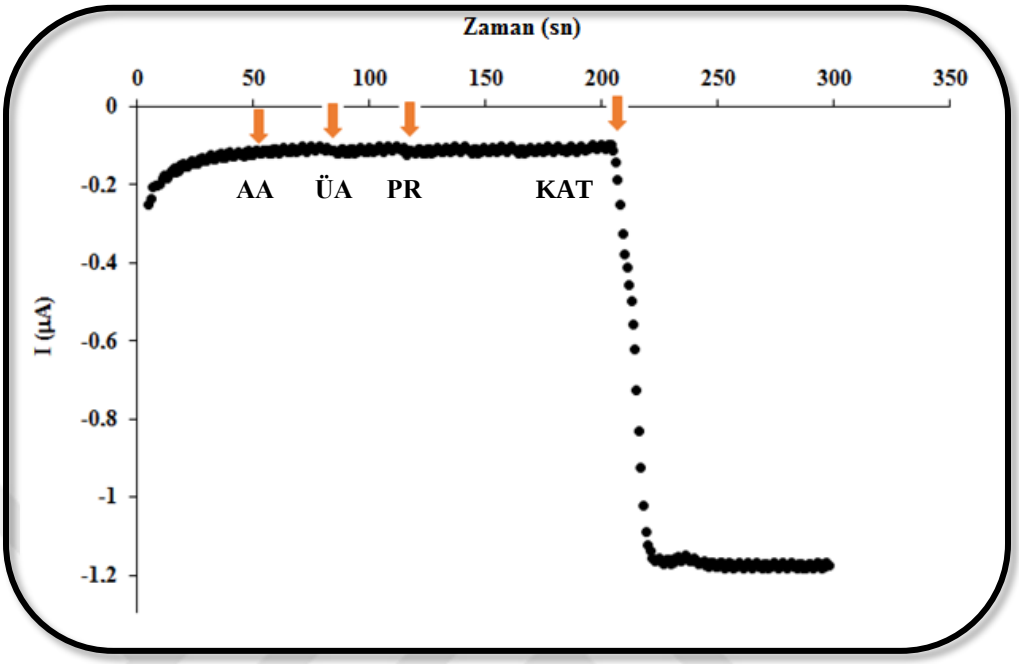
Optimize edilen koşullar altında tasarlanan biyosensör 0,2 µM Katekol ile 26 µM Katekol derişimi arasında doğrusal bir davranış sergilemiştir. Katekol eklenmesinde yaklaşık 25 sn sonra anlamlı bir biyokatalitik cevap alınmıştır. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırası ile 0,053 µM and 0,161 µM Katekol olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.30). Tasarlanan biyosensörün SEM görüntüleri alınarak yüzey morfolojileri incelenmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.30. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensörünün analitik karakterizasyonu.



Şekil 3.31. SEM görüntüleri (A) EiGO and IrOkNP (B), EiGO/IrOkNP NP/Tir 200 nm.

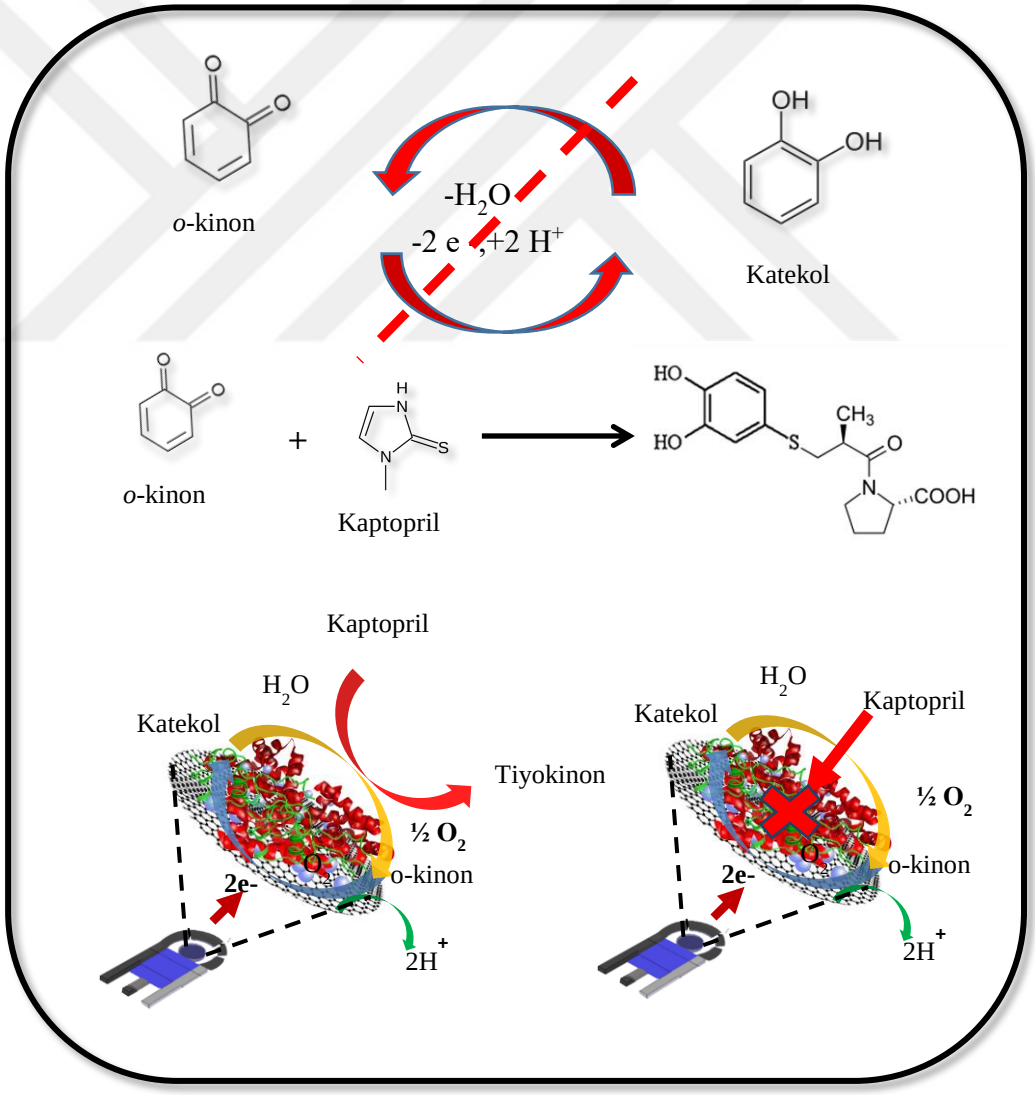


Şekil 3.32. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensörüne girişim etkisi.

PBE-EiGO-IrOkNP-Tir Biyosensörüne girişim çalışmalarında, 15 µM askorbik asit (AA), ürik asit (ÜA) ve parasetamol (PR) ilave edilip ardından 15 µM Katekol ilave edilmiştir. Potansiyel olarak girişim yapabilecek bu maddelerin Katekol cevabına herhangi bir etkisi görülmemiştir (Şekil 3.32).

3.2.2. Kaptopril tayini

Kaptopril, Tirozinaz mekanizmasını iki şekilde inhibe eder. Birincisi kinonlar ile birleşmesi, (substrata bağlanarak inhibisyon), ikincisi enzime bağlanması (tersinmez inhibisyon) (Şekil 3.33). Kaptopril substrata bağlanarak, enzimi inhibisyonunu sağlamaktadır. Kaptopril'in kinonlar ile birleşmesi, Katekol-o-kinon döngüsünü bozar ve biyosensör cevabında düşüş yani inhibisyon gerçekleşir (Şekil 3.33).



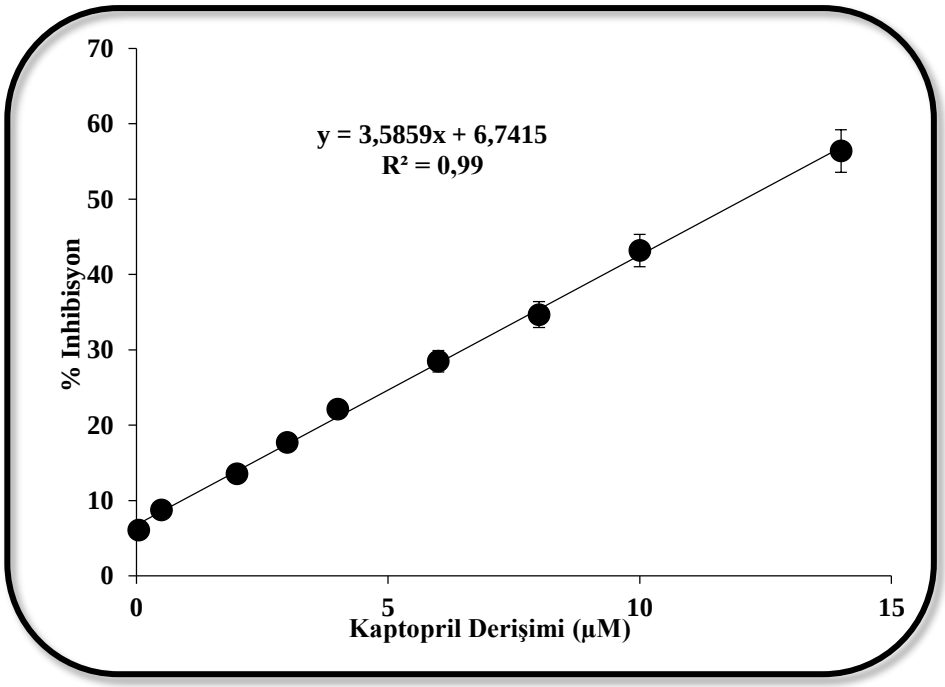
Şekil 3.33. Kaptopril'in tiyokinon oluşturarak inhibisyon mekanizması.

Bu şekilde Kaptopril'in Tirozinaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi vardır. Yüzde inhibisyon yine, aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir.

$$I(\%) = \left[\left(I_o - I_1 \right) / I_o \right] * 100 \qquad (1)$$

Bu denklemdeki I_o ilaç olmadan Katekol cevabının, I_1 ise ilaç varlığında, inhibisyon sonrası Katekol cevabı anlamına gelmektedir. Cevaplar akım cinsindendir. Bu denklem yardımı ile yüzde inhibiyon (% I) hesaplanmıştır.

Kaptopril'in tiyokinon oluşturarak Tirozinaz inhibisyonu ile tayininde, artan Kaptopril derişimlerinde 0,6 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,05 µM-14 µM Kaptopril derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). 0,0083 µM YS ve 0,0253 µM TAS değerleri elde edilmiştir. Günler arası tekrar edilebilirlik ve gün içi tekrar edilebilirlikler için %10'dan düşük %BSS değerleri elde edilmiştir (Şekil 3.34, Çizelge 3.8).

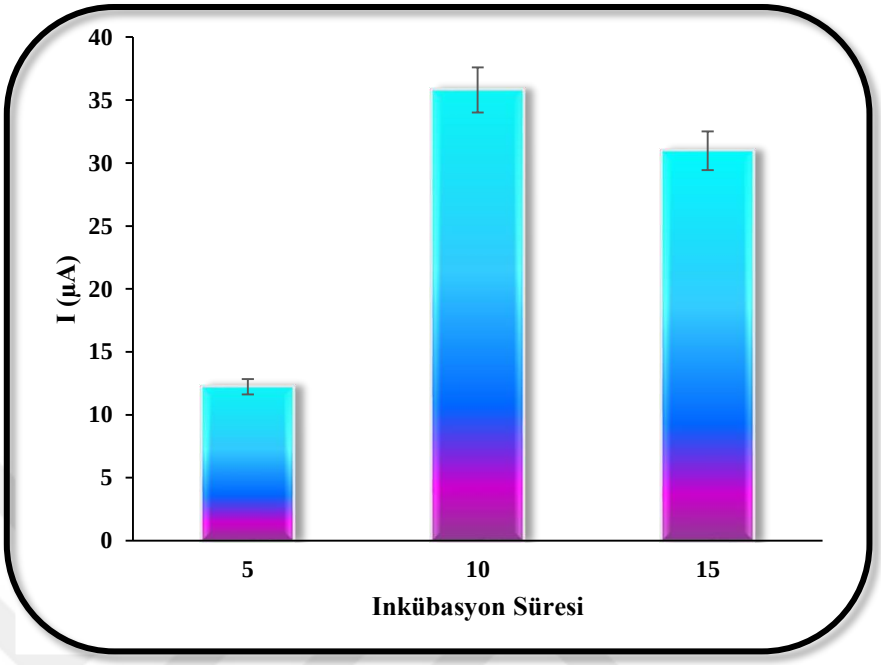


Şekil 3.34. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tiyokinon oluşturarak inhibisyonda Kaptoril tayinine ait kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.8. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tiyokinon oluşturarak inhibisyon ile Kaptopril tayinine ait validasyon sonuçları.

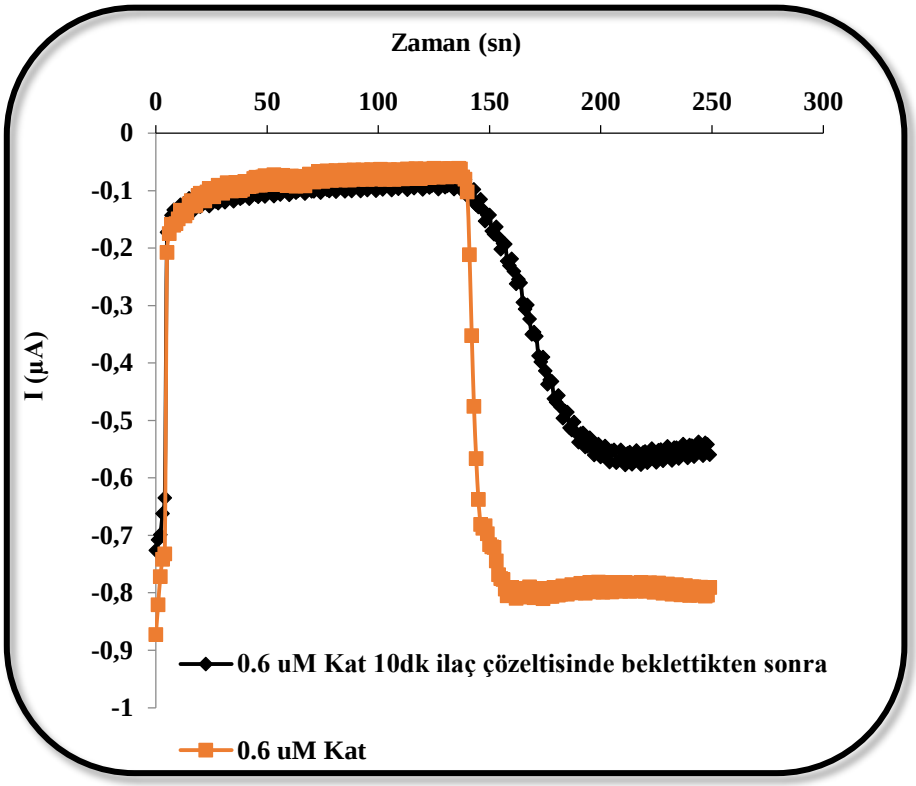
Doğrusal aralık (µM)	0,05-14
Eğim (µA.M^{-1})	3,59
Kesişim (µA)	6,74
Korelasyon katsayısı	0,99
Yakalama sınırı (µM)	0,008
Tayin alt sınırı (µM)	0,025
Gün içi tekrarlanabilirlik (%BSS)	2,73
Günler arası tekrarlanabilirlik (%BSS)	3,89

İkinci tip inhibisyonda Kaptopril doğrudan enzimin içinde bulunan bakır ile şelat oluşturarak, enzime bağlanarak, enzimde konformasyonel bir değişiklik meydana getirir. Geri dönüşümsüz olan bu inhibisyonda, biyosensör tek sefer kullanılabilir ve inhibisyonun olması için inkübasyon süresi gereklidir. Geliştirilen biyosensör 5 µM Kaptopril çözeltisinde 5, 10 ve 15 dakikalık farklı inkübasyon sürelerinde bekletilmiştir. Daha sonra 0,6 µM Katekol cevabı izlenmiştir.



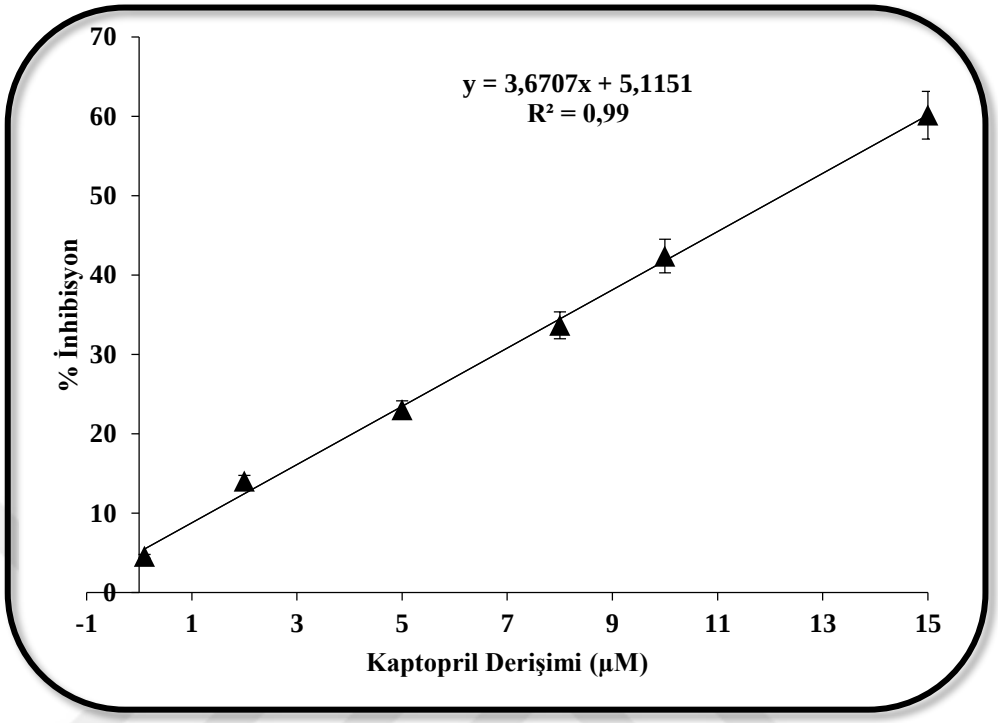
Şekil 3.35. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon inkübasyon süresi optimizasyonu.

10 dk inkübasyon süresi uygun bulunmuş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır (Şekil 3.35). Hazırlanan biyosensör 10 dk ilaç çözeltisinde bekletilmiştir ve % 30 inhibisyon gözlenmiştir (Şekil 3.36).



Şekil 3.36. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe 0,6 µM Katekol ile tersinmez inhibisyonun amperometrik takibi.

Optimize edilen inhibisyon koşullarında, artan Kaptopril derişimlerinde 0,6 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,1 µM-15µM Kaptopril derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). YS ve TAS değerleri sırası ile 0,019 ve 0,059 µM olarak hesaplanmıştır. Günler arası tekrar edilebilirlik ve gün içi tekrar edilebilirlikler için %10 dan düşük %BSS değerleri elde edilmiştir (Şekil 3.37, çizelge 3.9).



Şekil 3.37. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon ile Kaptopril tayininin analitik karakterizasyonu.

