



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**NANOMALZEME KAPLI ELEKTROKİMYASAL SENSÖR
YARDIMIYLA ORAL ANTİDİYABETİK İLAÇLARIN
VOLTAMETRİK MİKTAR TAYİNİ**

Berfin ŞAK

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

**ANKARA
2024**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOMALZEME KAPLI ELEKTROKİMYASAL SENSÖR
YARDIMIYLA ORAL ANTİDİYABETİK İLAÇLARIN
VOLTAMETRİK MİKTAR TAYİNİ**

Berfin ŞAK

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

**ANKARA
2024**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Nanomalzeme Kaplı Elektrokimyasal Sensör Yardımıyla Oral Antidiyabetik İlaçların Voltametrik Miktar Tayini” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin adı ve soyadı: Berfin ŞAK

Tarih: 26.01.2024

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında

Berfin ŞAK tarafından hazırlanan

“Nanomalzeme Kaplı Elektrokimyasal Sensör Yardımıyla Oral Antidiyabetik İlaçların
Voltametrik Miktar Tayini” adlı

tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

26.01.2024

İmza

Prof. Dr. Bengi USLU

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Nevin ERK

Ankara Üniversitesi

Raportör

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Gizem TIRIS

Bezmîâlem Vakıf Üniversitesi

Üye

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

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Nanomalzeme Kaplı Elektrokimyasal Sensör Yardımıyla Oral Antidiyabetik İlaçların Voltametrik Miktar Tayini

Yüksek lisans tez çalışmasında, linagliptinin (LNG) elektroanalizi için hassas ve seçici bir sensör olarak nano elmas (NE) ve grafen nano plakalar (GNP) kaplı camı karbon elektrot (NE/GNP/CKE) kullanılmıştır.

Döngüsel voltametri (DV) içeren yöntem, CKE'ye kıyasla NE/GNP/CKE'nin 2,2 kat daha yüksek elektroaktif yüzey alanını ortaya çıkarmıştır. LNG'nin voltametrik cevabı, diferansiyel puls voltammetri (DPV) kullanılarak NE/GNP kaplı elektrot tarafından 4,66 kat artırılmıştır.

0,8 μM – 18,7 μM konsantrasyon aralığında gözlenebilirlik sınırı (GS) 0,20 μM olarak hesaplanmıştır. Gelişmiş yöntem, %1,01'lik bir bağıl standart sapma (BSS) ile farmasötik numune üzerinde pratik olmasının yanı sıra, idrar numunesindeki LNG miktarını tespit etmek için tatmin edici geri kazanım yüzdesi sonuçları ile (idrarda $100,1 \pm 1,22$; farmasötik dozaj formunda $101,2 \pm 2,66$) yeterliliğini göstermiştir.

Özetle, NE/GNP/CKE'nin rutin kalite değerlendirmelerinde ve klinik izlemede LNG tespiti için basit, pratik ve uygun maliyetli bir sensör olabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Elektrokimyasal sensör, Grafen nano plakalar, Linagliptin, Nano elmas, Trajenta®.

SUMMARY

Voltammetric Quantification of Oral Antidiabetic Drugs with The Help of Nanomaterial Coated Electrochemical Sensor

In the master's thesis study, nanodiamond (ND) and graphene nanoplatelets (GNP) coated glassy carbon electrode (ND/GNP/GCE) had been employed as a sensitive and selective sensor for the electroanalysis of linagliptin (LNG).

The method including cyclic voltammetry (CV) had revealed the 2,2-fold higher electroactive surface area of ND/GNP/GCE compared to that of GCE. The voltammetric response of LNG had been raised 4,66-fold by the ND/GNP covered electrode in differential pulse voltammetry (DPV).

The limit of detection (LOD) within the concentration ranges of $0,8 \mu\text{M}$ – $18,7 \mu\text{M}$ had been calculated as $0,20 \mu\text{M}$. The advanced method had exhibited its sufficiency with satisfactory % recovery results ($100,1 \pm 1,22$ in urine sample and $101,2 \pm 2,66$ in pharmaceutical sample) in order to detect the quantity of LNG in urine sample beside being practical upon pharmaceutical sample with a relative standard deviation (RSD) of %1,01.

To sum up, it is predicted that ND/GNP/GCE may be a straightforward, practical and cost-effective sensor for the detection of LNG in the routine quality evaluations and clinical monitoring.

Keywords: Electrochemical sensor, Graphene nanoplatelets, Linagliptin, Nanodiamond, Trajenta®.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler Ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Diyabet	1
1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Etken Madde	7
1.3. Linagliptin'in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	7
1.3.1. Kimyasal Yapı	7
1.3.2. Farmakolojik Özellikler	8
1.3.2.1. Farmakokinetik Özellikler	8
1.3.2.2. Farmakodinamik Özellikler	10
1.3.2.3. Özel Popülasyonlar Üzerindeki Etkiler	11
1.3.2.4. Kullanılışı	12
1.3.2.5. Yan etkiler	13
1.3.2.6. Kontrendikasyonlar	13
1.4. LNG Tayini İçin Uygulanan Güncel Analiz Yöntemleri	13
1.4.1. Spektroskopik Yöntemler	14
1.4.1.1. Spektrofotometri	14
1.4.1.2. Spektroflorimetri	14
1.4.2. Kromatografik Yöntemler	15
1.4.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	15
1.4.3. Elektroanalitik Yöntemler	17
1.4.3.1. Voltametri	17
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
2.1. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler	20
2.1.1. Elektroanalitik Kimya	20
2.1.1.1. Voltametri	20
2.1.1.1.1. Hidrodinamik Voltametri	21
2.1.1.1.2. Diferansiyel Puls Voltametri	21
2.1.1.1.3. Kare Dalga Voltametri	22
2.1.1.1.4. Dönüşümlü Voltametri	23
2.1.2. Voltametrik Hücre Bileşenleri	25
2.1.2.1. Çalışma Elektrotları	26
2.1.2.1.1. Katı Elektrotlar	26

2.1.2.1.2. Modifiye Elektrotlar	26
2.1.2.2. Referans Elektrotlar	27
2.1.2.3. Karşıt (Yardımcı) Elektrotlar	27
2.1.2.4. Destekleyici Elektrolit	27
2.1.2.5. Voltametik Hücre	28
2.2. Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler	28
2.2.1. Kimyasallar	28
2.2.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	30
2.2.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Elektrokimyasal Sistem	30
2.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	31
2.3.1. LNG Standart Çözeltilisinin Hazırlanması	31
2.3.2. Elektrolit Çözeltilisinin Hazırlanması	32
2.3.3. İdrar Numunesi Hazırlama	32
2.3.4. Farmasötik Dozaj Formunun Hazırlanması	32
2.3.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Diğer Çözeltilerin Hazırlanması	33
2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Voltametik Yöntemler	34
2.4.1. Dönüşümlü Voltametri	34
2.4.2. Diferansiyel Puls Voltametri	34
2.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Sensörün Hazırlanması	34
2.5.1. Kullanımdan Önce CKE'ye Yapılan Ön İşlemler	34
2.5.2. NE/GNP Modifiye CKE'nin Hazırlanması	35
3. BULGULAR	36
3.1. NE/GNP/CKE'nin Elektrokimyasal Karakterizasyonu	36
3.1.1. Elektroaktif Yüzey Alanlarının Hesaplanması	37
3.2. LNG için Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi	38
3.2.1. NE/GNP/CKE'de LNG'nin Elektrokimyasal Davranışı	38
3.2.2. Yüzey Kaplama Etkisi	40
3.3.3. LNG için Voltametik Yöntem Optimizasyonu	41
3.3.3.1. Elektrolit Çözeltilisinin pH Etkisi	41
3.3.3.1.1. LNG'nin Yükseltgenme Mekanizmasının Anlaşılması	43
3.3.3.2. Tarama Hızı Etkisi	44
3.3.3.3. DPV Yöntemi Analitik Uygulamaları	48
3.3.3.4. Seçicilik Çalışmaları	51
3.3.3.5. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları	53
3.3.3.6. Yeniden Üretilirlik Çalışmaları	54
3.3.3.7. Stabilitate Çalışmaları	54
3.4. İdrar Numunesinde LNG Tayini	55
3.5. Farmasötik Dozaj Formunda LNG Tayini	56
4. TARTIŞMA	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	67

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi kapsamında, Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan anti-hiperglisemik etken madde olan linagliptinin (LNG) Trajenta® ve idrar örnekleri içerisinde miktarının belirlenmesi amacıyla elektro sensör bazlı bir voltametrik yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntemlerin dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) inhibitörlerinin rutin kalite değerlendirmelerinde ve klinik izlenmesinde uygulanabilirliği öngörülmüştür.

Tez çalışmalarım sırasında değerli katkılarıyla çalışmalarına yön veren değerli danışmanım Prof. Dr. Nevin ERK'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Nuray ŞAK, abim Mustafa ŞAK, ablam Berivan ŞAK ve babam Mehmet ŞAK'a şükranlarımı sunuyorum. Lisans eğitimim sırasında hayatıma dahil olan yol arkadaşım Mert Mesut ERKAN'a her zorlukta yanımda olduğu için teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Elektrotun Yüzey Alanı
α	Alfa
β	Beta
BSS	Bağıl Standart Sapma
C	Konsantrasyon
CKE	Camsı Karbon Elektrot
Δ	Delta (Fark)
D	Difüzyon Katsayısı
DM	Diabetes Mellitus
DPP4	Dipeptidil Peptidaz 4
DPV	Diferansiyel Puls Voltammetri
DV	Dönüşümlü voltametri
E	Potansiyel
E_{pa}	Anodik Pik Potansiyeli
E_{pk}	Katodik Pik Potansiyeli
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
FT	Fosfat Tamponu
GIP	Glikoz Bağımlı İnsülinotropik Polipeptit
GK	Geri Kazanım
GLP 1	Glukagon Benzeri Peptit 1
GNP	Grafen Nano plakalar
GS	Gözlenebilirlik Sınırı
h/h	Hacim/Hacim
HbA1c	Hemoglobin A1c
HV	Hidrodinamik Voltametri
I	Akım
I_{pa}	Anodik Pik Akımı
I_{pk}	Katodik Pik Akımı
λ	Dalga boyu
KDV	Kare Dalga Voltametri
k/h	Kütle/Hacim
LNG	Linagliptin
m	Eğim

μ	Mikro
n	Aktarılan Elektron Sayısı
ND	Nano elmas
r	Korelasyon katsayısı
R^2	Belirleme Katsayısı
σ	Sigma (Standart Sapma)
t	Zaman
T1DM	Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Tip 2 Diabetes Mellitus
TS	Tayin Sınırı
v	Tarama Hızı
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi



ŞEKİLLER

Şekil 1.1 . T2DM'de Hipergliseminin 'Uğursuz Sekizlisi'	4
Şekil 1.2. DPP4 inhibitörleri önerilen etki mekanizması	5
Şekil 2.1. E: potansiyel ve I: darbe başına akım olan tipik bir DPV voltamogramı	22
Şekil 2.2. KDV'nin tipik bir voltamogramı, E: potansiyel ve I: darbe başına akım	23
Şekil 2.3. DV'nin tipik bir voltamogramı, E: potansiyel ve I: darbe başına akım	24
Şekil 3.1. 50 mV/s tarama hızında 0,04 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisinde CKE ve NE/GNP'nin döngüsel voltamogramı	36
Şekil 3.2. 1,0 mM LNG'nin 0,05 M FT içerisinde (pH 7,0) farklı elektrotlarla voltamogramı	39
Şekil 3.3. 1,0 mM LNG'nin pH 7,0 0,05 M FT içerisinde 0,1 mg/mL-1,5 mg/mL arasında değişen NE konsantrasyonları ve 1,0 mg/mL GNP konsantrasyonu ile modifiye edilmiş CKE yüzeyinde voltamogramı	40
Şekil 3.4. 1,0 mM LNG'nin pH 7,0 0,05 M FT içerisinde 0,1 mg/mL-1,5 mg/mL arasında değişen GNP konsantrasyonları ve 0,5 mg/mL NE konsantrasyonu ile modifiye edilmiş CKE yüzeyinde voltamogramı	41
Şekil 3.5. LNG'nin pH değerleri 2,0-8,0 arasında değişen 0,05 M FT içerisinde NE/GNP/CKE ile DV voltamogramları	42
Şekil 3.6. (a) LNG'nin anodik pik akımı ile pH değerlerinin grafiği. (b) E_{pa} ve pH değerlerinin grafiği (Pourbaix Diyagramı)	43
Şekil 3.7. LNG yükseltgenmesi için önerilen mekanizma	44
Şekil 3.8. pH 5,0 0,05 M FT içerisinde 1,0 mM LNG'nin 10, 25, 50, 100, 150, 200 ve 300 mV/s tarama hızlarında DV voltamogramları	45
Şekil 3.9. pH 5,0 0,05 M FT içerisinde 1,0 mM LNG'nin I_{pa} 'ya karşı $\sqrt{v}$ grafiği (N=4)	46
Şekil 3.10. pH 5,0, 0,05 M FT içerisinde 1,0 mM LNG log I_{pa} 'ya karşı log v grafiği (N=4)	46
Şekil 3.11. pH 5,0, 0,05 M FT içerisinde 1,0 mM LNG E_{pa} 'ya karşı ln v grafiği (N=4)	47
Şekil 3.12. pH 5,0, 0,05 M FT içerisinde NE/GNP/CKE yüzeyinde LNG'nin artan konsantrasyonlarla (0,8 μ M ila 18,7 μ M arasında değişen) DPV voltamogramları	49
Şekil 3.13. LNG'nin I_{pa} 'sının LNG konsantrasyonlarına (C_{LNG}) karşı grafiği	50
Şekil 3.14. 100 μ M girişim yapan maddelerin varlığında NE/GNP/CKE ile 1,0 μ M LNG'nin DPV voltamogramları	51
Şekil 3.15. 100 μ M girişim yapan maddelerin varlığında NE/GNP/CKE ile 1,0 μ M LNG'nin I_{pa} değerlerini gösteren sütun grafiği	52
Şekil 3.16. Tekrarlanabilirlik çalışmaları için pH 5,0 0,05 M FT içerisinde 1,0 μ M LNG'nin DPV voltamogramları	53

Şekil 3.17. Yeniden üretilebilirlik çalışmaları için pH 5,0 0,05 M FT içerisinde 1,0 µM LNG'nin DPV voltamogramları	54
Şekil 3.18. 60 günlük stabilite testleri kapsamında pH 5,0 0,05 M FT içerisinde 1,0 µM LNG'nin DPV voltamogramları	55



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Tanısal referans değerleri	2
Çizelge 2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar	29
Çizelge 2.2. Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve diğer ekipmanlar	30
Çizelge 2.3. Tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri	31
Çizelge 2.4. Girişim çalışmasında kullanılan kimyasalların miktarları	33
Çizelge 3.1. 1,0 mM LNG'nin farklı elektrotlar üzerindeki analitik tepkisinin kıyaslanması (N=3)	39
Çizelge 3.2. Optimize edilmiş DPV parametreleri (N=6)	48
Çizelge 3.3. LNG'nin NE/GNP/CKE ile elde edilen DPV analitik parametreleri	50
Çizelge 3.4. Girişim yapan maddelerin NE/GNP/CKE ile LNG voltametrik sinyal üzerine etkisi (N=3)	52
Çizelge 3.5. NE/GNP/CKE sensörü ile idrar numunesinde LNG tayini (N=2)	56
Çizelge 3.6. Trajenta®'da LNG Tayini (tablet başına 5 mg LNG) (N=3)	56
Çizelge 3.7. Saf LNG ve Trajenta® Formunun Karşılaştırması	57
Çizelge 4.1. LNG tayini için önceden rapor edilen analitik yöntemlerin karşılaştırması	60

1. GİRİŞ

1.1. Diyabet

İnsülin sekresyonu veya etkisi ya da her ikisiyle ilgili bozuklukların bir sonucu olarak ortaya çıkan, hiperglisemi ile teşhis edilen kronik bir metabolik hastalık olan *Diabetes Mellitus* (DM), gözlerde, böbreklerde, sinirlerde, kalpte ve kan damarlarında işlev bozuklukları gibi uzun süreli yaralanmalarla ilişkilendirilen ciddi bir sağlık sorunu olmaktadır (American Diabetes Association, 2009).

Pankreas tarafından üretilen insülin kan şekerini düzenleyen bir hormondur. İnsülinin üretilmemesi ve etkin bir şekilde kullanılamaması, kontrolsüz diyabetin ortak etkisi olan kan şekerinin yükselmesiyle sonuçlanır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre 2014 yılında yaklaşık 422 milyon yetişkin diyabetli vardır. 1980'deki 108 milyon rakamıyla karşılaştırıldığında diyabetin görülme sıklığındaki artışın onu küresel bir salgına dönüştürdüğü iddia edilebilir. Tüm bunlar ve 2012 yılındaki 1,5 milyon ölüm göz önüne alındığında diyabet tedavisinin ne kadar önemli olduğu açıkça göstermektedir (Roglic ve DSÖ, 2016).

Amerikan Diyabet Derneği'ne (ADD) göre, pankreasın β - hücrelerinin otoimmün yıkımında yer alan patojenik süreçlerin, yetersiz insülin etkisi ve insülin sekresyonunun bozulması gibi sonuçlara yol açtığı bilinmektedir. Genellikle diyabet hastalarında bir arada bulunan bu iki karmaşık hormon etkisinin çalışma prensibinde hipergliseminin ana nedeninin hangi anomali olduğu net olarak belirtilmemiştir. Bununla birlikte, diyabet vakalarının büyük çoğunluğu iki ana etyopatogenetik türe ayrılmaktadır; insülin salgısındaki eksiklikten kaynaklanan tip 1 DM (T1DM) ve insülin etkisine direncin yanı sıra insülin salgılanmasına karşı yetersiz telafi edici yanıtın neden olduğu tip 2 DM (T2DM) (ADD, 2009).

Kanlarındaki glikoz miktarının ayarlanabilmesi için günlük olarak insülin uygulanmasına ihtiyaç duyan T1DM'li kişilerde aşırı susama ve idrara çıkma, sürekli açlık ve halsizlik, görmede değişiklik ve kilo kaybı gibi belirtiler ortaya çıkar. Öte yandan, insüline bağımlı olmayan veya yetişkin başlangıçlı diyabet olarak adlandırılan T2DM'li kişilerde tip 1'dekilere benzer belirtiler ortaya çıkabilir, ancak genellikle belirtiler daha az belirgindir veya yoktur. Bu nedenle dünya genelinde yaygın olan tip 2 diyabetin tanısı birkaç yıl konulamamaktadır (Roglic ve DSÖ, 2016).

Karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki düzensizliklerle tanımlanan T2DM, hem çevresel faktörlerin (örneğin obezite, fiziksel hareketsizlik, sağlıksız beslenme...) hem de genetik faktörlerin sonucu olabilmektedir. Prediyabet ile başlayan sürecin hiperglisemi ile takip edildiği bu bireylerde T2DM gelişme riski yüksek olabilmektedir. Gerstein vd., (2007) meta-analizlerinde prediyabetlerin %3 ila %11'inin yıllık olarak T2DM'ye dönüştüğünü göstermişlerdir. Bu nedenle prediyabetli kişilerin tanımlanmasının ve onların yaşam tarzlarına (kilo kaybı ve egzersiz) müdahale edilmesinin yanı sıra antidiyabetik ve anti-obezite ilaçlarının da önemini vurgulamışlardır.

Çizelge 1.1. Tanısal referans değerleri (DeFronzo vd., 2015, s: 3)

Parametreler	Normal*	Prediyabet	T2DM
Hemoglobin A1c	<%5,7 ‡ <%6,0 §	%5,7–6,4 ‡ %6,0–6,4 §	≥%6,5
Açlık plazma glikozu	<100 mg/dl ‡ <110 mg/dl §	dl başına 100–125 mg ‡ dl başına 110–125 mg §	dl başına ≥126 mg
İki-saatlik plazma OGTT	<140 mg/dl	dl başına 140-199 mg	dl başına ≥200 mg

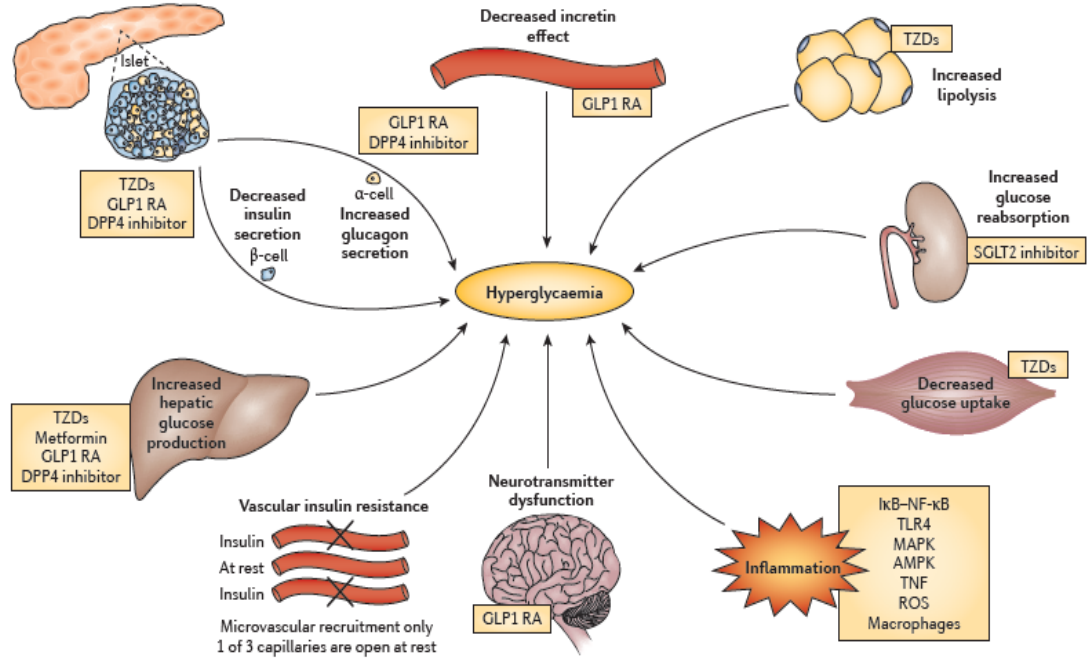
OGTT, oral glikoz tolerans testi; T2DM, tip 2 diyabet. *Normal glikoz metabolizması. ‡ADD. § DSÖ.

