



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



PARASETAMOL ANALİZİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Danna Paulina OROZCO GÓMEZ

DİSİPLİNLER ARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
ADLİ TOKSİKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ

ANKARA

2020

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARASETAMOL ANALİZİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL
SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

Danna Paulina OROZCO GÓMEZ

DİSİPLİNLER ARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
ADLİ TOKSİKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ

EŞ DANIŞMAN

Doç. Dr. Aytekin UZUNOĞLU

ANKARA

2020

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “PARASETAMOL ANALİZİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tez, bilimsel ahlâk 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 ve yorumlar tarafıma aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Danna Paulina OROZCO GÓMEZ

17.12.2020

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinler Arası Adli Bilimler Anabilim Dalı, Adli Toksikoloji Bölümün’de Danna Paulina OROZCO GÓMEZ tarafından hazırlanan “PARASETAMOL ANALİZİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

17.12.2020

Prof. Dr. Sibel Aysıl ÖZKAN
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ
Ankara Üniversitesi
Adli Bilimler Enstitüsü
Üye

Dr.Öğr. Üyesi Ergin YALÇIN
İskenderun Teknik Ü. Müh.ve Doğa
Bilimleri Fakültesi
Üye

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

Prof.Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiv
1.GİRİŞ	1
1.1.Parasetamolün toksisitesi	3
1.2.Parasetamol Miktarının Tayin Edilmesinin Önemi	7
1.3.Elektrokimyasal Yöntemler	11
1.3.1.Voltametrik Yöntemler	12
1.3.1.1 Dönüşümlü Voltametri (DV)	13
1.3.1.1Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)	16
1.3.1.2.Kare Dalga Voltametri (KDV)	17
1.3.1.3.Sıyırma Yöntemleri	18
1.3.2.Amperometri	20
1.3.2.1. Kronoamperometri	20
1.4.Elektrokimyasal Hücrede Kullanılan Elektrotlar	21
1.4.1.Referans Elektrot	22
1.4.2.Karşı Elektrot	22
1.4.3.Çalışma Elektrotları	22
1.4.3.1 Katı Elektrotlar	24
1.5.Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	26
1.5.1.Seçicilik	28
1.5.2.Doğrusallık ve Aralık	28

1.5.3.Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS)	29
1.5.4.Kesinlik	30
1.5.5.Doğruluk	30
1.5.6.Sağlamlık ve Tutarlılık	31
2.GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1.Kullanılan araç, gerçe ve kimyasallar	38
2.2.Çözeltilerin Hazırlanması	39
2.2.1. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	39
2.2.2. Parasetamolün Stok Çözeltisinin Hazırlanması	40
2.2.3. Farmasötik Dozaj Şekline Ait Çözeltilerin Hazırlanması	41
2.2.4. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması	41
2.2.5. Olası Girişim Yapabilecek Maddelerin Çözeltilerinin Hazırlanması	42
2.2.6. CKE’ nin Modifikasyonu ve Karakterizasyonu	43
2.2.7. Modifiye Elektrodun Hazırlanması	44
3.BULGULAR	45
3.1. Camısı Karbon Elektrotta Parasetamol Davranışının İncelenmesi	45
3.1.1. pH Taraması	45
3.1.2. Camısı Karbon Elektrot ile Hız Taraması	50
3.2. Camısı Karbon Elektrotta DPV Tekniğinin Optimizasyonu	53
3.3.Camısı Karbon Elektrot Kullanılarak Gerçekleştirilen Analiz Çalışmaları	54
3.4.Parasetamol Analizi için CKE Üzerinde Yapılan Modifikasyon Çalışmaları	56
3.4.1.Modifikasyon Malzemesinin Karakterizasyonu	56
3.4.2. Modifikasyon Malzemesi Üzerine Çalışmalar	60
3.4.2.1. Modifiye elektrot ile pH Taraması	62
3.4.2.2.Seçilen Modifikasyon ile Gerçekleştirilmiş Hız Taraması	67
3.4.2.3.Modifiye Elektrotta Biriktirme Potansiyeli ve Biriktirme Süresi	71
3.4.3.Modifiye Elektrot ile Parasetamol Miktar Tayini Çalışmaları	72
3.4.3.1. Modifiye Elektrot ile Standart Çözelti ile Kalibrasyon Oluşturma	73
3.4.3.2. Modifiye Elektrotta Serum ile Kalibrasyon Oluşturma	74
3.4.3.3. Modifiye Elektrotta İdrar ile Kalibrasyon Oluşturma	76
3.4.3.4. Modifiye Elektrot ile Gerçekleştirilen Geri Kazanım Çalışmaları	78
3.4.3.5. Modifiye Elektrotta Gerçekleştirilen Girişim Çalışmaları	79

4.TARTIŞMA	81
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	85
ÖZET	86
SUMMARY	87
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	94



ÖNSÖZ

Bu tez ile öngörülen çalışmada parasetamol için hassas, duyarlı, hızlı ve tamamen validasyonu yapılmış elektrokimyasal sensör geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Analizlerde kullanılacak katı elektrotların özgül nano malzemelerle modifiye edilerek daha hızlı, hassas ve düşük tayin sınırına sahip analizlerin yapılması hedeflenmiştir. Elektrokimyasal yöntemlerden amperometri, dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls ve kare dalga voltametri gibi yöntemler kullanarak, uygun destek elektroliti ve pH belirlenmesi, bu ortamda miktar tayini yapılması, teşhis ve tayin limitleri, tekrar edilebilirlik ve tüm gerekli validasyon parametrelerinin incelenmesi de amaçlanmıştır.

Parasetamol analizi ile ilgili modifiye elektrotlarla voltametrik ve amperometrik yöntemler kullanılarak sentetik biyolojik numunelerin analizi için geliştirilecek bu yöntemlilerin de hasta başı analizlerde kullanıma uygun sensörlerin üretilmesine de katkı sağlayabileceği öngörülmektedir. İlgili tez bu yönüyle literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilimsel desteğini esirgmeden aktaran danışman hocam Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ 'a çok teşekkür ederim.

Bu muhteşem eğitim deneyimi için Ankara Üniversitesi'ne, ilgisi ve rehberliği için hocam Prof. Dr. Sinan SÜZEN 'e teşekkür ederim.

Tezimin malzeme geliştirilme kısmında ve ilk denemelerinde yardımcı olan eş danışmanım Necmettin Erbakan Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Aytekin UZUNOĞLU, proje asistanı Merve ÖZCAN ve Dr. Öğretim Üyesi Hasan KOTAN 'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında bana burs desteği veren Türkiye Bursları (YTB) teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım her aşamasında bana vakit ayıran, yardım ve destekleriyle beni yalnız bırakmayan, tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN ve Öğr. Gör. Göksu ÖZÇELİKAY'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yabancı öğrenci olmanın zorlukları var ama eğitimcilerimizin sevgisi ve sabır ile hiçbir hedef imkânsız değil.

Sonsuz teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AuNp	Altın Nanoparçacık
BII	Bağıl hata
BIA-ÇPA	Batch enjeksiyon analizi-Çoklu puls amperometri
BKEE	Bor katkılı elmas elektrot
BM	Ball mailing
BP	British Pharmacopocia
BR	Britton-Robinson
BSS	Bağıl standart sapma
ÇDKN	Çok duvarlı karbon nanotüpler
CKE	Camsı karbon elektrot
CKME	Camsı karbon modifiye elektrot
cm	Santimetre
ÇPA	Çoklu Puls Amperometri
dk	Dakika
DPV	Diferansiyel puls voltametri
DV	Dönüşümlü voltametri
E0	Standart potansiyel
E1/2	Yarı dalga potansiyeli
Eb	Bozunma Potansiyeli
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi

EP	European Pharmacopoeia
Ep	Pik potansiyeli
ERGO	Elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit
F	Faraday sabiti
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FIA-MPA	Akış enjeksiyon analizi Çoklu Puls Amperometri
FTIR	Fourier-transform infrared spektroskopi
g	Gram
GC-MS spektrometresi)	Gas chromatography–mass spectrometry (Gaz kromatografisi-kütle
GO	Grafen oksit
GQD	Grafen kuantum noktalar
HPLC kromatografisi)	High-performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı
KA	Kronoamperometri
KDASV	Kare dalga adsorptif sıyırma voltametri
KDV	Kare dalga voltametri
KPE	Karbon pasta elektrot
L	Litre
LSV	Doğrusal voltametri
m	Eğim
M	Molar
μA	Mikroamper
μg	Mikrogram
mg	Miligram

ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
n	Elektron sayısı/Veri sayısı
nm	Nanometre
PtNp	Platin nanopartikül
s	Saniye
ss	Standart Sapma
t	Zaman
TAS	Tayin alt sınırı (LOQ)
TDKN	Tek duvarlı karbon nanotüp
TS	Teşhis sınırı (LOD)
USP	United States Pharmacopeia (Birleşik Devletler Farmakopesi)
v	Tarama hızı
V	Volt
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Parasetamolün kimyasal yapısı	1
Şekil 1.2 Asetaminofen metabolizması. NAPQI, N-asetil-p-benzokinon imin; GSH, glutatyon (Lancaster ve ark., 2015)	5
Şekil 1.3. Rumack-Matthew Nomogramı(Castro, 2016)	6
Şekil 1.4. Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması	12
Şekil 1.5. Dönüşümlü voltametri: tipik potansiyel üçgen dalga formu (A), farklı tarama hızlarında tersinir bir sistem için akım-potansiyel eğrisi (B). (Ozkan ve ark., 2015)	14
Şekil 1.6. (a) potansiyel-zaman dalga formu, (b) şematize edilmiş bir voltamogram (Ozkan ve ark., 2015)	16
Şekil 1.7. Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyali ve voltamogram	18
Şekil 1.8. Anodik sıyırma voltametrisinin şematize edilmiş hali: potansiyel-zaman grafiği (A), voltamogram (B)	19
Şekil 1.9. Parasetamol ve adrenalin kronoamperometri yanıtı. Modifiye edilmiş bir elektrot kullanma (SWCNTs-CHIT-IL/GCE) (Babaei ve ark., 2011)	21
Şekil 1.10. İki ve üç elektrotlu sistemin şematize edilmiş hali: referans elektrot (R), Çalışma elektrodu (W), Karşıt elektrot (A)	21
Şekil 1.11. Voltametriye sıklıkla kullanılan çalışma elektrotlarının genel sınıflandırılması	23
Şekil 1.12. Karbon ve allotroplarına ait genel bir sınıflandırmaya (Dhawane ve ark., 2018)	25
Şekil 1.13. Camı (Glassy) karbon ve elektrot gösterimleri	26
Şekil 1.14. Doğruluk ve kesinlik parametrelerine genel bakış	31
Şekil 3.1. 10 µM Parasetamol 'un camı karbon elektrot ile asetat tamponu (3,7-5,7) içerisinde incelenen voltamogramları (Tarama hızı: 100 mV s ⁻¹)	45
Şekil 3.2. 10 µM Parasetamol 'un camı karbon elektrot ile BRT tamponu içerisinde incelenen voltamogramları (Tarama hızı: 100 mV s ⁻¹)	46
Şekil 3.3. 10 µM Parasetamol 'un camı karbon elektrot ile fosfat tamponu içerisinde incelenen voltamogramları (Tarama hızı: 100 mV s ⁻¹)	47
Şekil 3.4. 10 µM Parasetamol 'un camı karbon elektrot ile kaydedilen voltamogramlarına göre farklı pH değerleri için pik akımı (A) ve pik potansiyeli (B)	

üzerine etkisini gösteren eğriler. (Δ): Asetat tamponu, ($\square$): Fosfat tamponu, ($\diamond$): BRT tamponu (Tarama hızı: 100 mV s^{-1}) 49

Şekil 3.5. $10 \text{ }\mu\text{M}$ Parasetamol 'un camısı karbon elektrotta ile pH 3 fosfat tamponu ortamında $5\text{--}1000 \text{ mV s}^{-1}$ aralığında yapılan, tarama hızı-pik akımı (A), hız taraması çalışmasının kare kökü ile pik akımı (B) arasındaki ilişkiyi gösteren eğriler. 51

