TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞİZOFRENİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI ANTİPSİKOTİK İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN ELEKTROANALİTİK TAYİNİ İÇİN SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE DNA İLE ETKİLEŞİMLERİ

Ümmüye Nur TÜZÜN

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zehra YAZAN

ANKARA
2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞİZOFRENİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI ANTİPSİKOTİK İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN ELEKTROANALİTİK TAYİNİ İÇİN SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE DNA İLE ETKİLEŞİMLERİ

Ümmüye Nur TÜZÜN

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Zehra YAZAN

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 2501 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Şizofreni Tedavisinde Kullanılan Bazı Antipsikotik İlaç Etken Maddelerinin Elektroanalitik Tayini İçin Sensör Geliştirilmesi ve DNA ile Etkileşimleri" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Doç. Dr. Ümmüye Nur Tüzün

Tarih: 25.12.2023

İmza: [redacted]

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Adli Kimya-Adli Toksikoloji Anabilim Dalında
Doç. Dr. Ümmüye Nur Tüzün tarafından hazırlanan
"Şizofreni Tedavisinde Kullanılan Bazı Antipsikotik İlaç Etken Maddelerinin Elektroanalitik Tayini İçin Sensör Geliştirilmesi ve DNA ile Etkileşimleri" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07.06.2024

İmza
Prof. Dr. Erdal Dinç
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Zehra Yazan
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof. Dr. Mehmet Sayim Karacan
Gazi Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Halit Arslan
Gazi Üniversitesi
Üye

İmza
Doç. Dr. Mehmet Gümüştaş
Ankara 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

Şizofreni Tedavisinde Kullanılan Bazı Antipsikotik İlaç Etken Maddelerinin Elektroanalitik Tayini İçin Sensör Geliştirilmesi ve DNA ile Etkileşimleri

Bu tez çalışmasında olanzapin (OLA), klozapin (CLZ) ve klorpromazin (CPZ) antipsikotik ilaç etken maddelerinin tayini için üç yeni elektrokimyasal arayüzey platformları geliştirilmiştir. OLA tayini için kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyi ön işlemden geçirilerek (pre-PGE); poly(L-Alanin) (poly(L-Ala)) ve Au nanoparçacıklarla (AuNPs) modifiye edilmiş ve CLZ maddesinde ise PGE yüzeyi poly(kafeik asit) (polyCA) ve Au nanoparçacıklarla modifiye edilmiştir. Son olarak; CPZ tayini için yine PGE yüzeyi farklı miktarlarda olan poly(L-Alanin) ve Au nanoparçacıklarla modifiye edilmiştir. Modifikasyon işleminde modifier olarak kullanılan L-alanin, kafeik asit, kloroaurik asit çözelti derişimleri, pH ve tarama hızı etkisi diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve dönüşümlü voltametri (CV) ile her bir modifiye elektrot için ayrı ayrı optimize edilmiştir. Optimum şartlarda hazırlanan her bir modifiye elektrodun yüzey morfolojisi alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ve EDX ile, elektrokimyasal karakterizasyonu ise, CV ve elektrokimyasal empedans spektroskopi (EIS) ile incelenmiştir. Daha sonra; antipiskotik ilaç etken maddelerinin elektrokimyasal yükseltgenme davranışı CV yöntemi ile incelenmiş ve OLA'nın yükseltgenmesi pH 4,5 değerinde +0,35V'de iken, CLZ +0,30V'de (pH 9,0) ve CPZ ise +0,60V'de (pH 5,0) gerçekleşmiştir. Daha sonra, maddelerin olası yükseltgenme mekanizmaları önerilmiştir. Elde edilen yükseltgenme piklerine dayanarak DPV yöntemi ile kantitatif tayinleri yapılmıştır. OLA için (0,271-1000;0) µM doğrusal çalışma aralığında, gözlenebilme sınırı (LOD) 0,081 µM olarak tespit edilmiştir. CLZ için (0,010-1000,0) µM doğrusal çalışma aralığında, LOD 0.003 µM iken; CPZ için (0,005-400,0) µM doğrusal çalışma aralığında, LOD 0,001650 µM olarak belirlenmiştir. Olası girişim etkisi (ketiapin (QTP), fluoksetin (Flx), askorbik asit (AA), ürik asit (UA), asetaminofen (APAP), sodyum (Na^+), potasyum (K^+), kalsiyum (Ca^{2+}), ve magnezyum (Mg^{2+})) maddeler varken çalışılmıştır. Geliştirilen yöntemler ticari ilaç örneği, sentetik insan serumu ve idrar numunelerine uygulanmıştır. Son olarak, bahsi geçen üç ilaç etken maddesinin dsDNA etkileşimleri çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: DNA etkileşimi, klorpromazin, klozapin, olanzapin, sensör geliştirme

SUMMARY

Sensor Modification for Electroanalysis of Some Antipsychotic Drug Efficient Matters and Determining Their DNA Interactions

Three different novel electrochemical sensors for sensitive determination of antipsychotic drug efficient matters olanzapine (OLA), clozapine (CPZ), and chlorpromazine (CPZ) were introduced in the current thesis study. The fabricated sensors were based on pre-treated pencil graphite electrode (pre-PGE) modified with poly(L-alanine) and gold nanoparticles (AuNPs) for OLA analysis, pencil graphite electrode (PGE) modified with poly(caffeic acid) and gold nanoparticles (AuNPs) for CLZ analysis, and pencil graphite electrode (PGE) modified with poly(L-alanine) and gold nanoparticles (AuNPs) for CPZ analysis. The effect of monomer L-alanine or monomer caffeic acid and chloroauric acid concentrations, pH, and scan rate were tested with differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV) for each of the modified electrodes. The electrodes' surface morphologies were characterized by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and energy dispersive X-ray spectrometry (EDX), and the electrodes' electrochemical characterizations were studied with cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Then, the antipsychotic drug efficient matters' electrochemical oxidation processes were studied with CV method. OLA gave an oxidation peak at +0,35V (pH 4,5). An oxidation peak was detected at +0,30V (pH 9,0) for CLZ. CPZ gave an oxidation peak at 0,60V (pH 5,0). Oxidation mechanisms were suggested for each of the antipsychotic drug efficient matters. Then quantitative analysis was applied for each of these drug efficient matters according to their oxidation peaks in DPV method. The linear response of OLA was in the ranges of (0,271-1000,0) μM with limit of detection (LOD) value of 0,081 μM. The linear response of CLZ was in the ranges of (0,010-1000,0) μM with the LOD value of 0,003 μM, and the linear response of CPZ was in the ranges of (0,005-400,0) μM with the LOD value of 0,0017 μM. The interference effect was investigated for quetiapine (QTP), fluoxetine (FLX), ascorbic acid (AA), uric acid (UA), acetaminophen (APAP), sodium (Na^+), potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}), and magnesium (Mg^{2+}) cations. The utility of sensors was worked for the determination of each of the matters in their pharmaceutical dosage forms, human serum, and human urine. Finally, the mentioned drug efficient matters-DNA interactions were studied also.

Keywords: Chlorpromazine, clozapine, DNA interaction, electrode modification, olanzapine.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Şizofreni	3
1.2. Voltametri	5
1.3. Dönüşümlü Voltametri	5
1.4. Diferansiyel Puls Voltametri	6
1.5. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi	7
1.6. Voltametrik Cihazlar	7
1.7. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ve Enerji Dağılımlı X Işınları Spektroskopisi (EDX)	9
1.8. Olanzapin	10
1.9. Olanzapin Tayini İçin Yapılan Voltametrik Çalışmalar	11
1.10. Klozapin	16
1.11. Klozapin Tayini İçin Yapılan Voltametrik Çalışmalar	17
1.12. Klorpromazin	22
1.13. Klorpromazin Tayini İçin Yapılan Voltametrik Çalışmalar	23
1.14. DNA-İlaç Etken Maddesi Etkileşimleri	27
1.15. DNA-İlaç Etken Maddesi Etkileşimleri İçin Yapılan Voltametrik Çalışmalar	31
1.16. PGE Elektrot Modifikasyonunda Kullanılan Nanoparçacıklar	32
1.16.1. AuNPs Özellikleri	32
1.16.2. L-Alaninin Özellikleri	33
1.16.3. Kafeik Asitin Özellikleri	34
1.17. Çalışmanın Amaçları	35
2. GEREÇ ve YÖNTEM	37
2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	37
2.2. Çalışma Elektrodu ve Cihazlar	39
2.3. AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE Elektrodun Modifikasyonu	39
2.4. AuNPs-poly(CA)-PGE Elektrodun Modifikasyonu	40
2.5. AuNPs-poly(L-Ala)-PGE Elektrodun Modifikasyonu	41
2.6. Ticari İlaç Örneklerinin Hazırlanması	42
2.7. Kan Serum ve İdrar Numunelerinin Hazırlanması	43
3. BULGULAR	44
3.1. OLA ile Yapılan Voltametrik Çalışmalar	44
3.1.1. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojileri	44
3.1.2. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu	45
3.1.3. Modifiye Elektrodun Bileşiminin Belirlenmesi	48
3.1.4. pH Etkisi	48
3.1.5. Tarama Hızı Etkisi ve Olası OLA Yükseltgenme Mekanizması	49

3.1.6. OLA'nın Elektrokimyasal Analizi 52
3.1.7. Girişim Etkisi 55
3.1.8. OLA Gerçek Numune Çalışmaları 55
3.1.9. OLA ile DNA Etkileşim Çalışması 56

3.2. CLZ ile Yapılan Voltametrik Çalışmalar 59
3.2.1. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojileri 59
3.2.2. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu 60
3.2.3. Modifiye Elektrodun Bileşiminin Belirlenmesi 62
3.2.4. pH Etkisi 63
3.2.5. Tarama Hızı Etkisi ve Olası CLZ Yükseltgenme Mekanizması 63
3.2.6. CLZ'nin Elektrokimyasal Analizi 66
3.2.7. Girişim Etkisi 67
3.2.8. CLZ Gerçek Numune Çalışmaları 68
3.2.9. CLZ ile DNA Etkileşim Çalışması 69

3.3. CPZ ile Yapılan Voltametrik Çalışmalar 71
3.3.1. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojileri 71
3.3.2. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu 72
3.3.3. Modifiye Elektrodun Bileşiminin Belirlenmesi 74
3.3.4. pH Etkisi 75
3.3.5. Tarama Hızı Etkisi ve Olası CPZ Yükseltgenme Mekanizması 76
3.3.6. CPZ'nin Elektrokimyasal Analizi 77
3.3.7. Girişim Etkisi 79
3.3.8. CPZ Gerçek Numune Çalışmaları 80
3.3.9. CLZ ile DNA Etkileşim Çalışması 81

4. TARTIŞMA 84

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 89

KAYNAKLAR 90
ÖZGEÇMİŞ 104

ÖNSÖZ

Bu doktora tez çalışmasında olanzapin (OLA), klozapin (CLZ) ve klorpromazin (CPZ) antipsikotik ilaç etken maddelerinin duyarlığı yüksek bir şekilde tayini için üç yeni elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Sensörler için modifikasyon, optimizasyon, validasyon çalışmaları yapıldıktan sonra sensörler ile ilaç etken maddeleri-DNA etkileşimleri de çalışılmıştır.

Doktora çalışmalarım boyunca engin bilgisi ve tecrübesi ile yoluma ışık olan, yoğun mesai saatleri içerisinde her zaman bana kıymetli vaktini ayıran, zorlandığım zamanlarda bile bıkmadan usanmadan bilimime bilim katan, bilimsel çalışma azmini, pedagojik öğretisini kendime felsefe edindiğim çok Kıymetli Sayın Hocam ve Tez Danışmanım Prof. Dr. Zehra Yazan Hocama sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Yine doktora çalışmalarım boyunca benimle akademik bilgilerini paylaşan, deneysel çalışmalarıma ışık tutan ve ekip ruhu ile kendimi yalnız hissetmememi sağlayan çok Kıymetli Hocalarım Sayın Doç. Dr. Dilek Eskiköy Bayraktepe ve Sayın Ceren Yıldız Hocalarıma sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Bütün doktora öğrenim hayatım boyunca bana her daim inanan, her daim yanımda duran başta Sayın Prof. Dr. Halit Sinan Süzen Hocam, Sayın Doç. Dr. Dilek Akyüzlü Hocam, Sayın Doç. Dr. Halide Nihal Açıkgöz Hocam olmak üzere Ankara Üniversitesi Disiplinlerarası Adli Bilimler Enstitüsü Müdürüme, Müdür Yardımcıma, Hocalarıma ve Destek Personelimize sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme süreçlerimde akademik önerileri ile tezimin kapsam geçerliğinin artmasını sağlayan, değerli vakitlerini ayıran çok Kıymetli Hocam Prof. Dr. Erdal Dinç Hocama ve çok Kıymetli Hocam Doç. Dr. Mehmet Gümüştaş Hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu süreçte hep yanımda olduklarını bildiğim yaşam enerjim anneme, babama, kardeşime, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doç. Dr. Ümmüye Nur Tüzün

SİMGELER ve KISALTMALAR

CV	Dönüşümlü Voltametri
DPV	Diferansiyel Puls Voltametri
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopi
PGE	Kalem Grafit Elektrot
AuNPs	Altın Nanoparçacıklar
poly	Polimer
L-Ala	L-Alanin
CA	Kafeik Asit
OLA	Olanzapin
CLZ	Klozapin
CPZ	Klorpromazin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
APAP	Asetaminofen
Flx	Fluoksetin
QTP	Ketiapin
AA	Askorbik asit
UA	Ürik asit
BR	Britton-Robinson Destek Elektrolit Çözeltisi
PBS	Fosfat Destek Elektrolit Çözeltisi
ABS	Asetat Destek Elektrolit Çözeltisi
Redoks prob	1×10^{-2} M ve eşit hacimde $K_3[Fe(CN)_6]$- $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi
K	DNA Bağlanma Sabiti
C	Derişim
D	Difüzyon Katsayısı
υ	Tarama Hızı
FE-SEM	Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu
EDX	Enerji Dağılımlı X Işınları Spektrometresi
i	Akım
V	Potansiyel
log	logaritma
Z	Elektrot aktif yüzey direnci
dsDNA	Sığır timüs DNA

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Dönüşümlü voltametride elektroda uygulanan gerilim ve elde edilen voltamogram. 6
Şekil 1.2. Diferansiyel puls voltametrisi tekniğinde potansiyel - zaman grafiği. 6
Şekil 1.3. Elektrokimyasal empedans spektrumu (Nyquist diyagramı). 7
Şekil 1.4. Potansiyostatik üç-elektrotlu doğrusal-taramalı voltametri için bir sistem. 8
Şekil 1.5. Üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücre. 8
Şekil 1.6. EDX analizi ile numunedeki element yüzdeleri ve pikleri. 9
Şekil 1.7. Olanzapinin kimyasal yapısı. 10
Şekil 1.8. Klozapinin kimyasal yapısı. 17
Şekil 1.9. Klorpromazinin kimyasal yapısı. 23
Şekil 1.10. DNA'nın çift sarmal yapısı. 28
Şekil 1.11. DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu. 29
Şekil 1.12. DNA-ilaç etken maddesi etkileşim yolları. 30
Şekil 1.13. Altın iyonlarının (Au^{3+}) altın atomuna (Au^{0}) indirgenmesiyle altın monometalik nanopartiküllerinin oluşumu. 32
Şekil 1.14. L-Alaninin yapısı. 33
Şekil 1.15. Kafeik asitin yapısı. 34
Şekil 2.1. pre-PGE elektrodun $HAuCl_4$ ve L-Ala ile pH 7,0 PBS destek elektrolit ortamında 10 döngülü CV ile eş zamanlı olarak kaplanması süreci. İç grafikler: a) Kronoamperometri ile +1,4 V potansiyel ve 60 s süreyle pH 4,5 BR destek elektrolitte PGE'nin ön muamele edilmesi. b) eş zamanlı olarak kaplanma sürecinden CV yönteminde bir döngülü voltamogram. 40
Şekil 2.2. PGE elektrodun $HAuCl_4$ ve CA ile pH 4,0 PBS destek elektrolit ortamında 10 döngülü CV ile eş zamanlı olarak kaplanması süreci. İç grafik: a) eş zamanlı olarak kaplanma sürecinden CV yönteminde bir döngülü voltamogram. 41
Şekil 2.3. PGE elektrodun $HAuCl_4$ ve L-Ala ile pH 7,0 PBS destek elektrolit ortamında 10 döngülü CV ile eş zamanlı olarak kaplanması süreci. İç grafik: a) eş zamanlı olarak kaplanma sürecinden CV yönteminde bir döngülü voltamogram. 42
Şekil 3.1. a) pre-PGE, b) poly(L-Ala)/pre-PGE, c) AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE FE-SEM görüntüleri d) AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE için EDX spektrumu. 44
Şekil 3.2. a) Nyquist eğrileri b) 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob için υ: 0,05 V/s tarama hızında CV voltamogramlar. 46
Şekil 3.3. 0,50 mM OLA'nın farklı modifiye elektrotlardaki DPV voltamogramları (pH 4,5 BR destek elektrolit ortamı, step potansiyel: 0,01 V, pulse potansiyel: 0,2 V, pulse zamanı: 0,02 s, tarama hızı: 0,1 V/s). 47
Şekil 3.4. 0,50 mM OLA pik akımlarına a) L-Ala derişiminin etkisi b) $HAuCl_4$ derişiminin etkisi (0,1 M BR destek elektrolit ortamı pH 4,5). 48
Şekil 3.5. a) 0,50 mM OLA'nın DPV voltamogramlarından elde edilen birinci (E_{pa1}) ve ikinci (E_{pa2}) yükseltgenme pik potansiyellerinin – pH ile değişimi b) i_{p1} – pH değişimi. Elektrot: AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE, 0,1 M BR tampon ortamında (pH 2,5 – 11,0). 49
Şekil 3.6. $5{,}0\times10^{-4}$ M OLA'nın farklı tarama hızlarında CV voltamogramları (pH 4,5 BR, υ:0,1–1,0 Vs^{-1}) **a)** birinci yükseltgenme piki (E_{pa1}), **b)** ikinci yükseltgenme piki (E_{pa2}) ve indirgenme piki (E_{pc}) İç grafikler: $\log\upsilon - \log i_p$ grafikleri. 50
Şekil 3.7. Önerilen OLA yükseltgenme-indirgenme mekanizması. 52
Şekil 3.8. OLA'nın farklı derişimlerde diferansiyel puls voltamogramları. İç grafik: OLA kalibrasyon eğrisi. (pH 4,5, step potansiyel: 0,01 V, pulse potansiyel: 0,2 V, pulse zamanı: 0,02 s, tarama hızı: 0,1 V/s). 54
Şekil 3.9. OLA : olası girişim yapan madde 1:1 olduğu durumda DPV yöntemiyle elde edilen % akım değerleri – olası girişim yapan maddeye karşı grafiği (pH 4,5 0,12 M BR destek elektrolit ortamı ve elektrot: AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE). 55
Şekil 3.10. OLA tayini için geliştirilen yöntemde geri kazanım çalışması; a) kan serum, b) idrar, c) ticari numune içeren ortamlarda kaydedilmiş voltamogramlar. 56
Şekil 3.11. OLA'nın pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları. İç grafik: $C_{DNA} - i_p$ grafiği (pH 4,3). 57

Şekil 3.12. log($i_{OLA\text{-}DNA}/i_{OLA}-i_{OLA\text{-}DNA}$)−log(1/DNA) grafiği. 58
Şekil 3.13. a) PGE, b) polyCA-PGE, c) AuNPs-PGE, d) AuNPs-polyCA-PGE FE-SEM görüntüleri e) AuNPs-polyCA-PGE için EDX spektrumu. 59
Şekil 3.14. a) Nyquist eğrileri b) 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob için υ: 0,05 V/s tarama hızında CV voltamogramlar. 60
Şekil 3.15. 0,50 mM CLZ'nin farklı modifiye elektrotların yüzeyinde DPV voltamogramları (pH 9,0 BR ortamında). 62
Şekil 3.16. 0,50 mM CLZ pik akımlarına a) CA derişiminin etkisi b) $HAuCl_4$ derişiminin etkisi (0,1 M BR destek elektrolit ortamı pH 9,0). 63
Şekil 3.17. a) 0,50 mM CLZ'nin DPV voltamogramlarından elde edilen birinci (E_p) pik potansiyellinin – pH ile değişimi b) i_p – pH değişimi. AuNPs-polyCA-PGE elektrot yüzeyinde, 0,1 M BR tampon ortamında (pH 2,0 – 11,0). 63
Şekil 3.18. $5{,}0\times10^{-4}$ M CLZ'nin farklı tarama hızlarında CV voltamogramları (pH 9,0 BR destek elektrolit ortamında 0,1–1,0 Vs^{-1} tarama hızı aralığında), iç grafik: logυ−logi_p grafiği. 64
Şekil 3.19. $5{,}0\times10^{-4}$ M CLZ CV voltamogramları (5 döngülü). (pH 9,0 BR, (-0.3V)−(+0.75V)−(-0.3V) potansiyel aralığı, υ: 0,1Vs^{-1}). 65
Şekil 3.20. CLZ'nin olası yükseltgenme mekanizması. 66
Şekil 3.21. CLZ'nin farklı derişimlerde elde edilen diferansiyel puls voltamogramları. İç grafik: CLZ kalibrasyon eğrisi. (pH 9,0 BR). 67
Şekil 3.22. CLZ: olası girişim yapan madde 1:1 olduğu durumda DPV yöntemiyle elde edilen % akım değerleri – olası girişim yapan maddeye karşı grafiği (pH 9,0 0,12 M BR destek elektrolit ortamı ve elektrot: AuNPs-polyCA-PGE). 68
Şekil 3.23. CLZ tayini için geliştirilen yöntemde geri kazanım çalışması; a) kan serum, b) idrar, c) ticari numune içeren ortamlarda kaydedilmiş voltamogramlar. 69
Şekil 3.24. CLZ'nin farklı derişimlerdeki DNA ortamında DPV voltamogramları. İç grafik: $C_{DNA}-i_p$ grafiği (pH 7,4). 70
Şekil 3.25. log($i_{CLZ\text{-}DNA}/i_{CLZ}-i_{CLZ\text{-}DNA}$)−log(1/DNA) grafiği. 71
Şekil 3.26. a) PGE, b) poly(L-Ala)-PGE, c) AuNPs-PGE d) AuNPs-poly(L-Ala)-PGE FE-SEM görüntüleri d) AuNPs-poly(L-Ala)-PGE için EDX spektrumu. 72
Şekil 3.27. Hazırlanan modifiye elektrotların a) Nyquist eğrileri b) CV voltamogramları (0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob için υ: 0,035 V/s). 73
Şekil 3.28. 0,50 mM CPZ tayininde farklı modifiye elektrotlar ile DPV voltamogramlar (pH 4,5 BR). 74
Şekil 3.29. 0,50 mM CPZ pik akımlarına a) L-Ala derişiminin etkisi b) $HAuCl_4$ derişiminin etkisi (0,1 M BR destek elektrolit ortamı, pH 5,0). 75
Şekil 3.30. a) 0,50 mM CPZ'nin DPV voltamogramlarından elde edilen birinci (E_{pa1}) ve ikinci yükseltgenme pik potansiyellerinin (E_{pa2}) – pH ile değişimi b) i_{p1} – pH değişimi. AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot yüzeyinde, 0,1 M BR tampon ortamında (pH 2,0 – 6,0). 75
Şekil 3.31. $5{,}0\times10^{-4}$ M CPZ'nin pH 5,0 BR destek elektrolit ortamında 0,1–1,0 Vs^{-1} tarama hızı aralığında CV voltamogramları. İç grafikler: **a)** CPZ tayininde birinci yükseltgenme piki (E_{pa1}), **b)** ikinci yükseltgenme piki (E_{pa2}) için logυ−logi_p grafikleri. 76
Şekil 3.32. Olası CPZ yükseltgenme mekanizması. 77
Şekil 3.33. CPZ diferansiyel puls voltamogramları (BR destek elektrolit ortamı, AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot). İç grafik: CPZ kalibrasyon eğrisi. 79
Şekil 3.34. CPZ : olası girişim yapan madde 1:1 olduğu durumda DPV yöntemiyle elde edilen % akım değerleri – olası girişim yapan maddeye karşı grafiği (0,12 M BR destek elektrolit ortamı, pH 5,0 ve elektrot: AuNPs-poly(L-Ala)-PGE). 80
Şekil 3.35. CPZ tayini için geliştirilen yöntemde geri kazanım çalışması; a) kan serum, b) idrar, c) ticari numune içeren ortamlarda kaydedilmiş voltamogramlar. 81
Şekil 3.36. CPZ'nin pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları. İç grafik: $C_{DNA}-i_p$ grafiği (pH 4,3). 82
Şekil 3.37. log($i_{CPZ\text{-}DNA}/i_{CPZ}-i_{CPZ\text{-}DNA}$)−log(1/DNA) grafiği. 83

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. OLA tayini için yapılan voltametrik çalışmalar**.** 15
Çizelge 1.2. CLZ tayini için yapılan voltametrik çalışmalar. 22
Çizelge 1.3. CPZ tayini için yapılan voltametrik çalışmalar. 27
Çizelge 3.1. OLA kalibrasyonunda regresyon parametreleri. 54
Çizelge 3.2. Kan serum, idrar ve ticari ilaç örneğinden OLA geri kazanım bulguları. 56
Çizelge 3.3. CLZ kalibrasyonunda regresyon parametreleri. 67
Çizelge 3.4. Kan serum, idrar ve ticari ilaç örneğinden CLZ geri kazanım bulguları. 69
Çizelge 3.5. CPZ kalibrasyonunda regresyon parametreleri. 79
Çizelge 3.6. Kan serum, idrar ve ticari ilaç örneğinden CPZ geri kazanım bulguları. 81

1. GİRİŞ

Şizofreni yüzyıllardan beri, insanın ruh sağlığını tehdit eden bir hastalık olmuştur. Şizofreni, hasta hezeyanları, halüsinasyonları, kontrolsüz davranış semptomları nedeniyle, suça yönelimi kolaylaştıran bir hastalık olarak karşımıza çıkar. Bu noktada, toplum güvenliği adına şizofreni hastalarının suçla olan ilişkisinin kontrolü önemlidir. Bu bağlamda, şizofreni tedavisinde kullanılan antipsikotik ilaç etken maddelerin tayini için yöntem geliştirmek önemlidir.

Elektrokimya, elektron alışverişine dayanan kimyasal olayları ve mekanizmaları inceler. Hızlı sonuç vermesi, yüksek seçicilik ve yüksek performansa sahip olması, güvenilir olması nedeniyle elektrokimyasal yöntemlerin yaygın bir kullanım alanı vardır. Bu sebeple, yeni çalışma elektrotlarının geliştirilmesi farmasötik kimya, adli bilimler ve gen teknolojileri uygulamaları için giderek önem arz etmektedir.

Son zamanlarda artan bir biçimde önem kazanan bir başka konu da nanoboyutta malzeme sentezi, karakterizasyonu ve uygulamalarıdır. Nanoparçacıkların geniş yüzey alanı, iyi elektriksel ve mekaniksel özellikler sağlaması nedeniyle nanobilimde yaygın kullanımları ile bilimsel bilgi ve teknolojide hızlı bir ilerleme kaydedilmiştir (Freitas, 2005; Govender vd., 2000; Kreuter, 2004; Kunzmann vd., 2011; Rao ve Geckeler, 2011)

Nanoteknolojideki artan gelişmeler farmasötik kimya, adli bilimler ve gen teknoloojilerine yönelik araştırmalar, geleceğin nanoteknolojiye bağlı olduğunu ortaya koymaktadır (Gök ve Özdemir, 2015; Sahoo vd., 2007; Singh vd., 2009).

Metal nanoparçacıklara dayanan modifiye elektrotlar yeni sensör tasarımlarında kullanılmaktadır (Hernandez-Santos vd., 2004; Katz vd., 2004; Luo vd., 2006; Wang, 2003). Çünkü nitelikli yüzey özellikleri göstermeleri nedeniyle elektrokimyasal analizlerde yüksek performans göstermektedirler.

Bununla birlikte, metal nanoparçacık kaplı yüzeyler çok kararlı değildir, kırılabilir, özelliklerini yitirebilir ve modifikasyon esnasında elektrot yüzeyinde yığılma gösterebilirler. Bahsi geçen durumu önlemek için stabilizatörler kullanılmaktadır. Bu şekilde nanoparçacıkların boyutları kontrol edilebilmekte ve nanoparçacıkların modifikasyon

esnasında elektrodun belirli bir bölgesinde yığılması engellenebilmektedir (Templeton vd., 2000; Zanchet vd., 2001).

Stabilizatör olarak organik maddeler, yüzey aktif maddeler (Triton X-100), çeşitli polimerler ve killer kullanılabilmektedir. Bu malzemelerden elektron iletimi sağlayan ve gözenekli yapıyla sahip biyoiletken polimerler elektrot modifikasyonlarında en sık tercih malzemelerden biridir (Ahmed vd., 2015; Tammari vd., 2017).

Elektropolimerizasyonla aminoasitler elektrot yüzeyinde biyopolimer oluşturabilmektedirler. Elektrodun biyopolimerle modifikasyonu, elektrodun biyouyumlu olmasını sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında kullanılan aminoasit elektropolimerizasyon ile elektrot yüzeyinde polimerleşebilmektedir.

Literatüre bakıldığında elektrotların poliaminoasit (pA) ya da polimerler (p) ile modifikasyonuna dair bilimsel çalışmalar son yıllarda artmıştır (Ahmed vd., 2015; Tammari vd., 2017). Ayrıca poliaminoasit (pA) modifiye grafit elektrotların metal nanoparçacıkları ile modifikasyonuyla elektrodun duyarlığının artırılması çalışmaları da son yıllarda önem kazanmıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında kullanılmış olan AuNPs-pA-PGE ve AuNPs-p-PGE elektrotlar yeni ve dikkat çeken bir çalışma alanıdır.

Literatür araştırmalarında poliaminoasit/polimer ile kaplı elektrodun metalik nanoparçacıklar ile modifikasyonuna ait çalışmalar çok daha azdır. Bu nedenle poliaminoasit/polimer kaplı grafit elektrotların metalik nanoparçacıklar ile modifikasyonuyla yeni elektrotların üretilmesi ve elektrokimyasal sensör olarak kullanımı oldukça önemlidir.

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında PGE elektrotların yüzeyi çoklu dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi ile monometalik Au nanoparçacıklar ve poly(L-Alanin)/poly(kafeik asit) ile eş zamanlı modifiye edilerek hazırlanmıştır. Çalışmada geliştirilen tüm elektrotların performansları ve karakterizasyonları CV, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ve enerji dağılımlı X ışınları spektroskopisi (EDX) teknikleri kullanılarak araştırılmıştır. Geliştirilen elektrotların yüzeyinde elektrokimyasal yükseltgenme davranışları incelenen antipsikotik ilaç etken etken maddeleri diferansiyel puls voltametrisi (DPV) yöntemiyle kantitatif olarak tayin edilmiştir. Aynı zamanda, söz konusu ilaç etken maddeleri önemli bir antipsikotik ilaç grubu olduğundan yeni ilaç tasarımlarına katkı sağlaması için DNA ile etkileşimleri incelenmiştir.

1.1. Şizofreni

Şizofreni insanın ruh sağlığını tehdit eden bir hastalıktır ve şizofreninin suçla olan ilişkisi, hastaların halüsinasyonları, kontrolsüz davranışları ve hezeyanları nedeniyle suça yönelmeyi kolaylaştırmasıdır.

Şizofreni, kişinin yüksek şiddet riski gösterme eğilimini doğrudan etkilemektedir. Bunun sonucunda ülkemizde şizofreni kaynaklı adli vakalar da giderek artmaktadır.

Şizofreni ilaçlarının kullanımı adli bilimlerde adli psikiyatride önemlidir. Adli psikiyatri tedavi programlarında şizofreni semptomlarının tedavisinin yanı sıra şiddet riskinin değerlendirilmesi ve yönetilmesi çalışmaları da yapılmaktadır (Hodgins vd., 2007). Şizofreni ilaç kullanımı temelinde planlanan uzun vadeli adli psikiyatri tedavi programları şizofreni hastalarının şiddet eğilimlerinde azalmayı sağlamaktadır (Richter vd., 2018). Ayrıca şizofreni ilaç kullanımı temelindeki uzun süreli tedavi programları hastaların bilişsel kapasitelerini ve verilen bir görevi yerine getirebilmelerini gerçeklemede de etkilidir (Majorek vd., 2009). Öte yandan şizofreni ilaç kullanımı temelindeki uzun süreli tedavi programlarında etkililik sağlanabilmesi adına ilaçların doz miktarının belirlenmesi ve kullanımı suçun alışkanlık haline getirilmesinin önlenmesinde de etkilidir (Tengström ve Hodgins, 2002). Bu nedenle, adli bilimlerde antipsikotik ilaçların derişiminin, hem kalite kontrol amaçlı ticari ilaç örneklerinde hem de biyolojik numunelerde (kan serumu, idrar) hızlı bir şekilde belirlenebilmesi için etkili analitik yöntemler gerekmektedir.

Adli bilimlerde antipsikotik ilaç etken maddelerin tayini için çeşitli analitik yöntemler kriminal laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Temelde elektrokimyasal sinyaller bir elektroda modifiye edilen biyolojik madde (DNA, enzim vb), nanoparçacık ya da polimer içeren yüzeylerinde gerçekleştirilir. Bir ya da daha çok maddenin elektrot yüzeyine modifikasyonu ile hazırlanan elektrotların birçok maddenin tayininde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Elektrokimyasal sensörler diğer zaman alıcı klasik yöntemlere göre birçok avantaja sahiptir. Örneğin kullanılan kromatografik yöntemlerin pahalılığı, fazla miktarda çözücü gerektirmesi, kullanımının uzmanlık gerektirmesi ve maliyetinin yüksek olması gibi nedenler bahsi geçen yöntemlerin cazibesini azaltmaktadır. Elektroforetik yöntemlerin uygulamasının uzun zaman alması, ayrıca yöntemin çok pahalı olması gibi dezavantajları vardır (Hert vd., 2008).

Elektrokimyasal yöntemler özellikle ilgi çekicidir, çünkü bunlar karmaşık değildir, hızlı yanıtlara sahiptir, nispeten ucuzdur ve genellikle analitik olarak oldukça hassastır. Ayrıca bu yöntemlerle geliştirilen elektrokimyasal sensörlerin kullanımı, özellikle nanoteknoloji alanındaki gelişmelerle birlikte giderek önem kazanmaktadır (Bakker ve Quin, 2006; Cernat vd., 2015). Elektrokimyasal sensör hazırlanmasında benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan Au, Ag, Pt ve metal oksit (MO) nanoparçacıklar sıklıkla kullanılmaktadır (Beytur vd., 2018; Ganjali vd., 2017). Özellikle Au nanoparçacıklar elektrot ile analit arasındaki elektron transferini kolaylaştırmaktadır aynı zamanda biyouyumlu olması nedeniyle son yıllarda elektrot malzemesi olarak kullanılmaktadır (Beytur vd., 2018). Nanokillller elektrot yüzeyinin iletkenliğini artırmakta aynı zamanda analitin yüzeye adsorpsiyonunu artırmaktadır. Son yıllarda biyouyumlu olması nedeniyle elektrot malzemesi olarak kullanılmaktadır (Shetti vd., 2017). Metal oksit nanoparçacıklar ise, metalik iletkenliğe yakın iletkenlik, geniş elektrokimyasal çalışma penceresi, yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmaları nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir (Ganjali vd., 2017). Elektrot yüzeyinin bir biyopolimerle modifiye edilmesi, elektrodun biyouyumluluğunu artırmaktadır. Organik bir polimer ile elektrot modifikasyonu; organik ve doymamış bileşiklerin elektrot yüzeyinde tutunması suretiyle nitelikli bir elektrokataliz süreci sağlar, elektrot yüzeyinin çabuk bozulmasını, dökülmesini engeller, elektrot yüzeyinde öngörülen tepkimenin gerçekleşmesini sağlar, istenmeyen tepkimeleri engeller (Don vd.; Oyama & Anson; Hu vd.'den aktaran Ren vd., 2006).

Yapılan literatür araştırmasında, antipsikotik ilaç etken maddelerinden olanzapin, klozapin ve klorpromazinin tayininde elektrokimyasal sensör geliştirme çalışmaları incelendiğinde kullan at teknolojisine uygun, ucuz, sensör teknolojine uygun kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine nanoparçacıkların (nano altın, nanokil, metal oksit, biyopolimer/polimer nanoparçacıklar) modifiye edildiği çalışmaların çok da yaygın olmadığı görülmüştür. Bu tez çalışmasında, şizofreni ilaç etken maddesi olarak çalışılan olanzapin, klozapin ve klorpromazinin tayini için PGE elektrot yüzeyi modifiye edilerek elektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen modifiye elektrotların yüzey morfolojileri ve elektrokimyasal performansı incelenmiştir. En yüksek yüzey alanına sahip modifiye elektrot yüzeyinde üç farklı şizofreni ilaç etken maddesi olarak olanzapin, klozapin ve klorpromazinin elektrokimyasal yükseltgenme davranışları CV ve DPV yöntemleri ile incelenmiştir. Elektrokimyasal yükseltgenme davranışları doğrultusunda olanzapin, klozapin ve klorpromazinin analizleri için elektrokimyasal yöntem, DPV geliştirilmiştir.

Genetik kodumuzu taşıyan DNA molekülünde meydana gelen hasarlar mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, kanser gibi ölümcül hastalıklara neden olmaktadır. DNA

molekülleri çeşitli koşullar altında, özellikle küçük moleküller ile etkileşim yoluyla hasar görmeye yatkındır. İlaç etken maddelerinin kendilerinin ya da metabolitlerinin DNA-bağlanma ürünleri, ilaca sürekli maruziyette karsinojenezis erken dönem biyogöstergesi olarak davranmaktadır. Dolayısıyla ilaç etken maddelerin DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi; mutajenezis (gen mutasyonları), mutajenezisin gen baskılayıcı genlerce onarılamaması durumunda da karsinojenezis olasılıkları nedeniyle önemlidir. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında, antipsikotik ilaç etken maddelerinden olanzapin, klozapin ve klorpromazinin DNA ile etkileşimleri voltametrik yöntemlerle incelenmiştir.

1.2. Voltametri

Voltametri, bir indikatör ya da çalışma elektrodunun, polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanarak, analit hakkında bilgi edinilen bir gurup analitik yöntemdir.

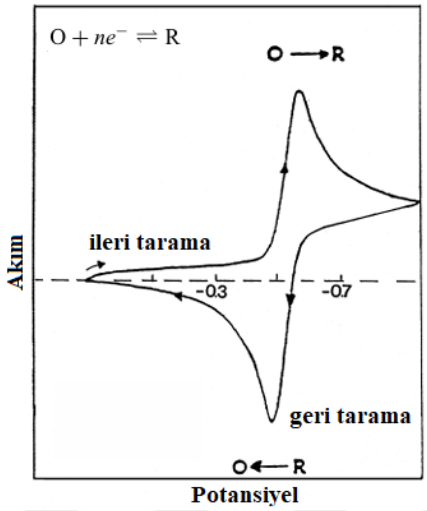
Bir voltametrik deneyin yürütüldüğü elektrokimyasal hücre, bir çalışma elektrodundan, bir referans elektrottan ve bir karşıt elektrottan oluşur. Çalışma elektrodu yük transferinin gerçekleşmesi için bir ara yüzey sağlar. Bir kimyasal türün indirgenmesi ya da yükseltgenmesi yeterli bir potansiyelin uygulanması ile çalışma elektrodu yüzeyinde gerçekleşir, yeni oluşan ürüne ait kütle aktarımı elektrot yüzeyinde gerçekleşirken akım oluşur (Kounaves, 1997).

Voltametrinin kullanımının sağladığı avantajlar; doğrusal çalışma aralığında 10^{-12} M'den 10^{-1} M'ye kadar gözlenebilme sınırında organik ve inorganik elektroaktif türler için hassas tayin, birçok farklı çözücü ve elektrolit kullanımına olanak verme, geniş bir sıcaklık aralığında çalışabilme, saniye gibi hızlı analiz süreleri, birkaç analitin eş zamanlı tayin edilebilmesi, mekanizma tayinlerinin yapılabilmesi, iyi geliştirilmiş bir teori ile bilinmeyen parametrelerin de tahmin edilebilirliği, farklı potansiyel dalga biçimlerinin uygulanabilirliği ile daha hassas ölçülebilen akımlar şeklinde sıralanabilir (Kounaves, 1997).

1.3. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri (CV) moleküllerin yükseltgenme ve indirgenme süreçlerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. CV aynı zamanda elektron transferiyle indüklenen kimyasal reaksiyonların çalışılmasında önemlidir. CV'de ileri yönde

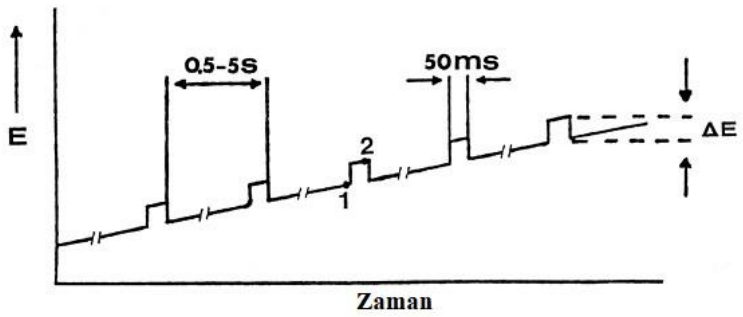
ve geri yönde bir gerilim taraması yapılmaktadır (Elgrishi vd., 2018). CV'de elektroda uygulanan gerilime karşılık gelen voltamogram Şekil 1.1.'de sunulmuştur.



Şekil 1.1. Dönüşümlü voltametride elektroda uygulanan gerilim ve elde edilen voltamogram (Wang, 2001).

1.4. Diferansiyel Puls Voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisi (DPV), eser miktarda organik ve inorganik türlerin tayin edilmesinde oldukça kullanışlıdır. DPV'de çalışma elektroduna sabit pulslar uygulanır. (Şekil 1.2.). Akım, puls uygulamasının öncesinde ve sonrasında iki defa ölçülür. Uygulanan potansiyele karşı, aradaki fark grafiğe geçirilir. Böylece DPV voltamogramları elde edilir. Çalışılan analitin derişimi, voltamogramların pik akımları ile orantılıdır (Wang, 2001).