Prediyabet tanısının içeriklerinin şu şekilde sıralanabileceği belirtilmiştir; bozulmuş glikoz toleransı (IGT), bozulmuş açlık glikozu (IFG) seviyeleri veya artmış glikozillenmiş hemoglobin A1c (HbA1c) seviyeleri. ADD ve DSÖ tarafından tanımlanan tanısal referans değerleri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.(DeFronzo vd., 2015, s: 3) HbA1c> %6,5 olan kişiler; vücut kitle indeksi (BMI) m² başına 30 kg; 60 yaş yüksek riskli grup olarak görülmekte ve

ADA Konsensüs Konferansı'nda IGT veya IFG düzeylerinin metformin ile tedavisi önerilmektedir. (Nathan vd., 2007). DeFronzo vd., (2011) metforminin pioglitazon ile birlikte düşük dozda kullanılmasını önermelerine karşın, Zinman vd., (2010) rosiglitazonun prediyabetin diyabete dönüşmesini engellemede aynı etkinliğe sahip olduğunu gösterdikleri bilinmektedir.

Sonuç olarak, karmaşık bir kronik hastalık olan T2DM aşağıdakileri içeren gerçek bir tedaviyi gerektirmektedir; sürekli tıbbi tedavi, anormal glikoz seviyelerinin sabırla kontrol edilmesi, çok faktörlü riski azaltan doğru stratejilerle kan şekeri seviyelerinin normalleştirilmesi, akut, uzun vadeli mikrovasküler (örn. nöropati, nefropati ve retinopati) ve makrovasküler komplikasyonların (örn. kalp krizi gibi) gözlemlenmesi. Gerçek bir tedavi bulmak için, bu çok faktörlü hastalığın insülin direnci, kronik inflamasyon ve β hücre fonksiyon bozukluğu gibi patofizyolojik faktörleri karakterize edilmelidir. (DeFronzo, 2009) tarafından öne sürülen hiperglisemiyle ilgili sekiz farklı patofizyolojik anormallik (uğursuz oktet), T2DM geçmişinde iyi bir örneklerle gösterilmiş ve bozulmuş glikoz homeostazisine yol açtığı Şekil 1.1' de açıklanmıştır.

T2DM'ye yol açan birincil deformiteler, pankreas β -hücrelerinin neden olduğu bozulmuş insülin sekresyonunun yanı sıra kas ve karaciğerde görülen insülin direnci olarak belirtilmişlerdir. Glukagon benzeri peptid 1 (GLP 1)'in, GLP 1'e dirençli β -hücrelerinin fonksiyonundaki devam eden kusurların sonuçlarının arkasında yatan bir faktördür ve artan glukagon seviyeleri ve artan hepatik duyarlılığın etkisiyle karaciğeri aşırı glikoz üretmeye teşvik etmiştir. Adipositlerdeki insülin direncine bağlı olarak artan lipoliz ve plazma serbest yağ asidi (FFA) düzeyleri, kas ve karaciğerin insülin direncinin yanı sıra β hücre yetmezliğini de şiddetlendirmiştir.

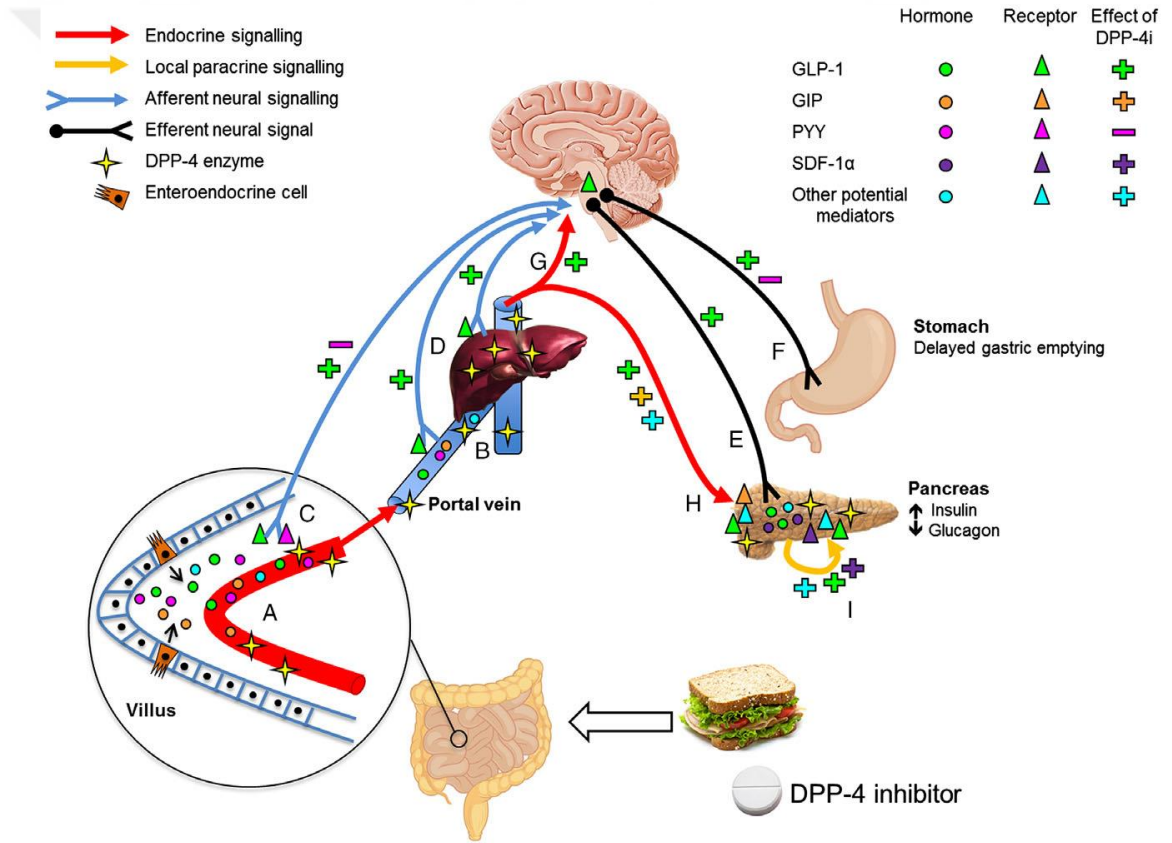


Şekil 1.1. T2DM'de Hipergliseminin 'Uğursuz Sekizlisi'

RA, reseptör agonisti; DPP4, dipeptidil peptidaz 4 ; I κ B, NF- κ B'nin inhibitörü; NF- κ B, nükleer faktör- κ B; TLR4, Toll benzeri reseptör 4; MAPK, mitojenle aktiveleşen protein kinaz; AMPK, AMP ile aktiveleşen protein kinaz; TNF, tümör nekroz faktörü; ROS, reaktif oksijen türleri; TZD'ler, tiazolidindionlar. (DeFronzo vd., 2015, s:7)

Hipergliseminin korunması, eşik değerinin artmasıyla idrarda glikoz dökülmesinin ve sodyum/glikoz yardımcı taşıyıcısı 2'nin (SGLT2) renal glikoz yeniden emilimindeki artışın işlevini yerine getirmesinin bir sonucu olarak belirtilmiştir. Kilo almanın nedenleri arasında beyindeki dopamin seviyesinin düşmesi ve serotonin seviyesinin yükselmesinin yanı sıra amilin, leptin, YY peptidi, GLP 1 ve insülinin iştah bastırıcı etkilerine karşı direnç gösterilmesi sayılabilmektedir. Uğursuz Sekizlinin, vasküler insülin direnci ve inflamasyonun da eklenmesiyle çökmekte olan dekoplete dönüştürülmesi gerektiği öne sürülmüştür. (DeFronzo vd., 2015)

T2DM'nin düzenli hipodermik infüzyon tedavisi ile HbA1c seviyesinin düşürülmesinde bağırsak hormonu GLP 1'in yeterli olabileceği ortaya konmuş olsa da (Deacon, 2011) bu dalgalanan peptidin, in vivo bozulma ve nefritik klirens yoluyla GLP 1 insülinotropik etkinliğinden sorumlu olan DPP4 tarafından düzenlenen kan dolaşımından tahliye edilmeye dirençli olmadığını vurgulamıştır. İncretin etkisi olarak da adlandırılan DPP4 inhibisyon etkisi, GLP 1'deki ani bozulma üzerindeki sınırlayıcı etkisine, diğer bir deyişle GLP 1'in antihiperglisemik etkinliğini artırıcı etkisine atfedilmiştir. DPP4 inhibitörlerinin artış etkisi, Şekil 1.2'de önerilen bir etki mekanizması ile gösterilmiştir.



Şekil 1.2. DPP4 inhibitörleri' önerilen etki mekanizması (Andersen vd., 2018, s:36)

Gıda alımıyla başlayan bu etki mekanizması, DPP4 bozulmasının enteroendokrin hücreleri GLP 1, glikoza bağımlı insülinotropik polipeptit (GIP), Polipeptit YY (PYY), stromal hücreden türetilmiş faktör-1α (SDF1 α) ve gastrointestinal (GI) kanaldaki diğer potansiyel araçlar (A) gibi hormonların salınması için uyardığını ileri sürmektedir. Gerek vasküler yatakta gerekse karaciğerde (B) ilerlemeyi daha da sürdüren bozulma, hem lokal vagal

aferentlerin GLP 1 aktivasyonunun bağırsak duvarında (C) hem de karaciğer veya hepatportal bölge (D) içindeki duyu aferentlerinde bulunan kılcal damarlar tarafından takip edilmiştir. Bu işlemlerin sonucunda beyne iletilen ‘Efferent Sinyalleme’ adı verilen sinyal, pankreas adacıkları yoluyla GLP 1'in indüklediği insülin artışına ve glukagon salgısının azalmasına (E) ve ardından mide ejeksiyonunun ertelenmesine (F) aracılık etmektedir (Andersen vd., 2018).

Andersen vd., (2018) ayrıca lokal duysal afferentlerin (C) içindeki PYY ile olası etkileşiminin gastrik boşaltımın ertelenmesine yol açabileceğini göstermektedir. GIP olabilen hormonların, diğer potansiyel aracılardan yanı sıra eser miktardaki GLP 1'in DPP4 bozunmasından hayatta kalması, pankreasın (H) yanı sıra beyne (G) sinyal gönderilmesine aracılık etmiştir. Ayrıca insülin ve glukagon sekresyonunun ayarlanmasının, pankreas adacıklarındaki SDF-1 α , GLP ve diğer potansiyel olarak bilinen ve bilinmeyen hormonların üretiminden kaynaklanan parakrin sinyalleme ile yerine getirilebileceği iddia edilmiştir (I). DPP4 inhibitörlerinin insanlar üzerindeki terapötik etkilerinin, önerilen yolların (hem nöral hem de parakrin sinyalleme) kemirgenler üzerinde doğrulanması nedeniyle kanıtlanması gerektiğine dikkat çekilmek istenmektedir.

Gliptinler olarak da adlandırılan DPP4 inhibitörleri, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (AGİ) tarafından yetişkinlerde T2DM tedavisine yönelik oral diyabet ilaçları olarak sertifikalandırılmıştır. Vildagliptinin AGİ tarafından değil, yalnızca Avrupa İlaç Ajansı (AİA) tarafından sertifikalandırıldığı bilirse de AGİ onaylı DPP4 inhibitörleri saksagliptin, sitagliptin, alogliptin ve linagliptin olarak sınıflandırılabilir (Kasina ve Baradhi, 2022).

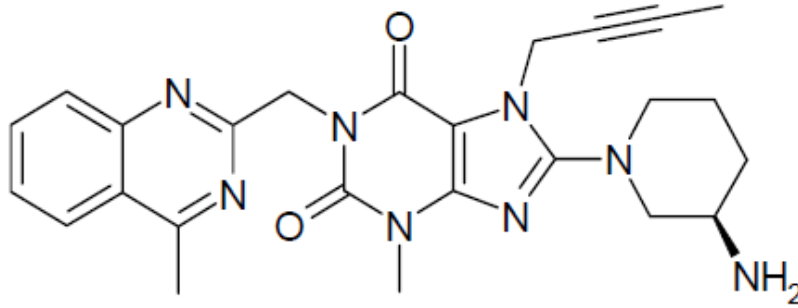
1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Etken Madde

T2DM tedavisinde kullanılan oral anti-hiperglisemik ilaç olarak 2011 yılında ruhsat alan Linagliptin (LNG), DPP4'ün $\geq$ %80 inhibisyonuna sahip 24 saatlik doz aralığına sahiptir ve ayırt edici, güçlü ve doza bağımlı bir farmakokinetik profile işaret etmektedir. LNG'nin monoterapi olarak (günde bir kez 5 veya 10 mg, oral) veya diğer oral antihiperglisemik ilaçlarla birlikte kullanılması, vücut ağırlığı ve hipoglisemi üzerinde nötr veya minimal etkiler göstermiştir ve bu klinik deneylerde takdire şayan bir tolerans anlamına gelmektedir.(Scott, 2011)

1.3. Linagliptin'in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

1.3.1. Kimyasal Yapı

Moleküler Yapı:



Moleküler Formül: C₂₅ H₂₈ N₈ O₂

Molekül Ağırlığı: 472,54 g/mol

IUPAC Adı: 8-[(3R)-3-aminopiperidin-1-il]-7-but-2-inil-3-metil-1-[(4-metilkinazolin-2-il)metil]purin-2,6 -dion

Görünüm: Hafif higroskopik olabilen sarımsı ila beyaz katı madde.

Saklama Koşulları: 25°C (77°F) sıcaklıkta saklanmalıdır; 15°-30°C'ye (59°-86°F) kadar sapmaya izin verilir. Güvenli, iyi kapatılmış bir ambalajda saklanmalıdır.

Çözünürlüğü: Su, izopropanol ve asetondeki çözünürlüğü çok zayıf (sırasıyla; 0,9 mg/ml, < 1 mg/ml ve 1 mg/ml), metanoldeki çözünürlüğü ise tatmin edicidir (60 mg/ml). Etanolde de yeterli çözünürlüğe sahiptir (10 mg/ml).

Ayrışma Sabitleri: $pK_{a1} = 1,9$ ve $pK_{a2} = 8,6$

Log P (K_{ow}): 2,85

(FDA, 2011; National Center for Biotechnology Information, 2023)

1.3.2. Farmakolojik Özellikler

LNG (ATC kodu A10BH05 olan) farmakoterapötik gruba dahildir; sindirim sistemi ve metabolizma, diyabette kullanılan ilaçlar, kan şekeri düşürücü ilaçlar ve DPP4 inhibitörleri (WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, 2023). Bir DPP4 inhibitörü olarak LNG'nin, GIP ve GLP 1 hormonlarının parçalanmasını geciktirerek insülin salınımını ve pankreasta bulunan beta hücrelerinden glukagonun inhibisyonunu tetiklediği bilinmektedir. (DrugBank Online, 2023)

1.3.2.1. Farmakokinetik Özellikler

LNG'nin 1-10 mg'lık oral dozlarla (tekli veya çoklu) hızlı emiliminin ~ 90 dakika (t_{mak}) içinde maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{mak}) ulaşabildiği bilinmektedir. Kararlı durum konsantrasyonlarına (1-10 mg doz aralığında) ulaşmak için 6-2 gün gerekirken, 5 mg terapötik dozda ise bu sürenin 4 gün olduğu ve bunun da kararlı durum C_{mak} 11-12 nmol/L'yi işaret ettiği elde edilmiştir. LNG'nin oral biyoyararlanımı yaklaşık %30 olarak hesaplanmıştır. Gıdayla birlikte uygulanması, böbrek yetmezliği, ırk, karaciğer yetmezliği, vücut ağırlığı, yaş veya

cinsiyet gibi faktörler LNG üzerinde görülen herhangi bir farmakokinetik değişiklik bilinmemektedir.

Kararlı durumdaki 5 mg tek doz LNG'nin ana dağılım hacmi (V_{ss}) 1110 L olarak hesaplanmıştır. LNG'nin insan plazmasındaki protein bağlanmasının konsantrasyona bağlı olduğu ortaya çıkmıştır; 1 nmol/L için %99 ve 30 nmol/L'den büyük *in vitro* konsantrasyonlar için %75-89 olarak hesaplanmıştır.

Metabolizma, hesaplanmış %90 radyoaktiviteye sahip, geri kazanılmış, değişmemiş ana bileşiği gösteren, LNG'nin toplam bertarafı ve eliminasyonu için yardımcı bir faktördür. LNG'nin S-3-hidroksipiperidinil türevi olarak bilinen birincil metabolit CD1790, 5 mg/günlük oral dozlardan sonra kararlı durumdaki (AUC_{ss}) molar LNG plazma maruziyetinin yaklaşık %13,3'ünü ve 10 mg tekli oral dozlardan (AUC_{24}) sonra %18,0'ını oluşturmuştur. Sırasıyla CYP3A4 ile katalize edilen keton oluşumunu ve aldo-keto redüktazlarla katalize edilen CD1790 stereo-seçici indirgemeyi içeren *in vitro* deneyler, LNG'nin birincil metabolitinin DPP4'e karşı farmakolojik olarak aktif olmadığını ortaya çıkarmıştır.

LNG'nin ortadan kaldırılması, birincil hızlı düşüşün ardından uzatılmış bir terminal eliminasyon aşamasıyla iki fazlı olarak açıklığa kavuşturulmuştur. Kararlı duruma hızlı erişim için birikim yarı ömrü ($t_{1/2ACC}$), 5 mg tek doz başına ~ 10 saat olarak belirtilirken, kararlı durumdaki plazma terminalinin yarı ömrü ($t_{1/2\beta}$) çoklu 5 mg oral dozajlarla 100 saatten daha uzun süre incelenmiştir. Aktif olmayan LNG metabolitlerinin yaklaşık %85'i dışkıyla atılırken, 4 gün sonra yalnızca %5'i idrarla atılmıştır. LNG, kararlı durumda böbrek klirensin 70 mL/dakika ve toplam vücut klirensinin ~ 1200 mL/dakika olduğu 5 mg oral dozaj, plazma konsantrasyonu ile bağlanmamış ilaç fraksiyonu arasındaki korelasyonun bir sonucu olabilecek doza bağlı bir klirens sergilemiştir (DrugBank Online, 2023; Graefe-Mody vd., 2012).

1.3.2.2. Farmakodinamik Özellikler

İlk hayvan çalışmalarında LNG'nin (1nmol/L inhibisyon sabiti), tam dozlamayla plazma DPP4 aktivitesinin (>%80) inhibisyonu için yeterli olduğu gösterilmiştir. Gönüllü sağlıklı erkekleri içeren çalışmada 2,5 mg ve 5,0 mg tekli oral dozajlardaki LNG'nin plazma DPP4 aktivitesini sırasıyla %72,7 ve %86,1 oranında azaltmak için yeterli olduğu ortaya konulmuştur. Plazma DPP4 aktivitesinin maksimum inhibisyonuna ulaşmak için gereken sürenin 2,5 mg için 3 saat ve 5,0 mg için ~ 1,5 saat olduğu hesaplanmıştır. Dozaj karşılaştırması (5,0 mg/gün ve 10 mg/gün), kararlı durumda $\geq$ %80 inhibisyon aktivitesinin $\geq$ 24 saat boyunca 5,0 mg günlük dozaj ile elde edilebileceğini göstermiştir.

Karışık, plasebo kontrollü, çift kör yemek tolerans testini içeren 28 günlük tedavi faz II çalışmasında, LNG, plazma GLP-1 konsantrasyonunu iki katına çıkarmanın yanı sıra açlık plazma glikozunu ve 24 saat ağırlıklı ortalama glikozu düşürmede başarılı olmuştur. Eksik glisemik kontrol ve T2DM hastaları dahil edilen 24 haftalık faz III çalışmaları, 5 mg LNG dozajının, monoterapinin yanı sıra ikili kombinasyon (LNG + metformin) ve üçlü kombinasyon (LNG + metformin + sülfonilüre) olarak glikozillenmiş HbA1c'yi ve açlık plazma glikozunu nasıl azaltabildiğini ortaya çıkarmıştır. Plaseboya göre ayarlanmış modifikasyonların %-0,62 ila %8,1 arasında değiştiği gösterilmiştir; HbA1c için %-0,69 ila %8,0. Plaseboya göre ayarlanmış modifikasyonlar -0,7 mmol/L ila 8,8 mmol/L arasında değişirken; açlık plazma glikozu için -1,3 mmol/L ila 9,1 mmol/L arasında değişmiştir.

Japon hastaları kapsayan çalışma ayrıca 5 mg LNG dozajının, 12 haftalık süre içinde HbA1c için plaseboya göre ayarlanmış ortalamayı %-0,87'den %8,0'a değiştirebildiğini ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak, diğer DPP4 inhibitörlerinin etkilerine benzer şekilde LNG, plaseboya göre ayarlanmış HbA1c'yi %0,6-0,9'a düşürürken plazma GLP-1 konsantrasyonunu 2 kat artırmayı başarabilmiştir.

Kapsamlı QT çalışması, kardiyovasküler vakaların 5000 hastadan daha fazla meta-analizini içeren sekiz faz III çalışmasıyla, 100 mg supra terapötik ve 5 mg tek terapötik dozaj aralığı

dahil olmak üzere QT aralığının uzaması durumunda bile LGN'nin kardiyak fonksiyon üzerinde göze çarpan bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur. Sırasıyla 5 mg LNG, 100 mg LNG, 400 mg moksifloksasin ve plasebo alan 44 beyaz hasta, çift kör olarak LNG ve plasebo alırken, her dönem arasında 6 hafta arınma olacak şekilde dört dönem boyunca açık etiketli moksifloksasin almıştır.

Sonuç olarak, LNG'nin kardiyovasküler ölüm, felç, anjina nedeniyle hastaneye yatış ve miyokard enfarktüsüne bağlı hastaneye yatışları temel alan kıyaslamalara göre tehlike oranının 0,34 değeriyle oldukça düşük olduğu ortaya çıkmıştır (Graefe-Mody vd., 2012).

1.3.2.3. Özel Popülasyonlar Üzerindeki Etkiler

Böbrek Yetmezliği

LNG'nin renal eliminasyonu küçük bir fraksiyonda gerçekleştiğinden, hastalarda böbrek fonksiyonundaki düşüşle birlikte LNG'nin farmakokinetiğinin önemli ölçüde değişmemesi gerektiğini ortaya koyan hipotez, bir faz I çalışmasıyla doğrulanmıştır. T2DM olan veya olmayan, farklı derecelerde böbrek yetmezliği olan bireylerden oluşan çalışma, 7 gün boyunca (normal böbrek fonksiyonu ve hafif veya orta dereceli böbrek yetmezliği grubu) veya tek dozda (böbrek hastalığı son dönem ve ciddi böbrek yetmezliği grubu) 5 mg/gün LNG dozuyla gerçekleştirilmiştir. Böbrek yetmezliği olan hastaların farmakokinetiğinde klinik olarak büyük bir değişiklik olmadığını ortaya koyan kanıtlar, uygun bir anti hiperglisemik ajan olarak LNG'nin böbrek yetmezliği olan hastalarda herhangi bir doz ayarlaması yapılmaksızın kullanılabileceğini göstermiştir (Graefe-Mody vd., 2012).