Kaptopril tayininin Tirozinaz inhibisyonu ile takibi için geliştirilen biyosensör iki inhibisyon yöntemi ile karakterize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır (Çizelge 3.9). Bu yöntemlerin gerçek örneklere uygulanabilirliğini göstermek amaçlı, Kaptopril içeren farmasötik dozaj formlardan Kaptopril tayini yapılmıştır. İnsan kanına ilave etme yöntemi ile Kaptopril içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile yapılmış çizelge 3.10'da ayrıntılı olarak paylaşılmıştır.

Çizelge 3.9. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon ile Katekol tayinine ait validasyon sonuçları.

Doğrusal aralık (µM)	0,1-15
Eğim (µA.M^{-1})	3,67
Kesişim (µA)	5,12
Korelasyon katsayısı	0,99
Yakalama sınırı (µM)	0,019
Tayin alt sınırı (µM)	0,059
Gün içi tekrarlanabilirlik (%BSS)	6,72
Günler arası tekrarlanabilirlik (%BSS)	7,93

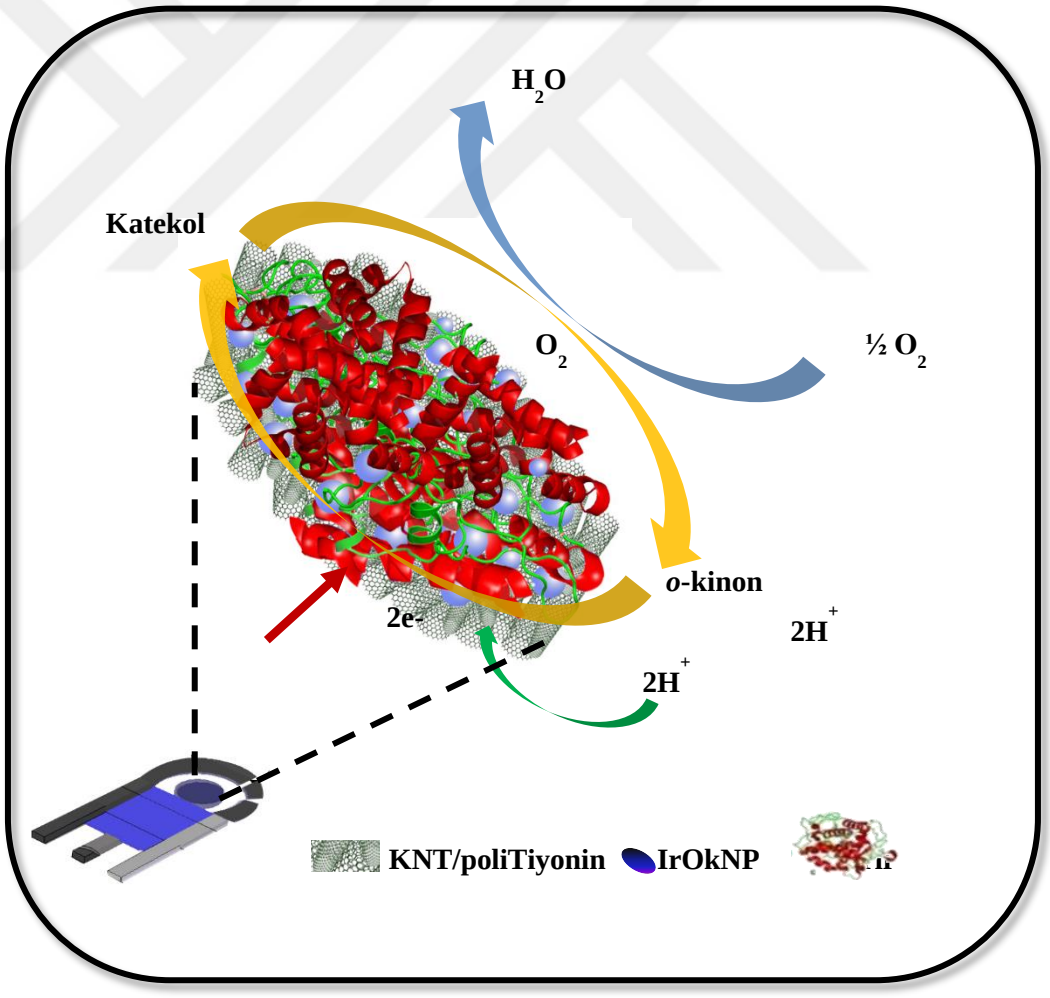
Çizelge 3.10. PBE-EiGO-IrOkNP-Tir biyosensörü ile gerçek numunelerde Kaptopril tayini.

	Tiyokinon oluşumu		Bakır ile şelat oluşumu	
	Kaptopril®	İnsan serumu	Kaptopril®	İnsan serumu
Etiket miktarı (mg)	25,00	-	25,00	-
Bulunan miktar (mg)	24,85	-	25,10	-
% BSS	6,94	-	9,77	-
% BH	0,58	-	-0,40	-
İlave edilen miktar (mg)	2,00	10,00	2,00	10,00
Bulunan miktar (mg)	2,03	10,19	2,04	10,76
Geri kazanım (%)	101,46	101,85	102,11	107,63
BSS (%)	7,35	5,56	5,87	7,30
BH (%)	-1,46	-1,85	-2,11	-7,63

3.3. Sildenafil tayinine yönelik çalışmalar

3.3.1. Katekol Tayini

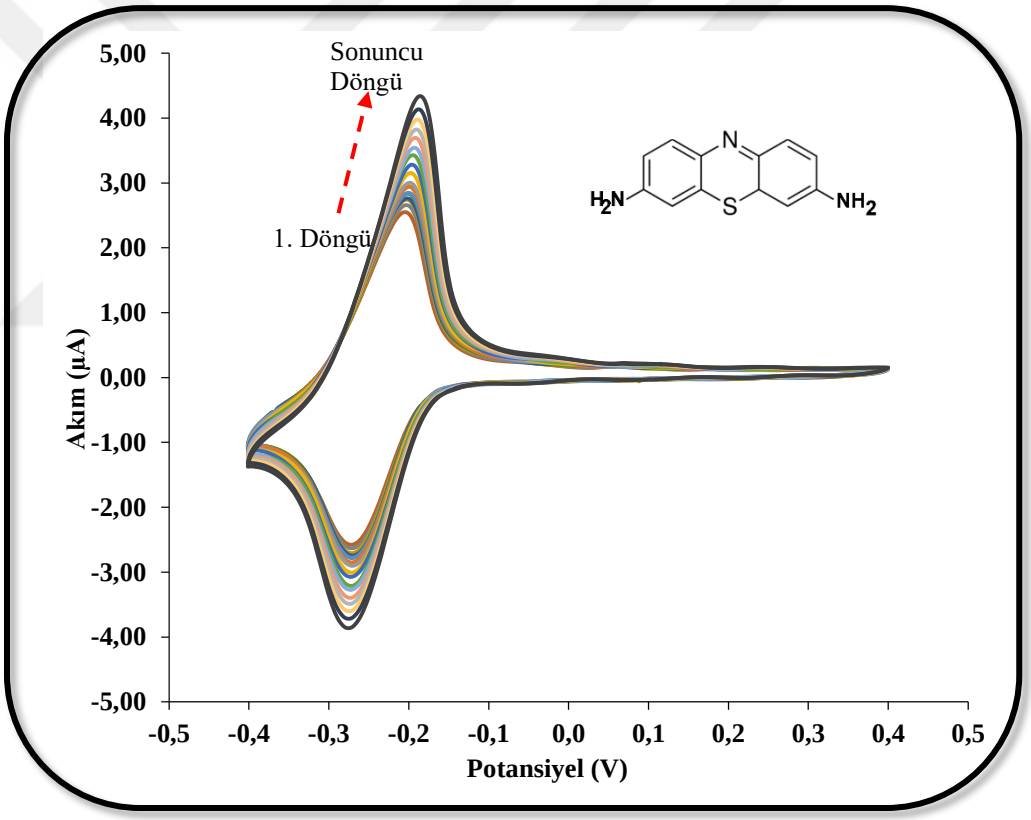
Bu kısımda Sildenafil etken maddesinin Tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini incelemek üzere yeni bir biyosensör geliştirilmiştir. Karbon nanotüpler üzerine tiyonin polimeri biriktirilmiş ve iridyum nanopartikül ile kompozit bir biyosensör oluşturulmuştur (Şekil 3.38).



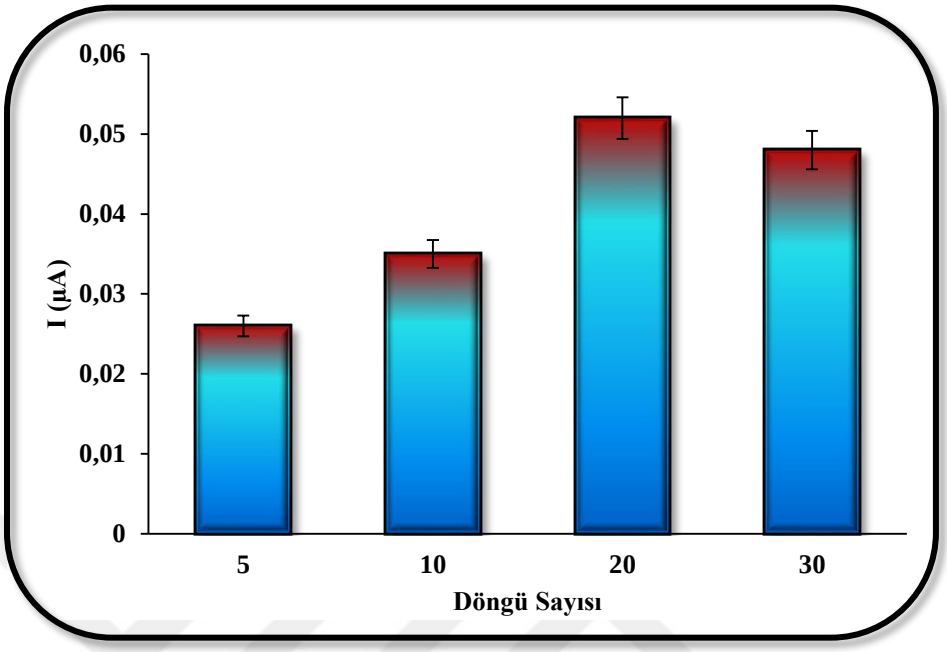
Şekil 3.38. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensörünün şematik gösterimi

20 döngüde elde edilen -NH_2 grupları olan tiyonin polimeri ile % 0,25, 5 µL gluteraldehit çapraz bağlayıcı ajanı ve 2 µL ÇDKNT ortamında Tirozinaz enzimi kovalent bağlanarak güçlü bir şekilde immobilize edilmiştir. Karbon nanotüp miktarı sabit tutularak, polimer kalınlığı, iridyum oksit nanopartikül miktarı, Tirozinaz enzimi miktarı optimize edilmiştir.

0,5 mM tiyonin polimeri 0,1 M fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış ve 50 mV/s tarama hızında, -0,4 V ile 0,4 V arasında farklı sayıda döngü alınmıştır (Şekil 3.39).



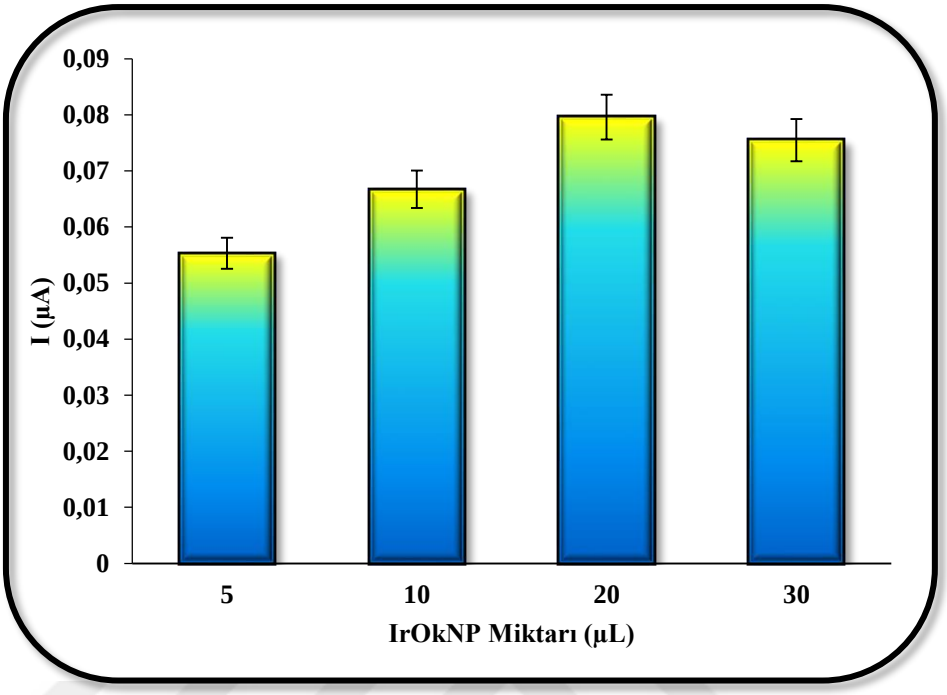
Şekil 3.39. Tiyonin monomerinin polimerleşmesi.



Şekil 3.40. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe döngü sayısı optimizasyonu.

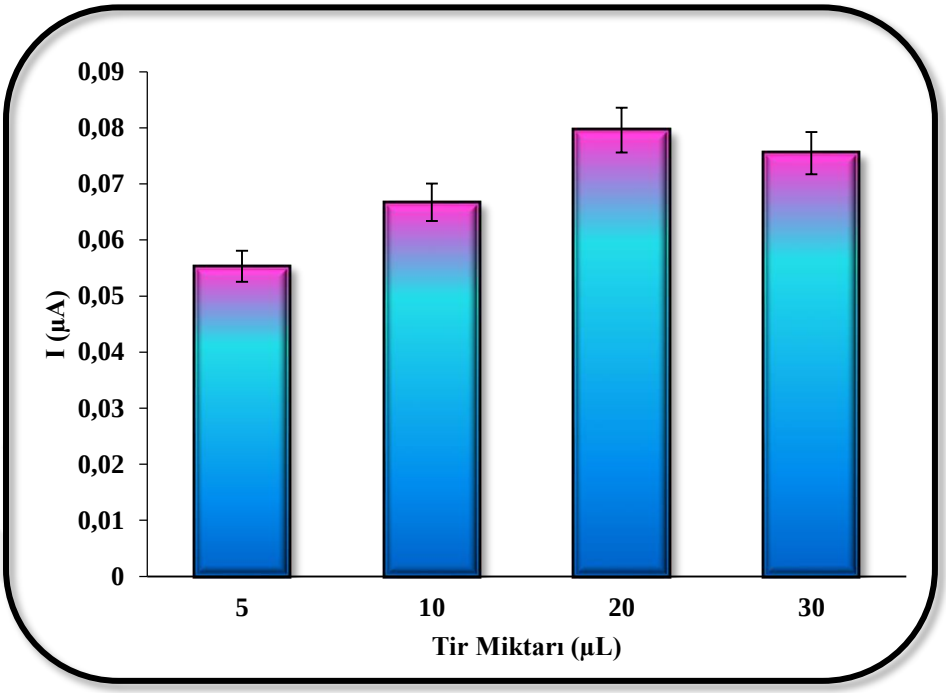
20 döngü ile elde edilen tiyonin polimeri ile biyosensör oluşturulduğu zaman en yüksek cevap elde edilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu miktar kullanılmıştır (Şekil 3.40).

Karbon nanotüp üzerine biriktirilen tiyonin polimerine iridyum oksit nanopartiküller eklendiğinde Katekol'e karşı biyosensör cevabının daha da arttığı görülmüştür (Şekil 3.41).



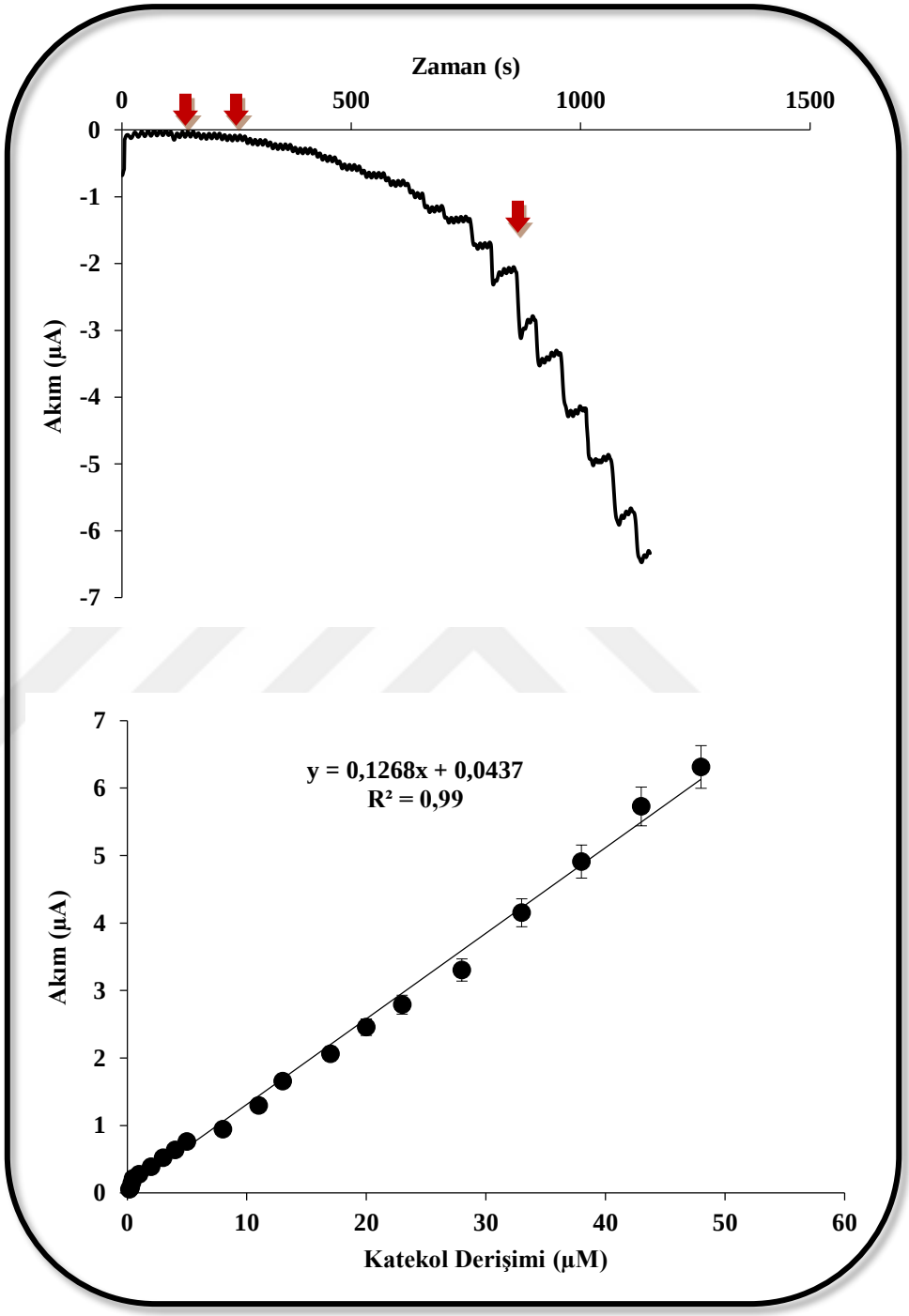
Şekil 3.41. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe IrOkNP miktarı optimizasyonu.

Farklı miktarlarda enzim immobilize edildiğinde biyosensör cevabında değişiklikler görülmüştür. Bu immobilize edilebilecek maksimum enzim miktarının sağlandığının bir göstergesidir. 20 µL enzim immobilize edildiği zaman maksimum biyosensör cevabı gözlenmiştir (Şekil 3.42).