Şekil 3.6. $10 \text{ }\mu\text{M}$ Parasetamol 'un camısı karbon elektrotta ile pH 3 fosfat tamponu ortamında $5\text{--}1000 \text{ mV s}^{-1}$ aralığında yapılan, tarama hızının logaritması ile pik akımının logaritması (C) ve tarama hızının logaritması ile pik potansiyeli (D) arasındaki ilişkiyi gösteren eğriler. 52

Şekil 3.7. $10 \text{ }\mu\text{M}$ Parasetamol 'un camısı karbon elektrotta ile pH 3 fosfat tamponu ortamında DPV ile elde edilen biriktirme süresine karşı akım (A) ve biriktirme potansiyeline karşı akım (B) grafikleri. 54

Şekil 3.8. Parasetamol 'un CKE kullanılarak ile $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ – $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ derişim aralığında pH 3,0 fosfat tamponu içerisinde DPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafikleri. 55

Şekil 3.9. CKE kullanılarak pH 3,0 fosfat tamponu içerisinde parasetamol 'un seçilmiş derişimlerdeki DPV ile elde edilen voltamogramları. 1) Destek elektrolit; 2) $8,0 \times 10^{-7} \text{ M}$; 3) $2,0 \times 10^{-6} \text{ M}$; 4) $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$; 5) $8,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 6) $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 7) $2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 55

Şekil 3.10. Raman Spektroskopisi sonucu 56

Şekil 3.11. Hazırlanan nanoyapıların XRD faz analizi. 57

Şekil 3.12. TGA analizi sonuçları 58

Şekil 3.13. Farklı SEM görüntüleri ve EDS grafiği 59

Şekil 3.14. Ag-AC için 2,5 dk, 5 dk, 10 dk olarak uygulanan bilyeli öğütücü sürleri sonrası DV cevabı 60

Şekil 3.15. $1 \text{ }\mu\text{M}$ Parasetamol 'un asetat tamponu içerisinde incelenen voltamogramları. 63

Şekil 3.16. $1 \text{ }\mu\text{M}$ Parasetamol 'un BRT tamponu içerisinde incelenen voltamogramları. Mikro amper değerleri (A) nano amper değerleri (B) 64

Şekil 3.17. $1 \text{ }\mu\text{M}$ Parasetamol 'un fosfat t amponu içerisinde incelenen voltamogramları. Mikro amper değerleri (A) nano amper değerleri (B) 65

Şekil 3.18 $1 \text{ }\mu\text{M}$ Parasetamol 'un DPV voltamogramlarına göre farklı pH değerleri için pik akımı (A) ve pik potansiyeli (B) üzerine etkisini gösteren eğriler. (Δ): Asetat tamponu, ($\square$): Fosfat tamponu, ($\diamond$): BRT tamponu. 67

Şekil 3.19 $1 \text{ }\mu\text{M}$ Parasetamol 'un pII 3 fosfat tamponu ortamında $5\text{--}1000 \text{ mV s}^{-1}$ aralığında yapılan tarama hızı-pik akımı (A), hız taraması çalışmasının kare kökü ile pik akımı (B) arasındaki ilişkiyi gösteren eğriler. 69

Şekil 3.20 $1 \text{ }\mu\text{M}$ Parasetamol 'un pH 3 fosfat tamponu ortamında $5\text{--}1000 \text{ mV s}^{-1}$ aralığında yapılan tarama hızının logaritması ile pik akımının logaritması (C) 70

ve tarama hızının logaritması ile pik potansiyeli (D) arasındaki ilişkiyi gösteren eğriler.
70

Şekil 3.21 1 µM Parasetamol 'un pH 3 fosfat tamponu ortamında DPV ile elde edilen biriktirme süresine karşı akım (A) ve biriktirme potansiyeline karşı akım (B) grafikleri.
72

Şekil 3.22 Parasetamol 'un 1×10^{-8} - 8×10^{-7} M derişim aralığında pH 3,0 fosfat tamponu içerisinde DPV ile elde edilen kalibrasyon eğrisi
73

Şekil 3.23. Modifiye elektrot kullanılarak, pH 3,0 fosfat tamponu içerisinde parasetamol 'un seçilmiş derişimlerdeki DPV ile elde edilen voltamogramları. 1) Destek elektrolit; 2) $5,0 \times 10^{-8}$ M; 3) $8,0 \times 10^{-8}$ M; 4) $1,0 \times 10^{-7}$ M; 5) $5,0 \times 10^{-7}$ M 6) $8,0 \times 10^{-7}$ M
74

Şekil 3.24. Modifiye elektrot kullanılarak, Parasetamol 'un 1×10^{-8} - 8×10^{-7} M derişim aralığında pH 3 fosfat tamponu kullanılarak serum içerisinde oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi
75

Şekil 3.25 Modifiye elektrot kullanılarak, pH 3 fosfat tamponu ve serum içerisinde parasetamol 'un bazı derişimlerindeki DPV ile elde edilen voltamogramları. 1) Destek; 2) $1,0 \times 10^{-8}$ M; 3) $5,0 \times 10^{-8}$ M; 4) $1,0 \times 10^{-7}$ M; 5) $2,0 \times 10^{-7}$ M 6) $5,0 \times 10^{-7}$ M 7) $8,0 \times 10^{-7}$ M
75

Şekil 3.26 Modifiye elektrot kullanılarak, Parasetamol 'un 1×10^{-8} - 8×10^{-7} M derişim aralığında pH 3 fosfat tamponu kullanılarak idrar içerisinde oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi
76

Şekil 3.27 Modifiye elektrot kullanılarak, pH 3 fosfat tamponu ve idrar içerisinde parasetamol 'un bazı derişimlerindeki DPV ile elde edilen voltamogramları. 1) Destek; 2) $1,0 \times 10^{-8}$ M; 3) $2,0 \times 10^{-8}$ M; 4) $5,0 \times 10^{-8}$ M; 5) $8,0 \times 10^{-8}$ M 6) $1,0 \times 10^{-7}$ M 7) $2,0 \times 10^{-7}$ M
77

Şekil 3.28. Modifiye elektrota ait girişim çalışmaları sonuçları
80

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Analitik yöntem geçerlilik testi parametreleri	27
Çizelge 1.2. Elektrokimyasal teknikler kullanılarak parasetamol tayini ile ilgili seçilmiş bazı çalışmalar.	33
Çizelge 1.3. HPLC kullanılarak parasetamol tayini ile ilgili seçilmiş bazı çalışmalar	35
Çizelge 1.4. GC-MS kullanılarak parasetamol tayini ile ilgili seçilmiş bazı çalışmalar	36
Çizelge 2.1. Kullanılan araç ve gereçler	38
Çizelge 2.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf maddeler	38
Çizelge 2.3. Girişim yapabilecek maddelerin hazırlığına ilişkin çizelge	42
Çizelge 3.1. Asetat tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 10 μ M Parasetamol 'un farklı pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.	46
Çizelge 3.2. BRT tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 10 μ M Parasetamol 'un farklı pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.	47
Çizelge 3.3. Fosfat tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 10 μ M Parasetamol 'un farklı pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.	48
Çizelge 3.4. Seçilen modifikasyon türüne göre akım farklarının ölçülmesi	61
Çizelge 3.5. Farklı yüzey modifikasyonlarına ait sonuçlar	62
Çizelge 3.6. Asetat tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 1 μ M Parasetamol 'un farklı pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.	63
Çizelge 3.7. BRT tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 1 μ M Parasetamol 'un farklı pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.	65
Çizelge 3.8. Fosfat tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 1 μ M Parasetamol 'un farklı pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.	66

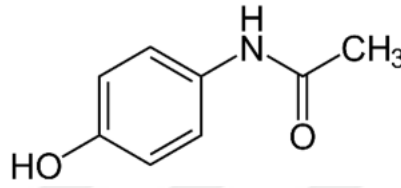
Çizelge 3.9. Camsı karbon elektrot ve modifiye edilmiş yüzey kullanılarak, serum ve idrar ile parasetamol 'un pH 3 fosfat tamponu içerisinde elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri. 77

Çizelge 3.10. Farmasötik dozaj şekli ve biyolojik numunelere ait gerçek numune ve geri kazanım sonuçları 79



1. GİRİŞ

Parasetamol (Asetaminofen) $C_{18}H_{19}NO_2$ olarak formülize edilmiş olup IUPAC'a (International Union of Pure and Applied Chemistry) göre N- (4-hidroksifenil) asctamit olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.1)



Şekil 1.1. Parasetamolün kimyasal yapısı

Parasetamol 1873 yılında Harmon Morse tarafından keşfedilmiştir, ancak analjezik olarak özellikleri 1893'te Strazburg Üniversitesi'nde bir Profesör olan Adolf Kussmaul ve diğer iki Fransız doktor Arnold Cahn ve Paul Hepp tarafından ortaya koyulmuştur. 1956'da İngiltere'de 500 mg içerikli tabletlerin üretilmesiyle satışları ve popülerliği dünya çapında hızla artmaya başlamıştır. Hali hazırda dünya üzerinde en çok kullanılan analjezik olan parasetamolün, iltihabı kontrol etmek, grip semptomlarını, kas ağrılarını, ateş, kulak ağrısı, baş ağrısı, artirit, osteoartrit, farenjit ve de mide ağrılarını azaltmak için kullanıldığı bilinmektedir. Yüksek biyoyararlanımı, reçetesiz ve kolay ulaşılabilir olmasından kaynaklı olarak bu ilacın kullanımının çekici olduğu da söylenebilmektedir.

Bu kadar ilgi çekici bir ilaç olmasına karşın bilim otoriteleri tarafından özellikle çocuklarda ve geriatric popülasyonda, parasetamol kullanımına dayalı aşırı dozun neden olduğu çoklu akut karaciğer yetmezliği vakaları rahatsızlık yaratmaktadır. Rahat

ulaşılabilirliği ve kullanımının bu denli yaygın olması nedeniyle, hastalar, ilacın toksisitesini görmeyen gelmiş veya küçümsemiştir. Bu davranış biğimi sonucunda da ciddi tıbbi acil durumlara neden olmuş ve hayatlarını riske atmışlardır. Ayrıca zehirlenerek geręekleşen intihar vakalarında da parasetamol etkin rol oynamaktadır. İngiltere Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avustralya'da yanlışlıkla veya istemeden en yaygın aşırı doz bildirimi de bu etken madde üzerinden yapılmaktadır (Mund ve ark., 2015).

Parasetamole ait doz aşımı sonucunda, panzehir tedavisine rağmen akut karaciğer yetmezliği (ALF) ve ölüme yol açan, hafif ila şiddetli hepatotoksositeye kadar bir dizi hepatik hasara neden olmaktadır. Parasetamol doz aşımından kaynaklanan ALF, İngiltere, ABD, Fransa, Kanada ve Avustralya'da yaygın olarak rapor edilmiştir. Aşırı doz alımına bağlı ALF'nin en yaygın olduğu İngiltere'de (ALF etiyolojisinin %60-75'i), daha az sıklıkta görüldüğü ABD'de (yaklaşık %20' si) ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde daha düşük olduğu (%2) bildirilmiştir. Fransa'da ALF etiyolojisi). Bununla birlikte, son yıllarda ABD'de parasetamol kaynaklı ALF vakalarının görölme sıklığının katlanarak artığı rapor edilmiştir(Marzilawati ve ark., 2012).

Parasetamolün aşırı dozuna neden olan ana nedenlerden biri, kullanıcıların parasetamolün diğer ilaçların formölasyonunda ikincil bir bileşik olarak bulunabileceğinin farkında olmamalarıdır. Aşağıda liste halinde verilen seçilmiş bazı örneklerde olduğu gibi ikincil bir etken madde olarak parasetamol içeren ve yaygın olarak kullanılan ilaçların olduğu dikkate alınmalıdır.