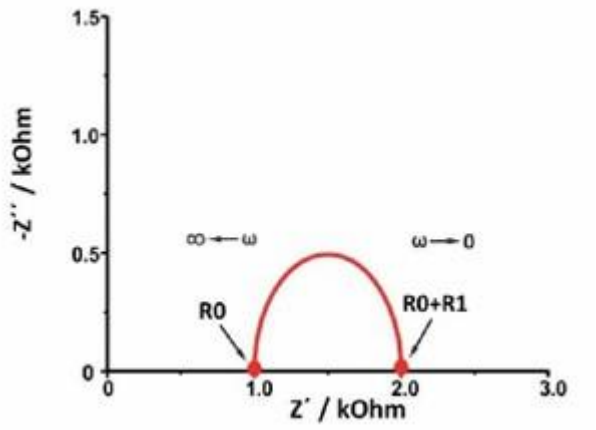
Şekil 1.2. Diferansiyel puls voltametrisi tekniğinde potansiyel - zaman grafiği (Wang, 2001).

1.5. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), modifiye edilen elektrotların özelliklerini ve elektrot reaksiyonlarını araştırmak için önemli bir yöntemdir (Wang vd., 2021).

EIS, modifiye edilen bir elektrodun arayüzeyine alternatif gerilim ya da alternatif akım gibi sinüzoidal sinyal uygulamasıyla arayüzeyi oluşturan kararlı yapının bozunmasına dayanır. Bir dizi frekansa modifiye edilmiş elektrot yüzeyinin gerilim ya da akım olarak vermiş olduğu sinüzoidal tepki esas alınır (Lazanas ve Prodromidis, 2023).

Nyquist eğrisi $-Z'' = f(Z')$ empedans değerine karşılık gelmektedir. Burada Z', frekans uyarımının empedansına karşılık gelirken; $-Z''$ ise Z' değerine karşılık gelen empedanstır (Lazanas ve Prodromidis, 2023). Şekil 1.3'te sunulan Nyquist eğrisinde R_{ct} değeri yani elektrodun yük transfer direnci, R_0 başlangıç direnci ile R_0+R_1 bitiş direnci arasındaki farka dayanır ve değerin küçük olması modifiye elektrodun yüzey direncin küçük olması şeklinde yorumlanabilir.

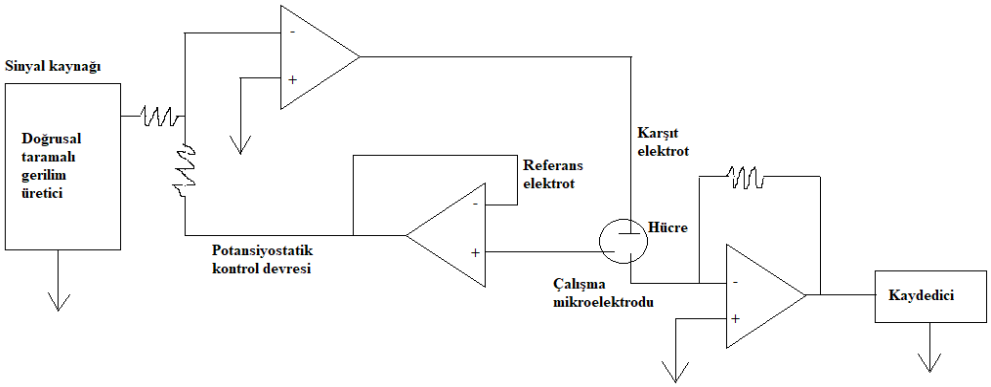


Şekil 1.3. Elektrokimyasal empedans spektrumu (Nyquist diyagramı) (Lazanas ve Prodromidis, 2023).

1.6. Voltametrik Cihazlar

Doğrusal taramalı voltametrik ölçümler yapmak için kullanılan modern bir cihazın

bileşenleri Şekil 1.4.'te şematik olarak gösterilmiştir.

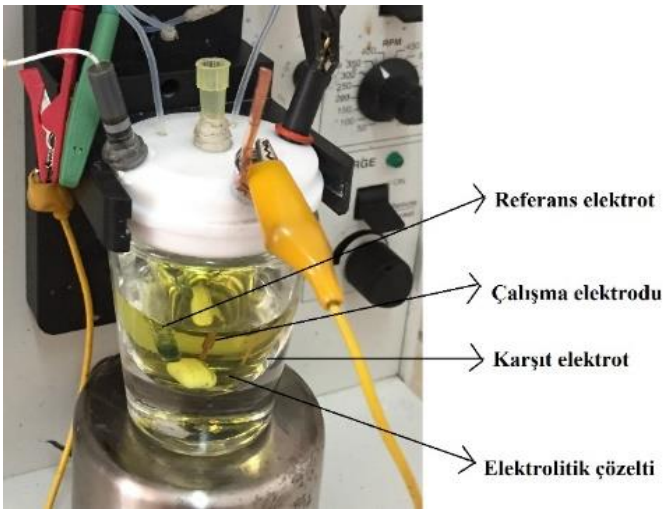


Şekil 1.4. Potansiyostatik üç-elektrotlu doğrusal-taramalı voltametri için bir sistem (Skoog vd., 1996).

Analit, reaktif olmayan-aşırı elektrolit içeren destek elektrolit ve bu ikisini içeren çözeltiye daldırılmış üç elektrot bir hücreyi oluşturmaktadır. Bu elektrotlardan çalışma elektrodu; potansiyeli zamanla doğrusal olarak değişen mikroelektrottur. Polarize olma eğilimini artırma için bu elektrodun boyutu küçüktür.

İkinci elektrot, referans elektrottur. Potansiyeli deney boyunca sabittir. Doymuş kalomel ya da bir gümüş/gümüş klorür elektrot referans elektrottur.

Karşıt elektrot ise üçüncü elektrottur. Elektriğin sinyal kaynağından, çözelti içine ve çalışma elektroduna aktarımını sağlar. Platin tel veya civa havuzu şeklinde olabilir (Skoog vd., 1996). Şekil 1.5.'te üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücre gösterilmiştir.



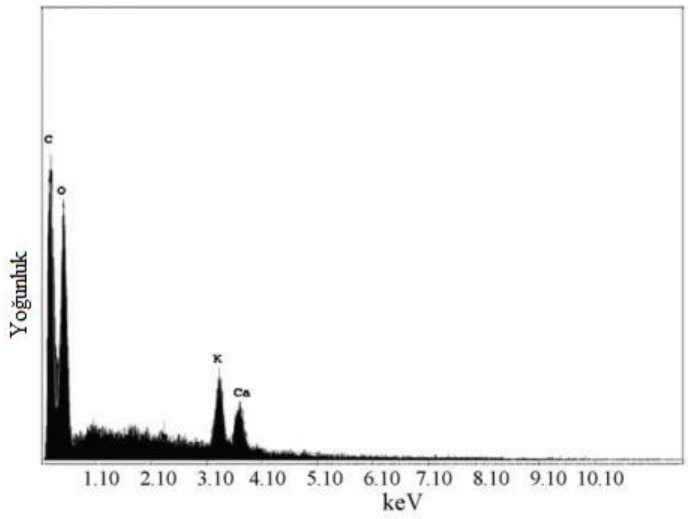
Şekil 1.5. Üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücre.

1.7. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ve Enerji Dağılımlı X Işınları Spektroskopisi (EDX)

Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobunda (FE-SEM), yüksek enerjili elektron demeti ızgara tarama yöntemiyle, numune yüzeyinin görüntülenmesi esastır. FE-SEM'de alan emisyon kaynağından salınan elektronlar kullanılır. Bu elektron salınımları, tungsten telin emisyonundan 1000 kat daha fazla emisyon üretir. Aynı zamanda elektronların vakuma gelebilmesi için çok daha yüksek vakumlama koşulları gerekmektedir. Elektron demeti üretilince manyetik lenslere düşürülerek analiz edilecek yüzey tanecikleri ile etkileşmekte, daha sonra da detektör tarafından toplanarak yüzeyin ayrıntılı görüntüsü şeklinde işlenmektedir (Kazmiruk, 2012).

Enerji Dağılımlı X-Işınları Spektroskopisi (EDX), genellikle taramalı elektron mikrsokobuna bağlı olarak bulunmaktadır. EDX cihazının radyasyon kaynağı ile iyonize olan numune atomları X ışınları yayımlarlar. Bu ışınlar da dedektörde pik sinyali şeklinde işlenerek numunenin hem kalitatif hem de kantitatif olarak elementel bileşimi hakkında bilgi verir (Scimeca vd., 2018).

Şekil 1.6.'da temsili bir numune olarak mango kabuğu içerisindeki element bileşimleri sunulmuştur. Elementlerin yüzdeleri, her bir elemente ait pikin altındaki alanla orantılıdır (Iqbal vd., 2009).



Şekil 1.6. EDX analizi ile numunedeki element pikleri ve yüzdeleri (Iqbal vd., 2009).

1.8. Olanzapin

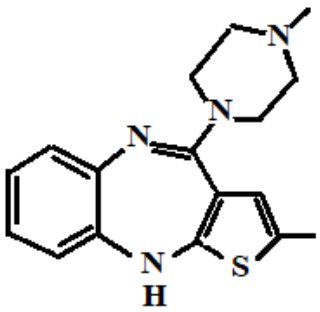
Olanzapin, (OLA, 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)- 10H-tiyono [2,3-b][1,5] benzodiazepin, $C_{17}H_{20}N_4S$) şizofreni tedavisinde kullanılan bir ilaç etken maddesidir (Callaghan vd., 1999).

Olanzapin, şizofreni grubu psikotik bozuklukların; halüsünasyonların, manik atakların tedavisinde endikedir (Ondo vd., 2002; Tohen vd., 1999).

Olanzapin, 10- ve 4′-N-glukronidleri ile 4′-N-desmetilolanzapin metabolitlerine CYP1A2 enzimi ile sindirilir, olanzapin N-oksit metabolitine ise flavin monooksijenaz-3 enzimi ile sindirilir. Bu olanzapinin esas metabolik yolağıdır. Olanzapinin yan metabolik yolağı ise olanzapinin 2-hidroksil-metilolanzapin metabolitine CYP2D6 enzimi ile sindirilmesi yolağıdır (Callaghan vd., 1999).

Gen polimorfizmi kaynaklı ya da olanzapin ilaç etken maddesinin aşırı dozda alımı kaynaklı olanzapinin kanda aşırı birikmesi insan sağlığını tehdit eden bir durumdur. Postmortem adli vakaların aydınlatılmasında ya da akut toksisitede zamanında antidot uygulanmasında kan serumdan ya da idrardan olanzapin tespit ve miktar tayini önemlidir. Olanzapinin kan serumdan ve idrardan tayininde kromatografi, spektrofotometri ve elektrokimyasal sensörler kullanılmaktadır (Ikeda vd., 2012; Aman vd., 2005; Arvand vd., 2015; Shahrokhian vd., 2014). Bu yöntemlerden elektrokimyasal sensör geliştirmenin diğer yöntemlere göre ucuz olması, basit kullanımı, kısa sürede analiz sonuçlarının elde edilmesi, yüksek duyarlık ve yüksek seçicilik gibi avantajları vardır (Pisoschi vd., 2015).

Olanzapinin kimyasal yapısı Şekil 1.7.'de sunulmuştur.



Şekil 1.7. Olanzapinin kimyasal yapısı.

1.9. Olanzapin Tayini İçin Yapılan Voltametrik Çalışmalar

OLA voltametrik tayinine yönelik son 20 yılda yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Biryol ve Erk (2003) çalışmalarında olanzapinin (OLA) yükseltgenme davranışını ve tayinini camsı karbon elektrot (GCE) yüzeyinde dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve Osteryoung kare dalga voltametri (OSWV) yöntemleri ile incelemişlerdir. $1{,}0\times10^{-3}$ M OLA'nın BR destek elektrolit ortamında pH 3,2'de elektrokimyasal yükseltgenmesinin +0,37V'da olduğu bulunmuştur, geri taramada ise, +0,42V'da bir indirgenme pikine rastlanmıştır. +0,37V'da elde edilen pikten yararlanılarak voltametrik yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen DPV ve OSWV yöntemleri için doğrusal çalışma aralığı 70,0−1000,0 µM olarak belirlenmiştir. DPV yöntemi için gözlenebilme sınırı (LOD) 6,79 µM iken, OSWV yöntemi için 6,91 µM olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine başarı ile uygulanmıştır.

Merli vd. (2012) OLA'nın farmasötik formlarından ve vücut sıvılarından tayini için seçici elektrokimyasal sensör üretiminin hızlı, etkili ve ekonomik tayin sağladığını vurguladıkları çalışmalarında; yükseltgenmiş-tek duvarlı karbon nanotüp modifiye altın elektrot (SWCNTs-COOH-CME) üretmişlerdir. Modifiye edilmemiş altın elektrot ile modifiye edilmiş elektrot 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ ve 0,1 M KCl içeren redoks prob üzerinde CV yönteminde karşılaştırılmıştır. En yüksek pik akımı ve en düşük pik potansiyel farkı modifiye elektrotta elde edilmiştir. Geliştirilen bu elektrot yardımıyla OLA'nın elektrokimyasal yükseltgenme davranışı amonyak/amonyum klorür destek elektrolit ortamında pH 8,5'da CV yöntemi ile incelenmiştir. OLA'ya ait yükseltgenme piki yaklaşık +420 mV değerinde gözlenmiştir. Bu yükseltgeme piki kullanılarak OLA DPV yöntemiyle tayin edilmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrusal çalışma aralığı (0,48−48,07) µM olarak belirlenmiş ve gözlenebilme sınırı ise 0,32 µM'dır. Geliştirilen yöntemin doğruluğunu teyit etmek amacıyla ticari ilaç örneklerine ve idrar numunelerine uygulanmıştır.

Arvand ve Palizkar (2013) çalışmalarında OLA'nın elektrokimyasal tayini için amin katkılı TiO_2/çok duvarlı karbon nanotüp-modifiye camsı karbon elektrot (NH_2-TiO_2-MWCNTs/GCE) geliştirmişlerdir. Geliştirilen modifiye elektrodun performansı 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ ve 0,1 M KCl içeren redoks prob üzerinde CV yöntemiyle incelenmiştir. Modifiye elektrot yüzeyinde PBS destek elektrolit ortamında pH 5,0 değerinde OLA tayini için SWV yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemde iki doğrusal çalışma

aralığı (0,12−33,0 μM ve 33,0−124,0 μM) elde edilmiş ve düşük doğrusal çalışma aralığı için gözlenebilme sınırı 0,09 μM olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine ve serum numunelerine %96,8 ve %96,6 geri kazanım değerleriyle başarıyla uygulanmıştır.

El-Shal (2013) olanzapinin ketiapin (QTP) ile birlikte elektrokimyasal davranışı ve tayinini camsı karbon elektrot (GCE) yüzeyinde CV ve DPV yöntemlerinde çalışmıştır. OLA'nın yükseltgenme davranışı CV yöntemiyle incelenmiş ve +0,60 V değerinde bir yükseltgenme piki görülmüştür. Bu yükseltgenme pikinin elektrokimyasal davranışı 10-200 mVs^{-} tarama hızı aralığında çalışılmıştır. Buna göre logip−logv grafiği çizilerek eğimin 0,51 değerine eşit olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla elektrot yüzeyi elektrokimyasal davranışının difüzyon kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır. GCE elektrot yüzeyinde BR destek elektrolit ortamında pH 2,0 değerinde OLA tayini için DPV yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemde (0,03−4,0 μM) doğrusal çalışma aralığında OLA için gözlenebilme sınırı 0,01 μM olarak belirlenmiştir. Yöntem idrar ve serum numunelerine %98,2 ve %96,7 geri kazanım değerleriyle başarıyla uygulanmıştır.

Ahmed vd. (2015) çalışmalarında OLA tayini için, iyonik sıvı olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında glutamin (GL) ve altın nanoparçacıklarla (GN) modifiye edilerek (GNGLCP/SDS/CPE) yeni ve duyarlılığı yüksek bir elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. GNGLCP/SDS/CPE elektrotta OLA yükseltgenme davranışı BR destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde CV ile incelendiğinde, +0,35 V değerinde bir yükseltgenme piki gözlemlenmiştir, geri dönüşte ise +0,13 V'de bir indirgenme piki elde edilmiştir. OLA tayini için modifiye elektrot ile geliştirilen yöntemde bu yükseltgenme piki esas alınmıştır. Geliştirilen analitik yöntemde, 0,5−125,0 μM doğrusal çalışma aralığında 0,9986 korelasyon katsayısı ile gözlenebilme sınırı 0,0036 μM olarak belirlenmiştir. İdrar ve ticari ilaç örneği ile gerçek numune çalışmaları yapıldığında, geri kazanım yüzdeleri; %98,56 ve %100,53 olarak hesaplanmıştır.

Yılmaz vd. (2017) çalışmalarında OLA tayini için camsı karbon elektrot (GCE) yüzeyinde basit ve hızlı bir yöntem olarak LSV yöntemi geliştirmişlerdir. CV yöntemiyle BR destek elektrolit ortamında pH 1,65 değerinde GCE yüzeyinde OLA'nın elektrokimyasal yükseltgenme pik potansiyeli +1,06V değerinde elde edilmiştir. LSV yöntemi kullanarak (8,01−160,25) μM doğrusal çalışma aralığında OLA için gözlenebilme sınırı 1,60 μM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine %99,8 geri kazanım ile başarıyla uygulanmıştır.

Muthusankar vd. (2018) çalışmalarında OLA'nın elektrokimyasal davranışını belirlemek ve tayini için sülfür doplanmış karbon kuantum noktalı ve demir (III) oksit nanoparçacık modifiyeli camsı karbon elektrot (S-CQDs/Fe_2O_3/GCE) hazırlamışlardır. Modifiye elektrot yüzey morfolojisi geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntülemeleri ve EDS ile incelenmiştir. Hazırlanan sensörün elektrokimyasal karakterizasyonu CV yönteminde 50 mVs^- tarama hızında ve 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ ve 0,1 M KCl içeren redoks prob üzerinde incelenmiştir. Hazırlanan elektrot yüzeyinde OLA'nın yükseltgenme piki CV yönteminde +0,23 V değerinde elde edilmiş, voltametrik yöntem geliştirme için bu pik takip edilmiştir. Modifiye elektrodun OLA tayini için elektrokimyasal duyarlılığı PBS destek elektrolit ortamında DPV yönteminde pH 7,0 değerinde ve (0,1−35,0) μM doğrusal çalışma aralığında çalışılmış, OLA gözlenebilme sınırı 0,006 μM olarak belirlenmiştir. Gerçek numune çalışmaları idrar numunelerine başarıyla uygulanmış, çoklu ölçümlerde %95,10 ile %105,47 arasında değişen geri kazanımlar elde edilmiştir.

Arvand ve Pourhabib (2019) çalışmalarında sodyum dodesil sülfat varlığında amin katkılı TiO_2/çok duvarlı karbon nanotüp-modifiye camsı karbon elektrodun (ISS-NH_2-TiO_2-MWCNTs/GCE) geliştirilmesi ve kullanımını anlatmışlardır. Modifiye elektrot OLA'nın elektrokimyasal karakterizasyonunu ortaya koyma amacıyla kullanılmıştır. OLA'nın yükseltgenmesinde modifiye elektrodun etkililiği, pH 7,0 PBS destek elektrolit ortamında CV ve kare dalga voltametri (SWV) yöntemleri kullanılarak çalışılmıştır. SWV yönteminde, modifiye elektrot OLA tayini için 0,05−0,1; 0,1−10,0 μM doğrusal çalışma aralıklarında düşük potansiyel ile yüksek duyarlılık ve iyi seçicilik göstermiştir. OLA için gözlenebilme sınırı 0,008 μM olarak belirlenmiştir. Ayrıca geliştirilen yöntem OLA'nın farmasötik tablet ve kan serumdan tayininde yüksek duyarlık göstermiştir.

Shukla vd. (2020) çalışmalarında OLA yükseltgenme davranışı ve tayini için mikroskalada platinyum black modifiye altın mikroelektrot (PB-modified microelectrode) geliştirmişlerdir. CV yönteminde OLA'nın modifiye elektrot yüzeyinde yükseltgenme pik potansiyeli +0,3V değerindedir ve OLA tayini için bu yükseltgenme piki takip edilmiştir. OLA'nın elektrokimyasal tayini için fosfat tamponunda (pH 7,4), (0,08−0,15) μM doğrusal çalışma aralığında DPV voltamogramları alınmıştır; elde edilen voltamogramlar yardımıyla kalibrasyon grafikleri çizilmiştir ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen gözlenebilme sınırı 0,0156 μM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem standart ekleme yöntemiyle kan serum numunelerine uygulanmış ve bu ortamda gözlenebilme sınırı 0,0278 μM olarak bulunmuştur.

Yağmur-Kabaş (2020) çalışmasında OLA'nın yükseltgenme davranışını ve tayinini DPV ve CV yöntemlerinde camsı karbon elektrot (GCE) kullanarak incelemiştir. OLA yükseltgenme piki CV yönteminde BR destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde +1,5V olarak belirlenmiştir, bu yükseltgenme piki OLA'nın voltametrik tayini için yöntem geliştirmede takip edilen pik olarak alınmıştır. Geliştirilen DPV yöntemi için doğrusal çalışma aralığı (20,0−100,0) μM dır, gözlenebilme sınırı 1,88 μM olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem idrarda ve farmasötik numunelerde başarıyla uygulanmıştır.

Gowda vd. (2022) çalışmalarında OLA tayini için voltametrik yöntem geliştirmede GCE elektrot yüzeyine MnO_2NPs modifiye ederek pH 6,0 destek elektrolit ortamında OLA'nın elektrokimyasal analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Dönüşümlü voltametride +0,32V'de OLA için elde edilen yükseltgenme piki elektrokimyasal yöntem geliştirmede kullanılmıştır. Ayrıca dönüşümlü voltametride farklı tarama hızları çalışması sonrasında OLA yükseltgenmesinin difüzyon kontrollü olduğu belirlendikten sonra SWV yöntemi ile elde edilen doğrusal çalışma aralığı (0,1−23,0) μM dır, gözlenebilme sınırı, LOD 0,00227 μM olarak tespit edilmiştir. Elektrodun duyarlığı ve güvenirliği klinik numuneler ve idrarda, standart ekleme yöntemiyle başarıyla çalışılmıştır.

Noureldin vd. (2024) çalışmalarında OLA'nın yükseltgenme davranışı ve tayini için nikel kobaltit ve karbon kserojel nanokompozit modifiye camsı karbon elektrot ($NiCo_2O_4$/CX/GPE) üretmişlerdir. CV yönteminde OLA'nın elektrokimyasal davranış incelendiğinde +0,2V değerinde OLA için bir yükseltgenme piki elde edilmiştir. DPV yönteminde modifiye elektrotla (0,04−212,4) μM doğrusal çalışma aralığında OLA tayini için gözlenebilme sınırı 0,004 μM olarak belirlenmiştir. Gerçek numune uygulamaları ticari ilaç örneği, idrar ve kanda başarıyla uygulanmıştır. Özetlenen çalışmalar Çizelge 1.1.'de sunulmuştur.

Yukarıda özetlenen çalışmalarda sıklıkla GCE göze çarpmaktadır. Camsı karbon elektrodun maliyetinin yüksek olması bir dezavantaj olarak görülmektedir. Bu tez çalışmasında ise yapılan çalışmalardan farklı olarak ucuz, kullan at teknolojisine uygun, basit, kullanımı kolay olan PGE elektrot yüzeyi Au ve poly(L-Ala) ilk defa modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu elektrodun yüzeyi önce ön işlemle fonksiyonlandırılmış, daha sonra eş zamanlı olarak Au nanoparçacıklarla ve poly(L-Alanin) ile kaplanmıştır. Elde edilen bu yeni elektrot ara yüzeyi, AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE, ile OLA yükseltgenme davranışı ve yükseltgenme mekanizması araştırılmıştır. Daha sonra OLA tayini için bu elektrotla DPV yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem gerçek numunelere (ticari ilaç örneği, kan serum ve idrar) uygulanmıştır.

Çizelge 1.1. OLA tayini için yapılan voltametrik çalışmalar.

Elektrot	Yöntem	Tayin edilen kimyasal	Doğrusal çalışma aralığı (µM)	Gözlene-bilme sınırı (µM)	Uygulanan numune	Referans
GCE	CV DPV OSWV	OLA	70,0 - 1000,0	6,79(DPV), 6,91 (OSWV)	Ticari ilaç örneği	Biryol ve Erk, 2003
SWCNTs-COOH-CME	CV DPV	OLA	0,48 - 48,07	0,3	Ticari ilaç örneği, idrar	Merli vd., 2012
NH_2-TiO_2-MWCNTs/GCE	CV SWV	OLA	0,12 - 33,0; 33,0 - 124,0	0,09	Ticari ilaç örneği, kan serum	Arvand ve Palizkar, 2013
GCE	CV DPV	OLA-QTP	0,03 - 4,0	0,01	İdrar, kan serum	El-Shal, 2013
GNGLCP/SDS/CPE	CV	OLA	0,5 - 125,0	0,004	Ticari ilaç örneği, idrar	Ahmed vd., 2015
GCE	CV LSV	OLA	8,01 - 160,25	1,60	Ticari ilaç örneği	Yılmaz vd., 2017
S-CQDs/Fe_2O_3/GCE	CV DPV	OLA	0,1 - 35,0	0,006	İdrar	Muthusankar vd., 2018
ISS-NH_2-TiO_2-MWCNTs/GCE	CV SWV	OLA	0,05 - 0,1; 0,1 - 10,0	0,008	Ticari ilaç örneği, kan serum	Arvand ve Pourhabib, 2019
PB-modifiye mikro-elektrot	CV DPV	OLA	0,08 - 0,15	0,0156	Kan serum	Shukla vd., 2020
GCE	CV DPV	OLA	20,0 - 100,0	1,88	Ticari ilaç örneği, idrar	Yağmur-Kabaş, 2020
GCE	SWV	OLA	0,1 - 23,0	0,00227	Klinik numune, idrar	Gowda vd., 2020
$NiCo_2O_4$/CX/GPE	CV DPV	OLA	0,04 - 212,4	0,004	Ticari ilaç örneği, kan serum, idrar	Noureldin vd., 2024

Çalışmada PGE elektrot yüzeyi için kronoamperometri ile elektrokimyasal ön muamele yapılmasının sebebi yüzeyin karbonillenerek (Srinivas vd., 2023) modifiye partiküllerin dağılmasının önlenmesidir (Rana vd., 2019). Elektrot yüzeyinde L-Ala elektropolimerizasyonun sebebi, gözenekli yapıda bir biyo iletken polimer olan bu maddenin elektron, iyon ya da proton iletimini iyi olmasıdır (Ahmed vd., 2015; Tammari vd., 2017) Ayrıca stabilizatör olarak poly(L-Ala) ile eş zamanlı olarak kaplama yapılacak Au nanoparçacıklar, stabilizatör sebebiyle yüzeyde homojen dağılır (Chandra vd., 2011; Li vd., 2008; Phongphut vd., 2020). Metalik nanoparçacık olarak Au nanoparçacıkların seçilmesinin

sebebi ise Au nanoparçacıkların elektroanalitik tayinlerdeki biyouyumluluğudur (Hu vd., 2008). Yukarıda özetlenen voltametrik çalışmalarda üretilen farklı elektrotlarla ve geliştirilen farklı yöntemlerde OLA gözlenebilme sınırı 0,0036 µM ile 9,60 µM arasında farklılaşmaktadır. Mevcut çalışmada OLA gözlenebilme sınırı ise 0,081 µM'dır, ancak yukarıda özetlenen çalışmalarda genellikle daha pahalı olan GCE kullanılmıştır ki mevcut çalışmanın üstünlüğü daha ucuz PGE elektrot modifikasyonun kullanılmasıdır. Öte yandan OLA'nın kan serum potansiyel toksisite düzeyi 0,32 µM'dır (Dokur vd., 2014; Dordevic vd., 2022) ve mevcut çalışmada üretilen elektrot ve geliştiren yöntemin OLA tayini için LOD değerinin 0,081 µM olması sebebiyle üretilen elektrot ve geliştirilen yöntem kan serum potansiyel toksisite düzeyi tespiti için başarıyla uygulanabilir.

1.10. Klozapin

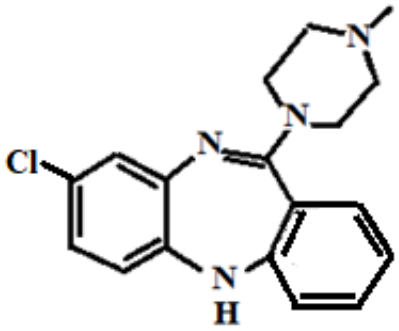
Klozapin, (CLZ, 3-klor-6-(4-metilpiperazin-1-il)-11H-benzo[b][1,4]benzodiazepin, $C_{18}H_{19}ClN_4$) şizofreni tedavisinde kullanılan bir ilaç etken maddesidir (Dragoi vd.,'den aktaran Marinho, 2024).

Klozapin, şizofreni grubu psikotik bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır. Klozapin tedaviye dirençli, daha ağır şizofreni tedavisinde endikedir (Dragoi vd.,'den aktaran Marinho, 2024).

N-Desmetilklozapin ve Klozapin-N-oksit, klozapinin ana metabolitleridir (Shaber vd., 1998). Karaciğer sitokrom P450 enzim ailesinden CYP1A2 enzimleri CLZ'yi N-Desmetilklozapin metabolitine sindirirken CYP3A4 enzimleri CLZ'yi Klozapin-N-oksit metabolitine sindirir (Bishara ve Taylor, 2008).

Gen polimorfizmi kaynaklı ya da klozapin ilaç etken maddesinin aşırı dozda alımı kaynaklı klozapinin kanda aşırı birikmesi insan sağlığını tehdit eden bir durumdur. Postmortem adli vakaların aydınlatılmasında ya da akut toksisitede zamanında antidot uygulanmasında kan serumdan ya da üreden klozapin tespit ve miktar tayini önemlidir. Klozapinin kan serumdan ve üreden tayininde kromatografi, spektrofotometri ve elektrokimyasal sensörler kullanılmaktadır (Shetti vd., 2017; Van Leeuwen vd., 2005; Zhu vd., 2018). Bu yöntemlerden elektrokimyasal sensör geliştirmenin diğer yöntemlere göre ucuz olması, basit kullanımı, kısa sürede analiz sonuçlarının elde edilmesi, yüksek duyarlık ve yüksek seçicilik gibi avantajları vardır (Shetti vd., 2017).

Klozapinin kimyasal yapısı Şekil 1.8.'de sunulmuştur.



Şekil 1.8. Klozapinin kimyasal yapısı.

1.11. Klozapin Tayini İçin Yapılan Voltametrik Çalışmalar

Farhadi ve Karimpour (2007) çalışmalarında klozapinin (CLZ) elektrokimyasal davranışı ve tayini için +1,8V'de anodik yükseltgenme ile ön muamele edilmiş camsı karbon elektrot (pre-oxidizedGCE) kullanmışlardır. Dönüşümlü voltametride (CV) CLZ için +0,55V'de bir yükseltgenme piki elde edilmiştir, geri dönüşte de +0,45V'de bir indirgenme piki elde edilmiştir. Elde edilen yükseltgenme piki CLZ tayini için yöntem geliştirmede kullanılmıştır. Modifiye elektrot ile fosfat (PBS) destek elektrolit ortamında pH 6,0 değerinde DPV yönteminde CLZ tayini için (0,1−1,0; 1,0−10,0; 10,0−100,0 µM) doğrusal çalışma aralığında, gözlenebilme sınırı (LOD) 0,008 µM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneği, kan serum ve idrara başarıyla uygulanmıştır.

Manjunatha vd. (2011) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için çok duvarlı karbon nanotüp modifiye karbon pasta elektrot (MWCNTs/CPE) üretmişlerdir. CV yönteminde CLZ için +0,36V'de bir yükseltgenme piki elde edilmiş, geri dönüşte de +0,45V'de bir indirgenme piki elde edilmiştir. Elde edilen yükseltgenme piki CLZ tayini için yöntem geliştirmede kullanılmıştır. Modifiye elektrot ile PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde CV yönteminde CLZ tayini için 1000,0−3500,0 µM doğrusal çalışma aralığında, LOD 2000,0 µM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Arvand ve Shiraz (2012) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışını belirleme ve tayini için eş zamanlı sodyum dodesil sülfat yüzey aktif madde modifiye karbon iyonik sıvı elektrot (SDS/ISS-CILE) üretmişlerdir. CLZ'nin elektrokimyasal davranışı CV ile incelenmiştir, +0,59V'de bir yükseltgenme piki elde edilmiştir, geri dönüşte de +0,52V'de bir indirgenme piki elde edilmiştir. Elde edilen yükseltgenme piki CLZ tayini için yöntem geliştirmede esas alınmıştır. Modifiye elektrot ile distile su ve HCl destek elektrolit ortamında pH 3,5 değerinde adsorptif anodik diferansiyel puls voltametrisi (AdsDPV) yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi optimize edilmiştir. Geliştirilen yöntem ile CLZ tayini için doğrusal çalışma aralığı 0,001−0,1 μM olarak belirlenmiş, LOD de 0,0002 μM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine ve kan serum örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Mashhadizadeh ve Afshar (2013) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışını belirleme ve tayini için titanyum dioksit nanoparçacık modifiye karbon pasta elektrot (TiO_2NPs/CPE) kullanmışlardır. CLZ'nin elektrokimyasal davranışı CV ile incelenmiştir, +0,40V'de bir yükseltgenme piki elde edilmiştir, geri dönüşte de +0,25V'de bir indirgenme piki elde edilmiştir. CLZ'nin tayini için yöntem geliştirmede bu yükseltgenme piki kullanılmıştır. BR destek elektrolit ortamında pH 9,0 değerinde CLZ tayini için yöntem geliştirmede AdsDPV yönteminde doğrusal çalışma aralığı 0,5−45,0 μM olarak alınmış, LOD değeri de 0,061 μM olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Shahrokhian vd. (2013) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışını belirleme ve tayini için çok duvarlı karbon nanotüp ve koksin ($C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$, boyar kimyasal) doplanmış polipirol modifiye camsı karbon elektrot (MWCNTs/NC/PPY/GCE) üretmişlerdir. CLZ'nin elektrokimyasal davranışı CV'de incelenmiş, +0,50V'de bir yükseltgenme piki, geri dönüşte de +0,05V'de bir indirgenme piki elde edilmiştir. Bu yükseltgenme piki CLZ tayini için yöntem geliştirmede esas alınmıştır. BR destek elektrolit ortamında pH 5,44 değerinde CLZ tayini için doğrusal tarama voltametrisi (LSV) yönteminde 0,01−5,0 μM doğrusal çalışma aralığında LOD 0,0006 μM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine ve kan serum örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Shetti vd. (2017) çalışmalarında CLZ'nin elektokimyasal davranışını belirleme ve tayini için ruthenyum doplanmış titanyum dioksit nanoparçacık modifiye karbon pasta elektrot (Ru/TiO_2NPs/CPE) elektrot üretmişlerdir. SEM ve TEM görüntüleri ile modifiye elektrodun yüzey morfolojisi çalışılmıştır. CV yönteminde CLZ'nin davranışı incelendiğinde +0,24V'de

bir yükseltgenme piki, geri dönüşte de +0,20V'de bir indirgenme piki gözlenmiştir. Yükseltgenme piki CLZ tayini için yöntem geliştirmede kullanılmıştır. CLZ tayini için PBS destek elektrolit ortamında pH 10,4 değerinde kara dalga voltametrisi (SWV) yönteminde 0,9−40,0 μM doğrusal çalışma aralığında LOD değeri 0,00043 μM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine ve idrara başarıyla uygulanmıştır.

Tammari vd. (2017) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışının belirlenmesi ve tayini için Fe_3O_4 nanopartikülleri/β-alanin ve paladyum nanopartikülleri kullanılarak modifiye camsı karbon elektrot (Fe_3O_4/β-alanin/Pd/GCE) hazırlamışlardır. CV yönteminde CLZ için +0,4V'de bir yükseltgenme piki geri dönüşte de +0,3V'de bir indirgenme piki gözlenmiştir. CLZ tayini için yöntem geliştirmede bahsi geçen yükseltgenme piki alınmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,2 değerinde DPV yönteminde CLZ tayini için 0,003−0,07 μM doğrusal çalışma aralığında LOD değeri 0,00153 μM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine ve kan serum örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Shamsi vd. (2018) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışını incelemek ve de tayini için nikel oksit nanoparçacıklı grafen kuantum dot modifiye camsı karbon elektrot (NiO/GQD/GCE) hazırlamışlardır. CLZ tayininde CV yönteminde +0,4V'de bir yükseltgenme piki, geri dönüşte de +0,3V'de bir indirgenme piki gözlenmiştir. CLZ tayini için yöntem geliştirmede bahsi geçen yükseltgenme piki alınmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 2,0 değerinde CLZ tayini için DPV yönteminde modifiye elektrot kullanılarak 0,003−1,0 μM doğrusal çalışma aralığında kalibrasyon grafiği çizilmiş, LOD değeri 0,0005 μM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine ve kan serum örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Ghanbari vd. (2019) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için titanyum dioksit nanoparçacık ve bakır (II) oksit modifiye karbon pasta elektrot (TiO_2NPs/CuO/CPE) üretmişlerdir. CLZ'nin elektrokimyasal davranışı CV yönteminde incelendiğinde +0,6V'de bir yükseltgenme piki, geri dönüşte +0,55V'de bir indirgenme piki görülmüştür. CLZ tayini için yöntem geliştirmede bu yükseltgenme piki alınmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 5,0 değerinde CLZ tayini için DPV yönteminde (0,00003−0,004 μM ve 0,004−10,0 μM) doğrusal çalışma aralığında gözlenebilme sınırı 0,000009 μM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine ve kan serum örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Aflatoonian vd. (2020) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için rutenyum (IV) oksit nanoparçacık modifiye yüzey baskılı elektrot (RuO_2NPs/SPE) hazırlamışlardır. Modifiye elektrot yüzey morfolojisi SEM görüntüleri ile incelenmiştir. CLZ'nin elektrokimyasal davranışı CV yönteminde incelendiğinde +0,28V'de bir yükseltgenme piki, geri dönüşte de +0,17V'de bir indirgenme piki gözlenmiştir. Yükseltgenme piki CLZ tayini için yöntem geliştirmede esas alınmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde CLZ tayini için DPV yönteminde 0,2−500,0 µM doğrusal çalışma aralığında LOD değeri 0,07 µM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem farmasötik tablet ve idrar numunelerine başarıyla uygulanmıştır.

Beitollahi vd. (2020) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için grafen oksit, manyetit, silisyum dioksit modifiye yüzey baskılı elektrot (GO/Fe_3O_4/SiO_2/SPE) üretmişlerdir. Elektrodun yüzey morfolojisi SEM görüntüleri ile çalışılmıştır. CLZ'nin elektrokimyasal davranışı CV yönteminde incelenmiş +0,4V'de bir yükseltgenme piki görülmüş, geri dönüşte +0,3V'de de bir indirgenme piki analiz edilmiştir, CLZ'nin tayini için yöntem geliştirmede bu yükseltgenme piki temel alınmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde CLZ tayini için modifiye elektrot kullanılarak DPV yönteminde 0,1−700,0 µM doğrusal çalışma aralığında gözlenebilme sınırı 0,03 µM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Senel vd. (2021) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için indirgenmiş grafen oksit nanoparçacık, altın, palladyum, platin modifiye kalem grafit elektrotlar (ReducedGO NCs/Au/Pd/Pt/PGEs) üretmişlerdir. Modifiye elektrotların yüzey morfolojisi SEM ve TEM görüntüleri ile incelenmiştir. CLZ tayini için CV yöntemiyle yapılan incelemede; indirgenmiş grafen oksit nanoparçacık, platin modifiye kalem grafit elektrot (ReducedGO NCs/Pt/PGE) pik akımının duyarlığı daha yüksek bulunmuştur, +0,45V değerinde bir yükseltgenme piki görülmüştür, CLZ tayini için yöntem geliştirmede bu pik kullanılmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,4 değerinde CLZ tayini için ReducedGO NCs/Pt/PGE elektrot kullanılarak, DPV yönteminde 0,05−10,0 µM doğrusal çalışma aralığında LOD değeri 1,6 µM olarak hesaplanmıştır.

Wang vd. (2022) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için elektrokimyasal polarize edilmiş yüzey baskılı karbon elektrot (EP/SPCE) kullanmışlardır. CLZ'nin elektrokimyasal davranışı CV yönteminde incelenmiş, +0,3V'de bir yükseltgenme piki, geri dönüşte de +0,3V'de bir indirgenme piki gözlenmiştir. CLZ tayini için yöntem geliştirmede bu pik esas alınmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 6,0 değerinde CLZ

tayini için modifiye elektrot kullanılarak DPV yönteminde 0,05−20,0 μM doğrusal çalışma aralığında gözlenebilme sınırı 0,028 μM olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem kan serum örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Ghanbari vd. (2023) çalışmalarında CLZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için nikel doplanmış grafen nanoparçacıklarla modifiye camsı karbon elektrot (Ni@GRNT/GCE) kullanmışlardır. CV yönteminde CLZ'nin davranışı incelenmiş, +0,45V'de yükseltgenme piki, geri dönüşte de +0,37V'de indirgenme piki elde edilmiş, yükseltgenme piki CLZ tayini için yöntem geliştirmede kullanılmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde CLZ tayini için DPV yönteminde 0,0003−60,0 μM doğrusal çalışma aralığında gözlenebilme sınırı 0,0001 μM olarak belirlenmiştir. Ticari ilaç örneği ve kan serum numunelerine geliştirilen yöntem başarı ile uygulanmıştır. Özetlenen çalışmalar Çizelge 1.2.'de sunulmuştur.

Yukarıda özetlenen makalelerde sıklıkla camsı karbon elektrot (GCE) ve karbon pasta elektrot (CPE) modifikasyonu göze çarpmaktadır. Bahsi geçen bu elektrotlardan GCE elektrodun maliyetinin yüksek olması, tekrarlanabilirliğinin de nispeten düşük olması bir dezavantaj olarak görülmektedir. Aynı zamanda, CPE elektrot ve GCE elektrotların hazırlanma prosedürleri uzundur. Bu nedenle, bu tez çalışmasında ucuz, kullan at teknolojisine uygun, basit, kullanımı kolay, hazırlama prosedürleri basit PGE elektrotlar kullanılmıştır. PGE elektrodun yüzeyi eş zamanlı olarak Au nanoparçacıklarla ve poly(kafeik asit) ile elektrokimyasal olarak kaplanmıştır. Ara yüzey poly(kafeik asit) ile kaplanarak altın nanoparçacıkların yüzey tutunması sağlanmıştır. Hazırlanan yeni ara yüz ile iletkenliğin artması beklenmektedir (Chandra vd., 2011; Hu vd., 2008; Li vd., 2008; Phongphut vd., 2020) Elde edilen bu yeni modifiye elektrot ara yüzeyi, AuNPs-poly(CA)-PGE, ile CLZ elektrokimyasal yükseltgenme davranışı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, hazırlanan elektrot ara yüzeyinde CLZ tayini için DPV yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem gerçek numunelere (ticari ilaç örneği, kan serum ve idrar) uygulanmıştır.

Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntem ile elde edilen gözlenebilme sınırı ise 0,003 μM düzeyindedir. Öte yandan, CLZ'nin kan serum potansiyel toksisite düzeyi ise 4,000 μM civarındadır (Brown vd., 2013), dolayısıyla bu çalışmanın gözlenebilme sınırının kan serum potansiyel toksisite düzeyinin tespiti için gerçek numunelere başarıyla uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 1.2. CLZ tayini için yapılan voltametrik çalışmalar.

Elektrot	Yöntem	Tayin edilen kimyasal	Doğrusal çalışma aralığı (µM)	Gözlene-bilme sınırı (µM)	Uygulanan numune	Referans
pre-oxidized GCE	CV DPV	CLZ	0,1−1,0; 1,0−10,0; 10,0−100,0	0,008	Ticari ilaç örneği, kan serum, idrar	Farhadi ve Karimpour, 2007
MWCNTs/ CPE	CV	CLZ	1000,0−3500,0	2000,0	Ticari ilaç örneği	Manjunatha vd., 2011
SDS/ISS-CILE	CV AdsDPV	CLZ	0,001−0,1	0,0002	Ticari ilaç örneği, kan serum	Arvand ve Shiraz, 2012
TiO_2NPs/ CPE	CV AdsDPV	CLZ	0,5−45,0	0,061	Ticari ilaç örneği	Mashhadizadeh ve Afshar, 2013
MWCNTs/ NC/PPY/ GCE	CV LSV	CLZ	0,01−5,0	0,0006	Ticari ilaç örneği, kan serum	Shahrokhian vd., 2013
Ru/TiO_2 NPs/CPE	CV SWV	CLZ	0,9−40,0	0,00043	Ticari ilaç örneği, idrar	Shetti vd., 2017
Fe_3O_4/β-alanin/Pd/ GCE	CV DPV	CLZ	0,003−0,07	0,00153	Ticari ilaç örneği, kan serum	Tammari vd., 2017
NiO/GQD/ GCE	CV DPV	CLZ	0,003−1,0	0,0005	Ticari ilaç örneği, kan serum	Shamsi vd., 2018
TiO_2NPs/ CuO/CPE	CV DPV	CLZ	0,00003−0,004; 0,004−10,0	0,000009	Ticari ilaç örneği, kan serum	Ghanbari vd., 2019
RuO_2NPs/ SPE	CV DPV	CLZ	0,2−500,0	0,07	Ticari ilaç örneği, idrar	Aflatoonian vd., 2020
GO/Fe_3O_4/ SiO_2/SPE	CV DPV	CLZ	0,1−700,0	0,03	Ticari ilaç örneği	Beitollahi vd., 2020
Reduced GONCs/ Au/Pd/Pt/ PGEs	CV DPV	CLZ	0,05−10,0	1,6	Kan serum	Senel vd., 2021
EP/SPCE	CV DPV	CLZ	0,05−20,0	0,028	Kan serum	Wang vd., 2022
Ni@GR NT/GCE	CV DPV	CLZ	0,0003−60,0	0,0001	Ticari ilaç örneği, kan serum	Ghanbari vd., 2023

1.12. Klorpromazin

Klorpromazin, (CPZ, 3-(2-klor-10H-fenotiyazin-10-il)-N,N-dimetilpropan-1-amin, $C_{17}H_{19}ClN_2S$) şizofreni tedavisinde kullanılan bir ilaç etken maddesidir (Khanfous vd., 2017).

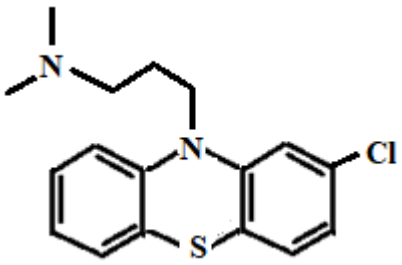
Klorpromazin, şizofreni tedavisinde seçici bir yaklaşım sağlayan ilk ilaç etken maddesidir ve daha sonra birçok şizofreni ilaç etken maddesinin sentezini de olası kılmıştır

(Lopez-Munoz vd., 1998'den aktaran Lopez-Munoz vd., 2005; Lopez-Munoz vd., 2004'ten aktaran Lopez-Munoz vd., 2005).

Klorpromazin sindiriminde hidroksilleme ve glukronatlama ile ana metabolit N-desdimetil klorpromazinin monoglukronattır (Beckett vd., 1963). Karaciğer sitokrom P450 enzim ailesinden CYP1A2, CYP2D6 ve CYP3A4 enzimleri klorpromazini metabolitlerine sindirmektedir (Mann ve Marwaha, 2023).

Gen polimorfizmi kaynaklı ya da klorpromazin ilaç etken maddesinin aşırı dozda alımı kaynaklı klorpromazinin kanda aşırı birikmesi insan sağlığını tehdit eden bir durumdur. Postmortem adli vakaların aydınlatılmasında ya da akut toksisitede zamanında antidot uygulanmasında kan serumdan ya da üreden klorpromazin tespit ve miktar tayini önemlidir. Klorpromazinin kan serumdan ve üreden tayininde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve elektrokimyasal sensör geliştirme gibi çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Allender vd., 1983; Bailey ve Guba, 1979; Mitsana-Papazoglou vd., 1985). Bu yöntemlerden elektrokimyasal sensör geliştirmenin diğer yöntemlere göre ucuz olması, basit kullanımı, kısa sürede analiz sonuçlarının elde edilmesi, yüksek duyarlık ve yüksek seçicilik gibi avantajları vardır (Shetti vd., 2017).

Klorpromazinin kimyasal yapısı Şekil 1.9.'da sunulmuştur.



Şekil 1.9. Klorpromazinin kimyasal yapısı.

1.13. Klorpromazin Tayini İçin Yapılan Voltametrik Çalışmalar

Ahmedzadeh vd. (2001) çalışmalarında klorpromazinin (CPZ) elektrokimyasal davranışı ve tayini için kadmiyum oksit nanoparçacık iyonik sıvı karbon pasta elektrot (CdO/NPs/IL/CPE) üretmişlerdir. Dönüşümlü voltametri (CV) yönteminde CPZ'nin elektrokimyasal davranışı incelenmiştir ve +0,69V'de bir yükseltgenme piki elde edilmiştir.

CPZ'nin tayini için yöntem geliştirmede bu yükseltgenme piki esas alınmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde kare dalga voltametri (SWV) yönteminde modifiye elektrotla CPZ tayini için 0,1−350,0 μM doğrusal çalışma aralığında, gözlenebilme sınırı (LOD) 0,07 μM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine ve idrar numunelerine başarıyla uygulanmıştır.

Ni vd. (2001) çalışmalarında CPZ'nin elektrokimyasal tayini için modifiye edilmemiş camsı karbon elektrot (GCE) kullanmışlardır. BR destek elektrolit ortamında pH 9,0 değerinde anodik DPSV yönteminde CPZ için +0,62V'de bir yükseltgenme piki gözlenmiştir. CPZ'nin DPSV yöntemiyle tayini için bu pik kullanılmıştır. DPSV yönteminde GCE ile CPZ tayini için 0,16−3,76 μM doğrusal çalışma aralığında LOD 0,15 μM olarak hesaplanmıştır.

Parvin (2011) çalışmasında CPZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için grafen modifiye karbon pasta elektrot (GPE) üretmiştir. Yüksek elektrik iletkenliği, geniş yüzey alanı, eşsiz elektron transfer hızı ve daha ucuz maliyetli olması nedeniyle grafen kullanılmıştır. Hazırlanan elektrot yüzeyinde CPZ'nin elektrokimyasal yükseltgenme davranışı PBS destek elektrolit ortamında pH 4,0 değerinde CV ile incelenmiş ve +0,72V'de bir yükseltgenme piki var iken geri potansiyel taramasında ise +0,68V'de bir indirgenme piki gözlenmiştir. Gözlenen yükseltgenme piki yardımıyla anodik DPV yöntemi geliştirilmiştir. CPZ için doğrusal çalışma aralığı 0,01−9,0 μM iken, LOD 0,006 μM olarak belirlenmiştir.

Parvin vd. (2012) çalışmalarında CPZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için kobalt nanoparçacık modifiye karbon pasta elektrot (CoNPs/CPE) üretmişlerdir. CPZ'nin elektrokimyasal davranışı CV ile incelenmiştir. +0,75V'de bir yükseltgenme piki elde edilmiştir, geri dönüşte de +0,66V'de bir indirgenme piki elde edilmiştir. CPZ tayini için yöntem geliştirmede bu yükseltgenme piki esas alınmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 4,0 değerinde DPV yönteminde CPZ tayini için 0,002−1,0 μM doğrusal çalışma aralığında LOD 0,0006 μM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem kan serum ve idrar numunelerine sırasıyla %98,6 ve %98,2 geri kazanım yüzdeleriyle başarıyla uygulanmıştır.

Unnikrishnan vd. (2012) çalışmalarında CPZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için çok duvarlı karbon nanotüp, polietilenimin modifiye camsı karbon elektrot (MWCNT/PEI/GCE) üretmişlerdir. Modifiye elektrodun yüzey morfolojisi FE-SEM görüntüleri ile karakterize edilmiştir. CPZ'nin elektrokimyasal davranışı CV yönteminde çalışılmıştır ve +0,685V'de bir yükseltgenme piki elde edilmiştir. Bu yükseltgenme pikinden faydalanarak CPZ tayini için yöntem geliştirilmiştir. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0

değerinde DPV yönteminde modifiye elektrotla CPZ tayini için 0,019−9,2 μM doğrusal çalışma aralığında LOD 0,01 μM olarak belirlenmiştir.

Purushothama vd. (2018) çalışmalarında CPZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için alanin modifiye kalem grafit elektrot (Ala/PGE) ve glisin modifiye kalem grafit elektrot (Gli/PGE) hazırlamışlardır. CPZ tayini için bu modifiye elektrotların elektrokimyasal davranışı CV yöntemiyle incelenmiştir. CV yönteminde PGE elektrodun, Ala/PGE elektrot ve Gli/PGE elektrot ile yapılan CPZ tayinleri için pik akımı daha yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla çalışma CPZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için PGE elektrot ile yürütülmüştür. CV yönteminde PGE elektrot CPZ tayini için +0,75V'de geri dönüşümsüz bir yükseltgenme piki vermiştir. Bu yükseltgenme piki CPZ tayini için yöntem geliştirmede kullanılmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde DPV yönteminde CPZ tayini için 0,01−0,08 μM doğrusal çalışma aralığında LOD 0,003 μM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine %100,0 geri kazanım oranıyla başarıyla uygulanmıştır.

Kubendhiran vd. (2019) çalışmalarında CPZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için hidrotermal olarak sentezlenen rutenyum sülfür ile modifiye edilmiş grafit tabakları (RuS_2/AG) elektrot malzemesi olarak kullanmışlardır. Hazırlanan RuS_2/AG nanokompozit yüzey baskılı karbon elektrot (RuS_2/AG/SPCE) yüzeyine damlatarak modifiye edilmiştir. Hazırlanan elektrodun yüzeyinde CPZ'nin elektrokimyasal davranışı PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 de CV yöntemi ile incelenmiş ve +0,60V'de tersinmez bir yükseltgenme piki gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre CPZ tayini için DPV yöntemi geliştirilmiştir. Düşük ve yüksek derişimlerde olmak üzere iki farklı doğrusal çalışma aralığı (0,05−79,75 μM ve 79,75−1249,00 μM) elde edilmiştir, LOD 0,008 μM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine ve idrar örneklerine sırasıyla %101,3 ve %97,3 geri kazanım yüzdeleriyle başarıyla uygulanmıştır.

Sebastian vd. (2019) çalışmalarında CPZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için üç farklı nanoparçacığı (grafen oksit, demir ve çinko oksit nanoparçacıkları) yüzey baskılı karbon elektrot (GO-Fe/ZnO modifiye SPCE) yüzeyine modifiye etmişlerdir. CPZ'nin elektrokimyasal davranışı PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde CV yöntemi ile incelenmiştir. Buna göre modifiye elektrot yüzeyinde +0,70V değerinde daha yüksek pik akımına sahip yükseltgenme piki gözlenmiştir. Bu pik ile anodik DPV yöntemi geliştirilmiştir. CPZ tayini için (0,02−172,74 μM ve 222,48−1047,74 μM) doğrusal çalışma aralığında, LOD 0,02 μM olarak belirlenmiştir. Ticari ilaç örneği ve idrara geliştirilen yöntem uygulandığında %97,93 ve %98,06 geri kazanım ile CPZ tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Tajik ve Beitollahi (2019) çalışmalarında CPZ'nin elektrokimyasal davranışını belirleme ve tayini için grafen oksit modifiye camsı karbon elektrot (GO/GCE) hazırlamışlardır. Modifiye elektrot kullanılarak CPZ'nin elektrokimyasal davranışı CV yönteminde incelenmiş, +0,60V'de bir yükseltgenme piki bulunmuştur. Bu yükseltgenme piki CPZ tayininde yöntem geliştirmek için kullanılmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde DPV yönteminde CPZ analizi için 0,05−200,0 μM doğrusal çalışma aralığında, gözlenebilme sınırı 0,042 μM olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ticari ilaç örnekleri ve idrara başarıyla uygulanmıştır; CPZ geri kazanım yüzdesi sırasıyla %99,1 ve %99,0'dır.

Lu vd. (2020) çalışmalarında ürettikleri nikel sülfür biyokütle karbon üzerine; altın nonoparçacıklar, azot grafen oksit kuantum dotlar modifiye, camsı karbon elektrot (AuNPs/N-GOQDs/NiS_2/BC/GCE) ile CPZ'nin tayini için yöntem geliştirip gerçek numune uygulamaları yapmışlardır. Modifiye elektrodun yüzey morfolojisi FE-SEM görüntüleri ile karakterize edilmiştir. PBS destek elektrolit ortamında pH 6,8 değerinde DPV yönteminde CPZ tayini için 0,005−2,0 μM doğrusal çalışma aralığında LOD 0,00025 μM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem kan serum ve idrar numunelerine başarıyla uygulanmıştır.

Koventhan vd. (2023) çalışmalarında CPZ'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini için nikel molibdat/kobalt molibdat nanoparçacıklarını içeren yüzey baskılı karbon elektrot (NCMO/SPCE) üretmişlerdir. CPZ'nin elektrokimyasal davranışı CV yönteminde incelenmiş, +0,70V'de bir yükseltgenme piki gözlenmiş, geri dönüşte de +0,60V'de bir indirgenme piki görülmüştür. CPZ tayini için yöntem geliştirmede bu yükseltgenme piki esas alınmıştır. PBS destek elektrolit ortamında pH 7,0 değerinde DPV yönteminde modifiye elektrotla CPZ tayini için 0,2−421,0 μM doğrusal çalışma aralığında LOD 0,007 μM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem çevresel numune olarak atık sulardan ve biyolojik numune olarak idrardan CPZ tayini için başarıyla uygulanmıştır; sırasıyla %99,35 ve %99,76 geri kazanım ile CPZ tayin edilmiştir. Özetlenen çalışmalar Çizelge 1.3.'te sunulmuştur.

Yukarıda özetlenen makalelerde sıklıkla GCE modifikasyonu göze çarpmaktadır. Camsı karbon elektrodun maliyetinin yüksek olması bir dezavantaj olarak görülmektedir. Bu tez çalışmasında ise yukarıda bahsi geçen çalışmalardan farklı olarak ucuz, kullan at teknolojisine uygun, basit, kullanımı kolay PGEler kullanılmıştır. Bu elektrodun yüzeyi eş zamanlı olarak Au nanoparçacıklarla ve poly(L-Alanin) ile kaplanmıştır. Çalışmada PGE elektrot yüzeyinde L-Ala elektropolimerizasyonun sebebi, poly(L-Ala) ile eş zamanlı kaplama yapılacak Au nanoparçacıklarının yüzeyde homojen dağılımının sağlanmasıdır. Metalik nanoparçacık olarak Au nanoparçacıkların seçilmesinin sebebi ise Au nanoparçacıkların

elektroanalitik tayinlerdeki biyouyumluluğudur (Chandra vd., 2011; Hu vd., 2008; Li vd., 2008; Phongphut vd., 2020). Elde edilen bu yeni elektrot ara yüzeyi, AuNPs-poly(L-Ala)-PGE, ile CPZ yükseltgenme davranışı ve yükseltgenme mekanizması araştırılmıştır. Daha sonra CPZ tayini için bu elektrotla DPV yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem gerçek numunelere (ticari ilaç örneği, kan serum ve idrar) uygulanmıştır.

Çizelge 1.3. CPZ tayini için yapılan voltametrik çalışmalar.

Elektrot	**Yöntem**	**Tayin edilen kimyasal**	**Doğrusal çalışma aralığı (µM)**	**Gözlene-bilme sınırı (µM)**	**Uygulanan numune**	**Referans**
CdO/NPs/IL/ CPE	CV SWV	CPZ	0,1−350,0	0,07	Ticari ilaç örneği, idrar	Ahmedzadeh vd., 2001
GCE	DPSV	CPZ prometazin	0,16−3,76	0,16−3,76	Sentetik karışım, kan serum	Ni vd., 2001
GPE	CV DPV	CPZ	0,01−9,0	0,006	Ticari ilaç örneği	Parvin, 2011
CoNPs/CPE	CV DPV	CPZ	0,002−1,0	0,0006	Kan serum, idrar	Parvin vd., 2012
MWCNT/ PEI/GCE	CV DPV	CPZ	0,019−9,2	0,01	Ticari ilaç örneği	Unnikrishnan vd., 2012
PGE	CV DPV	CPZ	0,01−0,08	0,003	Ticari ilaç örneği	Purushothama vd., 2018
RuS_2/AG	CV DPV	CPZ	0,05−79,75; 79,75−1249,00	0,008	Ticari ilaç örneği, idrar	Kubendhiran vd., 2019
GO-Fe/ZnO modifiye SPCE	CV DPV	CPZ	0,02−172,74; 222,48−1047,74	0,02	Ticari ilaç örneği, idrar	Sebastian vd., 2019
GO/GCE	CV DPV	CPZ	0,05−200,0	0,042	Ticari ilaç örneği, idrar	Tajik ve Beitollahi, 2019
AuNPs/N-GOQDs/NiS_2/BC/GCE	DPV	CPZ	0,005−2,0	0,00025	Kan serum, idrar	Lu vd., 2020
NCMO/SPCE	CV DPV	CPZ	0,2−421,0	0,007	Atık sular, idrar	Koventhan vd., 2023

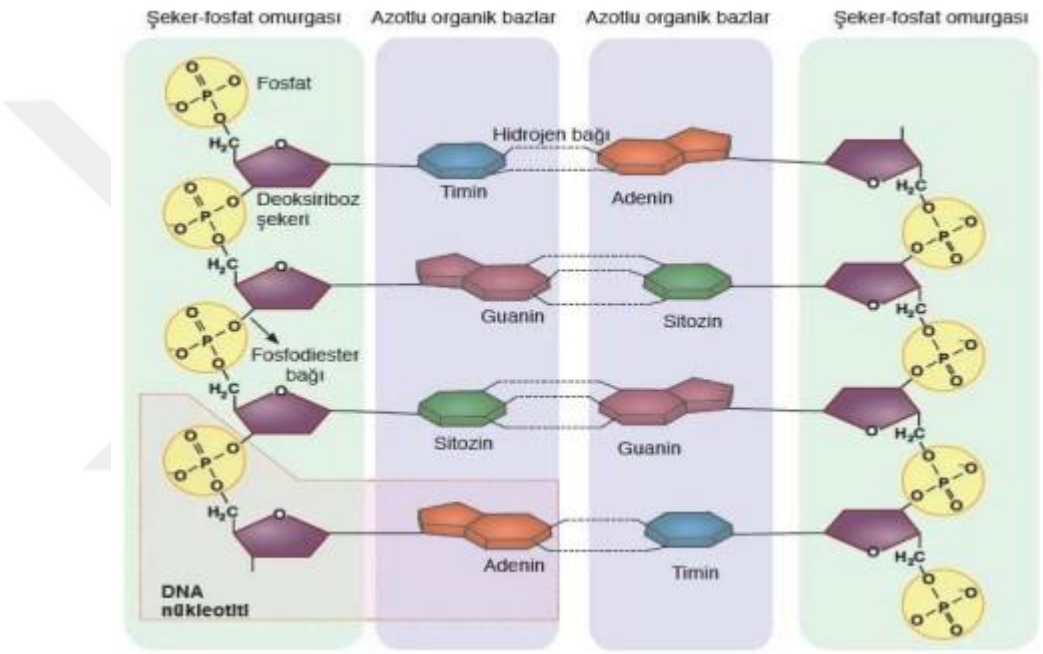
Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntem ile elde edilen gözlenebilme sınırı ise 0,00165 µM düzeyindedir. Öte yandan, CPZ'nin kan serum potansiyel toksisite düzeyi ise 1,88 µM civarındadır (mlabs.umich.edu), dolayısıyla bu çalışmanın gözlenebilme sınırının kan serum potansiyel toksisite düzeyinin tespiti için gerçek numunelere başarıyla uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

1.14. DNA-İlaç Etken Madde Etkileşimleri

DNA ilk olarak İsviçreli kimyacı Miescher tarafından 1868 yılında balık hücrelerinin çekirdeğinden izole edilmiştir. DNA daha sonra 1900'lü yıllarda genetik materyal olarak kabul

edilmiştir. Hücre çekirdeğindeki her bir kromozomda; tek ve uzun bir DNA zinciri vardır. Gen ise DNA molekülünde belli bir genetik özelliği taşıyan bölgedir (Klug ve Cumming'ten aktaran Erol, 2020).

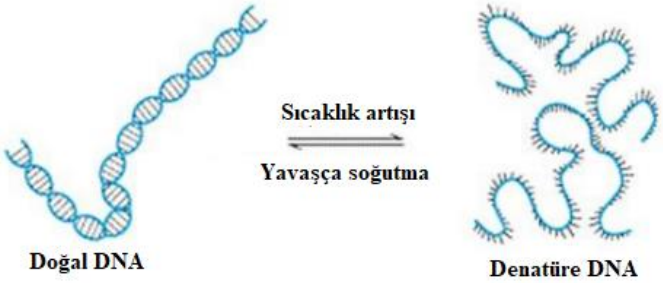
Adenin-guanin-sitozin ve timin bazları, beş karbonlu şeker ve fosfat grupları, DNA'yı oluşturmaktadır. Pürin olarak adlandırılan adenin ve guanin bazları, pirimidin olarak adlandırılan sitozin ve timin bazlarına hidrojen etkileşimleri ile tutunmaktadır. Adenin ile timin arasında, ikili hidrojen etkileşimi; guanin ile sitozin arasında, üçlü hidrojen etkileşimi mevcuttur (Erol, 2020). Şekil 1.10.'da DNA'nın çift sarmal yapısı verilmiştir.



Şekil 1.10. DNA'nın çift sarmal yapısı (Erol, 2020).

Çift sarmal yapılı DNA molekülünde bazlar arasındaki H etkileşimleri zayıf etkileşimler olduğundan DNA ısıtılınca; nükleotidlerin kovalent bağları bozunmadan hidrojen etkileşimleri kolayca açılır ve DNA'nın çift sarmal yapısı bozunur. Buna denatürasyon denir (Hernandez-Perez vd.'den aktaran Caymaz, 2019).

Uygun şartlarda, bozunmuş DNA, tekrar eski haline gelebilir. Buna da renatürasyon denir (Kuetche'den aktaran Caymaz, 2019). DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu Şekil 1.11.'de sunulmuştur.



Şekil 1.11. DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu (Caymaz, 2019).

Ayrıca, çift sarmal yapıyı bir arada tutan hidrojen etkileşimleri pH 4,0 ile pH 11,0 arasında kararlı bir yapı göstermektedir. Bahsi geçen pH aralığının dışında DNA kararlılığını kaybetmekte ve çift sarmal açılmaktadır (Zhu vd.'den aktaran Caymaz, 2019). Dolayısıyla bu tez çalışması kapsamında incelenmiş DNA-ilaç etken maddesi etkileşimleri için bahsi geçen pH aralığının dışına çıkılmamıştır.

DNA molekülü genetik kodumuzu taşır. DNA molekülünde meydana gelen hasarlar mutajenezise, genomik kararsızlığa ve mutajenezis gen baskılayıcı genlerce onarılamadığında da karsinojenezise neden olmaktadır.

DNA molekülleri çeşitli koşullar altında, özellikle küçük moleküller ile etkileşim yoluyla hasar görmeye yatkındır.

İlaç etken maddelerinin kendilerinin ya da metabolitlerinin DNA-bağlanma ürünleri, ilaca sürekli maruziyette karsinojenezis erken dönem biyogöstergesi olarak davranmaktadır.

Dolayısıyla ilaç etken maddelerin DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi mutajenezis (gen mutasyonları), mutajenezisin gen baskılayıcı genlerce onarılamaması durumunda da karsinojenezis olasılıkları adına önemlidir.

Ayrıca ilaç etken maddelerin mutajenezis risk değerlendirmeleri ileriki dönem gebeliklerden önce fetüste teratojenezise sebebiyet vermemesi adına hekimler tarafından ilaç kullanım sonrası bekleme sürelerinin tayini bakımından da önemlidir.

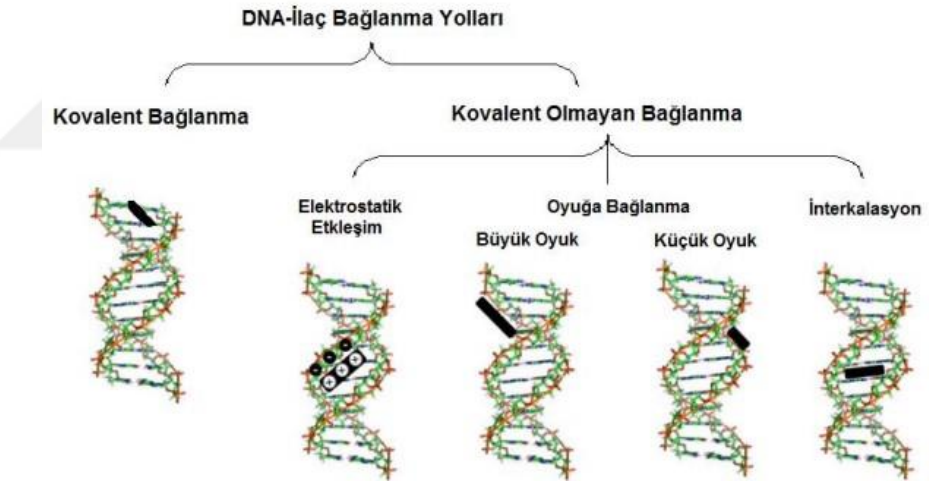
Yine şizofreni ilaçlarının hekim tarafından gebelik boyunca ID kontrollü kullanımı planlanacaksa, ilaç etken maddelerinin DNA etkileşimlerinin risk değerlendirme adına önceden değerlendirilmesi önemlidir.

Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında antipsikotik ilaç etken maddelerinden olanzapin, klozapin ve klorpromazinin DNA ile etkileşimleri çözelti ortamında elektrokimyasal yöntem geliştirme suretiyle incelenmiştir.

DNA-ilaç etken maddeleri üç şekilde etkileşir: 1. İlaç etken maddesi DNA'ya bağlanan proteinler ile etkileşir. 2. İlaç etken maddesi RNA'nın tek veya DNA'nın çift sarmalına bağlanır. 3. Küçük organik moleküller olarak ilaç etken maddesi DNA'nın çift sarmal yapısının boşlukları ile etkileşir (interkalasyon).

Bir başka ifadeyle kovalent bağlanma ile kovalent olmayan etkileşimler küçük moleküllerin DNA ile etkileşimleridir. Kovalent olmayan etkileşimlerden elektrostatik etkileşimde ilaç etken maddesi molekülleri DNA'nın fosfat-şeker omurgası ile etkileşir.

İnterkalasyonda molekül DNA baz çiftleri arasına girer. Ya da oyuğa bağlanmada molekül DNA'daki büyük ve küçük oyuklara bağlanır. Şekil 1.12.'de DNA-ilaç etken maddesi etkileşim yolları verilmiştir. (Strekowski ve Wilson'dan aktaran Caymaz, 2019).



Şekil 1.12. DNA-ilaç etken maddesi etkileşim yolları (Strekowski ve Wilson'dan aktaran Caymaz, 2019).

İnterkalasyon kavramında vurgulanması gereken bir husus aromatik halka içeren düzlemsel organik moleküllerin DNA'ya interkalasyon ile bağlanmasıdır. Dolaysısıyla bu tez kapsamında çalışılmış antipsikotik ilaç etken maddelerinden olanzapin, klozapin ve klorpromazinin trisiklik ilaç etken maddesi grubunda yer almaları, aromatik halka içermeleri, düzlemsel yapıda olmaları, fonsiyonel gruplarının ve yapılarının benzerlik göstermeleri sebebiyle DNA ile interkalasyon ile etkileşmeleri beklenmektedir. Bahsi geçen ilaç etken

maddelerinin DNA ile etkileşimleri K bağlanma sabiti büyüklüğü ve geliştirilen elektroanalitik yöntemde potansiyel kayması ile yorumlanacaktır.

1.15. DNA-İlaç Etken Maddeleri Etkileşimleri İçin Yapılan Voltametrik Çalışmalar

Yapılan literatür araştırmasında antipsikotik ilaç etken maddelerinden olanzapinin, DNA ile etkileşimi voltametrik çalışmasına rastlanmamıştır. Klozapin ve klorpromazinin DNA ile etkileşimleri voltametrik araştırmalarının ise sınırlı olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir:

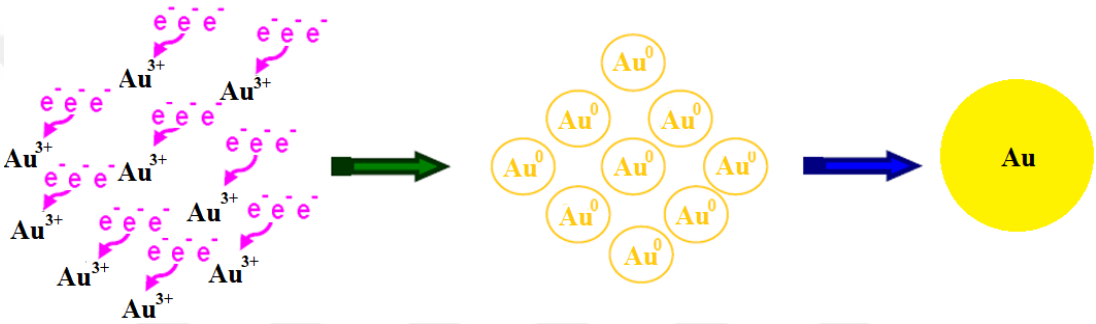
Farhadi vd. (2007) yaptıkları çalışmada, CPE elektrot yüzeyine dsDNA pH 4,3 ABS destek elektrolit ortamında +0,5V'de bir potansiyel uygulayarak ve 3 dk bekleterek elektrokimyasal olarak immobilize etmiştir. Elde edilen dsDNA-CPE elektrot yüzeyinde CLZ elektrokimyasal davranışı incelenmiş ve eser miktarda kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir. dsDNA-CPE elektrot yüzeyinde pH 4,3 asetat (ABS) destek elektrolit ortamında CLZ ortamdayken CV yöntemiyle 180 sn'lik bir bekletme süresi uygulandıktan sonra CLZ'ye ait +0,55V'de bir yükseltgenme piki, geri potansiyel taramasında ise +0,50V'de bir indirgenme piki gözlenmiştir. Elde edilen pik akım şiddetinin, elektrot yüzeyinde dsDNA yokken çok daha küçük olduğu belirtilmiştir. Daha sonra CLZ-dsDNA etkileşimini daha detaylı olarak incelemek amacıyla tuz etkisi çalışması yapılmıştır ve CLZ'nin dsDNA ile hem elektrostatik hem de interkale olarak etkileştiği sonucuna varılmıştır. Bu etkileşimden yararlanılarak diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametrisi (AdsDPV) yöntemi geliştirmek için çeşitli deneysel parametreler (biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi ve pH) optimize edilmiştir. Geliştirilen yöntem ile CLZ tayini için doğrusal çalışma aralığı 0,007 µM − 1,2 µM iken alt tayşn sınırı (LOD) 0,0015 µM olarak hesaplanmıştır. Yöntem ve elektrot, kan serum örneklerine 97,0±2,5% geri kazınım yüzdesiyle başarıyla uygulanmıştır.

Jankowska-Sliwinska vd. (2014) çalışmalarında dsDNA-Au-CPE biyosensörü amperometrik olarak hazırlamışlardır. dsDNA-Au-CPE elektrot ile pH 7,5 PBS destek elektrolit ortamında LSV yönteminde CPZ tayini için 5 µM – 50 µM doğrusal çalışma aralığında gözlenebilme sınırı 0,6 µM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca çalışmanın Au-CPE elektrodun CPZ tayininde dsDNA-Au-CPE elektroda göre seçiciliğinin daha düşük olduğu da vurgulanmıştır.

1.16. PGE Elektrot Modifikasyonunda Kullanılan Nanoparçacıklar

1.16.1. AuNPs Özellikleri

Monometalik nanoparçacıklar ile elektrot yüzey modifikasyonu sonucu voltametrik tayini yapılacak analit için daha duyarlı tayin sonuçları elde edilir. Monometalik nanoparçacıklar, metal tuzunun bir indirgeyici ile bir çözücü varlığında indirgenmesiyle oluşur. Reaksiyonda metal tuzu 2+, 3+ değerlikli bir geçiş metali olabilir (Arslan, 2016). Şekil 1.13'te Au^{3+} iyonlarından Au nanoparçacıkların oluşumu modellenmiştir.



Şekil 1.13. Altın iyonlarının (Au^{3+}) altın atomuna (Au^{0}) indirgenmesiyle altın monometalik nanopartiküllerinin oluşumu.

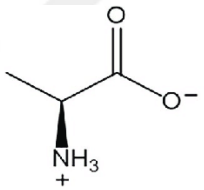
Altın nanoparçacıklar biyonanoteknoloji alanındaki elektrot modifiye çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Altın nanoparçacıkların bir elektrodun modifikasyonunda kullanım amacı; bir analitin varlığını spesifik biçimde saptamak ve analitin derişimini ölçebilecek bir çıktıyı sağlamaktır. Küçük boyutlarından dolayı altın nanoparçacık kullanımı, yapılan çalışmalarda ilgi çekici hale gelmeye başlamıştır. Çünkü altın nanoparçacıkların yüzey kimyası; nanosensör, biosensör, katalizör, nanoalgılayıcı ve nanoelektrokimya gibi çalışma alalarında çok önemli bir yere sahiptir. Altın nanoparçacıklar, yüksek biyouyumluluk, yüksek iletkenlik ve yüksek yüzey/hacim oranı gibi özellikleri nedeniyle elektroanalitik kimya alanında, uygulamada tercih sebebidir (Arslan, 2016).

Au nanoparçacıkların PGE elektrot modifikasyonunda kullanımı elektrot aktif yüzey alanını artırır, kütle aktarımını artırır, gözlenebilme sınırını düşürür, cihaz gürültüsünü bastırarak daha iyi sinyal alınmasını sağlar (Obollino vd.'den, Gong vd.'den, Abollino vd.'den aktaran Bernalte vd., 2012).

Bu tez çalışmasında OLA'nın ve CPZ'nin voltametrik tayini için, PGE yüzeyinde L-Alanin elektropolimerizasyonu ile eş zamanlı AuNPs'ların indirgenmesi ile elektrot modifikasyonu yapılmıştır. L-Alanin elektropolimerizasyonu ile eş zamanlı AuNPs'ların indirgenmesi sonrası, polimer yüzeye homojen dağılım sağlayan Au, duyarlılığı daha yüksek bir elektrot modifikasyonu eldesi sağlamıştır. CLZ'nin voltametrik tayini için ise, PGE yüzeyinde kafeik asit elektropolimerizasyonu ile eş zamanlı AuNPs'ların indirgenmesi ile elektrot modifikasyonu yapılmıştır. Kafeik asit elektropolimerizasyonu ile eş zamanlı AuNPs'ların indirgenmesi sonrası, polimer yüzeye homojen dağılım sağlayan Au, duyarlılığı daha yüksek bir elektrot modifikasyonu eldesi sağlamıştır.

1.16.2. L-Alaninin Özellikleri

Aminoasitler amin ve karboksil grubu içerirler, polimerleşerek proteinleri oluştururlar. Doğada 20 çeşit aminoasit vardır. Bu aminoasitlerden biri de alanindir. Alanin (Ala) ($HO_2CCH(NH_2)CH_3$), 2-aminopropanoik asit, olarak adlandırılır. Alaninin D- ve L-Alanin olmak üzere iki enantiyomeri vardır (Laerdahl vd., 2000). Mevcut çalışmada elektrot modifikasyonunda L-alanin kullanılmıştır. L-Alaninin yapısı Şekil 1.14'te gösterilmiştir (Parthasarathy vd., 2019).



Şekil 1.14. L-Alaninin yapısı (Parthasarathy vd., 2019).

Aminoasitler voltametrik yöntemlerle polimeleşebilmektedir. Polimerler ya da inorganik ligandlar ya da metaller elektrot modifikasyonlarında kullanılan maddelerdir (Arslan, 2016). Elektrodun yüzey modifikasyonunda fiziksel tekniklerden biri elektrot yüzeyinde potansiyel uygulanarak aktif bölgelerin oluşturulması ya da rekristalizasyondur. Bir başka teknik ise fiziksel adsorpsiyondur. Ancak adsorpsiyon zayıftır ve elektrodun kararlılığına negatif etkisi vardır. Dolayısıyla elektrot modifikasyonunda fiziksel teknikler pek tercih edilmez (Barendrecht'den aktaran Arslan, 2016).

Kimyasal yöntemlerle elektrot modifikasyonları ise; bağlayıcı ile modifierin elektrot yüzeyine kovalent bağla bağlanması (Netzer & Sagiv'den aktaran Arslan, 2016; Watkins vd.'den aktaran Arslan, 2016), modifierin elektrot yüzeyine damlatılması (Diab vd.'den aktaran Arslan, 2016), modifierin içerisine daldırılan elektrot arayüzeyinde adsorpsiyonla film

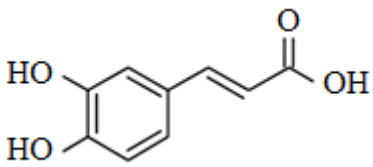
tabaka oluşması (Deng vd.'den aktaran Arslan, 2016), kompozite modifierin emdirilmesi (CPE elektrot örneği) (Chen & Zhou'dan aktaran Arslan, 2016) ve modifierin, çözücünün elektrot yüzeyine damlatıldıktan sonra merkez kaç kuvvetiyle döndürülerek buharlaştırılması (Pyun & Bae'den aktaran Arslan, 2016) şeklindedir.

Elektropolimerizasyonda ise, çalışma elektrodunun, karşıt elektrodun ve referans elektrodun olduğu üç elektrotlu bir hücrede monomer, destek elektrolit ortamında, elektrot yüzeyinde polimerleşmektedir. Polimerleşme sürecinde, başlama basamağı doğrudan veya dolaylı olabilir. Polimerleşmeyi başlatacak reaktifler elektrot yüzeyinde reaksiyonlarla oluşur (Arslan, 2016). Çoklu CV, kronoamperometri ve kronopotansiyometri elektropolimerizasyonda kullanılan tekniklerdir. Bu tez çalışmasında PGE elektrot yüzeyi çoklu CV yönteminde L-Ala elektropolimerizasyonu ile modifiye edilmiştir.

PGE yüzeyinin L-alanin elektropolimerizasyonu ile polimeri şeklinde modifiye edilmesi organik bileşiklerin tayininde daha düşük gözlenebilme sınırı, daha geniş bir potansiyel çalışma aralığı, yüksek seçicilik, yüksek duyarlık ve yüksek güvenirlik sağlar (Purushothama vd., 2018). Literatürde L-alanin ile modifiye edilmiş PGE elektrot, trisiklik ilaç etken maddesinin yükseltgenmesi için yüksek elektrokatalitik aktivite göstermiştir (Purushothama vd., 2018).

1.16.3. Kafeik Asitin Özellikleri

Kafeik asit, 3,4-dihidroksi sinnamik asit, yaygın ve doğal bir fenoldür. Kafeik asit bitkilerde oldukça yaygın olarak bulunur. Birçok sebzenin tohumunda, meyvesinde, yumrusunda ve otsu kısmında bulunur (Nardini vd.'den aktaran Ren vd., 2006). Kafeik asitin kimyasal yapısı Şekil 1.15'te gösterilmiştir (Cizmarova vd., 2020).



Şekil 1.15. Kafeik asitin yapısı (Cizmarova vd., 2020).

Kafeik asit fenil ester (KAFE), eksojen olarak kullanılan bir antioksidandır. KAFE, bal arılarınca toplanan kuvvetli antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidan ve antineoplastik özellikleri olan propolislerin aktif bileşenidir. Ayrıca, KAFE'nin serbest haldeki radikalleri

süpüren ve antioksidan enzimleri aktive eden ajan özelliği de gösterilmiştir (Ozyurt vd.; Ozer vd.'den aktaran Parlakpınar vd., 2012).

Kafeik asit ile elektrot modifikasyonu organik ve doymamış bileşiklerin elektrot yüzeyinde tutunması suretiyle nitelikli bir elektrokataliz süreci sağlar. Elektrot yüzeyinin çabuk bozulmasını, dökülmesini engeller. Elektrot yüzeyinde öngörülen tepkimenin gerçekleşmesini sağlar, istenmeyen tepkimeleri engeller (Don vd., Oyama ve Anson, Hu vd.'den aktaran Ren vd., 2006).

Kafeik asidin elektopolimerizasyon ile PGE yüzeyde polikafeik asit modifikasyonu sonucunda, tayin edilecek analitin elektrot yüzeyinde yükseltgenmesinin kolaylaştırılması söz konusu olduğu literatürde belirtilmektedir (Ren vd., 2006).

1.17. Çalışmanın Amaçları

- Elektrot yüzey alanını artırmak suretiyle antipsikotik ilaç etken maddeleri için tayin sınırlarını iyileştirmek için PGE elektrot yüzeyi nanoparçacıklarla modifiye edilecektir.

- Modifiye edilen PGE elektrotların yüzeylerinin morfolojisi FE-SEM ve EDX ile incelenecektir. Elektrotların elektrokimyasal performansı ise CV ile incelenecektir. Elektrotların aktif yüzey dirençleri ile EIS ile incelenecektir.

- Klasik elektrotlar; camsı karbon elektrot (GCE), karbon pasta elektrot (CPE), prolitik grafit vb. yerine tek kullanımlık, küçültülebilir, pratik, diğer elektrotlara göre tekrarlanabilir sonuçlar veren, küçük hacimlerle çalışma imkânı sunan, sensör teknolojisine uygun olan ve ucuz olan PGE kalem grafit karbon elektrot modifikasyonlarıyla bütün süreçler yürütülecektir.