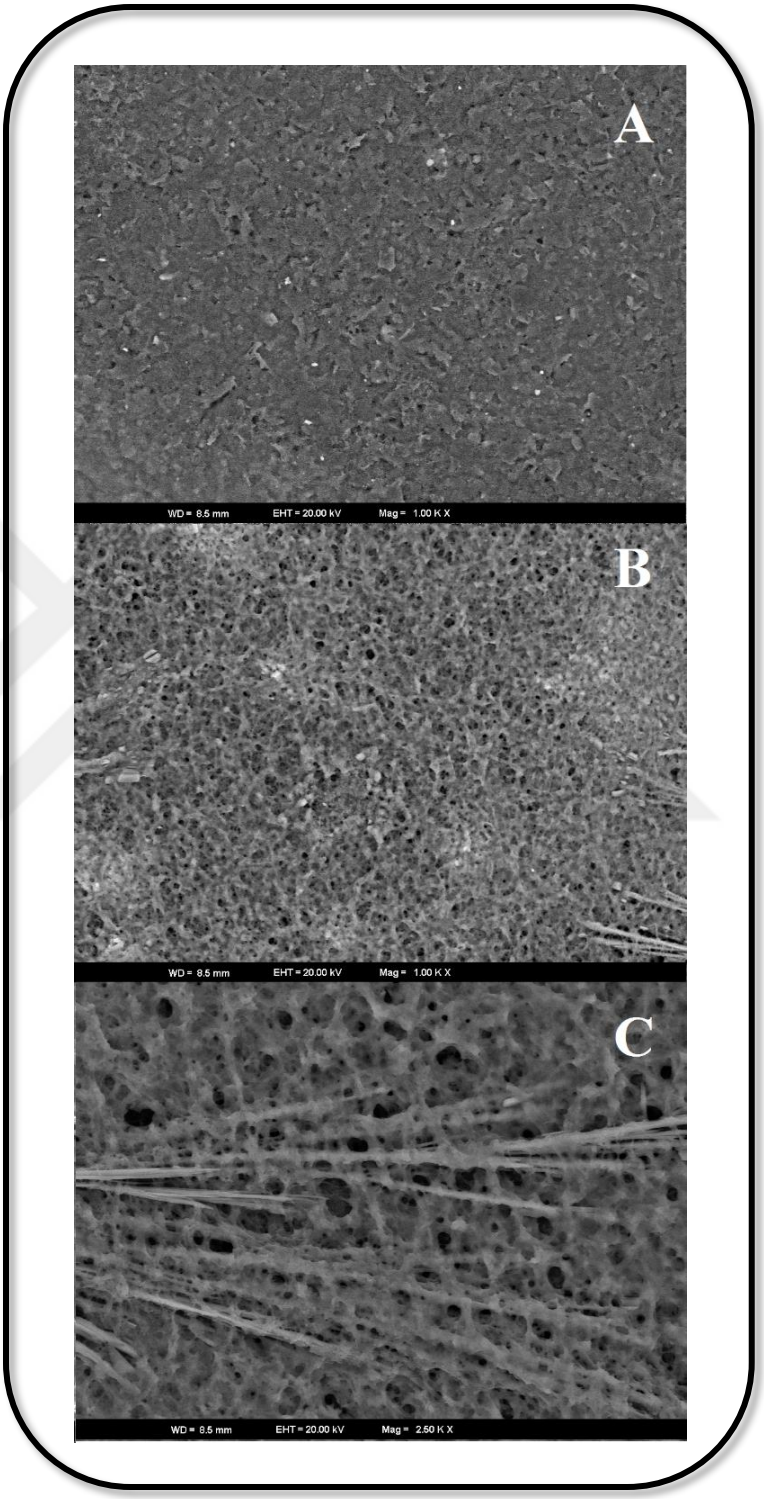


Şekil 3.42. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe enzim miktarı optimizasyonu.

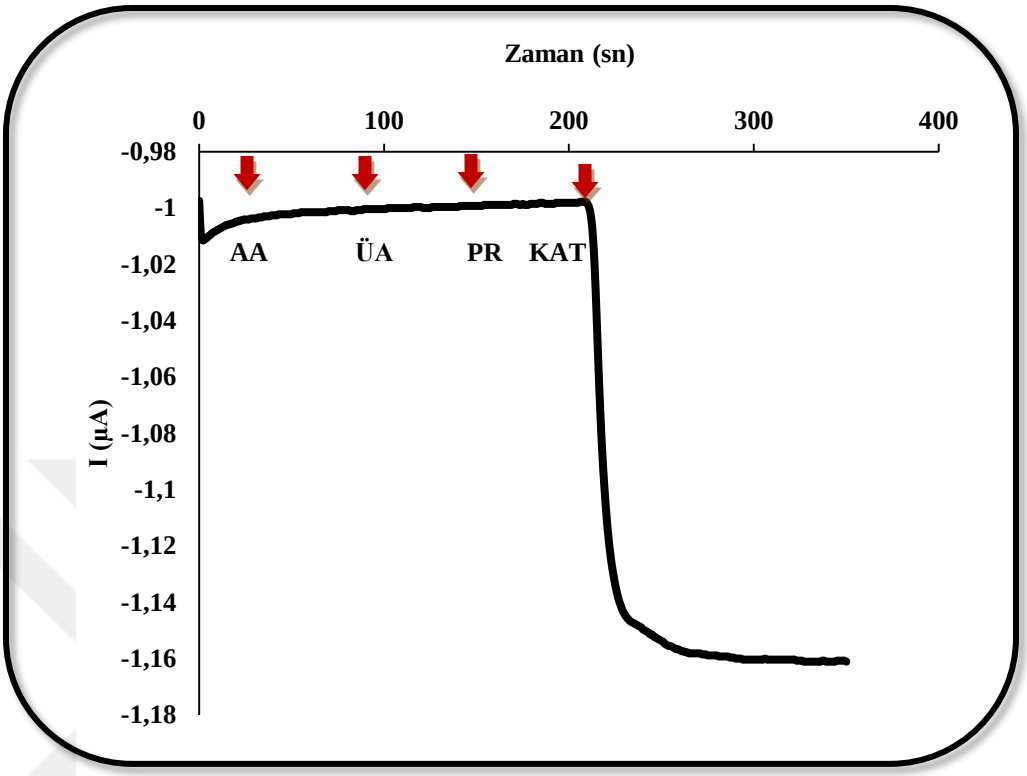
Tasarlanan nanobiyosensör cevabı, Katekol cevabına yönelik en uygun şartlarda karakterize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. 0,2-48 µM aralığında Katekol tayini yapılmış, yakalama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırası ile 0,08 µM ve 0,2 µM olarak bulunmuştur. Kronoamperometrik cevapları ve kalibrasyon grafiği şekil 3.43'de görülmektedir. Tasarlanan biyosensörün SEM görüntüleri alınarak yüzey morfolojileri incelenmiştir (Şekil 3.44).



Şekil 3.43. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensörünün analitik karakterizasyonu.



Şekil 3.44. SEM görüntüleri (A) KNT/IrOkNP (B) KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir 200 nm (C) KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir 2,5 Kat büyütülmüş.

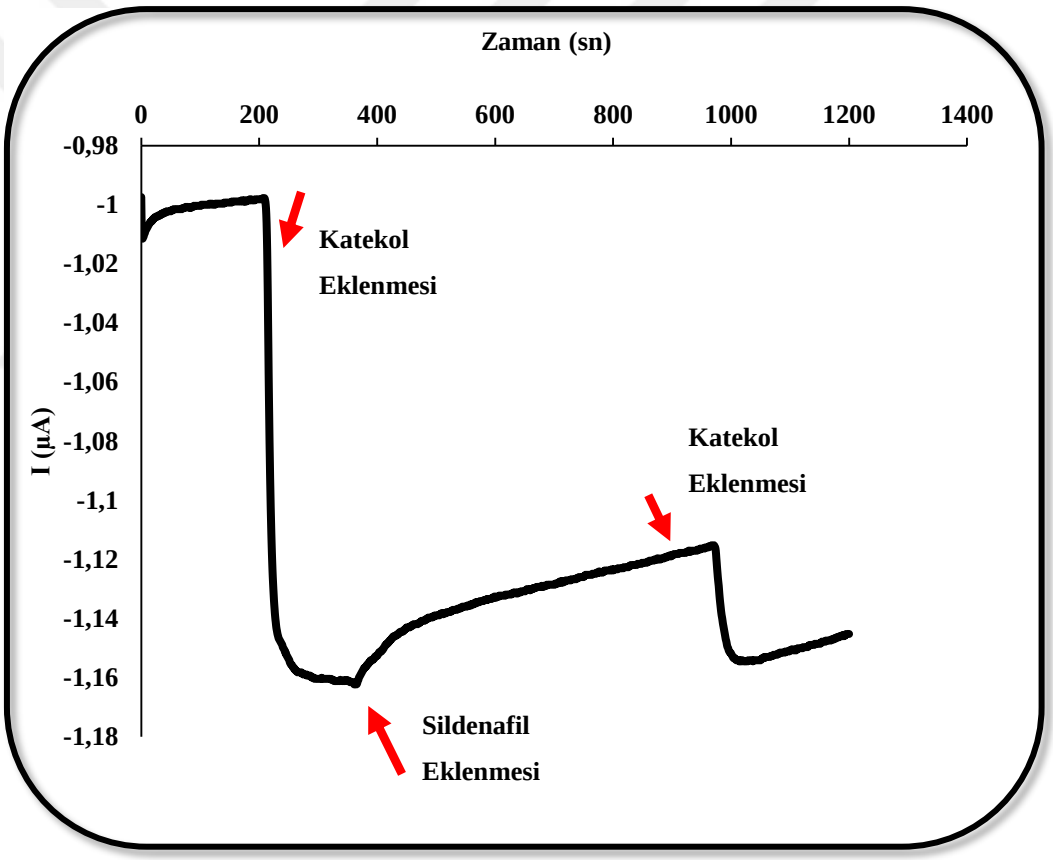


Şekil 3.45. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensörüne girişim etkisi.

PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir Biyosensörüne girişim çalışmalarında, 5 µM askorbik asit, ürik asit ve parasetamol ilave edilip ardından 5 µM Katekol ilave edilmiştir. Potansiyel olarak girişim yapabilecek bu maddelerin Katekol cevabına herhangi bir etkisi görülmemiştir (Şekil 3.45).

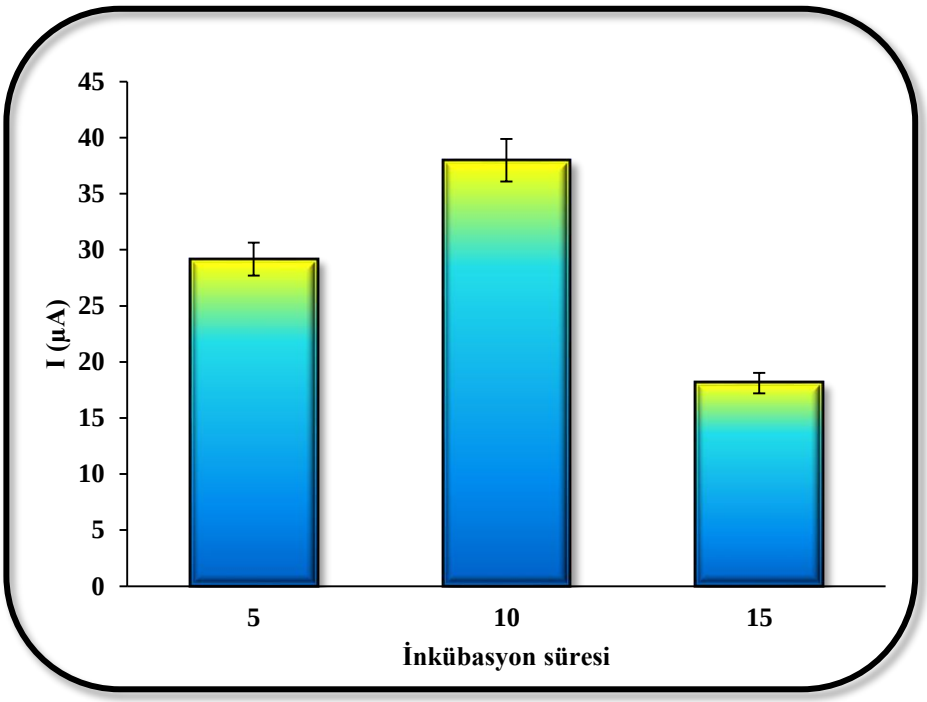
3.3.2. Sildenafil Tayini

Sildenafil ve analoglarının, Tirozinaz enzimi üzerine tersinmez etkisinin olduğu literatürde yer almaktadır. Öncelikle geliştirilen biyosensöre Sildenafil etkisini incelemek amaçlı, Katekol ilave edilen sisteme, Sildenafil eklenmiş ve inkübasyon gerçekleşmesi için beklenmiştir. Ardından tekrar eklenen Katekol cevabındaki düşüş inhibisyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 3.46).



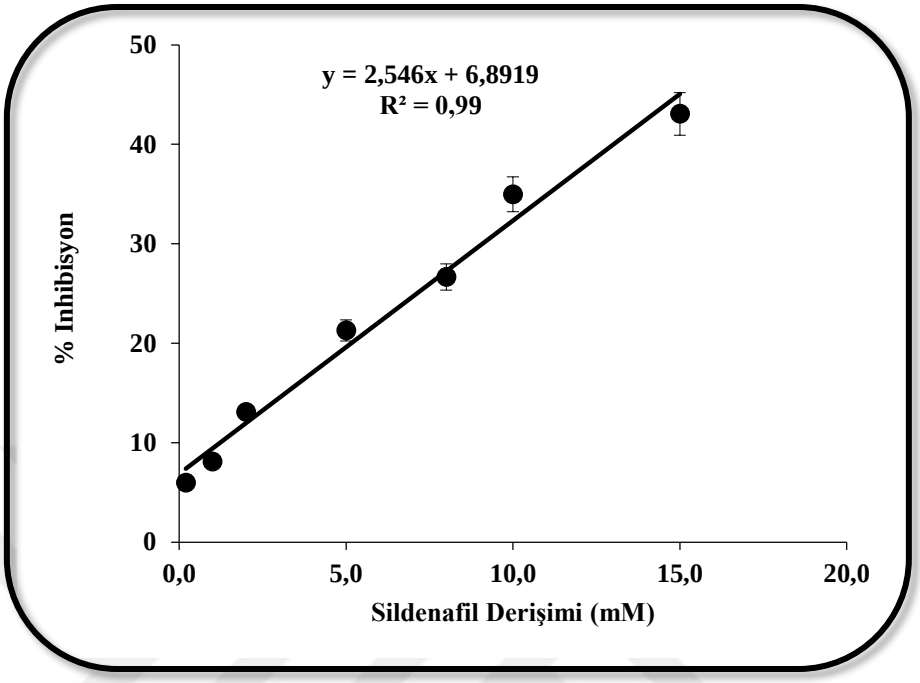
Şekil 3.46. Sildenafil'in KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensör cevabına etkisi.

Katekol cevabı alındıktan sonra biyosensör Sildenafil çözeltisinde farklı sürelerde bekletilmiş ve uygun biyosensör cevabı 10 dk inhibisyon süresi ile elde edilmiştir (Şekil 3.47).



Şekil 3.47. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon için inkibüsyon süresi optimizasyonu.

Geliştirilen biyosensörün farklı derişimde Sildenafil çözeltilerinde bekletilmesi ile inhibisyonu üzerinden Sildenafil tayini yapılmıştır. 0,2 µM ile 15 µM Sildenafil derişimi aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Yakalama ve tayin alt sınırı sırası ile 0,004 µM ve 0,012 µM olarak bulunmuştur (Şekil 3.47).



Şekil 3.48. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensöründe tersinmez inhibisyon ile Sildenafil tayininin kalibrasyon grafiği.

Geliştirilen biyosensör ile Sildenafil ilacının insan serumuna ve farmasötik dozaj formlara uygulama deneyleri yapılmıştır (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. PBE/KNT/poliTiyonin/IrOkNP/Tir biyosensörü ile gerçek numunelerde Sildenafil tayini.

	Bakır ile şelat oluşumu ile inhibisyon	
	Viagra®	İnsan serumu
Etiket miktarı (mg)	25,00	-
Bulunan miktar (mg)	24,73	-
BSS (%)	6,23	-
BH (%)	1,11	-
İlave edilen miktar (mg)	5,00	5,00
Bulunan miktar (mg)	4,93	5,12
Geri kazanım (%)	98,64	102,34
BSS (%)	8,05	7,76
BH (%)	1,36	-2,34

4. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında enzim bazlı elektrokimyasal biyosensörler geliştirilip, çeşitli ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Tirozinaz enzimi kullanılmış ve Tirozinaz enziminin substratı olan Katekol cevabına karşı geliştirilen biyosensörler karakterize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra, Tirozinaz enzimini inhibe eden, Metimazol, Kaptopril ve Sildenafil ilaç etken maddelerinin inhibisyon etkileri geliştirilen, Tirozinaz bazlı elektrokimyasal biyosensörler üzerinde incelenmiştir. Taşıyıcı olarak kullanılan perde baskılı elektrotların yüzeyleri, duyarlılığı arttırmak için, grafen, karbon nanotüp, tiyonin iletken polimeri, iridyum oksit nanopartikül gibi malzelerle modifiye edilmiştir. Geliştirilen elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak Tirozinaz inhibisyonu yöntemi ile Metimazol, Kaptopril ve Sildenafil sitrat etken maddelerinin farmasötik dozaj formlarından ve insan serumundan analizleri başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir.

Giriş bölümünde biyosensörlerden ve biyosensörlerin bileşenleri olan biyokomponentlerden ve çeviriciden bahsedilmiştir. Biyokomponent olarak enzim kullanılmasından dolayı, enzimlerin; sınıflandırılması, kinetiği ve inhibisyonu ayrıntılı olarak incelenmiştir. Geliştirilen biyosensörlerin çevirici kısmının elektrokimyasal olmasından dolayı elektrokimyasal yöntemler kısaca tanımlanıp, bu tezde kullanılan amperometrik elektrokimyasal biyosensörler ayrıntılı olarak incelenmiştir. Takip eden kısımlarda modifiye biyosensörler incelenmiş, iletken polimerler, grafen, karbon nanotüp, iridyum oksit nanopartikül gibi modifiye biyosensör hazırlamak kullanılan malzemelerden bahsedilip, gereç ve yöntem kısmına geçilmiştir. Enzim bazlı elektrokimyasal biyosensörlerin hazırlanışı ayrıntılı bir şekilde gereç ve yöntem kısmında anlatılmış, sonuçlar tezin son bölümü olan bulgular kısmında paylaşılmıştır.

Bütün çalışmalarda poliester bir alt tabaka üzerine, tek tek ve tabaka tabaka, grafit, Ag/AgCl ve yalıtkan mürekkebin maske yardımı ile şekillendirilmesi sonucu oluşturulan perde baskılı elektrolar kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan mikroçipler, elastik poli(dimetilsiloksan) kullanılarak hazırlanmıştır.