- Actifed[®]
- Alka-Seltzer Plus LiquidGels[®]
- Anacin[®]

- Benadryl®
- Cepacol®
- Contac®
- Coricidin®
- Dayquil®
- A-ferin®
- Tylohot®
- Parol®
- Theraflu®
- Vermidon®
- Calpol®
- Gripin®

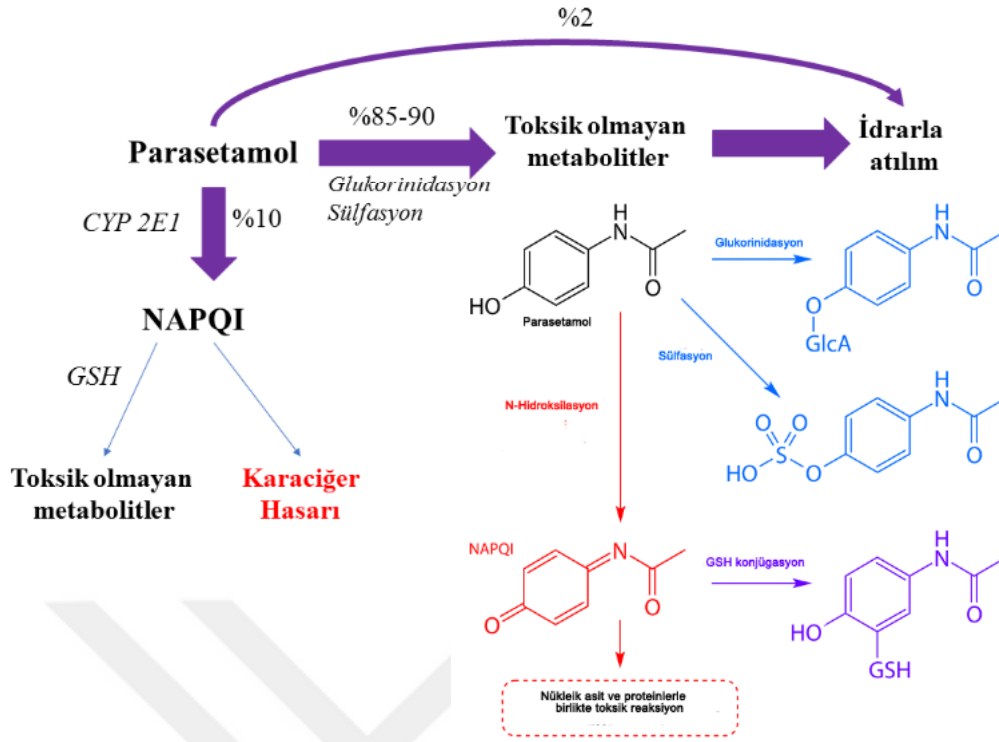
Yukarıda da bahsedildiği üzere son yıllarda zehirlenme oranları giderek ve önemli ölçüde artmıştır. Bu nedenle Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi FDA (Food and Drug Administration) Acetaminophen Awareness Coalition (AAC) ve “Double Check, Do not Double Up” eğitim kampanyasının yayılması ve farkındalığın yaratılması konusunda etkin rol üstlenmektedir. Bu kampanyanın ana unsurları:

- İlaç etiketini ilacı tüketmeden önce kontrol edin.
- Parasetamol içeren herhangi bir ürünün önerilen dozunu aşmayın.
- Parasetamol içeren birden fazla ürün almayı, olarak sıralanmaktadır.

1.1. Parasetamolün toksisitesi

Parasetamol günlük hayatımızın bir parçası olduğu andan itibaren her zaman etkili ve güvenli bir analjezik olarak sunulmuştur, bu nedenle aşırı dozdan kaçınmak için çok az önlem alınmıştır. 1960'lı yıllarda Birleşik Krallık 'ta satışlar parasetamolün aspirinden daha düşük yan etkileri olduğundan dolayı en yüksek seviyelerine ulaşmıştı. Zaman geçtikçe aşırı doz ve intihar girişimi vakalarının tarihinin bir parçası olmaya başladığı 60'lı yılların sonlarından günümüze, hepatoksisite, semptomlar, panzehir ve alınabilecek diğer önlemler ile ilgili çalışmalar bilim camiasında ön plana çıkmıştır. (Simkin ve ark, 2012). FDA kılavuzlarına göre, çocuklarda maksimum doz 80 mg/kg iken yetişkinlerde maksimum doz günde 4 gramdır. "Normal koşullar altında, parasetamol karaciğer tarafından %85-90, glukoronidasyon ve sülfatasyon işlemi ile faz II boyunca metabolize olarak idrar vasıtasıyla atılıma uğrar. İlacın geri kalanı (%10-15), işlemden sorumlu ana enzim olarak sitokrom CYP 2E1 yoluyla toksik ve reaktif ara maddesi, N-acetil p-benzokinonimin (NAPQI) oksidasyonu yoluyla faz I'de metabolize edilir (Şekil 1.2).

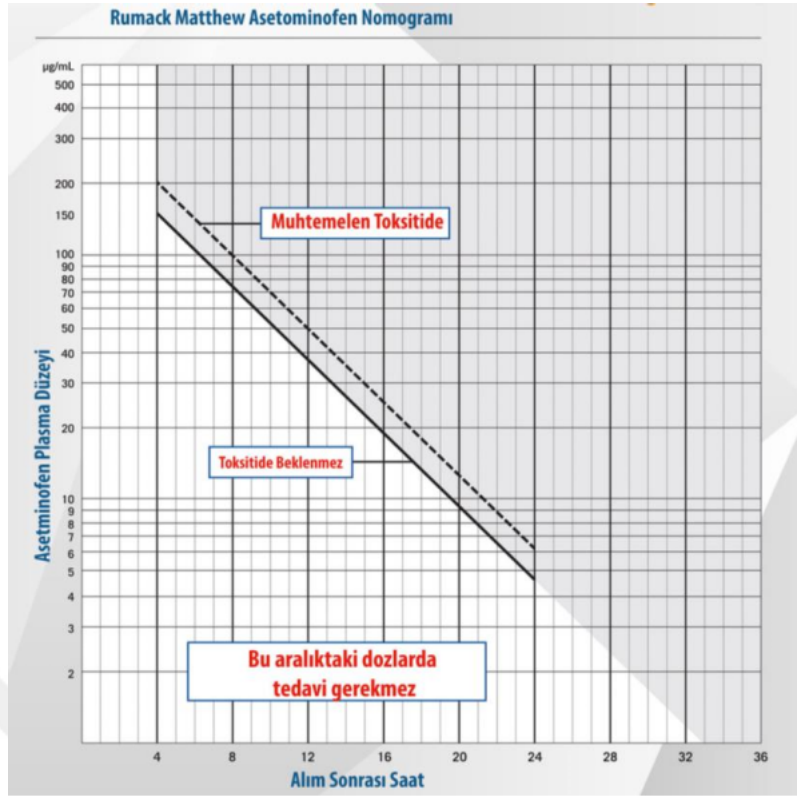
Bu ara ürün, böbrekler tarafından atılan toksik olmayan sistein ve merkapturat metabolitleri oluşturan glutatyonun sülfhidril grupları ile etkileşime girer. İlacın suprarapötik dozlarında, sülfatlama ve glukuronidasyon yolları doymuş hale gelir ve daha fazla parasetamol NAPQI yoluyla metabolize edilir. Glutatyon (GSII) depoları %70 ila 80 oranında yenilendiğinde, NAPQI hepatositler ile reaksiyona girer ve hücre hasarına neden olan sistein gruplarına kovalent olarak bağlanır. Bu işlem geri döndürülemez ve oksidatif hasara yol açar.(Castro., 2016)



Şekil 1.2 Asetaminofen metabolizması. NAPQI, N-asetil-p-benzokinon imin; GSH, glutatyon (Lancaster ve ark., 2015)

Şekil 1.2'de genel anlamda görebildiğimiz gibi, asetaminofen vücudumuzdaki böbrek hastalığının nedeni değildir, fazla bulunursa doğrudan ALF'ye neden olan NAPQI metabolitidir. Parasetamolün hepatotoksitesi tehlike grubunda olan alkolik bireylerde ve yetersiz beslenmeden muzdarip bireylerde daha fazla risk oluşturmaktadır. Bu hastalarda NAPQI metaboliti daha hızlı oluşur ve karaciğere saldırır.

Genel olarak parasetamol toksisitesi belirlenirken, Rumack-Matthew nomogramı kullanılarak (Şekil 1.3.) Bu diyagram, aşırı dozdan sonra serum örneklerinde parasetamol konsantrasyonunun etkilerini ve gerekli N-asetilsistein (NAC) antidot dozunun uygulanması gereken sürenin netleştirilmesine olanak tanır.



Şekil 1.3. Rumack-Matthew Nomogramı(Castro, 2016)

“Rumack-Matthew nomogramı, ilacın alındığı zaman bilindiğinde akut asetaminofen aşırı dozunun yönetimine rehberlik etmek için yararlı bir araçtır. Asetaminofen seviyesi nomogramda çizilir ve N-asetil sistein (NAC) ile tedavi edilip edilmeyeceği kararı buna göre belirlenir. Tedaviye yönelik ölçümler ilaç alındıktan 4 saat sonra başlar ve zamanla doğrusal olarak azalır. 200 mg / ml’lik bir serum konsantrasyonunda toksisite mümkün olmasına rağmen, nomogramın hassasiyetini arttırmak için tedavi hattı 150 mg / ml’de başlayacak şekilde indirilmiştir. Özetle seviye tedavi çizgisinin üzerindeyse, NAC başlatılmalıdır. İlaç alım zamanı bilinmediği durumlarda veya ilaç alındıktan 24 saatten fazla bir süre sonra başvurulduğunda ve uzun süreli tekrarlanan maruziyetlerde nomogram uygulanamaz.” (Nadler ve Fein., 2018)

1.2. Parasetamol Miktarının Tayin Edilmesinin Önemi

70'li yıllardan bu yana, parasetamol doz aşımı nedeniyle ölümler, hepatotoksitesitesi hakkında çalışmalar ve bilgilerin belirli bir düzeye ulaşmasının ardından önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, özellikle 20 yaşın altındaki gençler ve 60 yaşın üzerindeki yetişkinler arasında kasten aşırı doz vakalarının artışı da gözlemlenmekteydi. Yanlışlıkla alınan ve aşırı doza sebep olan vakalar genellikle bebeklerde ebeveynlerin ikincil ajan olarak parasetamol içeren farklı bir kombinasyonu kullanması sonucu ortaya çıkar. Ebeveynlerin çocuklarına bu ilacı vermesinin en yaygın nedeni çocuklarda görülen yüksek ateşin giderilmesidir. Çoğu asetaminofen zehirlenmesinin bilinçli aşırı dozdan kaynaklandığı düşünüldüğünde, ebeveynlerin çocuklarına yanlışlıkla yanlış dozda ilaç verme sıklığı, asetaminofenin kullanımının yaygınlığını gerçek bir endişe haline getirir.”(Nadler ve Fein., 2018). Yakın tarihli başka bir rapor, ABD'deki yetişkinlerin % 6'sının kombinasyon ilaçları nedeniyle 4 g/gün asetaminofen üzerinde reçete edildiğini göstermektedir. Bu nedenle, FDA, 2009 yılında reçeteli asetaminofen kombinasyon ürünlerinin piyasadan kaldırılması için bir öneri sunmuştur. Bununla birlikte, 2011'de bu öneriyi revize ederek her bir kombinasyon tabletinde 325 mg'dan fazla asetaminofen bulunmaması gerektiği yönünde revize etmişlerdir. (Michaut ve ark., 2014)

British Journal of Clinical Pharmacology dergisinde yayınlanan Gulmez ve çalışma ekibine ait bir çalışma, genel parasetamol doz aşımının 2005 ve 2007 yılları arasında Avrupa ülkelerinde nakil (ALFT) ile sonuçlanan akut karaciğer yetmezliğinin altıda birini temsil ettiğini raporlamıştır (Gulmez ve ark., 2015). Dolayısıyla parasetamol toksitesinin erken tanınması, hastanın iyileşmesi ve hasta mortalitesinin azaltılması için büyük önem arz etmektedir. Parasetamol kullanımını ve buna bağlı toksiteyi aşamalarıyla inceleyecek olursak. Klinik olarak 4 aşamaya ayrılır (Mancipe ve ark., 2010)

:

1. aşama, ilk 24 saat boyunca hasta halsizlik, solukluk, bulantı, kusma ve terleme gibi spesifik olmayan semptomlar gösterir. Bazıları asemptomatiktir.
2. aşama, İlacı aldıktan 24-72 saat sonra semptomlar artmaya başlar, karaciğer transaminazlarının konsantrasyonu 24 saat sonra başlar. Bilirubin yükselebilirken, protrombin süresi uzatılabilir ve böbrek fonksiyonunda anormallikler görülebilir.
3. aşama, yaklaşık 72 ila 96 saat içinde karaciğer fonksiyon anormallikleri zirveye ulaşır. Faz I belirtileri olarak sarılık, hemorajik diyatezi tekrar ortaya çıkar. Transaminaz seviyelerinde, hiperammonemi, hipoglisemi, laktik asidoz görülebilir. Bu aşamada en büyük karaciğer hasarı meydana gelmesine rağmen geri dönüşümlüdür. Bununla birlikte, ölümlerin çoğu bu aşamada çoklu organ yetmezliği ile baş gösterir.
4. aşama, bu döneme kadar hayatta kalan hastalar, 4. günde başlayan ve zehirlenmeden sonraki 7. günde tamamlanan klinik iyileşme aşamasına başlar. İşlem üç hafta veya daha fazla sürebilir. Histolojik iyileşme üç aya kadar sürebilir. Böbrek fonksiyon bozukluğu insidansı, zehirlenmenin ciddiyeti ile ilişkilendirilir (Blakely ve McDonald., 1995)

Kısaca tanı ve tedavide izlenecek yollar açısından hastanın hangi aşamada olduğunu belirlemek için ilk alım zamanını bilmek gereklidir. İlk adım, bu değere göre serumdaki parasetamol konsantrasyonunu belirlemek ve antidot NAC başlanmalıdır. Bununla birlikte, aşırı dozun nedeninin intihar girişiminde bulunduğu biliniyorsa, vücutta da bulunabilecek diğer madde tiplerini belirlemek için gerekli testler yapılmalıdır. Alkol alımının veya yetersiz beslenme semptomlarının değiştiği ve vücutta daha büyük bir hepatotoksisite yarattığı unutulmamalıdır, bu nedenle antidot ve mide yıkama ve aktif karbon kullanımı gibi diğer detoksifikasyon süreçleri hızlı bir şekilde verilmelidir.