- Nanoparçacıklarla modifiye edilen PGE elektrotların optimum çalışma koşulları belirlenecektir (modifikasyon bileşimleri, pH, çalışma potansiyeli).

- Optimizasyon koşulları belirlenen modifiye edilmiş PGE elektrotların yüzeyinde antipsikotik ilaç etken maddelerinden olanzapin, klozapin ve klorpromazin tayini için voltametrik yöntemler geliştirilecektir.

- Bahsi geçen ilaç etken maddeleri için modifiye edilmiş PGE elektrotların analitik performansı tespit edilecektir (gözlenebilme sınırı, doğrusal çalışma aralığı).

- Modifiye edilen PGE elektrotların pik akımlarının ve pik potansiyellerini tekrar edilebilirliği ve tekrar üretilebilirliği çalışılacaktır.

- Modifiye edilen PGE elektrotların antipsikotik ilaç etken maddeleri olanzapin, klozapin, klorpromazinin uygulaması ticari ilaç örneklerinden, sentetik serum örneklerinden ve idrardan gerçekleştirilecektir.

- Modifiye edilen PGE elektrotlar ile antipsikotik ilaç etken maddeleri olanzapin, klozapin ve korpromazinde tayininde insan vücudunda doğal olarak bulunan iyonlar ve bahsi geçen ilaç etken maddeleri ile birlikte reçete edilebilen asetaminofen, fluoksetin ve ketiapin gibi ilaç etken maddeleri ile girişim çalışmaları yapılacaktır.

- Söz konusu ilaç etken maddelerinin dsDNA ile etkileşimleri voltametrik yöntemlerle ilaç etken maddelerinin yükseltgenme sinyallerinden incelenecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıktadır. Olanzapin, klozapin, klorpromazin, fosforik asit, asetik asit, borik asit, metanol, kloroaurik asit ($HAuCl_4$), L-alanin ve kafeik asit Sigma Aldrich'den satın alınmıştır.

0,12 M Britton-Robinson (BR) destek elektrolit çözeltisi, 3,708 g borik asit, 3,45 mL asetik asit ile %85'lik 4,05 mL fosforik asitten hazırlanmıştır. Söz konusu kimyasallar saf suda çözünüp 500 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Katı borik asit ayrıca çözünüp ilave edilmiştir. BR destek elektrolit çözeltisi pH 1,81−11,98 arası kullanılabilirdir. BR destek elektrolit çözeltisinin pH ayarlamaları seyreltik HCl ve seyreltik NaOH ilavesi ile yapılmıştır.

0,05M fosfat (PBS) destek elektrolit çözeltisi, 2,999 g NaH_2PO_4 ve 3,54 g Na_2HPO_4 ile distile suda toplam çözelti hacmi 500 mL olacak biçimde pH 7,01'de hazırlanmıştır. PBS destek elektrolit çözeltisinin pH ayarlamaları seyreltik HCl ve seyreltik NaOH ilavesi ile yapılmıştır.

Redoks prob için $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisi 0,823 g katının bir miktar distile suda çözünmesiyle toplam hacmin 250 mL'ye tamamlanmasıyla $1{,}0\times10^{-2}$ M çözeltisi biçiminde hazırlanmıştır. $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi 1,056 g $K_4[Fe(CN)_6]$ katının bir miktar distile suda çözünmesiyle toplam hacmin 250 mL'ye tamamlanmasıyla $1{,}0\times10^{-2}$ M çözeltisi biçiminde hazırlanmıştır.

1,0M asetat (ABS) destek elektrolit çözeltisi, belli miktar distile su içeren behere 5,0 mL derişik asetik asit çözeltisi ilavesinin ardından 5 adet NaOH paleti atılarak pH 4,8 olduğunda çözelti toplam hacmi 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. ABS destek elektrolit çözeltisinin pH ayarlamaları seyreltik HCl ve seyreltik NaOH ilavesi ile yapılmıştır.

NaOH çözeltisi 0,4 g NaOH katısının bir miktar distile suda çözünüp 100 mL'ye tamamlanmasıyla 0,1 M çözeltisi şeklinde hazırlanmıştır. HCl çözeltisi kütlece yüzdesi %37,

yoğunluğu 1,2 gmL^{-1} olan derişik hidroklorik asit çözeltisinden 1,2 mL alınarak bir miktar distile suda çözünüp 100 mL'ye tamamlanarak 0,1 M çözeltisi şeklinde hazırlanmıştır. 0,5M H_2SO_4 çözeltisi, yoğunluğu 1,98 gmL^{-} ve kütlece yüzdesi %98 olan derişik H_2SO_4 çözeltisinden 1,5 mL alınıp toplam hacim 50,00 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

0,01 M OLA stok çözeltisi 15,60 mg olanzapinin 5,00 mL metanolde çözünmesiyle hazırlanmıştır. 0,01 M CLZ stok çözeltisi 16,34 mg klozapinin 5,00 mL metanolde çözünmesiyle hazırlanmıştır. 0,01 M CPZ stok çözeltisi 17,80 mg klorpromazin hidrojen klorürün 5,00 mL metanolde çözünmesiyle hazırlanmıştır. OLA, CLZ ve CPZ stok çözeltileri +4 ^{0}C'de saklanmıştır. Bütün pH ayarlamaları HANNA (ABD) marka pHmetre ile yapılmıştır.

PGE elektrot modifikasyonlarında kullanılan çözeltilerden aurik asit ($HAuCl_4$) çözeltisi 19,60 mg katının 5,00 mL distile suya tamamlanmasıyla $1,0\times10^{-2}$ M çözeltisi şeklinde hazırlanmıştır. L-alanin çözeltisi 4,5 mg katının 5,00 mL distile suya tamamlanmasıyla $1,0\times10^{-2}$ M çözeltisi şeklinde hazırlanmıştır. Kafeik asit çözeltisi ise 9,00 mg katının 5,00 mL metanole tamamlanmasıyla $1,0\times10^{-2}$ M çözeltisi şeklinde hazırlanmıştır.

Girişim çalışmalarında kullanılan Na_3PO_4 çözeltisi, KCl çözeltisi, askorbikasit çözeltisi, ürik asit çözeltisi, glikoz çözeltisi, glisin çözeltisi, $CaSO_4$ çözeltisi ve $MgSO_4$ çözeltisi belirlenen miktarlarının 50 mL distile suda çözünmesiyle ayrı ayrı $1,0\times10^{-2}$ M çözeltileri şeklinde hazırlanmıştır. Asetaminofen (APAP) Sigma Aldrich saflığında katısından $1,0\times10^{-3}$ M APAP'a karşılık gelen katı metanolde 30 dakika ultrasonik banyoda çözünerek 5,00 mL çözeltisi olacak biçimde hazırlanmıştır. Tablet başına 20,0 mg fluoksetin (Flx) içeren beş tablet öğütülmüş ve karıştırılmıştır. Toz haline getirilmiş katıdan $1,0\times10^{-3}$ M Flx'e karşılık gelen katı metanolde 30 dakika ultrasonik banyoda çözünerek 50 mL çözeltisi olacak biçimde hazırlanmıştır. Tablet başına 25,0 mg ketiapin (QTP) içeren beş tablet öğütülmüş ve karıştırılmıştır. Toz haline getirilmiş katıdan $1,0\times10^{-3}$ M QTP'ye karşılık gelen katı metanolde 30 dakika ultrasonik banyoda çözünerek 50 mL çözeltisi olacak biçimde hazırlanmıştır.

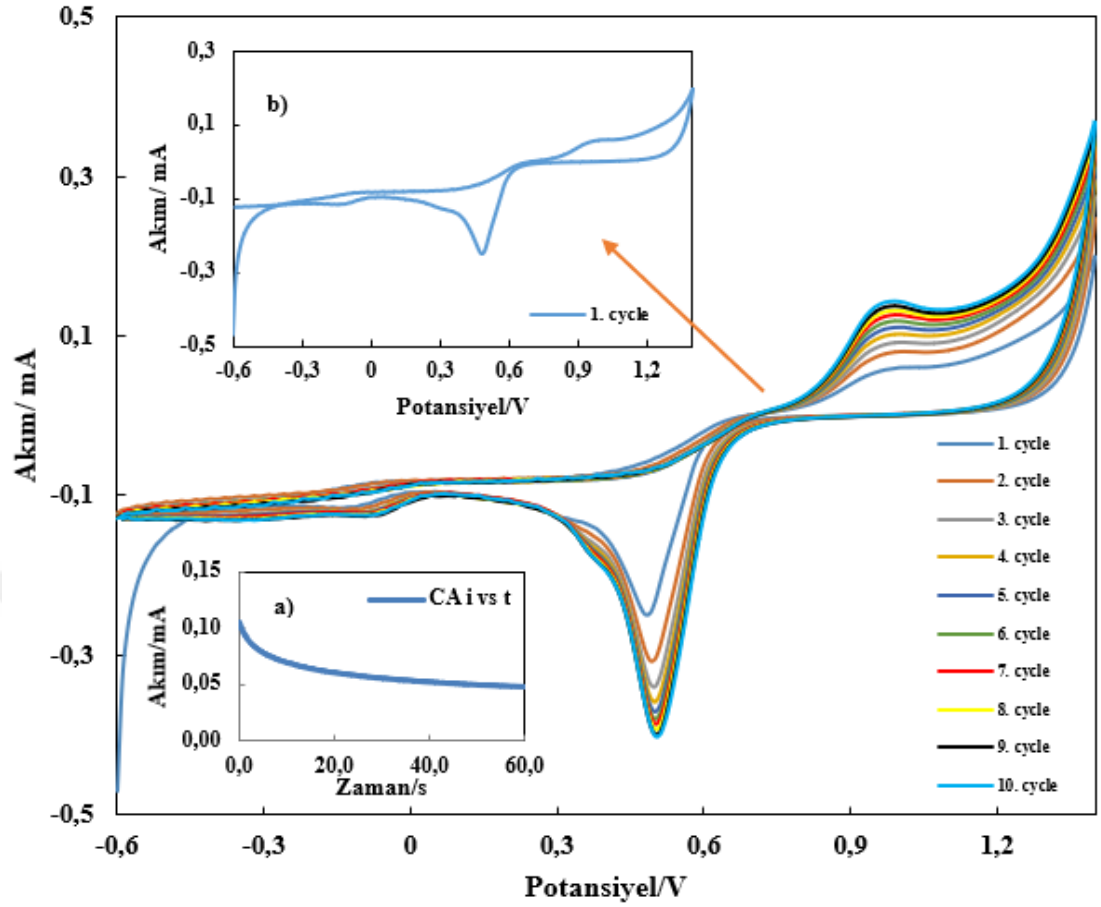
Bütün çalışmalarda dsDNA kullanılmıştır. 1000 ppm dsDNA tozundan 5,0mg dsDNA'nın 5 mL distile suda çözünmesiyle hazırlanmıştır. Bahsi geçen katı miktar öncelikle 2,5 mL'ye distile su ile tamamlanıp 1 gece +4 ^{0}C'de saklanılıp kararlılığı sağlanmıştır. Ertesi gün çözelti 5 mL'ye tamamlanıp +20 ^{0}C'de saklanmıştır. Farklı derişimlerdeki dsDNA'lar oda sıcaklığına getirilip vortexlenen bahsi geçen stok çözeltiden hazırlanmıştır.

2.2. Çalışma Elektrodu ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan ve çalışma elektrotları olarak modifiye edilen 0,7 mm 2B Faber Castel kalem grafit elektrotlar Ankara'da bir kırtasiyeden satın alınmıştır. Bütün elektrokimyasal ölçümler, dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopi (EIS), PSTrace 5.9 yazılımlı palmSens4 potansiyostat/galvanostat (Hollanda) kullanılarak yapılmıştır. Referans elektrodun Ag/AgCl (BASi MF-2078) olduğu, karşıt elektrodun Pt tel (BASi MW-1032) olduğu BAS C3 hücre standlı üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Modifiye kalem grafit elektrotların FE-SEM görüntülemeleri için 20 keV elektron vakum voltajlı (FE-SEM) Quanta FEG 250 model (Hollanda) kullanılmıştır.

2.3. AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE Elektrodun Modifikasyonu

OLA tayini için AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrodun modifikasyonu iki aşamadan oluşmaktadır. Yalın kalem grafit elektrot (PGE) pH 4,5 BR destek elektrolit ortamında +1,4 V değerinde 60 s süreyle kronoamperometri yöntemiyle ön muamele edilmiş, böylece elektrodun yüzeyinin daha aktif hale getirilmesi sağlanmıştır. Daha sonra ön muamele edilmiş elektrot (pre-PGE) pH 7,0, 0,05 M PBS destek elektrolit ortamında, 1,5 mM L-Ala ve 0,5 mM $HAuCl_4$ ile eş zamanlı olarak, (-0,6) V – (+1,4) V potansiyel aralığında, 0,05 V/s tarama hızında dönüşümlü voltametri (CV) ile 10 döngülü bir süreçte kaplanmıştır. PGE elektrodun kronoamperometri ile ön muamale edilmesi Şekil 2.1.a.'da, daha sonra eş zamanlı olarak L-Ala ve $HAuCl_4$ ile 10 döngülü CV ile kaplama Şekil 2.1.'de, bir dönüşümlü voltamogram ise Şekil 2.1.b'de görülmektedir. 0,6V'deki yükseltgenme piki L-Ala'nın yükseltgenmesine, 1,0V'deki yükseltgenme piki ile 0,5V'deki indirgenme piki Au'nun yükseltgenme ve indirgenmesine karşılık gelmektedir (Hariska vd., 2019; Hezard vd., 2012).

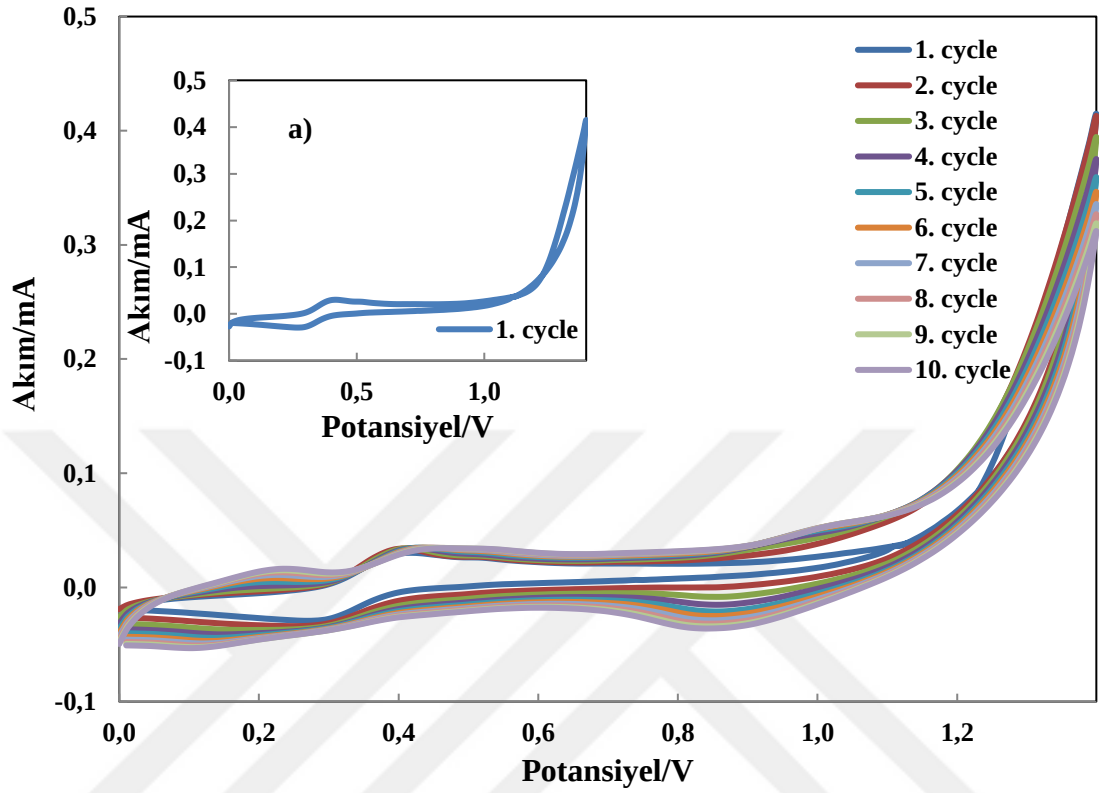


Şekil 2.1. pre-PGE elektrodun $HAuCl_4$ ve L-Ala ile pH 7,0 PBS destek elektrolit ortamında 10 döngülü CV ile eş zamanlı olarak kaplanması süreci. İç grafikler: a) Kronoamperometri ile +1,4 V potansiyel ve 60 s süreyle pH 4,5 BR destek elektrolitte PGE'nin ön muamele edilmesi. b) eş zamanlı olarak kaplanma sürecinden CV yönteminde bir döngülü voltamogram.

2.4. AuNPs-polyCA-PGE Elektrodun Modifikasyonu

CLZ tayini için AuNPs-polyCA-PGE elektrodun modifikasyonu pH 4,0, 0,05 M PBS destek elektrolit ortamında, 0,3 mM CA ve 0,1 mM $HAuCl_4$ ile eş zamanlı olarak, (0,0) V – (+1,4) V potansiyel aralığında, 0,05 V/s tarama hızında dönüşümlü voltametri (CV) ile 10 döngülü bir süreçte eş zamanlı olarak kaplanmıştır. Şekil 2.2.'de PGE elektrodun eş zamanlı olarak CA ve $HAuCl_4$ ile 10 döngülü CV ile kaplanması, Şekil 2.2.a.'da ise bir dönüşümlü voltamogram görülmektedir. +0,4V'deki yükseltgenme piki CA'nın yükseltgenmesine,

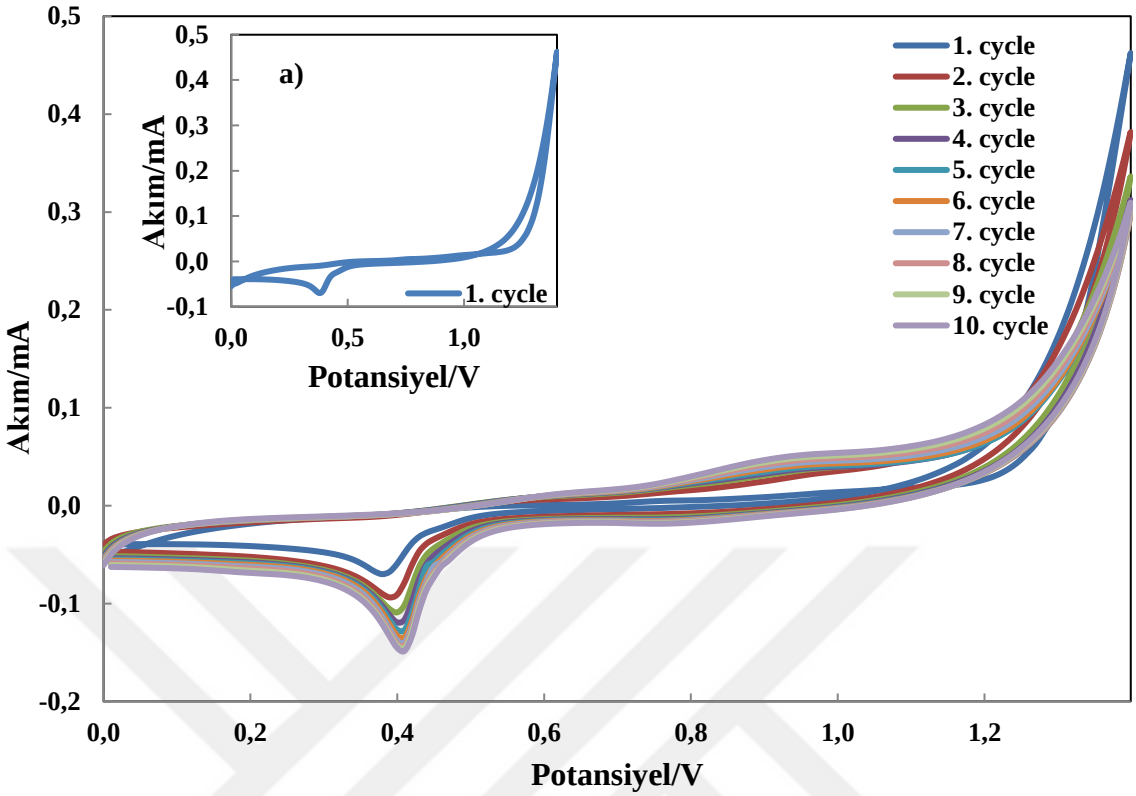
+1,0V'deki yükseltgenme piki ile +0,7V'deki indirgenme piki Au'nun yükseltgenme ve indirgenmesine karşılık gelmektedir (Li, vd., 2016; Hezard vd., 2012).



Şekil 2.2. PGE elektrodun $HAuCl_4$ ve CA ile pH 4,0 PBS destek elektrolit ortamında 10 döngülü CV ile eş zamanlı olarak kaplanması süreci. İç grafik: a) eş zamanlı olarak kaplanma sürecinden CV yönteminde bir döngülü voltamogram.

2.5. AuNPs-poly(L-Ala)-PGE Elektrodun Modifikasyonu

CPZ tayini için AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrodun modifikasyonu pH 7,0, 0,05 M PBS destek elektrolit ortamında, 0,5 mM L-Alanin ve 0,3 mM $HAuCl_4$ ile eş zamanlı olarak, (0,0) V – (+1,4) V potansiyel aralığında, 0,05 V/s tarama hızında dönüşümlü voltametri (CV) ile 10 döngülü bir süreçte eş zamanlı olarak kaplanmıştır. Şekil 2.3.'te PGE elektrodun eş zamanlı olarak L-Ala ve $HAuCl_4$ ile 10 döngülü CV ile kaplanması, Şekil 2.3.a.'da ise bir dönüşümlü voltamogram görülmektedir. +0,6V'deki yükseltgenme piki L-Ala'nın yükseltgenmesine, 1.0V'deki yükseltgenme piki ile 0,4V'deki indirgenme piki Au'nun yükseltgenme ve indirgenmesine karşılık gelmektedir (Hariska vd., 2019; Hezard vd., 2012).



Şekil 2.3. PGE elektrodun $HAuCl_4$ ve L-Ala ile pH 7,0 PBS destek elektrolit ortamında 10 döngülü CV ile eş zamanlı olarak kaplanması süreci. İç grafik: a) eş zamanlı olarak kaplanma sürecinden CV yönteminde bir döngülü voltamogram.

2.6. Ticari İlaç Örneklerinin Hazırlanması

Tablet başına 2,5 mg OLA içeren beş tablet öğütülmüş ve karıştırılmıştır. Toz haline getirilmiş katıdan $1{,}0\times10^{-3}$ M OLA'ya karşılık gelen katı metanolde 30 dakika ultrasonik banyoda çözünerek 50 mL çözeltisi olacak biçimde hazırlanmıştır.

Tablet başına 25,0 mg CLZ içeren beş tablet öğütülmüş ve karıştırılmıştır. Toz haline getirilmiş katıdan $1{,}0\times10^{-3}$ M CLZ'ye karşılık gelen katı metanolde 30 dakika ultrasonik banyoda çözünerek 50 mL çözeltisi olacak biçimde hazırlanmıştır.

Tablet başına 100,0 mg CPZ içeren beş tablet öğütülmüş ve karıştırılmıştır. Toz haline getirilmiş katıdan $1{,}0\times10^{-3}$ M CPZ'ye karşılık gelen katı metanolde 30 dakika ultrasonik banyoda çözünerek 50 mL çözeltisi olacak biçimde hazırlanmıştır.

DPV analizler için bu stok çözeltilerden distile su ile seyreltme yapılmıştır. Voltamogramlar DPV metodunda optimum parametrelerle kaydedilmiştir (step potansiyel: 0,01 V, pulse potansiyel: 0,2 V, pulse zamanı, 0,02 s, tarama hızı: 0,1 V/s), böylece kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen regresyon parametreleri tablet bileşimini tayin etmede kullanılmıştır.

2.7. Sentetik Kan Serum ve İdrar Numunelerinin Hazırlanması

Kan serum örneği Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır ve -20 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir. Serum stok çözeltisi asetonitril ile çöktürme ile hazırlanmıştır, ultrasonik banyoda çözünmüş serum 2500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Geri kazanım çalışmaları seruma hesaplanan miktar OLA, CLZ ve CPZ'nin ayrı ilaveleri ile yürütülmüştür.

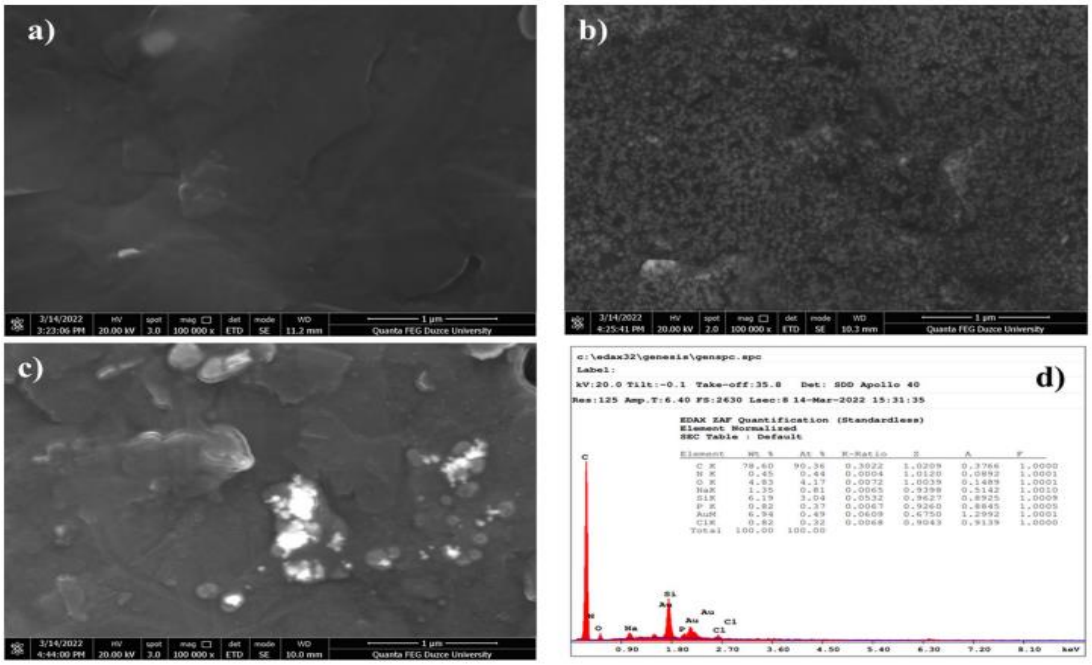
İdrar örneği ise laboratuvarda alınmış, ön muamelesiz, geri kazanım çalışmaları için idrara hesaplanan miktar OLA, CLZ ve CPZ'nin ayrı ilaveleri ile kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. OLA ile Yapılan Voltametrik Çalışmalar

3.1.1. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojileri

PGE elektrotların poly(L-Ala) ve Au nanoparçacıklarla modifikasyonu Bölüm 2.3'te ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan pre-PGE, poly(L-Ala)/pre-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrotların yüzey morfolojileri için yüzey FE-SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.1.). Şekil 3.1.a.'da görüldüğü üzere pre-PGE yüzeyi grafit tabakalardan oluşmaktadır. Şekil 3.1.b.'de L-alaninin elektropolimerizasyonu sonrası yüzeyin değiştiği görülmüştür. Şekil 3.1.c.'de ise poly(L-Ala) yüzeyde Au nanoparçacıkların varlığı görülmektedir. Ayrıca, Şekil 3.1.d.'de AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot için EDX spektrumunda Au piklerinin olması, yüzeyde Au varlığını; N ve O piklerinin olması da yüzeyde poly(L-Ala) varlığını destekler niteliktedir.

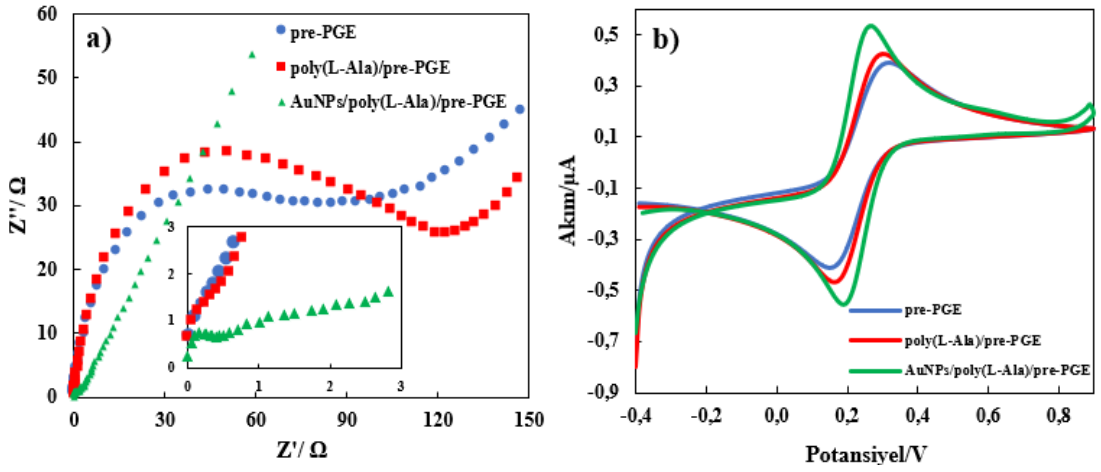


Şekil 3.1. a) pre-PGE, b) poly(L-Ala)/pre-PGE, c) AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE FE-SEM görüntüleri d) AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE için EDX spektrumu.

3.1.2. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Modifiye elektrotların (pre-PGE, poly(L-Ala)/pre-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE) elektrokimyasal karakterizasyonları iki farklı yöntemle incelenmiştir. Bunlardan biri elektrokimyasal empedans spektroskopisidir. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, aktif elektrot yüzeylerinin elektriksel yük direncinin belirlenmesinde etkili bir yöntemdir. Bu amaçla pre-PGE, poly(L-Ala)/pre-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE modifiye elektrotlar için 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob ile Nyquist diyagramları elde edilmiştir. Şekil 3.2.a.'da görüldüğü üzere Nyquist eğrilerinde yarı çap azaldıkça elektrot yüzey direnci düşmekte ve yüzeyde elektron aktarım hızı artmaktadır. (Wang vd., 2021). Elektrodun yük transfer direnci (R_{ct}) Nyquist eğrisinin başlangıç ve bitiş eğrisi arasındaki direnç farkından hesaplanmaktadır (Fitoz, 2021). Şekil 3.2.a.'ya göre R_{ct} değerleri pre-PGE elektrot için 90 Ω, poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot için 120 Ω ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot için 0,8 Ω değerindedir. Buna göre, AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrodun diğer elektrotlara göre yüzey elektriksel iletkenliğinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

Şekil 3.2.b.'de ise 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probda 0.05 V/s tarama hızında (-0,4)−(+0,9)−(-0,4) V potansiyel aralığında pre-PGE, poly(L-Ala)/pre-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE modifiye elektrotlar için dönüşümlü voltamogramlar verilmiştir. Şekil 3.2.b.'de görüldüğü üzere; $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks proba ait yükseltgenme ve indirgenme piklerin akımı AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot yüzeyinde diğer elektrotlara göre artmakta, anodik pik potansiyeli ile katodik pik potansiyelin arasındaki fark (ΔE_p) değeri pre-PGE elektrot için +0,06V; poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot için +0,04V ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot için ise +0,02V olarak küçülmektedir. Elde edilen sonuçlar; AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot yüzeyinde elektron aktarımının hızlı ve kolay olduğunu göstermektedir (Tüzün vd., 2023).



Şekil 3.2. a) Nyquist eğrileri b) 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob için υ: 0,05 V/s tarama hızında CV voltamogramlar.

Aynı zamanda modifiye elektrotların yüzey alanları arasında fark olup olmadığı CV yöntemiyle (0,005, 0,015, 0,025, 0,035, 0,050, 0,060, 0,075, 0,090, 0,100) V/s tarama hızı aralığında 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probuyla incelenmiştir. pre-PGE, poly(L-Ala)/pre-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE modifiye elektrotların yüzey alanları klasik Randles-Sevcik eşitliği (1) kullanılarak hesaplanmıştır (Heineman ve Kissinger, 1980).

$$i_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 \upsilon^{1/2} \qquad (1)$$

Burada n redoks sürecinde transfer edilen elektron sayısını göstermektedir. Elektrodun elektroaktif yüzey alanı cm^2 birimindendir ve A ile gösterilmiştir. Elektrot yüzey alanı redoks prob içerisinde hesaplandığından C_0 redoks probun derişimidir. D_0 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ için difüzyon katsayısıdır ve $7{,}6\times10^{-6}$ cm^2/s'dir. υ tarama hızıdır ve birimi V/s'dir.

Elektrot yüzey alanları $ip - \upsilon^{1/2}$ grafiklerinin çizilmesiyle hesaplanmıştır (Erdinç, 2019).

0,399 (±0,015) cm^2, pre-PGE
0,473 (±0,060) cm^2, poly(L-Ala)/pre-PGE
0,563 (±0,065) cm^2, AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE

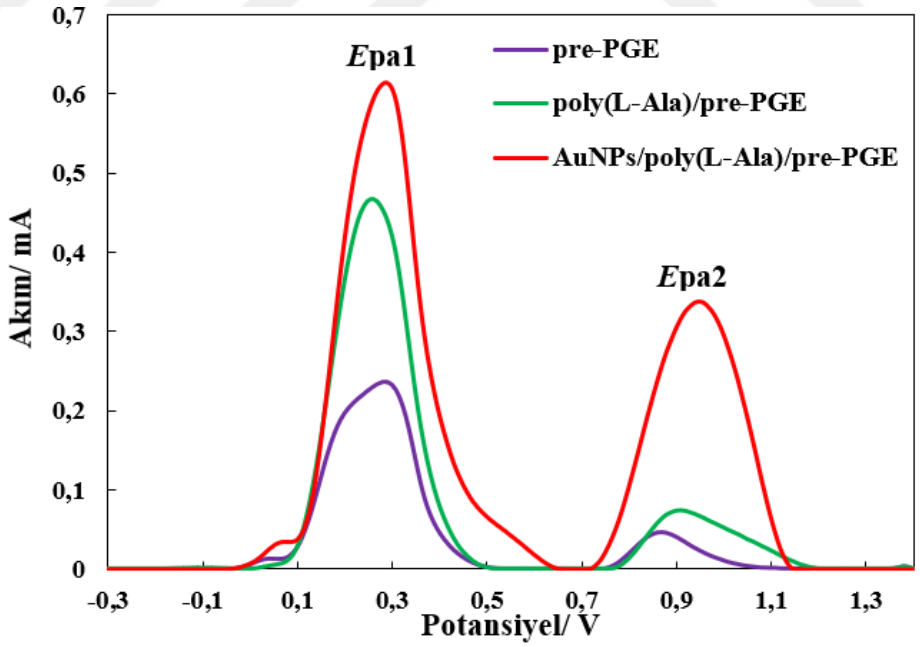
Burada görüldüğü üzere, AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrodun yüzey alanı pre-PGE'nin yüzey alanından 1,41 kat daha yüksek olduğu görülmektedir.

Daha sonra, 0,50 mM OLA'nın yükseltgenmesi, hazırlanan modifiye elektrotların (pre-PGE, poly(L-Ala)/pre-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE) yüzeyinde Britton-Robinson (BR) destek elektrolit ortamında (pH 4,5) (-0,3) − (+1,4) V potansiyel aralığında DPV yönteminde incelenmiştir. (Şekil 3.3.)

Şekil 3.3.'te görüldüğü üzere olanzapinin bütün elektrotların yüzeyinde iki yükseltgenme piki gözlenmiştir. pre-PGE elektrot kullanıldığında OLA'nın birinci yükseltgenme piki 0,290 V'de 0,237 mA, ikinci yükseltgenme piki 0,869 V'de 0,046 mA'dır. poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot kullanıldığında OLA'nın birinci yükseltgenme piki 0,260 V'de 0,467 mA, ikinci yükseltgenme piki 0,909 V'de 0,074 mA'dır. AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot kullanıldığında ise OLA'nın birinci yükseltgenme piki 0,290 V'de 0,615 mA, ikinci yükseltgenme piki 0,949 V'de 0,338 mA'dır.

Sonuç olarak; AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot pre-PGE elektrot ile karşılaştırıldığında birinci pik için yükseltgenme pik akımı 2,59 kat, ikinci pik için ise yükseltgenme pik akımı 7,35 kat artmıştır.

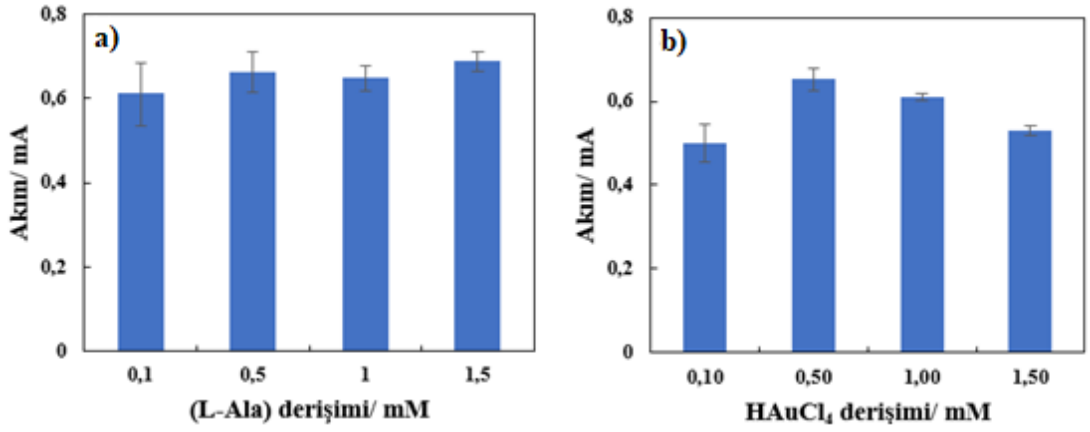
OLA'ya ait birinci yükseltgenme pik potansiyeli ve pik akımı göz önüne alınarak optimizasyon çalışmaları birinci pik üzerinden gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. 0,50 mM OLA'nın farklı modifiye elektrotlardaki DPV voltamogramları (pH 4,5 BR destek elektrolit ortamı, step potansiyel: 0,01 V, pulse potansiyel: 0,2 V, pulse zamanı: 0,02 s, tarama hızı: 0,1 V/s).

3.1.3. Modifiye Elektrodun Bileşiminin Belirlenmesi

OLA'nın birinci yükseltgenme pik sinyali temel alınarak OLA tayini için $HAuCl_4$ ve L-Ala derişimleri optimize edilmiştir. Bu amaçla önce pH 4,5 BR destek elektrolit ortamında +1,4 V potansiyelde 60 s süreyle kronoamperometri yöntemiyle PGE yüzeyleri ön muamele edilmiştir. pre-PGE elektrotların yüzeyinde $HAuCl_4$ derişimi 1,0 mM da sabit tutularak L-Ala derişimleri 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 mM aralığında değiştirilerek elektropolimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan elektrotlar ile OLA'nın DPV voltamogramları alınmıştır. Her bir derişim için elde edilen DPV pik akımları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.4.a). Şekil 3.4.a.'da görüldüğü üzere L-Alaninin derişiminin artmasıyla pik akımlarında büyük bir artış gözlenmemekle birlikte en yüksek pik akımının ve en simetrik pik şeklinin gözlendiği derişim olan 1,5 mM L-Ala optimize derişim olarak alınmıştır. Daha sonra L-Ala derişimi 1,5 mM'da sabit tutularak $HAuCl_4$ derişimleri (0,1, 0,5, 1,0, 1,5) mM aralığında değiştirilmiştir (Şekil 3.4.b.). Şekil 3.4.b.'de görüldüğü gibi, 0,5 mM $HAuCl_4$ derişimine kadar pik akımı artmakta, sonrasında ise azalmaktadır, dolayısıyla en yüksek pik akımının elde edildiği derişim olan 0,5 mM $HAuCl_4$ optimize derişim olarak belirlenmiştir.



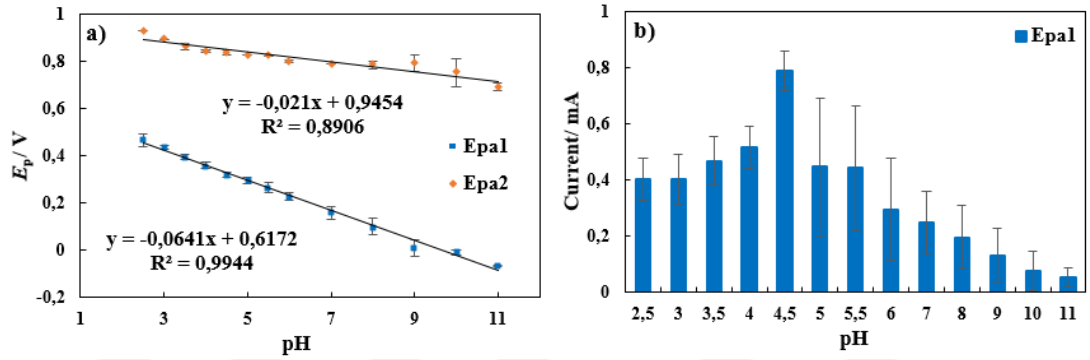
Şekil 3.4. 0,50 mM OLA pik akımlarına a) L-Ala derişiminin etkisi b) $HAuCl_4$ derişiminin etkisi (0,1 M BR destek elektrolit ortamı pH 4,5).

3.1.4. pH Etkisi

Organik moleküllerin yükseltgenmesi-indirgenmesi esnasında proton yer aldığı için voltametrik yöntemlerde pH etkisi önemlidir. Bu nedenle, OLA'nın voltametrik davranışı destek elektrolit olarak alınan BR'nin pH değerinin 2,5 ile 11,0 arasında değiştiği bir aralıkta incelenmiştir. Şekil 3.5.a.'da görüldüğü üzere OLA'nın birinci yükseltgenme pik potansiyeli pH artışı ile negatif potansiyele kaymıştır. Buradan OLA'nın birinci yükseltgenme

mekanizmasında protonların da yer aldığı söylenebilir. Birinci yükseltgenme pik potansiyeli pH ilişkisi eşitliği $E_p/V = -0{,}0641pH + 0{,}6172$ ($R^2 = 0{,}9944$; pH 2,5−11,0 aralığı) şeklindedir. Eşitliğin 0,0641 V/pH değerinin teorik 0,059 V değerine nispeten yakın olması sebebiyle; OLA'nın birinci yükseltgenmesinde yer alan elektron ve proton sayılarının eşit olduğu söylenebilir. Öte yandan OLA'nın ikinci yükseltgenme pik potansiyelinin pH artışından az etkilendiği görülmektedir. Buradan, OLA'nın ikinci yükseltgenme reaksiyonunda protonların yer almadığı söylenebilir.