İmmobilizasyon yöntemlerinden Gluteraldehit ile çapraz bağlama, bağlanması 1-etil-3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid /N-Hidroksisüksünimid (EDC/NHS) amid tipi çapraz bağlayıcı, ve manyetik nanopartiküller ile immobilize etme yöntemleri başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Tez kapsamında analiz edilen ilaçlar için, modifiye elektrotlar hazırlandıktan sonra enzimin reaksiyon akımını ne kadar değiştiğine dönüşümlü voltametri yöntemi ile karar verilmiş, bu potansiyelde amperometrik ölçümler yapılmıştır. Amperometri için çözeltinin karışması, sabit potansiyelde çalışılması gereklidir ve bunlar sağlanmıştır. Tirozinaz enzimi 200 mV civarı Katekol'e karşı cevap vermektedir. 300 rpm sabit karışma hızı ile amperometrik ölçümler alınmıştır.

Tasarlanan üç biyosensörde de iridyum oksit nanopartiküller kullanılmıştır. İridyum oksit nanopartiküllerinin kullanımını göstermek amaçlı tasarlanan biyosensörlerin Katekol cevaplarını arttırdığı görülmüştür. İridyum oksit nanopartiküller ile yapılan önceki çalışmalarımızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Metimazol tayini için geliştirilen biyosensör öncelikle Katekol tayini üzerine optimize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Biyosensörün performans karakterizasyonun için 3 farklı yöntem ile hazırlanan biyosensörlere devamlı olarak Katekol ilave edilerek kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Bu biyosensörlerden en iyisi olarak IrOkNP, Tirozinaz ile 12 saat karıştırılıp, MNP eklenip 12 saat tekrar karıştırılması ile hazırlanan biyosensör seçilmiştir. Modifikasyon stratejisi seçildikten sonra, ölçüme etki eden, uygulanan potansiyel, iridyum oksit miktarı ve Tirozinaz miktarı gibi

parametreler optimize edilmiştir. 50 µL MNP için, 250 µL IrOkNP, 19,61 U Tirozinaz varlığında maksimum Katekol cevabı elde edilmiştir. 23,5 µM ile 433,50 µM Katekol derişimi aralığında doğrusal bir çalışma aralığı belirlenmiştir. Katekol biyosensörü için yakalama sınırı 0,043 µM ve tayin alt sınırı 0,13 µM olarak hesaplanmıştır. Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneyleri %BSS olarak hesaplanmıştır.

Metimazol, Tirozinaz enzimin çalışma mekanizmasını iki şekilde inhibe eder. Birincisi kinonlar ile birleşmesi, tiyokinon oluşturarak inhibisyon, ikincisi enzimde bulunan bakır ile şelat oluşturması, tersinmez inhibisyondur. 5 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,125 -50 µM Metimazol derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırası ile 0,041 ve 0,125 µM olarak hesaplanmıştır.

Tirozinaz'ın ikinci tip inhibisyonu, Metimazol'ün Tirozinaz'da bulunan bakırlar ile şelat oluşturması ile olmaktadır. Optimize edilen inhibisyon koşullarında, 5 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,1 -10 µM Metimazol derşimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). YS ve TAS değerleri sırası ile 0,006 ve 0,017 µM olarak hesaplanmıştır. Günler arası tekrar edilebilirlik ve gün içi tekrar edilebilirlikler için %10'dan düşük %BSS değerleri elde edilmiştir.

Geliştirilen biyosensör ile Metimazol ilişkisini daha duyarlı ve daha hızlı incelemek amaçlı polimerik mikroçip tasarlanmıştır. Poli(dimetilsiloksan) tabanlı mikroçip perde baskılı elektrot ile kombine edilmiş, elektrodun altına mıknatıs yerleştirilmiştir. Mıknatıs sayesinde elektrot yüzeyinde, iridyum oksit ve manyetik nanopartiküller ile immobilize edilmiş nanokompozit tutturulabilmektedir. Optimize edilmiş olan enzim, iridyum oksit ve manyetik nanopartikül miktarları ile hazırlanan immobilizasyon matrisi, mikroçip içine yerleştirilmiştir.

Biyosensörlerin hızlı cevap verme, az numune ile analiz yapma özelliklerinden faydalanmak amaçlı, mikroçip kullanarak, Metimazol tayini hedeflenmiştir. Geliştirilen mikroçip ile 350 sn de üç anlamlı biyosensör cevabı alınmaktadır. 0,01 µM ve 10 µM Katekol derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir (r=0,99). YS ve TAS değerleri 0,003 ve 0,009 µM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen mikroçipte Metimazol ile Tirozinaz inhibisyonu çalışmalarında ilk inhibisyon metodu olan tiyokinon oluşumu ile inhibisyonda 5 µM Katekol enjeksiyonu yapılmıştır. 0,01-0,5 µM Metimazol derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırası ile 0,003 ve 0,010 µM olarak hesaplanmıştır.

Mikroçipler ile tersinmez inhibisyon çalışmaları inkübasyon süresi gerektirdiği için, inkübasyon yapılmak üzere ön çip hazırlanmış iki çip birbirine entegre edilmiştir. Manyetik nanopartiküller ile hazırlanan biyosensör sayesinde, Tiyokinon oluşarak inhibisyon yöntemi ile Metimazol tayini yapılırken, tersinmez inhibisyon inkübasyon gerektirdiğinden ve tek nokta için tek biyosensör tasarlanması ve mikroçip hazırlanması gerekliliğinden ötürü, biyosensörlerin hızlı hazırlanma, hızlı cevap verme teorisine ters düştüğünden bu inhibisyon yöntemi ile Metimazol tayini mikroçip ile çalışılamamıştır.

Geliştirilen biyosensörlerin gerçek örneklere uygulanabilirliğini göstermek amaçıyla, Metimazol içeren farmasötik dozaj formalardan Metimazol tayini yapılmıştır. İnsan kanına ilave etme yöntemi ile Metimazol içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile de yapılmıştır.

Kaptopril tayinine yönelik, indirgenmiş grafen oksit ve iridyum oksit nanopartikülleri nanosensör oluşturmak üzere, Tirozinaz enzimi ise nanobiyosensör oluşturmak üzere kullanılmıştır. İndirgenmiş grafen oksit elde etmek amaçlı, farklı derişimlerde grafen oksit çözeltilerinden 0-1,4V arasında farklı döngü sayısında, pH 6,5 fosfat tamponunda dönüşümlü voltamogramlar alınarak indirgenmiş grafen oksit elde edilmiştir.

Tirozinaz enzimini immobilize etmek için amin gruplarının bağlanması 1- etil-3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid /N-Hidroksisüksünimid (EDC/NHS) amid tipi çapraz bağlayıcı, çifti kullanılmıştır. 1-etil-3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid hidroksiklorid, karboksil grupları primer aminlere birleştirmek üzere kullanılan sıfır uzunluklu bir çapraz bağlama ajanıdır. EDC'nin verimliliği NHS varlığında artar. Bu nedenle birlikte kullanılırlar. EDC ve NHS'nin kombinasyonu ile karboksil içeren herhangi bir molekülde amin reaktif NHS esterler oluşturulabilir. Bu çapraz bağlama reaksiyonu ile oluşturulan amid bağları nötr bir bağlantı sağlar. N-hidroksi süksinimid, genellikle karboksilik asit gruplarını aktifleştirmek amacıyla kullanılır. Aktif hale gelen asitler amidleri vermek üzere aminlerle reaksiyona girerler. EDC'nin etkinliğini arttırıcı özelliği vardır.

Tirozinaz ile hazırlanan biyosensörün Katekol cevabına etkisi incelenmiştir. En uygun şartın 15 adet dönüşümlü voltamogram ve 0,1 $mg.mL^{-1}$ grafen oksit olduğu gözlenmiştir. PBE/EiGo üzerinde iridyum oksit nanopartikülleri damlatılarak nanosensörün Katekol karşı cevabının biraz daha artırılması hedeflenmiştir. 10 µM Katekol için PBE/EiGo/IOkNP/tir ve iGO nanosensörlerinin cevabından çok daha yüksek cevaplar alınmıştır.

İndirgenmiş grafen (iGO), iridyum oksit (IO) ve Tirozinaz (Tir) enzimi miktarları optimize edilmiş, en uygun şartlarda nanobiyosensör cevabı karakterize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Nanopartikül etkisi ve rGO etkisi alınan dönüşümlü voltamogram ölçümleri ile desteklenmiştir. 0,2 V civarı görülen Katekol indirgenme pikinin elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit varlğında arttığı, biyosensöre iridyum oksit nanopartikül eklendiğinde Katekol cevabını bir birim daha arttığı gözlenmiştir. Biyosensörün modifiye edilmesi ile Katekol cevabındaki bu artışlar, amperometrik olarak da takip edilmiştir.

Optimize edilen koşullar altında tasarlanan biyosensör 0,2 µM Katekol ile 26 µM Katekol derişimi arasında doğrusal bir davranış sergilemiştir. Katekol eklenmesinde yaklaşık 25 sn sonra anlamlı bir biyokatalitik cevap alınmıştır. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırası ile 0,053 µM ve 0,161 µM Katekol olarak hesaplanmıştır. Tasarlanan biyosensörün SEM görüntüleri alınarak yüzey morfolojileri incelenmiştir.

Kaptopril, Tirozinaz mekanizmasını iki şekilde inhibe etmektedir. Birincisi kinonlar ile birleşmesi, (substrata bağlanarak inhibisyon), ikincisi enzime bağlanması (tersinmez inhibisyon). Kaptopril substrata bağlanarak, enzimi inhibisyonunu sağlamaktadır. Kaptopril'in kinonlar ile birleşmesi, Katekol-o-kinon döngüsünü bozar ve biyosensör cevabında düşüş yani inhibisyon gerçekleşir. Kaptopril'in tiyokinon oluşturarak Tirozinaz inhibisyonu ile tayininde, 0,6 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,05 µM-14 µM Kaptopril derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). 0,0083 µM YS ve 0,0253 µM TAS değerleri elde edilmiştir. Günler arası tekrar edilebilirlik ve gün içi tekrar edilebilirlikler için %10'dan düşük %BSS değerleri elde edilmiştir.

İkinci tip inhibisyonda Kaptopril doğrudan enzimin içinde bulunan bakır ile şelat oluşturarak, enzime bağlanarak, enzimde konformasyonel bir değişiklik meydana getirir. Geri dönüşümsüz olan bu inhibisyonda, biyosensör tek sefer kullanılabilir ve inhibisyonun olması için inkübasyon süresi gereklidir. Geliştirilen biyosensör 5 µM Kaptopril çözeltisinde 5, 10 ve 15 dakikalık farklı inkübasyon sürelerinde bekletilmiştir. Daha sonra 0,6 µM Katekol cevabı izlenmiştir.

10 dk inkübasyon süresi uygun bulunmuş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensör 10 dk ilaç çözeltisinde bekletilmiştir ve % 30 inhibisyon gözlenmiştir. Optimize edilen inhibisyon koşullarında, 0,6 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,1 µM-15µM Kaptopril derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). YS ve TAS değerleri sırası ile 0,019 ve 0,059 µM olarak

hesaplanmıştır. Günler arası tekrar edilebilirlik ve gün içi tekrar edilebilirlikler için %10'dan düşük %BSS değerleri elde edilmiştir.

Kaptopril tayininin Tirozinaz inhibisyonu ile takibi için geliştirilen biyosensör iki inhibisyon yöntemi ile karakterize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu yöntemlerin gerçek örneklere uygulanabilirliği göstermek amaçlı, Kaptopril içeren farmasötik dozaj formlardan Kaptopril tayini yapılmıştır. İnsan kanına ilave etme yöntemi ile Kaptopril içeren numuneler hazırlanmış ve geri kazanım çalışmaları bu numuneler ile yapılmıştır.

Kaptopril ilaç etken maddesini inhibisyon ile tayinine yönelik mikroçip çalışmaları, akış altında nanokompozitin akış etkisi ile bir süre sonra yüzeyde tutunamamasından dolayı Tiyokinon oluşumu takibi tekrar edilebilir olmamıştır. Tersinmez inshibyon ile Kaptopril analizinde ise, tek nokta için tek biyosensör tasarlanması ve mikroçip hazırlanması gerekliliğinden ötürü, biyosensörlerin hızlı hazırlanma, hızlı cevap verme teorisine ters düştüğünden, 15 dk süren analiz verimli bulunmamıştır.

Son kısımda Sildenafil etken maddesinin Tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini incelemek için yeni bir biyosensör geliştirilmiştir. Karbon nanotüpler üzerine tiyonin polimeri biriktirilmiş ve iridyum nanopartikül ile kompozit bir biyosensör oluşturulmuştur.

20 döngüde elde edilen -NH_2 grupları olan tiyonin polimeri ile % 0,25, 5 µL gluteraldehit çapraz bağlayıcı ajanı ve de 2 µL ÇDKNT ortamında Tirozinaz enzimi kovalent bağlanarak güçlü bir şekilde immobilize edilmiştir. Karbon nanotüp miktarı sabit tutularak, polimer kalınlığı, iridyum oksit nanopartikül miktarı, Tirozinaz enzimi miktarı optimize edilmiştir.

0,5 mM tiyonin polimeri 0,1 M fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış ve 50 mV/s tarama hızında, -0,4 V ile 0,4 V arasında farklı sayıda döngü alınmıştır. 20 döngü uygun olarak bulunmuştur. 20 döngü ile elde edilen tiyonin polimeri ile biyosensör oluşturulduğu zaman en yüksek cevap elde edilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu miktar kullanılmıştır.

Karbon nanotüp üzerine biriktirilen tiyonin polimerine iridyum oksit nanopartiküller eklendiğinde Katekol'e karşı biyosensör cevabı artmıştır. Tiyonin redoks polimeri, yüksek iletkenliği, elektron transfer kapasitesi özelliklerinden ötürü iyi bir medyatördür. Karbon nanotüpler ile Tiyonin redoks polimeri, π–π etkileşmesi ile bağ oluştururlar. Karbon nanotüplerin yüzeyleri, üzerine biriktirilen tiyonin polimeri sayesinde, NH_2 grupları ile zengileşmiş hale gelip, gluteraldehit ile çapraz bağlanabilmiş ve Tirozinaz enzimi immobilize edilmiştir. Farklı miktarlarda enzim immobilize edildiğinde biyosensör cevabında değişiklikler görülmüştür. Bu immobilize edilebilecek maksimum enzim miktarının sağlandığının bir göstergesidir. 20 µL enzim immobilize edildiği zaman maksimum biyosensör cevabı gözlenmiştir.

Tasarlanan nanobiyosensör cevabı, Katekol cevabına yönelik en uygun şartlarda karakterize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. 0,2-48 µM aralığında Katekol tayini yapılmış, yakalama sınırı 0,08 µM ve tayin alt sınırı 0,2 µM olarak bulunmuştur. Tasarlanan biyosensörün SEM görüntüleri alınarak yüzey morfolojileri incelenmiştir.

Sildenafil ve analoglarının, Tirozinaz enzimi üzerine tersinmez etkisinin olduğu literatürde yer almaktadır. Öncelikle geliştirilen biyosensöre Sildenafil etkisini incelemek amaçlı, Katekol ilave edilen sisteme, Sildenafil eklenmiş ve inkübasyon gerçekleşmesi için beklenmiştir. Ardından tekrar eklenen Katekol cevabındaki düşüş inhibisyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

Mikroçip çalışmalarımız Sildenafil'in geri dönüşümsüz inhibe etmesinden dolayı, her ölçüm için yeni biyosensör tasarlanması ve mikroçip hazırlanması gerekliliğinden ötürü yapılamamıştır.

Perde baskılı elektrotlar ile hazırlanan biyosensör ile Katekol cevabı alındıktan sonra biyosensör Sildenafil çözeltisinde farklı sürelerde bekletilmiş ve uygun biyosensör cevabı 10 dk inhibisyon süresi ile elde edilmiştir. Geliştirilen biyosensörün farklı Sildenafil derişimlerinde bekletilmesi ile inhibisyon üzerinden Sildenafil tayini yapılmıştır. 0,2 μM ile 15 μM Sildenafil derişimi aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Yakalama sınırı 0,004 μM ve tayin alt sınırı 0,012 μM olarak bulunmuştur. Geliştirilen biyosensör ile Sildenafil ilacının insan serumuna ve farmasötik dozaj formlarına uygulama deneyleri yapılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu tez kapsamında 3 farklı biyosensör geliştirilmiş, tüm biyosensörlerin öncelikle Katekol analizi açısından, uygun şartları belirlenmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonrasında Metimazol, Kaptopril ve Sildenafil sitratın tayini, bu biyosensörlerdeki Tirozinaz enzimini inhibe etme yöntemi ile analiz edilmiş ve gerekli validasyon parametreleri hesaplanmıştır.

Metimazol tayinine yönelik, iridyum oksit nanopartikül, manyetik nanopartikül ve Tirozinaz ile elde edilen biyosensör ile 23,5 µM ile 433,50 µM Katekol derişimi aralığında doğrusal bir çalışma aralığı belirlenmiştir. Katekol biyosensörü için yakalama sınırı 0,043 µM ve tayin alt sınırı 0,13 µM olarak hesaplanmıştır.

Tiyokinon oluşumu ile inhibisyonda, 5 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,125 -50 µM Metimazol derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). Yakalama sınırı 0,041 µM ve tayin alt sınırı 0,125 µM olarak hesaplanmıştır.

Tersinmez inhibisyon ile, optimize edilen inhibisyon koşullarında, 5 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,1 -10 µM Metimazol derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). Yakalama ve tayin alt sınırı değerleri sırası ile 0,006 ve 0,017 µM olarak hesaplanmıştır.

Mikroçip kullanımda öncelikle Katekol analizi yapılmış 0,01 µM ve 10 µM Katekol derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir (r=0,99). Yakalama ve tayin alt sınırı sırası ile 0,003 ve 0,009 µM olarak hesaplanmıştır.

Tiyokinon oluşumu ile inhibisyonda mikroçip kullanımıyla artan Metimazol derişimleri ve 5 µM Katekol enjeksiyonu yapılmıştır. 0,01-0,5 µM Metimazol derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırası ile 0,003 ve 0,010 µM olarak hesaplanmıştır.

Kaptopril tayinine yönelik, elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit, iridyum oksit nanopartiküller ve Tirozinaz enzimi ile bir biyosensör geliştirilmiştir. Optimize edilen koşullar altında tasarlanan biyosensör, 0,2 µM Katekol ile 26 µM Katekol derişimleri arasında doğrusal bir davranış sergilemiştir. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırası ile 0,053 µM and 0,161 µM Katekol olarak hesaplanmıştır.

Kaptopril'in tiyokinon oluşturarak Tirozinaz inhibisyonu ile tayininde, 0,6 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,05 µM-14 µM Kaptopril derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). 0,0083 µM yakalama sınırı ve 0,0253 µM tayin alt sınırı değerleri elde edilmiştir.

Kaptopril'in tersinmez olarak Tirozinaz'ı inhibe etme yöntemi ile, optimize edilen inhibisyon koşullarında, 0,6 µM Katekol cevabının düşüşü yardımı ile 0,1 µM -15µM Kaptopril derişimi aralığında kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (r=0,99). Yakalama ve tayin alt sınırı sırası 0,019 ve 0,059 µM olarak hesaplanmıştır.

Sildenafil tayinine yönelik, tiyonin polimeri, karbon nanotüpler ve iridyum oksit nanopartikül kullanılarak Tirozinaz immobilizasyonu ile bir biyosensör oluşturulmuştur. Tasarlanan nanobiyosensör cevabı, Katekol cevabına yönelik en uygun şartlarda karakterize edilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır.

Geliştirilen biyosensör ile 0,2 -48 µM aralığında Katekol tayini yapılmış, yakalama sınırı 0,08 µM ve tayin alt sınırı 0,2 µM olarak bulunmuştur.