Karaciğer yetmezliği

LNG'nin dışkı yoluyla eliminasyonu böbrek dışı yollardan gerçekleştiğinden, hastalarda hepatik fonksiyon düşüşüyle birlikte LNG'nin farmakokinetiğinin önemli ölçüde değişmesi gerektiğini ortaya koyan hipotez, açık etiketli bir faz I çalışmasıyla çürütülmüştür. T2DM

olmayan, farklı düzeylerde karaciğer yetmezliği olan bireylerden oluşan çalışma, hafif, orta veya şiddetli karaciğer yetmezliğinin yanı sıra normal karaciğer fonksiyonuna sahip gruplarda 5 mg/gün tekli veya çoklu dozlarda LNG ile gerçekleştirilmiştir. Karaciğer yetmezliği olan hastaların farmakokinetiğinde klinik olarak hafif bir azalma olduğunu ortaya koyan kanıtlar, karaciğer yetmezliği olan hastalarda LNG'nin herhangi bir doz ayarlaması yapılmaksızın kullanılabileceğini göstermiştir (Graefe-Mody vd., 2012).

İlaç Etkileşimleri

Geçirgenlik glikoproteini (P-gp) ve sitokrom P450 (CYP) 3A4'e karşı bilinen zayıf bir inhibitör olarak (ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları veya diğer CYP izoenzimlerine karşı olmasa da) LNG'nin bugüne kadar maruziyeti azaltan güçlü P-gp veya CYP3A4 indükleyicileri ile eş zamanlı kullanımı hariç klinik olarak eşlik eden ilaç etkileşimleri ortaya konulmamıştır. Güçlü bir P-gp ve CYP3A4 inhibitörünün (ritonavir) LNG plazma maruziyetini 3 kat artırdığı bilinmesine rağmen, güvenlik veya etkinlik ile ilgili endişelere ilişkin klinik kanıt yoktur.

Elbette her hastada olduğu gibi ilaç kullanımında da hastanın bireysel yanıtına göre doz ayarlaması yapılması gerekmektedir (Graefe-Mody vd., 2012).

1.3.2.4.Kullanılışı

Trajenta® aktif madde olarak LNG'yi (5 mg) içeren oral antidiyabetik bir ilaçtır. Oral antidiyabetik ilaçlar, hastanın vücudundaki kan şekeri seviyesini düşürmek amacıyla yüksek kan şekerini tedavi etmek için ağız yoluyla kullanılan ilaçlardır. T2DM'li yetişkin hastalarda, hastalığın oral antidiyabetik ilaçlardan biri (metformin veya sülfonilüreler) veya tek başına diyet ve egzersiz ile yeterli şekilde kontrol altına alınamaması durumunda kullanılan Trajenta®, diğer antidiyabetik ilaçlarla birlikte kullanıma uygundur: Metformin, sülfonilüre ilaçları (örneğin, glimepirid, glipizid), empagliflozin veya insülin gibi ilaçlar. Önerilen doz olan günde bir kez 5 mg olan bu ilaç, aç veya tok karnına, yemekle birlikte veya yemeksiz olarak alınabilmektedir. Hastaların ilaç dozunun aniden kesilmesinin kan şekerinde artışa neden olduğu bilinmektedir. Hasta sağlığı açısından en iyi sonuçların alınabilmesi için bu ilacın, her

hastanın yanıtına göre doktorların reçete ettiği şekilde kullanılması gerekmektedir (Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 2021).

1.3.2.5. Yan Etkiler

Kan lipaz düzeylerinde artış bildirilen en yaygın yan etkidir. Hafif ila orta şiddette ortaya çıktığı ve geçici olduğu için tedavinin kesilmesine yol açmamaktadır. Yaygın görülen diğer yan etkiler ise şu şekilde sıralanabilir; burun veya boğaz iltihabı (nazofarenjit), öksürük, kabızlık (insülin ile birlikte kullanıldığında) ve kan amilaz düzeyinde artış. Deride kabarcıklanma (büllöz pemfigoid), bu ilacın bildirilen nadir bir yan etkisidir. Trajenta® tek başına veya diyabet tedavisinde kullanılan diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanıldığında nadiren pankreas iltihabı (pankreatit) gözlenmiştir. Bulantı ve kusmanın yanı sıra sırta doğru (mide çevresinde) şiddetli ve inatçı karın ağrısı da pankreasın iltihaplandığı (pankreatit) anlamına gelebilmektedir (FDA, 2011; Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 2021).

1.3.2.6. Kontrendikasyonlar

"Trajenta® linagliptine karşı ürtiker, anjiyoödem veya bronşiyal hiperreaktivite gibi aşırı duyarlılık reaksiyonu öyküsü olan hastalarda kontrendikedir (FDA, 2011).

1.4. LNG Tayini İçin Uygulanan Güncel Analiz Yöntemleri

LNG tayini için 2020-2023 yılları arasında uygulanmış güncel analiz yöntemleri bu bölümde aktarılmıştır.

1.4.1. Spektroskopik Yöntemler

1.4.1.1. Spektrofotometri

Sahloul ve Salami (2023) LNG'nin toplu olarak tanımlanması ve doğrulanması için UV-Görünür spektrofotometre ile yoğunlaşma reaksiyonuna dayalı bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yoğunlaşma reaksiyonu, P-dimetilaminobenzaldehit (PDAB) içindeki bir aldehit grubu ile LNG'deki birincil amin arasındaki etkileşimle 470 nm dalga boyunda sarı *Schiff bazının* oluşması için meydana gelmiştir. Renkli kompleks, 1 mL %5 k/h reaktif metanol ve distile su çözeltisinin hazırlanmasını, çözeltiye 2 mL HCl'nin eklenmesini ve su banyosunda (PDAB ve LNG için) 70–75 °C'ye kadar 35 dakikalık ısıtma işlemi içeren optimum deney koşullarından biri olan bir çözücü içinde formüle edilmiştir. Job's ve Molar oran yöntemine dayanarak bu çalışmada LNG ile PDAB arasındaki stokiyometrik oranın 1:1 olduğu ortaya konulmuştur. Hesaplanan GS ve TS değerleri, 5 ila 45 µg/mL konsantrasyon aralığında sırasıyla 1,5815 µg/mL ve 4,7924 µg/mL olarak gösterilmiştir. Sonuçlar, BSS <%2 ile doğrusallığı, belirleme katsayısının $R^2 = 0,9989$ olduğunu ve geri kazanım yüzdesinin %99,46 ila %100,8 arasında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yardımcı maddeler ve farmasötik formlarda önemsiz girişimler gösteren yöntem, erken dönemde bu kadar ileri düzeyde bir çalışmanın olmaması nedeniyle yüksek bir kalite sergilemiştir.

1.4.1.2. Spektroflorimetri

Abu-hassan vd., (2023) tek ve ortak formüle edilmiş tabletlerde LNG'yi belirlemek için spektrofotometre ile izoindol türevi bazlı uygun maliyetli ve basit bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. LNG'nin birincil amin kısmı ile o-ftalaldehit arasındaki etkileşim ile floresan bir ürünün oluşması için yoğunlaşma reaksiyonu meydana gelmiştir. Ürün, izoindol floroforu elde etmek için 2-merkaptetanol olan %0,01 h/h sülfhidril türevi bileşiği içerisinde formüle edilmiştir. $\lambda_{uyarımla}$ 337,8 nm ve $\lambda_{emisyon}$ 434,3 nm varlığında, LNG konsantrasyonuna karşı floresans yoğunluğunu gösteren kalibrasyon grafiği, RSD <%2 ile 50-2000 ng/mL aralığında mükemmel bir doğrusallık ortaya çıkarmıştır; belirleme katsayısı $R^2 = 0,9995$, TS 75,18 ng/mL

ve GS 24,8 ng/mL. Farklı dozaj formlarında LNG tahlilinin başarılı olduğunu gösteren yöntem, klinik çalışma ve kalite kontrolde umut verici ve pratik bir alternatif ortaya koymuştur.

1.4.2. Kromatografik Yöntemler

1.4.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

Thallapalli ve Manda (2023) fare plazmasında standartlar (IS) Empagliflozin (EPG) ve Linagliptin'i (LNG) ortaklaşa ölçmek için hassas bir sıvı kromatografi-kütle spektrometri (SK-KS) yöntemini tasarlayıp, geliştirip ve doğrulamışlardır. Numune temizliğini en üst düzeye çıkarmak için, hedef analitler ve IS, dondurucu lipid çöktürme (DLC) kullanılarak özütlenmiş ve güçlü katyon değişimli katı faz ekstraksiyonu (GKD-KFE) yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Özellikle KFE temizliği ile birlikte DLC, DLC prosedürü sırasında plazma numunesindeki yüksek lipid içeriğini, eser miktarda LNG ve EPG ile birlikte plazma lipidlerinin %84,14'ünden fazlasını etkili bir şekilde gidermiştir. Lipitlerin giderilmesinde FLP'nin etkinliğini değerlendirmek için SK-atmosferik kimyasal iyonizasyon (AKI) ile birlikte kütle spektrometri kullanılmıştır. LNG ve EPG'deki kalıntı kirletici maddeler GKD-KFE kartuşları tarafından ortadan kaldırılarak ek saflaştırmaya olanak sağlanmıştır. Numuneler, bir *Spherisorb RP/Cyano* kolonu kullanılarak kromatografik ayırma gerçekleştirmek amacıyla pozitif iyon modunda 0,8 mL/dakika akış hızında asetonitril ve 25 mM amonyum asetat tamponundan (pH 8,1) oluşan bir gradyan hareketli faz aracılığıyla pompalanmıştır. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağıyla donatılmış *Waters* üç aşamalı dört kutuplu tandem kütle spektrometri kullanılarak seçilen reaksiyon izleme tekniği gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırmayı tamamlamak için *Waters Acquity®*'nin yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) sistemi kullanılmıştır. EPG-d4 için kütle (m/z) değişimi M/z 455,19/71,12; LNG-d4 için 477,27/423,94 ve EPG için 451,15/71,12 etkili bir şekilde elde edilmiştir. Bu araştırma, EPG için 0,35–15 ng/mL ve LNG için 25–1050 ng/mL konsantrasyon aralıklarını etkili bir şekilde incelemiştir. Sonuçlar, LNG'nin aksine, EPG'nin doğrusallığının 25,14 ile 985,26 ng/mL ve 0,59 ile 14,86 ng/mL arasında değiştiğini göstermiştir. LNG ve EPG için hem günler içinde hem de günler arasında bağıl standart sapma (BSS) değerinin %3,83'ün altında bulunması, izin verilen sınırlar içerisinde olduğunu düşündürmektedir. Sağlıklı fareler üzerinde yapılan bir farmakokinetik çalışmada, bu yeni

yöntem, EPG ve LNG birlikte uygulandığında umut verici sonuçlar ortaya koymuştur. Bu çalışmaya göre, her iki ilacın birlikte uygulanmasının farmakokinetik davranışları üzerinde gözle görülür bir etkisi olmadığından ilaç-ilaç etkileşimi görülmemiştir.

Yadav vd., (2020) LNG'nin yapısını, bozunma ürünlerini ve ilgili safsızlıkları karakterize etmek için yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) ardışık kütle spektrometri (KS) ile çevrimiçi kromatografiye dayalı bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. ICH Q1A (R2) kurallarına dayanan prosedür, zorlu koşullar altında LNG'yi baskılayarak bozunma ürünleri üretmede yeterli olmuştur. Gradyan elüsyon ayrımı için kolon olarak 10 mM amonyum asetat (pH 5,5) içeren mobil fazla birlikte *InertSustain* C8 kolonu (4,6 mm x 150 mm, 5 µm) seçilmiştir; (A) sulu kısım, bir asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) karışımı, (B) organik kısım, 80:20 oranında (h/h). Pozitif iyon donanımlı MS üzerindeki tarama modu olan elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ürünleri YPSK'de de kullanılan hareketli fazla 0,3 mL/dakika akış hızında bir *Acquity* CSH C8 kolonu (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm; *Waters Corporation*) yardımıyla ayırmıştır. Geliştirilen sıvı kromatografi/kütle spektrometri (SK/KS) yöntemiyle 3'ü asitte, 3'ü alkali hidrolizde ve 6'sı oksidatif strese olmak üzere 12 bozunma ürünü elde edilip tanımlanabilmiştir.

Alam vd., (2023) birlikte reçete edilen üç ilacı; metformin HCl, linagliptin ve rivaroksaban içeren sabit dozlu film kaplı tabletlerin üretimini detaylandıran çalışmayı sunmuşlardır. Bu tabletlerin analizi için belirlenen analiz yöntemini, sabit bir üçlü doz kombinasyonunun olası gerekliliği ışığında bir *in vitro* ilaç salım profili takip etmiştir. Analiz, fosfat tamponu (pH 6,8): ACN (70:30) (h/h) kullanılarak 1,00 mL/dakika akış hızında, izokratik koşullar altında, dedektör dalga boyu 248 nm ile gerçekleştirilmiştir. Yöntem validasyonu ICH kurallarına uygun olarak yapılmıştır. Sonuçlar metformin HCl, linagliptin ve rivaroksaban için doğrusallık aralığının sırasıyla 40–1500, 0,2–7,50 ve 0,80–30 µg/mL olduğunu ve miktar limitlerinin 24,05; 0,264 ve 0,565 µg/mL olduğunu göstermiştir. Belirlenen yöntemin önemli düzeyde tekrarlanabilirliği, bunun farmasötik kalite kontrol prosedürlerine uygun olarak rutin analizler için uygun olduğunu göstermiştir. Önerilen yöntemin yeşilliğini değerlendirmek için AES skoru, AMVI, AGREE ve NEMI araçları kullanılarak çevreye duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Gurralla vd., (2022) sabit doz kombinasyonunda üç antidiyabetik ilacı (empagliflozin, metformin HCl ve linagliptin) eşzamanlı olarak analiz etmiş ve çoklu yanıt optimizasyonu (*Derringer*'in arzu edirlilik fonksiyonu) ile tasarım odaklı YPSK yöntemiyle yeni bir analitik kalite ortaya koymuştur. Kritik yöntem parametrelerini (organik fazın yüzdesi (X_1), sulu fazın pH'ı (X_2) ve akış hızı (X_3)) sistematik olarak optimize etmek için merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır. Kritik analitik özellikler arasında çözünürlük, kapasite faktörü ve teorik plaka numarası yer almıştır. İzokratik bir elüsyon modeli ve 222 nm'de UV tespiti içeren *Std. Discovery* C18 kolonu, 1 mL/dakika akış hızında pompalanan, asetonitril:fosfat tamponundan (pH 5, % 38:62 h/h) oluşan hareketli faz ile 30°C'de analitlerin kromatografi yoluyla başarılı bir şekilde ayrılması için kullanılmıştır. Tüm ICH Q2(R1) doğrulama gerekliliklerine uyan doğrusal model, metformin, empagliflozin ve linagliptin için sırasıyla 1,0 ila 200; 0,2 ila 40 ve 0,1 ila 20 µg/mL aralığında 3,04; 3,93 ve 5,99 dakikalık alıkonma süreleri sergilemiştir. Bu analitleri içeren farmasötik dozaj formlarının önerilen YPSK yöntemiyle test edilme kapasitesi, bu yöntemin ayrıca tasarım alanı dahilinde yöntem aktarımı ve düzenleme esnekliği açısından doğruluğu kanıtlanmıştır. Önerilen metodoloji ile farklı stres koşulları altında ilaç stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

1.4.3. Elektroanalitik Yöntemler

1.4.3.1. Voltametri

Haredy vd., (2022) dozaj formundaki LNG'yi, biyolojik sıvıları ve fare dışkısını kare dalga anodik adsorptif sıyırma voltametri (KDAASV) ile belirlemek için grafen oksit (GO) bazlı camsı karbon elektrot (CKE) geliştirmişlerdir. Basit ve uygun maliyetli yöntem, tekniğin ne kadar doğru, kesin ve seçici olduğunu kanıtlayarak 9,45 ila 103,96 ng/mL arasında iyi bir doğrusal aralığın yanı sıra 4,0 ng/mL tespit limiti göstermiştir. GO ile değiştirilmiş CKE elektrotunun (GO-CKE) yüzey morfolojisi, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) ve X-ışını toz kırınımı (XRD) ile karakterize edilmiştir. Optimize edilmiş deneysel parametreler, pH 6,5'te 40 mM fosfat tamponu (FT), 4,0 µL 1,0 µg /mL GO çözeltisi içeren GO-CKE ve 480 s birikim süresiyle +0,60 V birikim potansiyeli (E_{acc}) olarak rapor edilmiştir. Döngüsel voltametri (DV), GO-CKE üzerinde LNG'nin oksidasyon mekanizmasını ortaya çıkarmış olup, bu mekanizma, +1,06 V'deki oksidasyon zirvesi ve 1,12

(~1) transfer edilen elektron ile difüzyon kontrolünü kanıtlarken, KDAASV regresyon verilerini şu şekilde hesaplamıştır: Korelasyon katsayısı $r = 0,9981$, GS 4,0 ng/mL ve TS 14,0 ng/mL. Yöntemin tablet dozajına, insan plazmasına ve idrarına, fare dışkısına uygulanması; BSS <%2, %88, %79-99, %80 arasında yüksek yüzde geri kazanım değerleri ile sonuçlandırılmıştır.

Baezzat ve Shojaei (2021) LNG elektro analizde kullanılmak üzere CKE'ye dayalı hassas bir elektro sensör üretmek amacıyla zeolitik imidazolat çerçevesini (ZIF-67) ve GO'yu sentezlemişlerdir. Üretim sürecinde sensör şu şekilde katman katman modifiye edilmiştir; CKE (E-rGO) yüzeyinde GO'nun elektrokimyasal indirgenmesi, E-rGO (Poli (β -CD)) üzerinde β -siklodekstrinin elektro kaplanması ve son olarak E-rGO-Poly (β -CD) yüzeye Fe_3O_4 @ZIF-67 (manyetik ZIF-67) dökülmesi. CKE/E-rGO/Poly (β -CD)/manyetik ZIF-67'nin morfolojisi, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (XPS) ve Alan emisyon taramalı elektron mikroskopu (AE-SEM) ile araştırılırken, sentezlenen materyaller *Fourier* dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile karakterize edilmiştir. Elektrokimyasal verimlilik karşılaştırması; CKE, CKE/E-rGO, CKE/E-rGO/Poly (β -CD) ve CKE/E-rGO/Poly(β -CD)/manyetik ZIF-67 için 50 mV/s tarama hızında DV ile incelenmiş ve üretilen sensörle yüksek bir elektro katalitik aktivite (4 kat daha yüksek) gözlenmiştir. Sensörün 50 μM LNG'nin elektrokimyasal tayininde uygulanmaya yönelik optimize edilmiş deneysel parametreler, diferansiyel puls voltametri (DPV) ile araştırılmış ve pH 7,0 Briton-Robinson tamponu (BRT), 100 mV/s tarama hızı, 0,0-1,2 V potansiyel aralığı olarak rapor edilmiştir. Aktarılan 2 elektronla adsorpsiyon kontrollü oksidasyon; 0,01 μM GS ve 29,12 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ hassasiyetle 0,03–200 μM doğrusal aralığında DPV yönteminin yanı sıra 0,006 μM GS ve 0,074 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ hassasiyetle 0,02–300 μM doğrusal aralığında Amperometri yöntemiyle de kanıtlanmıştır. Yöntemin idrar ve insan plazma örneklerinin yanı sıra iyonik ve organik bileşiklere uygulanması, %96,00 ila %104,20 arasındaki yüzde geri kazanım değerleriyle sensörün klinik deneylerde bir paradigma olarak pratikliğini ortaya koymuştur.

Ateş vd., (2021) yığın ve plazma numunesindeki LNG'nin DPV ve DV ile belirlenmesi amacıyla 6 μL 1 mg/mL L-cys@MoS₂ dağılımı içeren L-sistein (L-cys) dekore edilmiş MoS₂ ile modifiye CKE (L-cys@MoS₂/CKE) üretmişlerdir. L-cys@MoS₂'nin sentezi, 2H fazını 1T fazına dönüştüren Li-interkalasyon yöntemiyle 1T-MoS₂ nano tabakalarının sentezini içermektedir. L-cys@MoS₂/CKE yüzey morfolojisi FTIR, x-ışını fotoelektron spektroskopisi

(XPS), x-ışını kırınım spektroskopisi (XRD) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile karakterize edilmiştir. Elektrokimyasal karakterizasyon karşılaştırması 0,1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisi ile 0,5-1,3 V potansiyel aralığında DV ile incelenmiş ve L-cys@MoS₂/CKE'nin CKE'e göre 4,9 kat, 1T-MoS₂/CKE'e göre 1,4 kat daha yüksek elektro aktif yüzey alanına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Sensörün 0,1 mM LNG'nin elektrokimyasal tayini uygulanmasına yönelik optimize edilmiş deneysel parametreler DPV ile araştırılmış ve DV ile aynı potansiyel aralığında, pH 7,0 BRT olarak rapor edilmiştir. 1T-MoS₂'nin CKE'ye kıyasla 2,2 kat daha yüksek voltametrik tepki ortaya çıkardığı sonucuna varılırken, L-cys@MoS₂'de bu tepki 3,2 kat daha fazla olarak hesaplanmıştır. Aktarılan elektron sayısı 2,94 (~3) olarak hesaplanmış difüzyon kontrollü oksidasyon DPV yönteminde 0,19 μ M GS, 0,64 TS ve $r=0,9907$ ile 1,0–75,0 μ M ve 75,0–153,4 μ M olmak üzere iki doğrusal çalışma aralığında kanıtlanmıştır. Yöntemin insan plazma numunelerinin yanı sıra yaygın müdahalelere ve diğer bazı antidiyabetik ilaçlara uygulanması, sensörün pratikliği, eklenmiş plazmada ortalama %100,2'lük iyileşme ile klinik deneylerde umut verici bir paradigma olarak basit ve uygun maliyetli bir yol olarak sonuçlandırılmıştır.

Bu tez çalışmasında Trajenta® ve idrar numunelerinde LNG tayini için elektro sensör tasarlanarak elektrokimyasal yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Üretilen sensörün rutin kalite değerlendirmeleri ve klinik izlemede LNG tespiti için hassas, pratik ve düşük maliyetli olabileceği ortaya konulmuştur.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler

2.1.1. Elektroanalitik Kimya

Elektroanalitik kimya, elektrokimyasal olarak aktif analitlerin bir elektrokimyasal hücre aracılığıyla kalitatif ve kantitatif analizine dayanan analitik kimya dalıdır. Elektroanaliz temelli yöntemlerin düşük tespit limitleri ve elektrokimyasal davranışları açığa çıkaran karakterizasyon sunma potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Bu elektrokimyasal özellikler '*arayüzeySEL yük transferinin stokiyometrisi ve hızı, kütle transferinin hızı, adsorpsiyon veya kemisorpsiyonun kapsamı ve kimyasal reaksiyonlar için oranlar ve denge sabitleri*' olarak sıralanabilmektedir (Skoog vd., 2007).