Ayrıca, OLA'nın birinci yükseltgenme pik akımının pH ile değişimi incelenmiştir. Şekil 3.5.b.'de görüldüğü üzere en yüksek pik akımı pH 4,5'ta elde edilmiştir.



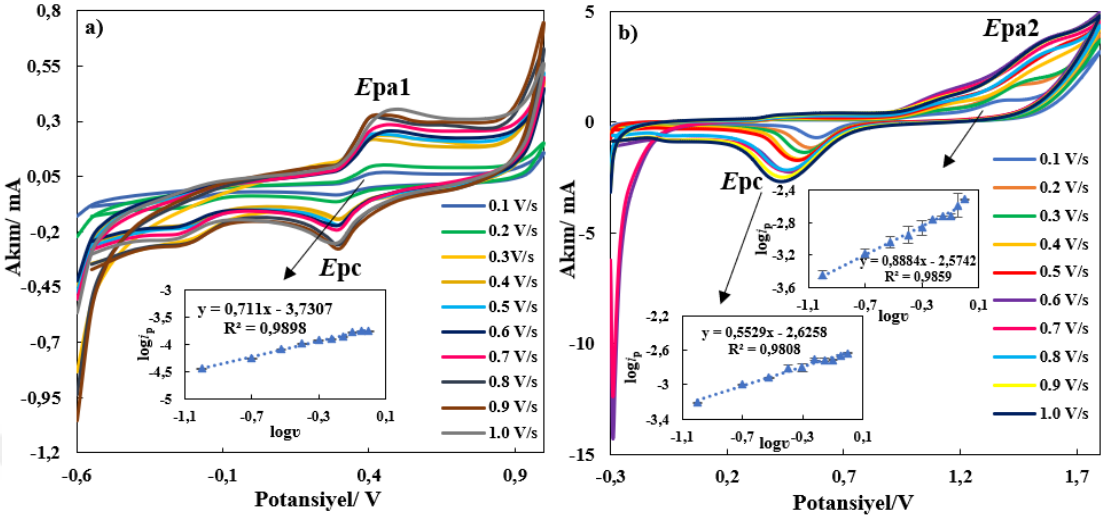
Şekil 3.5. a) 0,50 mM OLA'nın DPV voltamogramlarından elde edilen birinci (E_{pa1}) ve ikinci (E_{pa2}) yükseltgenme pik potansiyellerinin – pH ile değişimi b) i_{p1} – pH değişimi. Elektrot: AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE, 0,1 M BR tampon ortamında (pH 2,5 – 11,0).

3.1.5. Tarama Hızı Etkisi ve Olası OLA Yükseltgenme Mekanizması

0,50 mM OLA'nın elektrokimyasal yükseltgenme indirgenme mekanizmasını belirleyebilmek için pH 4,5 BR destek elektrolit ortamında, dönüşümlü voltametride tarama hızı çalışması yapılmıştır. Tarama hızları Şekil 3.6.'da görüldüğü üzere (0,100, 0,200, 0,300, 0,400, 0,500, 0,600, 0,700, 0,800, 0,900 ve 1,00) V/s olarak çalışılmıştır. Her tarama hızında iki yükseltgenme piki ve bir indirgenme piki gözlenmiştir.

Tarama hızı arttıkça birinci anodik (yükseltgenme) pik potansiyeli (E_{pa1}) ve ikinci anodik pik potansiyeli (E_{pa2}) daha pozitif değerlere kaymıştır. Öte yandan, tarama hızı arttıkça katodik (indirgenme) pik potansiyeli (E_{pc}) de daha negatif değere kaymıştır. Tarama hızı arttıkça piklerin potansiyellerinin sabit olmaması elektrot yüzeyindeki reaksiyonların tersinmez olabileceğini göstermektedir. Şekil 3.6.'da iç grafikler olarak sunulan $\log\upsilon - \log i_p$ grafiklerinde görüldüğü üzere E_{pa1} için eğim 0,7110, E_{pa2} için eğim 0,8884 ve E_{pc1} için eğim

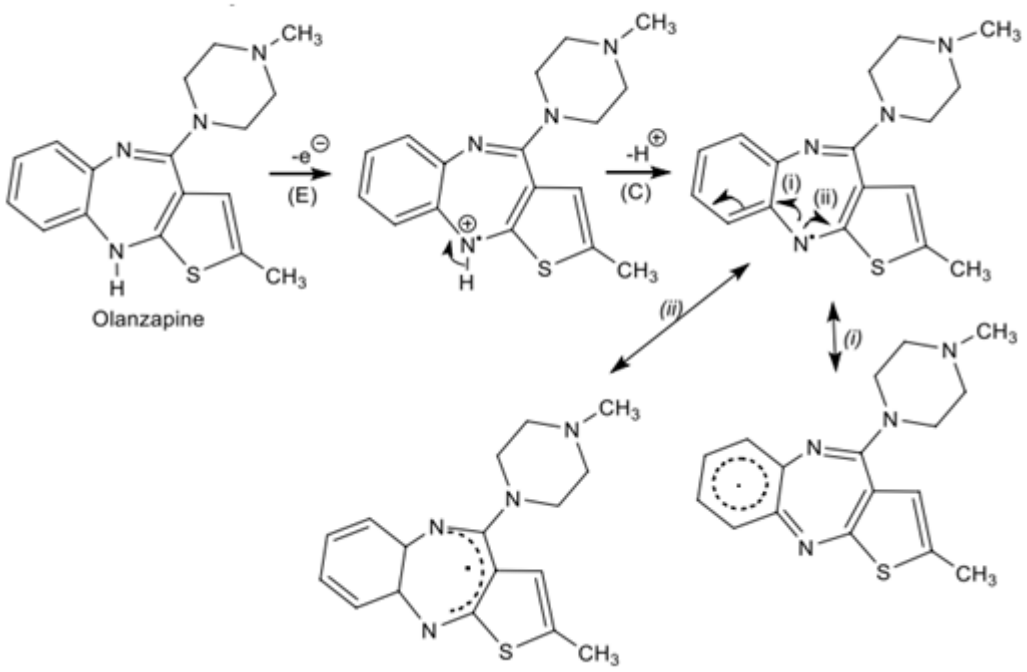
0,5529 şeklindedir. OLA'nın yükseltgenme ve indirgenme süreçlerinin hem adsorpsiyon hem difüzyon kontrollü olduğu söylenebilir (Wang, 2001).



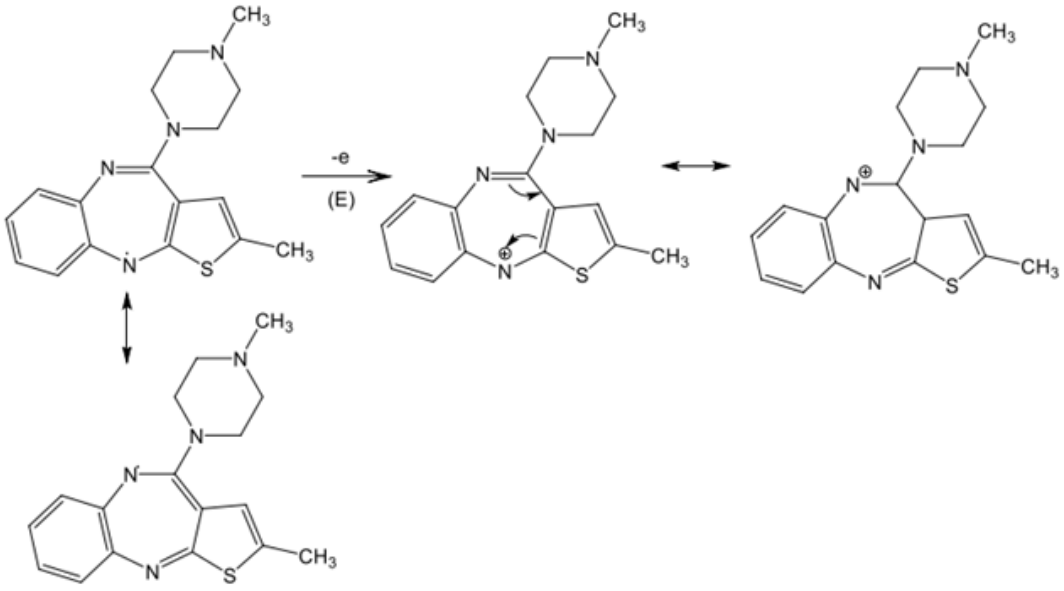
Şekil 3.6. 5,0×10^{-4} M OLA'nın farklı tarama hızlarında CV voltamogramları (pH 4,5 BR, υ:0,1–1,0 Vs^{-1}) **a)** birinci yükseltgenme piki (E_{pa1}), **b)** ikinci yükseltgenme piki (E_{pa2}) ve indirgenme piki (E_{pc}) İç grafikler: logυ–logi_p grafikleri.

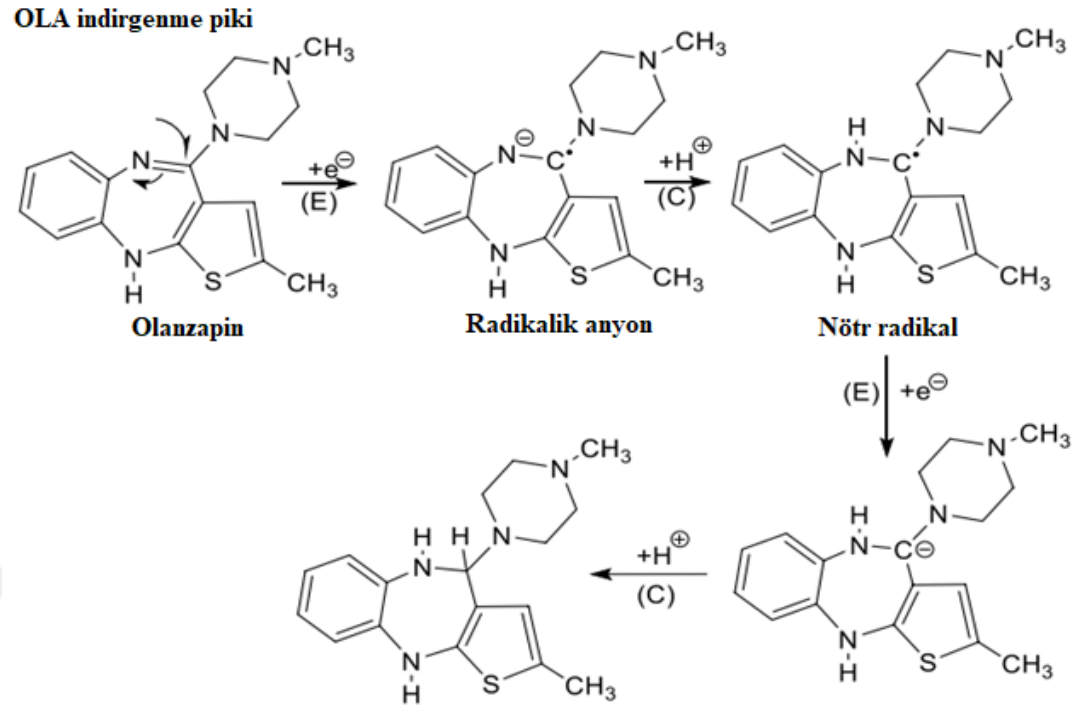
Yapılan tarama hızı ve pH çalışmaları sonucunda OLA'nın olası yükseltgenme mekanizması Şekil 3.7'de verilmiştir. Birinci pikin yükseltgenmesi (E_{pa1}), OLA'nın molekül yapısında bulunan amin grubu üzerinden 1e$^-$ ve 1H$^+$ vererek radikalik bir türün oluşabileceği düşünülmüştür. OLA'ya ait ikinci yükseltgenme pikinin (E_{pa2}), oluşan radikalik tür üzerinden 1e$^-$ vermesi ile oluştuğu düşünülebilir. Geri taramada gözlenen indirgenme pikinin (E_{pc}), molekülün yapısında yer alan imin bağının 2e$^-$, 2H$^+$ alarak amin grubuna indirgenmesine karşılık geldiği söylenebilir. Literatür incelendiğinde, OLA'nın sadece birinci yükseltgenme pikine ait bir mekanizma önerilmiş (Merli vd., 2012) ve benzer bulgular elde edilmiştir.

OLA 1. yükseltgenme pik potansiyeli (Epa1)



OLA 2. yükseltgenme pik potansiyeli (Epa2)





Şekil 3.7. Önerilen OLA yükseltgenme-indirgenme mekanizması.

3.1.6. OLA'nın Elektrokimyasal Analizi

OLA'nın birinci yükseltgenme pik potansiyelinin (E_{pa1}), ikinci yükseltgenme pik potansiyelinden (E_{pa2}) daha düşük değerde olması ve pik akımının daha yüksek ve pik şeklinin daha keskin olması nedeniyle yöntem geliştirme çalışmaları, birinci yükseltgenme piki üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla belirlenen optimize şartlarda OLA derişimi ile pik akımı arasındaki ilişki pH 4,5 BR destek elektrolit ortamında diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemi ile çalışılmış ve (0,01−1000,0) µM derişim aralığında DPV voltamogramları alınmıştır. Yapılan kalibrasyon çalışmasına ait voltamogramlar Şekil 3.8.'de sunulmuştur. Şekil 3.8'de iç grafikte görüldüğü üzere ise iki farklı doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bunlardan ilkinin doğrusal çalışma aralığı (0,271−1,0) µM, ikincisinin doğrusal çalışma aralığı (1,0−1000,0) µM'dır. Her iki kalibrasyon eğrisine dair lineer regresyon eşitlikleri aşağıda sunulmuştur:

i_{p1}=0,0231C_{OLA}+0,0373 R^2=0,9859.

i_{p2}=0,0006C_{OLA}+0,0661 R^2=0,9968.

Analitik performans parametreleri olan gözlenebilme sınırı LOD ve tayin sınırı LOQ değerleri birinci doğrusal kalibrasyon eğrisi regresyon eşitliğinden AuNPs-poly(L-Ala)/pre-

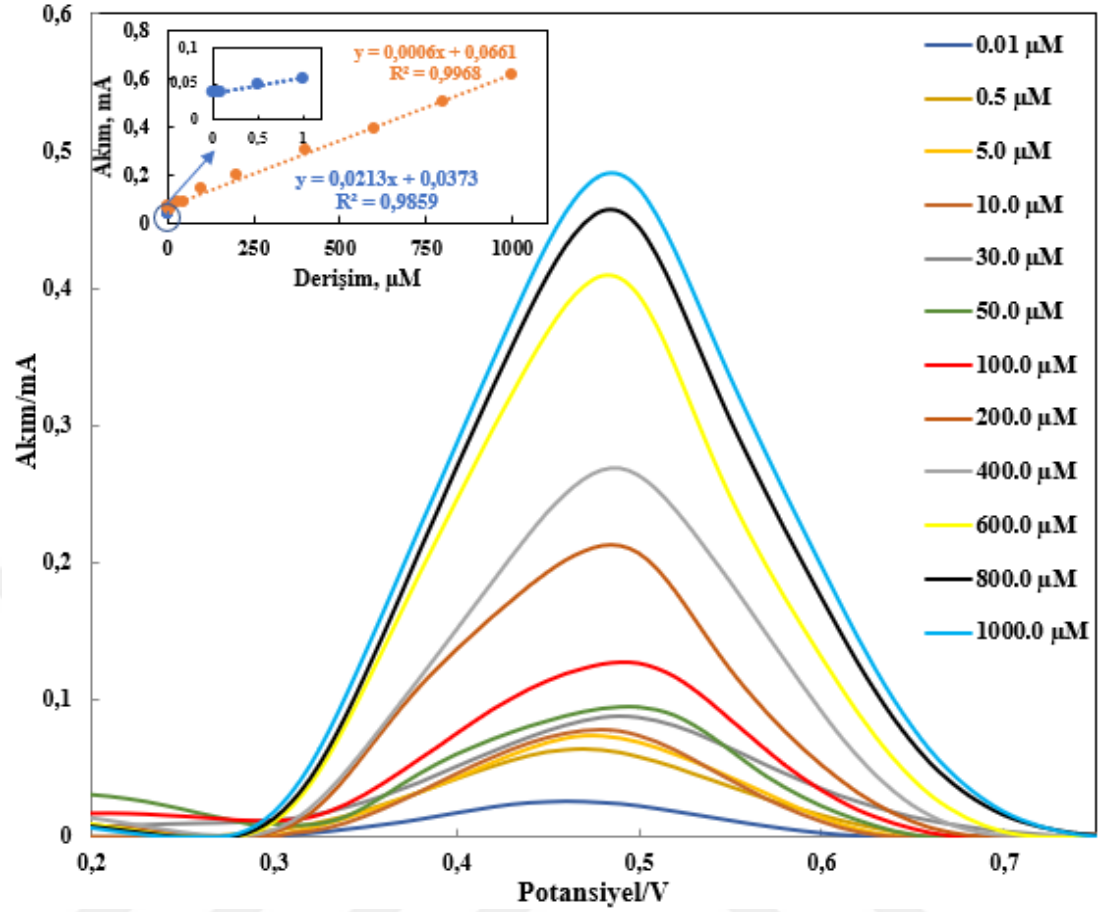
PGE elektrot kullanıldığı durum için hesaplanmıştır. LOD ve LOQ eşitlikleri aşağıda sunulmuştur (Pandit vd., 2015):

LOD=3s/m LOQ=10s/m

Burada; s en düşük OLA derişim değeri için pik akımlarının on ölçümlü standart sapması, m kalibrasyon eğrisinin eğimini göstermektedir. Bu eşitlikleri kullanarak Çizelge 3.1.'de görüldüğü üzere LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,081 μM ve 0,271 μM olarak hesaplanmıştır.

AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot için tekrarlanabilirlik ölçümleri gün içi farklı saatlerde alınmıştır. Beş ölçümün ortalaması alınarak modifiye elektrodun OLA tayininde yükseltgenme pik akımının tekraredilebilirliği %BSS 2,61, yükseltgenme pik potansiyelinin tekraredilebilirliği %BSS 1,90 olarak hesaplanmıştır ve bu değerler yüksek olarak değerlendirilmiştir.

Tamamen aynı deneysel koşullarda ve şartlarda kaplanan beş modifiye elektrot ile OLA'nın DPV voltamogramları alınarak tekrarüretilebilirlik test edilmiştir. Çizelge 3.1'de görüldüğü üzere yükseltgenme pik akımının tekrarüretilebilirliği %BSS 2,42, pik potansiyelinin tekrarüretilebilirliği ise %BSS 0,42 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. OLA'nın farklı derişimlerde diferansiyel puls voltamogramları. İç grafik: OLA kalibrasyon eğrisi. (pH 4,5, step potansiyel: 0,01 V, pulse potansiyel: 0,2 V, pulse zamanı: 0,02 s, tarama hızı: 0,1 V/s).

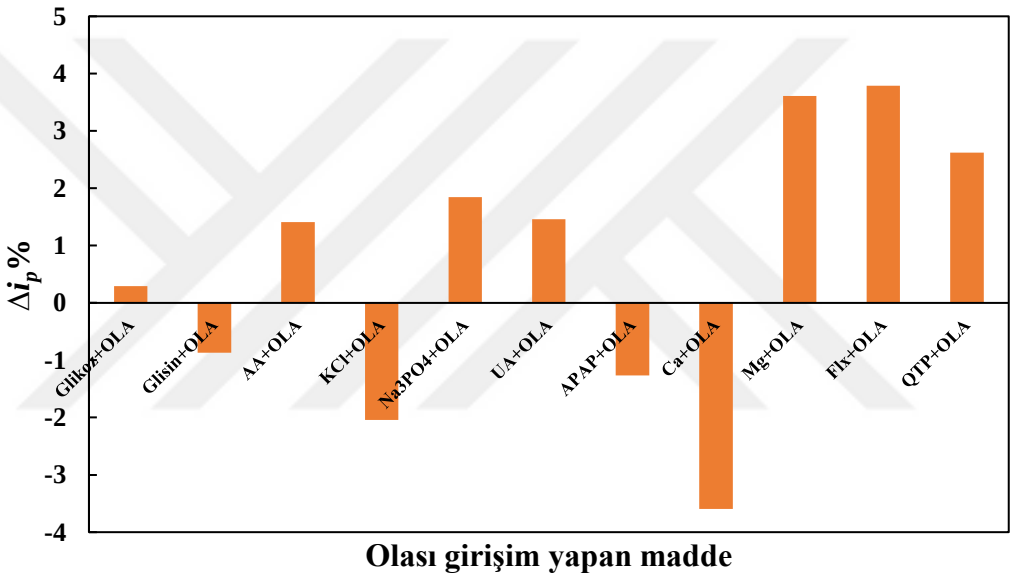
Çizelge 3.1. OLA kalibrasyonunda regresyon parametreleri.

Regresyon parametreleri	**OLA**
Doğrusal çalışma aralığı, µM	0,271 – 1,0; 1,0 – 1000,0
Eğim (mA/µM)	0,0213 / 0,0006
Ekstrapolasyon noktası (mA)	0,0373 / 0,0661
Gözlenebilme sınırı (LOD), µM	0,081
Tayin sınırı (LOQ), µM	0,271
Regresyon katsayısı (R^2)	0,986 / 0,997
Pik potansiyelinin tekraredilebilirliği, %[a]BSS	1,90
Pik akımının tekraredilebilirliği, %[a]BSS	2,61
Pik potansiyelinin tekrarüretilebilirliği, %[a]BSS	0,42
Pik akımının tekrarüretilebilirliği, %[a]BSS	2,42

[a]*BSS beş ölçümün bağıl standart sapmasıdır.*

3.1.7. Girişim Etkisi

İnsan sentetik serumunda ve idrarda doğal olarak bulunan bazı organik ve anorganik türler (glukoz, glisin, askorbik asit, ürik asit, K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}) ve OLA ile reçete edilebilen bazı ilaç etken maddeleri (asetaminofen (APAP), fluoksetin (flx) ve ketiapin (QTP)) için girişim etkisi çalışması gerçekleştirilmiştir. Olası girişim yapması düşünülen maddeler, OLA bulunan ortama 1:1 oranda ilave edilerek DPV voltamogramları alınmıştır. Elde edilen pik akımları OLA'nın tek başına bulunduğu ortamların pik akımları ortalaması ile karşılaştırılarak yüzde bağıl hatalar hesaplanmıştır (%Bağıl hata= $(\imath_{ort\ \text{girişim yapan madde}-\text{OLA}} - \imath_{ort\ \text{OLA}})/\ \imath_{ort\ \text{OLA}} \times 100$) Sonuçlar Şekil 3.9.'da verilmiştir.

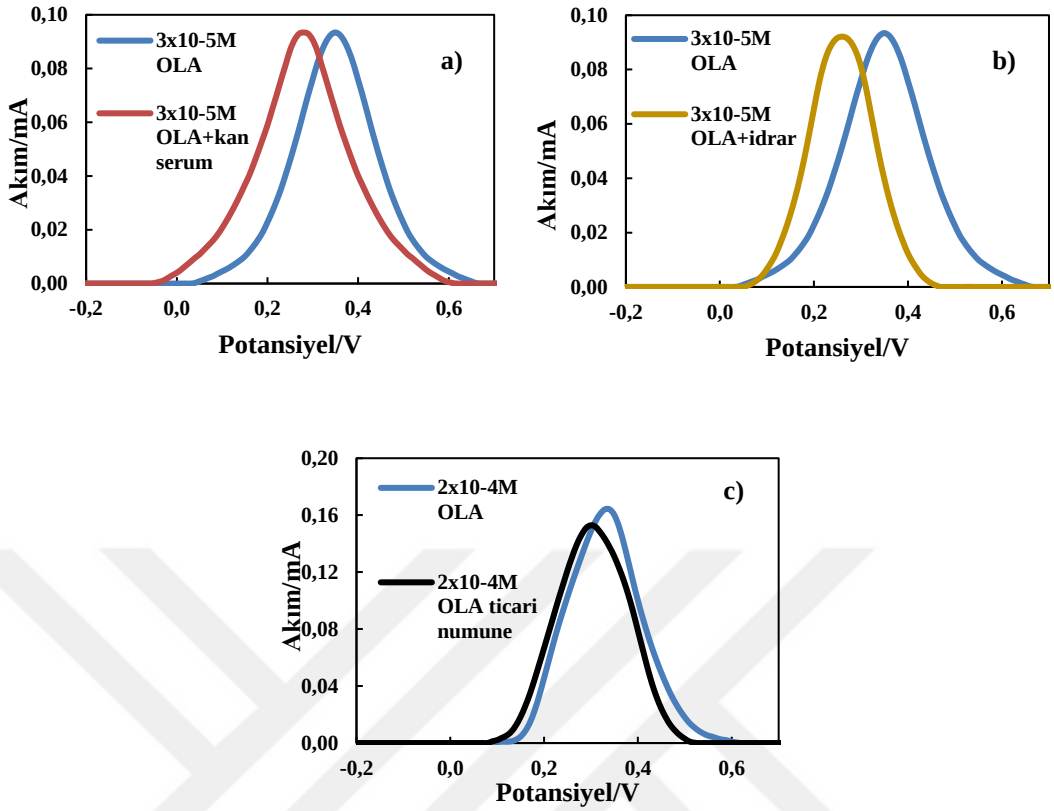


Şekil 3.9. OLA : olası girişim yapan madde 1:1 olduğu durumda DPV yöntemiyle elde edilen % akım değerleri – olası girişim yapan maddeye karşı grafiği (pH 4,5 0,12 M BR destek elektrolit ortamı ve elektrot: AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE).

Şekil 3.9 incelendiğinde OLA'nın pik akımındaki değişimlerin bozucu türler varken yüzde bağıl hata olarak en fazla %3,79 civarında olduğu görülmektedir.

3.1.8. OLA Gerçek Numune Çalışmaları

Geliştirilen yöntemin ve elektrodun doğruluğunu belirlemek için sentetik kan serum, idrar ve ticari ilaç örneği olmak üzere farklı örneklerde DPV voltamogramlardan yaralanarak (Şekil 3.10.) geri kazanım çalışması yapılmıştır. Ticari ilaç örneği olarak, tablet başına 2,5 mg OLA içeren ilaç kullanılmıştır.



Şekil 3.10. OLA tayini için geliştirilen yöntemde geri kazanım çalışması; a) kan serum, b) idrar, c) ticari numune içeren ortamlarda kaydedilmiş voltamogramlar.

Çizelge 3.2. Kan serum, idrar ve ticari ilaç örneğinden OLA geri kazanım bulguları.

Numune	Yöntem	Gerçek numune	Eklenen miktar	Bulunan miktar	Geri kazanım, %	% [a]BSS
OLA	DPV	Kan serum	30,0 µM	29,74 ± 0,54	99,12 ± 1,79	1,81
		İdrar	30,0 µM	29,12 ± 0,32	97,09 ± 1,07	1,09
		Tablet	2,50 mg	2,48 ± 0,06	99,00 ± 2,28	2,30

[a]BSS beş ölçümün bağıl standart sapmasıdır.

Çizelge 3.2.'de kan serum ve idrara eklenen 30 µM OLA ve 2,50 mg ilaç etken maddesi için geri kazanım % değerleri sunulmuştur. DPV yönteminde %95 güven seviyesinde geri kazanım yüzdeleri kan serum için %99,12, idrar için %97,06 ve ticari ilaç örneği için %99,00'dır. Sonuçların %100'e yakın olması geri kazanım çalışmaları başarıyla yürütüldüğünü göstermektedir.

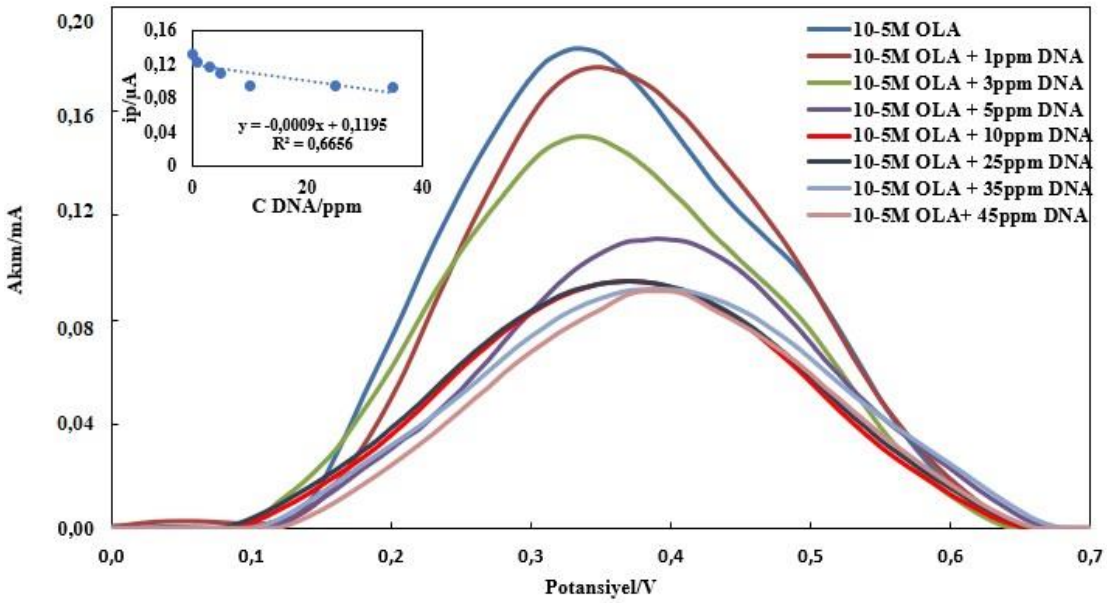
3.1.9. OLA ile DNA Etkileşim Çalışması

OLA ilaç etken maddesinin moleküler yapısı incelendiğinde yük polarizasyonun olduğu fonksiyonel grupların olması sebebiyle DNA ile elektrostatik etkileşimin olabilirliği söz

konusudur. Ayrıca OLA ilaç etken maddesi trisiklik aromatik ve düzlemsel bir yapıda olduğundan DNA ile interkalasyon yapması da olasıdır (Strekowski ve Wilson'dan aktaran Caymaz, 2019).

OLA ilaç etken maddesinin uzun süreli kullanımında DNA'da mutajenezis ya da karsinojenezis'e sebep olma olasılığını yorumlayabilmek için OLA yükseltgenme piki üzerinden DNA etkileşimleri incelenmiştir. pH 4,3 ABS destek elektrolit ortamında (pH 4,3 seçilmesinin sebebi fizyolojik pH olmasıdır.) pre/AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot kullanılarak 10^{-5} M OLA ilaç etken maddesinin 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 35 ppm ve 45 ppm DNA varlığında DPV yönteminde akım-potansiyel voltamogramları incelenmiştir. Şekil 3.11.'de OLA'nın pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları verilmiştir. İç grafikte ise $C_{DNA}-ip$ grafiği (pH 4,3 ABS) sunulmuştur.

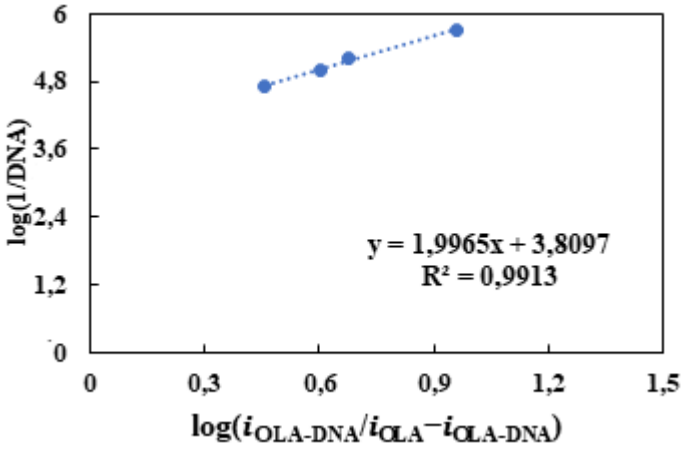
10^{-5} M OLA ilaç etken maddesinin pH 4,3 ABS destek elektrolit ortamında 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 35 ppm ve 45 ppm DNA varlığında DPV yönteminde voltamogramları incelendiğinde, DNA derişimi arttıkça, OLA'ya ait pik akımının doğrusal olarak azaldığı, daha sonra sabitlendiği görülmektedir.



Şekil 3.11. OLA'nın pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları. İç grafik: $C_{DNA}- i_p$ grafiği (pH 4,3).

İlaç etken maddesi ve DNA arasındaki etkileşim $log\left(\frac{1}{[DNA]}\right) = log\,K + log\left(\frac{I}{I_0 - I}\right)$ formülüyle hesaplanmaktadır (Erkmen vd., 2022). Madde-DNA etkileşim pikinin akımı I, maddenin pik akımı I_0 ile gösterilmiştir.

OLA ve DNA arasındaki etkileşimin türünün yorumlanabilmesi için K bağlanma sabiti DPV yöntemi ile elde edilen akımlar kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, $\log(i_{OLA\text{-}DNA}/i_{OLA}-i_{OLA\text{-}DNA})-\log(1/DNA)$ grafiği çizilmiş (Deepa vd., 2018), grafiğin kesim noktasının antilog değerinden K bağlanma sabiti hesaplanmıştır. Şekil 3.12.'de $\log(i_{OLA\text{-}DNA}/i_{OLA}-i_{OLA\text{-}DNA})-\log(1/DNA)$ grafiği sunulmuştur.



Şekil 3.12. $\log(i_{OLA\text{-}DNA}/i_{OLA}-i_{OLA\text{-}DNA})-\log(1/DNA)$ grafiği.

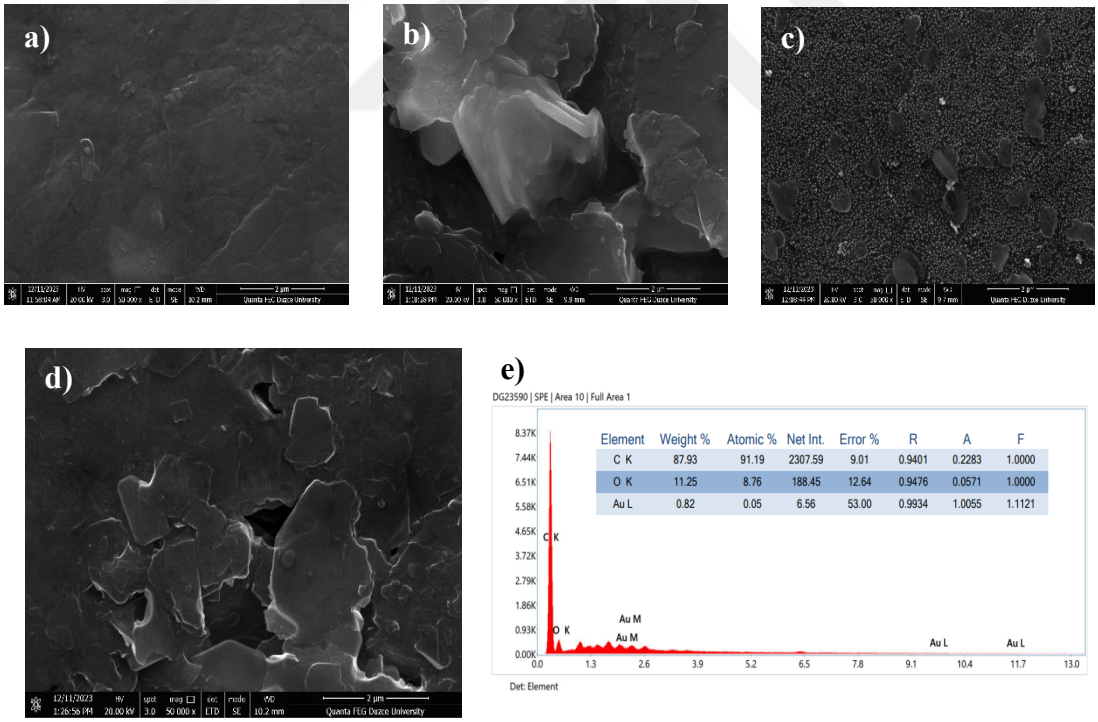
Şekil 3.12.'de sunulan $\log(i_{OLA\text{-}DNA}/i_{OLA}-i_{OLA\text{-}DNA})-\log(1/DNA)$ grafiğinin kesim noktası 3,8097'dır. Bu değerin antilog değeri hesaplandığında K bağlanma sabiti $6{,}45\times10^3$ M^{1-} olarak bulunmuştur. Şekil 3.12.'de görüldüğü gibi OLA'ya ait yükseltgenme pik potansiyeli, DNA derişimi arttıkça pozitif potansiyellere kaymaktadır (+0,30V'den +0,40V'ye) Pik potansiyelinin pozitif değerlere kayması OLA-DNA etkileşiminin interkalasyon olabileceğini düşündürmüştür (Erkmen vd., 2022).

OLA-DNA etkileşimi için hesaplanan bağlanma sabitinden yola çıkılarak reaksiyon standart Gibbs serbest enerjisi $\Delta G^0 = -RTlnK$ eşitliği yardımıyla hesaplanarak ΔG^0= -21,7 kJ/mol olarak bulunmuştur. Standart Gibbs serbest enerjisi değerinin negatif olması reaksiyonun kendiliğinden yürüyen, istemli bir etkileşim olabileceğini göstermektedir.

3.2. CLZ ile Yapılan Voltametrik Çalışmalar

3.2.1. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojileri

PGE elektrotların Au nanoparçacıklarla ve polyCA ile modifikasyonu Bölüm 2.4.'te ayrıntılı bir biçimde anlatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan PGE, polyCA-PGE, AuNPs-PGE ve AuNPs-polyCA-PGE elektrotların yüzey morfolojileri için yüzey FE-SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.13.). Şekil 3.13.a.'da görüldüğü üzere, PGE yüzeyi grafit tabakalardan oluşmaktadır. Şekil 3.13.b.'de kafeik asit elektropolimerizasyonu sonrası PGE yüzeyde holler oluşmaktadır. PGE yüzeyi Au nanoparçacıklarla modifiye edildiğinde ise (Şekil 3.13.c.'de), yüzeyde görülen parlak noktaların varlığı AuNPs varlığını destekler niteliktedir. Şekil 3.13.d.'de ise polyCA ve Au nanoparçacıkları birarada PGE yüzeyine modifiye edildiğinde yüzeyin değiştiği görülmektedir. Ayrıca, Şekil 3.13.e.'de AuNPs-polyCA-PGE elektrot için EDX spektrumunda Au ve O piklerinin gözlenmesi yüzeyde AuNPs-polyCA varlığını göstermektedir.

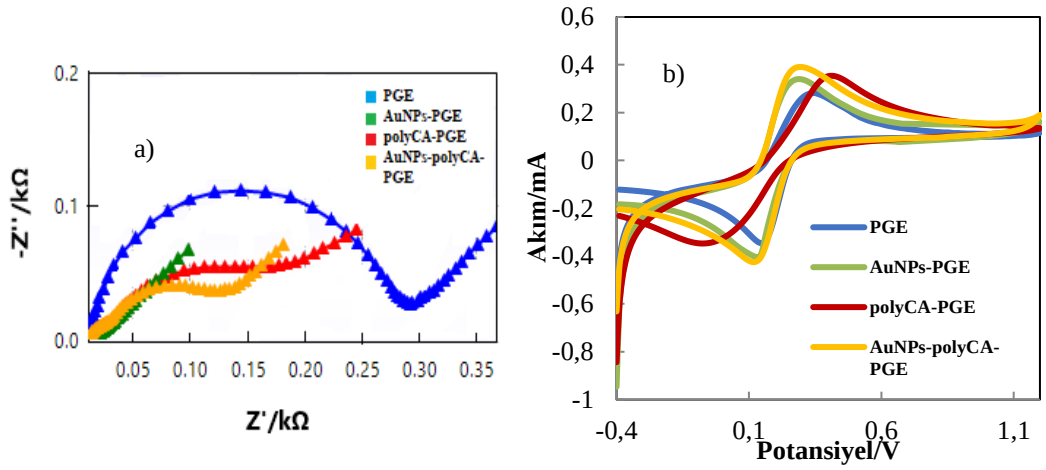


Şekil 3.13. a) PGE, b) polyCA-PGE, c) AuNPs-PGE, d) AuNPs-polyCA-PGE FE-SEM görüntüleri e) AuNPs-polyCA-PGE için EDX spektrumu.

3.2.2. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Modifiye elektrotların (PGE, AuNPs-PGE, polyCA-PGE ve AuNPs-polyCA-PGE) elektrokimyasal karakterizasyonu öncelikle elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob ile incelenmiştir (Şekil 3.14.a.). Elde edilen Nyquist grafiklerine göre, R_{ct} değerleri PGE elektrot için 290 Ω, AuNPs-PGE elektrot için 14 Ω, polyCA-PGE elektrot için 1 Ω ve AuNPs-polyCA-PGE elektrot için 0,5 Ω değerindedir. Buna göre, AuNPs-polyCA-PGE elektrodun yüzey iletkenliğinin daha iyi olduğu düşünülmüştür (Wang vd., 2012).

Şekil 3.14.b.'de ise 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probda 0,05 V/s tarama hızında (-0,4)−(+1,2)−(-0,4) V potansiyel aralığında PGE, AuNPs-PGE, polyCA-PGE ve AuNPs-polyCA-PGE modifiye elektrotlar için dönüşümlü voltamogramlar verilmiştir. Redoks probun pik akımları AuNPs-polyCA-PGE elektrot yüzeyinde diğer elektrotlara göre daha yüksektir ve anodik pik potansiyeli ile katodik pik potansiyeli arasındaki fark (ΔE_p) diğer elektrotlardan nispeten küçüktür. AuNPs-polyCA-PGE elektrot yüzeyinde elektron aktarımının hızının diğer hazırlanan elektrotlara göre nispeten daha hızlı olduğu düşünülmektedir (Rajendrachari vd., 2022).



Şekil 3.14. a) Nyquist eğrileri b) 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob için υ: 0,05 V/s tarama hızında CV voltamogramlar.