Sildenafil'in Tirozinaz üzerine tersinmez inhibisyon etki ile analizi, geliştirilen biyosensörün artan Sildenafil derişimlerinde bekletilmesi ile yapılmıştır. 0,2 µM ile 15 µM Sildenafil derişimi aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Yakalama ve tayin alt sınırı sırası ile 0,004 µM ve 0,012 µM olarak bulunmuştur.

ÖZET

Çeşitli İlaçların Tirozinaz İnhibisyonundaki Rollerini İncelemek Amaçlı Elektrokimyasal Nanobiyosensör ve Mikroçip Tasarımı

Bu tez kapsamında, Tirozinaz enzimini inhibe eden ilaçların ve Katekol'un teşhis ve tayinine yönelik özgün nanobiyosensörler geliştirilmiştir. Metimazol tayini için, manyetik nanopartikül, iridyum oksit nanopartikül bazlı nanokompozit bazLı biyosensör oluşturulmuş ve Tirozinaz perde baskılı elektrotlar üzerine magnet yardımı ile tutturulmuştur. Katekol cevabına etki eden enzim miktarı, iridyum oksit nanopartikül miktarı, inkübasyon süresi gibi parametreler optimize edilmiştir. Perde baskılı elektrot ile entegre edilmiş "Lab-on-a-chip" mikro sistemi ile akış modu başarılmıştır. Metimazol tayini, Metimazol'ün Tirozinaz ile bakır şelat oluşturması ve Tiyokinon oluşması perde baskılı elektrotlar ve mikroçip ile değerlendirilmiştir. Kaptopril tayini için, perde baskılı elektrotlar üzerine N-Hidroksisaksiimid ve N-(3-Dimetilaminopropil))-N′-etilkarbodiimid çapraz bağlayıcı, elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit ve iridyum oksit nanopartikül ile immobilize edilmiş Tirozinaz bazlı biyosensör hazırlanmıştır. Biyosensör Katekol cevabına karşı, grafen oksit miktarı, indirgenmiş grafen oksit için döngü sayısı, iridyum oksit ve Tirozinaz miktarı açısından karakterize edilmiştir. Geliştirilen biyosensör, Kaptopril'in Tirozinaz ile bakır şelat oluşturması ve Tiyokinon oluşması yollarıyla Tirozinaz'ı inhibe etmesi ile Kaptopril tayini için kullanılmıştır. Sildenafil tayini için, Tiyonin polimeri, karbon nanotüp, iridyum oksit nanopartikül matrisine immobilize olan Tirozinaz ile özgün bir biyosensör hazırlanmıştır. Geliştirilen biyosensör tiyonin polimerizasyon döngü sayısı, iridyum oksit ve Tirozinaz miktarı açısından Katekol cevabına karşı optimize edilmiştir. Sildenafil, geri dönüşümsüz olarak Tirozinaz ile bakır şelat oluşturması yoluyla analiz edilmiştir. Önerilen metotlarının başarılı bir şekilde validasyon çalışmaları yapılmıştır, kabul edilebilir geri kazanım değerleri ile insan serumuna ve farmasötik dozaj formalara uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, Enzim, Farmasötik, İnhibisyon, Nanomalzeme

SUMMARY

Design of Electrochemical Nanobiosensors and Microchips to Investigate the roles of some Pharmaceuticals in Tyrosinase Inhibition

In this dissertation, novel nanobiosensors are developed for the detection and determination of both catechol and tyrosinase enzyme inhibitor drugs. For Methimazole determination, a biosensor based on a nanocomposite of magnetic nanoparticles, iridium oxide nanoparticles is developed and tyrosinase immobilized onto screen printed electrode by using a permanent magnet. All the parameters effecting catechol responses are optimized, such as enzyme, iridium oxide nanoparticles amount and incubation time amount. Flow mode is achieved using a lab-on-a-chip microsystem with an integrated screen printed electrode. The Methimazole detection is evaluated via chelating copper at the active site of tyrosinase and thioquinone formation using screen printed electrodes and microchip. For Captopril detection, a novel biosensor based on tyrosinase immobilization onto screen printed electrode by using 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide and N-Hydroxysuccinimide coupling reagents, electrochemically reduced graphene oxide and iridium oxide nanoparticles is prepared. Biosensor response is characterized towards catechol response, in terms of graphene oxide concentration, number of cycles to reduce graphene oxide, volume of iridium oxide nanoparticles and tyrosinase solution. The designed biosensor is used to detect Captopril by inhiting Tyrosinase via chelating copper at the active site of tyrosinase and thioquinone formation. For Sildenafil detection, a novel biosensor based on immobilization of tyrosinase in thionine polymer, multiwalled carbon nanotubes and iridium oxide nanoparticles matrix is proposed. The designed biosensor is characterized towards catechol response in terms of thinonine polymerization cycle amount, iridium oxide and tyrosinase amount. Sildenafil is analysed through irreversible inhibition of Tyrosinase by chelating copper at the active site of Tyrosinase. The proposed methods have been successfully validated and applied in spiked human serum and pharmaceutical dosage forms with acceptable recovery values.

Keywords: Biosensor, Enzyme, Inhibition, Nanomaterial, Pharmaceutical

KAYNAKLAR

ABOUL-ENEIN HY, STEFAN R-I, BAIULESCU G-E (2000). Quality and Reliability in Analytical Chemistry. Boca Raton, FL: CRC Press.

AL-HROUB H, ALKHAWAJA B, ALKHAWAJA E, ARAFAT T (2016). Sensitive and rapid HPLC-UV method with back-extraction step for the determination of sildenafil in human plasma. *J Chromatogr B*, **1009**: 1–6.

ANDRAWIS A, KAHN V (1996). Effect of methimazole on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochem J*, **235**: 91–96.

AREIAS MC, TOH HS, LEE PT, COMPTON RG (2016). Voltammetric Detection of Captopril on Graphite Screen Printed Electrodes. *Electroanalysis*. **28**: 742–748.

ARREGUI FJ (2010). Introduction. In: *Sensors Based on Nanostructured Materials*, Ed.: Arregui, F.J., Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. 1–10.

ASHBY MF, FERREIRA PJ, SCHODEK DL (2009). Nanomaterials, Nanotechnologies and Design: An Introduction for Engineers and Architects. Burlington, MA: Butterworth-Heinemann.

ASLANOGLU M, PEKER N (2003). Potentiometric and voltammetric determination of methimazole. *J Pharm Biomed Anal*, **33**: 1143–1147.

AUDREY SASSOLAS A, PRIETO-SIMÓN B, MARTY J-L (2012). Biosensors for Pesticide Detection: New Trends. *American Journal of Analytical Chemistry*, **3**: 210–232.

AYTEMİR MD, KARAKAYA G (2012). Kojic Acid Derivatives, Medicinal Chemistry and Drug Design, Ed.: EKİNCİ D. ISBN: 978-953-51-0513-8, INTECH Open Access Publisher.

ARAYNE MS, SULTANA N, ZUBERI MH, SIDDIQUI FA, HAROON U. (2013). Simultaneous determination of metformin, captopril, lisinopril, and enalapril by RP-HPLC: Its applications in dosage formulations and in human serum. *Med Chem Res*, **22**: 5717–5722.

BAGHERI H, KARIMI-MALEH H, KARIMI F, MALLAKPOUR S, KEYVANFARD M (2014). Square wave voltammetric determination of captopril in liquid phase using N-(4-hydroxyphenyl)-3,5-dinitrobenzamide modified ZnO/CNT carbon paste electrode as a novel electrochemical sensor. *J Mol Liq*, **198**: 193–199.

BAGOTSKY VS (2006). Fundamentals of Electrochemistry. 2nd Ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons.

BARD AJ, FAULKNER LR (2001) Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. 2nd Ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons.

BARD AJ, INZELT G, SCHOLZ F (2008). Electrochemical Dictionary. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.

BARTOŠOVÁ Z, JIROVSKÝ D, HORNA A (2011). High-performance liquid chromatographic method with amperometric detection employing boron-doped diamond electrode for the determination of sildenafil, vardenafil and their main metabolites in plasma. *J Chromatogr A*, **1218**: 7996–8001.

BARTLETT PN, WHITAKER, RG (1987). Strategies for the Development of Amperometric Enzyme Electrodes. *Biosensors*, **3**: 359–379.

BATISTA EF, SARTORI ER, MEDEIROS RA, ROCHA-FILHO RC, FATIBELLO-FILHO O (2010). Differential pulse voltammetric determination of sildenafil citrate (Viagra®) in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Anal Lett*, **43**: 1046–1054.

BAURIN N, ARNOULT E , SCIOR T, DO QT, BERNARD P (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharmacol*, **82**: 155–158.

BEITOLLAHI H, GHOFRANI IVARI, S, ALIZADEH R, HOSSEINZADEH R (2015). Preparation, Characterization and Electrochemical Application of ZnO-CuO Nanoplates for Voltammetric Determination of Captopril and Tryptophan Using Modified Carbon Paste Electrode. *Electroanal*, **27**: 1742–1749.

BOND AM (2002). Broadening Electrochemical Horizons: Principles and Illustration of Voltammetric and Related Techniques. Oxford: Oxford University Press.

BORISOV SM, WOLFBEIS OS (2008). Optical biosensors. *Chem Rev*, **108**: 423–461.

BUERK DG (1993). Biosensors: Theory and Applications. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company.

BUERK DG (1995). *Biosensors: Theory and applications.* USA: CRC Press.

BURESTEDT E, NARVAEZ A, RUZGAS T, GORTON L, EMNEUS J, DOMİNGUEZ E, MARKO-VARGA G (1996). Rate-Limiting Steps of Tyrosinase-Modified Electrodes for the Detection of Catechol. *Anal Chem*, **68**: 1605–1611.

CHANG T-S (2009). An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int J Mol Sci*, **10**: 2440–2475.

CHEN C, XIE Q, YANG D, XIAO H, FU Y, TAN Y, YAO S (2013). Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *Rsc Advances*, **3**: 4473–4491.

CHEN S (2007). Practical Electrochemical Cells. In: *Handbook of Electrochemistry*, Ed.: Zoski, C. G., Amsterdam: Elsevier, 33–56.

CHU H-L, WANG B-S, CHANG L-C, CHANG L-W ANd PIN-dER dUH (2012). Effects of Captopril on Melanin Formation in B16 cells. *J Food Drug Anal*, **20**: 668–673.

CHWATKO G, DARRAS VM, BALD E. (2014). A method for the determination of total and reduced methimazole in various biological samples. Food Addit Contamin: Part A, **31**: 1009–1016.

CIOBANU M, WILBURN JP, KRIM ML, CLIFFEL DE (2007). Fundamentals. In: *Handbook of Electrochemistry*, Ed.: Zoski, C.G., Amsterdam: Elsevier. 3–29.

CLARK LC, LYONS C (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann Ny Acad Sci*, **102**: 29–45.

DANIELSSON B, MATTIASSON B, MOSBACH K (1981). Enzyme thermistor devices and their analytical applications. *Appl Biochem Bioeng*, **3**: 97–143.

DAVIS G (1985). Electrochemical techniques for the development of amperometric biosensors. *Biosensors*, **1**: 161–178.

DONG C, ZHANG Y, GUO L, LI QM (2010). Spectrophotometric determination of methimazole in pharmaceutical, serum and urine samples by reaction with potassium ferricyanide-Fe (III). *J Anal Chem*, **65**: 707-712.

DONG F, HU K, HAN H, LIANG J (2009). A novel method for methimazole determination using CdSe quantum dots as fluorescence probes. *Microchim Acta*, **165**: 195-201.

DORRAJI PS, JALALI F (2015). Sensitive amperometric determination of methimazole based on the electrocatalytic effect of rutin/multi-walled carbon nanotube film. *Bioelectrochemistry*, **101**: 66–74.

DRYHURST G (1977). Electrochemistry of Biological Molecules. New York, NY: Academic Press.

DUBACH JM, CLARK HA (2013). Nanosensors. In: *The Textbook of Nanoneuroscience and Nanoneurosurgery*. Ed.: Kateb, B. Heiss, J. D. Boca Raton, FL: CRC Press. 203–216.

EBRAHIMZADEH H, ASGHARINEZHAD AA, ADLNASAB L, SHEKARI N. (2012). Optimization of ion-pair based hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC–UV for the determination of methimazole in biological samples and animal feed. *J Sep Sci*, **35**: 2040–2047.

EDMONDS TE (2013). *Chemical sensors.* Springer Science & Business Media.

EDWARD AC (1992). Thyroid hormones and drugs that affect the thyroid, In: Text-Book of Pharmacology, Ed. Smith CM, Reynard AM, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 652–656.

EDWARDS GA, BERGREN AJ, PORTER MD (2007). Chemically Modified Electrodes. In: *Handbook of Electrochemistry*, Ed.: Zoski, C. G., Amsterdam: Elsevier. 295–327.

EGGINS BR (2002). *Chemical Sensors and Biosensors.* UK: John Wiley and Sons.

EL-BAGARY R, AZZAZY H M, ELKADY EF, FAROUK F. (2014). Simultaneous determination of sildenafil citrate and some nitric oxide releasing drugs in human plasma using UPLC MS/MS. *Clin Biochem*, **47**: 654–656.

EL-GINDY A, NASSAR MW, ATTIA KAS, ABU-SEADA HH, EL-GHANDOUR M (2014). Stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of captopril, indapamide, and their related compounds. *J Liq Chromatog Rel Tech*, **37**: 696–712.

ENSAFI AA, ARABZADEH A (2012). A new sensor for electrochemical determination of captopril using chlorpromazine as a mediator at a glassy carbon electrode. *J Anal Chem*, **67**: 486–496.

ENSAFI AA, MONSEF M, REZAEI B, KARIMI-MALEH H (2012). Electrocatalytic oxidation of captopril on a vinylferrocene modified carbon nanotubes paste electrode. *Anal Meth*, **4**: 1332–1338.

ENSAFI AA, KARIMI-MALEH H, MALLAKPOUR S, REZAEI B (2011). Highly sensitive voltammetric sensor based on catechol-derivative-multiwall carbon nanotubes for the catalytic determination of captopril in patient human urine samples. *Colloid Surfaces B*, **87**: 480–488.

ENSAFI AA, MONSEF M, REZAEI B, KARIMI-MALEH H (2012). Recent Analytical Applications on Antihypertensive Drugs. *Anal Meth*, **4**: 1332–1338.

ESPIN JC, WICHERS HJ (2001). Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in Vitro. *Biochim Biophys Acta*, **1544**: 289–300.

FDA (2015). "Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry" bkz. http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf

FERAPONTOVA EE, SHLEEV S, RUZGAS T, STOİCA L, CHRİSTENSON A, TKAC J, YAROPOLOV AI, GORTON L (2005). Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes. *Perspectives in Bioanalysis*, **1**: 1–81.

FIGEYS D, PINTO D (2000). Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences. *Anal Chem*, **72**: 330 A–335 A.

FOULADGAR M, (2011) Electrocatalytic Measurement of Trace Amount of Captopril Using Multiwall Carbon Nanotubes as a Sensor and Ferrocene as a Mediator. *Int J Electrochem Sci*, **6**: 705–716.

FOULADGAR M, MOHAMMADZADEH S (2014). Determination of Methimazole on a Multiwall Carbon Nanotube Titanium Dioxide Nanoparticle Paste Electrode. *Anal Lett*, **47**: 763–777.

FRAG EYZ, MOHAMED GG, ALELAİWİ HMS (2011) Electroanalytical determination of Sildenafil in Viagra tablets using screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *J Electroanal Chem*, **659**: 121–127.

GALLO N, BIANCO P, TAPINO R, LUISI G. (1983) Interaction of methimazole and quinones. Spectrophotometric determination of methimazole in blood. *Minerva Med* **74**: 875–877.

GEIM AK (2009). Graphene: Status and Prospects. *Science*, **324:** 1530–1534.

GENÇ H, ZENGIN M, YAVUZ E, GENÇER N, ARSLAN O (2014). Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of novel isoquinoline urea/thiourea derivatives. *Artif Cell Nanomed B*, **42**: 178–185.

GERARD M, CHAUBEYB A, MALHOTRAB BD (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens Bioelectron*, **17**: 345–359.

GHOLIVAND MB, KHODADADIAN M, OMIDI M (2013). Amperometric sensor based on a graphene/copper hexacyanoferrate nano-composite for highly sensitive electrocatalytic determination of captopril. *Mat Sci Eng C*, **33**: 774–781.

GOFFREDO BM, CAIROLI S, VITALE A, CORSETTI T, PASTORE A (2016). Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography for the Simultaneous determination of Sildenafil and N-desmethyl sildenafil in plasma of children. *Biomed Chromatogr*, **30**: 1-4.

GOODING JJ, LAI LMH, GOON IY (2009). Nanostructured Electrodes with Unique Properties for Biological and Other Applications. In: *Chemically Modified Electrodes*, Ed.: Alkire, R.C., Kolb, D. M., Lipowski, J., Ross. P. N., Weinheim: Wiley-WCH. 1–56.

GORTON L (1986). Chemically modified electrodes for the electrocatalytic oxidation of nicotinamide coenzymes. *J Chem Soc Faraday Trans*, **82**: 1245–1258.

GOSHORN ER, FAYNOR SM, HAVEN MC (1995). Electrochemical Methods of Analysis. In: *Laboratory Instrumentation*. Ed.: Haven, M. C., Tetrault, G. A., Schenke, J. R. 4th Ed. New York, NY: John Wiley and Sons. 185–213.

GREEF R, PEAT R, PETER LM, PLETCHER D, ROBINSON J (1990). Instrumental Methods in Electrochemistry. Ellis Horwood, England.

GRONOW M (1991). Biosensors-a marriage of biochemistry and microelectronics In: Biotechnology: The Science & The Business, Ed.: Moses V, Cape RE, Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 355–370.

GUILBAULT GG, KRAMER DN, CANNONJR PL (1962). Electrochemical determination of organophosphorus compounds. *Anal Chem*, **34**: 1437–1439.

GUILBAULT GG, MONTALVOJR JG (1969). Urea specific enzyme electrode. *J Am Chem Soc*, **91**: 2164–2165.

HABIBI D, FARAJI AR, GIL A. (2013). A highly sensitive supported manganese-based voltammetric sensor for the electrocatalytic determination of captopril. *Sens Actuat B: Chem*, **182**: 80-86.

HAN J (2005). Structures and Properties of Carbon Nanotubes. In: *Carbon Nanotubes: Science and Applications*, Ed.: Meyyapan, M., Boca Raton, FL: CRC Press. 2–4.

HART JP (1990). Electroanalysis of Biologically Important Compounds, Ellis Harwood, London.

HART JP (1997). Recent developments in the design and application of screen printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses. *TrAC Trends in Anal Chem*, **16:** 89–103.

HARTMANN C, SMEYERS-VERBEKE J, MASSART DL, MCDOWALL RD (1998) Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal*, **17**: 193–218.

HASSAN KHAN MT (2007). Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins. *Pure Appl Chem*, **79**: 2277–2295.

HENGSTMANN JH, HOHN H (1985). Pharmacokinetics of methimazole in humans *Klin Wochenschr,* **63**: 1212-1217.

HENNRICH F, CHAN C, MOORE V, ROLANDI M, O'CONNELL M (2006). The Element Carbon. In: *Carbon Nanotubes: Properties and Applications*, Ed.: O'Connell, M. J., Boca Raton, FL: CRC Press. 1–18.

HENRI, V 1903. Lois Générales de l'Action des Diastases. Paris: Hermann.