2.1.1.1. Voltametri

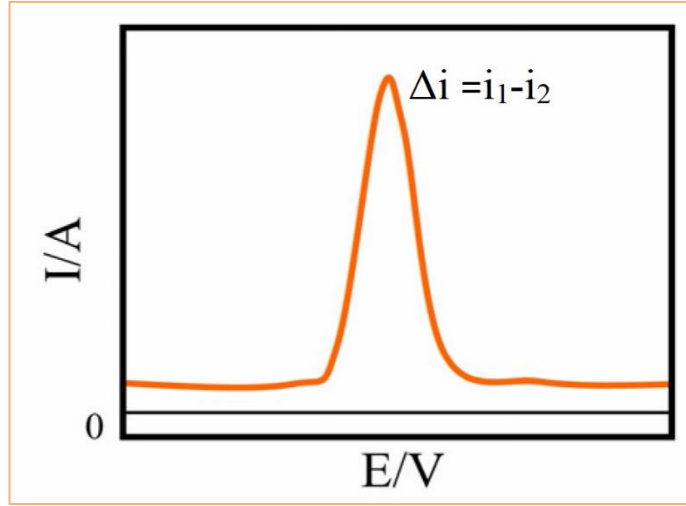
Analit hakkında bilgi elde etmek amacıyla polarize edilebilir bir çalışma (gösterge) elektrodunu destekleyen, potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçümünü içeren bir grup elektroanalitik yöntem, Voltametri olarak sınıflandırılmaktadır. Çeşitli ortamlarda oksidasyon-indirgeme, elektrot yüzeyindeki (kimyasal olarak değiştirilmiş) elektron transferini ortaya çıkaran mekanizmalar ve yüzey adsorpsiyonunu içeren temel çalışmalar, voltametriyi biyolojik, fiziksel ve inorganik kimyacılar için pratik bir yöntem haline getirmiştir (Skoog vd., 2007). Tüm organik ve inorganik maddelerin elektro aktivitesini araştıran yöntem, elektrokimyasal hücreler içerisinde; iki elektrotlu sistemde referans elektrota göre, üç elektrotlu sistemde ise bir yardımcı (karşıt) elektrota göre çalışma elektrotuna değişken potansiyellerin uygulandığı elektrot reaksiyonu sonucu akımın ölçülmesine dayanan bir çalışma prensibini ortaya çıkarmıştır. '*Zamanın ve akımın bir fonksiyonu olarak çalışma elektroduna uygulanan spesifik bir voltaj profili*' 'voltamogramlar' olarak adlandırılan potansiyel-akım eğrilerini dalga biçiminde sunmuştur (Wenzel, 2020).

2.1.1.1.1. Hidrodinamik Voltametri

Hidrodinamik voltametri (HV), tipik bir hücrede çeşitli yollarla gerçekleştirilebilen bir voltametri türüdür. Bu yöntemlerden biri, analit çözeltisinin bir miknatıslı karıştırıcı aracılığıyla sabit bir çalışma elektroduyla doğrudan temas halinde tutularak karıştırılmasını içermektedir. İkinci yöntemin yaklaşımı ise analit çözeltisi içindeki çalışma elektrodunu sabit bir hızla karıştırarak dönme hareketini sağlamaktır. Üçüncü yöntemin yaklaşımı ise analit çözeltisinin çalışma elektrodu içinden bir tüp aracılığıyla akışının sağlanmasıdır. Son ve en yaygın olarak kullanılan yöntem, indirgenebilir veya oksitlenebilir analitlerin bir akış enjeksiyon *manifold* veya bir sıvı kromatografi kolonu yardımıyla tespitini içermektedir. Elektroanaliz sırasında reaktan ile elektrot yüzeyi arasındaki etkileşim; elektrik alanının bir sonucu olarak göç, karıştırmanın bir sonucu olarak konveksiyon, elektrot yüzeyindeki ve analit çözeltisindeki sıvı filmin konsantrasyon farkının bir sonucu olarak difüzyon olmak üzere üç farklı mekanizma ile gerçekleştirilmektedir (Bard ve Faulkner, 2001; Skoog vd., 2007).

2.1.1.1.2. Diferansiyel Puls Voltametri

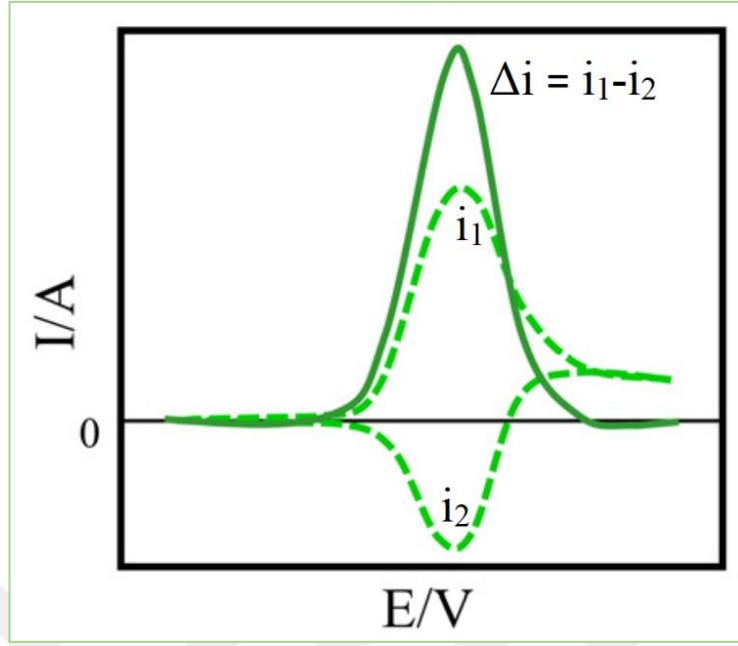
Diferansiyel Puls Voltametri (DPV), doğrusal artan uyarma voltajının bir fonksiyonu olarak darbe başına akım farkını (Δi) kaydetmek için iki akımın tepkisinin dönüşümlü olarak ölçülmesi yoluyla elde edilen bir voltametri türüdür. Elde edilen diferansiyel eğri (Şekil 2.1.), analit konsantrasyonu ile doğrudan orantılı bir tepe yüksekliğinin yanı sıra yarı reaksiyon standart potansiyeline neredeyse eşit bir tepe potansiyeli göstermiştir. DPV, nanoamper cinsinden mevcut ölçek dikkate alındığında, klasik voltametriden 2 ila 3 kat daha düşük olan, tespit limitlerinin 10^{-7} ile 10^{-8} M arasında değiştiği oldukça hassas voltamogramlar sağlamıştır. Günümüzde 10^{-9} M (nanomolar) seviyesinde kantitatif tespitler yapabilme özelliği, DPV'yi özellikle ağır metal iyonlarının eser miktar analizlerinde en yaygın kullanılan voltametrik yöntemlerden biri haline getirmiştir (Bard ve Faulkner, 2001; Skoog vd., 2007).



Şekil 2.1. E: potansiyel ve I: darbe başına akım olan tipik bir DPV voltamogramı (Liu vd., 2022)

2.1.1.1.3. Kare Dalga Voltametri

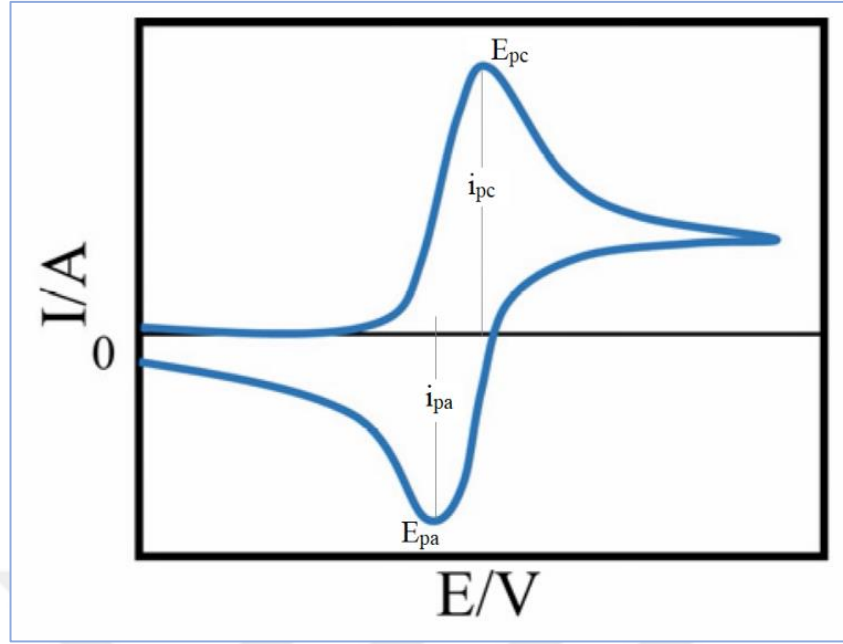
Kare dalga voltametri (KDV), bir elektrokimyasal hücredeki çalışma elektroduna genellikle 1-100 Hz aralığında kare potansiyel dalga biçimi gerçekleştiren darbe voltametrisinin bir varyasyonu olarak elde edilen voltametri türüdür. Elde edilen diferansiyel eğri, her biri ayarlanabilir genlik ve süreye sahip kısa bir dinlenme periyodunun takip ettiği bir dizi hızlı potansiyel adım şeklinde bir darbenin üst üste bindiğini göstermiştir. KDV'nin voltamogramı ileri darbe (i_1) olarak katodik bir akımı ve ters darbe (i_2) olarak bir anodik akımı (farkı 10 ms'den daha az ölçüm süresiyle potansiyele karşı Δi olarak çizilen) ortaya çıkarmıştır (Şekil 2.2.). KDV, yüksek hassasiyet, 10^{-7} ile 10^{-8} M arasında rapor edilen düşük tespit limiti ve hızlı ölçüm gibi özellikleriyle özellikle biyolojik moleküller ve çevresel kirleticiler gibi karmaşık sistemlerin eser miktar analizi için en yaygın kullanılan voltametrik yöntemlerden biri haline gelmiştir (Bard ve Faulkner, 2001; Skoog vd., 2007).



Şekil 2.2. KDV'nin tipik bir voltamogramı, E: potansiyel ve I: darbe başına akım (Liu vd., 2022)

2.1.1.1.4. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri (DV), karıştırılmamış bir analit çözeltisi içindeki üçgen potansiyel dalga formu tarafından küçük bir sabit elektrotun uyarılmasının bir sonucu olarak elektrotun akım tepkisinin kaydedilmesiyle elde edilen bir voltametri türüdür. DV voltamogramı (Şekil 2.3.), dalga formu diferansiyel eğrisinde bir geçiş potansiyeli olarak ileri ve geri taramaları temel alan potansiyel-akım ilişkisinden (zamanın bir fonksiyonu) kaynaklanır. Tersine çevrilebilir bir redoksta voltamogram, ileri taramada katodik bir tepe akımı (i_{pc}) ve ters taramada zıt işaretlerle hemen hemen aynı mutlak değere sahip bir anodik tepe akımı (i_{pa}) ortaya çıkarmıştır. Tersinir bir redoksun voltamogramı (25 °C'de), mutlak değerdeki farkı tepe potansiyelleri arasındaki farka (ΔE_p) eşit olan ileri darbe olarak bir katodik tepe potansiyelini (E_{pc}) ve ters darbe olarak bir anodik tepe potansiyelini (E_{pa}) göstermiştir. Denklem 1.1, ΔE_p ile redoks yarı reaksiyonunda aktarılan elektron sayısı (n) arasındaki ilişkiyi temsil etmektedir (Skoog vd., 2007; Wang, 2006).



Şekil 2.3. DV'nin tipik bir voltamogramı, E: potansiyel ve I: darbe başına akım (Liu vd., 2022)

$$\Delta E_p = |E_{pc} - E_{pa}| = \frac{0,0592}{n} \quad (1.1)$$

Tersinir olmayan bir redoksta, artan tarama hızıyla baş edilmeye çalışılan küçük elektron transferinden dolayı ΔE_p değerinin beklenenden yüksek çıktığı bilinmektedir. DV voltamogramlarının farklı tarama hızlarında ölçümlerle alınmasının nedeni budur.

Hem tersinir hem de tersinmez elektrot reaksiyonlarındaki durumlar, DV voltamogramındaki karakteristik piklerin nedeni olan çalışma elektrot yüzeyini kaplayan difüzyon katmanında meydana gelen süreci ortaya çıkarmıştır. Difüzyon katmanındaki elektro aktif malzeme, yükseltgenme veya indirgeme potansiyeline ulaşıldığında uygulanan potansiyel tarafından hızlı bir şekilde analit çözeltisinden geçmeye itilir ve bu durum akımın artmasına neden olur. Bu süreçte analit çözeltisinden elektrot yüzeyine kütle transferi başlamış olup, akım piklerinin nedeni olarak elektrot-çözelti arayüzü arasındaki konsantrasyon gradyanının zamanla sürekli değişmesine neden olur. Elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından çok daha büyük olduğunda ileri akım tepe noktası darbeye ulaşır, daha sonra düşmeye başlar ve aynı şekil ters akım için de görülür. Tepe akımı ile elektro aktif analitin konsantrasyonu ve difüzyon katsayısı

arasındaki doğru orantılılığı gösteren niceliksel bilgi, 25 °C'de *Randles-Sevcik* denklemi (1.2) ile elde edilmiştir.

$$\dot{I}_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A c D^{1/2} v^{1/2} \quad (1.2)$$

$\dot{I}_p$: tepe akımı (A), n: aktarılan elektron sayısı, A: elektrotun yüzey alanı (cm²), c: elektro aktif analitin konsantrasyonu (M), D: difüzyon katsayısı (cm²/s) ve v: tarama hızı (V/s)

Adsorpsiyon/difüzyon mekanizmaları, birleşik kimyasal reaksiyonlar ve elektrot yüzey modifikasyonu hakkındaki bilgilerin yanı sıra elektron transfer reaksiyonlarının termodinamik ve kinetiğini gün ışığına çıkarma yeteneği, DV'yi bir elektroanaliz yönteminde ilk adım deneyi olarak en yaygın kullanılan voltametrik yöntem haline getirmiştir (Skoog vd., 2007; Wang, 2006).

2.1.2. Voltametrik Hücre Bileşenleri

İlk dönem voltametrik çalışmaların iki elektrotlu sistemi kapsadığı bilinmesine rağmen günümüzdeki voltametrik analizler üç elektrotlu sistem kullanılarak yapılmaktadır. Bu tipik voltametrik sistem, bir voltametrik hücre içindeki sıvı elektrolit çözeltisi içindeki bir çalışma elektrotu, bir referans elektrotu ve bir karşıt elektrottan oluşmaktadır. Yöntemin uygulanmasına bağlı olarak sıcaklık kontrolü ve karıştırma sistemi de olabilmektedir. Günümüzde milimetre boyutlarındaki elektrotların yerini mikro elektrot olarak adlandırılan mikrometre veya daha küçük boyutlardaki elektrotlar almıştır. Son voltametrik analizler, üç elektrotun '*sert bir polimer veya seramik malzeme*' ile birleştirilmesiyle '*tek kullanımlık, taşınabilir, hızlı ve küçük hacimli analizler*' sağlayan serigrafi baskılı elektrotları içermektedir (Bard ve Faulkner, 2001; Skoog vd., 2013).

2.1.2.1. Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrodu, voltametrik hücrenin, kendinden karşıt elektroda doğru akım akışını ölçmek için zamana bağlı bir uyarım yoluyla referans elektrodun potansiyeline göre potansiyelini değiştiren bileşenidir. Asil metal, yarı iletken veya metal kaplı film cıva bazlı farklı şekil ve formlarda olabilen çalışma elektrotu üç alt gruba ayrılmıştır; cıva elektrotları, katı elektrotlar ve modifiye elektrotlar (Harvey, 2019; Skoog vd., 2013).

2.1.2.1.1. Katı Elektrotlar

Analit tarafından metal yüzey adsorpsiyonu dezavantajına rağmen geniş pozitif ve negatif potansiyel aralığına sahip olma avantajı katı elektrotları Pt, Au, Ag veya C'den oluşan en yaygın kullanılan voltametrik elektrotlardan biri haline getirmiştir. Son voltametrik çalışmalarda mikro elektrot üretmek için ayna kaplamalı temperli camın içinde 5 ila 100 mm arasında değişen küçük çaplı metal teller veya fiberler katı elektrot malzemelerinden oluşturulmuştur. Cıva elektrotlarda görülen dezavantajlardan dolayı; voltametriye katı bir elektrodun cıva elektrodunun yerini alabilecek yeterlilikte olduğu görülmüştür (Adams, 1969; Navratil ve Barek, 2009).

2.1.2.1.2. Modifiye Elektrotlar

Katı bir elektrodun çeşitli iletken malzemelerle kimyasal olarak modifiye edilerek modifiye elektrotların üretilmesi son yıllarda popüler hale gelen aktif bir alandır. Modifikasyon işlemleri, istenen işlevselliğe ulaşmak için adsorbe edici maddelerin geri döndürülemez şekilde uygulanmasına, elemanların kovalent bağlanmasıyla yüzeyin kaplanmasına ve elektrot yüzeyinin bir polimer veya diğer malzeme bazlı film tabakasıyla modifiye edilmesine dayanmaktadır. Modifiye elektrotların birçok potansiyel uygulaması vardır; yakıt hücreleri ve piller için gerekli olan oksijenin suya indirgenmesi, elektrokromik cihazlarda oksidasyon ve indirgeme sonucu renk değişimi, diyot ve transistör gibi elektronik cihazların yanı sıra hassas analitik sensörlerin üretilmesi gibi (Edwards vd., 2007; Murray vd., 1981).

2.1.2.2. Referans Elektrotlar

Referans elektrot, ideal durumda uygulanan akımda bilinen ve sabit bir potansiyeli koruyan, sıcaklığa ve analit çözeltisine karşı duyarsız olan, sağlam ve montajı kolay olan elektrokimyasal hücrenin bir bileşenidir. Hg/Hg₂Cl₂ bazlı doymuş kalomel elektrotlar (SCE olarak kısaltılır) ve Ag/AgCl elektrotlar, voltametrik analizlerde en yaygın kullanılan referans elektrotlardır (Inzelt vd., 2013).

2.1.2.3. Karşıt (Yardımcı) Elektrotlar

Karşıt (yardımcı) elektrot, esas olarak platin veya grafit gibi iletken bir malzemeden oluşan, çalışma elektrotundan tüm sisteme elektronların akışına izin vererek devreyi tamamlamak amacıyla hücrenin içine yerleştirilen elektrokimyasal hücrenin bileşenlerinden biridir. İlk voltametrik çalışmalarda, karşıt elektrotsuz iki elektrotlu sistem yüksek elektriksel dirençli solüsyonlarda gerçekleştirilen hatalı ölçümlerin bir sonucu olarak bozuk voltamogramlar oluşturmanın yanı sıra, referans elektrottan geçen akımda yüksek potansiyellerde görülen bir polarizasyon sorununu ortaya çıkarmıştır. Günümüzün üç elektrotlu sisteminde istenmeyen ürünlerin birikmesini önleyen gerekli sabit potansiyel, *'akım akışının karşıt elektrot ile dengelenmesiyle'* karşılanmaktadır (Bard ve Faulkner, 2001; Skoog vd., 2013).

2.1.2.4. Destekleyici Elektrolit

Destekleyici elektrolit, voltametrik hücre bileşenlerinin içine daldırıldığı, tuz ilave edilmiş bir analitten oluşan çözeltidir. Hücredeki destekleyici elektrolitin temel fonksiyonları; göç etkisinin azaltılması, direncin bozulması ve çalışma elektroduna tepki vermemesi olarak sıralanabilmektedir. Voltametrik analizlerde destekleyici elektrolit olarak organik çözeltilerin yanı sıra çeşitli tuzlar (NaCl, KCl ve tetraalkilamonyum tuzları gibi), tampon çözeltiler (asetat ve fosfat gibi) kullanılmaktadır (Bard ve Faulkner, 2001; Skoog vd., 2013).

2.1.2.5. Voltametrik Hücre

Voltametrik hücrelerin kap olarak üretilmesi için cam, plastik veya kuvars gibi kimyasal olarak inert ve iletken olmayan malzemeler kullanılmaktadır. Elektrolit ve üç elektrottan oluşan elektrot sistemi, çeşitli hacimlerde *O-ring* veya benzeri bir kapakla hücre içerisinde taşınmaktadır(Skoog vd., 2007).

2.2. Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler

2.2.1. Kimyasallar

Tezde kullanılan tüm kimyasallar  izelge 2.1'de belirtilmiştir. Nano elmas (NE) Prof. Dr. Mustafa Soylak tarafından temin edilirken, Grafen nano plakalar (GNP) Nanografi Nano Teknoloji'den satın alınmıştır. Ayrıca tez çalışmalarının yürütülmesi amacıyla örnek olarak bir gönüllünün idrarı toplanmıştır.

Çizelge 2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Formül	Marka
Linagliptin	C ₂ H ₂₈ N ₈ O ₂	Boehringer Ingelheim
Nano elmas	C	Soylak Araştırma Grubu
Grafen nano plakalar	C	Nanografi Nano Teknoloji
Sodyum fosfat dibazik	Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
Potasyum dihidrojen fosfat	KH ₂ PO ₄	Merck
Sodyum hidroksit	NaOH	Merck
Etanol	C ₂ H ₆ O	Carlo Erba
Metanol	CH ₄ O	Merck
Potasyum ferrisiyanür	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Sigma-Aldrich
D-Glikoz	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma-Aldrich
L-Sistein	C ₃ H ₇ NO ₂ S	Sigma-Aldrich
Üre	CH ₄ N ₂ O	Sigma-Aldrich
Dopamin	C ₈ H ₁₁ NO ₂	Alfa-Aesar
Sodyum sülfat	Na ₂ SO ₄	Merck
Kafein	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	Sigma-Aldrich
Asetik Asit	CH ₃ COOH	Merck
Borik Asit	H ₃ BO ₃	Merck
Fosforik Asit	H ₃ PO ₄	Merck
Sodyum Asetat	CH ₃ COONa	Merck
Potasyum Asetat	CH ₃ COOK	Merck
Hidroklorik asit	HCl	Merck

2.2.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve diğer ekipmanlar Çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve diğer ekipmanlar

Cihaz	Marka modeli
Hassas terazi	Radwag AS 220 R.2
pH ölçer	METTLER TOLEDO S220-K SevenCompact™
Ultrasonik banyo	Bandelin sonoreksi
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Heidolp MR Hei-Standart
Ultra saf su cihazı	Millipore, Milli-Q
Otomatik mikropipet	Thermo Fisher Bilimsel Finnpiette
Santrifüj	Thermo Electron Corp. MicroCL 17R
Vorteks	Velp Scientifica
PTFE şırınga filtresi (0,45 µm)	Agilent Teknolojileri

2.2.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Elektrokimyasal Sistem

Kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri

Bileşen	Marka modeli
Potansiyostat Galvanostat sistemi	Metrohm Autolab PGSTAT 204N
Dijital ısıtıcılı manyetik karıştırıcı	Daihan MSH-20d
Çalışma elektrodu (CKE*, 3 mm çap)	BASi®- MF 2012
Referans elektrodu (Ag/AgCl)	BASi®- MF 2052
Karşıtl elektrot (Pt, 7,5 cm)	BASi®- MW 1032
Parlatma cilalama seti	BASi®- MF 2060
Cam hücre	BASi®- MR 1208

*CKE: Camsı karbon elektrot

2.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, deneylerde ultra saf su temin edilmiştir.