Modifiye elektrotların aktif yüzey alanları arasında fark olup olmadığı CV yöntemiyle (0,005, 0,015, 0,025, 0,035, 0,050) V/s tarama hızı aralığında, 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probuyla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdadır:

0,442 (±0,067) cm^2, PGE

0,590 (±0,023) cm^2, AuNPs-PGE

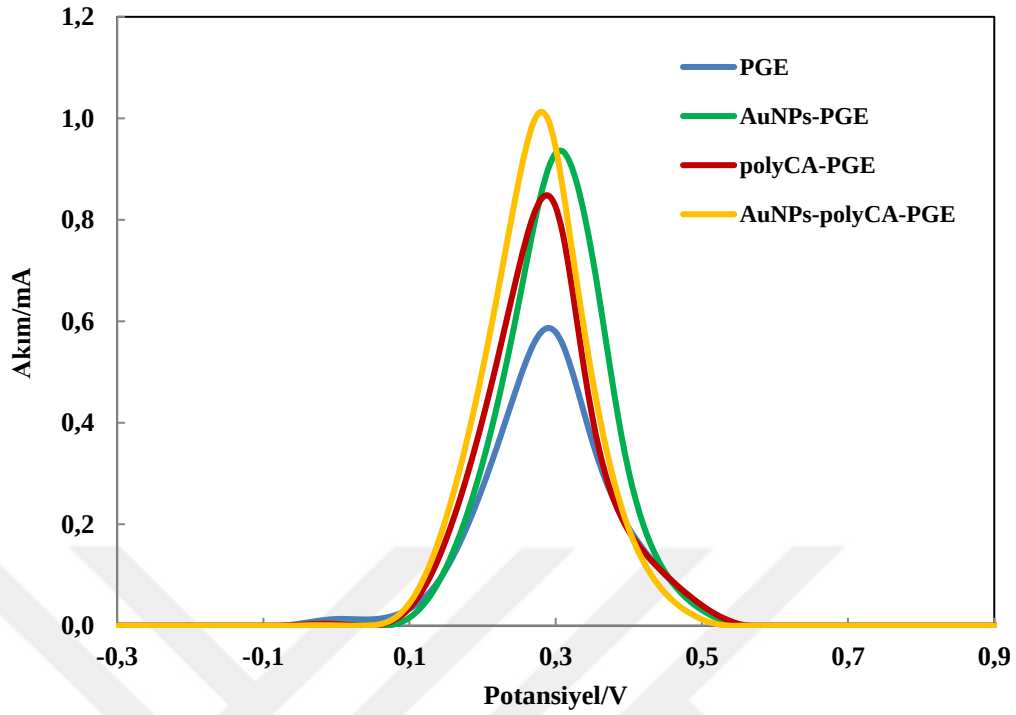
0,276 (±0,060) cm^2, polyCA-PGE

0,839 (±0,022) cm^2, AuNPs-polyCA-PGE

Burada görüldüğü üzere, AuNPs-polyCA-PGE elektrodun yüzey alanı PGE'nin yüzey alanından 1,90 kat daha yüksektir. Bu sonuçlara göre en yüksek aktif yüzey alanına sahip elektrodun AuNPs-polyCA-PGE olduğu sonucuna varılmıştır.

Daha sonra, hazırlanan modifiye elektrotların (PGE, AuNPs-PGE, polyCA-PGE ve AuNPs-polyCA-PGE) yüzeyinde 0,50 mM CLZ'nin yükseltgenme davranışı Britton-Robinson (BR) destek elektrolit ortamında (pH 9,0), (−0,3)−(+1,4) V potansiyel aralığında DPV yönteminde incelenmiştir. (Şekil 3.15.).

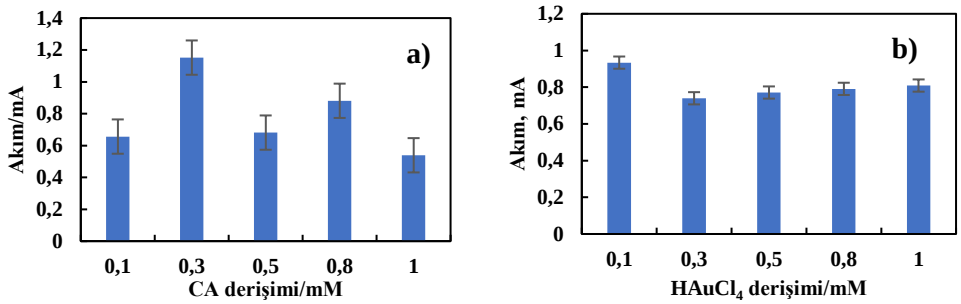
Şekil 3.14.'te görüldüğü üzere klozapinin hazırlanan bütün elektrotların yüzeyinde bir yükseltgenme piki gözlenmiştir. CLZ'nin yükseltgenme piki; PGE elektrot yüzeyinde 0,290 V'de (0,587 mA); AuNPs-PGE elektrotta 0,310V'de (0,935 mA), polyCA-PGE elektrotta 0,290V'de (0,849 mA) ve AuNPs-polyCA-PGE elektrotta ise 0,280V'de (1,013 mA) gözlenmiştir. Hazırlanan bütün elektrot yüzeylerindeki akımlar karşılaştırıldığında; AuNPs-polyCA-PGE elektrodun PGE elektroda göre 1,73 kat kadar daha yüksek bir akım elde edilmiştir. CLZ'nin yükseltgenme pik potansiyeli ise AuNPs-polyCA-PGE elektrot yüzeyinde diğer elektrotlara göre nispeten daha negatif potansiyele kaymıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre, CLZ tayini için en uygun modifiye elektrodun AuNPs-polyCA-PGE olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.15. 0,50 mM CLZ'nin farklı modifiye elektrotların yüzeyinde DPV voltamogramları (pH 9,0 BR ortamında).

3.2.3. Modifiye Elektrodun Bileşiminin Belirlenmesi

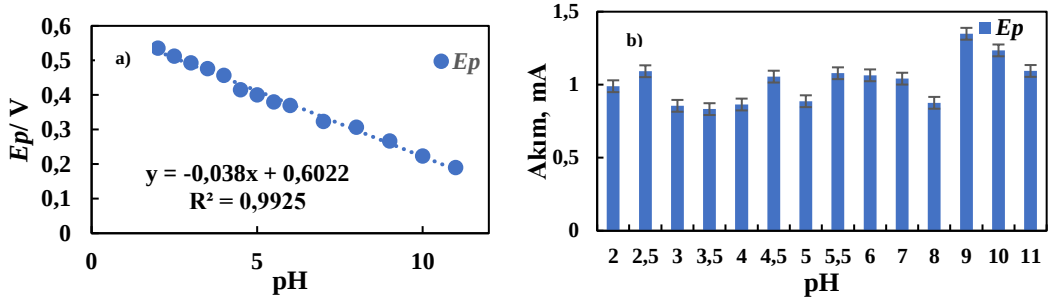
CLZ'nin yükseltgenme pik sinyali temel alınarak CLZ tayini için $HAuCl_4$ ve CA derişimleri optimize edilmiştir. Bu amaçla, PGE elektrotların yüzeyi $HAuCl_4$ çözeltisi ve CA monomeri bir arada iken çoklu CV yöntemi ile altın nanoparçacıkları ve polyCA olarak modifiye edilmiştir. Modifiye elektrodu oluşturan $HAuCl_4$ derişimi 0,3 mM da sabit tutularak CA derişimleri (0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1,0) mM aralığında değiştirilerek elektropolimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan elektrotlar ile CLZ'nin DPV voltamogramları alınmıştır. Her bir derişim için elde edilen DPV pik akımları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.16.a.). Şekil 3.16.a.'da görüldüğü üzere en yüksek pik akımının ve en simetrik pik şeklinin gözlendiği derişim olan 0,3 mM CA optimize derişim olarak alınmıştır. Daha sonra CA derişimi 0,3 mM'de sabit tutularak $HAuCl_4$ derişimleri (0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1,0) mM aralığında değiştirilmiştir (Şekil 3.16.b.). Şekil 3.16.b.'de görüldüğü gibi, 0,1 mM $HAuCl_4$ derişimi en yüksek pik akımının elde edildiği derişimdir ve optimize derişim olarak alınmıştır, bu derişimden sonra pik akımı azalarak birbirine yakın seyretmektedir.



Şekil 3.16. 0,50 mM CLZ pik akımlarına a) CA derişiminin etkisi b) $HAuCl_4$ derişiminin etkisi (0,1 M BR destek elektrolit ortamı pH 9,0).

3.2.4. pH Etkisi

CLZ'nin tayini için pH etkisi BR tamponunda pH 2,0 ile 11,0 arasında değiştirilerek incelenmiştir. Şekil 3.17.a.'da görüldüğü üzere CLZ'nin yükseltgenme pik potansiyeli pH arttıkça negatif potansiyellere kaymaktadır. Pik potansiyelinin pH ile değişimini veren eşitlik E_p/V = −0,038pH + 0,6022 (R^2= 0,9925) şeklindedir. Eşitlik incelendiğinde 0,038 V/pH değerinin; teorik değer olan 0,059 V/pH değerinin yaklaşık olarak yarısına karşılık gelmesi sebebiyle yükseltgenme mekanizmasında yer alan elektron ve proton sayılarının eşit olmadığı söylenebilir (Mashhadizadeh ve Afshar, 2013). Şekil 3.17.b.'de görüldüğü üzere CLZ'nin yükseltgenme piki için anodik yükseltgenme akımının en yüksek olduğu pH değeri 9,0'dır. Bu nedenle pH 9,0 optimize değer olarak seçilmiştir.



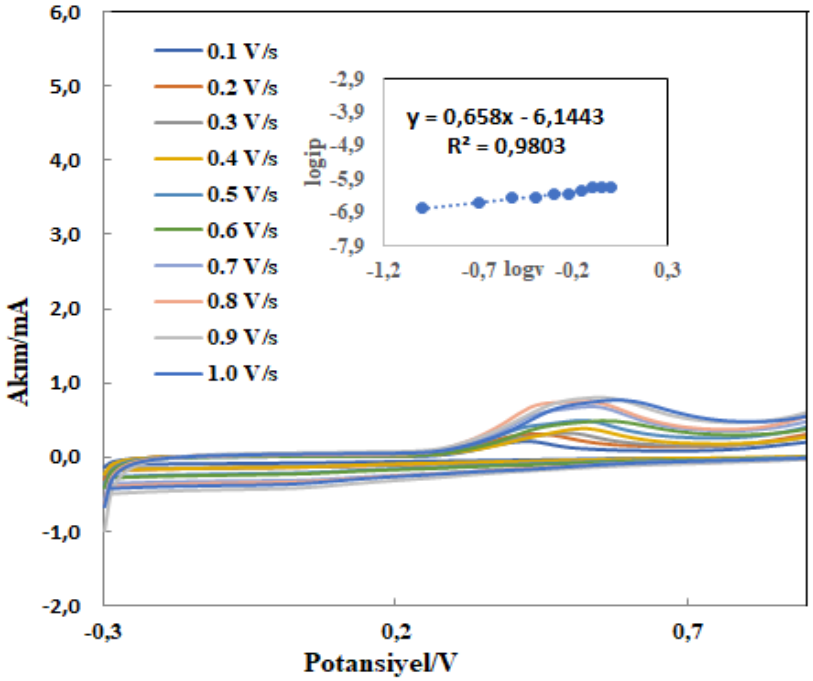
Şekil 3.17. a) 0,50 mM CLZ'nin DPV voltamogramlarından elde edilen birinci (E_p) pik potansiyellinin – pH ile değişimi b) i_p – pH değişimi. AuNPs-polyCA-PGE elektrot yüzeyinde, 0,1 M BR tampon ortamında (pH 2,0 – 11,0).

3.2.5. Tarama Hızı Etkisi ve Olası CLZ Yükseltgenme Mekanizması

Optimum değer olarak belirlenen pH 9,0 BR destek elektrolit ortamında derişimi 0,50 mM olarak alınan CLZ'nin elektrokimyasal yükseltgenme ve indirgenme mekanizmasını belirleyebilmek için dönüşümlü voltametride tarama hızı çalışması yapılmıştır. Tarama hızları

Şekil 3.18.'de görüldüğü üzere (0,100, 0,200, 0,300, 0,400, 0,500, 0,600, 0,700, 0,800, 0,900 ve 1,00) V/s olarak değiştirilmiştir.

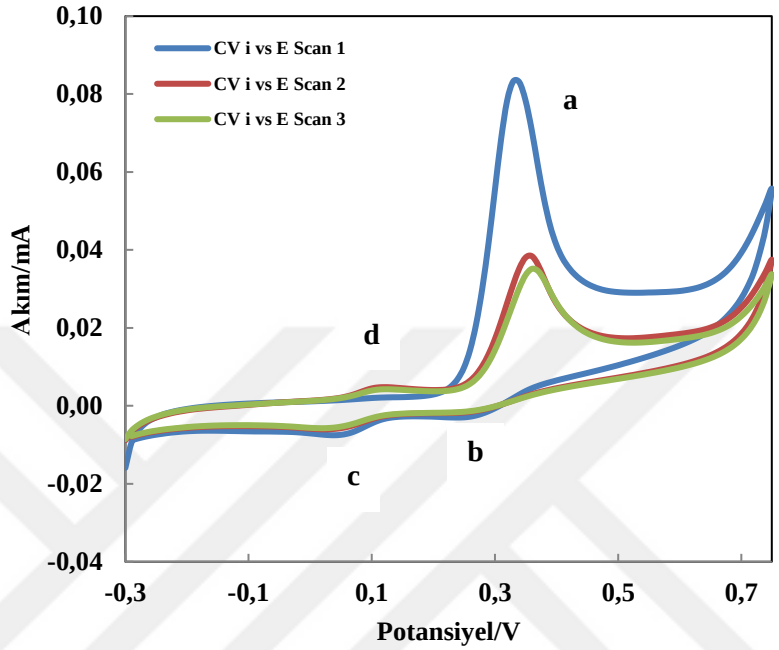
Tarama hızı arttıkça anodik (yükseltgenme) pik potansiyeli (E_p) daha pozitif değerlere kaymaktadır (Şekil 3.18). Ayrıca, Şekil 3.18.'de iç grafik olarak sunulan log$v$–logi_p grafiğinden görüldüğü üzere eğim 0,658 olarak hesaplanmıştır. Eğimin 0,500'den büyük olması CLZ'nin elektrot yüzeyinde yükseltgenme prosesinde hem difüzyon hem de adsorpsiyonun etkili olduğu söylenebilir (Wang, 2001).



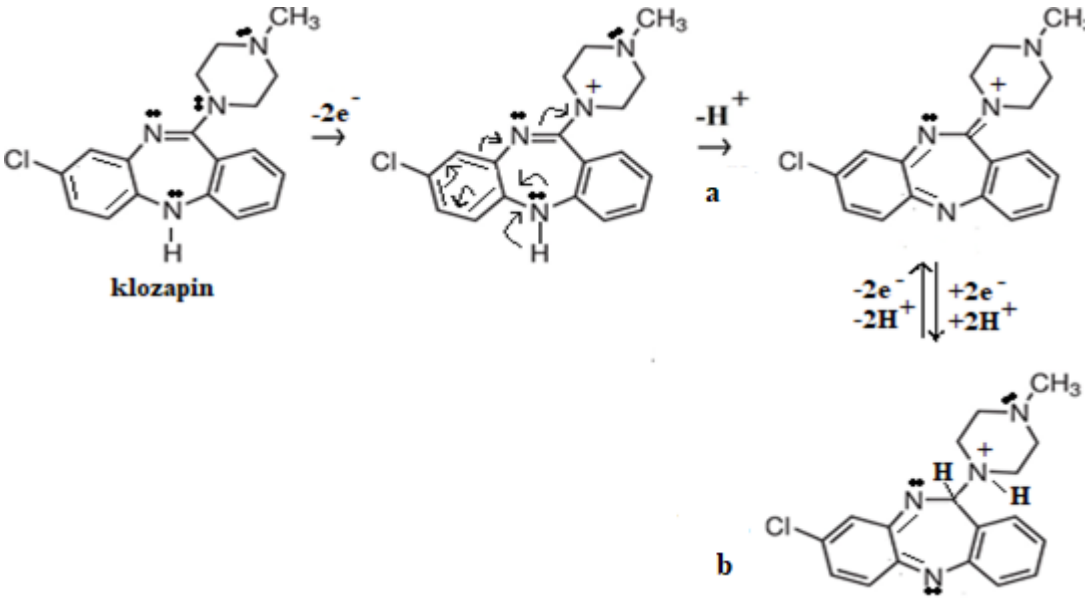
Şekil 3.18. 5,0×10^{-4} M CLZ'nin farklı tarama hızlarında CV voltamogramları (pH 9,0 BR destek elektrolit ortamında 0,1–1,0 Vs^{-1} tarama hızı aralığında), iç grafik: log$v$–logi_p grafiği.

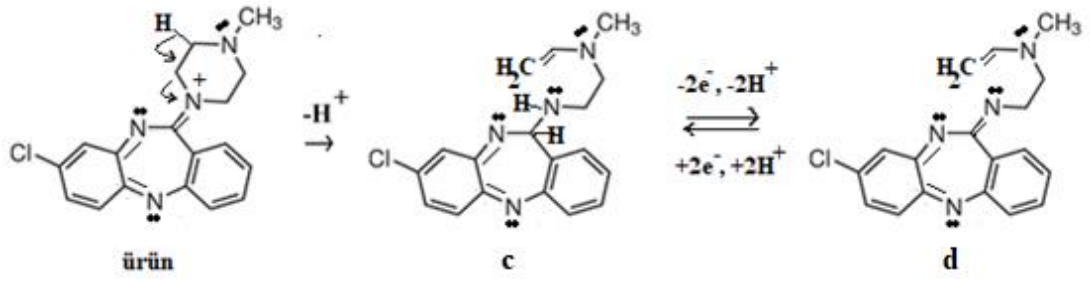
CLZ'nin yükseltgenme indirgenme olası mekanizmasını araştırmak için beş döngülü CV voltamogramları alınmıştır (Şekil 3.19.). CLZ'nin birinci döngüde yaklaşık +0,50V'deki yükseltgenme piki (Şekil 3.19.a.) molekülün yapısındaki piperazin halkasından 2e$^-$, 1H$^+$ vererek pozitif yüklü bir kimyasal türe dönüşmesine ait olabileceği düşünülmüştür. İkinci döngüde 0,4V'de gözlenen indirgenme piki (Şekil 3.19.b.) ilk döngüdeki yükseltgenme sonucunda oluşan türün bir kimyasal reaksiyona uğradığı ve daha sonra imin grubu üzerinden indirgenme (Şekil 3.19.c.) ve yükseltgenmenin olduğu söylenebilir (Şekil 3.19.d.), (Mashhadizadeh ve Afshar, 2013). CLZ'nin olası yükseltgenme-indirgenme mekanizmasının

aydınlatılması için literatürde de benzer döngülü voltamogramlar alınmış ancak detaylı bir mekanizma önerilmemiştir. Yapılan dönüşümlü voltametri, çok döngülü voltamogramlar ve pH çalışmaları sonucunda CLZ'nin olası yükseltgenme mekanizması Şekil 3.20.'de detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 3.19. $5{,}0\times10^{-4}$ M CLZ CV voltamogramları (5 döngülü). (pH 9,0 BR, (-0.3V)−(+0.75V)−(-0.3V) potansiyel aralığı, v: 0,1Vs^{-1}).





Şekil 3.20. CLZ'nin olası yükseltgenme mekanizması.

3.2.6. CLZ'nin Elektrokimyasal Analizi

CLZ tayini için (0,01-1000,0) µM derişim aralığında DPV voltamogramları alınmıştır. Yapılan kalibrasyon çalışmasına ait voltamogramlar Şekil 3.21.'de sunulmuştur. Şekil 3.20.'de iç grafikte görüldüğü üzere ise iki farklı doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bunlardan ilkinin doğrusal çalışma aralığı (0,010-0,5) µM, ikincisinin doğrusal çalışma aralığı (0,5-1000,0) µM'dır. Her iki kalibrasyon eğrisine dair lineer regresyon eşitlikleri aşağıda sunulmuştur:

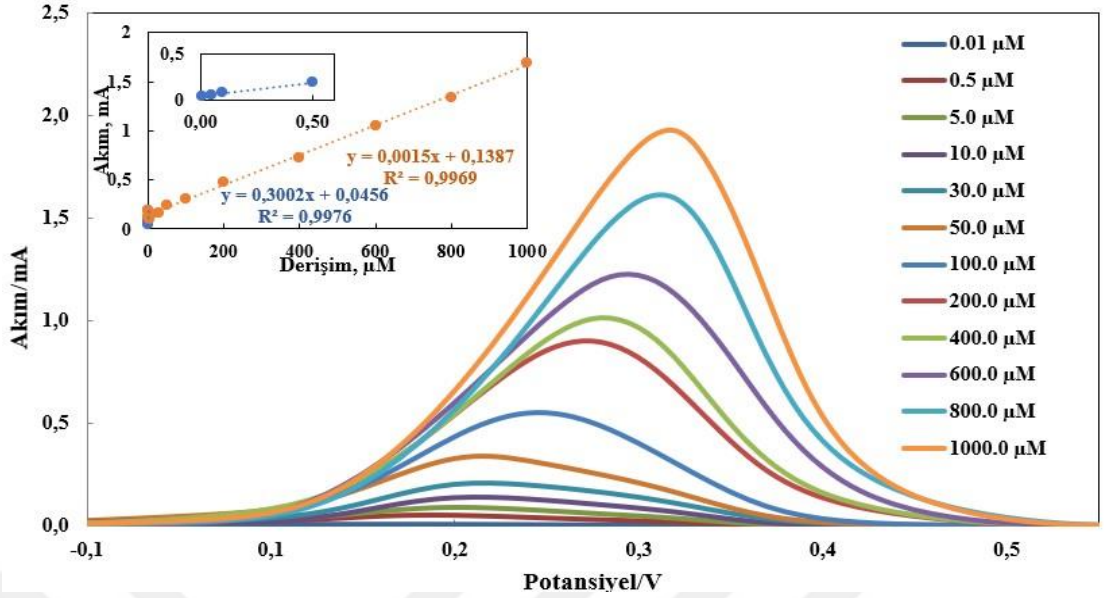
i_{p1}=0,3002C_{CLZ}+0,0456 R^2=0,9976.

i_{p2}=0,0015C_{CLZ}+0,1387 R^2=0,9969.

Regresyon analizi sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3.'te detaylı olarak verilmiştir. Çizelge 3.3.'te görüldüğü üzere LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,003 µM ve 0,010 µM olarak hesaplanmıştır.

AuNPs-polyCA-PGE elektrot için tekrarlanabilirlik ölçümleri gün içi farklı saatlerde alınmıştır. Beş ölçümün ortalaması alınarak modifiye elektrodun CLZ tayininde yükseltgenme pik akımının %BSS değeri 2,41, yükseltgenme pik potansiyelinin %BSS değeri 1,99 olarak hesaplanmıştır.

Tamamen aynı deneysel koşullarda ve şartlarda oluşturulan beş modifiye elektrot ile CLZ'nin DPV voltamogramları alınarak tekrarüretilebilirlik test edilmiştir. Çizelge 3.3'te görüldüğü üzere, yükseltgenme pik akımının tekrarüretilebilirliği %BSS değeri 2,72, pik potansiyelinin ise %BSS değeri 0,43 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.21. CLZ'nin farklı derişimlerde elde edilen diferansiyel puls voltamogramları. İç grafik: CLZ kalibrasyon eğrisi. (pH 9,0 BR).

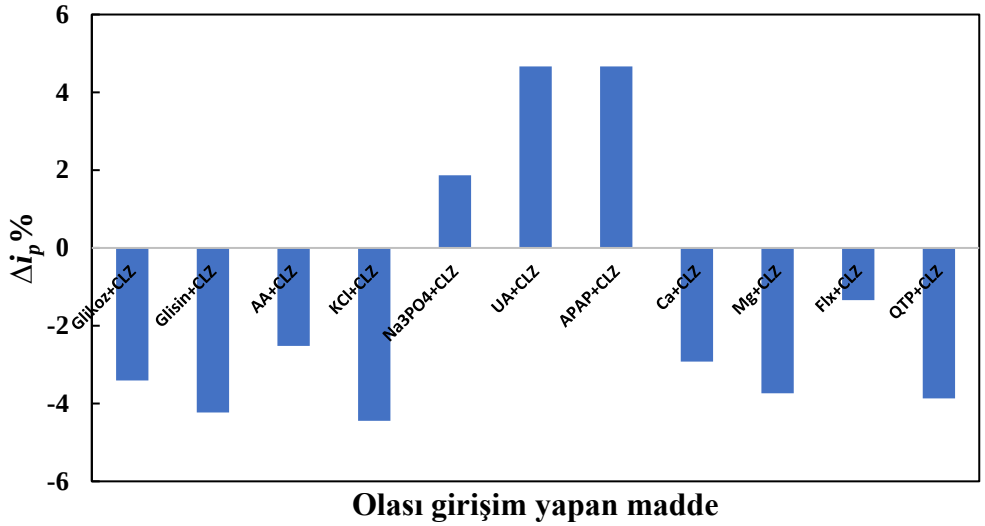
Çizelge 3.3. CLZ kalibrasyonunda regresyon parametreleri.

Regresyon parametreleri	**CLZ**
Doğrusal çalışma aralığı, µM	0,010 – 0,5; 0,5 – 1000,0
Eğim (mA/µM)	0,3002 / 0,0015
Kesim noktası (mA)	0,046 / 0,139
Gözlenebilme sınırı (LOD), µM	0,003
Tayin sınırı (LOQ), µM	0,010
Regresyon katsayısı (R^2)	0,998/ 0,969
Pik potansiyelinin tekrarlanabilirlik, %[a]BSS	1,99
Pik akımının tekrarlanabilirlik, %[a]BSS	2,41
Pik potansiyelinin tekrarüretilebilirliği, %[a]BSS	0,43
Pik akımının tekrarüretilebilirliği, %[a]BSS	2,72

[a]BSS 5 ölçümün bağıl standart sapmasıdır.

3.2.7. Girişim Etkisi

Kan serumda ve idrarda doğal olarak bulunan bazı organik ve anorganik türler (glukoz, glisin, askorbik asit, K^+, Na^+, ürik asit, Ca^{2+}, Mg^{2+}) ve CLZ ile reçete edilebilen bazı ilaç etken maddeleri (asetaminofen (APAP), fluoksetin (flx) ve ketiapin (QTP)) için girişim etkisi çalışması gerçekleştirilmiştir. CLZ ve olası girişim yapan maddeler ortama 1:1 oranda ilave edilerek DPV voltamogramları alınmıştır. Elde edilen pik akımları CLZ'nin tek başına bulunduğu ortamların pik akımları ortalaması ve olası girişim yapan maddeler var iken elde edilen akım ortalamaları yardımıyla yüzde bağıl hatalar hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 3.22.'de verilmiştir.

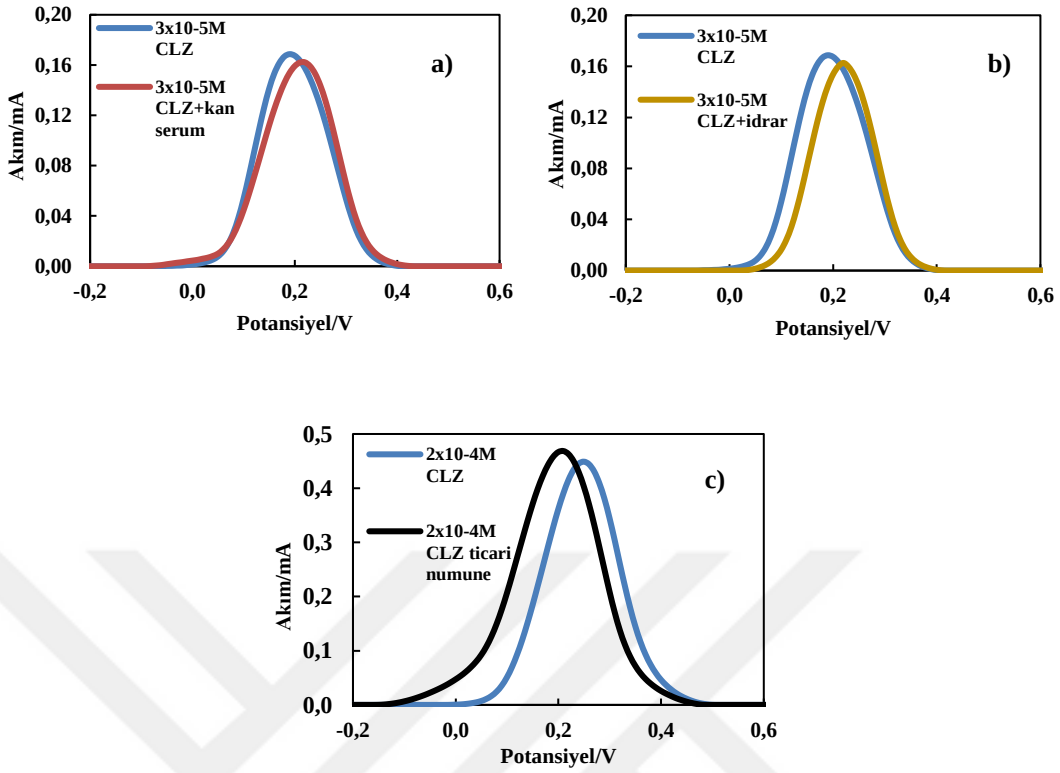


Şekil 3.22. CLZ: olası girişim yapan madde 1:1 olduğu durumda DPV yöntemiyle elde edilen % akım değerleri – olası girişim yapan maddeye karşı grafiği (pH 9,0 0,12 M BR destek elektrolit ortamı ve elektrot: AuNPs-polyCA-PGE).

Şekil 3.22. incelendiğinde, olası girişim yapan türlere ait çalışılan potansiyel penceresinde herhangi bir yükseltgenme pikine rastlanmamıştır. Girişim yapan türler varken CLZ'nin pik akımındaki değişimlerin yüzde bağıl hatası en fazla %4,66 civarındadır.

3.2.8. CLZ Gerçek Numune Çalışmaları

Geliştirilen yöntemin ve elektrodun doğruluğunu belirlemek için sentetik kan serum, idrar ve ticari ilaç örneği olmak üzere farklı örneklerde DPV voltamogramlardan yaralanarak (Şekil 3.23.) geri kazanım çalışması yapılmıştır. Ticari ilaç örneği olarak, tablet başına 25,0 mg CLZ içeren ilaç kullanılmıştır.



Şekil 3.23. CLZ tayini için geliştirilen yöntemde geri kazanım çalışması; a) kan serum, b) idrar, c) ticari numune içeren ortamlarda kaydedilmiş voltamogramlar.

Çizelge 3.4. Kan serum, idrar ve ticari ilaç örneğinden CLZ geri kazanım bulguları.

Numune	Yöntem	Gerçek numune	Eklenen miktar	Bulunan miktar	Geri kazanım, %	% [a]BSS
CLZ	DPV	Kan serum	30,0 µM	30,60 ± 0,31	102,00 ± 1,04	1,02
		İdrar	30,0 µM	30,07 ± 1,26	100,25 ± 4,20	4,19
		Tablet	25,0 mg	25,23 ± 0,86	100,90 ± 3,42	3,90

[a]BSS beş ölçümün bağıl standart sapmasıdır.

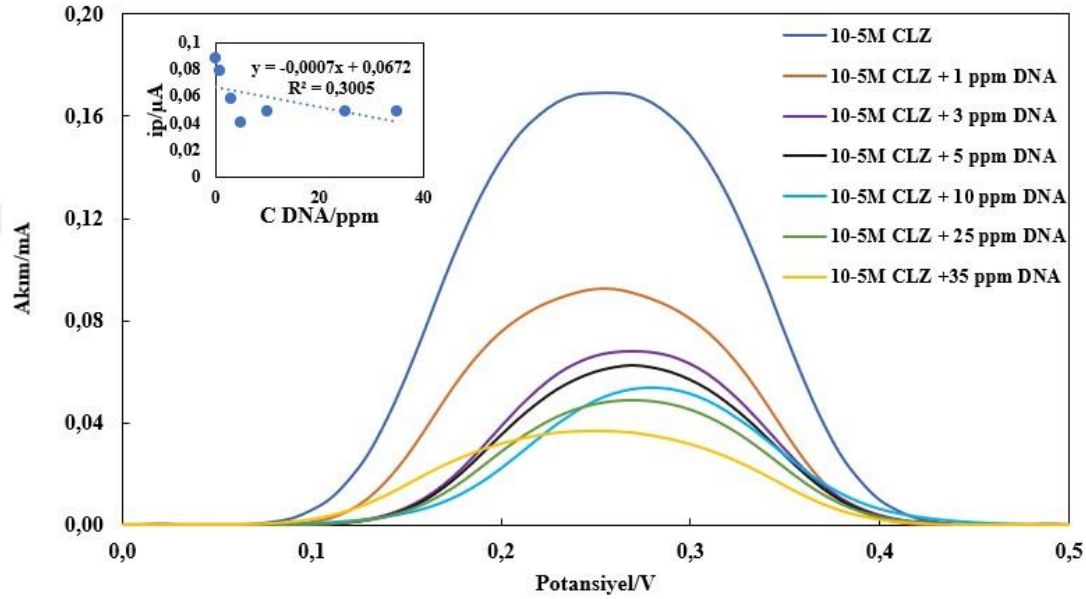
Çizelge 3.4.'te kan serum ve idrara eklenen 30 µM CLZ ve 25,0 mg ilaç etken maddesi için geri kazanım % değerleri sunulmuştur. DPV yönteminde %95 güven seviyesinde geri kazanım yüzdeleri kan serum için %102,00, idrar için %100,25 ve ticari ilaç örneği için %100,90 olarak bulunmuştur.

3.2.9. CLZ ile DNA Etkileşim Çalışması

CLZ ilaç etken maddesinin uzun süreli kullanımında DNA'da mutajenezis ya da karsinojenezise sebep olma olasılığını yorumlayabilmek için CLZ yükseltgenme piki üzerinden DNA etkileşimleri incelenmiştir. pH 7,4 PBS destek elektrolit ortamında (pH 7,4

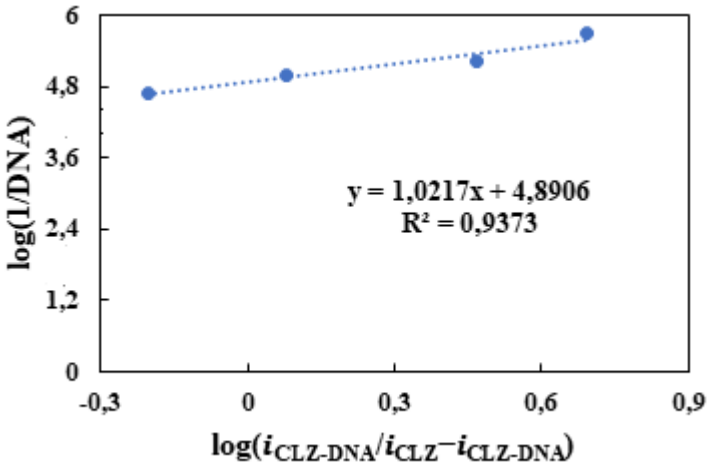
PBS seçilmesinin sebebi fizyolojik pH olmasıdır.) AuNPs-polyCA-PGE elektrot kullanılarak 10^{-5} M CLZ ilaç etken maddesinin 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 35 ppm ve 45 ppm DNA varlığında DPV yönteminde akım-potansiyel voltamogramları incelenmiştir. Şekil 3.24.'te CLZ'nin pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları verilmiştir. İç grafikte ise $C_{DNA}-_{ip}$ grafiği (pH 7,4 PBS) sunulmuştur.

CLZ ilaç etken maddesinin pik akımı, azalırken pik potansiyeli ise dsDNA ilave edildikçe pozitif değerlere doğru kaymaktadır (Şekil 3.22.).



Şekil 3.24. CLZ'nin farklı derişimlerdeki DNA ortamında DPV voltamogramları. İç grafik: $C_{DNA}-i_p$ grafiği (pH 7,4).

CLZ'nin DNA ile etkileşiminin K bağlanma sabitini hesaplamak için DNA varken ve yokken elde edilen DPV voltamogramlarından $\log(i_{CLZ\text{-}DNA}/i_{CLZ}-i_{CLZ\text{-}DNA})-\log(1/DNA)$ grafiği çizilmiş, grafiğin kesim noktasının antilog değerinden K bağlanma sabiti hesaplanmıştır. Şekil 3.25.'te $\log(i_{CLZ\text{-}DNA}/i_{CLZ}-i_{CLZ\text{-}DNA})-\log(1/DNA)$ grafiği sunulmuştur (Deepa vd., 2018).



Şekil 3.25. log($i_{CLZ\text{-}DNA}/i_{CLZ}-i_{CLZ\text{-}DNA}$)−log(1/DNA) grafiği.

Şekil 3.25.'te sunulan log($i_{CLZ\text{-}DNA}/i_{CLZ}-i_{CLZ\text{-}DNA}$)−log(1/DNA) grafiğinin kesim noktası 4,891'dir. Bu değerin antilog değeri hesaplandığında K bağlanma sabiti $7{,}77\times10^{4}$ M^{1-} olarak hesaplanmıştır. Literatürde DNA ile ilaç etken maddesi arasındaki etkileşime ait bağlanma sabiti değerinin $10^{4}-10^{6}$ M^{1-} aralığında olduğunda etkileşim türünün interkalasyon olduğu belirtilmiştir (Erkmen vd., 2022; Temerk vd., 2015). Ayrıca, CLZ yükseltgenme pik potansiyeli, DNA derişimi arttıkça +0,30V değerlerinden +0,35V değerlerine, yaklaşık +0,05V'luk pozitif potansiyellere doğru kaymaktadır. Bu sonuç; CLZ ilaç etken maddesinin DNA ile etkileşim türünün ağırlıklı olarak interkalasyon olduğunu destekler niteliktedir (Erkmen vd., 2022).

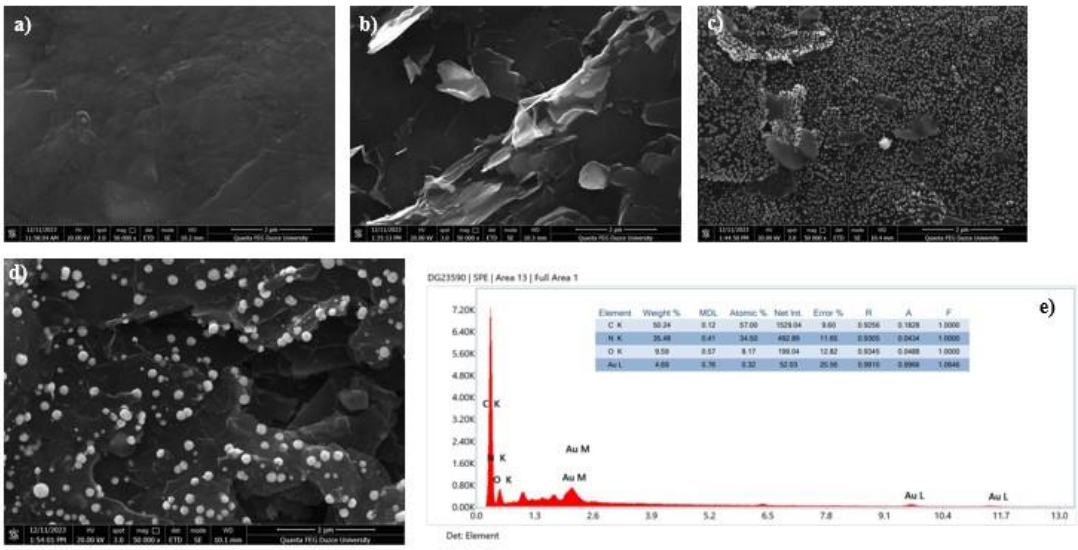
CLZ-DNA etkileşiminin hesaplanan bağlanma sabitinden yola çıkılarak reaksiyonun standart Gibbs serbest enerjisi $\Delta G^{0} = -RTlnK$ eşitliği yardımıyla ΔG^{0}= -27,9 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Standart Gibbs serbest enerjisi değerinin negatif olması reaksiyonun kendiliğinden yürüyen, istemli bir etkileşim olabileceğini göstermektedir.

3.3. CPZ ile Yapılan Voltametrik Çalışmalar

3.3.1. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojileri

CPZ tayini için geliştirilen PGE elektrotlarda elektrot yüzeyi bir ön işleme tabi tutulmadan modifiye edilmiştir. PGE elektrot yüzeyinin poly(L-Ala) ve Au nanoparçacıklarla modifikasyonu Bölüm 2.5'te ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan PGE,

poly(L-Ala)-PGE, AuNPs-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrotların yüzey morfolojileri için yüzey FE-SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.26.). Şekil 3.26.a.'da görüldüğü üzere, PGE yüzeyi grafit tabakalardan oluşmaktadır. Şekil 3.26.b.'de L-alaninin elektropolimerizasyonu sonrası kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyinin değiştiği ve holler oluştuğu görülmektedir. PGE yüzey Au nanoparçacıklarla kaplandığında yüzeyde parlak partiküller oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 3.26.c.). Yüzey poly(L-Ala)-Au nanoparçacıklarla birlikte modifiye edildiğinde yüzeyin üç boyutlu hale geldiği görülmektedir (Şekil 3.26.d.). Ayrıca, AuNPs-poly(L-Ala)-PGE yüzeyinin EDX spektrumu da alınmıştır (Şekil 3.26.e.). Spektrumda Au, N ve O'ya ait pikleri yüzeyde AuNPS-poly(L-Ala) varlığını destekler niteliktedir.



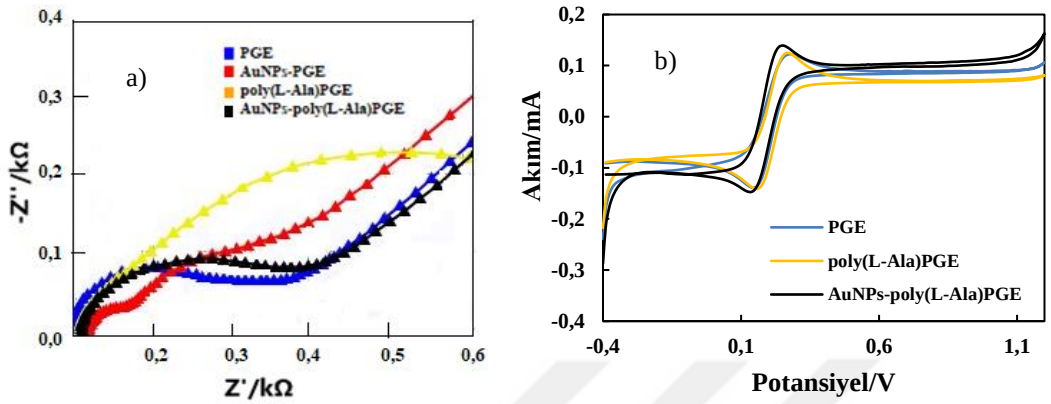
Şekil 3.26. a) PGE, b) poly(L-Ala)-PGE, c) AuNPs-PGE d) AuNPs-poly(L-Ala)-PGE FE-SEM görüntüleri d) AuNPs-poly(L-Ala)-PGE için EDX spektrumu.

3.3.2. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Modifiye elektrotların (PGE, AuNPs-PGE, poly(L-Ala)-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)-PGE) elektrokimyasal karakterizasyonları, elektrokimyasal empedans spektroskopi ile incelenmiştir. PGE, AuNPs-PGE, poly(L-Ala)-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)-PGE modifiye elektrotlar için 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob ile elektrokimyasal Nyquist diyagramları elde edilmiştir (Şekil 3.27.a.). PGE yüzeyi AuNPs-poly(L-Ala) ile modifiye edildiğinde yüzeyin iletkenliğinde çok az da olsa bir iyileşme elde edilmiştir.