(Nadler ve Fein, 2018). NAC uygulaması oral veya intravenöz olabilir. Her ikisi de asctaminofen toksisitesinin önlenmesinde ve tedavisinde eşit derecede etkilidir. Asetaminofen seviyesi saptanamayana kadar NAC kullanımına devam edilmelidir. Karaciğer yetmezliğine ilerleyen ve NAC tedavisine cevap vermeyen ciddi hasta hastalarda, karaciğer nakli hayat kurtarıcı olabilir.(Nadler ve Fein., 2018). NAC, molekül formülü $C_5H_9NO_3S$ ve molekül ağırlığı 163.19 g/mol olan bir sistein türevidir. Bu molekül yaygın olarak aşırı dozda parasetamol karşı ana panzehir olarak bilinir. Kimyasal özellikleri, NAC metabolizmasında molekülün, GSH glutatyonunun öncüsü olarak hareket etmesine neden olur, bu da NAPQI molekülleri ile doğal olarak reaksiyona giren GSH konsantrasyonunu artırmaya yardımcı olur ve bu da idrarla atılan merkaptotirik asit adı verilen toksik olmayan bir ürün oluşturur ve karaciğer hasarı bu sayede engellenebilir. Tüm bu ciddi sonuçlar sebebiyle plazma parasetamol konsantrasyonunun hızlı, seçici ve etkili bir şekilde belirlenmesi, uygun tedaviyle başlamak için hayati önem taşır. Amerikan Farmakopesine göre belirlenmiş parasetamol analiz yöntemleri aşağıda sıralanmıştır (FDA., 2013)

Tanımlama için

- ✓ Erime noktası (USP 741)
- ✓ Kalitatif kimyasal testler (USP 181)
- ✓ İnce tabaka kromatografisi (TLC) (USP)

Kirlilik analizleri için

- ✓ Gravimetrik (USP 281)
- ✓ Tutuşmada Kalıntı ve Kolayca Karbonize Olabilen Maddeler Testi (USP 271)
- ✓ Limit testler/ağır metaller (USP 231)

Spektroskopik yöntemler

- ✓ Fourier-transform infrared spektroskopi (FTIR) (USP 197K)
- ✓ UV spektroskopi (USP 197U)

Ayırmaya dayalı yöntemler

- ✓ Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (USP 621)

Diğer yöntemler

- ✓ Titrasyon (USP 541)
- ✓ Karl Fischer (USP 921)
- ✓ Disolüsyon (USP 711)

USP' nin yanı sıra, Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia EP) ve İngiliz Farmakopesine (British Pharmacopoeia BP) göre, parasetamolün belirlenmesi için öncelikli bazı teknikler şunlardır (Chambers ve Road., 2010):

- ✓ Erime noktası (EP 2002, 2.2.14)
- ✓ Ağır metal analizi (EP 2002, 2.4.8)
- ✓ Infrared spektroskopi (EP 2002, 2.2.24)
- ✓ Sıvı kromatografisi (Appendix III D)

Farmakope yöntemlerinde belirtilen birçok etken madde ve bitmiş ürün için altın standart olarak HPLC yöntemi gösterilse de bu yöntemin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunların başında,

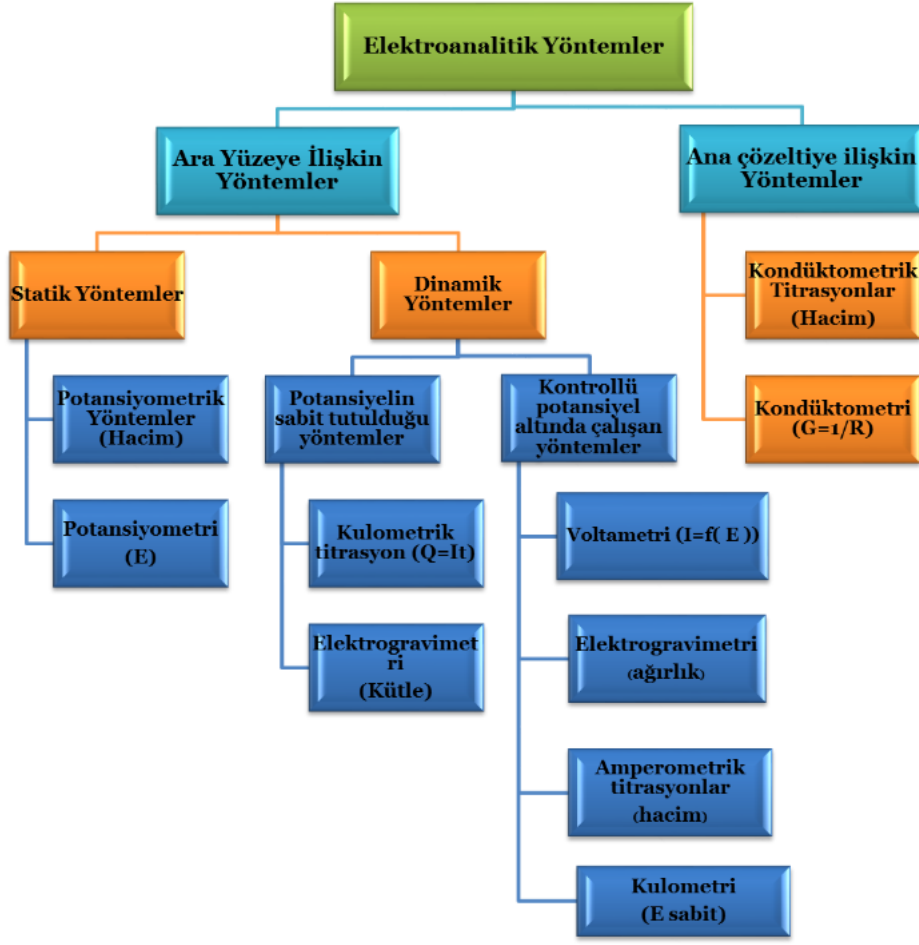
- Cihaz ve bakım maliyetlerini yüksek oluşu,
- Göreceli olarak uzun analiz süresi
- Ekipmanın kullanımı konusunda eğitim almış personel gerekliliği öne çıkmaktadır.

Bu noktada alternatif analiz yöntemleri arayışı göz önüne alındığında elektrokimyasal tekniklerin (potansiyometri, kronoamperometri, voltametri, vs.) kullanım sahasına açık olduğu görülmektedir.

1.3. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimya kavramı, bir elektrot yüzeyinde heterojen şekilde gerçekleşen veya çözeltiye ait ortamda homojen biçimde aktarılan yük miktarının elektron sayısı ve madde derişimi veya miktarı ile ilgilendiğı yöntemlere verilen genel isimdir. Şekil 1.4'te elektrokimyasal yöntemlere ait yapılan en genel sınıflandırma şematize edilmiştir. Verilmiş olan bu yöntemlerden tez kapsamında analizler için kullanılanlar hakkında özet bilgi aşağıda verilecektir.

Elektrokimya temelli yöntemler, endüstriyel kalite kontrol çalışmaları, analitik ölçümler, çevre ve biyomedikal alanlarında kullanılabilen, potansiyel, akım ve yük ile ilgili parametrelere ait ölçümlerin yapıldığı, görece olarak düşük maliyetli, az miktarda numune hacmi ile çalışmaya olanak sağlayan analitik yöntemlerdir. Analitik amaçlı ölçümler söz konusu olduğunda çözelti ara yüzeyi ve elektrot arasında meydana gelen prosceşler kimyasal ölçümlere olanak sağlamaktadır. Yukarıda da bahsedildiğı gibi ara yüzey ve elektrot arasında gerçekleşen yük aktarımına ait stokiyometrik, hız, adsorbsiyon derecesi, kütle aktarım hızı, reaksiyon denge sabitleri gibi bilgileri de bize sağlama olanağı tanımaktadır.



Şekil 1.4. Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması

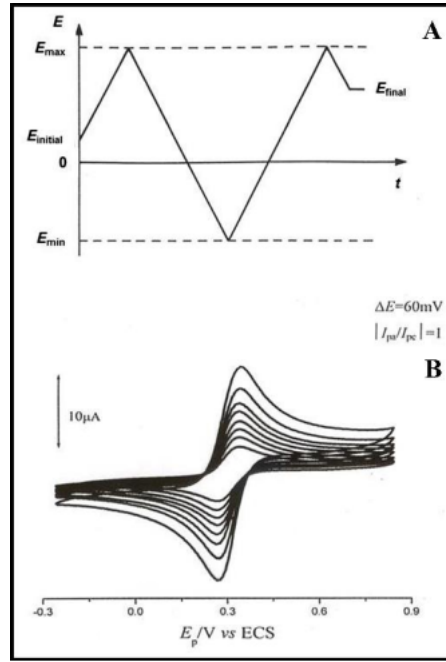
1.3.1. Voltametrik Yöntemler

Voltametri alanındaki ilk çalışmalar 1922'de bilimci Jaroslav Heyrovsky' nin polarografi tekniğini bulması ve geliştirmesi sonucunda ortaya çıkmaya başlamıştır. Polarografi yönteminde damlayan bir civanın kolayca yükseltgenmesi sebebiyle, indirgenme olayları incelenirken, voltametri yönteminde ise katı elektrotlar vasıtasıyla hem indirgenme hem de yükseltgenme davranışları incelenebilmektedir.

Özetle destek elektrolit içeren bir çözeltiye yerleştirilmiş çalışma elektrotunun polarize olduğu koşullarda uygulanan potansiyel karşı akım değişimlerinin incelenmesine dayanmaktadır (Scholz., 2015). Modern voltametriye uyarma sinyali, çalışma elektrodu ile yardımcı bir elektrot arasında ortaya çıkan akımın, potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesiyle elde edilir. Potansiyel karşı elde edilen akım grafiğine de voltamogram ismi verilir.(Houssin ve Senez, 2013) Kullanım alanları incelendiğinde farmasötik preparatlar, çevresel kirlenmeler, moleküler oksijen tayini, biyolojik numunelerin analizi, vs. gibi alanlarda kullanılabildiği de görülmektedir. Voltametrik yöntemler temelde 7 alt başlığa ayrılabilir. Dönüşümlü voltametri, normal (lineer veya doğrusal) puls voltametri, diferansiyel puls voltametri, kare dalga voltametri, sıyırma voltametri, kronoamperometri ve kronokulometridir (Ozkan ve ark., 2015).