HESS BS, GASPARETTO JCA, CARDOSO MAB, PONTAROLO RA (2011) Simultaneous determination of captopril, hydrochlorothiazide and their related compounds in a single pharmaceutical tablet using validated HPLC method, *Lat Am J Pharmacy*, **30**: 1901-1909

HEYDEN YV, MASSART DL (1996). Review of the Use of Robustness and Ruggedness in Analytical Chemistry. In: *Robustness of Analytical Chemical Methods and Pharmaceutical Technologies Products*. Ed.: Hendricks,M. M. W. B., de Boer, J. H., Smilde, A. K., Amsterdam: Elsevier. 79–148.

HICKS GP, UPDIKE SJ (1970). *Washington, DC, U.S. Patent and Trademark Office. Patent No. U.S. Patent No. 3,542,662.*

HIMMELMANN A, HANSSON L, HEDNER T (2001). The Captopril Prevention Project, further analyses on left ventricular hypertrophy and diabetes, *Blood Press,* **10**: 60–61.

HOLLOSI L, KETTRUP A, SCHRAMM KW (2004). MMSPE-RP-HPLC method for the simultaneous determination of methimazole and selected metabolites in fish homogenates. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, **36**: 921–924.

HUA L, HAN H, CHEN H. (2009). Enhanced electrochemiluminescence of CdTe quantum dots with carbon nanotube film and its sensing of methimazole. *Electrochim Acta*, **54**: 1389–1394.

HUANG T, HE Z, YANG B, SHAO L, ZHENG X, DUAN G (2006). Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide in human plasma by reverse-phase HPLC from linear gradient elution. *J Pharma Biomed Anal*, **41**:644–648.

HUBER L (2007). Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2nd Ed. New York & London: Informa Healthcare.

ICH Rehberi (1994). "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)". Bkz. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline .pdf.

ICH Rehberi (2003) "Stability Testing of New Drug Substances and Products" Q1A (R2)" Bkz. http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073369.pdf

IWUNZE MO (2008). Introductory Electrochemistry and Related Applications. Bloomington, In: 1st Books.

JALALI F, RANJBAR S (2014). Electrocatalytic oxidation of captopril using a carbon-paste electrode modified with copper-cobalt hexacyanoferrate. *Russ J Electrochem*, **50**: 482-489.

JANATA J, JOSOWICZ M, DEVANEY DM (1994). Chemical sensors. *Anal Chem*, **66**: 207R–228R.

JANKOWSKI A, SKOREK A, KRZYSKO K, ZARZYCKI PK, OCHOCKA RJ, LAMPARCZYK H (1995). Captopril: determination in blood and pharmacokinetics after single oral dose. *J Pharm Biomed Anal*, **13**: 655–660.

JÖNSSON G, GORTON L (1985). An Amperometric Glucose Sensor Made by Modification of a Graphite Electrode Surface With Immobilized Glucose Oxidase and Adsorbed Mediator. *Biosensors*, **1**: 355–368.

KARIMI-MALEH, H.; MOAZAMPOUR, M.; GUPTA, V. K.; SANATI, A. L. (2014). Electrocatalytic determination of captopril in real samples using NiO nanoparticle modified (9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-4-ethylbenzene-1,2-diol carbon paste electrode. *Sens Actuat B: Chem*, **199**: 47–53.

KARNES HT, SHIU G, SHAH VP (1991) Validation of bioanalytical methods. *Pharm.Res.* **8**: 421–426.

KAUNAVES SP (1997). Voltammetric Techniques. In: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemisty*, Ed.: Settle, F. A., Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall PTR. 711–728.

KHAMANGA SM, WALKER RB, (2011). The use of experimental design in the development of an HPLC–ECD method for the analysis of captopril, *Talanta*, **83**: 1037–1049.

KHAN KM, MAHARVI GM, HASSAN KHAN MT, PERVEEN S, CHOUDHARY MI, RAHMAN A (2005a). A facile and improved synthesis of Sildenafil (Viagra®) analogs through solid support microwave irradiation possessing tyrosinase inhibitory potential, their conformational analysis and molecular dynamics simulation studies. *Mol Divers*, **9**: 15–26.

KHAN KM, MAHARVI GM, PERVEEN S, H KHAN MT, ABDEL-JALIL RJ, SHAH STA, FECKER M, CHOUDHARY MI, RAHMAN A, VOELTER W (2005b). Synthesis of methyl ether analogues of Sildenafil (Viagra) possessing tyrosinase inhibitory potential. *Chem Biodivers*, **2**: 470–476.

KHANNA VK (2011). Nanosensors: Physical, Chemical and Biological. Boca Raton, FL: CRC Press.

KOMORSKY-LOVRIĆ S (2010). Working Electrodes. In: *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*, Ed.: Scholz, F., 2nd Ed. Heidelberg: Springer. 273–290.

KRUEGER RC (1954). The Inhibition of Tyrosinase. *Arch Biochem Biophys*, **57**: 52-60.

KUŚMIEREK K, BALD E. (2007). Determination of methimazole in urine by liquid chromatography. *Talanta*, **71**: 2121–2125.

KUTLUAY A, ASLANOĞLU M (2012). Multi-walled carbon nanotubes/electro-copolymerized cobalt nanoparticles-poly (pivalic acid) composite film coated glassy carbon electrode for the determination of methimazole. *Sensor Actuat B-Chem*, **171–172**: 1216–1221.

KURBANOGLU S, MAYORGA-MARTINEZ CC, RIVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇI A. (2015) Antithyroid drug detection using an enzyme cascade blocking in a nanoparticle-based lab-on-a-chip system. *Biosens Bioelectron*, **67**: 670–676.

LARSON AD, KALLIO RE (1954). Purification and properties of bacterial urease. *J Bacteriol*, **68**: 67–73.

LAWRENCE NS, LIANG H-P (2008). Metal Nanoparticles: Applications in Electroanalysis. In: *Nanostructured Materials in Electrochemistry*, Ed.: Eftekhari, A., Weinheim: Wiley-VCH. 435–458.

LEE SK, KIM Y, KIM TK, IM GJ, LEE BY, KIM DH, JIN C, YOO HH (2009). Determination of mirodenafil and sildenafil in the plasma and corpus cavernous of SD male rats. *J Pharma Biomed Anal*, **49:** 513–518.

LEFROU C, FABRY P, POIGNET JC (2012). Electrochemistry: The Basics with Examples. Heidelberg: Springer-Verlag.

LI G, MIAO P (2013). Electrochemical Analysis of Proteins and Cells. Heidelberg: Springer-Verlag.

LIEDBERG B, NYLANDER C, LUNSTRÖM I (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensor Actuator*, **4**: 299–304.

LIM T-C, RAMAKRISHNA S (2006). A conceptual review of nanosensors. *Zeitschrift für Naturforschung*, **61a:** 402–412.

LINEWEAVER H, BURK D (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc*, **56**: 658–666.

LIU X, LI Y, SONG Z (2015). Determination of Captopril in Biofluids by Luminol–Chloroauric Acid–Lysozyme Chemiluminescence. *Instrum Sci Technol*, **43**:197–213.

LÜBBERS DW, OPITZ N (1975). Die pCO2-/pO2-Optode: Eine neue p CO2-bzw. pO2-Meßsonde zur Messung des pCO2 oder pO2 von Gasen und Flüssigkeiten/The pCO2-/pO2-Optode: A New Probe for Measurement of pCO2 or pO2 in Fluids and Gases. *Zeitschrift Für Natur*, **30**: 532–533.

LUQUE DE CASTRO MD, HERRERA MC (2003). Enzyme inhibition-based biosensors and biosensing systems: questionable analytical devices. *Biosens Bioelectron*, **18**: 279–294.

LVOV SN (2015). Introduction to Electrochemical Science and Engineering. Boca Raton, FL: CRC Press.

LVOVICH VF (2012). Impedance Spectroskopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons.

MALHOTRA BD, SINGHAL R, CHAUBEY A, SHARMA SK, KUMAR A (2005). Recent trends in biosensors. *Curr Appl Phys*, **5**: 92–97.

MARKEN F, NEUDECK A, BOND AM (2010). Cyclic Voltammetry. Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications, Ed.: Scholz, F., 2nd Ed. Heidelberg: Springer. 57–106.

MARTINDALE: THE EXTRA PHARMACOPOEIA, Captopril, 36th ed., London: The Pharmaceutical Press, 2009, p. 1239-1240.

MARTINDALE: THE EXTRA PHARMACOPOEIA, Thiamazole, 36th ed., London: The Pharmaceutical Press, 2009, p. 2176-2177.

MARTINDALE: THE EXTRA PHARMACOPOEIA, Sildenafil, 36th ed., London: The Pharmaceutical Press, 2009, p. 2193–2196.

MARYOTT CH (1915). The Role of Enzymes in Chemical Changes. *J Am Pharm Assoc*, **4**: 678–682.

MASUKO N, OSAKA T, ITO Y (1996). Electrochemical Technology: Innovation and New Developments. Tokyo: Kodansha Ltd.

MAYORGA-MARTINEZ CC, PINO F, KURBANOGLU S, RIVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇI A. (2014) Iridium oxide nanoparticle induced dual catalytic/inhibition based detection of phenol and pesticide compounds. *J Mat Chem B,* **2**: 2233–2239.

MCPOLIN O (2009). Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis. Warrenpoint: Mourne Trading Services.

MENTEN L, MICHAELIS MI, 1913, Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem Z* **49**: 333–369.

MERKOÇI A (2013). Nanoparticles Based Electroanalysis in Diagnostics Applications. *Electroanal*, **25**: 15–27.

METTERS JP, BANKS CE (2013). Screen Printed Electrodes Open New Vistas in Sensing: Application to Medical Diagnosis. In: *Applications of Electrochemistry in Medicine*, Ed.: Schlesinger, M., Heidelberg: Springer. 83–120.

METTERS JP, BANKS CE (2014). Nanoparticle Modified Electrodes for trace Metal Ion Analysis. In: *Nanosensors for Chemical and Biological Applications: Sensing with Nanotubes, Nanowires and Nanoparticles*, Ed.: Honeychurch, K. C., Waltham, MA: Woodhead Publishing. 54–79.

MEZGEBE T, SERGAWİE A (2014). Voltammetric Study of Sildenafil Citrate Using Glassy Carbon Electrode. *IJTEEE,* **2**: 12–16.

MIRASOLI M, MASSIMO G, MICHELINI E, RODA A (2014). Recent advancements in chemical luminescence-based lab-on-chip and microfluidic platforms for bioanalysis. *J Pharmaceut Biomed*, **87**: 36–52.

MOJZYCH M, DOLASHKI A, VOELTER W (2014). Synthesis of pyrazolo [4, 3-e][1, 2, 4] triazine sulfonamides, novel Sildenafil analogs with tyrosinase inhibitory activity. *Bioorgan Med Chem*, **22**: 6616–6624.

MOLERO L, FAUNDEZ M, DEL VALLE MA, DEL RÍO R, ARMIJO F (2013). Electrochemistry of methimazole on fluorine-doped tin oxide electrodes and its square-wave voltammetric determination in pharmaceutical formulations. *Electrochim Acta*, **88**: 871– 876.

MORELAND RB, GOLDSTEIN I, KIM NN, TRAISH A (1999). Sildenafil citrate, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Trends Endocrinol Metab*, **10**: 97–104.

MOSTAFA GAE (2010). Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides. *The Open Electrochemistry Journal*, **2**: 22–42.

MURRAY RW (1980). Chemically Modified Electrodes. *Acc Chem Res*, **13**: 135–141.

BAURIN N, E. ARNOULT, T. SCIOR, Q.T. DO, P. BERNARD (2002) Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharmacol*, **82**: 155–158.

NEWMAN J, THOMAS-ALYEA KE (2004). Electrochemical Systems. 3rd Ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons.

NOROUZI P, GUPTA VK LARIJANI B, GANJALI MR, FARİDBOD F (2014). A new Methimazole sensor based on nanocomposite of CdS NPs–RGO/IL–carbon paste electrode using differential FFT continuous linear sweep voltammetry. *Talanta*, **127**: 94–99.

OCHIAI LM, BINDEWALD EH, MENGARDA P, MARCOLINO-JUNIOR LH, BERGAMINI MF. (2016). Disposable potentiometric citrate sensor based on polypyrrole-doped films for indirect determination of sildenafil in pharmaceuticals formulations. *J App Pol Sci*, **133**: 43762–43768.

OLSON MP, LACOURSE WR (2004). Voltammetry. In: *Ewing's Analytical Instrumentation Handbook*, Ed.: Cazes, J., 3rd Ed. Boca Raton FL: CRC Press. 529–544.

ÖZKAN B, BİRYOL İ, ŞENTÜRK Z (1993). Modifiye elektrotlara genel bir bakış. *FABAD J Pharm Sci*, **18:** 95–101.

ÖZKAN SA (2012). Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation. HNB Pub., USA, ISBN: 978-0-9664286-7-4.

ÖZKAN SA, KAUFFMANN JM, ZUMAN P (2015). Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences (main title), (Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN: 978-3-662-47137-1.

ÖZKAN SA, USLU B, ZUMANB P (2004). Electrochemical oxidation of Sildenafil citrate (Viagra) on carbon electrodes. *Anal Chim Acta*, **501**: 227–233.

PAIMARD G, GHOLIVAND MB, SHAMSIPUR M, GHOLIVAND K, MOHAMMADI-BEHZAD L, GHOLAMI A, BARATI A (2015). Fabrication of a highly sensitive amperometric sensor using 1,4-phenylene-N,N′-bis (O,O-diphenylphoramidate)/CdS quantum dots/multi-walled carbon nanotubes for nanomolar detection of captopril. *J Electroanal Chem*, **738**: 176–183.

PAN M, WANG J, FANG G, TANG W, WANG, S. (2010). Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer and its application as SPE enrichment sorbent for determination of trace methimazole in pig samples using HPLC-UV. *J Chromatogr B*, **878**: 1531–1536.

PETERS FT, MAURER HH (2002). Bioanalytical Method Validation and Its Implications for Forensic and Clinical Toxicology – A Review. In: *Validation in Chemical Measurement*. Ed.: De Bievre, P., Günzler, H., Heidelberg: Springer. 1–9.

PICKERING WF (2002). General Strategies for Speciation, In: *Chemical Speciation in the Environment*, Ed.: Ure, A., Oxford: Blackwell Science Ltd. 9–29.

PIRES NMM, DONG T, HANKE U, HOIVIK N (2014). Recent developments in optical detection technologies in lab-on-a-chip devices for biosensing applications. *Sensors*, **14**: 15458–15479.

PLETCHER D, WALSH FC (1990). Industrial Electrochemistry. London: Chapman and Hall.

PLOSKER GL, MCTAVISH D (1995) Captopril. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy after myocardial infarction and in ischaemic heart disease, *Drugs Aging*, **7**: 226-253.

PRASEK J, KIZEK R, DRBOHLAVOVA J, CHOMOUCKA J, HUBALEK J, JASEK O, ADAM V (2011). Methods for carbon nanotubes synthesis–review. *J Mater Chem*, **21:** 15872–15884.

RASHID J, AHSAN F (2016). A highly sensitive LC–MS/MS method for concurrent determination of sildenafil and rosiglitazone in rat plasma. *J Pharma Biomed Anal*, **129**: 21-27.

RAMANATHAN K, DANIELSSON B (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosens Bioelectron*, **16**: 417–423.

RAOOF JB, OJANI R, BAGHAYERI M (2011). Sensitive Voltammetric Determination of Captopril Using a Carbon Paste Electrode Modified with Nano-TiO2/Ferrocene Carboxylic Acid. *Chin J Catal*, **32**: 1685–1692.

RASTKARI, N., KHOOBI, M., SHAFIEE, A., KHOSHAYAND, M. R., AHMADKHANIHA, R. (2013). Development and validation of a simple and sensitive HPLC–UV method for the determination of captopril in human plasma using a new derivatizing reagent 2-naphthyl propiolate. *J Chromatog B*, **932**: 144-151.

RAY SC (2015). Application of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials. Waltham, MA: Elsevier.

REYNOLDS JEF (1989). Antithyroid agents, Martindale. In: The Extra Pharmacopoeia, 29th ed., Ed.: J.E.F. Reynolds. The Pharmaceutical Press, London, 682–688.

REZENDE KR, MUNDIM IM, TEIXEIRA LS, SOUZA WC, RAMOS DR, CARDOSO CR, SOUZA IC, GRATAO MZ, BELLÓRIO, K. B. (2007). Determination of captopril in human plasma, using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography, coupled to mass spectrometry: Application to bioequivalence study. *J Chromatogr B*, **850**: 59–67.

RILEY CM (1996). Statistical Parameters and Analytical Figures of Merit. In: *Pharmaceutical and Biomedical Analysis: Development and Validation of Analytical Methods*. Ed.: RILEY C M, ROSANSKE TW, Oxford: Elsevier. 15–72.

RIVAS L, (2015). Electrochemical and optical nanoparticle-based biosensors for point-of-care applications, Doktora Tezi, Autonoma Universitesi, Ispanya

RUMMELI MH, AYALA P, PICHLER T (2010). Carbon Nanotubes and Related Structures: Production and Formation. In: *Carbon Nanotubes and Related Structures: Synthesis, Characterization, Functionalization and Applications*, Ed.: Guldi, D. M., Martin, N., Weinheim: Wiley-VCH. 1–21.

RXMEDIAPHARMA® 2016 İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı-Kaptopril

RXMEDIAPHARMA® 2016 İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı-Metimazol

RXMEDIAPHARMA® 2016 İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı-Sildenafil

SADOWSKI Z, MALISZEWSKA IH. (2011). Applications of Gold Nanoparticles: Current Trends and Future Prospects. In: *Metal Nanoparticles in Microbiology*, Ed.: Rai, M., Duran, N., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 225–248.

SALEH TA, AL-SHALALFEH MM, AL-SAADI AA. (2016). Graphene Dendrimer-stabilized silver nanoparticles for detection of methimazole using Surface-enhanced Raman scattering with computational assignment. *Scientific Reports*, **6**: 32185–32197.

SALEM II, SAIF WA, JMEIAN Y, AL TAMIMI JI. (2005). A selective and rapid method for the quantification of captopril in human plasma using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry. *J Pharma Biomed Anal*, **37**: 1073–1080.

SANCHEZ-FERRER A, RODRIGUEZ-LOPEZ JN, GARCIA-CANOVAS F, GARCIA-CARMONA F (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1247**: 1–11.

SANCHEZ-PEDRENO C, ALBERO MI, GARCIA MS, RODENAS V, (1995). Flow-injection spectrophotometric determination of carbimazole and methimazole. *Anal. Chim. Acta*, **308**: 457–461.

SCHELLER F, SCHUBERT F, PFEIFFER D, HINTSCHE R, DRANSFELD I, RENNEBERG R, Wollenberger U, Riedel K, Pavlova M, Kühn M, Müller H-G, Tan P, Hoffmann W, Moritz W (1989). Research and development of biosensors. A review. *Analyst*, **114**: 653–662.

SCHELLER FW, SCHUBERT F, RENNEBERG R, MÜLLER H-G, JÄNCHEN M, WEISE H (1985). Biosensors: trends and commercialization. *Biosensors*, **1**: 135–160.

SELINGER KA (1996). Biological Samples. In: *Pharmaceutical and Biomedical Analysis: Development and Validation of Analytical Methods*. Ed.: Riley, C. M., Rosanske, T. W., Oxford: Elsevier. 249–292.

SEO S-Y, SHARMA VK, SHARMA N (2003). Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *J Agric Food Chem*, **51**: 2837−2853.