2.3.1. LNG Standart Çözeltisinin Hazırlanması

Boehringer Ingelheim tarafından temin edilen 4,73 mg LNG standardının 10 mL'lik balon joje içindeki ultra saf su içerisinde çözülmesiyle 1,0 mM LNG stok çözeltisi (4,73 mg/mL) hazırlanmıştır. Tam bir çözünme elde etmek için içerikler vorteks içerisinde 25 dakika karıştırılmış ve LNG'nin stok çözeltisi olarak +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Stok çözeltinin kullanılmadan önce 25 °C'ye ulaşması sağlanmış ve elektroanaliz sırasında belirli konsantrasyonlarda LNG elde etmek için elektrolit çözeltisi ile seyreltilmiştir.

2.3.2. Elektrolit Çözeltisinin Hazırlanması

Tez çalışmasında elektrolit çözeltisi olarak 0,05 M konsantrasyonlu fosfat tamponu (FT) kullanılmıştır. 4,48 g Na_2HPO_4 ve 1,70 g KH_2PO_4 hassas terazide ölçülmüş ve bir miktar ultra saf su içeren 500 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Bileşenler manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırma mıknatısı ile karıştırıldıktan sonra karıştırıcı çıkarılarak çözelti ultra saf su ile 500 mL'ye kadar seyreltilmiştir. FT'nin istenen pH değerlerine ayarlanması için 0,1 M NaOH kullanılmıştır. 0,05 M FT çözeltisi elektrolit olarak buzdolabında +4 °C'de saklanmış ve kullanılmadan önce 25 °C'ye ulaşması sağlanmıştır.

2.3.3. İdrar Numunesi Hazırlama

İdrar numunesindeki LNG içeriği enjeksiyon solüsyonu (0,10 mL 0,20 mg/mL) ve 10 mL 0,05 M FT ile (pH 5,0) hazırlanmıştır. Bir gönüllü tarafından temin edilen idrar numunesi, toplandıktan hemen sonra bir gece boyunca buzdolabında (4 °C'de) saklanmıştır. 2000 devir/dakikada (10 dakika) santrifüj için 10 mL numune alınmıştır. Beş kez FT (pH 5,0) ile seyreltmeden önce, santrifüjlenen numune, gerçek numune hazırlama için de kullanılan PTFE ile süzölmüştür. Çözelti analiz edilecek voltametrik hücreye aktarılmış ve idrar numunesinde standart ekleme yöntemiyle LNG tayini yapılmıştır.

2.3.4. Farmasötik Dozaj Formunun Hazırlanması

Trajenta® içindeki LNG içeriği (her tablette 5 mg LNG, AA8364A) analiz edilmiştir. Tam olarak tartılan tabletler (tablet başına 181,02 mg) havanla toz haline getirilmiştir. Tablet tozunun 10 mL'lik balon joje içerisinde metanol (MeOH , 7 mL) ile çözülmesi ve 25 dakika sonikasyon işlemi sonucunda 1,0 mM LNG tablet çözeltisi (4,73 mg/mL) hazırlanmıştır. MeOH ile 10 mL'ye tamamlanan çözelti, PTFE şırınga filtresiyle süzölmüştür. Süzüntü buzdolabında +4 °C'de tablet çözeltisi olarak saklanmıştır. Tablet çözeltisinin kullanımdan önce 25 °C'ye ulaşması sağlanmış ve elektroanaliz sırasında belirli konsantrasyonlara FT (pH 5,0) ile seyreltilmiştir (%10 MeOH h/h oranı korunmuştur).

2.3.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Diğer Çözeltilerin Hazırlanması

Üretilen sensörün elektrokimyasal karakterizasyonu 0,04 mM konsantrasyonda $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. $K_3[Fe(CN)_6]$ 'nin hazırlanma süreci 5,0 mM ferrosiyanür $[Fe(CN)_6]^{4-}$, 5,0 mM ferrisiyanür $[Fe(CN)_6]^{3-}$ ve 0,1 M KCl çözeltilerinin ayrı ayrı hazır hale getirilmesini içermiştir. $[Fe(CN)_6]^{4-}$ çözeltisi 26,4 mg maddenin 25 mL ultra saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. $[Fe(CN)_6]^{3-}$ çözeltisi ise 41,2 mg maddenin 25 mL ultra saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. KCl çözeltisi 186 mg maddenin 25 mL ultra saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Ayrı ayrı hazırlanan üç çözelti $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisini oluşturmak amacıyla 100 mL'lik hacimsel bir balon joje içinde karıştırılmış, +4 °C'de buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce 25 °C'ye ulaşmasına olanak sağlanmıştır.

Girişim maddelerinin LNG voltametrik yanıtı üzerindeki etkisini değerlendirmek için D-glikoz, L-sistein, üre, dopamin, Na_2SO_4 ve kafeinden oluşan girişim türleri 1,0 mM konsantrasyonda kullanılmıştır. Hassas bir şekilde hesaplanan ve ölçülen gerekli madde miktarları, ultra saf su ile çözülerek 10 mL'lik volumetrik flasklar içinde hazırlanmıştır. Girişim çalışmasında kullanılan kimyasalların miktarları Çizelge 2.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. Girişim çalışmasında kullanılan kimyasalların miktarları

Girişim	Kimyasal Madde Miktarları (mg)
D-Glikoz	1,97
L-Sistein	1,21
Üre	0,60
Dopamin	1,90
Sodyum Sülfat	1,42
Kafein	1,94

2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Voltametrik Yöntemler

2.4.1. Dönüşümlü Voltametri

DV çalışması *Britton-Robinson* (BRT), asetat ve fosfat tamponlarında (FT) 1,0 mM LNG için incelenmiştir. Yüksek pH deneylerinde karşılaşılan alkali hatasının yanı sıra BR ve asetat tamponundaki bileşenlerin zararlı etkileri göz önüne alındığında, LNG'nin elektrokimyasal davranışını ölçmek için üretilen sensör ile 0,05 M (pH 7,0) konsantrasyonlu FT tamponunun kullanılmasına karar verilmiştir. Modifiye edicilerin LNG'nin pik akımı üzerindeki etkinliğinin miktarı, yüzey kaplama etkisini anlamak için DV çalışması yapılarak incelenmiştir. Optimum pH koşulu ve LNG'nin elektrokimyasal reaksiyonu sırasında transfer edilen elektron sayısı da DV çalışmasıyla ortaya çıkarılmıştır.

2.4.2. Diferansiyel Puls Voltametri

LNG'nin analitik uygulamaları, seçicilik, tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik, stabilite, girişim ve geri kazanım (%) çalışmaları DPV yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

2.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Sensörün Hazırlanması

2.5.1. Kullanımdan Önce CKE'ye Yapılan Ön İşlemler

Parlatma-cilalama plakası üzerinde CKE yüzeyi 0,05 µm alümina bulamacı ile cilalanarak modifikasyona hazırlanmıştır. Yıkama sonrasında hem ultra saf su ile giderilemeyen alümina atıklarının hem de diğer yabancı maddelerin uzaklaştırılması amacıyla 5 dakika süren sonikasyon işleminde etanol ve ultra saf su kullanılmıştır. Ultrasonik banyodan çıkarılan CKE, ortam sıcaklığında kurutulduktan sonra çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır.

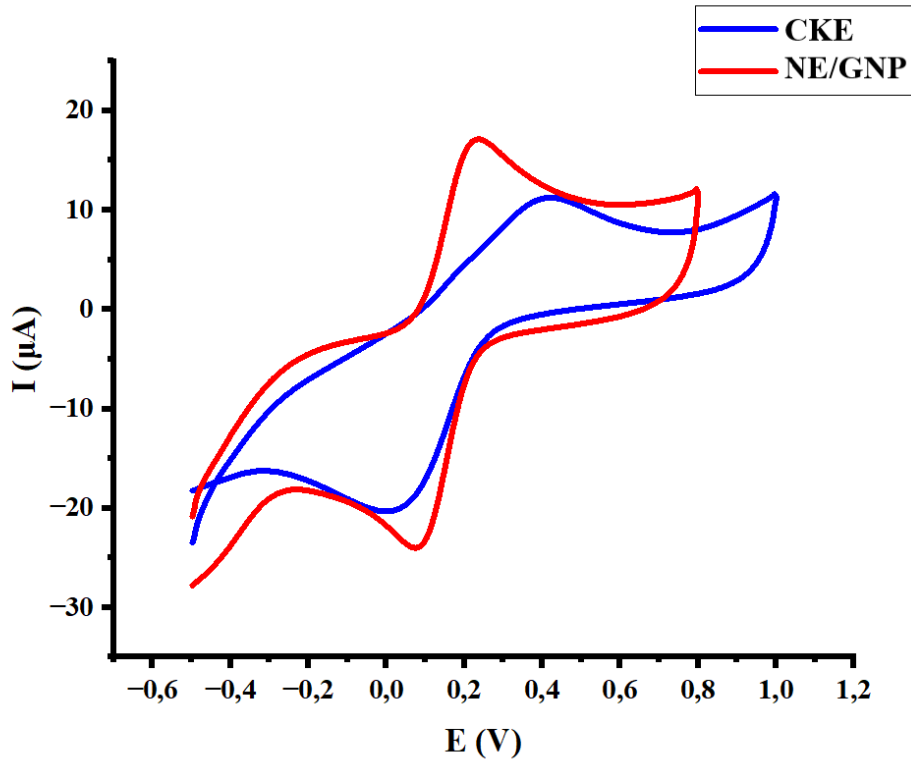
2.5.2. NE/GNP Modifiye CKE'nin Hazırlanması

NE/GNP ile modifiye edilmiş CKE'nin (NE/GNP/CKE) hazırlanmasından önce, karşılaştırma için NE/CKE ve GNP/CKE üretilmiştir. 0,5 mg NE'nin 1,0 mL ultra saf su (0,5 mg/mL) içerisinde dispersiyonu ile hazırlanan NE süspansiyonu, homojen bir dağılım elde etmek amacıyla 1 dakika süreyle *vorteks* işleminden geçirilmiştir. Önceden parlatılmış ve temizlenmiş CKE yüzeyine, 6,0 µl NE süspansiyonu bir mikropipet ile damlatılmış ve NE/CKE kullanılmadan önce ortam sıcaklığında kurutulmuştur. Benzer şekilde, 1,0 mg GNP'nin 1,0 mL ultra saf su (1,0 mg/mL) içerisinde dağıtılmasıyla hazırlanan GNP süspansiyonu, homojen bir dağılım elde etmek amacıyla 1 dakika süreyle *vorteks* işleminden geçirilmiştir. Daha önce cilalanmış ve temizlenmiş CKE yüzeyine, GNP/CKE kullanılmadan önce 6,0 µL GNP süspansiyonu bir mikropipet ile damlatılmış ve ortam sıcaklığında kurutulmuştur. NE/GNP/CKE, ilk olarak CKE'nin 6,0 µL 0,5 mg/mL NE süspansiyonu ile modifiye edilmesini ve ortam sıcaklığında kurutulmasını, ardından NE/CKE'nin 6,0 µL 1,0 mg/mL GNP süspansiyonuyla kaplanmasını ve kurutulmasını içeren iki işlemle üretilmiş ve ortam sıcaklığında kurutulmuştur.

3. BULGULAR

3.1. NE/GNP/CKE'nin Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Elektrotların elektroaktif yüzey alanı 0,04 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisinin -0,5 V ila 1,6 V potansiyel aralığında 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 ve 400 mV/s tarama hızlarında DV analizleri ile *Randles-Sevcik* denklemi uygulanarak hesaplanmıştır. CKE, NE, GNP ve NE/GNP elektroaktif yüzey alanları sırasıyla 6,64; 6,93; 13,5 ve 14,8 mm² olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, hesaplamalar ve elde edilen voltamogramlar (Şekil 3.1) sonucunda NE/GNP'nin CKE'ye kıyasla 2,2 kat daha yüksek elektroaktif yüzey alanına sahip olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 3.1. 50 mV/s tarama hızında 0,04 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisinde CKE ve NE/GNP'nin döngüsel voltamogramı

3.1.1. Elektroaktif Yüzey Alanlarının Hesaplanması

Bu tez çalışması kapsamında CKE, NE, GNP ve NE/GNP'nin elektroaktif yüzey alanları *Randles-Sevcik* denklemi ile hesaplanmıştır (Skoog vd., 2007).

$$i_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A c D^{1/2} v^{1/2} \quad (3.1)$$

i_p : pik akımı (A), n: aktarılan elektron sayısı, A: elektrodun yüzey alanı (cm²), c: elektroaktif analitin konsantrasyonu (M), D: difüzyon katsayısı (cm²/s) ve v: tarama hızı (V/s).

Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks sisteminde D= 6,3 x 10⁻⁶ cm²/s ve n=1 ile *Randles-Sevcik* denklemi uygulanmıştır. Elektrotların regresyon denklemlerini elde etmek için oksidasyon pik akımlarının (I_{pa}) tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) karşı grafiği çizilmiştir. 0,04 mM K₃[Fe(CN)₆] çözeltisindeki CKE'nin regresyon denklemi aşağıda (3.2) gösterilmiştir.

$$I_{pa} (\mu A) = 1,6584 v^{1/2} (mV/s)^{1/2} + 1,8306 \quad (R^2=0,9928) \quad (3.2)$$

Randles-Sevcik denklemine uygulandığında CKE'nin 0,04 mM K₃[Fe(CN)₆] çözeltisindeki elektroaktif yüzey alanı (A) 6,64 mm² olarak hesaplanmıştır.

NE'nin 0,04 mM K₃[Fe(CN)₆] çözeltisindeki regresyon denklemi aşağıda (3.3) gösterilmiştir.

$$I_{pa} (\mu A) = 1,7307 v^{1/2} (mV/s)^{1/2} + 1,1753 \quad (R^2=0,9926) \quad (3.3)$$

Elde edilen eğim *Randles-Sevcik* denklemine uygulandığında, NE'nin 0,04 mM K₃[Fe(CN)₆] çözeltisindeki elektroaktif yüzey alanı (A) 6,93 mm² olarak hesaplanmıştır.

GNP'in K₃[Fe(CN)₆] çözeltisindeki regresyon denklemi aşağıda (3.4) gösterilmiştir.

$$I_{pa} (\mu A) = 3,3736 v^{1/2} (mV/s)^{1/2} + 8,3297 \quad (R^2=0,9567) \quad (3.4)$$

Randles-Sevcik denklemine uygulandığında 0,04 mM K₃[Fe(CN)₆] çözeltisindeki GNP'in elektroaktif yüzey alanı (A) 13,5 mm² olarak hesaplanmıştır.

K₃[Fe(CN)₆] çözeltisindeki NE/GNP'nin regresyon denklemi aşağıda (3.5) gösterilmiştir.

$$I_{pa} (\mu A) = 3,707 v^{1/2} (mV/s)^{1/2} + 4,0527 (R^2=0,9811) \quad (3.5)$$

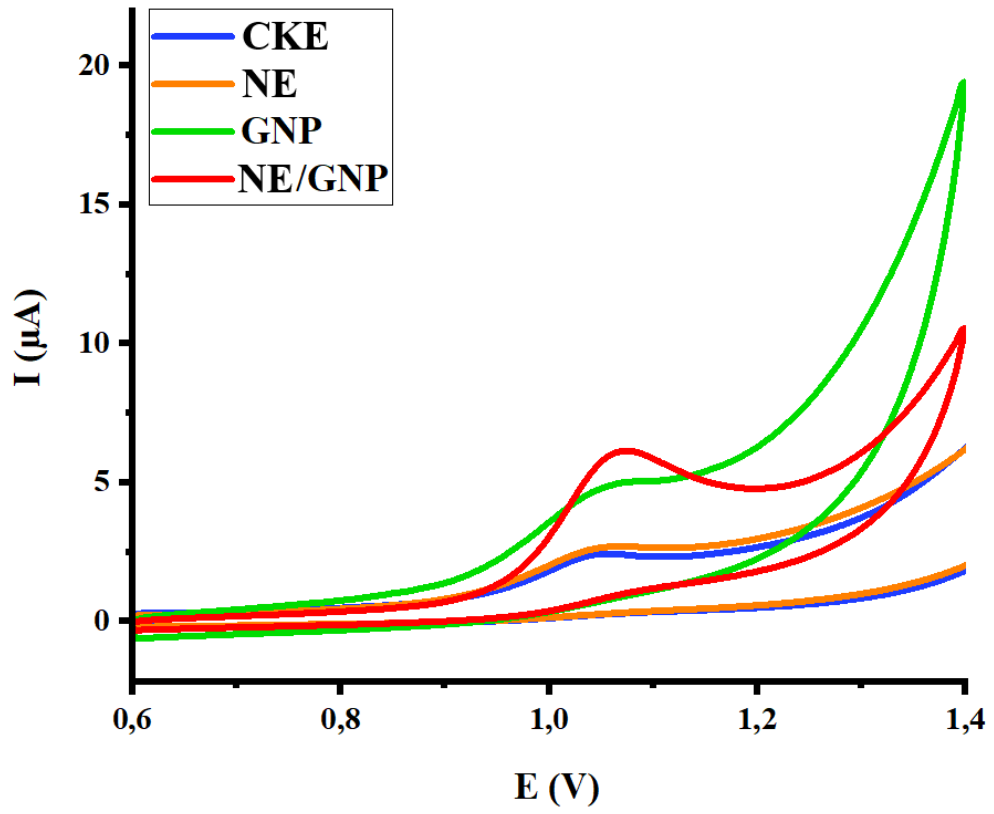
Randles-Sevcik denklemine uygulandığında 0,04 mM K₃[Fe(CN)₆] çözeltisindeki NE/GNP'nin elektroaktif yüzey alanı (A) 14,8 mm² olarak hesaplanmıştır.

3.2. LNG için Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi

Tez çalışması kapsamında NE/GNP/CKE'nin elektrokimyasal karakterizasyonu tamamlandıktan sonra LNG tayinine yönelik elektroanalitik yöntem geliştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları sonrasında idrarda ve Trajenta® farmasötik dozaj formunda LNG tayini yapılmıştır.

3.2.1. NE/GNP/CKE'de LNG'nin Elektrokimyasal Davranışı

Geliştirilen sensör ile LNG'nin elektrokimyasal davranışı incelenmeden önce, sabit bir voltamogram elde etmek için 0,0 V ve 1,6 V arasında 5 kez tarama yapılarak elektrotlar voltametrik analizlere hazır hale getirilmiştir. Daha sonra, LNG'nin elektrokimyasal davranışını ölçmek amacıyla 1,0 mM LNG için NE/GNP/CKE'de 0,05 M FT (pH 7,0) ile DV çalışması araştırılmıştır (Şekil 3.2). NE/GNP/CKE üzerinde 3,35 µA- 1064 mV'da belirgin bir yükseltgenme piki gözlenmiştir. DV çalışması CKE, NE/CKE ve GNP/CKE'de 0,05 M FT ile (pH 7,0) 1,0 mM LNG için araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 3.1'de karşılaştırılmıştır. NE ve GNP kaplı elektrot yüzeyleri LNG'nin voltametrik tepkisinde 1,06 kat ve 1,30 kat artış sağlarken, NE/GNP kaplı elektrot bu oranı CKE'ye kıyasla 4,66 kata çıkarmıştır. Sonuçlar dikkate alınarak tez çalışmalarına NE/GNP/CKE elektrot sistemi ile devam edilmesine karar verilmiştir.