1.3.1.1 Dönüşümlü Voltametri (DV)

Dönüşümlü voltametri tekniği, adsorbsiyon, difüzyon gibi taşıma olaylarını, redoks reaksiyonlarına ait termodinamiği ve de elektron aktarımına ait kinetiğin etkilerini açıklamak için sağlam ve tekrar edilebilir bilgiler sağladığı için elektrokimyada en çok kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Sıcaklık, elektrot türü, tarama hızı, potansiyel aralığı, pH, gibi parametreleri değiştirerek ortaya çıkan dönüşümlü voltamogramların değerlendirilmesiyle elektrot reaksiyonları hakkında detaylı bilgiler elde edilmektedir (Kissinger ve Heineman., 1983). Dönüşümlü voltametri, genellikle bir bileşiğin, biyolojik bir materyalin veya bir elektrot yüzeyinin elektrokimyasal çalışmasında yapılan ilk deneydir. Potansiyel tarama sırasında çalışan elektrottaki ileri ve geri doğru, doğrusal tarama yapılırken ölçülen akım ile döngüsel bir voltamogram elde edilir. Voltamogram oluşurken uygulanan potansiyelin zamanla değişimi aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir (Şekil 1.5). DV'deki önemli parametreler, pik akımların, I_p , a ve I_p , c'nin büyüklükleri ve piklerin meydana gelme potansiyelleri, E_p , a ve E_p , c'dir. Pik akımların doğru değerlerini ölçmek, muhtemelen döngüsel voltamogramları analiz etmenin en büyük zorluğudur. (Ozkan ve ark., 2015).



Şekil 1.5. Dönüşümlü voltametri: tipik potansiyel üçgen dalga formu (A), farklı tarama hızlarında tersinir bir sistem için akım-potansiyel eğrisi (B). (Ozkan ve ark., 2015)

Bir voltamogramı etkileyen bazı parametreler aşağıda listelenmiştir:

- Numune hazırlanması,
- Kirliliklerin varlığı,
- Çözeltinin pH' si
- Tarama hızı,
- Numunenin oksidasyon yatkınlığı,
- Elektrolit türü değişimi,
- Numune konsantrasyonunun değiştirilmesi gibi.

Genel olarak, güvenilir sonuçlar elde etmek için yeterli ve tutarlı deney koşulları gereklidir. Dönüşümlü voltametrde pik akımı (i), Randles-Sevick bağıntısıyla gösterilir. (Eşitlik 1.1)

$$i_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Eşitlik 1.1}$$

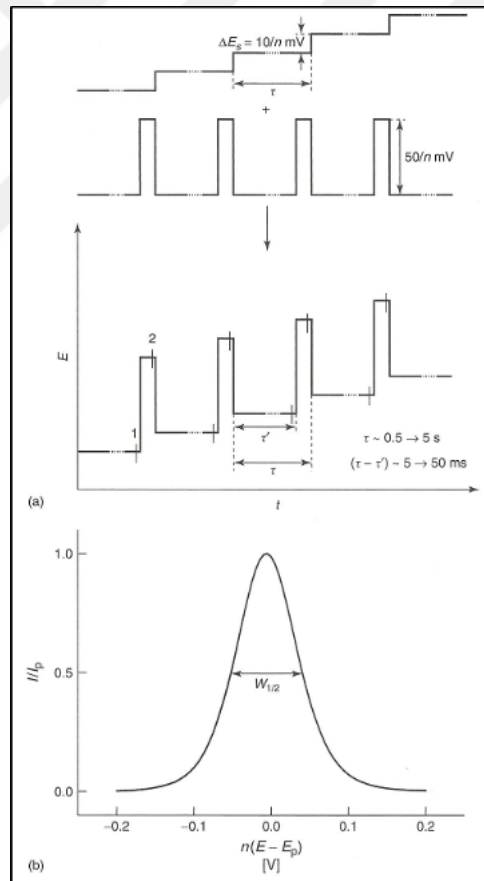
İlgili eşitlikte, i_p : pik akımını, A : elektrot yüzey alanını (cm^2), n : aktarılan elektron sayısını ($\text{mol e}^-/\text{mol molekül}$), C : elektroaktif türün başlangıçtaki derişimi, mol/cm^3 , D : difüzyon katsayısını, (cm^2/s), v : tarama hızını (V/s) ifade etmektedir. Tarama hızı parametresi elektrokimyasal yöntemlerde özellikle de dönüşümlü voltametri de önemli bir parametredir. Potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak değişimini ifade eder. Tarama hızı ile pik akımındaki farklılıklar kullanılarak, reaksiyonun difüzyon veya adsorbsiyon kontrollü olup olmadığı hakkında bilgi edinilebilmektedir.

Ayrıca bir elektrot yüzeyinde meydana gelen reaksiyonlar yarı tersinir, tersinir veya tersinmez davranışlar gösterebilir. Tersinir olduğunu anlamak için, dönüşümlü voltamogramda ters potansiyel bölgesinde pik gözlenmelidir, elektrot yüzeyinde, elektron aktarım hızı, kütle aktarım hızından büyük olacağı için Nernst eşitliği geçerlidir, tarama hızının değişimi dalga şeklini değiştirmez ve oda sıcaklığında katodik ve anodik pik potansiyelleri arasındaki fark, $\Delta E_p = (E_{p,a} - E_{p,k}) - 0,059/n$ dir. Yük aktarım katsayısı (α), 0,5' e eşitse pik akımları oranı eşittir. Bahsedilen bu durumların tam tersi olması durumunda da tersinmezlik söz konusu olmakla birlikte, $\Delta E_p = (E_{p,a} - E_{p,k}) > 0,059/n$ dir.

Tarama hızı ile ilgili bilinmesi gereken bir diğer husus ise, elektroaktif analit ile çalışma elektrodu arasında, elektron aktarımı, elektrot ara yüzeyi ile çözelti arasındaysa sistem difüzyon kontrollü kabul edilmekle birlikte, elektrot yüzeyinde gerçekleşen bir elektron aktarımı söz konusu olduğunda bu tür sistemlere adsorbsiyon kontrollü sistemler adı verilmektedir (Ozkan ve ark., 2015). Sistemin adsorpsiyon veya difüzyon kontrollü olmasının ifadesi tarama hızına karşı çizilen pik akımı (i_p-v) eğrisinin doğrusallığı ile birlikte, tarama hızının logaritmasına karşı akımın logaritmasının ($\log i_p - \log v$) grafiğine ait eğimin 1'e yaklaşması ile ifade edilmektedir. Buna göre 1' e yaklaşma durumu elektron transferinin elektrodun yüzeyinde gerçekleştiğini dolayısıyla sistemin adsorpsiyon kontrollü olduğunu belirtirken $\log i_p - \log v$ grafiğine ait eğimin 0,5'e yaklaşması aktarımın elektrot ile çözelti ara yüzeyi arasında gerçekleştiğinin ifadesidir. Bu da sistemin difüzyon temelli olarak ilerlediğini göstermiş olmaktadır.

1.3.1.1 Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Temel olarak lineer potansiyel artışına göre ayarlanan sabit büyüklükteki pulsların elektroda belirli bir süre uygulanması ile oluşur. Bu teknikte akım iki kere ölçülür, birinci ölçüm puls uygulama anından önce (pulsun başladığı anda da denilebilir), ikincisi ise pulsun bitimine yakın bir bölgede ölçülerek iki akım arasındaki fark olarak verilmektedir (Şekil 1.6). Uygulanan potansiyele karşı akım farklarının grafik haline getirilmesiyle de diferansiyel puls voltametrik voltamogram oluşturulmuş olur. Aradaki fark alınarak işlem yapıldığı için de kapasitif akım elimine edilmiş olur. (Torralba., 213).



Şekil 1.6. (a) potansiyel-zaman dalga formu, (b) şematize edilmiş bir voltamogram (Ozkan ve ark., 2015)

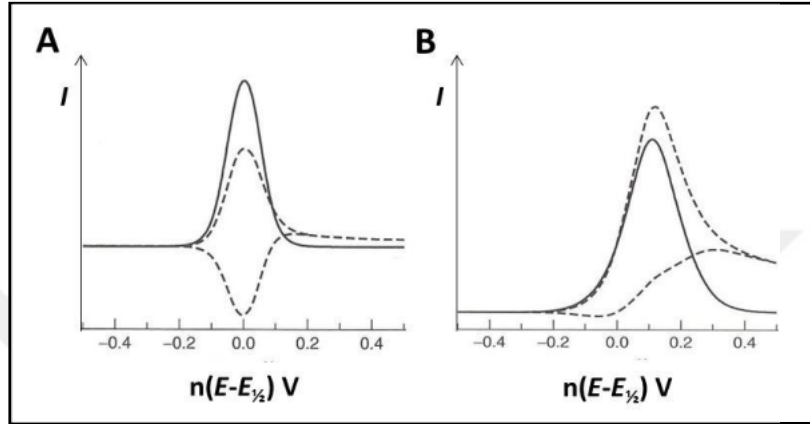
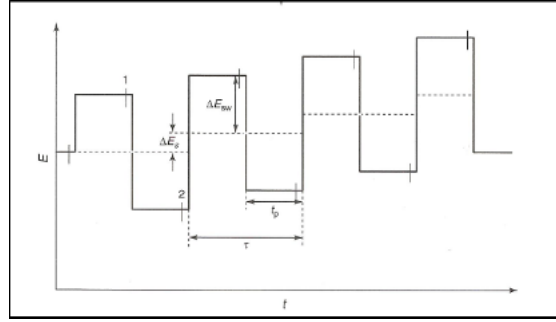
DPV yönteminin duyarlılığının yüksek olmasının iki ana sebebi bulunmaktadır:

- Faradayik akımın artması,
- Faradayik olmayan yükleme akımının azalması

Bu sayede de nanomolar ve mikro molar seviyedeki birçok analitin analizine olanak sağlanmaktadır. Ayrıca iki farklı potansiyele sahip analitlerin de eş zamanlı tayin edilemesini mümkün kılmaktadır.

1.3.1.2.Kare Dalga Voltametri (KDV)

Barker tarafından 1950'li yıllarda geliştirilen bu yöntem hızlı ve duyarlı bir teknik olmasıyla bilinmektedir. Çalışma elektroduna uygulanan potansiyel, büyük genişlikli bir diferansiyel teknik olmasını sağlayan simetrik kare dalgalar şeklindedir. DPV ile bu yöntemin temel farkı, geri yönde de pulsların uygulanmasının sonucunda, ileri yönde uygulanan puls bitişi ile geri yönde uygulanan puls bitişi arasında akımın ölçülüyor olmasıdır. Net akım diye adlandırılan akım, bu iki akım arasındaki farkın alınmasıyla ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.7).



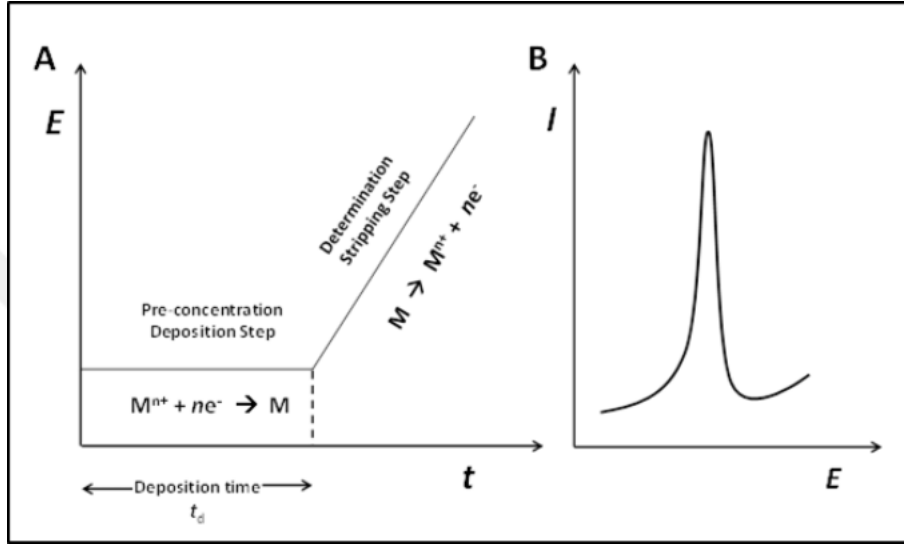
Şekil 1.7. Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyali ve voltamogram

DPV tekniğinde analit başına analiz süresi 2-3 dakikalara ulaşırken, KDV yöntemi kullanılarak saniyeler içinde analizi gerçekleştirmek mümkün olabilmektedir. Etkin tarama hızı, basamak yüksekliği (ΔE_s) ve kare dalgaının frekansı (f) değiştirilmek suretiyle belirlenmektedir.