SETHI RS (1994). Transducer aspects of biosensors. *Biosens Bioelectron*, **9**: 243–264.

SHAH VP, MIDHA KK, DIGHE S, MCGILVERAY IJ, SKELLY JP, YACOBI A, LAYLOFF T, VISWANATHAN CT, COOK CE, MCDOWALL RD, PITTMAN KA, SPECTOR S (1992) Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Pharm Res* **9**:588–592.

SHAH VP, MIDHA KK, FINDLAY JW, HILL HM, HULSE JD, MCGILVERAY IJ, MCKAY G, MILLER KJ, PATNAIK RN, POWELL ML, TONELLI A, VISWANATHAN CT, YACOBI A (2000) Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* **17**:1551–1557.

SHAHROKHIAN S, GHALKHANI M (2008). Voltammetric Determination of Methimazole Using a Carbon Paste Electrode Modified with a Schiff Base Complex of Cobalt. *Electroanal*, **20**: 1061–1066.

SHARMA SK, SEHGAL N, KUMAR A (2003). Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Curr Appl Phys*, **3**: 307–316.

SHENG Z, HAN H, YANG G. (2011). A novel method for sensing of methimazole using gold nanoparticle-catalyzed chemiluminescent reaction. *Luminescence*, **26**: 196–201.

SHICHIRI M, YAMASAKI Y, KAWAMORI R, HAKUI N, ABE H (1982). Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. *The Lancet*, **320**: 1129–1131.

SHLEEV S, TKAC J, CHRİSTENSON A, RUZGAS T, YAROPOLOV AI, WHİTTAKER JW, GORTON L (2005). Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosens Bioelectron*, **20:** 2517–2554.

SIMIELE M, PENSI D, PASERO D, IVALDI F, RINALDI M, DI PERRI G, RANIERI VM, D'AVOLIO A (2015). Development and validation of an ultra performance liquid chromatography tandem mass method for sildenafil and N-desmethyl sildenafil plasma determination and quantification. *J Chromatogr B,* **1001**: 35–40.

SIVANESAN A, JOHN SA (2009). Gold nanoparticles modified electrodes for biosensors. In: *Nanostructured Materials for Electrochemical Biosensors*, Ed.: Yogeswaran, U., Kumar, S., Chen, S., New York, NY: Nova Science Publishers. 97–128.

SKOWRON M, CIESIELSKI W (2011). Spectrophotometric Determination of Methimazole, D-Penicillamine, Captopril, and Disulfiram in Pure Form and Drug Formulations, *J Anal Chem*, **66**:714–719.

SOPHA H, HOCEVAR SB, PIHLAR B, OGOREVC B (2012). Bismuth film electrode for stripping voltammetric measurement of Sildenafil citrate. *Electrochim Acta*, **60**: 274–277.

SRINUBABU G, JAGANBABU K, SUDHARANI B, VENUGOPAL K, GIRIZASANKAR G, RAO JVLNS (2006). Development and validation for the determination of an experimental design. *Chromatographia*, **64:** 95–100.

STEFAN-VAN STADEN RI, VAN STADEN JF, ABOUL-ENEIN HY (2010). Diamond paste-based electrodes for the determination of Sildenafil citrate (Viagra). *J Solid State Electrochem*, **14**: 997–1000.

STIEF CG (2000). Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of erectile dysfunction. *Drug Today*, **36**: 93.

STRACH B, WYSKA E, POCIECHA K, KRUPA A, JACHOWICZ R. (2015). Sensitive and precise HPLC method with back-extraction clean-up step for the determination of sildenafil in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*, **29**: 1559–1566.

SUAREZ-MARTINEZ I, GROBER N, EWELS CP (2012). Encyclopedia of Carbon Nanoforms. In: *Advances in Carbon Nanomaterials: Science and Applications*, Ed.: Tagmatarchis N., Singapore: Pan Stanford Publishing. 1–66.

SULTANA N, ARAYNE MS, ALI S. N. (2013). Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of captopril, piroxicam, and amlodipine in bulk drug, pharmaceutical formulation, and human serum by programming the detector. *J Sep Sci*, **36**: 3176–3183.

SUN G, NICKLAUS M, KERTESZ M (2004). Single-Walled Carbon Nanotubes: Geometries, Electronic Properties, and Actuation. In: *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Ed.: Schwarz, J. A., Contescu, C. I., Putyera, K., Volume 5. Boca Raton, FL: CRC Press. 3605–3615.

SWAIN GM (2007). Solid Electrode Materials: Pretreatment and Activation. In: *Handbook of Electrochemistry*, Ed.: Zoski, C. G., Amsterdam: Elsevier. 111–154.

SWARTZ ME, KRULL I (2012). Handbook of Analytical Validation. Boca Raton, FL: CRC Press.

TAEI M, HASANPOUR F, ZAHEDI G (2015). Application of New Ferrocene Derivative for Electrocatalytic Determination of Captopril Using Multiwall Carbon Nanotube Modified Carbon Paste Electrode. *B Chemi Soc Ethiopia*, **29**: 149–156.

TAMAYO J, KOSAKA PM, RUZ JJ, SAN PAULO A, CALLEJA M (2013). Biosensors based on nanomechanical systems. *Chem Soc Rev*, **42**: 1287–1311.

TAVAKKOLI N, SOLTANI N, KHORSHIDI E. (2015). Fabrication of Ru–Pd bimetallic monolayer on nanoporous gold film electrode with excellent electrocatalytic performance towards captopril oxidation. *Electrochim Acta*, **164**: 1–11.

THEVENOT DR, TOTH K, DURST RA, WILSON GS (1999). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Appl Chem*, **71**: 2333–2334.

THEVENOT DR, TOTH K, DURST RA, WILSON GS (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron*, **16**: 121–131.

TIWARI PM, BAWAGE SS, SINGH SR (2015). Gold Nanoparticles and their Applications in Photomedicine Diagnosis and Therapy. In: *Applications of Nanoscience in Photomedicine*, Ed.: Hamblin, M. R., Avci, P., Cambridge: Woodhead Publishing. 249–266.

TROJANOWICZ M, MATUSZEWSKI W, PODSIADLA M (1990). Enzyme Entrapped Polypyrrole Modified Electrode for Flow-Injection Determination of Glucose. *Biosens Bioelectron*, **5**: 149–156.

TU CQ, WEN XR. (2013). Indirect Determination of Methimazole in Pharmaceutical Sample by Discoloration Spectrophotometry Using Fe (III)-Tiron System. *Advanced Materials Research Trans Tech Publications.* **781**: 115–119.

TURNER A, KARUBE I, WILSON GS (1987). *Biosensors: fundamentals and applications*. United States: Oxford Science Publications.

TURNER AP (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev*, **42**: 3184–3196.

TYSZCZUK K, KOROLCZUK M (2010). Voltammetric method for the determination of Sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations. *Bioelectrochemistry*, **78**: 113–117.

UMRANI DN, GOYAL RK (1999) Pharmacology of sildenafil citrate, *Indian J Physiol Pharmacol*, **43**:160–164

USLU B, ÖZKAN SA (2007). Solid Electrodes in Electroanalytical Chemistry: Present Applications and Prospects for High Throughput Screening of Drug Compounds. *Comb Chem High T Scr*, **10:** 495–513.

USP 31, (2008) The United States Pharmacopeia XXXI, General Chapter 1225, Validation of Compendial Methods, Rockville, MD, The United States Pharmacopeial Convention, Inc.

VAN GELDER CWG, FLURKEY WH, WICHERS HJ (1997). Sequence and Structural Features of Plant and Fungal Tyrosinases. *Phytochemistry*, **45**: 1309–1323.

VANCEA S, IMRE S, DONÁTH-NAGY G, BÉLA T, NYULAS M, MUNTEAN T, BORKA-BALÁS R. (2009). Determination of free captopril in human plasma by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Talanta*, **79**: 436–441.

VARGAS-BERNAL R, RODRÍGUEZ-MİRANDA E, HERRERA-PÉREZ G (2012). Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides. INTECH Open Access Publisher.

WALLIS R M (1999). The pharmacology of sildenafil, a novel and selective inhibitor of phosphodiesterase (PDE) type 5. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, **114**:22–26.

WALSH J (1993). Jaroslav Heyrovský, 1890-1967. In: *Nobel Laureates in Chemistry, 1901–1992*, Ed.: Laylin, J. K., Philadelphia, PA: Chemical Heritage Foundation. 412–418.

WANG J (1988). Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. New York, NY: VCH Publishers.

WANG J (2005). Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*, **130**: 421–426.

WANG J (2006). Analytical Electrochemistry. 3rd Ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons.

WANG J, TIAN B, LU J, MACDONALD D, WANG J, LUO D (1998). Renewable Reagent Enzyme Inhibition Sensor for Remote Monitoring of Cyanide. *Electroanal*, **10**: 1034–1037.

WEETALL HH, ROYER GP (1980). *Enzyme Engineering.* Plenum Press, New York.

WEETMAN AP, MCGREGOR AM, HALL R (1984). Evidence for an effect of antithyroid drugs on the natural history of Graves' disease. *Clin. Endocrinol.* **21**: 163–172.

WENDT H, KREYSA G (1999). Electrochemical Engineering: Science and Technology in Chemical and Other Industries. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.

WHITEMAN M, HALLIWELL B (1997). Thiols and disulphides can aggravate peroxynitrite-dependent inactivation of ai-antiproteinase. *Febs Lett*, **414**: 497–500.

WILLETS P, WOOD R, (2000). A Critique on Available In-House Method Validation Documentation. In: *Principles and Practices of Method Validation*. Ed.: Fajgelj, A., Ambrus, A., Cambridge: Royal Society of Chemistry. 253–296.

WITTMER VL, WAICHERT EJ, GAVA PL, PEREIRA FE, GUIMARAES MC, DE FIGUEIREDO SG, MAUAD H (2015). Effects of captopril on cardiovascular reflexes and respiratory mechanisms in rats submitted to monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Pulm Pharmacol Ther,* **30**: 57–65.

XI X, MING L, LIU J (2010). Electrochemical determination of thiamazole at a multi-wall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *J Appl Electrochem*, **40**: 1449–1454.

XIAO C, TANG M, LI J, YIN CR, XIANG G, XU L. (2013). Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction-back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *J Chromatogr B*, **931**: 111–116.

YAZHEN W (2011). Electrochemical determination of methimazole based on the acetylene black/chitosan film electrode and its application to rat serum samples. *Bioelectrochemistry*, **81**: 86–90.

ZAKRZEWSKI, R. (2008). Determination of methimazole in urine with the iodine-azide detection system following its separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, **869**: 67–74.

ZARGAR B, PARHAM H, HATAMIE A (2015). Electrochemical investigation and stripping voltammetric determination of captopril at CuO nanoparticles/multi-wall carbon nanotube nanocomposite electrode in tablet and urine samples. *Anal Meth*, **7**: 1026–1035.

ZHANG Y, HUANG Z, DING L, YAN H, WANG M, ZHU S (2010). Simultaneous determination of yohimbine, sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, **33:** 2109–2114.

ZICHA J, DOBESOVA Z, ZIDEK V, SILHAVY J, SIMAKOVA M, MLEJNEK P, VANECKOVA I, KUNES J, PRAVENEC M (2014). Pharmacogenetic analysis of captopril effects on blood pressure: possible role of the Ednrb (endothelin receptor type B) candidate gene, *Physiol Res*, **63**:263–265.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: SEVİNÇ

Soyadı: KURBANOĞLU

Doğum yeri ve tarihi: BORNOVA, 09.05.1985

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı, 06100, Tandoğan-Ankara, 0312 2033181

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

Öğrenim Dönemi	Derece	Öğrenim Birimi	Öğrenim Alanı	Ünvan
2008-2010	Yüksek Lisans	ODTÜ	FIZIKO KIMYA	Uzman Kimyager
2003-2008	Lisans	ODTÜ	KIMYA	Kimyager
1995-2003	Lise	BALIKESİR SIRRI YIRCALI ANADOLU LİSESİ	-	-

III- Ünvanları

Araştırma Görevlisi: 2011-

Uzman Kimyager: 2010-

Kimyager: 2008-

IV-Mesleki Deneyimleri

Aralık 2011- Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Araştırma Görevlisi

2010-2011, Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. ARGE Analitik Uzmanı

Temmuz- Ekim 2013, Prof. Dr. Arben Merkoçi, Barselona Autonoma Universitesi, Ispanya, Enzim İnhibisyonuna Yönelik Nanobiyosensörlerin Geliştirilmesi

Haziran-Eylül 2009, Prof. Dr. Lo Gorton, Lund Üniversitesi, Lund, İsveç, Osmium Polimer Bazlı Enzimatik Biyosensörlerin Dizaynı

2008-2010, Prof. Dr. Suna Timur, Ege Üniversitesi, Mikrobiyel Biyosensörlerin Dizaynı

2005 – 2010, Prof. Dr. Levent Toppare, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, İletken Polimer Bazlı Enzimatik Biyosensörlerin Dizaynı

Ağustos-2007, ŞİŞECAM Cam Araştırma Merkezi, Topkapı, İstanbul

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

International Society of Electrochemistry

Bioelectrochemistry Society

American Chemical Society

VI- Bilimsel İlgi Alanları (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

SCI ve SCI - Expanded indekslerde yer alan dergilerde yapılan yayınlar

1. KURBANOĞLU S, ÖZKAN SA, MERKOÇİ A. Nanomaterials-Based Enzyme Electrochemical Biosensors Operating Through Inhibition For Drug Analysis, Safety And Security Applications. *Biosensors and Bioelectronics*, Baskıda.

2. KURBANOGLU S, RIVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇİ A. Electrochemically Reduced Graphene And Iridium Oxide Nanoparticles For Inhibition-Based Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Detection. *Biosensors and Bioelectronics*, Baskıda.

3. BOZAL PALABIYIK B, KURBANOĞLU S, USLU B, ÖZKAN SA, ZUMAN P (2016). Diffusion, Adsorption And Electrode Kinetics Of Electro-Oxidatons On A Stationary Solid Electrode. *Electroanalysis*, **28**: 1 – 10.

4. ÖZKAN CK, KURBANOĞLU S, EŞİM Ö, SAVASER A, ÖZKAN SA, ÖZKAN Y (2016). A Novel Rp-Lc Method For The Simultaneous Determination Of Two Combined Tablet Form Of Amlodipine. *Chromatographia,* **79**: 1143–1151.

5. KURBANOGLU S, DOGAN-TOPAL B, RODRIGUEZ EP, BOZAL-PALABIYIK B, ÖZKAN S, USLU B (2016). Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* **775**: 8–26.

6. AZAK H, KURBANOĞLU S, YILDIZ HB, ÖZKAN SA (2016). Electrochemical Glucose Biosensing via New Generation DTP Type Conducting Polymers/Gold Nanoparticles/Glucose Oxidase Modified Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* **770**: 90–97.

7. ÖZKAN CK, EŞİM Ö, KURBANOĞLU S, SAVAŞER A, ÖZKAN S, ÖZKAN Y (2016). Development of a Suitable Simultaneous Dissolution Method for the Combined Tablet Formulation of Atorvastatin and Ezetimibe by RP-LC Method. *Current Drug Delivery,* **13**: 424–432.

8. KURBANOGLU S, BOZAL PALABIYIK B, GÜMÜŞTAŞ M, USLU B, ÖZKAN SA (2015). Investigation of voltammetric behavior and electroanalytical determination of anticancer epirubicin via glassy carbon electrode using differential pulse and square wave voltammetry techniques. *Revue Roumanie de Chimie*, **60**: 491–499.

9. KURBANOĞLU S, TOPPARE L (2015). Ethanol Biosensor Based On Immobilization of Alcohol Oxidase in a Conducting Polymer Matrix via Crosslinking With Glutaraldehyde, *Revue Roumanie de Chimie,* **60**: 453-460.

10. KURBANOĞLU S, MAYORGA-MARTINEZ CC, MEDINA-SÁNCHEZ M, RIVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇİ A (2015). Antithyroid drug detection using an

enzyme cascade blocking in a nanoparticle-based lab-on-a-chip system. *Biosensors and Bioelectronics*, **67**: 670–676.

11. KURBANOGLU S, DOGAN-TOPAL B, HLAVATA L, LABUDA J, ÖZKAN SA, USLU B (2015). Electrochemical investigation of an interaction of the antidepressant drug aripiprazole with original and damaged calf thymus dsDNA, *Electrochimica Acta*, **169**: 233–240

12. MAYORGA-MARTINEZ CC, PINO F, KURBANOĞLU S, RIVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇI A (2014). Iridium oxide nanoparticle induced dual catalytic/inhibition based detection of phenol and pesticide compounds. *Journal of Material Chemistry B*, **2**: 2233–2239.

13. KURBANOĞLU S, SAN MIGUEL PR, USLU B, ÖZKAN SA (2014). Stability Indicating UPLC Method for the Determination of Bisoprolol Fumarate and Hydrochlorothiazide: Application to Dosage Forms and Biological Sample. Chromatographia, **77**: 365–371.

14. KURBANOĞLU S, ASHRAFI AM, VYTŘAS K, USLU B, ÖZKAN SA (2014). Determination and Validation of the Antiviral Drugs Using Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic Method. *Current Drug Therapy*, **9**: 256–260.

15. ASHRAFI AM, KURBANOĞLU S, VYTŘAS K, USLU B, ÖZKAN SA (2014). Electrochemical mechanism and sensitive assay of antiretroviral drug Abacavir in biological sample using multiwalled carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. *Journal of Electronalytical Chemistry*, **712**: 178-184.

16. BAYRAK Z, KURBANOĞLU S, SAVASER A, ÖZKAN SA, ALTUNAY H, TAŞ Ç, KÖSE ÖZKAN C, ÖZKAN Y (2014). A novel and stability indicating LC-MS method for the sensitive determination of Metoclopramide: Application to rabbit plasma, gel formulations and pharmaceuticals. *Chromatographia*, **77**: 99–107.

17. KURBANOĞLU S, GÜMÜŞTAŞ M, ÖZKAN SA (2014). Simultaneous Determination and Validation of Some Binary Mixtures of Antihypertansive Drugs Using Ratio Derivative Spectrophotometric Method. *Journal of Analytical Chemistry*, **69**: 935–941.

18. KURBANOĞLU S, BOZAL-PALABIYIK B, GÜMÜŞTAŞ M, KAMACI S, USLU B, ÖZKAN SA (2014). Development and validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of anticancer drug epirubicin in pharmaceuticals. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **37**: 1583–1596.

19. BOZAL-PALABIYIK B, KURBANOĞLU S, GÜMÜŞTAŞ M, USLU B, ÖZKAN SA (2013). Electrochemical approach for the sensitive determination of anticancer drug epirubicin in pharmaceuticals in the presence of anionic surfactant. *Revue Roumanie de Chimie*, **58**: 647–658.

20. GÜMÜŞTAŞ M, KURBANOĞLU S, USLU B, ÖZKAN SA (2013). UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, **76**: 1365–1427.

21. KURBANOĞLU S, GÜMÜŞTAŞ M, USLU B, ÖZKAN SA (2013). A Novel, Sensitive and Selective RP-LC Method for the Simultaneous Determination of the Antihypertensive Drugs, Enalapril, Lercanidipine, Nitrendipine and Their Validation. Chromatographia, **76**: 1477–1485.

22. AL LAYLAA AMT, TÜRKARSLAN Ö, KURBANOĞLU S, SULAIMAN ST, AL-FLAYEH KA, TOPPARE L (2013). A New Amperometric Biosensor for Diamine: Use of a Conducting Polymer Layer. Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry, **50**: 914–922.