Şekil 3.27.b.'de ise 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probda 0,05 V/s tarama hızında (-0,4)−(+0,9)−(-0,4) V potansiyel aralığında PGE, poly(L-Ala)-PGE

ve AuNPs-poly(L-Ala)-PGE modifiye elektrotlar için dönüşümlü voltamogramlar verilmiştir. AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot yüzeyinde elektron aktarımının nispeten daha hızlı olduğu görülmektedir (Tüzün vd., 2023).



Şekil 3.27. Hazırlanan modifiye elektrotların a) Nyquist eğrileri b) CV voltamogramları (0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob için υ: 0,035 V/s).

Modifiye elektrotların (PGE, AuNPs-PGE, poly(L-Ala)-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)-PGE), aktif yüzey alanları CV yöntemiyle (0,005, 0,015, 0,025, 0,035, 0,050) V/s tarama hızı aralığında redoks probuyla incelenmiş, sonuçlar aşağıda sunulmuştur:

0,559 (±0,061) cm^2, PGE
0,692 (±0,074) cm^2, AuNPs-PGE
0,589 (±0,085) cm^2, poly(L-Ala)-PGE
0,695 (±0,025) cm^2, AuNPs-poly(L-Ala)-PGE.

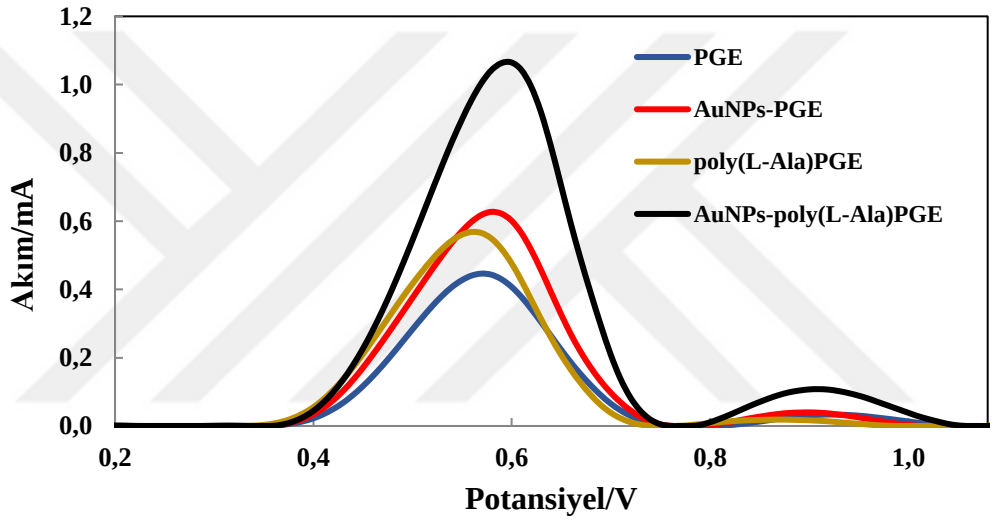
Buradan görüldüğü üzere; AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrodun yüzey alanı PGE'nin yüzey alanından 1,24 kat daha yüksektir. Elektrot aktif yüzey alanı AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot için nispeten yüksek hesaplanmıştır.

Daha sonra, hazırlanan modifiye elektrotların (PGE, AuNPsPGE, poly(L-Ala)-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)-PGE) yüzeyinde 0,50 mM CPZ'nin yükseltgenme davranışı Britton-Robinson (BR) destek elektrolit ortamında (pH 4,5), (-0,2) − (+0,9) V potansiyel aralığında DPV yönteminde incelenmiştir. (Şekil 3.28.)

Şekil 3.28.'de görüldüğü üzere klorpromazinin, hazırlanan bütün elektrotların yüzeyinde iki yükseltgenme piki gözlenmiştir. PGE elektrot kullanıldığında CPZ'nin birinci yükseltgenme piki 0,569 V'de 0,446 mA, ikinci yükseltgenme piki 0,919 V'de 0,034 mA'dır.

AuNPs-PGE kullanıldığında CPZ'nin birinci yükseltgenme piki 0,579 V'de 0,627 mA, ikinci yükseltgenme piki 0,899 V'de 0,040 mA'dır. poly(L-Ala)-PGE kullanıldığında CPZ'nin birinci yükseltgenme piki 0,559 V'de 0,568 mA, ikinci yükseltgenme piki 0,869 V'de 0,019 mA'dır. AuNPs-poly(L-Ala)-PGE kullanıldığında ise CPZ'nin birinci yükseltgenme piki 0,599 V'de 1,065 mA, ikinci yükseltgenme piki 0,909 V'de 0,108 mA'dır.

AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot, PGE elektrot ile karşılaştırıldığında birinci pik için yükseltgenme pik akımı 2,39 kat artmıştır. CPZ tayini, birinci yükseltgenme pik potansiyelinden gerçekleştirildiğinde en uygun elektrot olarak AuNPs-poly(L-Ala)-PGE seçilmiştir.

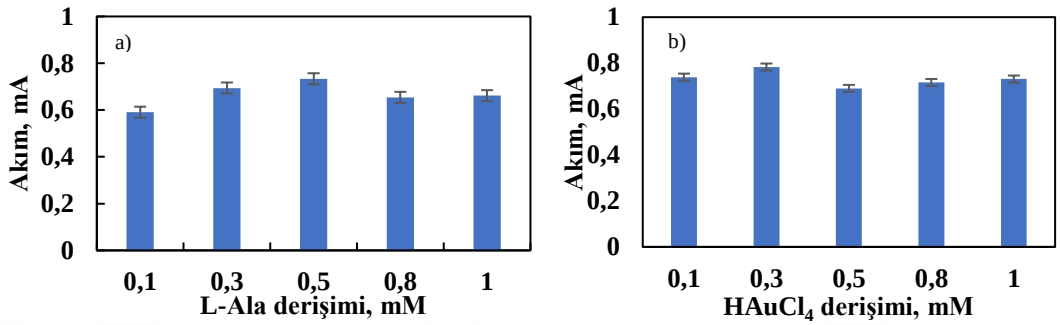


Şekil 3.28. 0,50 mM CPZ tayininde farklı modifiye elektrotlar ile DPV voltamogramlar (pH 4,5 BR).

3.3.3. Modifiye Elektrodun Bileşiminin Belirlenmesi

CPZ tayini için birinci yükseltgenme pik sinyali temel alınarak, $HAuCl_4$ ve L-Ala derişimleri optimize edilmiştir. Bu amaçla, PGE elektrotların yüzeyi $HAuCl_4$ çözeltisi ve L-Ala monomeri bir arada iken CV yöntemi ile altın nanoparçacıkları ve poly(L-Alanin) olarak kaplanmıştır. Modifiye elektrodu oluşturan $HAuCl_4$ derişimi 0,3 mM da sabit tutularak L-Ala derişimleri (0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1,0) mM aralığında değiştirilerek elektropolimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan elektrotlar ile CPZ'nin DPV voltamogramları alınmıştır. Her bir derişim için elde edilen DPV pik akımları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.29.a.). Şekil 3.29.a.'da görüldüğü üzere L-Alaninin derişiminin artmasıyla pik akımlarında hafif de olsa bir artış gözlenmektedir. En yüksek pik akımının ve en simetrik pik şeklinin gözlendiği derişim

olan 0,5 mM L-Ala optimize derişim olarak alınmıştır. Daha sonra, L-Ala derişimi 0,5 mM'da sabit tutularak $HAuCl_4$ derişimleri (0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1,0) mM aralığında değiştirilmiştir (Şekil 3.29.b.). Şekil 3.29.b.'de görüldüğü gibi, 0,3 mM $HAuCl_4$ derişiminde en yüksek pik akımı ve en simetrik pik şekli elde edildiği için, 0,3 mM derişim optimize derişim olarak belirlenmiştir.

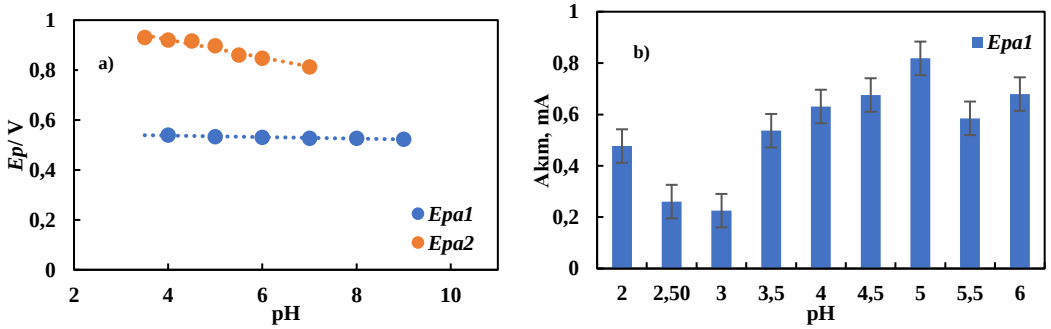


Şekil 3.29. 0,50 mM CPZ pik akımlarına a) L-Ala derişiminin etkisi b) $HAuCl_4$ derişiminin etkisi (0,1 M BR destek elektrolit ortamı, pH 5,0).

3.3.4. pH Etkisi

CPZ'nin voltametrik davranışı BR'nin pH değerinin 2,0 ile 11,0 arasında değiştiği bir aralıkta incelenmiştir. Şekil 3.30.a.'da görüldüğü üzere CPZ'nin birinci yükseltgenme pik potansiyeli ve ikinci yükseltgenme pik potansiyeli pH artışından fazla etkilenmediği düşünülmüştür. Buradan, CPZ'nin birinci yükseltgenme mekanizmasında ve ikinci yükseltgenme mekanizmasında protonların yer almadığı söylenebilir.

Ayrıca Şekil 3.30.b.'de görüldüğü üzere CPZ'nin birinci yükseltgenme piki için anodik yükseltgenme akımının en yüksek olduğu pH 5,0 değeridir. Bu değer optimize pH değeri olarak alınmıştır.

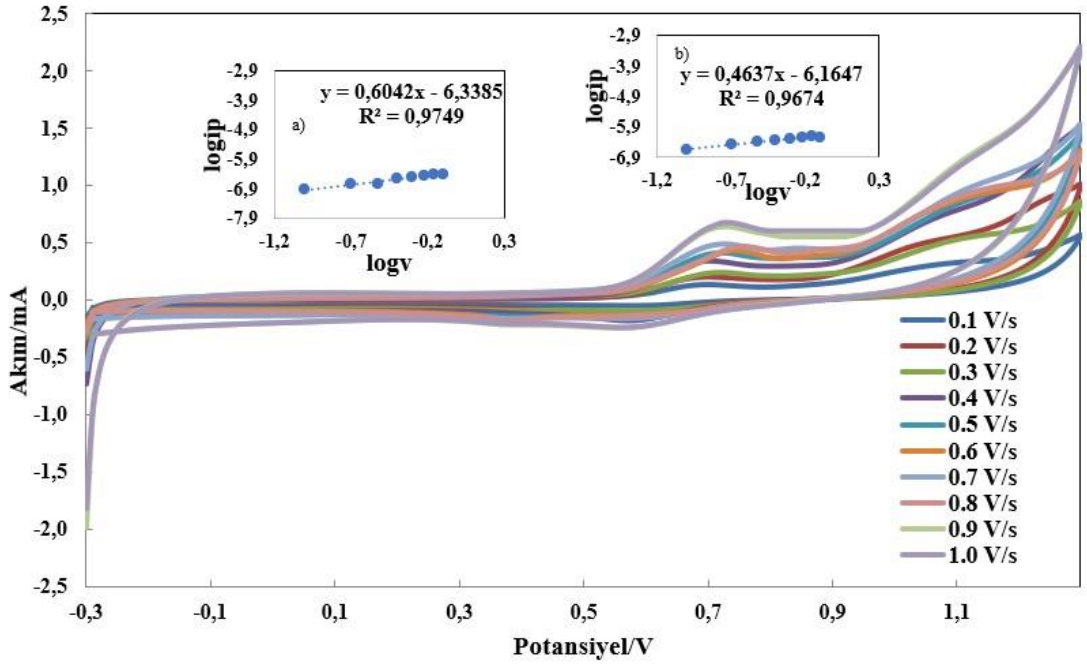


Şekil 3.30. a) 0,50 mM CPZ'nin DPV voltamogramlarından elde edilen birinci (E_{pa1}) ve ikinci yükseltgenme pik potansiyellerinin (E_{pa2}) – pH ile değişimi b) i_{p1} – pH değişimi. AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot yüzeyinde, 0,1 M BR tampon ortamında (pH 2,0 – 6,0).

3.3.5. Tarama Hızı Etkisi ve Olası CPZ Yükseltgenme Mekanizması

0,50 mM CPZ'nin pH 5,0 BR destek elektrolit ortamında elektrokimyasal yükseltgenme indirgenme mekanizmasını belirleyebilmek için dönüşümlü voltametride tarama hızı çalışması yapılmıştır. Tarama hızları Şekil 3.31.'de görüldüğü üzere (0,100, 0,200, 0,300, 0,400, 0,500, 0,600, 0,700, 0,800, 0,900 ve 1,00) V/s olarak çalışılmıştır. CV voltamogramları incelendiğinde CPZ'ye ait, +0,70V'de bir yükseltgenme piki, +1,00V'de ikinci bir yükseltgenme piki gözlenmiştir. Geri taramada ise herhangi bir indirgenme pikine rastlanmamıştır. Tarama hızı arttıkça birinci anodik (yükseltgenme) pik potansiyeli (E_{pa1}) ve ikinci anodik pik potansiyeli (E_{pa2}) daha pozitif değerlere kaymıştır (Şekil 3.31). Piklerin pozitif potansiyellere kayması reaksiyonların tersinmez olabileceğini düşündürmüştür.

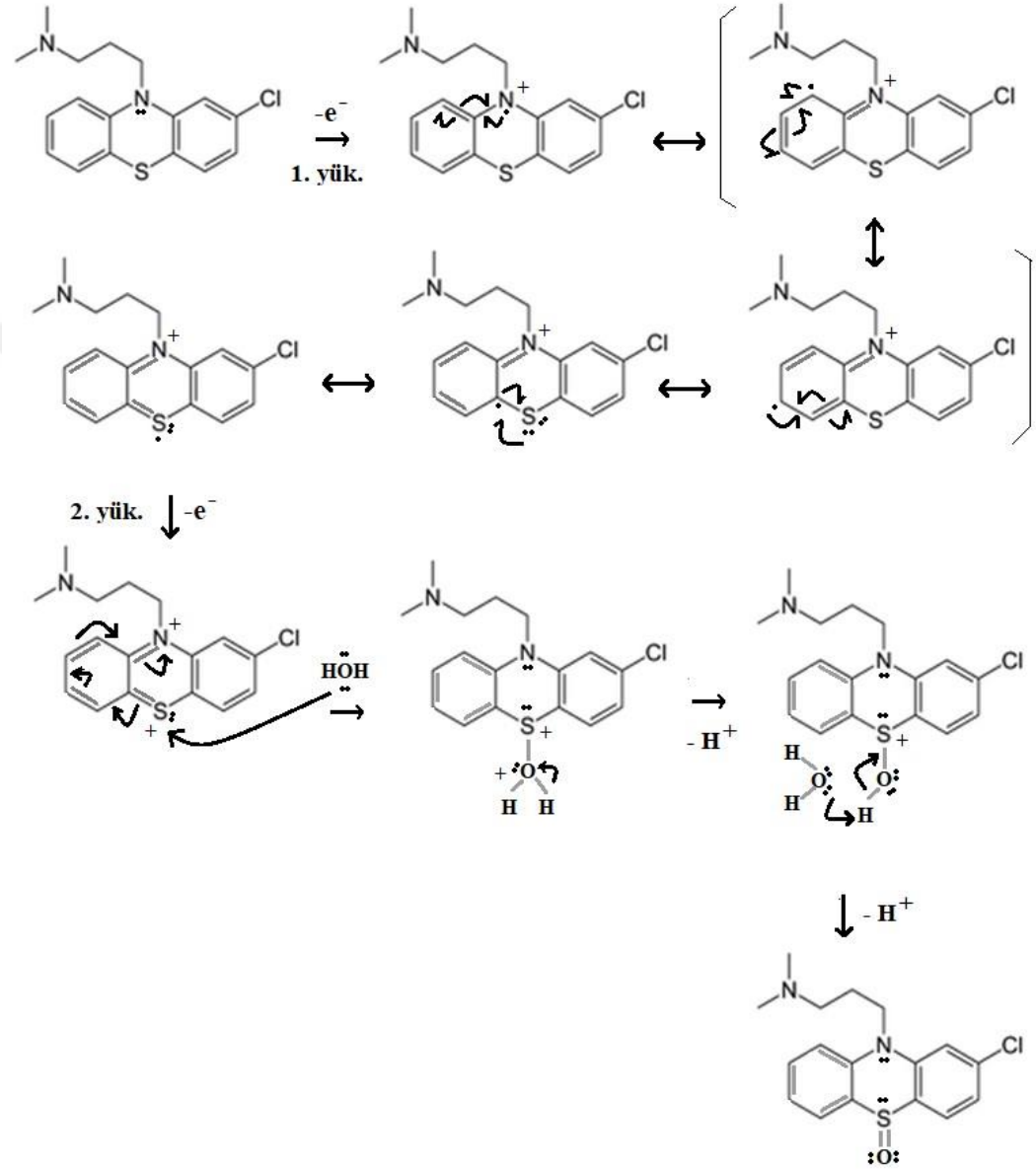
Şekil 3.31.'de iç grafikler olarak sunulan logυ−logi_p grafiklerinde görüldüğü üzere E_{pa1} için eğim 0,604 ve E_{pa2} için eğim 0,464 şeklindedir. Buradan CPZ'nin birinci yükseltgenmesi adsorpsiyon ve difüzyon kontrollü olduğu söylenebilir (Wang, 2001).



Şekil 3.31. 5,0×10^{-4} M CPZ'nin pH 5,0 BR destek elektrolit ortamında 0,1–1,0 Vs^{-1} tarama hızı aralığında CV voltamogramları. İç grafikler: **a)** CPZ tayininde birinci yükseltgenme piki (E_{pa1}), **b)** ikinci yükseltgenme piki (E_{pa2}) için logυ−logi_p grafikleri.

CPZ'nin tarama hızı ve pH çalışmalarına göre Şekil 3.30.'da olası bir yükseltgenme mekanizması önerilmiştir. Şekil 3.32.'de görüldüğü gibi, CPZ molekülün birinci yükseltgenme mekanizmasında trisiklik halkadaki amin ucundan bir elektron verilerek + yüklü

kimyasal türün oluştuğu düşünülmüştür. Oluşan kimyasal tür, ikinci yükseltgenme mekanizmasında trisiklik halkadaki kükürt ucundan bir elektron daha vererek 2+ yüklü iyonuna dönüştüğü varsayılmıştır. Sonrasında, su nükleofil olarak katılmaktadır. Önerilen mekanizma literatürde Purushothama vd. (2018) tarafından da desteklenmiştir.



Şekil 3.32. Olası CPZ yükseltgenme mekanizması.

3.3.6. CPZ'nin Elektrokimyasal Analizi

CPZ'nin birinci yükseltgenme pik potansiyelinin (E_{pa1}), ikinci yükseltgenme pikinden (E_{pa2}) daha düşük olması, pik akımının ise daha yüksek ve pik şeklinin daha keskin olması

nedeniyle elektrokimyasal analiz çalışmaları birinci yükseltgenme piki üzerinden gerçekleştirilmiştir. CPZ tayini için (0,05−400,0) µM derişim aralığında DPV voltamogramları alınmıştır. Yapılan kalibrasyon çalışmasına ait voltamogramlar Şekil 3.33.'te sunulmuştur. Şekil 3.33.'te iç grafikte görüldüğü üzere ise iki farklı doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bunlardan ilkinin doğrusal çalışma aralığı (0,005−1,0) µM, ikincisinin doğrusal çalışma aralığı (1,0−400,0) µM'dır. Her iki kalibrasyon eğrisine dair lineer regresyon eşitlikleri aşağıda sunulmuştur:

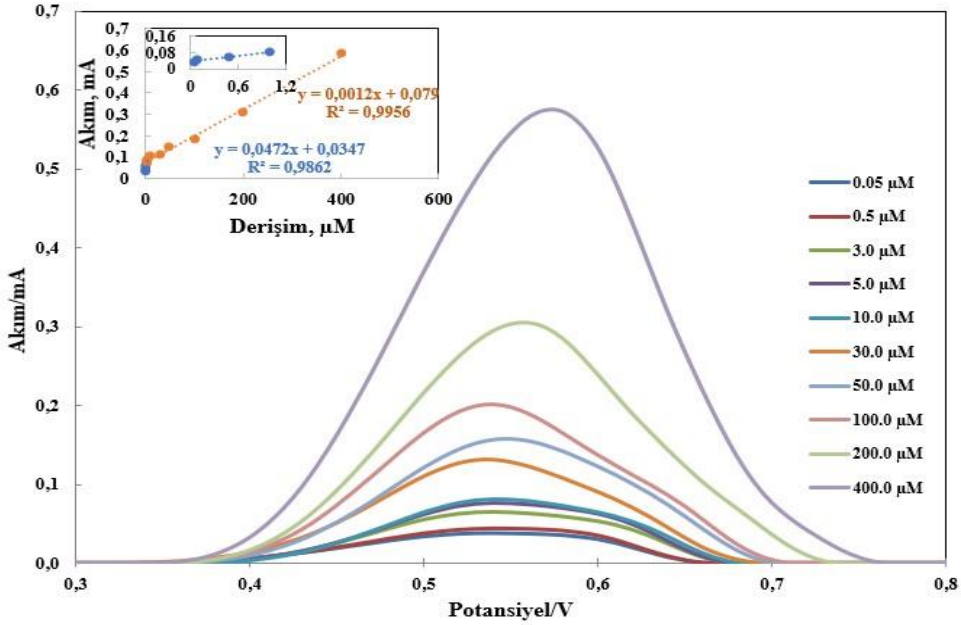
i_{p1}=0,0012C_{CPZ}+0,079 R^2=0,9956.

i_{p2}=0,0472C_{CPZ}+0,0347 R^2=0,9862.

Analitik performans parametreleri olan gözlenebilme sınırı LOD ve tayin sınırı LOQ değerleri birinci doğrusal kalibrasyon eğrisi regresyon eşitliğinden hesaplanmıştır. Çizelge 3.5.'te görüldüğü üzere LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,0017 µM ve 0,0055 µM olarak hesaplanmıştır.

AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot için tekrarlanabilirlik ölçümleri gün içi farklı saatlerde alınmıştır. Beş ölçümün ortalaması alınarak modifiye elektrodun CPZ tayininde birinci yükseltgenme pik akımının tekrar edilebilirliği %BSS 4,14, pik potansiyelinin tekrar edilebilirliği %BSS 1,42 olarak hesaplanmıştır.

Tamamen aynı deneysel koşullarda ve şartlarda kaplanan beş modifiye elektrot ile CPZ'nin DPV voltamogramları alınarak tekrarüretilebilirlik test edilmiştir. Çizelge 3.5'te görüldüğü üzere birinci yükseltgenme pik akımının tekrarüretilebilirliği %BSS 5,30, pik potansiyelinin tekrarüretilebilirliği ise %BSS 0,68 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.33. CPZ diferansiyel puls voltamogramları (BR destek elektrolit ortamı, AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot). İç grafik: CPZ kalibrasyon eğrisi.

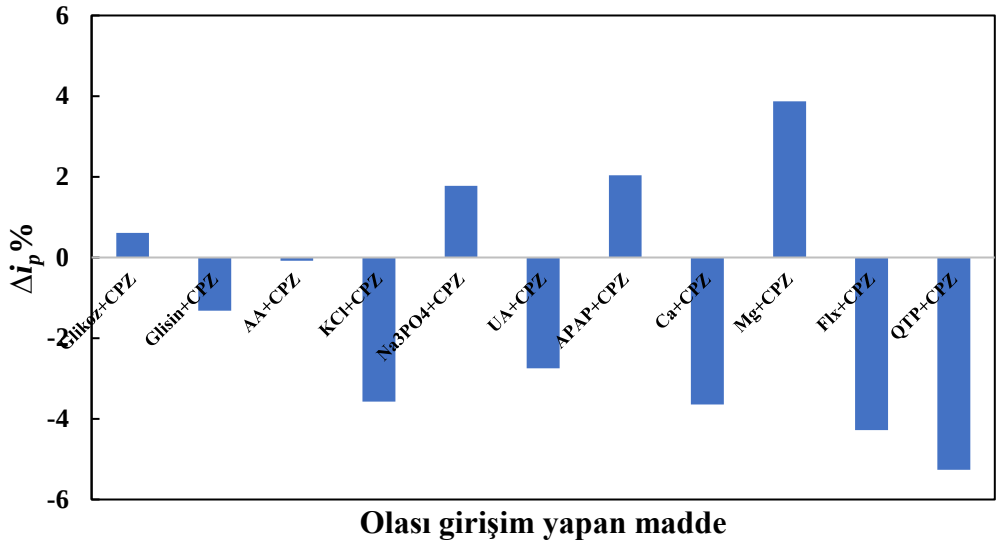
Çizelge 3.5. CPZ kalibrasyonunda regresyon parametreleri.

Regresyon parametreleri	**CPZ**
Doğrusal çalışma aralığı, µM	0,005 – 1,0; 1,0 – 400,0
Eğim (mA/µM)	0,0472 / 0,0012
Ekstrapolasyon noktası (mA)	0,0347 / 0,0790
Gözlenebilme sınırı (LOD), µM	0,0017
Tayin sınırı (LOQ), µM	0,0055
Regresyon katsayısı (R^2)	0,9862 / 0,9956
Pik potansiyelinin tekrarlanabilirliği, %[a] BSS	1,42
Pik akımının tekrarlanabilirliği, %[a] BSS	4,14
Pik potansiyelinin tekrarüretilebilirliği, %[a] BSS	0,68
Pik akımının tekrarüretilebilirliği, %[a] BSS	5,30

[a]BSS beş ölçümün bağıl standart sapmasıdır.

3.3.7. Girişim Etkisi

Kan serumda ve idrarda doğal olarak bulunan bazı organik ve anorganik türler (glukoz, glisin, askorbik asit, K^+, Na^+, ürik asit, Ca^{2+}, Mg^{2+}) ve CPZ ile reçete edilebilen bazı ilaç etken maddeleri (asetaminofen (APAP), fluoksetin (flx) ve ketiapin (QTP)) için girişim etkisi çalışması gerçekleştirilmiştir. Maddeler, CPZ bulunan ortama 1:1 oranda ilave edilerek DPV voltamogramları alınmıştır. Elde edilen pik akımları CPZ'nin tek başına bulunduğu ortamların pik akımları ortalaması ile karşılaştırılarak yüzde bağıl hatalar hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 3.34.'te verilmiştir.

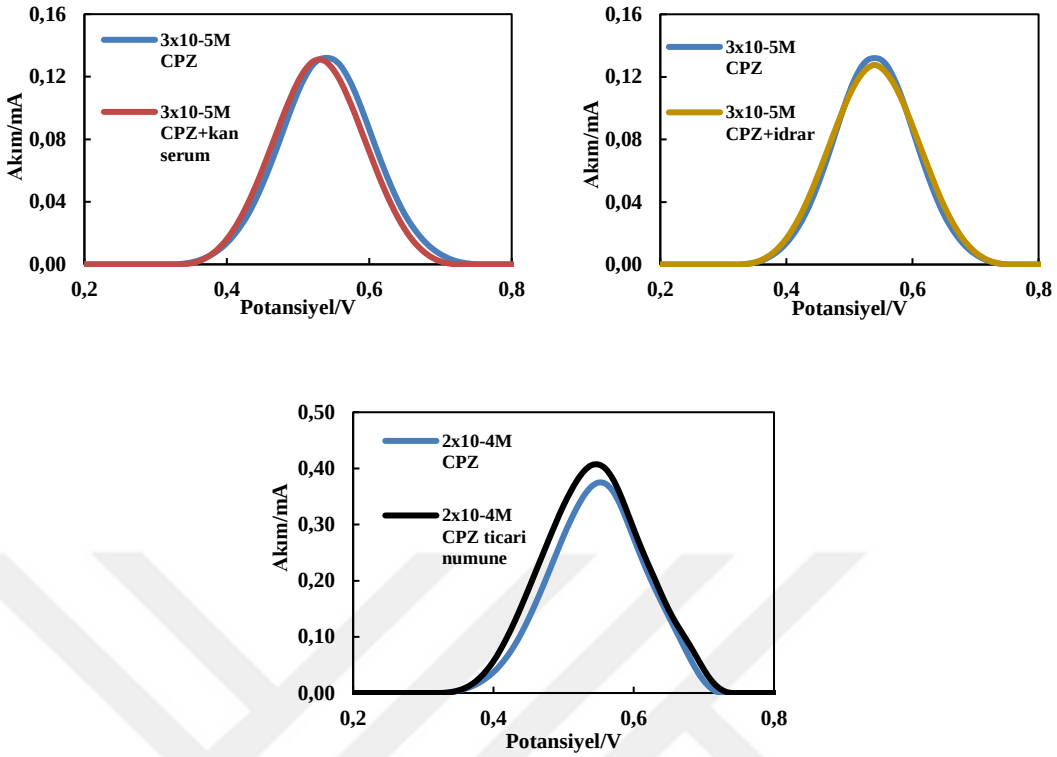


Şekil 3.34. CPZ : olası girişim yapan madde 1:1 olduğu durumda DPV yöntemiyle elde edilen % akım değerleri – olası girişim yapan maddeye karşı grafiği (0,12 M BR destek elektrolit ortamı, pH 5,0 ve elektrot: AuNPs-poly(L-Ala)-PGE).

Şekil 3.34. incelendiğinde CPZ'nin pik akımındaki değişimlerin olası girişim yapan kimyasal türler varken yüzde bağıl hata olarak en fazla %5,26 civarında olduğu görülmektedir. Ayrıca olası girişim yapan türlere ait çalışılan potansiyel penceresinde herhangi bir yükseltgenme pikine rastlanmamıştır.

3.3.8. CPZ Gerçek Numune Çalışmaları

İnsan sentetik kan serumu, idrar ve ticari ilaç örneği olmak üzere farklı örneklerde DPV voltamogramlardan yaralanarak (Şekil 3.35.) geri kazanım çalışması yapılmıştır. Ticari ilaç örneği olarak tablet başına 100,0 mg CPZ içeren ilaç kullanılmıştır.



Şekil 3.35. CPZ tayini için geliştirilen yöntemde geri kazanım çalışması; a) kan serum, b) idrar, c) ticari numune içeren ortamlarda kaydedilmiş voltamogramlar.

Çizelge 3.6. Kan serum, idrar ve ticari ilaç örneğinden CPZ geri kazanım bulguları.

Numune	Yöntem	Gerçek numune	Eklenen miktar	Bulunan miktar	Geri kazanım, %	%[a]BSS
CPZ	**DPV**	**Kan serum**	30,0 µM	29,64 ± 0,53	98,78 ± 1,78	1,80
		İdrar	30,0 µM	29,76 ± 0,79	99,20 ± 2,64	2,66
		Tablet	100,0 mg	98,70 ± 1,60	98,70 ± 1,60	1,62

[a]BSS beş ölçümün bağıl standart sapmasıdır.

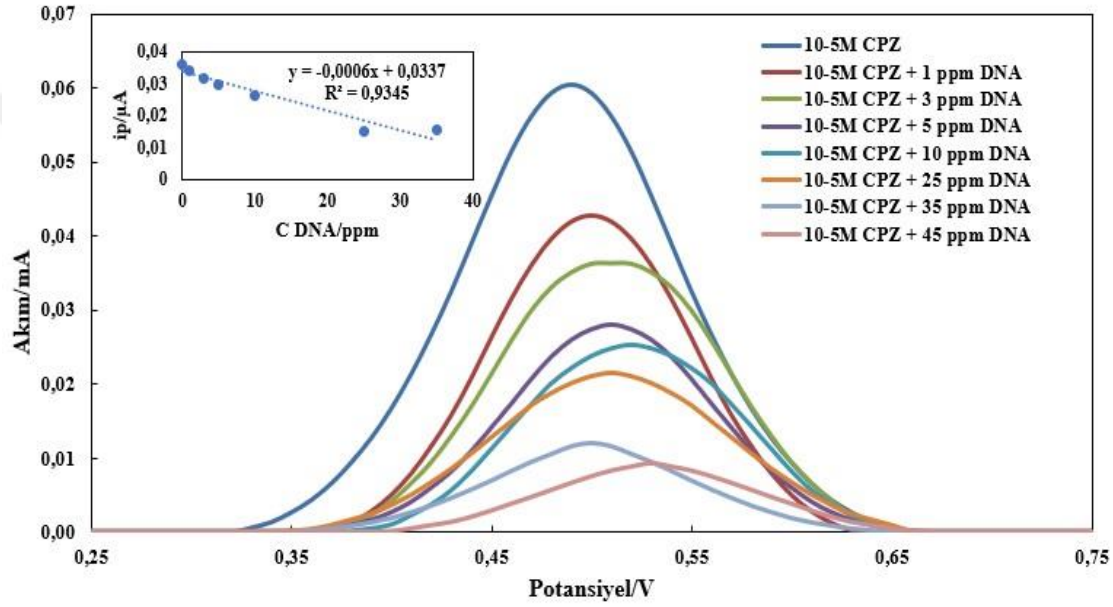
Çizelge 3.6'da kan serum ve idrara eklenen 30 µM CPZ ve 100,0 mg ilaç etken maddesi için geri kazanım % değerleri sunulmuştur. DPV yönteminde %95 güven seviyesinde geri kazanım yüzdeleri kan serum için %98,78, idrar için %99,20 ve ticari ilaç örneği için %98,70'tir.

3.3.7. CPZ ile DNA Etkileşim Çalışması

CPZ ilaç etken maddesinin uzun süreli kullanımında DNA'da mutajenezis ya da karsinojenezis'e sebep olma olasılığını yorumlayabilmek için CPZ yükseltgenme piki üzerinden DNA etkileşimleri incelenmiştir. pH 4,3 ABS destek elektrolit ortamında (pH 4,3 seçilmesinin sebebi fizyolojik pH olmasıdır.) AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot kullanılarak

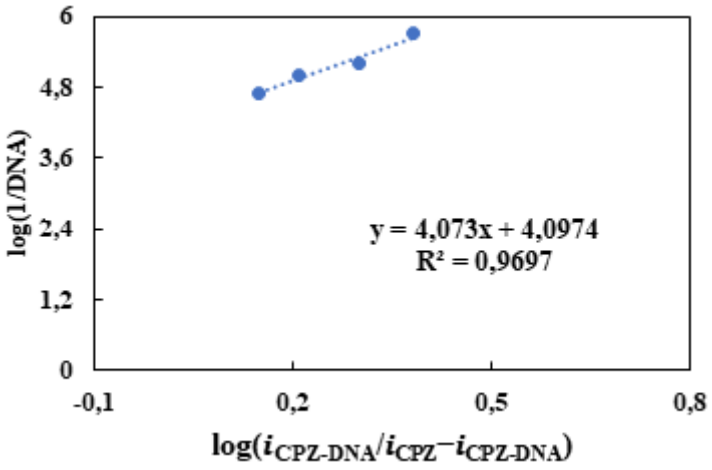
10^{-5} M CPZ ilaç etken maddesinin 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 35 ppm ve 45 ppm DNA varlığında DPV yönteminde akım-potansiyel voltamogramları incelenmiştir. Şekil 3.36.'da CPZ'nin pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları verilmiştir. İç grafikte ise $C_{DNA}-ip$ grafiği (pH 4,3 ABS) sunulmuştur.

10^{-5} M CPZ ilaç etken maddesinin pH 4,3 ABS destek elektrolit ortamında 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 35 ppm ve 45 ppm DNA varlığında DPV yönteminde voltamogramları incelendiğinde CPZ ilaç etken maddesinin pik akımlarında düşüş meydana gelmiştir.



Şekil 3.36. CPZ'nin pik akımının DNA derişimi ile değişiminin DPV voltamogramları. İç grafik: $C_{DNA}- i_p$ grafiği (pH 4,3).

CPZ ve DNA arasındaki etkileşimin türünün yorumlanabilmesi adına K bağlanma sabiti hesaplaması DPV yöntemi ile elde edilen akımlar kullanılarak yapılmıştır. $\log(i_{CPZ\text{-}DNA}/i_{CPZ}-i_{CPZ\text{-}DNA})-\log(1/DNA)$ grafiği çizilmiş (Deepa vd., 2018), grafiğin kesim noktasının antilog değerinden K bağlanma sabiti hesaplanmıştır. Şekil 3.37.'de $\log(i_{CPZ\text{-}DNA}/i_{CPZ}-i_{CPZ\text{-}DNA})$-log(1/DNA) grafiği sunulmuştur.



Şekil 3.37. log($i_{CPZ\text{-}DNA}/i_{CPZ}-i_{CPZ\text{-}DNA}$)−log(1/DNA) grafiği.

Şekil 3.37.'de sunulan log($i_{CPZ\text{-}DNA}/i_{CPZ}-i_{CPZ\text{-}DNA}$)−log(1/DNA) grafiğinin kesim noktası 4,0974 biçimindedir. Bu değerin antilog değeri hesaplandığında K bağlanma sabiti $1{,}25\times10^4$ M^{1-} olarak bulunmuştur. Çalışılan tüm antipsikotik ilaçların DNA bağlanma sabiti değerleri 10^3-10^4 M^{1-} mertebesindedir. Literatürde kanser hücreleri ile etkileşiminde bulunan ve DNA dizilimine müdahale eden folik asit ve dimetil sülfoksitin DNA bağlanma sabiti değerleri sırasıyla $1{,}37\times10^5$ ve 1.92×10^5 M^{-1} şeklindedir (Li vd., 2021). Aynı zamanda antikanser ilaç olan etoposid için ise yine bağlanma sabiti değeri 10^6 M^{1-} mertebesindedir (Burden vd., 1996). Bu karşılaştırmaya göre, antipsikotik ilaç etken maddelerinin muhtemel DNA hasarına neden olmayacağı sonucuna varılmıştır.

Literatürde DNA ile ilaç etken maddesi arasındaki etkileşime ait bağlanma sabiti değerinin 10^4-10^6 M^{1-} aralığında olduğunda etkileşim türünün interkalasyon olduğu belirtilmiştir (Erkmen vd., 2022; Temerk vd., 2015). Ayrıca, Şekil 3.33.'te görüldüğü gibi CPZ yükseltgenme pik potansiyeli, DNA derişimi arttıkça +0,50V değerlerinden +0,55V değerlerine, daha pozitif potansiyellere doğru kaymaktadır. Bu sonuç; CPZ ilaç etken maddesinin DNA ile etkileşim türünün ağırlıklı olarak interkalasyon olduğunu destekler niteliktedir (Erkmen vd., 2022).

CPZ-DNA etkileşiminin hesaplanan bağlanma sabitinden yola çıkılarak reaksiyonun standart Gibbs serbest enerjisi $\Delta G^0 = -RTlnK$ eşitliği yardımıyla ΔG^0= -23,4 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Standart Gibbs serbest enerjisi değerinin negatif olması reaksiyonun kendiliğinden yürüyen, istemli bir etkileşim olabileceğini göstermektedir.

4. TARTIŞMA

OLA ile yapılan voltametrik çalışmalar sonucunda:

Elektrot yüzey alanını artırmak suretiyle olanzapin ilaç etken maddesinin gözlenebilme sınırını iyileştirmek için PGE elektrot yüzeyi kronoamperometri ile ön muamele edildikten sonra Au nanoparçacıklarla ve L-Alaninin elektropolimerizayonu ile eş zamanlı olarak (AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE) modifiye edilmiştir.

Modifiye edilen pre-PGE, poly(L-Ala)/pre-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrotların FE-SEM görüntüleri ile yüzey morfolojisi incelenmiş, AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot yüzeyinde L-Ala elektropolimerizasyonu sonrası Au nanoparçacıkların dağılımının sağlandığı görülmüştür. Ayrıca AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot için EDX spektrumunda Au piklerinin olması yüzeyde Au varlığını; N ve O piklerinin olması da yüzeyde poly(L-Ala) varlığını destekler niteliktedir. Bahsi geçen modifiye elektrotların CV yöntemi ile voltamogramlarının karşılaştırılmasında ve EIS yöntemiyle aktif yüzey aktif alanları karşılaştırıldığında AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrodun en iletken elektrot olduğu sonucuna varılmıştır. pre-PGE, AuNPs/pre-PGE, poly(L-Ala)/pre-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot yüzeylerinde OLA'nın elektrokimyasal yükseltgenme karakterizayonu incelenmiştir. DPV yöntemi ile elde edilen voltamogramlar incelendiğinde; pik akımı ve pik potansiyeli göz önüne alınırsa OLA için en uygun elektrodun AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrot olduğu sonucuna varılmıştır. Kullanılan DPV yöntemi için optimum cihaz parametreleri: step potansiyel: 0,01 V, pulse potansiyel: 0,2 V, pulse zamanı: 0,02 s, tarama hızı: 0,1 V/s olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen elektrot için optimum koşullar belirlenmiştir. (Optimum koşullar: 0,5 mM $HAuCl_4$, 1,5 mM L-Ala, pH 4,5 BR).

Farklı derişimlerde alınan DPV voltamogramları yoluyla elde edilen regrasyon sonuçlarına göre; gözlenebilme sınırı (LOD) 0,081 μM, doğrusal çalışma aralığı (0,271−1,0) μM ile (1,0−1000,0) μM olarak tespit edilmiştir.

AuNPs-poly(L-Ala)/pre-PGE elektrodun pik akımının tekraredilebilirliği, %BSS 2,61, tekrarüretilebilirliği %BSS 2,42 ve pik potansiyelinin tekraredilebilirliği %BSS 1,90 ve tekrarüretilebilirliği %BSS 0,42 olarak tespit edilmiştir.

OLA için elektrokimyasal yöntem geliştirme aşamasında olası girişim yapan türler incelenmiştir. Bu amaçla, kan serumda ve idrarda doğal olarak bulunan bazı elektrokimyasal türler ve OLA ile reçete edilebilen bazı ilaç etken maddelerinin (APAP, flx ve QTP) girişim etkisi çalışılmıştır. Çalışılan türlerin elektrokimyasal yükseltgenme pikleri çalışılan potansiyel penceresinde ve optimum pH'da gözlenmemiştir. Ancak türlerin OLA'nın yükseltgenme pikine olan etkisi %3,79 civarındadır.

Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine, insan sentetik kan serum örneklerine ve idrar numunelerine standart ekleme yöntemiyle uygulanmıştır. Elde edilen % geri kazanım değerleri ticari ilaç örneği (%99,00 ± 2,28), sentetik serum (%99,12 ± 1,79), idrar için (%97,09 ± 1,07) aralığındadır. Bu sonuçlar yöntemin çeşitli gerçek numunelere başarıyla uygulanabileceğini göstermektedir.