1.3.1.3. Sıyırma Yöntemleri

Sıyırma yöntemlerinin temeli tayin edilecek analitin, elektrot yüzeyine az hacimde biriktirilmesine dayanmaktadır. Analizin başlangıç safhasında, ilk olarak bir damla oluşturulur ve belirli bir hızda karıştırma başlatılır. Analizi gerçekleştirilecek analitin,

yarı dalga potansiyelinden 1/10 volta daha negatif potansiyel uygulanmasıyla birikme başlamaktadır. Biriken analitin, elektrodun yüzeyine ulaşma hızını, analit derişimi, elektrot türü (yüzey alanı) ve destek elektrolit cinsine bağılı olarak değışiklik göstermektedir (Şekil 1.8).



Sekil 1.8. Anodik sıyırma voltametrisinin şematize edilmiş hali: potansiyel-zaman grafiğı (A), voltamogram (B)

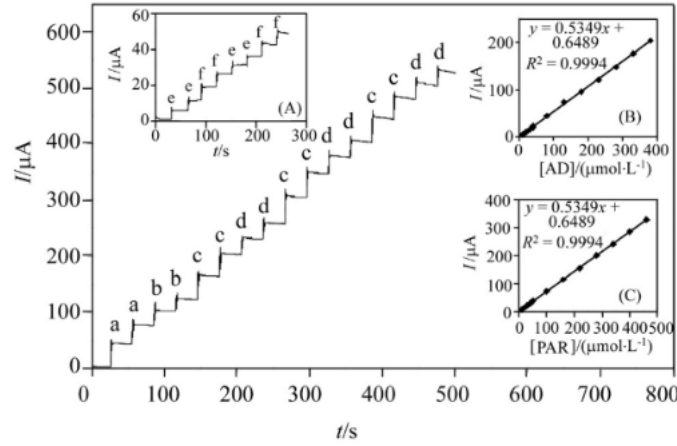
Bu noktada biriktirme potansiyeli, süresi gibi parametrelerin düzgün bir şekilde optimizasyonu önem teşkil etmektedir. Elektrot yüzeyinde birikimi sağlanan analit anodik veya katodik yönde uygulanan bir potansiyel taraması ile birlikte, yükseltgenme veya indirgenme vasıtasıyla elektrot yüzeyinden sıyrılarak çözeltiye geri aktarımı sağlanır. Çözeltiye geçen analite ait akım ölçülmesiyle de madde miktarı tayin edilir. Sıyırma voltametrisi kavramına ek olarak adsorptif sıyırma voltametri yöntemi de geliştirilmiştir. Bu yöntemin temel farkı, biriktirilmiş olan potansiyelde elektron transferinin gerçekleşmiyor olmasıdır. Eğer sıyırma, yükseltgenme yönünde gerçekleştiriliyorsa Anodik, indirgenme yönünde gerçekleştiriliyorsa katodik adsorptif sıyırma voltametrisi olarak adlandırılmaktadır.

1.3.2. Amperometri

Amperometri, belirli bir kimyasal türün derişimiyle orantılı olarak, akımın sabit bir potansiyelde analiz edildiğı elektro analitik yöntemdir. Söz konusu akım yoğunluğu, çalışma elektrotunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ifade edilir. Bununla birlikte, bu metodolojinin voltametreye benzememesinin en büyük avantajlarından biri, amperometride ortalama akımların zaman içinde ortalama olmasıdır, bu özellik, bazı durumlarda voltametri kullanılarak yapılan ölçümlerden daha fazla doğruluk sunar.(Grale ve Swartzlander., 2018)

1.3.2.1. Kronoamperometri

Kronoamperometri, zaman-akım ilişkisinin kontrollü bir potansiyelde araştırılmasını sağlayan bir yöntemdir. Elektroaktif türelerin elektron sayısını belirlemek için kullanılabildiğı gibi elektrot yüzey alanı ölçümü için de tercih edilebilmektedir. Tahmini elektrot sayısı bu yöntemde Cottrell eşitliğı kullanılarak hesaplanabilmektedir. Elektroda sabit bir potansiyel uygulanırken akım değışimleri de zamanın bir fonksiyonu olarak ölçülmektedir (Şekil 1.9) (Bard ve Fulkner., 2001)



Şekil 1.9. Parasetamol ve adrenalin kronoamperometri yanıtı. Modifiye edilmiş bir elektrot kullanma (SWCNT's-CHIT-IL/GCE) (Babaei ve ark., 2011)

1.4. Elektrokimyasal Hücrede Kullanılan Elektrotlar

Elektrokimyasal hücrede karşılaştırma elektrodu, referans elektrot ve çalışma elektrodu olmak üzere üç farklı elektrot kullanılır (Şekil 1.10). Voltametrik hücre çözelti ortamında çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması amacıyla azot ya da argon gibi inert bir gazın geçişine izin veren bir düzenele tamamlanır. Hücre içerisindeki çözeltinin 5-20 mL arasında olması ölçümün daha doğru olmasını sağlar.



Şekil 1.10. Hücre ve üç elektrotlu sistemin şematize edilmiş hali: referans elektrot (R), Çalışma elektrodu (W), Karşıt elektrot (A)

1.4.1. Referans Elektrot

Elektrokimyasal bir hücre içerisinde bulunabilecek referans elektrot çeşitleri, Doymuş kalomel elektrot ($\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$), gümüş/gümüş klorür elektrot (Ag/AgCl) olabilmektedir. Gümüş temelli elektrotun 60°C üzerindeki sıcaklıklarda kullanılabilir olması kalomel elektrota göre avantajdır. Bu sayede de geniş sıcaklık aralıklarında ve susuz ortamlarda kullanıma olanak sağlar. Bir referans elektrodun sahip olması istenilen özellikleri sıralamak gerekirse, sabit bir potansiyele sahip olmalıdır, sıcaklık değişimlerinden etkilenmemelidir, kolay hazırlanmalı, tersinir olmalı ve Nernst eşitliğine uygun olmalıdır.

1.4.2. Karşıt Elektrot

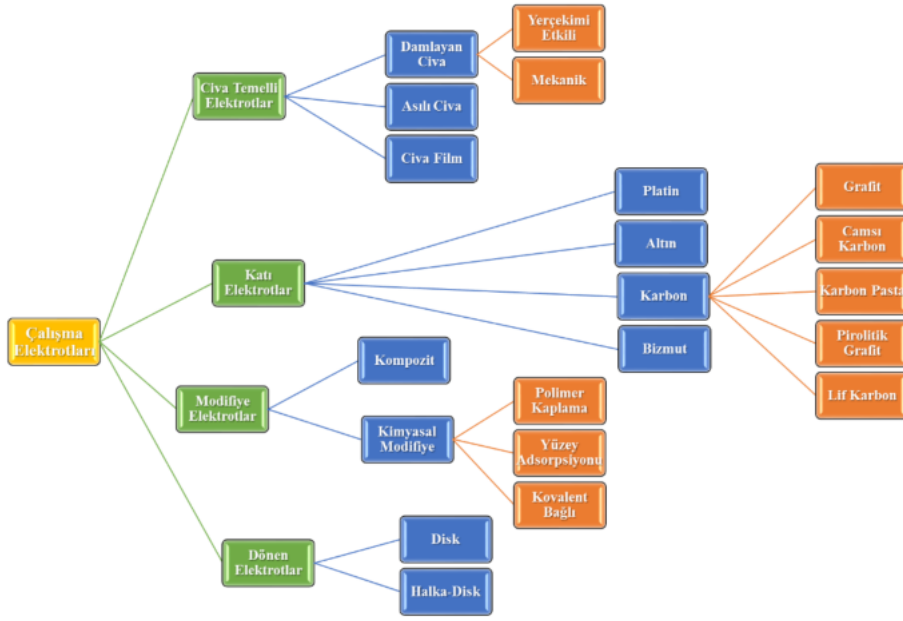
Civa havuzu veya platin, bir elektrokimyasal hücrede karşıt (yardımcı) elektrot olarak kullanılabilir. Çalışma elektroduna göre daha geniş bir yüzeye sahip olmalı beklenmekle birlikte, çözelti içerisinde geçen akımın çalışma elektroduna aktarımını sağlarlar.

1.4.3. Çalışma Elektrotları

Voltametri de sıklıkla kullanılan çalışma elektrotlarının genel sınıflandırılması Şekil 1.11 de verilmiştir. Bu elektrotların bulundurma gereken genel özellikler, aşağıda sıralanmıştır:

- Sinyal/gürültü oranlarının yüksek olmalıdır,
- Potansiyel aralığı geniş olmalıdır,
- Artık akım değeri düşük olmalıdır,

- Toksik olmamalıdır,
- Maliyeti düşük olması tercih edilmelidir,
- Gerek elektrokimyasal gerek kimyasal tepkimeye girmemelidir,
- Elektrot birim yüzeyine düşen akım şiddeti büyük olmalıdır,
- Ohmik direnci düşük olmalıdır,
- Hızlı ve tekrar edilebilir cevaplar vermelidir.



Şekil 1.11. Voltametri de sıklıkla kullanılan çalışma elektrotlarının genel sınıflandırılması

Tez kapsamında kullanılan çalışma elektrodu, katı elektrotlar sınıfında bulunan karbon temelli elektrotlardan camısı karbon elektrottur. Öncelikle camısı karbon elektrot ile analizler gerçekleştirilmiş daha sonra yüzeyi modifiye edilen elektrot ile de ölçümler arası farklar gösterilmiştir. Katı elektrotlar, Karbon elektrotlar ve CKE ile ilgili özet bilgiler aşağıda yer almaktadır.

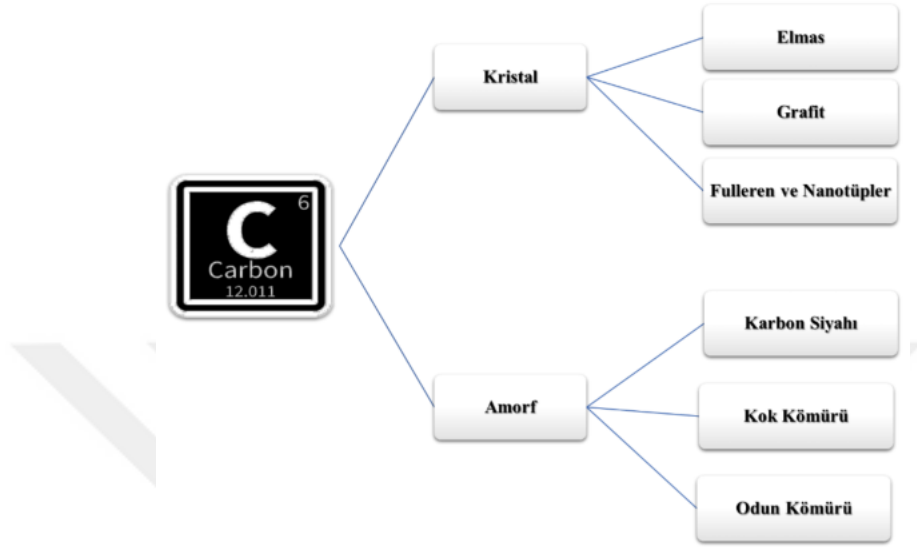
1.4.3.1 Katı Elektrotlar

Katı elektrotlar, ilaç etken madde ve biyolojik sıvıların analizinde sıklıkla kullanılmaktadır, bu sebeple farmakolojik aktivitenin detayları ve mekanizmanın aydınlatılması konularında da kullanılabilir. Cıva temelli elektrotlara göre daha kararlı sonuçlar veren modifikasyon yapılarak hassasiyetin ve seçiciliğin artırılması mümkün olan, daha tekrar edilebilir sonuçlarla karşılaşabileceğimiz bir elektrot sınıfıdır. Tez kapsamında kullanılacak karbon elektrotların dışında metalik elektrotlar da katı elektrotlar sınıfındadır.