23. KURBANOGLU S, DOGAN-TOPAL B, USLU B, CAN A, ÖZKAN SA (2013). Electrochemical investigations of anticancer drug idarubicin using multi-walled

carbon nanotubes modified glassy carbon and pyrolytic graphite electrodes. *Electroanalysis*, **25**: 1473–1482.

24. KURBANOĞLU S, GÜMÜŞTAŞ M, ÖZKAN SA (2013). Simultaneous Estimation and Validation of Some Binary Mixtures of Antihypertensive Drugs by RP-LC Methods Using Two New Generation Silica Columns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **72**: 198–200.

25. TANRIVERDİ S, TUNCAGIL S, TOPPARE L (2012). A New Amperometric Alcohol Oxidase Biosensor Based on Conducting Polymer of (4,7-Dithien-2-yl-2, 1,3-benzothiadiazole). *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry*, **49**: 185–190.

26. TUNÇAĞIL S, ÖZDEMİR C, ODACI D, TİMUR S, TOPPARE L (2011). Gold nanoparticle modified conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-l) benzenamine for potential use as a biosensing material. *Food Chemistry*, **127**: 1317–322.

27. ÖZDEMİR Ç, TUNCAGIL S, ODACİ D, TİMUR S, TOPPARE L (2011). Design of Carbon Nanotube Modified Conducting Polymer for Biosensing Applications. *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure And Applied Chemistry*, **48**: 503–508.

28. IŞIKLI Ş, TUNCAGIL S, BOZKURT A, TOPPARE L (2010). Immobilization of Invertase in a Novel Proton Conducting Poly(vinylphosphonic acid)-poly(1-vinylimidazole) Network. *Journal of Macromolecular Science, Part A Pure and Applied Chemistry*, **47**: 639–646.

29. TUNÇAĞIL, VARIŞ S, TOPPARE L (2010). Design of a biosensor based on 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1H pyrrole, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic* **64**: 195–199.

30. ERDOĞAN H, TUNÇAĞIL S, TOPPARE L (2010). L-Dopa Synthesis on Conducting Polymers. *Journal of Macromolecular Science, Part A Pure and Applied Chemistry*, **47**: 209–214.

31. TUNÇAĞIL S, ODACI D, VARIŞ S, TİMUR S, TOPPARE L (2009). Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing. *Bioelectrochemistry*, **76**: 169–174.

32. TUNÇAĞIL S, KAYAHAN SK, BAYRAMOGLU G, ARİCA MY, TOPPARE L (2009). L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **58**: 187–193.

33. TUNÇAĞIL S, ODACI D, YILDIZ E, TİMUR S, TOPPARE L (2009). Design of a microbial sensor using conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-l) benzenamine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **137**: 42–47.

34. TUNÇAĞIL S, KIRALP S, VARIS S, TOPPARE L (2008). Immobilization of invertase on a conducting polymer of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1H-pyrrole. *Reactive and Functional Polymers*, **68**: 710–717.

Kitap Bölümü

1- ÖZKAN SA, GÜMÜŞTAŞ M, TUNÇAĞIL S (2012). 2. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabında Bölüm Yazarlığı. Bölüm: Elektrokimyasal analizlerde analitik yöntem optimizasyonu ve validasyonu, Gökçel, İ.(Ed.). 95–118.

2- TUNÇAĞIL S., GÜMÜŞTAŞ M, ÖZKAN SA (2012). 2. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabında Bölüm Yazarlığı. Bölüm: Anti Parkinson ilaç etken maddesi L-Dopa'nın elektrokimyasal analizi ve validasyonu, Gökçel, İ.(Ed.). 263–275.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Ödüller

AMERİKAN KİMYA DERNEĞİ, EN İYİ SÖZLÜ SUNUM ÖDÜLÜ, 3rd International Conference on Analytical Chemistry. Analytical Chemistry for a Better Life. 28-31 Ağustos 2016, Yaş, Romanya. Sevinc Kurbanoglu, Lourdes Rivas, Sibel A. Özkan, Arben Merkoçi, A dual electrochemical nanobiosensor for the inhibition based detection of captopril and catechol.

AMERİKAN KİMYA DERNEĞİ, EN İYİ SÖZLÜ SUNUM ÖDÜLÜ, 2nd International Conference on Analytical Chemistry. Analytical Chemistry for a Better Life. 17-21 Eylül 2014, Targoviste, Romanya. Sevinc Kurbanoglu, Carmen C. Mayorga-Martinez, Mariana Medina, Lourdes Rivas, Sibel A. Ozkan, Arben Merkoçi, Electrochemical nanobiosensors for the dual catalytic/inhibition based biosensing of methimazole and catechol.

ORD. PROF. DR. İLHAMİ CIVAOĞLU POSTER SUNUM ÖDÜLÜ, 9. International Electrochemistry Meeting, 25-29 Eylül 2011, Çeşme, İzmir, Turkiye, Sevinç Tunçağıl, Mehmet Gumustas, Burçin Bozal, Bengi Uslu, Sibel A. Özkan, Electrochemical Behavior of Epirubicin at Boron-Doped Diamond Electrode and Its Determination in the Presence of Surfactants

POSTER SUNUM ÖDÜLÜ, Uluslararası Enzim Mühendisliği Kongresi, 1-5 Ekim 2008, Kuşadası, Sevinc Tuncagil, Serhat Varis, Levent Toppare, Conducting Polymers & Biosensors, A biosensor based on 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1H pyrrole

2007-2008 ODTÜ Kimya Bölümü Şeref Öğrencisi

Uluslararası kongre, sempozyum, çalıştay ve panel gibi bilimsel toplantılara ait bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. KURBANOĞLU S, RİVAS L, OZKAN SA, MERKOÇİ A (2016). A Novel Enzymatic Biosensor for the Detection of Catechol, International Symposium on Electrocatalysis, 11-14 Eylül, Japonya.

2. KURBANOĞLU S, RİVAS L, OZKAN SA, MERKOÇİ A (2016). A dual electrochemical nanobiosensor for the inhibition based detection of captopril and catechol, 3rd International Conference on Analytical Chemistry. Analytical Chemistry for a Better Life. 28-31 Ağustos, Yaş, Romanya.

3. KURBANOĞLU S, EŞİM Ö, KÖSE ÖZKAN C, SAVASER A, ÖZKAN SA, ÖZKAN Y (2016). Determination of dihydroergotamine via lc method coupled with fluorescence detection in pharmaceutical film preparations, 3rd International Conference on Analytical Chemistry. Analytical Chemistry for a Better Life. 28-31 Ağustos, Yaş, Romanya.

4. KARADURMUŞ L, KURBANOĞLU S, USLU B, ÖZKAN SA (2016). Electrochemical determination of rosuvastatin and ezetimibe from human serum and urine, 3rd International Conference on Analytical Chemistry. Analytical Chemistry for a Better Life. 28-31 Ağustos, Yaş, Romanya.

5. KURBANOĞLU S, ÖZKAN SA, MERKOÇİ A (2016). Nanomaterials -based biosensors operating through inhibition inducing biochemical reactions for drug analysis, safety and security applications, Biosensors 2016, 25-27 Mayıs, İsveç.

6. KURBANOĞLU S, RİVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇİ A (2016). Electrochemically reduced graphene and iridium oxide nanoparticles for inhibition based angiotensin-converting enzyme inhibitor detection and determination, Biosensors 2016, 25-27 Mayıs, İsveç.

7. KOSE ÖZKAN C, KURBANOĞLU S, EŞİM Ö, SAVAŞER A, ÖZKAN SA, ÖZKAN Y (2015). A novel RP-LC method for the simultaneous determination of two combined tablet form of amlodipine, 143rd Symposium of HPLC And Related Techniques (HPLC 2015), 21-25 September Beijing, Çin.

8. KURBANOĞLU S, EŞİM Ö, KÖSE ÖZKAN C, SAVASER A, ÖZKAN Y, ÖZKAN SA (2015). Development of RP-LC Method For The Simultaneous Determination Of Simvastatin And Ezetimibe From Rabbit Plasma, Pharmaceutical Dosage Form And Drug Dissolution Studies, The European Conference on analytical chemistry, EUROANALYSIS 2015, 6-10 Eylül, Bordö, Fransa.

9. DOGAN-TOPAL B, KURBANOĞLU S, HLAVATAL, LABUDA J, USLU B, ÖZKAN SA (2015). UV-Visible spectrophotometric study of the ınteraction of aripiprazole with dsDNA, 5-8 Temmuz, Tiflis, Gürcistan.

10. KURBANOĞLU S, DOGAN-TOPAL B, HLAVATA L, LABUDA J, ÖZKAN SA, USLU B (2015). Detection of Damaged DNA-Antidepressant Drug Interaction Through Electrochemical DNA Biosensor, 26th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 5-8 Temmuz, Tiflis, Gürcistan.

11. KURBANOĞLU S, MAYORGA-MARTİNEZ CC, MEDİNA M, RİVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇİ A (2015). Design of a Lab-on-a-chip system for the detection of Antithyroid drug using an enzyme cascade blocking in a nanoparticle-based, XXIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 14-18 Haziran, Malmö, İsveç.

12. KURBANOĞLU S, MAYORGA-MARTİNEZ CC, MEDİNA M, RİVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇİ A (2015). Design of a electrochemical nanobiosensor for the determination of catechol, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 11), 9-12 Haziran, Ankara, Turkey.

13. KOSE ÖZKAN C, EŞİM Ö, KURBANOĞLU S, SAVAŞER A, ÖZKAN SA, ÖZKAN Y, (2015) Development Of A Suitable Simultaneous Dissolution Method For Atorvastatin And Ezetimibe In Their Pharmaceutical Dosage Form By RP-LC, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 11), 9-12 Haziran 2015, Ankara, Türkiye.

14. KURBANOĞLU S, MAYORGA-MARTINEZ CC, MEDINA M, RIVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇI A, (2014) Electrochemical nanobiosensors for the dual catalytic/inhibition based biosensing of methimazole and catechol, 2nd International Conference on Analytical Chemistry. Analytical Chemistry for a Better Life. 17-21 Eylül, Targoviste, Romanya.

15. KURBANOĞLU S, DOGAN-TOPAL B, HLAVATA L, LABUDA J, ÖZKAN S A, USLU B, (2014) Electrochemical interaction of antidepressant drug aripiprazole with DNA and DNA damage induced by UV-C radiation and chemical agents, 11-15 Haziran, Malmö, İsveç.

16. KURBANOĞLU S, ASHRAFI AM, VYTŘAS K, USLU B, ÖZKAN SA, (2014) Electrochemical mechanism and sensitive assay of antiretroviral drug Abacavir in biological sample using multiwalled carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode, Symposium of the Analytical Division of SPQ-2014, 14-15 Nisan, Coimbra, Portekiz.

17. KURBANOĞLU S, GUMUŞTAŞ M, USLU B, ÖZKAN SA, (2013) A novel, sensitive and selective RP-LC method for the simultaneous determination of the antihypertensive drugs, enalapril-lercanidipine. 20 th International Symposium on Electro-and Liquid Phase-Separation Techniques, 6-9 Ekim 2013, Puerto de la Cruz, Tenerife, Canary Island, İspanya, PS2-16.

18. KURBANOGLU S, DOGAN-TOPAL B, USLU B, CAN A, ÖZKAN SA (2013). Electrochemical investigations of anticancer drug idarubicin using multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon and pyrolytic graphite electrodes,

Internationally Participated Electrochemistry Workshop Nanostructure Modified Electrochemical and Bioelectrochemical Systems 23-28 Haziran, Muğla Turkey, P-55.

19. TUNÇAĞIL S, DOGAN TOPAL B, USLU B, ÖZKAN SA (2012). Carbon nanotube modified electrodes for electrochemical assay of idarubicine, 1st International Conference on Analytical Chemistry, 18-21 Eylül, Targoviste- Romanya, Abstract P-63.

20. GÜMÜŞTAŞ M, TUNÇAĞIL S, ÖZKAN SA (2012). Simultaneous estimation and validation of some binary mixtures of antihypertensive drugs by RP-LC method, 1st International Conference on Analytical Chemistry, 18-21 Eylül, Targoviste- Romanya, Abstract P-147.

21. TUNÇAĞIL S, DOĞAN-TOPAL B, USLU B, ÖZKAN SA (2012). Novel sensor based on multi walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for the determination of idarubicin. 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 10), 26-29 Haziran, Ankara-Türkiye. Abstract P-151.

22. TUNÇAĞIL S, GÜMÜŞTAŞ M, BOZAL-PALABIYIK B, USLU B, ÖZKAN SA (2012). Determination of anticancer drug epirubicine in pharmaceutical preparations via glassy carbon electrode. 14th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2012), 3-7 Haziran, Portoroz, Slovenya. Abstract P2-9.

23. TUNÇAĞIL S, GÜMÜŞTAŞ M, Bozal B, Uslu B, Özkan SA (2011). Understanding Electrochemical Mechanism of Epirubicin on Glassy Carbon Electrode via Model Pharmaceutials, 9. International Electrochemistry Congress, 25-29 Eylül, İzmir, Türkiye, Abstract P-072.

24. TUNÇAĞIL S, GÜMÜŞTAŞ M, BOZAL B, USLU B, ÖZKAN SA (2011). Electrochemical Behavior of Epirubicin at Boron-Doped Diamond Electrode and Its Determınation in the Presence of Surfactants, 9. International Electrochemistry Congress, 25-29 Eylül, İzmir, Türkiye, Abstract P-044.

25. TUNÇAĞIL S, SPADİUT O, ANZENGRUBER J, ZAFAR MN, TASCA F, TİMUR S, TOPPARE L, HALTRİCH D, GORTON L (2009). Biosensing Applications Of Engineered Pyranose 2-oxidases Wired With Osmium Polymers, International Workshops on Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing (SMCBS'09), 6-10 Kasım, Krakow, Polonya.

26. EKİZ F, TUNÇAĞIL S, ÖZDEMİR Ç, ODACI D, TİMUR S, TOPPARE L (2009). Amperometric glucose biosensing via pyronase oxidase biosensor modified with conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-l) benzenamine, 8. International Electrochemistry Congress, 8-11 Ekim, Antalya, Türkiye.

27. TUNÇAĞIL S, ÖZDEMİR Ç, ODACI D, TİMUR S, TOPPARE L (2009). Gold nanoparticle effect on conducting poly(4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1h-pyrrol-1-yl) benzenamine) electrochemical biosensor, 8. International Electrochemistry Congress, 8-11 Ekim, Antalya, Türkiye.

28. TUNÇAĞIL S, ÖZDEMİR Ç, ODACI D, TİMUR S, TOPPARE L (2009). Gold Nanoparticle effect on conducting polymer based Biosensors, 8th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, 4-7 Ekim, Dresden, Germany.

29. TUNCAĞIL S, ODACI D, VARIŞ S, TİMUR S, TOPPARE L (2009). A Novel Immobilization Platform For Microbial Biosensing, Biotechnology Meeting, 27-30 Eylül, ODTU, Ankara.

30. TUNCAĞIL S, VARIŞ S, TOPPARE L (2008). Conducting Polymers & Biosensors, A biosensor based on 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1H pyrrole, International Symposium on Enzyme Engineering, 1-5 Ekim, Kuşadası, Türkiye.

31. TUNCAĞIL S, KIRALP KAYAHAN S, BAYRAMOGLU G, ARİCA MY, TOPPARE L (2007). L-Dopa synthesis using immobilized tyrosinase on magnetic beads, 4 th European Symposium on Biopolymers, 2-4 Ekim, Kusadasi, Türkiye.

Ulusal kongre, sempozyum, çalıştay ve panel gibi bilimsel toplantılara ait bildiri kitaplarında yer alan yayınlar (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

1. KARADURMUS L, KURBANOĞLU S, USLU B, ÖZKAN SA, (2016) Anti-Lipemik Rosuvastatin'in Elektrokimyasal Tayini, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi 30 Mayıs- 3 Haziran, Isparta, Türkiye.

2. AZAK H, KURBANOĞLU S, YILDIZ HB, ÖZKAN SA, (2016) Iletken polimer bazlı amperometrik glikoz biyosensörü geliştirilmesi, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi 30 Mayıs- 3 Haziran, Isparta, Türkiye

3. KURBANOGLU S, GUMUSTAŞ M, USLU B, ÖZKAN SA, (2015) Antihipertansif Enalapril, Lerkanidipin, Nitrendipin'in TF-SK İle Eş Zamanlı Tayin Yöntemleri Ve Validasyonu, 15. Ulusal Kromatografi Kongresi 8-10 Nisan, Uşak, Türkiye, 2015.

4. KURBANOĞLU S, MAYORGA-MARTINEZ CC, MEDINA M, RIVAS L, ÖZKAN SA, MERKOÇI A, (2014) Iridyum Oksit ve Tirozinaz Enzimi ile Fonksiyonlandırılmış Manyetik Nanopartikül Bazlı Elektrokimyasal Nanobiyosensör Tasarımı, VII. National Analytical Chemistry Congress, Ulusal-Analitik Kimya Kongresi 1-7 Eylül, Kahramanmaras, Türkiye.

5. TUNÇAĞIL, GUMUSTAŞ M, ÖZKAN SA, (2012) Yeni nesil kolonlarla antihipertansif ilaç etken maddeleri için eş zamanlı tayin yöntemleri ve validasyonu, VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 3-7 Eylül 2012, Hatay-Türkiye, Özet S-296.

6. TUNÇAĞIL S, ODACI D, TİMUR S, TOPPARE L, 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1h-pirol-1-l) benzenamin iletken polimerinin mikrobiyal sensör platformu olarak kullanımı 13. Ulusal Biyomedikal Mühendisliği Kongresi, 28-31 Mayıs 2008, ODTU, Ankara, Türkiye.

7. TUNÇAĞIL S, KIRALP KAYAHAN S, BAYRAMOGLU G, ARICA MY, TOPPARE L, Tyrosinaz enzimi tutuklanmış manyetik kürelerde L-Dopa sentezi, VII. Ulusal Kromotografi Kongresi, VII. Ulusal Kromotografi Kongresi, 13-15 Haziran 2007, Kırıkkale, Türkiye

Projeleri

1. PROJE ADI: Use of Conductive polymers and nanomaterials for the design of immobilization platforms for different enzyme sensors

PROJE ÇALIŞANLARI: Prof. Dr. Levent TOPPARE (ODTU), Assoc. Prof. Dr. Suna Timur (ODTU), Kim. Sevinç Tunçağıl (ODTU)

PROJE FONU: TÜBİTAK

PROJE NO: 1002 108T999

PROJE TARIHLERI: 15.04.2009-15.04.2010

2. PROJE ADI: Çeşitli İlaçların Tirozinaz İnhibisyonundaki Rollerini İncelemek Amaçlı Elektrokimyasal Nanobiyosensor Tasarımı

PROJE ÇALIŞANLARI: Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN (Ank. Üniv.), Arş. Gör. Sevinç Kurbanoğlu (Ank. Üniv.)

PROJE FONU: Ankara Universitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu

PROJE NO: 14L0237002

PROJE TARIHLERI: 2014 – 2015

3. PROJE ADI: Antipsikotik Aripiprazol ilaç etken maddesinin DNA ve hasarlı DNA ile etkileşiminin elektrokimyasal olarak incelenmesine ait biyosensör geliştirilmesi

PROJE ÇALIŞANLARI: Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN (Ank. Üniv.), Arş. Gör. Dr. Burcu Doğan Topal, Arş. Gör. Sevinç Kurbanoğlu

PROJE NO: Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu

PROJE NO: 15H0237001

PROJE TARIHLERI: 2015 – 2016