OLA−dsDNA etkileşimleri DPV yöntemiyle dsDNA derişimleri artırılarak OLA'ya ait yükseltgenme piki üzerinden incelenmiştir. pH 4,3 ABS destek elektrolit ortamında dsDNA derişimi arttıkça OLA ilaç etken maddesinin yükseltgenme sinyalleri düşmektedir. Buna göre OLA'nın DNA ile etkileştiği düşünülmüştür. Bu azalmadan yararlanarak OLA−dsDNA etkileşiminin bağlanma sabiti (K) hesaplanmıştır. Aynı zamanda dsDNA ilaveleri sonucunda OLA'nın yükseltgenme piki pozitif değerlere doğru kaymıştır. Elde edilen sonuçlar OLA'nın dsDNA ile etkileşiminin interkalasyon ağırlıklı olduğunu destekler niteliktedir. Hesaplanan bağlanma sabiti değerinden yararlanarak OLA−dsDNA etkileşiminin Gibss serbest enerji değeri (ΔG) hesaplanmıştır. Hesaplanan sonuca göre, OLA−dsDNA reaksiyonun kendiliğinden yürüdüğü sonucuna varılmıştır.

CLZ ile yapılan voltametrik çalışmalar sonucunda:

Elektrot yüzey alanını artırmak suretiyle klozapin ilaç etken maddesinin gözlenebilme sınırını iyileştirmek için PGE elektrot yüzeyi Au nanoparçacıklarla ve kafeik asitin elektropolimerizayonu ile eş zamanlı olarak (AuNPs-polyCA-PGE) modifiye edilmiştir.

Modifiye edilen PGE, AuNPs-PGE, polyCA-PGE ve AuNPs-polyCA-PGE elektrotların FE-SEM görüntüleri ile yüzey morfolojisi incelenmiş, AuNPs-polyCA-PGE elektrot yüzeyinde CA elektropolimerizasyonu sonrası Au nanoparçacıkların dağılımının

sağlandığı görülmüştür. Ayrıca AuNPs-polyCA-PGE elektrot için EDX spektrumunda Au piklerinin olması yüzeyde Au varlığını; O piklerinin olması da yüzeyde CA varlığını destekler niteliktedir. Bahsi geçen modifiye elektrotların CV yöntemi ile voltamogramlarının karşılaştırılmasında ve EIS yöntemiyle aktif yüzey aktif alanları karşılaştırıldığında AuNPs-polyCA-PGE elektrodun en iletken elektrot olduğu sonucuna varılmıştır. PGE, AuNPs-PGE, polyCA-PGE ve AuNPs-polyCA-PGE elektrot yüzeylerinde CLZ'nin elektrokimyasal yükseltgenme karakterizayonu incelenmiştir. DPV yöntemi ile elde edilen voltamogramlar incelendiğinde; pik akımı ve pik potansiyeli göz önüne alınırsa CLZ için en uygun elektrodun AuNPs-polyCA-PGE elektrot olduğu sonucuna varılmıştır. Kullanılan DPV yöntemi için optimum cihaz parametreleri: step potansiyel: 0,01 V, pulse potansiyel: 0,2 V, pulse zamanı: 0,02 s, tarama hızı: 0,1 V/s olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen elektrot için optimum koşullar belirlenmiştir. (Optimum koşullar: 0,1 mM $HAuCl_4$, 0,3 mM CA, pH 9,0 BR).

Farklı derişimlerde alınan DPV voltamogramları yoluyla elde edilen regrasyon sonuçlarına göre; gözlenebilme sınırı (LOD) 0,003 μM, doğrusal çalışma aralığı (0,010−0,5) μM ve (0,5−1000,0) olarak tespit edilmiştir.

AuNPs-polyCA-PGE elektrodun pik akımının tekraredilebilirliği, %BSS 2,41, tekrarüretilebilirliği %BSS 2,72 ve pik potansiyelinin tekraredilebilirliği %BSS 1,99 ve tekrarüretilebilirliği %BSS 0,43 olarak tespit edilmiştir.

CLZ için elektrokimyasal yöntem geliştirme aşamasında olası girişim yapan türler incelenmiştir. Bu amaçla, kan serumda ve idrarda doğal olarak bulunan bazı elektrokimyasal türler ve CLZ ile reçete edilebilen bazı ilaç etken maddelerinin (APAP, flx ve QTP) girişim etkisi çalışılmıştır. Çalışılan türlerin elektrokimyasal yükseltgenme pikleri çalışılan potansiyel penceresinde ve optimum pH'da gözlenmemiştir. Ancak türlerin CLZ'nin yükseltgenme pikine olan etkisi %4,66 civarındadır.

Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine, insan sentetik kan serum örneklerine ve idrar numunelerine standart ekleme yöntemiyle uygulanmıştır. Elde edilen % geri kazanım değerleri ticari ilaç örneği (%100,90 ± 3,42), sentetik serum (%102,00 ± 1,04), idrar için (%100,25 ± 4,20) aralığındadır. Bu sonuçlar yöntemin çeşitli gerçek numunelere başarıyla uygulanabileceğini göstermektedir.

CLZ−dsDNA etkileşimleri DPV yöntemiyle dsDNA derişimleri artırılarak CLZ'ye ait yükseltgenme piki üzerinden incelenmiştir. pH 7,4 PBS destek elektrolit ortamında dsDNA derişimi arttıkça CLZ ilaç etken maddesinin yükseltgenme sinyalleri düşmektedir. Buna göre CLZ'nin DNA ile etkileştiği düşünülmüştür. Bu azalmadan yararlanarak CLZ−dsDNA etkileşiminin bağlanma sabiti (K) hesaplanmıştır. Aynı zamanda dsDNA ilaveleri sonucunda CLZ'nin yükseltgenme piki pozitif değerlere doğru kaymıştır. Elde edilen sonuçlar CLZ'nin dsDNA ile etkileşiminin interkalasyon ağırlıklı olduğunu destekler niteliktedir. Hesaplanan bağlanma sabiti değerinden yararlanarak CLZ−dsDNA etkileşiminin Gibss serbest enerji değeri (ΔG) hesaplanmıştır. Hesaplanan sonuca göre, CLZ−dsDNA reaksiyonun kendiliğinden yürüdüğü sonucuna varılmıştır.

CPZ ile yapılan voltametrik çalışmalar sonucunda:

Elektrot yüzey alanını artırmak suretiyle klozapin ilaç etken maddesinin gözlenebilme sınırını iyileştirmek için PGE elektrot yüzeyi Au nanoparçacıklarla ve L-Alaninin elektropolimerizayonu ile eş zamanlı olarak (AuNPs-poly(L-Ala)-PGE) modifiye edilmiştir.

Modifiye edilen PGE, AuNPs-PGE, poly(L-Ala)-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrotların FE-SEM görüntüleri ile yüzey morfolojisi incelenmiş, AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot yüzeyinde L-Ala elektropolimerizasyonu sonrası Au nanoparçacıkların dağılımının sağlandığı görülmüştür. Ayrıca AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot için EDX spektrumunda Au piklerinin olması yüzeyde Au varlığını; N ve O piklerinin olması da yüzeyde poly(L-Ala) varlığını destekler niteliktedir. Bahsi geçen modifiye elektrotların CV yöntemi ile voltamogramlarının karşılaştırılmasında ve EIS yöntemiyle aktif yüzey aktif alanları karşılaştırıldığında AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrodun en iletken elektrot olduğu sonucuna varılmıştır. PGE, AuNPs-PGE, poly(L-Ala)-PGE ve AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot yüzeylerinde CPZ'nin elektrokimyasal yükseltgenme karakterizayonu incelenmiştir. DPV yöntemi ile elde edilen voltamogramlar incelendiğinde; pik akımı ve pik potansiyeli göz önüne alınırsa CPZ için en uygun elektrodun AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrot olduğu sonucuna varılmıştır. Kullanılan DPV yöntemi için optimum cihaz parametreleri: step potansiyel: 0,01 V, pulse potansiyel: 0,2 V, pulse zamanı: 0,02 s, tarama hızı: 0,1 V/s olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen elektrot için optimum koşullar belirlenmiştir. (Optimum koşullar: 0,3 mM $HAuCl_4$, 0,5 mM L-Ala, pH 5,0 BR).

Farklı derişimlerde alınan DPV voltamogramları yoluyla elde edilen regrasyon sonuçlarına göre; gözlenebilme sınırı (LOD) 0,0017 µM, doğrusal çalışma aralığı (0,005−1,0) µM ve (1,0−1000,0) µM olarak tespit edilmiştir.

AuNPs-poly(L-Ala)-PGE elektrodun pik akımının tekraredilebilirliği, %BSS 4,14, tekrarüretilebilirliği %BSS 5,30 ve pik potansiyelinin tekraredilebilirliği %BSS 1,42 ve tekrarüretilebilirliği %BSS 0,68 olarak tespit edilmiştir.

CPZ için elektrokimyasal yöntem geliştirme aşamasında olası girişim yapan türler incelenmiştir. Bu amaçla, kan serumda ve idrarda doğal olarak bulunan bazı elektrokimyasal türler ve CPZ ile reçete edilebilen bazı ilaç etken maddelerinin (APAP, flx ve QTP) girişim etkisi çalışılmıştır. Çalışılan türlerin elektrokimyasal yükseltgenme pikleri çalışılan potansiyel penceresinde ve optimum pH'da gözlenmemiştir. Ancak türlerin CPZ'nin yükseltgenme pikine olan etkisi %5,26 civarındadır.

Geliştirilen yöntem ticari ilaç örneklerine, insan sentetik kan serum örneklerine ve idrar numunelerine standart ekleme yöntemiyle uygulanmıştır. Elde edilen % geri kazanım değerleri ticari ilaç örneği (%98,70 ± 1,60), sentetik serum (%98,78 ± 1,78), idrar için (%99,20 ± 2,64) aralığındadır. Bu sonuçlar yöntemin çeşitli gerçek numunelere başarıyla uygulanabileceğini göstermektedir.

CPZ−dsDNA etkileşimleri DPV yöntemiyle dsDNA derişimleri artırılarak CPZ'ye ait yükseltgenme piki üzerinden incelenmiştir. pH 4,3 ABS destek elektrolit ortamında dsDNA derişimi arttıkça CPZ ilaç etken maddesinin yükseltgenme sinyalleri düşmektedir. Buna göre CPZ'nin DNA ile etkileştiği düşünülmüştür. Bu azalmadan yararlanarak CPZ−dsDNA etkileşiminin bağlanma sabiti (K) hesaplanmıştır. Aynı zamanda dsDNA ilaveleri sonucunda CPZ'nin yükseltgenme piki pozitif değerlere doğru kaymıştır. Elde edilen sonuçlar CPZ'nin dsDNA ile etkileşiminin interkalasyon ağırlıklı olduğunu destekler niteliktedir. Hesaplanan bağlanma sabiti değerinden yararlanarak CPZ−dsDNA etkileşiminin Gibss serbest enerji değeri (ΔG) hesaplanmıştır. Hesaplanan sonuca göre, CPZ−dsDNA reaksiyonun kendiliğinden yürüdüğü sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında antipsikotik ilaç sınıfına giren OLA, CLZ ve CPZ'nin elektrokimyasal davranışı, tayini ve dsDNA etkileşimi için yeni modifiye elektrotlar geliştirilmiştir. Öncelikle OLA için modifiye elektrot geliştirilmiştir. Bu amaçla; PGE elektrot yüzeyi ön muamele edildikten sonra çoklu CV yöntemi ile eş zamanlı Au nanoparçacıklar ve poly(L-Alanin) ile modifiye edilmiştir. CLZ için geliştirilen elektrotta ise PGE elektrot yüzeyi Au nanoparçacıklar ve poly(kafeik asit) ile; CPZ için ise PGE elektrot yüzeyi Au nanoparçacıklar ve poly(L-Alanin) ile modifiye edilmiştir. Hazırlanan elektrotların yüzey morfolojileri (FE-SEM ve EDX) elektrokimyasal karakterizasyonu (CV ve EIS) gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elektrot bileşimi ve deneysel şartlar optimize edilmiştir. Optimum şartlarda DPV yöntemiyle kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Doğrusal çalışma aralığı, LOD, LOQ değerleri belirlenmiştir. Daha sonra olası girişim yapan türlerin etkisi incelenmiştir. Geliştirilen yöntemin uygulanabilirliği ve doğruluğu ticari ilaç örneklerine, sentetik serum ve insan idrar numunelerine uygulanarak test edilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerin doğrusal çalışma aralığı bütün antipsikotik ilaç etken maddelerin akut toksisite kan serum derişim aralığını içine almaktadır. Böylece, yanlışlıkla fazla doz alımında, çoklu ilaç kullanımlarında, gen polimorfizmi söz konusu olduğunda geliştirilen yöntemin bir alternatif ve öncül çalışma olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında aynı zamanda OLA, CLZ ve CPZ'nin DNA ile etkileşimleri incelenmiştir. Her üç madde için ilaç-DNA bağlanma sabitleri belirlenmiştir ($K_{OLA}=6{,}45\times10^{3}$ M^{1-}, $K_{CLZ}=7{,}77\times10^{4}$ M^{1-}, $K_{CPZ}=1{,}25\times10^{4}$ M^{1-}). Elde edilen sonuçlara göre antipsikotik ilaçların DNA ile antikanser ilaçları kadar etkin bir etkileşime girmediği sonucuna varılmıştır.

Mevcut tez çalışmasında çalışılan antipsikotik ilaç etken maddeleri olarak OLA, CLZ ve CPZ seçilmesinin sebebi; elektrokimyasal aktif olmaları sebebiyle voltametrik uygulamalarda kullanılabilirlikleri ve bu ilaç etken maddelerinin Türkiye'de ticari ilaç örnekleri ile tedavi uygulamalarının oluşudur.

KAYNAKLAR

Aflatoonian, M.R., Tajik, S., Mohtat, B., Aflatoonian, B., Shoaie, I.S., Beitollahi, H., Zhang, K., Jang, H.W., & Shokouhimehr, M. (2020). Direct electrochemical detection of clozapine by RuO_2 nanoparticles-modified screen-printed electrode. *Royal Society of Chemistry, 10,* 13021-13028.

Ahmed, H.M., Mohamed, M.A., & Salem, W.M. (2015). New voltammetric analysis of Olanzapine analysis in tablets and human urine samples by modified carbon paste sensor electrode incorporating gold nanoparticles and glutamine in a micellar medium. *Analytical Methods.* https.//doi.org/ 10.1039/C4AY02450H.

Ahmadzadeh, S., Karimi, F., Atar, N., Sartori, E.R., & Faghih-Mirzaei, E. (2017). Synthesis of CdO nanoparticles using direct chemical precipitation method: Fabrication of novel voltammetric sensor for square wave voltammetry determination of chlorpromazine in pharmaceutical samples. *Inorganic and Nanometal Chemistry, 47*(3), 347-353.

Allender, W.J., Archer, A.W., & Dawson, A.G. (1983). Extraction and analysis of chlorpromazine and its major metabolites in post mortem material by enzymic digestion and HPLC. *Journal of Analytical Toxicology, 7*(4), 203-206.

Aman, T., Firdous, S., Nisa, & A.U.N. (2005). Determination of olanzapine by UV spectrophotometry and non-aquous titration. *Jour. Chem. Soc. Pak., 27*(2), 163-167.

Arvand, M., Orangpour, S., & Ghodsi, N. (2015). Differential pulse stripping voltammetric determination of the antipsychotic medication olanzapine at a magnetic nanocomposite with a core-shell structure. *RSC Adv., 5,* 46095-46130.

Arvand, M., & Palizkar, B. (2013). Development of a modified electrode with amine-functionalized TiO2/multi-walled carbon nanotubes nanocomposite for electrochemical sensing of the atypical neuroleptic drug olanzapine. *Materials Science and Engineering C, 33,* 4876-4883.

Arvand, M., & Pourhabib, A. (2019). Surfactant-assisted voltammetric determination of olanzapine at amine functionalized TiO2/multi-walled carbon nanotubes nanocomposite. *Journal of Analytical Chemistry, 74*(11), 1096-1103.

Arvand, M., & Shiraz, M.G. (2012). Voltammetric determination of clozapine in pharmaceutical formulations and biological fluids using an in situ surfactant-modified carbon ionic liquid electrode. *Electroanalysis, 24*(3), 683-690.

Arslan, E. (2016). *Elektrokimyasal yöntemler ile monometalik paladyum ve bimetalik paladyum-altın nanopartikül modifiye poliprolin film elektrotların geliştirilmesi ve analitik uygulamaları.* Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Bailey, D.N., & Guba, J.J. (1979). Gas-chromatographic analysis for chlorpromazine and some of its metabolites in human serum, with use of a nitrogen detector. *Clinical Chemistry, 7,* 1211-1215.

Bakker, E., & Quin, Y. (2006). Electrochemical sensors. *Anal Chem, 78,* 3965-3984.

Beitollahi, H., Tajik, S., Aflatoonian, M.R., Nejad, F.G., Zhang, K., Asl, M.S., Le, Q.V., Cha, J.H., Shokouhimehr, M., & Peng, W. (2020). A novel screen-printed electrode modified by graphene nanocomposite for detecting clozapine. *Int. J. Electrochem. Sci., 15,* 9271-9282.

Bernalte, E., Sanchez, C.M., & Gil, E.P. (2012). Gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for anodic stripping voltammetric determination of mercury in ambient water samples. *Sensors and Actuators B: Chemical, 161,* 669-674.

Beytur, M., Kardaş, M., Akyıldırım, O., Özkan, A., Bankoğlu, B., Yüksek, H., Yola, M.L., & Atar, N., (2018). A highly selective and sensitive voltammetric sensor with molecularly imprinted polymer-based silver@gold nanoparticles/ionic liquid modified glassy carbon electrode for determination of ceftizoxime. *Journal of Molecular Liquids, 251,* 212-217.

Biryol, I., & Erk, N. (2003). Voltammetric, spectrophotometric, and high-performance liquid chromatographic analysis of olanzapine. *Analytical Letters, 36*(11), 2497-2513.

Bishara, D., & Taylor, D.M. (2008). Upcoming agents for the treatment of schizophrenia: Mechanism of action, efficacy, and tolerability. *Drugs, 68*(16), 2269-2292.

Brown, C.A., Telio, S., Warnock, C.A., & Wong, A.H.C. (2013). Clozapine toxicity and hepatitis. *Journal of Psychopharmacology, 33*(4), 570-571.

Budak, F. (2020). *Eritromisinin elektrokimyasal davranışlarının DNA biyosensörleri ile incelenmesi.* Yüksek Lisans Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.

Burden, D.A., Kingma, P.S., Froelich-Ammon, S.J., Bjornsti, M.A., Patchan, M.W., Thompson, R.B., & Osheroff, N. (1996). Topoisomerase II-etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *The Journal of Biological Chemistry, 271*(46), 29238-29244.

Callaghan, J.T., Bergstrom, R.F., Ptak, L.R., & Beasley, C.M. (1999). Olanzapine. *Clinical Pharmacokinetics, 37,* 177-193.

Caymaz, B. (2019). *İmidazo(1,2-α)piridin türevlerinin sentezi, karakterizasyonu ve DNA etkileşimlerinin çalışılması.* Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.

Cernat, A., Tertiş, M., Sandulescu, R., Bedioui, F., Cristea, A., & Cristea, C. (2015). Electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for acetaminophen detection: A review. *Analytica Chimica Acta, 886,* 16-28.

Chandra, P., Noh, H.B., Won, M.S., & Shim, Y.B. (2011). Detection of daunomycin using phosphatidylserine and aptamer co-immobilized on Au nanoparticles deposited conducting polymer. *Biosensors and Bioelectronics, 26,* 4442-4449.

Chlorpromazine, serum. https://mlabs.umich.edu/tests/chlorpromazine-serum.

Cizmarova, B., Hubkova, B., Bolerazska, B., Marekova, M., & Birkova, A. (2020). Caffeic acid: a brief overview of its presence, metabolism, and bioactivity. *Bioactive Compounds in Health and Disease, 3*(4), 74-81.

Deepa, R.R., Arulraj, A.A.D., Mideen, A.K.A.S., Gandhidasan, R.R., & Vasantha, V.S.V.S. (2018). Evaluation of antioxidant property of quinones and calculation of their binding constant values with DNA by electrochemical technique. *Der Pharma Chemica, 10*(5), 69-78.

Dokur, M., Pancar-Gülmez, G., & Uslu-Kuzudişli, S. (2014). Clinical findings of emergence after olanzapine overdosage: Pediatric case report and review of literature. *Journal of Academic Emergency Medicine, 5,* 100-106.

Dordevic, S.B., Perkovic-Vukcevic, N., Antunovic, M., Kilibarda, V., Vukovic-Ercogovic, G., Jovic-Stovic, J., & Vucinic, S. (2022). Olanzapine poisoning in patients treated at the National Poison Control Centre in Belgrade, Serbia in 2017 and 2018: a brief review of serum concentrations and clinical symptoms. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 73*(2), 126-130.

El-Shal, M.A. (2013). Electrochemical studies for the determination of quetiapine fumarate and olanzapine antipsychotic drugs. *Advanced Pharmaceutical Bulletin, 3*(2), 339-344.

Elgrishi, N., Rountree, K.J., McCarthy, B.D., Rountree, E.S., Eisenhart, T.T., & Dempsey, J.L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education, 95,* 197-206.

Erdinç, A. (2019). Eriochrome black T modifiye kalem grafit elektrot ile voltammetrik atorvastatin tayini. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Erkmen, C., Unal, D.N., Kurbanoglu, S., Eren, G., & Uslu, B. (2022). Evaluation of the interaction of cinacalcet with calf thymus dsDNA: Use of electrochemical, spectrofluorimetric, and molecular docking methods. *Biosensors, 12,* 278.

Erol, A. (2020). *İlaç-DNA etkileşimine dayalı elektrokimyasal biyosensörlerin tasarımı ve uygulamaları.* Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Farhadi, K., & Karimpour, A. (2007). Electrochemical behavior and determination of clozapine on a glassy carbon electrode modified by electrochemical oxidation. *Analytical Sciences, 23,* 479-483.

Farhadi, K., Yamchi, R.H., & Sabzi, R. (2007). Electrochemical study of interaction between clozapine and DNA and its analytical application. *Analytical Letters, 40,* 1750-1762.

Fitoz, A. (2021). *Bazı ksantin türevlerinin modifiye kalem grafit elektrotta elektrokimyasal tayini ve DNA Etkileşimleri.* Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Freitas, R.E. (2005). What is nanomedicine? *Nanomedicine, 51,* 325-341.

Ganjali, M.R., Nejad, F.G., Beitollahi, H., Jahani, S., Rezapour, M., & Larijani, B. (2017). Highly sensitive voltammetric sensor for determination of ascorbic acid using graphite screen printed electrode modified with ZnO/Al_2O_3 nanocomposite. *Int. J. Electrochem. Sci., 12,* 3231-3240.

Ghanbari, M.H., Norouzi, Z., & Amiri, A. (2023). Application of nickel-doped graphene nanotubes to modified GCE as a sensitive electrochemical sensor for the antipsychotic drug clozapine in spiked human blood serum samples. *Journal of Iranian Chemical Society, 20,* 1179-1189.

Ghanbari, M.H., Shahdost-Fard, F., Rostami, M., Khoshroo, A., Sobhani-Nasab, A., Gholipour, N., Salehzadeh, H., Ganjali, M.R., Rahimi-Nasrabadi, M., & Ahmadi, F. (2019). Electrochemical determination of the antipsychotic medication clozapine by a carbon paste electrode modified with a nanostructure prepared from titania nanoparticles and copper oxide. *Microchimica Acta, 186*(698), 1-10.

Gowda, J.I., Hanabaratti, R.M., Pol, P.D., Sheth, R.C., Joshi, P.P., & Nandibewoor, S.T. (2022). Manganese oxide nanoparticles modified electrode for electrosensing of antipsychotic drug olanzapine. *Chemical Data Collections, 38,* 100824.

Govender, T., Riley, T., Ehtezazi, T., Garnett, M.C., Stolnik, S., Illum, L., & Davis, S.S. (2000). Defining the drug incorporation properties of PLA–PEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics, 199,* 95-110.

Gök, M.Z., & Özdemir, L. (2015). Nanoteknolojinin sağlık alanında kullanımı ve hemşirenin sorumlulukları. *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi, 18,* 3.

Hariska, K.V., Swamy, B.E.K, Ganesh, P.H., & Jayadevappa, H. (2019). Electrochemical oxidation of haematoxylin at poly(alanine) modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *J Electroanal Chem, 832,* 486-492.

Heineman, W.R., & Kissinger, P.T. (1980). Analytical electrochemistry: methodology and applications of dynamic techniques. *Analytical Chemistry, 52*(5), 138-151.

Hernandez-Santos, D., Diaz-Gonzalez, M., Gonzalez-Garcia, M.B., & Costa-Garcia, A. (2004). Enzymatic genosensor on streptavidin modified screen-printed carbon electrodes. *Analytical Chemistry, 76,* 6887-6893.

Hert, D.G., Fredlake, C.P., & Barron, A.E. (2008). Advantages and limitations of nextgeneration sequencing technologies: A comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis, 29,* 4618-4626.

Hezard, T., Fajerweg, K., Evrard, D., Colliere, V., Behra, P., & Gros, P. (2012). Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg(II) trace analysis. *J Electroanal Chem, 664,* 46-52.

Hodgins, S., Müller-Isberner, R., Freese, R., Tiihonen, J., Repo-Tiihonen, E., Eronen, M., Eaves, D., Hart, S., Webster, C., Levander, S., Tuninger, E., Ross, D., Vartiainen, H., & Kronstrand, R. (2007). A comparison of general adult and forensic patients with schizophrenia living in the community. *International Journal of Forensic Mental Health, 6,* 63-75.

Hu, G., Ma, Y., Guo, Y. & Shao, S. (2008). Electrocatalytic oxidation and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid on the gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta, 53,* 6610-6615.

Ikeda, K., Ikawa, K., Kozumi, T., Yokoshige, S., Horikawa, S., & Morikawa, N. (2012). Development and validation of a GC-EI-MS method with reduced adsorption loss for the quantification of olanzapine in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 403,* 1823-1830.

Iqbal, M., Saeed, A., & Iqbal-Zafar, S. (2009). FTIR spectrophotometry, kinetics and adsorption isotherms modeling, ion exchange, and EDX analysis for understanding the mechanism of Cd^{2+} and Pb^{2+} removal by mango peel waste. *Journal of Hazardous Materials, 164,* 161-171.

Jankowska-Sliwinska, J., Dawgul, M., & Pijanowska, D.G. (2014). DNA intercalation-based amperometric biosensor for chlorpromazine detection. *Procedia Engineering, 87,* 747-750.

Katz, E., Willner, I., & Wang, J. (2004). Electroanalytical and bioelectroanalytical systems based on metal and semiconductor nanoparticles. *Electroanalysis, 16,* 19-44.

Kazmiruk, V. (2012). *Scanning electron microscopy.* IntechOpen.

Khanfous, S.N., Nasser, N.A.H., Al-Rufaie, M.M. (2017). Modern spectrophotometric approach for assessment chlorpromazine hydrochloride drug. *Iranian Journal of Organic Chemistry, 9*(3), 2161-2167.

Kounaves, S.P. (1997). Voltammetric techniques. F.A. Settle (Ed.). *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, (pp. 709-726). Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.

Koventhan, C., Pandiyan, R., Chen, S.M., & Lo, A.Y. (2023). Nickel molybdate/cobalt molybdate nanoflakes by one-pot synthesis approach for electrochemical detection of antipsychotic drug chlorpromazine in biological and environmental samples. *Journal of Environmental Chemical Engineering, 11*(3), 110121. https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110121.

Kreuter, J. (2004). Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 4*, 484-488.

Kubendhiran, S., Sakthivel, R., Chen, S.M., Anbazhagan, R. & Tsai, H.C. (2019). A novel design and synthesis of ruthenium sulfide decorated activated graphite nanocomposite for the electrochemical determination of antipsychotic drug chlorpromazine. *Composites Part B, 168*, 282-290.

Kunzmann, A., Andersson B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A., & Fadel, B. (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta, 1810*, 361-373.

Laerdahl, J.K., Wesendrup, R., & Schwerdtfeger, P. (2000). D- or L-Alanine: That is the question. *ChemPhysChem, 1*(1), 60-62.

Lazanas, A.C., & Prodromidis, M.I. (2023). Electrochemical impedance spectroscopy – a tutorial. *ACS Measurement Science, 3, 162-193.*

Li, C., Cui, Y., Ren, J., Zou, J., Kuang, W., Sun, X., Hu, X., Yan, Y., & Ling, X. (2021). Novel cells-based electrochemical sensor for investigating the interactions of cancer cells with molecules and screening multitarget anticancer drugs. *Analytical Chemistry*, *93*(3), 1480-1488.

Li, J., Zhou, L., Han, X., & Liu, H. (2008). Direct electrochemistry of hemoglobin based on Gemini surfactant protected gold nanoparticles modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical, 135*(1), 322-326.

Li, T., Xu, J., Zhao, L., Shen, S., Yuan, M., Liu, W., Tu, Q., Yu, R., & Wang, J. (2016). Au nanoparticles/poly(caffeic acid) composite modified glassy carbon electrode for voltammetric determination of acetaminophen. *Talanta, 159,* 356-364.

Lopez-Munoz, F., Alamo, C., Cuenca, E., Shen, W.W., Clervoy, P., & Rubio, G. (2005). History of the discovery and clinical introduction of Chlorpromazine. *Annals of Clinical Psychiatry, 17*(3), 113-135.

Lu, Z., Li, Y., Liu, T., Wang, G. Sun, M., Jinag, Y., He, H., Wnag, Y., Zou, P., Wnag, X., Zhao, Q., Rao, H. (2020). A dual-template imprinted polymer electrochemical sensor based on AuNPs and nitrogen-doped graphene oxide quantum dots coated on NiS2/biomass carbon for simultaneous determination of dopamine and chlorpromazine. *Chemical Engineering Journal, 389,* 124417.

Luo, X., Morrin, A., Killard, A.J., & Smyth, M.R. (2006). Applications of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis, 18,* 319-326.

Marinho, E. (2024). Clozapine: A special case of an atypical antipsychotic. *European Journal of Medical Chemistry Reports, 10,* 100140.

Majorek, K., Wolfkühler, W., Küper, C., Saimeh, N., Juckel, G., & Brüne, M. (2009). "Theory of mind" and executive functioning in forensic patients with schizophrenia. *J Forensic Sci, 54,* 469-473.

Mann, S.K., & Marwaha, R. (2023). Chlorpromazine. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553079/#:~:text=Chlorpromazine%20is%20extensively%20metabolized%20by,urine%2C%20bile%2C%20and%20feces.

Manjunatha, J.G., Swamy, K., Mamatha, G.P., & Gilbert, O. (2011). Electrochemical studies of clozapine drug using carbon nanotube-SDS modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetry study. *Der Pharma Chemica, 3*(2), 236-249.

Mashhadizadeh, M.H., & Afshar, E. (2013). Electrochemical investigation of clozapine at TiO_2 nanoparticles modified carbon paste electrode and simultaneous adsorptive voltammetric determination of two antipsychotic drugs. *Electrochimica Acta, 87,* 816-823.

Merli, D., Dondi, D., Pesavento, M., & Profuma, A. (2012). Electrochemistry of olanzapine and risperidone at carbon nanotubes modified gold electrode through classical and DFT approaches. *Journal of Electroanalytical Chemistry, 683,* 103-111.

Mitsana-Papazoglou, A., Christopoulos, T.K., Diamandis, E.P., & Hadijioannou, T.P. (1985). Construction of ion-selective electrodes for chlorpromazine, amitriptyline, propantheline and meperidine: analytical study and application to pharmaceutical analysis. *Analyst, 110,* 1091-1094.

Muthusankar, G., Sangili, A., Chen, S.M., Karkuzhali, R., Sethupathi, M., Gopu, G., Karthick, S., Devi, R.K., & Sengottuvelan, N. (2018). In situ assembly of sulfur-doped carbon quantum dots surrounded iron (III) oxide nanocomposite; a novel electrocatalyst for highly sensitive detection of antipsychotic drug olanzapine. *Journal of Molecular Liquids, 268,* 471-480.

Ni, Y., Wang, L., & Kokot, S. (2001). Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta, 439,* 159-168.

Noureldin, H.A.M., Abdelwahab, A., Abdel-Aziz, A.M., El-Sayed, G.M., Moustafa, A.A.M., & Badr, I.H.A. (2024). Nickel-cobaltite-doped carbon xerogel based voltammetric sensor for olanzapine: Electrochemical characterization and applications. *Microchemical Journal, 137.* https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109758

Ondo, W.G., Levy, J.K., Vuong, K.D., Hunter, C., & Jankovic, J. (2002). Olanzapine treatment for dopaminergic-induced hallucinations. *Movement disorders, 17*(5), 1031-1035.

Pandit, U.J., Khan, I., Wankar, S., Raj, K.K., & Limaye, S.N. (2015). Development of electrochemical method for determination of tolvaptan at MWCNT/CPE in pharmaceutical preparations and human biological fluids. *Analytical Chemistry Letters, 5*(6), 338-350.

Parlakpınar, H., Örüm, M.H., & Acet, A. (2012). Kafeik asit fenileter ester (KAFE) ve mikrokardiyal iskemi reperfüzyon (Mİ/R) hasarı. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1,* 10-15.

Parthasarathy, A., Savka, M.A., & Hudson, A.O. (2019). The synthesis and role of β-alanine in plants. *Frontiers in Plant Science, 10,* Article 921.

Parvin, M.H. (2011). Graphene paste electrode for detection of chlorpromazine. *Electrochemistry Communications, 13,* 366-369.

Parvin, M.H., Golivand, M.B., Najafi, M., & Shariaty, S.M. (2012). Carbon paste electrode modified with cobalt nanoparticles and its application to the electrocatalytic determination of chlorpromazine. *Journal of Electroanalytical Chemistry, 683,* 31-36.

Phongphut, A., Chayasombat, B., Cass, A.E.G., Sirisuk, A., Phisalaphong, M., Prichanont, S., & Thanachayanont, C. (2020). Clay/au nanoparticle composites as acetylcholinesterase carriers and modified-electrode materials: A comparative study. *Applied Clay Science, 194*(1), 105704.

Pisoschi, A.M., Cimpeanu, C., & Predoi, G. (2015). Electrochemical methods for total antioxidant capacity and its main contributors determination: A review. *Open Chemistry, 13,* 824-856.

Prushothama, H.T., Arthoba-Nayaka, Y. Vinay, M.M., Manjunatha, P., Yathisha, R.O., & Basavarajappa K.V. (2018). Pencil graphite electrode for the voltammetric determination of chlorpromazine. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices, 3,* 161-166.

Rajendrachari, S., Basavegowda, N., Adimule, V.M., Avar, B., Somu, P., R.M., S.K., Baek, K.H. (2022). Assessing the food quality using carbon nanomaterial-based electrodes by voltammetric techniques. *Biosensors 2022, 12,* 1173. https://doi.org/10.3390/bios12121173.

Rana, A., Baig, N., & Saleh, T.A. (2019). Electrochemically pretreated carbon electrodes and their electroanalytical applications – A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 833(15), 313-332.

Rao, J.P., & Geckeler, K.E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science, 36,* 887-913.

Ren, W., Luo, H.Q, & Li, N.B. (2006). Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at a glassy carbon electrode modified with caffeic acid. *Biosensors and Bioelectronics, 21,* 1086-1092.

Richter, M.S., O'Reilly, K., O'Sullivan, D., O'Flynn, P., Corvin, A., Donohoe, G., Coyle, C., Davoren, M., Higgings, C., Byrne, O., Nutley, T., Nulty, T., Sharma, K., O'Connell, P., & Kennedy, H.G. (2018). Prospective observational cohort study of 'treatment as usual' over four years for patients with schizophrenia in a national forensic hospital. *BMC Psychiatry, 18,* 1-15.

Sahoo, S.K., Parveen, S., & Panda, J.J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine, 3,* 20-31.

Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H.K., Bonfiglio, R., & Bonanno, E. (2018). Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry, 62,* 2841.

Sebastian, N., Yu, W.C., Hu, Y.C., Balram, D., & Yu, Y.H. (2019). Sonochemical synthesis of iron-graphene oxide/honeycomb-like ZnO ternary nanohybrids for sensitive electrochemical detection of antipsychotic drug chlorpromazine. *Ultrasonics-Sonochemistry, 59,* 104696.

Senel, M., Durmus, Z., & Alachkar, A. (2021). Measurement of the antipsychotic clozapine using reduced graphene oxide nanocomposites-Au/Pd/Pt electrodes. *Electroanalysis, 33,* 1585-1595.

Shaber, G., Stevens, I., Gaertner, H.J., Dietz, K., & Breyer-Ptaff, U. (1998). Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance. *Br J Clin Pharmacol, 46,* 453-459.

Shahrokhian, S., Azimzadeh, M., & Hosseini, P. (2014). Modification of a glassy carbon electrode with a bilayer of multiwalled carbon nanotube/benzene disulfonate-doped polypyrrole: application to sensitive voltammetric determination of olanzapine. *RSC Adv., 4,* 40553-40560.

Shahrokhian, S., Kamalzadeh, Z., & Hamzehloei, A. (2013). Electrochemical determination of clozapine on MWCNTs/new coccine doped PPY modified GCE: An experimental design approach. *Bioelectrochemistry, 90,* 36-43.

Shamsi, A., Ahour, F., & Sehatnia, B. (2018). Nickel oxide nanoparticles decorated graphene quantum dot as an effective electrode modifier for electrocatalytic oxidation and analysis of clozapine. *Journal of Solid State Electrochemistry, 22,* 2681-2689.

Shetti, N.P., Nayak, D.S., Malode, S.J., Kulkarni, R.M. (2017). Nano molar detection of acyclovir, an antiviral drug at nanoclay modified carbon paste electrode. *Sensing and Bio-Sensing Research, 14,* 39-46.

Shukla, R.P., Belmaker, R.H., Bersudsky, Y., & Ben-Yoav, H. (2020). A platinum black-modifed microelectrode for in situ olanzapine detection in microliter volumes of undiluted serum. *Journal of Neural Transmission, 127,* 291-299.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S., Williams, P.M., Maffeis, T.G., Wright, C.J., & Doak, S.H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials, 30,* 3891-3914.

Skoog, D.A., West, D.M., & Holler, F.J. (1996). *Analitik kimya,* (E. Kılıç, & F. Köseoğlu, Çev. Ed.). Ankara: Bilim Yayıncılık.

Srinivas, S., Senthil-Kumar, S.M., & Senthil-Kumar, A. (2023). Edge and basal plane anisotropy of a preanodized pencil graphite electrode surface revealed using scanning electrochemical microscopy and electrocatalytic dopamine oxidation as a molecular probe. *Langmuir, 39*(36), 12563-12575.

Tajik, S., & Beitollahi, H. (2019). A sensetive chlorpromazine voltammetric sensor based on graphen oxide modified glassy carbon electrode. *Analytical and Bioanalytical Research, 6*(1), 171-182.

Tammari, E., Neshadali, A., Lotfi, S., & Veisi, H. (2017). Fabrication of an electrochemical sensor based on magnetic nanocomposite Fe_3O_4/β-alanine/Pd modified glassy carbon electrode for determination of nanomolar level of clozapine in biological model and pharmaceutical samples. *Sensors and Actuators B: Chemical, 241,* 879-886.

Temerk, Y., Ibrahim, M., İbrahim, H., & Kotb, M. (2015). Interactions of an anticancer drug Formestane with single and double stranded DNA at physiological conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 149,* 27-36.

Templeton A.C., Wuelfing, W.P, & Murray, R.W. (2000). Monolayer-protected cluster molecules. *Accounts of Chemical Research, 33,* 27-36.

Tengström, A., & Hodgins, S. (2002). Criminal behaviour of forensic and general psychiatric patients with schizophrenia: Are they different? *Acta Psychiatr Scand, 106,* 62-66.

Tohen, M., Sanger, T.M., McElroy, S.L., Tollefson, G.D., Chengappa, K.N.R., Daniel, D.G., Petty, F., Centorrino, F., Wang, R., Grundy, S.L., Greaney, M.G., Jacobs, T.G., David, S.R., Toma, V., & olanzapine HGEH study group. (1999). Olanzapine Versus Placebo in the Treatment of Acute Mania. *The American Journal of Psychiatry, 156*(5), 702-709.

Tüzün, Ü.N., Yıldız, C., Eskiköy-Bayraktepe, D., Polat, K., & Yazan, Z. (2023). Electrochemical fabrication of poly(L-alanine)-gold nanoparticle nanocomposite-modified electrode: application for determination and mechanism of antipsychotic drug olanzapine. *Chemical Montly, 154,* 95-104. https://doi.org/10.1007/s00706-022-03012-9. Index: SCI, Impact factor, 1.613.

Unnikrishnan, B., Hsu, P.C., & Chen, S.M. (2012). A multipurpose voltammetric sensor for the determination of chlorpromazine in presence of acetaminophen, uric acid, dopamine and ascorbic acid. *International Journal of Electrochemical Science, 7,* 11414-11425.

Van-Leeuwen, S.M., Blankert, B., Kauffmann, J.M., & Karst, U. (2005). Prediction of clozapine metabolism by on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382,* 742-750.

Wang, J. (2001). *Analytical electrochemistry.* John Wiley and Sons Inc.

Wang, J. (2003). Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. *Analytica Chimica Acta, 500,* 247–257.

Wang, K., Yang, L., Huang, H., Lv, N., Liu, J., & Liu, Y. (2022). Nanochannel array on electrochemically polarized screen printed carbon electrode for rapid and sensitive electrochemical determination of clozapine in human whole blood. *Molecules, 27*(2739), 1-14.

Wang, L., Zhao, J., He, X., Gao, J., Li, J., Wan, C., & Jiang, C. (2012). Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) study of $LiNi_{1/3}Co_{1/3}Mn_{1/3}O_2$ for Li-ion batteries. *Int. J. Electrochem. Sci., 7,* 345-353.

Wang, S., Zhang, J., Gharbi, O., Vivier, V., Gao, M., Orazen, M.E. (2021). Electrochemical empedance spectroscopy. *Nature Reviews Methods Primers, 1,* 41.

Yağmur-Kabaş, S. (2020). Reduction behavior of olanzapine and its differential pulse voltammetric determination in human urine and pharmaceuticals. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences,* 6(2), 342-352.

Yılmaz, B., Albayrak, M., & Kadıoğlu, Y. (2017). Determination of olanzapine in pharmaceutical preparations by linear sweep voltammetry method. *CBU Journal of Science, 13*(1), 99-104.

Zanchet, D., Micheel, C.M., Parak, W.J., Gerion, D., & Alivisatos, A.P. (2001). Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates. *Nano Letters, 1,* 32–35.

Zhu, Q, Yu, X., Wu, Z., Lu, F., & Yuan, Y. (2018). Antipsychotic drug poisoning monitoring of clozapine in urine by using coffee ring effect based surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytica Schimica Acta, 1014,* 64-70.