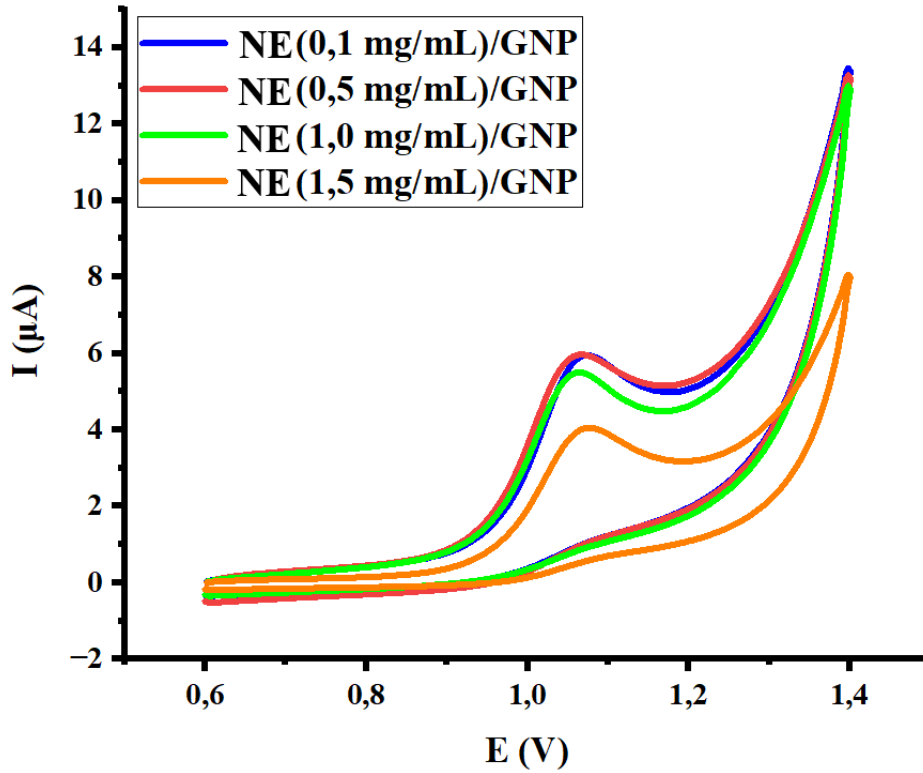
Şekil 3.2. 1,0 mM LNG'nin 0,05 M FT içerisinde (pH 7,0) farklı elektrotlarla voltamogramı

Çizelge 3.1. 1,0 mM LNG'nin farklı elektrotlar üzerindeki analitik tepkisinin kıyaslanması (N = 3)

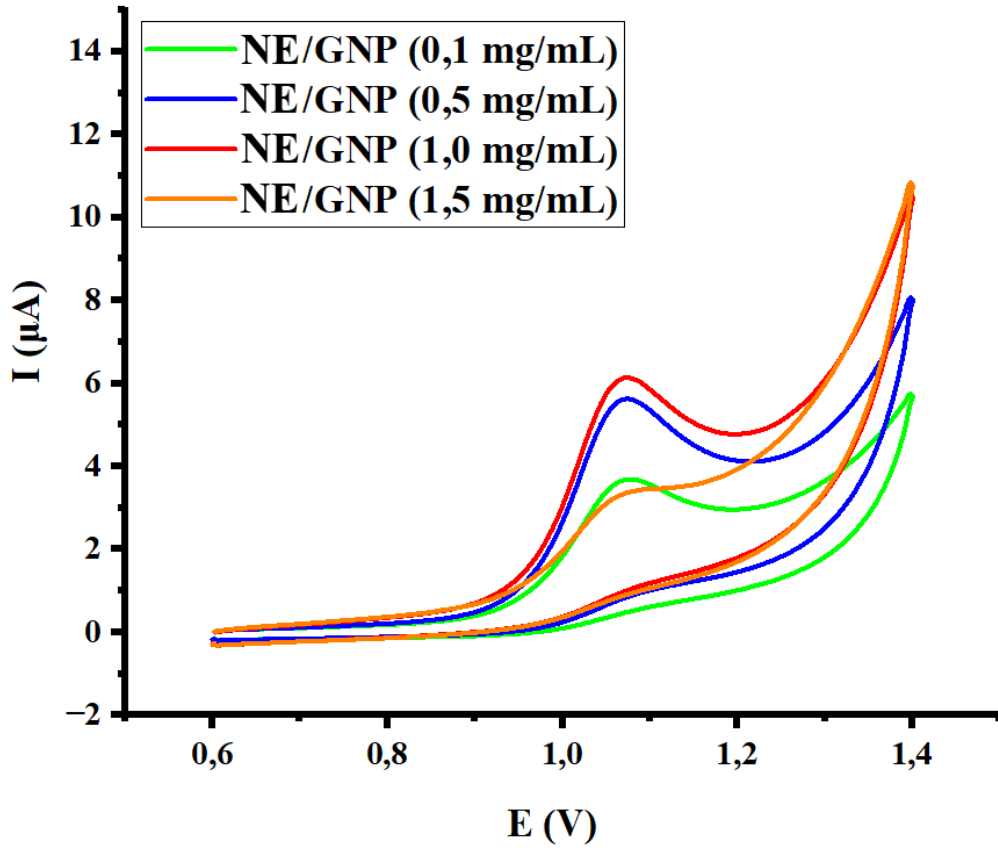
Elektrot	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μ A)
CKE	1045	0,719
NE	1047	0,762
GNP	1044	0,936
NE/GNP	1064	3,35

3.2.2. Yüzey Kaplama Etkisi

2.6.2.'de belirtildiği gibi, sırasıyla 6,0 μL 0,5 mg/mL NE süspansiyonu ve 1,0 mg/mL GNP süspansiyonu CKE yüzeyine kaplanmıştır. Sensör nanokompozitlerinin LNG pik akımı üzerindeki etkinliği, CKE yüzeyinin değişen nanokompozit konsantrasyonları (0,1 mg/mL-1,5 mg/mL) ile kaplanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te gösterilmiştir. 0,5 mg/mL NE ve 1,0 mg/mL GNP ile kaplanan elektrodun en yüksek pik akımına sahip olduğu görülmüş ve dolayısıyla ileriki çalışmalarda CKE yüzeyi üzerine 6 μL 0,5 mg/mL NE ve 1,0 mg/mL GNP dispersiyonları kaplanarak kullanılmıştır.



Şekil 3.3. 1,0 mM LNG'nin pH 7,0, 0,05 M FT içerisinde 0,1 mg/mL-1,5 mg/mL arasında değişen NE konsantrasyonları ve 1,0 mg/mL GNP konsantrasyonu ile modifiye edilmiş CKE yüzeyinde voltamogramı



Şekil 3.4. 1,0 mM LNG'nin pH 7,0, 0,05 M FT içerisinde 0,1 mg/mL-1,5 mg/mL arasında değişen GNP konsantrasyonları ve 0,5 mg/mL NE konsantrasyonu ile modifiye edilmiş CKE yüzeyinde voltamogramı

3.3.3. LNG için Voltametrik Yöntem Optimizasyonu

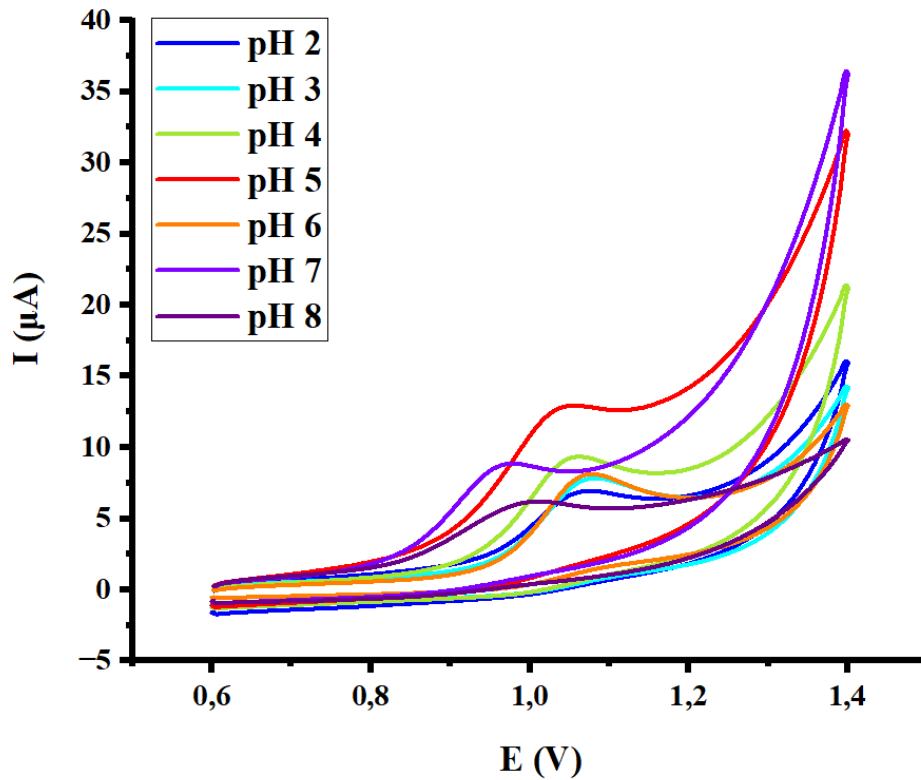
İleriki çalışmalarda kullanılacak sensörün belirlenmesinin ardından elektrolit FT'nin optimum pH'ı ve geliştirilen yöntem için optimum tarama hızı belirlenmiştir.

3.3.3.1. Elektrolit Çözeltilisinin pH Etkisi

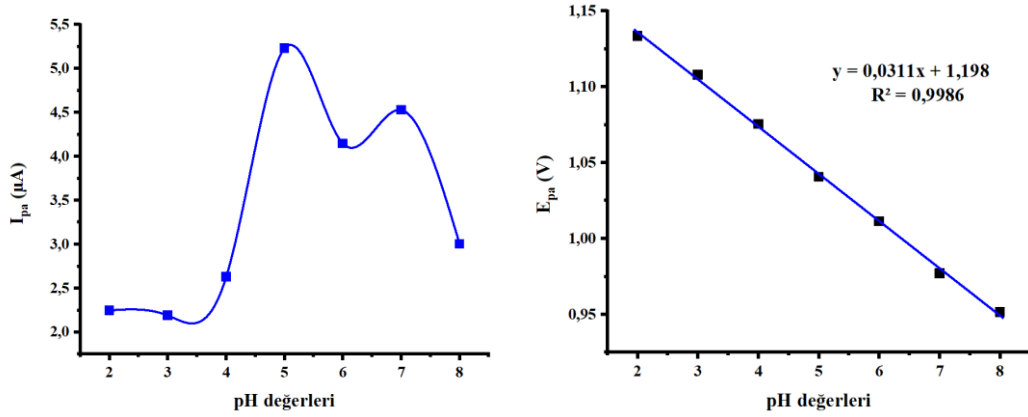
Analitin voltametrik yanıtı (Şekil 3.5'te gösterilmiştir) destekleyici elektrolitin pH değerinden önemli ölçüde etkilenmiştir, bu nedenle 1,0 mM LNG'nin pik akımlarının 2,0 ila 8,0 arasında değişen pH değerlerine sahip 0,05 M FT içinde araştırılması çok önemli olmuştur (2.4.1'de

belirtildiği gibi, yüksek pH deneylerinde karşılaşılan alkali hatası ve BR ile asetat tamponundaki bileşenlerin asit içeriklerinden kaynaklanan aşındırıcı ve tahriş edici zararlı etkileri göz önüne alınarak, bu çalışmada stok çözeltisi olarak FT kullanılmasına karar verilmiştir). Şekil 3.6'da görüldüğü gibi LNG'nin pik akımı pH 5,0'a kadar artış eğilimi gösterirken, pH 6,0'dan 8,0'a kadar pik akımının düşme eğilimi gösterdiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle en yüksek pik akımını veren optimum pH değeri 5,0 olarak seçilmiştir.

Pik potansiyeli (E_{pa}) ile pH değerleri arasındaki doğrusallık (Şekil 3.6) ve LNG yükseltgenme pik potansiyellerinin daha düşük değerlere kayması, *Pourbaix* Diyagramına (Verink, 2000) göre bu elektrolit sisteminde transfer edilen elektronlar ve hidrojenler arasındaki oranın 2:1 olduğunu göstermiştir. Ayrıntılı hesaplamalar ve açıklamalar bir sonraki bölümde verilmiştir.



Şekil 3.5. LNG'nin pH değerleri 2,0-8,0 arasında değişen 0,05 M FT içerisinde NE/GNP/CKE ile DV voltamogramları



Şekil 3.6. (a) LNG'nin anodik pik akımı ile pH değerlerinin grafiği. (b) E_{pa} ve pH değerlerinin grafiği (Pourbaix Diyagramı)

3.3.3.1.1. LNG'nin Yükseltgenme Mekanizmasının Anlaşılması

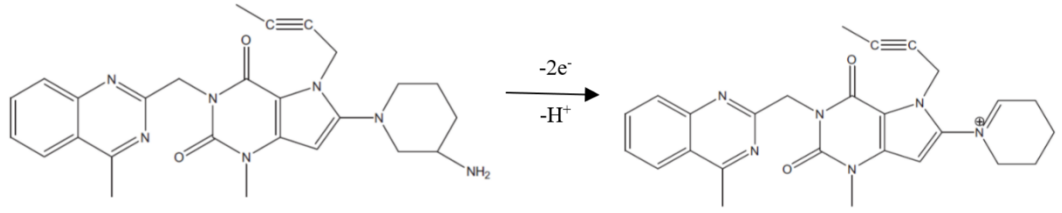
Değerlendirilen sistemdeki potansiyel kimyasal ve elektrokimyasal dengelerin incelenmesinden elde edilen üç farklı doğrusal ilişki biçimi *Pourbaix* Diyagramları olarak bilinmektedir (Verink, 2000). Tez çalışmasında elde edilen *Pourbaix* Diyagramı, H^+ ve e^- oranını (3.6) veren bir eğimle hem redoks hem de asit-baz reaksiyonunu işaret eden azalan bir düz çizgi ortaya çıkarmıştır.

$$\text{Eğim} = -0,0592 \frac{V}{pH} \times \frac{H^+ \text{ sayısı}}{e^- \text{ sayısı}} \quad (3.6)$$

Pourbaix Diyagramından (Şekil 3.6.) elde edilen 0,05 M FT çözeltisindeki değişen pH ile NE/GNP/CKE'nin regresyon denklemi aşağıda (3.7) gösterilmiştir.

$$E_{pa} (V) = -0,0311 pH + 1,198 \quad (R^2 = 0,9986) \quad (3.7)$$

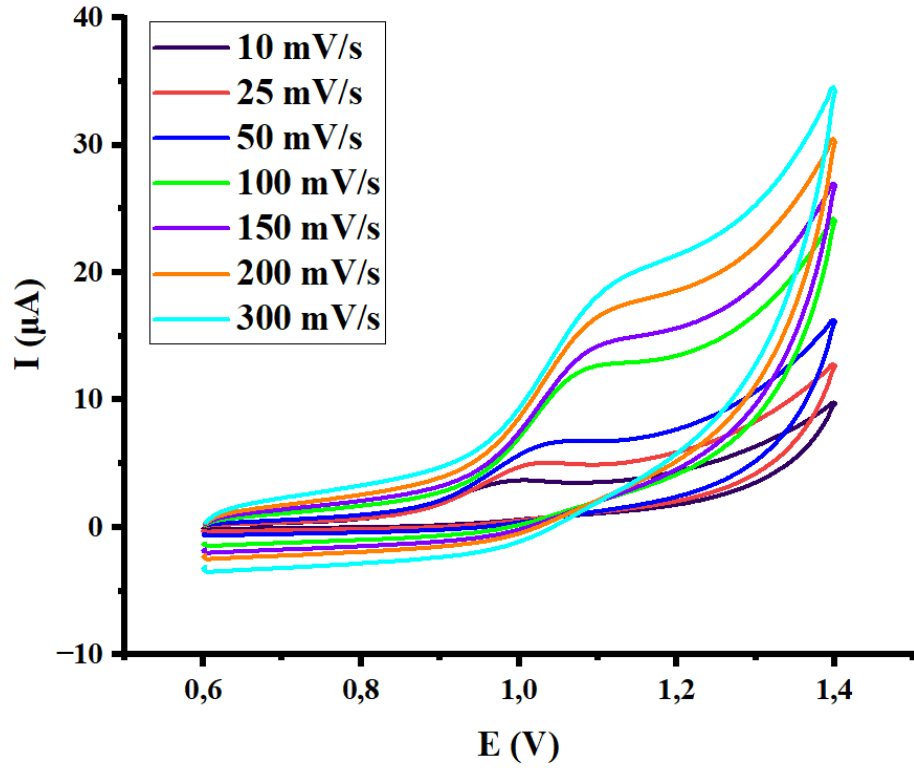
Elde edilen eğim (-0,0311 V/pH) denklem 3.6'ya uygulandığında elektronlar ve hidrojenler arasındaki oran 2:1 olarak bulunmuştur. LNG için önerilen yükseltgenme mekanizması, alifatik halkaya bağlı nitrojen den elektron ve protonların aktarıldığı Şekil 3.7'de verilmiştir.



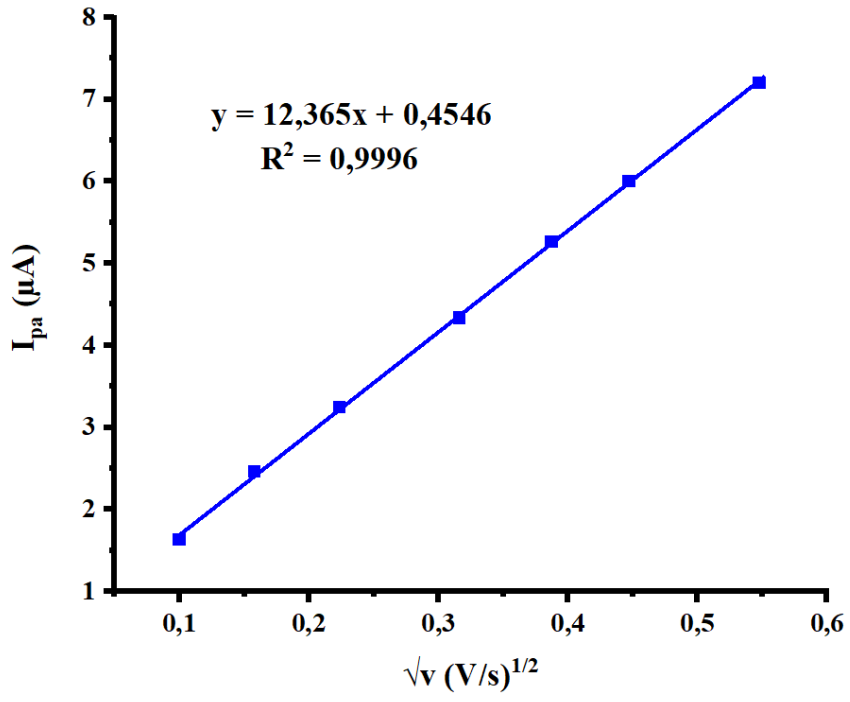
Şekil 3.7. LNG yükseltgenmesi için önerilen mekanizma

3.3.3.2. Tarama Hızı Etkisi

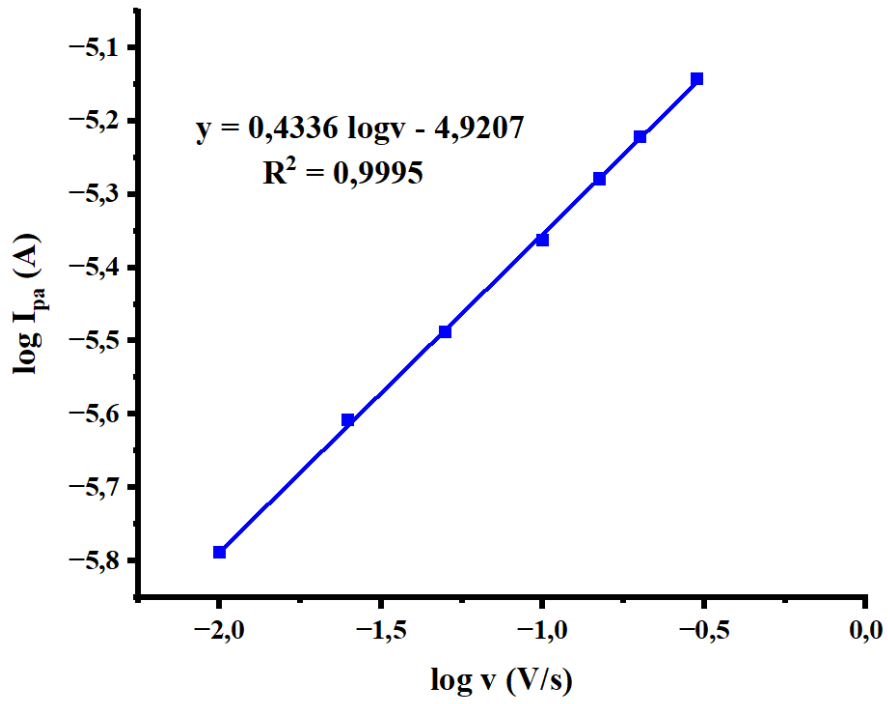
NE/GNP/CKE yüzeyinde meydana gelen reaksiyonun elektrokimyasal olarak incelenmesi amacıyla pH 5,0 0,05 M FT içerisinde 1,0 mM LNG'nin 10, 25, 50, 100, 150, 200 ve 300 mV/s tarama hızlarıyla 0,0 V ila 1,6 V potansiyel aralığında DV'leri araştırılmıştır. Hesaplamalarda her tarama hızında dört ölçümün ortalama değerleri kullanılmıştır. Elde edilen voltamogramlarda belirtildiği gibi (Şekil 3.8), pik akımı (I_{pa}) tarama hızına doğru doğrusal olarak artan bir eğilim ortaya çıkarmıştır; bu da modifiye elektrotların yüzeyinden doğrudan elektron transferine işaret etmektedir. I_{pa} 'nın tarama hızının kareköküne ($\sqrt{v}$) karşı doğrusal grafiği (Şekil 3.9), regresyon denkleminin eğimi 0,5'ten az olan $\log v$ ve $\log I_{pa}$ arasındaki doğrusal ilişki ile de doğrulanan, NE/GNP/CKE yüzeyindeki difüzyon kontrollü mekanizmayı kanıtlamıştır (Şekil 3.10 ve denklem 3.8'de gösterildiği gibi).



Şekil 3.8. pH 5,0, 0,05 M FT içerisinde 1,0 mM LNG'nin 10, 25, 50, 100, 150, 200 ve 300 mV/s tarama hızlarında DV voltamogramları



Şekil 3.9. pH 5,0, 0,05 M FT içerisinde 1,0 mM LNG'nin I_{pa} 'ya karşı $\sqrt{v}$ grafiği (N=4)

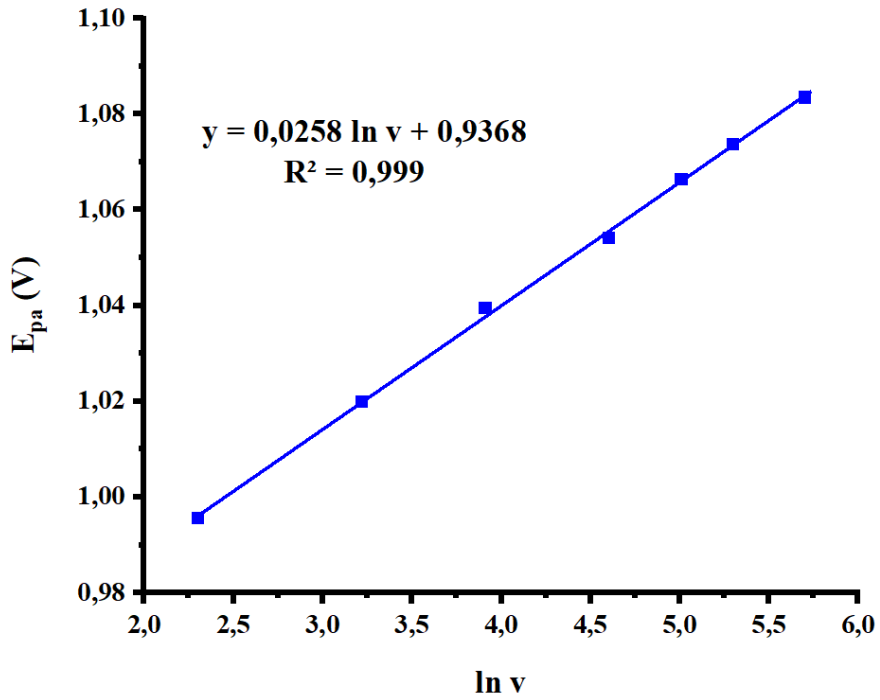


Şekil 3.10. pH 5,0, 0,05 M FT içerisinde 1,0 mM LNG $\log I_{pa}$ 'ya karşı $\log v$ grafiği (N=4)

$$\log I_{pa} (\mu A) = 0,4336 \log v (mV/s) - 4,9207 (R^2 = 0,9995) \quad (3.8)$$

LNG'nin anodik pik potansiyeli (E_{pa}), v 'deki artışa doğru pozitif bir kayma göstererek, NE/GNP/CKE yüzeyinde LNG'nin tersinir olmayan yükseltgenme mekanizmasını ortaya koymuştur (Şekil 3.11'de gösterildiği gibi).