1.4.3.1.1. Karbon Elektrotlar

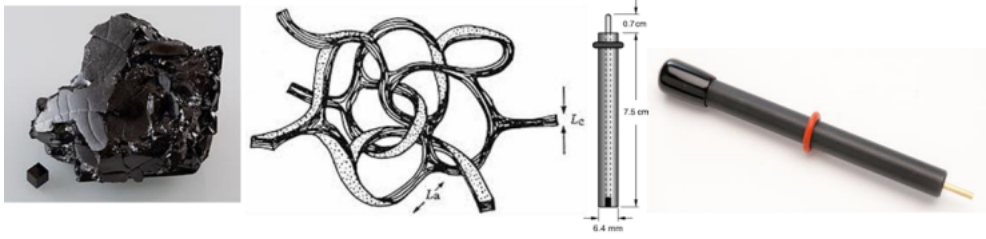
Karbon, insanlık tarafından binlerce yıldır yüksek stabilitesi ve çeşitli şekillerde hibritleşme kabiliyeti nedeniyle, yaygın olarak kullanılan bir malzemedir. 1990'lardan sonra, 1996'da Nobel Ödülü kazanan bilim adamları Curl, Kroto ve Smalley sayesinde, bu alanda büyük bir keşif olan 60 numaralı karbon allotropunun (C₆₀) keşfi nano-karbon teknolojisinin gelişmesine ivme kazandırmıştır. (Rageh ve Abdel-sabour, 2017). Karbon elektrotlar, kimyasal olarak inert olma avantajından, geniş potansiyel aralığında çalışmalara olanak sağlamasından, kolay modifiye edilebilir olmasından, tekrar edilebilir yüzey yapısına sahipliğinden ve de düşük artık akım oluşturmamasından dolayı sıklıkla tercih sebebi olmaktadır. (Yang ve ark., 2016) Karbon elektrotların modifikasyonunda kullanılan nanokarbonlar olarak adlandırılan bu çok boyutlu yeni karbonlar (Elmas, fulleren, nanotüpler, grafen, karbon fiberler ve elmas / karbon nanopartiküller vb.) Elektrokimyasal dedektörlerin ve sensörlerin performansını arttırmak konusunda umut vadetmektedir. Ayrıca elektrokimyasal dedektörlerin ve sensörlerin duyarlılığı,

tekrarlanabilirliği ve kararlılıklarında da artış sağlanmış olmakla birlikte biyo uyumludurlar (Yang ve ark., 2016).



Şekil 1.12. Karbon ve allotroplarına ait genel bir sınıflandırma (Dhawane ve ark., 2018)

Camsı Karbon Elektrotlar ise karbon elektrotların alt sınıfındadır ve sınıfındaki diğer elektrotlara göre farklı fiziksel özellikler barındırmaktadır. 1962’de Yamado ve Sato tarafından geliştirilmiş olup, yüzeylerinde daha küçük porlar içermektedir ve bu özellikleri dolayısıyla da yaygın kullanıma sahiptir. CKE’lerde analizler öncesinde elektrotları temizlemek için ön işlemler yapılması gereklidir. Bunlara örnek olarak kimyasal temizleme, elektrokimyasal temizleme ve fiziksel temizleme (parlatma) işlemleri vs. yapılmaktadır (Zittel ve Miller, 1965).



Şekil 1.13. Camsı (Glassy) karbon ve elektrot gösterimleri

Camsı karbon elektrot yüzeyinde yapılabilen en popüler metalik temelli modifikasyonlar aşağıda sıralanmıştır: Altın, platin, gümüş, azot, kadmiyum, kobalt, bakır, nikel, titanyum ve bunların haricinde de birçok karbon temelli malzeme ve polimerlerle modifikasyon mümkün olmaktadır. Modifiye edilmiş elektrotların birçok uygulaması vardır. Öncelikli olarak, elektro kataliz alanında olmuştur. Bu uygulamada, yakıt hücrelerinde ve bataryalarda kullanım için suda oksijeni azaltabilecek elektrotlar geliştirilmiştir. Başka bir uygulama, oksidasyon ve indirgeme ile renk değiştiren elektro kromik araçların üretimidir. Son olarak, bu tür elektrotların analitik kimyada özellikle belirli bir analit için seçici sensör geliştirmesi için kullanımı da çok yaygındır (Grale ve Swartzlander, 2018).

1.5. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Analitik yöntem geçerlilik testi, bir kimyasalın veya bir ilaç etken maddenin, bununla birlikte biyolojik bir örnek veya son ürün olan ilaç dozaj şeklinin her aşamada kesin, seçici, kararlı, doğru, kimyasal ve fiziksel özelliklerinin tehlikeye atılmadığından emin olmak için bir ürünün kalitesi ve niteliklerin çeşitli testler ile değer biçilmesidir. Analizci, ekipman, kimyasallar, referans standartlar ve ortam koşulları analize etkiyen en önemli

parametrelerdendir. Dolayısıyla, analizi etkileyen her bir parametre için sonuçlara etki edecek her bir etkenin tanımlanması ve süreçte dair olumlu veya olumsuz etkilerinin belirlenmesi gerekir.

Analitik yöntemlerde geçerlilik testlerinin yapımındaki asıl amaç, bilimsel bütünlük ve uygunluğun ulusal ve uluslararası arenada sağlanması, yeterli güvenilirlikte, tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesidir. Geliştirilen yöntemler, doğrusalılık, seçicilik, tayin alt sınırı, sağlamlık, teşhis sınırı, doğruluk, kesinlik, vb. parametrelerini içerir (Magnusson ve Örnemark., 2014). Validasyon, geliştirilen bir analiz yönteminin o andaki ve daha sonraki kullanımlarına ait geçerliliklerini gösterir ve aşağıdaki şekilde gösterilen parametreleri içerir. Optimize edilen bir yöntemin uygunluğunu belirleyen parametreler Uluslararası Uyum Konseyi (International Council for Harmonization, ICH) ve farklı farmakopelerde tanımlanmıştır. ICH, Amerikan Farmakopesi (USP) ve Avrupa Farmakopesi (EP) tarafından tanımlanan ve sağlanması gerektiği belirtilen parametreler Çizelge 1.1’c gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Analitik yöntem geçerlilik testi parametreleri

Gereken validasyon parametreleri	ICH’ ye göre	USP’ ye göre	EP’ ye göre
Seçicilik	+		
Doğrusallık	+	-	Sadece kantitatif çalışmalarda
Aralık	+		Sadece kantitatif çalışmalarda
Teşhis Sınırı	+	Sadece sınır testlerinde	Sadece sınır testlerinde
Tayin Alt Sınırı	+	Sadece kantitatif çalışmalarda	Sınır testlerinde
Kesinlik	+	-	Sadece kantitatif çalışmalarda
Tekrarlanabilirlik	+	-	
Gün içi tekrar edilebilirlik	+	-	
Günler arası tekrar edilebilirlik	+	-	
Doğruluk	+		Sadece kantitatif çalışmalarda
Sağlamlık	Tavsiye edilir		-
Stabilite	+	Tavsiye edilir	-

1.5.1. Seçicilik

Seçicilik bir analitik yöntemin, karışımlar veya matrisler içindeki belirli analitleri tanımlamak üzere, benzer özellik gösteren diğer bileşenlerin (safsızlıklar, bozunma ürünleri) girişimleri olmaksızın kullanılabilme derecesini ifade eder (Magnusson ve Örnemark., 2014). Seçiciliğin yeterli olmadığı bir analiz yönteminin diğer yöntem geçerlilik parametreleri de anlamsız olacaktır. Bir yöntemin seçiciliği genellikle analitin, ilgili analitle yüksek oranda benzerlik gösteren bir veya daha fazla kimyasal tür içeren farklı matrislerde analiz edilmesiyle belirlenir. Analit bir veya daha fazla kimyasal formda ise (farklı oksidasyon durumları, inorganik, organometalik, bağlı veya bağlı olmayan, vb.) önerilen yöntem bu bileşiklerin her birini tanımalıdır. Ürünü oluşturan yardımcı maddelerin ve çözücülerin de analizi gerçekleştirilen analitle aynı zamanda çıkan bir sinyal vermemesi gerekmektedir (Magnusson ve Örnemark., 2014). Eğer safsızlıklar ve bozunma ürünlerine ait referans standartlar mevcut değilse, bozundurma çalışmaları gerçekleştirilerek yöntemin seçiciliği gösterilebilir.

1.5.2. Doğrusallık ve Aralık

Derişime karşı, seçilen analitin cevabının geliştirilmiş yöntemde orantılı olarak değişmesi ve grafiğe geçirilen cevabın düz bir çizgi üzerinde yer alması doğrusallık olarak adlandırılır. Korelasyon (r) veya belirleyicilik (tanımlayıcılık) (R^2) katsayısı doğrusallığın sayısal ifadesini göstermektedir. Etkin madde analizlerinde r : 0,999 ve üzeri olması beklenmektedir.

Çalışma aralığı, metodun kabul edilebilir bir belirsizlikle sonuç sağladığı aralıktır. Çalışma aralığı belirlenirken hedef alınan konsantrasyona göre dizayn edilmesi önem arz etmektedir (hedef seviyenin %50'si ve %150'si aralığında olacak şekilde). Çalışma aralığının en üst sınırı analitik duyarlılıkta belirgin bir bozulmanın gözlemlendiği derişimdir (Magnusson ve Örnemark., 2014).

1.5.3. Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS)

Geliştirilen yöntemde genellikle düşük konsantrasyonları belirlemek gerektiğinde, TS ve TAS terimleri oldukça önemli bilgiler haline gelir ve genellikle yöntemin doğrusallığını belirlemek için başlangıç noktası olarak kabul edilir. TS, analitin, belirtilen koşullar altında yerinin nerede olduğunun belirlendiği, ancak miktarı hakkında kesin olarak bilgi verilemediği, tayin sınırları içerisine girmeyen en alt derişimdir. TAS, ise analitin belirtilen koşullar altında, kesin ve doğru olarak miktarının belirlenebileceği, doğrusallık aralığı dışında veya aralığın en alt sınırı olan düzeydir. Gözleme dayalı olarak, sinyal/gürültü oranına göre veya hesaplama ile tespiti gerçekleştirilebilir. Tez kapsamında gerçekleştirilen analizlerde eşitliğe dayalı yöntem kullanılmıştır.

$$TS = \frac{3.3 \times \sigma}{m} \quad TAS = \frac{10 \times \sigma}{m} \quad \text{Eşitlik 1.2}$$

Bu eşitlikte, σ : standart sapma; m : kalibrasyon doğrusunun eğimidir. TS ve TAS hesaplamasında kullanılan yöntem ve numune derişimleri çalışmada belirtilmelidir (Magnusson ve Örnemark., 2014, Gumustas ve Ozkan, 2011, Ozkan., 2012, Ozkan ve ark., 2015)

Analitik duyarlılık kavramından da bu başlık altında bahsetmek gerekirse, ölçülen niceliğin (örneğin; analit derişimi) değişimine karşı cihaz yanıtında oluşan değişiklik,

diğer bir deyişle yanıt eğrisinin eğimidir. Bir yöntemin hassasiyetinin, analit konsantrasyonundaki küçük farklılıklar arasında ayırım yapabilme yeteneğinin bir ölçüsü olduğu konusunda genel bir fikir birliği vardır. Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından kabul edilen hassasiyetin (duyarlılığın) nicel tanımı, ilgili konsantrasyondaki kalibrasyon eğrisinin eğimini ifade etmektedir. Bir yöntemin duyarlılığı ne kadar yüksekse seçiciliği o kadar düşüktür (Grale ve Swartzlander, 2018).