Laviron teorisinin E_{pa} 'ya karşı $\ln v$ grafiğinden elde edilen regresyon denklemine uygulanması, LNG'nin elektro-oksidasyonu boyunca 1,99 (~2) elektronun (n) transfer edildiği sonucunu ortaya çıkarmıştır (Laviron, 1974).



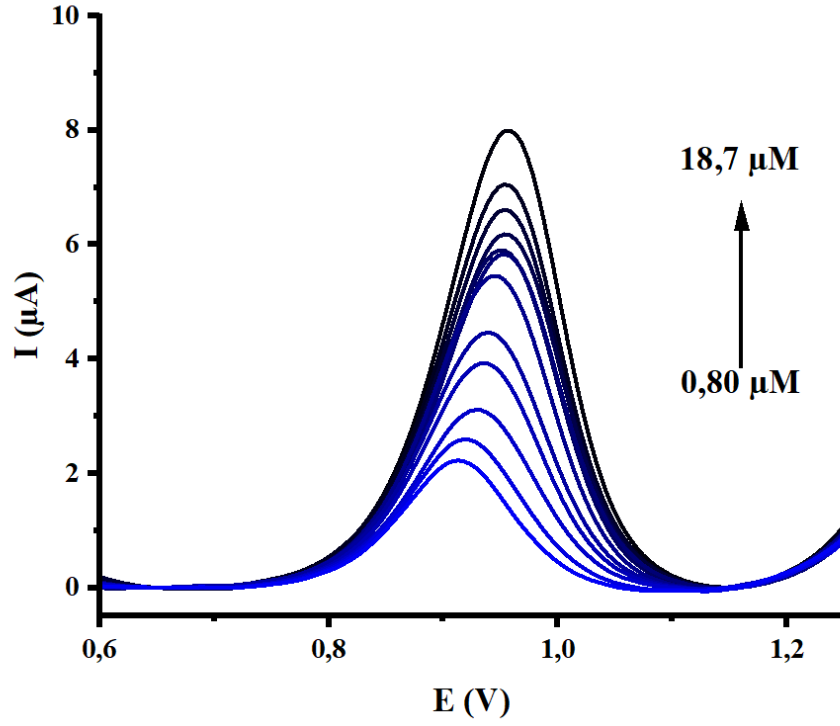
Şekil 3.11. pH 5,0, 0,05 M FT içerisinde 1,0 mM LNG E_{pa} 'ya karşı $\ln v$ grafiği (N=4)

3.3.3.3. DPV Yöntemi Analitik Uygulamaları

pH ve tarama hızının optimizasyonundan sonra, NE/GNP/CKE'de artan LNG konsantrasyonları (C_{LNG}) ile pH 5,0 0,05 M FT çözeltisinde DPV ile LNG için doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir (ilgili voltamogramlar Şekil 3.12'de gösterilmiştir). Optimize edilmiş DPV parametreleri altı kez tekrarlanarak ve ortalama değer alınarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Optimize edilmiş DPV parametreleri (N=6)

Parametreler	Optimize edilmiş değerler
Puls genişliği	0,05 V
Puls süresi	0,01 sn
Aralık süresi	0,1 sn
Basamak potansiyeli	0,005 V
Tarama hızı	0,05 V/sn



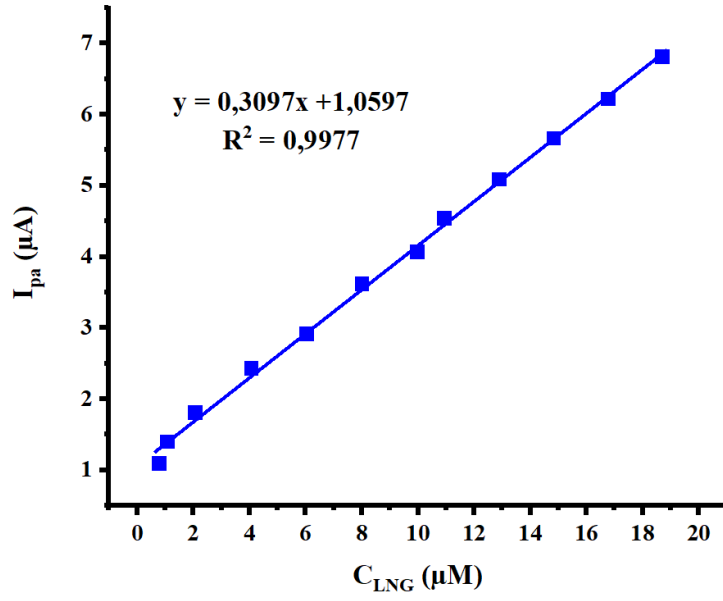
Şekil 3.12. pH 5,0, 0,05 M FT içerisinde NE/GNP/CKE yüzeyinde LNG'nin artan konsantrasyonlarla (0,8 μM ila 18,7 μM arasında değişen) DPV voltamogramları

Şekil 3.13'te gösterildiği gibi, 0,8 μM – 18,7 μM konsantrasyon aralığında I_{pa} 'ya karşı C_{LNG} 'nin doğrusal kalibrasyon eğrisi, regresyon denklemi 3.9'u göstermiştir.

$$I_{pa} (\mu\text{A}) = 0,3097 C_{LNG} (\mu\text{M}) + 1,0597 \quad (R^2 = 0,9977) \quad (3.9)$$

Gözlenebilirlik sınırı (GS) ve tayin sınırı (TS), 3.10 ve 3.11 denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır (Ateş vd., 2021).

$$GS = 3 \times \frac{\sigma}{m} \quad (3.10) \quad TS = 10 \times \frac{\sigma}{m} \quad (3.11)$$



Şekil 3.13. LNG'nin I_{pa} 'sının LNG konsantrasyonlarına (C_{LNG}) karşı grafiği

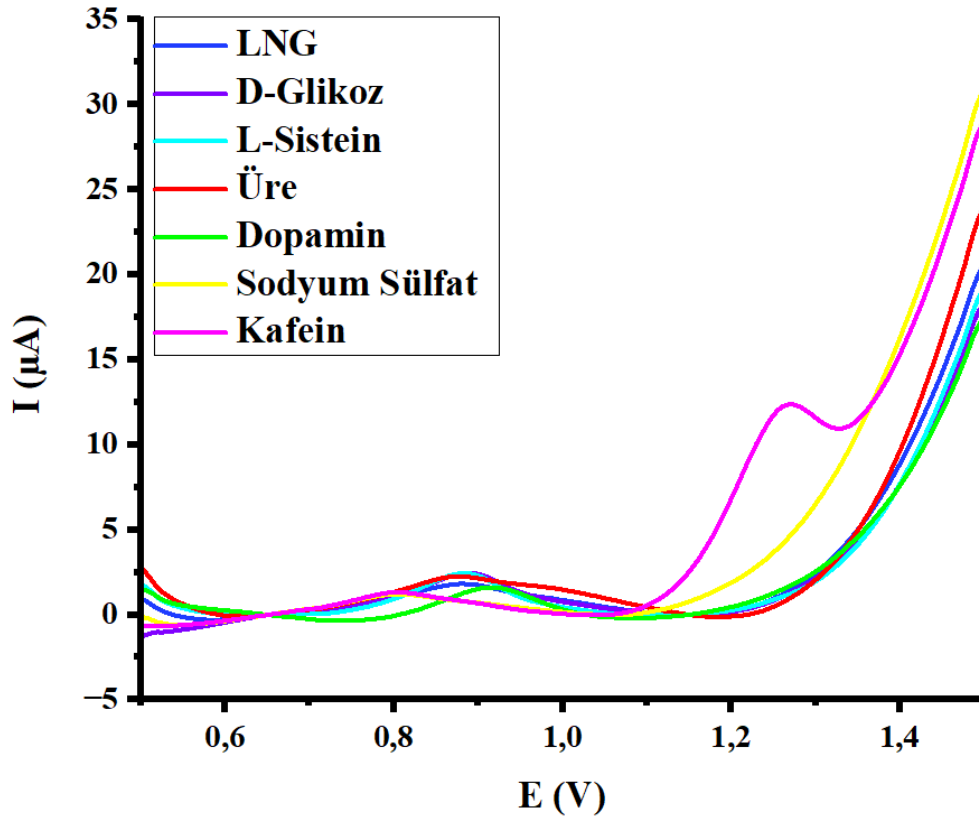
3.10 ve 3.11 denklemlerinde m = kalibrasyon eğrisinin eğimi, σ = en düşük C_{LNG} 'ye ait I_{pa} 'nın standart sapması. Çizelge 3.3'te belirtildiği gibi, doğrusal çalışma aralığında ($N=10$) GS 0,20 μM , TS ise 0,66 μM olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. LNG'nin NE/GNP/CKE ile elde edilen DPV analitik parametreleri

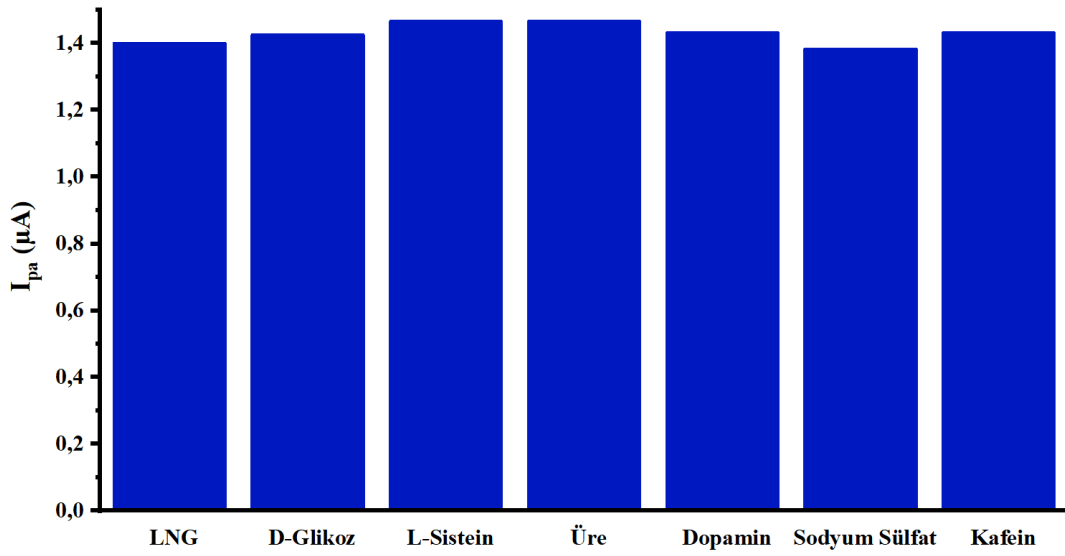
Parametre	Değer
Ölçülen potansiyel, V	0,936
Doğrusal çalışma aralığı, μM	0,80 – 18,7
Eğim, $\mu A/\mu M$	0,3097
Kesişim, μA	1,0597
Korelasyon katsayısı	0,9977
GS, μM	0,20
TS, μM	0,66

3.3.3.4. Seçicilik Çalışmaları

LNG tespitine yönelik NE/GNP/CKE sensör seçiciliği, pH 5,0 0,05 M FT çözeltisinde 1,0 μ M LNG'nin D-glikoz, L-sistein, üre, dopamin, Na₂SO₄ ve kafein gibi 100 kat fazla konsantrasyonda girişim yapan maddelerin varlığında analiz edilmesi yoluyla araştırılmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 3.14'te, her bir girişim için I_{pa} ölçümleri ise Şekil 3.15'te gösterilmiştir. Çizelge 3.4'te belirtildiği gibi maksimum pik akımı değişimi %4,71 olarak hesaplanmış ve elektrotun performansı üzerindeki etkinin ihmal edilebilir düzeyde olduğuna karar verilmiştir. Bu nedenle üretilen elektrodun LNG'nin tespiti için yeterli seçiciliğe sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 3.14. 100 μ M girişim yapan maddelerin varlığında NE/GNP/CKE ile 1,0 μ M LNG'nin DPV voltamogramları



Şekil 3.15. 100 μM girişim yapan maddelerin varlığında NE/GNP/CKE ile 1,0 μM LNG'nin I_{pa} değerlerini gösteren sütun grafiği

Çizelge 3.4. Girişim yapan maddelerin NE/GNP/CKE ile LNG voltametrik sinyal üzerine etkisi (N=3)

Girişim Maddesi	Cgirişim (μM)	I_{pa} (μA)	BSS (%)
D-Glikoz	100	1,4248	1,80
L-Sistein	100	1,4656	4,71
Üre	100	1,4650	4,67
Dopamin	100	1,3533	3,31
Sodyum sülfat	100	1,3824	1,23
Kafein	100	1,4310	2,25

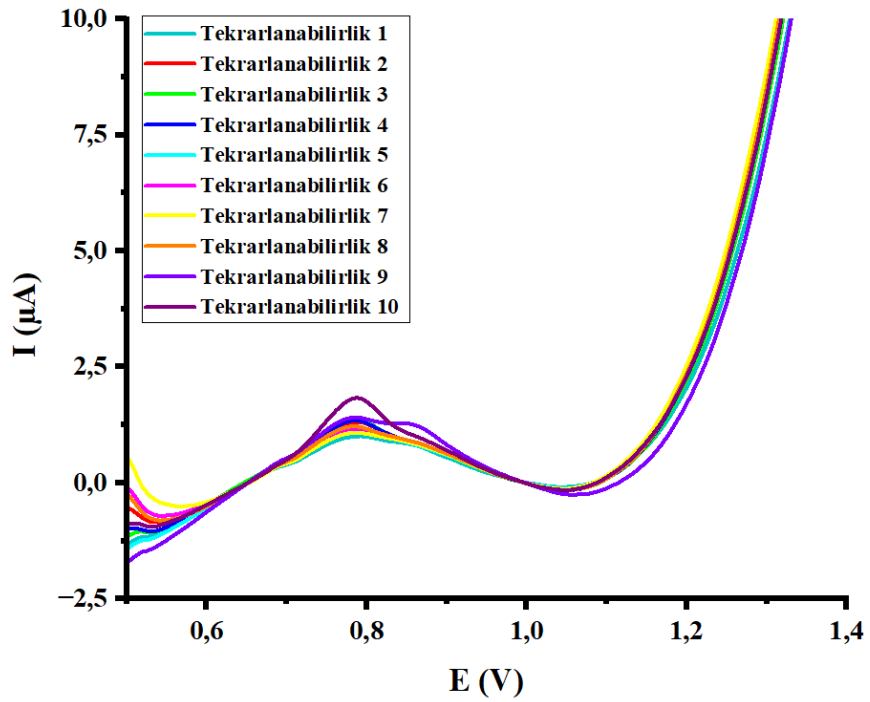
LNG I_{pa} 'sı 1,3996 μA 'dır.

%BSS'nin (bağıl standart sapma) formülasyonu aşağıdaki gibi verilmiştir.

$$\%BSS = \frac{\text{standart sapma } (\sigma)}{\text{ortalama}} \times 100 \quad (3.12)$$

3.3.3.5. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

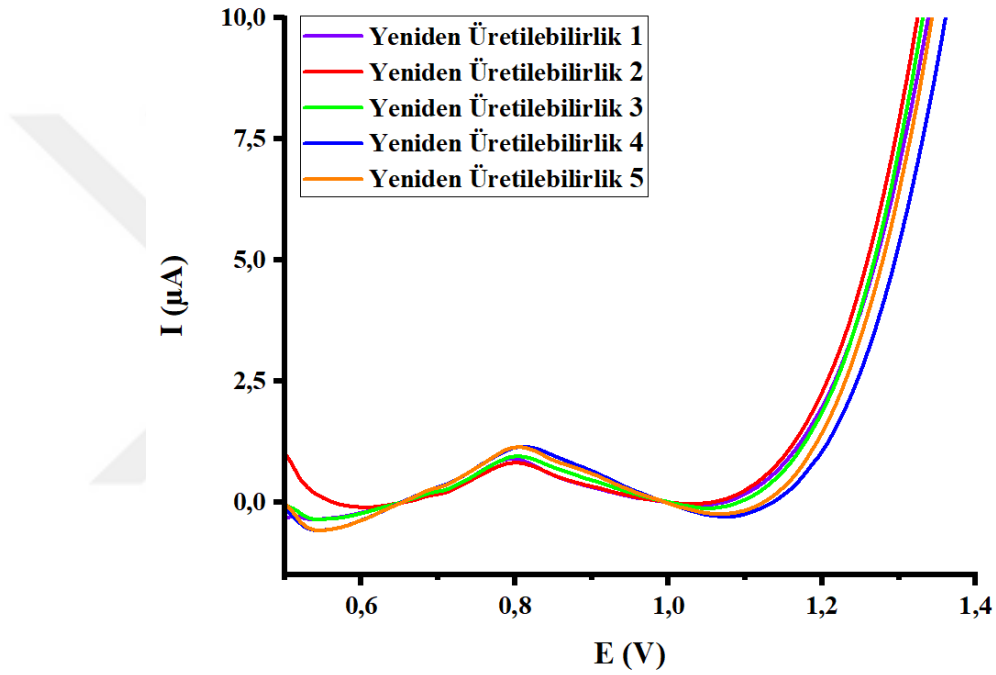
NE/GNP/CKE'nin tekrarlanabilirliği, pH 5,0 0,05 M FT varlığında 1,0 μ M LNG'nin DPV'leri ile aynı elektrotta on kez kayıt yapılarak değerlendirilmiştir, ki bu da ölçümler arasında elektrot üzerinde hiçbir işlem yapılmadığı anlamına gelir ve %0,36 BSS hesaplanmıştır (ilgili voltamogramlar Şekil 3.16'da gösterilmiştir).



Şekil 3.16. Tekrarlanabilirlik çalışmaları için pH 5,0 0,05 M FT içerisinde 1,0 μ M LNG'nin DPV voltamogramları

3.3.3.6. Yeniden Üretilirlik Çalışmaları

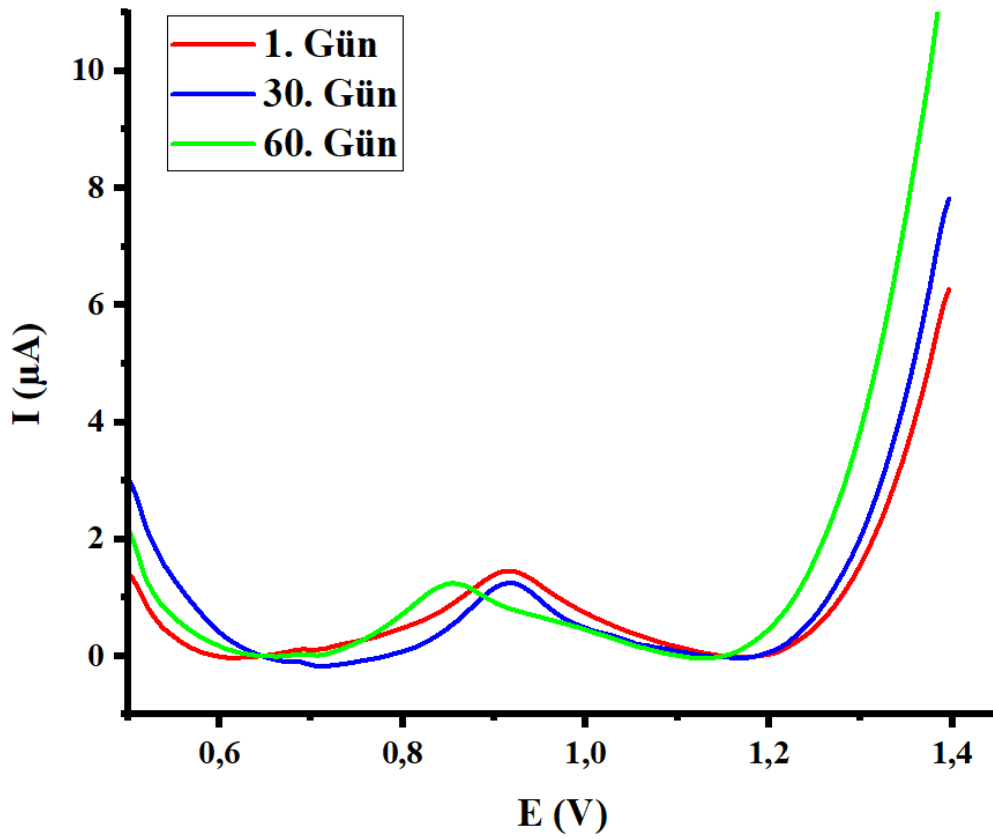
NE/GNP/CKE yeniden üretilirliğinin değeriendirilmesi için pH 5,0 0,05 M FT varlığında 1,0 μM LNG'nin DPV'leri beş farklı elektrot kaydıyla (her elektrot için N=3) uygulanmış ve %4,43 BSS hesaplanmıştır (ilgili voltamogramlar Şekil 3.17'de gösterilmiştir).



Şekil 3.17. Yeniden üretilirlik çalışmaları için pH 5,0 0,05 M FT içerisinde 1,0 μM LNG'nin DPV voltamogramları

3.3.3.7. Stabilitre Çalışmaları

NE/GNP/CKE ve LNG 1,0 μM LNG'nin pH 5,0 0,05 M FT varlığında stabilitesi DPV ile 60 gün boyunca araştırılmış (her gün için N=3) ve %3,25 BSS hesaplanmıştır (ilgili voltamogram Şekil 3.18'de görölmektedir).



Şekil 3.18. 60 günlük stabilite testleri kapsamında pH 5,0 0,05 M FT içerisinde 1,0 µM LNG'nin DPV voltamogramları

3.4. İdrar Numunesinde LNG Tayini

NE/GNP/CKE'nin karmaşık dokuya sahip idrar numunesindeki LNG analizine yönelik çalışması, 1,0 µM ila 12,8µM LNG konsantrasyon aralığında DPV'de standart ekleme yöntemiyle değerlendirilmiştir. 1,5, 3,0 ve 8,0 µM konsantrasyonlarındaki LNG'nin geri kazanım değerleri Çizelge 3.5'te gösterilmiştir. Geri Kazanım %100,1, standart sapma (σ) 1,22 olarak hesaplanmıştır. Sensörün idrar numuneleri üzerinde uygulanabilirliğini gösteren tatmin edici sonuçlar, eşzamanlı hedef değerlendirmesi için klinik paradigmalarda uygun bir model olabileceğini göstermiştir.

Çizelge 3.5. NE/GNP/CKE sensörü ile idrar numunesinde LNG tayini (N=2)

Eklenen (μM)	Elde Edilen (μM)	% Geri Kazanım	σ
1,50	1,46	97,15	0,34
3,00	2,96	98,77	2,52
8,00	8,34	104,31	0,80

σ : standart sapma

3.5. Farmasötik Dozaj Formunda LNG Tayini

Trajenta®'da LNG analizi için NE/GNP/CKE'nin verimliliği (tablet başına 5 mg LNG, AA8364A), 1,0 μM ila 12,8 μM LNG konsantrasyon aralığında DPV'de standart ekleme yöntemiyle değerlendirilmiştir. 2,0, 5,0 ve 8,0 μM konsantrasyonlarındaki LNG'nin geri kazanım değerleri Çizelge 3.6'da gösterilmiştir. Geri Kazanım %101,2, standart sapma (σ) 2,66 olarak hesaplanmıştır. 1,00 μM konsantrasyonlarda saf LNG ve Trajenta® formunun pik akımlarının karşılaştırılması (Çizelge 3.7'de gösterilmiştir), %1,01 BSS ile sensörün farmasötik numuneler üzerinde uygulanabilirliğini temsil etmiştir.

Çizelge 3.6. Trajenta®'da LNG Tayini (tablet başına 5 mg LNG) (N=3)

Eklenen (μM)	Elde Edilen (μM)	% Geri Kazanım	σ
2,00	2,00	100,20	2,07
5,00	4,97	99,40	2,19
8,00	8,31	103,88	3,71

σ : standart sapma

Çizelge 3.7. Saf LNG ve Trajenta® Formunun Karşılaştırması

	C (µM)	I_{pa}, ortalama (µA)	BSS (%) (N=3)
Saf LNG	1,00	1,4526	
Trajenta®	1,00	1,4378	1,01



4. TARTIŞMA

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında, "Trajenta® 5 mg tablet" olarak bilinen farmasötik formülasyonda, T2DM tedavisinde kullanılan oral anti-hiperglisemik etken madde olarak LNG'nin miktar tayinine yönelik voltametrik tekniklerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmalara başlamadan önce, karbon bazlı nanokompozitlerin sensör üretiminde kullanılması ile aktif madde analizleri için düşük maliyetli ve çevre dostu yeni hassas yöntemler geliştirilebileceği öngörülmüştür.

Boehringer Ingelheim tarafından sağlanan LNG aktif maddesi, standart çözelti hazırlamak amacıyla ultra saf su içerisinde çözülmüştür. Çalışmanın başlangıcında, farklı karbon bazlı nanokompozitler, *Britton-Robinson* (BR), asetat ve fosfat tamponları ile hem DPV hem de DV yöntemleri aracılığıyla 1,0 mM LNG analizi için CKE ile karşılaştırılmıştır. Yüksek pH deneylerinde karşılaşılan alkali hatası, BR ve asetat tamponundaki bileşenlerin tehlike düzeyi dikkate alınarak analizde fosfat tamponunun (FT) kullanılmasına karar verilmiştir. Tüm DPV ve DV çalışmalarında sabit bir voltamogram elde etmek için elektrotlar uygun potansiyel aralıklarında 5 kez taranıp koşullandırma yapılarak voltametri değerlendirmelerine hazır hale getirilmiştir. NE ve GNP, sensör nanokompozitleri olarak seçilmiş ve modifikasyon malzemelerinin LNG'nin pik akımı üzerindeki etkinliğinin miktarını ortaya çıkarmak amacıyla karşılaştırılmıştır. DV ile yapılan elektrokimyasal davranış ve yüzey kaplama etkisi çalışmaları (0,0-1,6 V potansiyel aralığında pH 7,0 0,05 M PBS tamponunda 1,0 mM LNG için) sonunda, bu tez çalışmasının elektro sensörü olarak NE/GNP/CKE'nin üretimi için CKE yüzeyinde 6 µl 0,5 mg/ mL NE ve 1,0 mg/mL GNP dispersiyonlarının kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Çizelge 3.1).

Üretilen sensör NE/GNP/CKE'nin elektroaktif yüzey alanı *Randles-Sevcik* denklemi ile 0,04 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisinde 14,8 mm² olarak hesaplanmıştır. CKE, NE ve GNP elektroaktif yüzey alanları sırasıyla 6,64; 6,93 ve 13,5 mm² olarak hesaplanmıştır. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi NE/GNP/CKE'nin elektroaktif yüzey alanının CKE'den 2,2 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Grafen-elmas nanomalzemelerinin, sp³ ve sp² hibridizasyon karbon ağlarının bir

arada bulunmasından kaynaklanan NE/GNP'nin benzersiz elektronik özelliği ile sınırsız uygulama ve kullanılabilirliği belgelediği bilinmesine rağmen (Vejpravová, 2021), yalnızca NE ve GNP içeren bir elektrot sistemine literatürde henüz rastlanmamıştır.

Voltametrik yöntem parametreleri, DV çalışmalarında 0,05 M FT içindeki 1,0 mM LNG için optimize edilmiştir. LNG'nin elektroanalitik tepkisi DV yönteminde NE/GNP/CKE ile pH 2,0-8,0 aralığında incelenmiş ve en yüksek pik akımı pH 5,0'da elde edilmiştir (Şekil 3.5). Elde edilen *Pourbaix* Diyagramı (Şekil 3.6), LNG için önerilen yükseltgenme mekanizması sırasında alifatik halkaya bağlı nitrojenden iki elektronun bir hidrojene transferini göstermiştir (Şekil 3.7). NE/GNP/CKE yüzeyindeki difüzyon kontrollü tersinir olmayan yükseltgenme mekanizması, 10-300 mV/s tarama hızı aralığında gerçekleştirilen DV yönteminde LNG'nin tarama hızı çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır (Şekil 3.8). E_{pa} ve $\ln v$ grafiğinin regresyon denklemi, 1,99 (~2) elektronun LNG'nin elektro-oksidasyonu sırasında aktarıldığı sonucunu ispatlamıştır.

LNG'nin pH 5,0 0,05 M FT içerisindeki voltametrik yanıtı için optimum koşullar elde edildikten sonra LNG'nin doğrusal çalışma aralığı 0,8 μ M – 18,7 μ M olarak belirlenirken (Şekil 3.11), NE/GNP/CKE ile optimize edilen DPV parametreleri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Doğrusal çalışma aralığında (N=10) 0,20 μ M GS ve 0,66 μ M TS değerlerini ortaya koyan çalışmanın analitik performansı Çizelge 4.1'de yeni geliştirilen elektrokimyasal sensörlerle karşılaştırılmıştır. Basit ve ucuz olmasının yanı sıra, modifiye elektrot sisteminden önerilen yöntem LNG'ye karşı olumlu bir duyarlılık göstermiştir.

Çizelge 4.1. LNG tayini için önceden rapor edilen analitik yöntemlerin karşılaştırması

Yöntem	Malzeme	Doğrusal Çalışma Aralığı (µM)	GS (µM)	Referans
DPV	CKE/E-rGO/Poli (B-CD)/manyetik ZIF-67	0,03- 200	0,01	(Baezzat ve Shojaei, 2021)
DPV	L-cyc@MoS ₂	1,0 – 153,4	0,19	(Ateş vd., 2021)
DPV	KGE	25- 200	6,7	(Topkaya vd., 2021)
KDV	CKE	0,4 – 4,8	0,11	(Gahlan vd., 2021)
KDV	KGE	0,5 – 11,0	0,21	(Naggar vd., 2020)
KDV	Co ₃ O ₄ NPs/MWC NTs	39,8 – 1530,0	11,3	(Rizk vd., 2020)
Spektrofotometri	-	5,3 – 63,5	1,33	(Amin, 2019)
TF- YPSK	-	0,36 – 3,6	0,12	(Salapaka vd., 2019)
DPV	NE/GNP/CKE	0,8 -18,7	0,20	Tez çalışması

KDV: Kare dalga voltametri, KGE: Kalem grafit elektrot, MWCNTs: Çok duvarlı karbon nanotüpler, TF-YPSK: Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi

NE/GNP/CKE'nin LNG'ye uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla seçicilik, tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik ve stabilite çalışmaları tamamlanmıştır. LNG'ye kıyasla 100 kat daha fazla D-glukoz, L-sistein, üre, dopamin, Na₂SO₄ ve kafein konsantrasyonlarında LNG'ye yönelik sensör seçiciliği tespit edilmiştir. %4,71 olarak hesaplanan I_{pa}'daki değişiklik, NE/GNP/CKE'nin, girişim yapan maddelerin varlığında LNG'yi seçici olarak ölçebildiğini göstermiştir. Aynı elektrotta 10 kez kayıt alınarak sensörün LNG'ye yönelik tekrarlanabilirliği tespit edilmiş ve BSS %0,36 olarak hesaplanmıştır. Sensörün LNG'ye yönelik yeniden üretilebilirliği beş farklı elektrotun kaydıyla tespit edilmiş (her elektrot için N=3) ve BSS %4,43 olarak hesaplanmıştır. 60 günlük ölçümlerle LNG'ye karşı sensör stabilitesi tespit edilmiş (her gün için N=3) ve BSS %3,25 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, LNG'nin elektrokimyasal tespiti için NE/GNP/CKE'nin seçiciliğini, tekrarlanabilirliğini, yeniden üretilebilirliğini ve stabilitesini göstermiştir. Geri kazanım

alışmaları kapsamında LNG, idrar numunesi içerisinde NE/GNP/CKE ile analiz edilmiş ve geri kazanım yüzdesi $100,1 \pm 1,22$ olarak hesaplanırken, farmasötik dozaj formundaki LNG'nin sensör ile analizinde ise $101,2 \pm 2,66$ olarak hesaplanmıştır. Saf LNG ve Trajenta[®] pik akımlarının karşılaştırılmasında %1,01 BSS'nin yanında $101,2 \pm 2,66$ % geri kazanım hesaplanmıştır. Sonuç olarak sensörün hem farmasötik dozaj formunda hem de idrar numunelerinde uygulanabilirliği, geliştirilen yöntemin klinik çalışmalarda eř zamanlı hedef değerlendirmesi için pratik ve uygun maliyetli bir tasarımı olabileceğini ortaya koymuştur.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüksek lisans tezi kapsamında, 2011 yılında T2DM tedavisi için ruhsatlandırılan oral anti-hiperglisemik bir ilaç olan LNG'nin farmasötik ve idrar örneklerinde miktar tayini için elektrokimyasal bir yöntemin geliştirilmesinde kullanılacak bir elektro-sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu hedefler doğrultusunda, geliştirilen sensörün pratik ve düşük maliyetli olması amaçlanmıştır.

Linagliptinin (LNG) elektrokimyasal davranışını araştırmak için NE/GNP modifiye CKE üretilmiştir. Difüzyon kontrollü süreci ortaya koyan iki elektron ve bir proton, NE/GNP/CKE yüzeyinde LNG'nin yükseltgenme reaksiyonunu gün ışığına çıkarmıştır. CKE'nin farklı konsantrasyonlarda nanopartiküller içeren NE/GNP ile modifikasyonu, LNG'nin voltametrik tepkisini CKE'ye kıyasla 4,66 katına çıkarmanın yanı sıra sensör hassasiyetinde kayda değer bir artış yaratmıştır. Üretilen sensör, 0,8 μM -18,7 μM konsantrasyon aralığında 0,20 μM gözlenebilirlik sınırına ulaşarak gerçek numune ve idrarda uygun analitik performansın yanı sıra girişim yapan maddelerle iyi bir seçicilik gibi avantajlar sunmuştur.

Sonuç olarak, yeni nesil antidiyabetik ilaç etken maddesi olan LNG'nin Trajenta® ve idrarda tayini için üretilen NE/GNP/CKE, yüksek lisans tezi kapsamında dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) inhibitörlerinin (Kasina & Baradhi, 2022) rutin kalite değerlendirmelerinde ve klinik izlemelerinde kullanılabilecek bir elektro sensör olarak öngörülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abu-hassan, A. A., El Hamd, M. A., El-Maghrabey, M. H., Mahdi, W. A., Alshehri, S., & Shaaban Mohammed, B. (2023). Application of isoindole fluorophore formation for determination of linagliptin in the sole and co-formulated tablets: Application for plasma assay and content uniformity testing. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 291, 122390. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.122390>
- Adams, R. N. (1969). Electrochemistry at Solid Electrodes. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 73(10), 1098-1098. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19690731029>
- Alam, I., Nadir Ali, S., Qayoom, A., Bibi, R., Aqeel, M., & Muhammad, H. (2023). Green liquid chromatographic method for simultaneous determination of metformin, linagliptin and rivaroxaban: Tablet manufacturing and application to in-vitro dissolution studies. *Microchemical Journal*, 193. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109025>
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2009). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 32(Supplement_1), S62-S67. <https://doi.org/10.2337/dc09-S062>
- Amin, S. (2019). PENERAPAN CERITA ISLAMI DALAM MENINGKATKAN PENALARAN MORAL PADA ANAK. *Psikodidaktika: Jurnal Ilmu Pendidikan, Psikologi, Bimbingan dan Konseling*, 4(2), 10. <https://doi.org/10.32663/psikodidaktika.v4i2.964>
- Andersen, E. S., Deacon, C. F., & Holst, J. J. (2018). Do we know the true mechanism of action of the DPP-4 inhibitors? İçinde *Diabetes, Obesity and Metabolism* (C. 20, Sayı 1, ss. 34-41). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/dom.13018>
- Ateş, A. K., Çelikkan, H., & Erk, N. (2021). Voltammetric determination of linagliptin in bulk and plasma sample using an electrochemical sensor based on L-cysteine modified 1T-MoS₂ nanosheets. *Microchemical Journal*, 167(106308). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106308>
- Baezzat, M. R., & Shojaei, F. (2021). Electrochemical sensor based on GCE modified with E-rGO/Poly (B-CD)/magnetic ZIF-67 nanocomposite for the measurement of Linagliptin. *Diamond and Related Materials*, 114(108345). <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2021.108345>
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2. bs). John Wiley & Sons:pp: 157-513.
- Deacon, C. F. (2011). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: A comparative review. İçinde *Diabetes, Obesity and Metabolism* (C. 13, Sayı 1, ss. 7-18). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01306.x>
- DeFronzo, R. A. (2009). From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58(4), 773-795. <https://doi.org/10.2337/db09-9028>
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- DeFronzo, R. A., Tripathy, D., Schwenke, D. C., Banerji, M., Bray, G. A., Buchanan, T. A., Clement, S. C., Henry, R. R., Hodis, H. N., Kitabchi, A. E., Mack, W. J., Mudaliar, S., Ratner, R. E., Williams, K., Stentz, F. B., Musi, N., & Reaven, P. D. (2011). Pioglitazone for Diabetes Prevention in Impaired Glucose Tolerance. *New England Journal of Medicine*, 364(12), 1104-1115. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1010949>

- DrugBank Online. (2023, Şubat 16). Linagliptin. <https://go.drugbank.com/drugs/DB08882>.
- Edwards, G. A., Bergren, A. J., & Porter, M. D. (2007). Chemically Modified Electrodes. İçinde *Handbook of Electrochemistry* (ss. 295-327). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044451958-0.50021-5>
- FDA. (2011). *Highlights Of Prescribing Information*. Tradjenta (Linagliptin) Tablets-accessdata.fda.gov. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/201280lbl.pdf
- Gahlan, A. A., Haredy, A. M., Derayea, S. M., Omar, M. A., & Saleh, G. A. (2021). A Glassy Carbon Electrode for the Determination of Linagliptin, an Antidiabetic Drug in Pure Form, Tablets and Some Biological Fluids by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Current Pharmaceutical Design*, 27(20), 2415-2424. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200925123245>
- Gerstein, H. C., Santaguida, P., Raina, P., Morrison, K. M., Balion, C., Hunt, D., Yazdi, H., & Booker, L. (2007). Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: A systematic overview and meta-analysis of prospective studies. İçinde *Diabetes Research and Clinical Practice* (C. 78, Sayı 3, ss. 305-312). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.05.004>
- Graefe-Mody, U., Retlich, S., & Friedrich, C. (2012). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Linagliptin. *Clinical Pharmacokinetics*, 51(7), 411-427. <https://doi.org/10.2165/11630900-000000000-00000>
- Gurralla, S., Raj, S., Subrahmanyam, C. V. S., & Anumolu, P. D. (2022). Quality-by-Design Approach for Chromatographic Analysis of Metformin, Empagliflozin and Linagliptin. *Journal of Chromatographic Science*, 60(1), 68-80. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab030>
- Haredy, A. M., Derayea, S. M., Gahlan, A. A., Omar, M. A., & Saleh, G. A. (2022). Graphene oxide modified glassy carbon electrode for determination of linagliptin in dosage form, biological fluids, and rats' feces using square wave voltammetry. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3), 103663. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103663>
- Harvey, D. (2019, Haziran 5). 11.4: Voltammetric Methods. <https://chem.libretexts.org/>.
- Inzelt, G., Lewenstam, A., & Scholz, F. (2013). *Handbook of Reference Electrodes* (G. Inzelt, A. Lewenstam, & F. Scholz, Ed.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36188-3>
- Kasina, S. V. S. K., & Baradhi, K. M. (2022). *Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) Inhibitors Continuing Education Activity*. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. StatPearls Publishing LLC.
- Laviron, E. (1974). Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 52(3), 355-393. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(74\)80448-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(74)80448-1)
- Liu, J., Xu, Y., Liu, S., Yu, S., Yu, Z., & Low, S. S. (2022). Application and Progress of Chemometrics in Voltammetric Biosensing. *Biosensors*, 12(7), 494. <https://doi.org/10.3390/bios12070494>
- Murray, R. W., Goodenough, J. B., & Alberly, W. J. (1981). Modified Electrodes: Chemically Modified Electrodes for Electrocatalysis [and Discussion]. İçinde *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* (C. 302, Sayı 1468). <https://about.jstor.org/terms>

- Naggar, A. H., Saleh, G. A., Omar, M. A., Haredy, A. M., & Derayea, S. M. (2020). Square-wave Adsorptive Anodic Stripping Voltammetric Determination of Antidiabetic Drug Linagliptin in Pharmaceutical Formulations and Biological Fluids Using a Pencil Graphite Electrode. *Analytical Sciences*, 36(9), 1031-1038. <https://doi.org/10.2116/analsci.19P469>
- Nathan, D. M., Davidson, M. B., DeFronzo, R. A., Heine, R. J., Henry, R. R., Pratley, R., & Zinman, B. (2007). Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care*, 30(3), 753-759. <https://doi.org/10.2337/dc07-9920>
- National Center for Biotechnology Information. (t.y.). *PubChem Compound Summary for CID 10096344, Linagliptin*. Access Address: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linagliptin>. Access Date: 15/02/2023.
- Navratil, T., & Barek, J. (2009). Analytical applications of composite solid electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39(3), 131-147. <https://doi.org/10.1080/10408340903011796>
- Rizk, M., Attia, A. K., Mohamed, H. Y., & Elshahed, M. S. (2020). Validated Voltammetric Method for the Simultaneous Determination of Anti-diabetic Drugs, Linagliptin and Empagliflozin in Bulk, Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Fluids. *Electroanalysis*, 32(8), 1737-1753. <https://doi.org/10.1002/elan.202000007>
- Roglic, G., & World Health Organization. (2016). *Global report on diabetes*. p:6.
- Sahloul, L., & Salami, M. (2023). Development and validation of a new analytical method for determination of linagliptin in bulk by visible spectrophotometer. *Scientific Reports*, 13(4008 (2023)).
- Salapaka, A., Bonige, K. B., Korupolu, R. B., T, C. R., K, C. R., N, S., Sharma, H. K., & Ray, U. K. (2019). A new stability indicating reverse phase high performance liquid chromatography method for the determination of enantiomeric purity of a DPP-4 inhibitor drug linagliptin. *ELECTROPHORESIS*, 40(7), 1066-1073. <https://doi.org/10.1002/elps.201800502>
- Scott, L. J. (2011). Linagliptin. *Drugs*, 71(5), 611-624. <https://doi.org/10.2165/11207400-000000000-00000>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (S. Kiselica, Ed.; 6. bs). David Harris. pp: 628-753.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry, Ninth Edition* (PreMediaGlobal, C. Simpson, & S. Kiselica, Ed.; 9. bs). Mary Finch. pp: 615-647.
- Thallapalli, A. K. G., & Manda, R. M. (2023). Development and validation of Empagliflozin and Linagliptin simultaneous estimation in rat plasma using freezing lipid precipitation and SCX-SPE assisted HPLC-MS/MS method and its application in pharmacokinetic studies. *Analytical Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s44211-023-00444-z>
- TİTCK. (2021). *KULLANMA TALİMATI TRAJENTA® 5 mg Film Kaplı Tablet*. https://titck.gov.tr/storage/Archive/2021/kubKtAttachments/2_f7cf6ba2-6ad9-42df-9cd1-0cbe0cfb623a.pdf.
- Topkaya, S. N., Kaya, H. O., & Cetin, A. E. (2021). Electrochemical Detection of Linagliptin and its Interaction with DNA. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(5), 645-651. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.71354>
- Vejpravová, J. (2021). *Graphene-diamond nanomaterials: a status quo review. 1*. <https://doi.org/10.20944/preprints202107.0647.v1>

- Verink, E. D. JR. (2000). *Uhlig's corrosion handbook* (R. W. Revie, Ed.; 2. bs). John Wiley & Sons, Inc.p: 113.
https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4928695/mod_resource/content/1/Diagrama%20de%20Poubaix.pdf
- Wang, J. (2006). Study of Electrode Reactions and Interfacial Properties. İçinde *Analytical Electrochemistry* (3. bs, ss. 29-66). John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/0471790303.ch2>
- Wenzel, T. (2020, Haziran 9). 7.5: *Voltammetric Methods*. <https://chem.libretexts.org>.
- WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. (2023, Ocak 23). *WHOcc - ATC/DDD Index*. Norwegian Institute of Public Health.
https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=A10BH05
- Yadav, A. S., Dornala, D., Swain, D., Prabha, A., & Samanthula, G. (2020). Application of online liquid chromatography/quadrupole time-of-flight electrospray ionization tandem mass spectrometry for structural characterization of linagliptin degradation products and related impurities. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34(21).
<https://doi.org/10.1002/rcm.8874>
- Zinman, B., Harris, S. B., Neuman, J., Gerstein, H. C., Retnakaran, R. R., Raboud, J., Qi, Y., & Hanley, A. J. (2010). Low-dose combination therapy with rosiglitazone and metformin to prevent type 2 diabetes mellitus (CANOE trial): a double-blind randomised controlled study. *The Lancet*, 376(9735), 103-111. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60746-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60746-5)