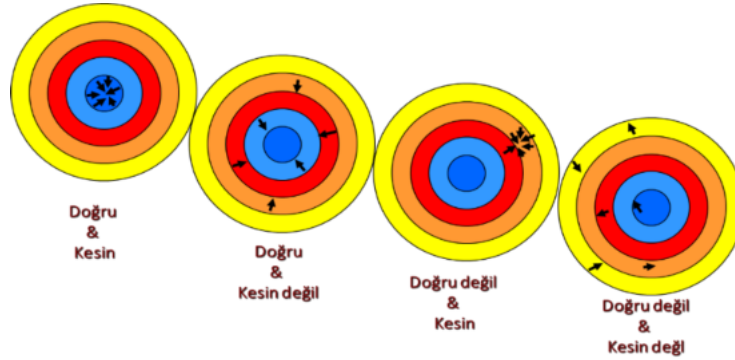
1.5.4. Kesinlik

Hassasiyet gündeme geldiğinde kesinlik terimini göz ardı etmemek gerekmektedir. Yöntemin rutin kullanımı sırasında oluşabilecek tüm uygulama farklılıklarını yansıtmak için analiz tekrarı içeren deneyler tasarlanmalıdır. Tekrarlanabilirlik, sonuçlar arasındaki en küçük varyasyonu vermesi beklenen, bir analistin, aynı cihazla kısa bir zaman aralığında gerçekleştirildiği ölçümlerin dağılımının ölçüsüdür. Tekrar elde edilebilirlik ise, sonuçlar arasındaki en yüksek varyasyonu vermesi beklenen laboratuvarlar arası sonuçların dağılımının ölçüsüdür (Magnusson ve Örnemark., 2014). Özet olarak, bir yöntemin sonuçlarının her bir ölçüm için birbirine yakınlığının ölçüsüdür. % bağlı standart sapma (BSS) veya % varyasyon katsayısı (VK) olarak ifade edilirler.

1.5.5. Doğruluk

Doğruluk parametresi, geri kazanım olarak tanımlanır. Geri kazanım, bulunan değer ve gerçek değer in % cinsinden oranı olarak tanımlanır. Analizlerin sonucunda kaydedilen

değerlerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunun bir ölçüsüdür. Şekil 1.14. analitik bir yöntemin doğruluk ve kesinliğinin ne anlama geldiğini açıkça ifade etmektedir.



Şekil 1.14. Doğruluk ve kesinlik parametrelerine genel bakış

Bu parametrelerin temel amacı, önerilen metodolojinin farklı bir yerde, farklı analist, farklı ekipman, reaktifler, nem, zaman dilimi vb. gerçekleştirildiğinde hata payları çerçevesinde yakın sonuçlara ulaşılmasını sağlar.

1.5.6. Sağlamlık ve Tutarlılık

Deneyler sonucunda elde edilen verilerin yöntem içerisinde ufak değişiklikler karşısında etkilenmeden kalabile kapasitesi sağlamlık olarak ifade edilir. Tutarlılık ise bir analitik yöntem, farklı analizciler tarafından yapıldığında, benzer cihazlar kullanılması sonucunda, reaktiflerin ve kimyasalların farklı olduğu koşullarda karşılaşılan farkların ölçümüne dayanır ve sonuçlar %BSS ile gösterilir. Aynı zamanda orta kesinlik ile de ilişkilendirilebilir.

1.6. Geçmişte Yapılmış çalışmalara ait rnekler

Literatür taraması yapıldığında parasetamol analizi ile ilgili rastlanılan çalışmalar ve bu çalışmalara ait zet bilgiler aşağıdaki çizelgelerde görülmektedir. (izelge 1.2-1.4)



Çizelge 1.2. Elektrokimyasal teknikler kullanılarak parasetamol tayini ile ilgili seçilmiş bazı çalışmalar.

Elektrot	Teknik	Tampon Çözelti Sistemi	Doğrusal Aralık	TS/TAS	Ortam	Kaynak
CKE (Camsı karbon elektrot)	DV ve KDV	0,1 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – NH_4Cl , (pH:9,3)	0,1-20 μM	0,032 μM	İnsan plazması ve farmasötik dozaj şekli	(Kang ve ark., 2010)
Elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit (ERGO)	KDV	Tampon (pH 9) Asetonitril 70: 30, (h/h)	-	0,011 μM	Kokain	(Rocha ve ark., 2017)
ZnONPs-Nq/CKE	DV ve DSV	0,1 M NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4	0,08-1,1 mM	0,030 μM	Farmasötik dozaj şekli	(Abdel-sabour., 2017)
Karbon pasta elektrot (KPE)	DV	0,1M NaOH	0,1-0,08 mM	0,018 nM	Poly (mavi anilin)	(Chandrashekar ve ark., 2014)
Poly(2,2'-(1,4-fenilenedivinilen) Bis-8-hidroksikuinaldin) Modifiye CKE	DV ve KDV	CH_3COOH ve NaCH_3COO ve	0,5-200 μM	0,075 μM	Farmasötik dozaj şekli ve idrar	(Filik ve ark., 2015)
Karbon pasta elektrot (CdO/NPs/ILs/KPE)	KDV	0,1 M tampon (pH 8,0)	0,1-600 μM	0,07 μM	Morfin	(Cheraghi ve ark., 2016)
Nikel oksit Nanopartiküller ve karbon siyahı, CKE	KDV	0,04 M Britton-Robinson tamponu (BR) (pH 3,0)	3,0- 47,8 μM	0,12 μM	Farmasötik dozaj şekli	(Batista ve ark., 2015)
(poly (AHNSA)/CKE)	KDV	Asetat tampon çözeltisi (pH 4,5)	10-125 μM	0,79 μM	İçecek numuneleri	(Tefera ve ark., 2016)
Karbon pasta elektrot (KPE) modifiye ile Pt-Co nanopartikül	DV, KDV ve EIS	Fosfat tamponu (pH 7,0)	1-850 μM	0,6 μM	Farmasötik ve biyolojik örnekler	(Karimi-Malche ve ark., 2016)
Çok duvarlı karbon nanotüpler (ÇDKNT)	DV	PBS (pH 7,0)	0,3-400 μM	0,1 μM	Farmasötik dozaj ve insan serumu	(Zhang ve ark., 2016)
Bor Katkılı Elmas Elektrot	DV ve KDASV	Fosfat tamponu (pH 2,5)	5-125 μM	0,597 μM	Farmasötik dozaj	(Yiğit ve ark., 2016)
RGO-CB-CTS/CKE	KDV	Fosfat tamponu (pH 7,0)	2,8-19 μM	0,053 μM	İdrar numuneleri	(Baccarin ve ark., 2017)

Grafen oksit (Pd/GO)	EIS, DV ve DPV	Raporlanmamış	0,005–0,5 µM ve 0,5–80 µM	2,2 nM	Farmasöti k dozaj ve idrar numuneleri	(Li ve ark., 2014)
Çok duvarlı karbon nanotüpler ve kitosan - bakır kompleksi (ÇDKNT CTS–Cu)	DV	PBS (pH 7,0)	0,1–200 µM	0,024 µM	Farmasöti k dozaj ve insan serumu	(Mao ve ark., 2015)
IL–NH ₂ –Fe ₃ O ₄ NP–ÇDKNT -CKE	CV	0,1 M BR Tamponu (pH 9,5)	Raporlanmamış	0,04 µM	Farmasöti k dozaj	(Chokkareddy ve ark., 2019)
TDKN-CHIT-IL/CKE	DV, DPV ve KΛ	0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0)	0,5–400 µM	Raporlanmamış	İnsan kanı ve idrar	(Babaci ve akr., 2011)
TDKN-CHIT-RTIL/CKE	DV, DPV ve KΛ	0,1 M fosfat tamponu (pH 7)	2–200 µM	0,11 µM	İnsan serumu ve idrar	(Afrasiabi, ve ark., 2016)
Karbon pasta elektrot modifiye ile (HNED–ÇDKNPE)	DV ve DPV	Tampon çözelti (pH 8)	1–100 µM	0,046 µM	İnsan serumu ve idrar	(Behpour ve ark., 2014)
Bor katkılı elmas elektrot BKEE	BIA-MPA	0,04 M Britton Robinson tamponu	NR	0,293mg/L	Farmasöti k dozaj	(Pereira ve akr., 2013)
BKEE	MPA	Britton Robinson tamponu	NR	0,15 µM	Farmasöti k dozaj	(Chaves ve ark., 2015)
Katodik ön işleminden geçirilmiş bor katkılı elmas elektrot KBKEE	FIA-MPA	0,04 M Britton Robinson tamponu (pH 2,0)	1–1000 µM	0,03 µM	İnsan serumu ve idrar	(Santos ve ark., 2015)
NiAlHCF/CKE	Hidrodinamik amperometri	0,1 M asetat tampon (pH 5,5)	3–1500 µM	0,8 µM	Farmasöti k dozaj	(Asadpour-Zeynali ve Amini., 2017)
BKEE	BIA-MPA	Raporlanmamış	5–520 µM	1,59 µM	Farmasöti k dozaj	(Alencar ve ark., 2018)

Çizelge 1.3. HPLC kullanılarak parasetamol tayini ile ilgili seçilmiş bazı çalışmalar

Sabit Faz	Hareketli Faz	Doğrusal aralık	TS/TAS	Ortam	Kaynak
ODS C-18 Intersil (25 cm x 4,6 mm, 10 µm.)	Metanol: Su, 70:30 (h/h)	5-50 µM	-	Farmasötik dozaj	(Wadher ve ark., 2006)
µ-Bondapak C8	0,01 M KH ₂ PO ₄ -metanol-asetonitril-izopropil alkol (420:20:30:30) (h/h/h/h)	0,409-400 µg/ml	0,409 µg/ml	Farmasötik dozaj	(Altun, 2002)
Hypurity Advance (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Fosfat tamponu (pH 6.3) :asetonitril , 90:10 (h/h)	10-400 µg/ml	0,64/ 2,13 µg/ml	Farmasötik karışım	(Belal ve ark., 2009)
Bio SiL IIL C18, (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Asetonitril: Su, 25:75, (h/h)	NR	0,01/0,2 µg/ml	Farmasötik dozaj	(Franela ve ark., 2002)
Zorbax SB C18, (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Asetonitril ve 50mM ortofoforik asit 40:60, (h/h)	12,5-100 µg/ml	0,027/ 0,081 µg/ml	Farmasötik dozaj	(Shaikh ve Devkhile, 2008)
Kogent fenil 100-A° (2,1 x 50 mm, 5 µm)	0,1% (h/h) formik asit tamponu	-	0,66 µM	Fare idrarı	(Hewavitharana ve ark., 2008)
C18e (125 mm x 3 mm, 5 µm)	Metanol ve su 50:50, (h/h)	1,95- 45 µg/ml	0,65/ 1,95 µg/ml	İnsan idrarı	(Baranowska ve Wileczek, 2009)
Nucleosyl, C18 (250 x 4,6 mm, 10 µm)	Asetonitril: Su, 50:50, (h/h)	6 -10000 ng/ml	6 ng/ml	İnsan serumu	(Sultana ve ark., 2012)
Phenomenex C18	0,05 mM sodyum sülfat:asetonitril, 93:7, (h/h)	2-100 µg/ml	1,61 µg/ml	İnsan serumu	(Tanam ve ark, 2014)
Hypersil BDS C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	20 mM sodyum dihidrojen fosfat metanol (80:20)	0,02-20 µg/ml	0,02 µg/ml	İnsan plazması	(Helmy ve El-Bedaiwy, 2014)
Zorbax-Sb-C18 (250 x 4,6 mm,5 µm)	Asetonitril- metanol- formik asit (7:7:86)	0,125- 8 mg/L	Raporlanmamış	İnsan plazması	(XUE Hong-yuan ve ark., 2005)
Gemini C18 (250 x 4,6 mm; 5µm)	Amonyum asetat tamponu (10 mM, pH 3), AcN ve metanol	0,5-25 µg/ml	0,5 µg/ml	Fare plazması	(Locatelli ve ark., 2015)
Hypersil ODS	Metanol ve fosfat tamponu	0,6-40 mg/L	0,06 mg/L	İnsan plazması	(Yan-Bin, Fang, ve Jin-Song, 2009)
C18c (125 x 3 mm, 5 µm)	su içinde metanol,asetonitril ve %0,05 trifloroasetik asit	4,5-38 µg/ml	0,13-0,42 µg/ml	İnsan idrarı	(Baranowska ve ark., 2006)
Hiber C18 (250x4,6 mm, 5 µm)	10 mM potasyum fosfat tamponu-asetonitril (70:30, h/h)	0,100 ila 50 µg/ml	Raporlanmamış	İnsan serumu	(Gorain ve ark., 2013)

Çizelge 1.4. GC-MS kullanılarak parasetamol tayini ile ilgili seçilmiş bazı çalışmalar

Kolon	Sıcaklık	Doğrusal aralık	TS/TAS	Ortam	Kaynak
100% dimeülpolisiloksan (Rtx-1)	1 dk için 70 ° C, 30 ° C / dk hızında 250 ° C'ye yükseltilmiş, ardından 20 dk 250 ° C' de bekletme	75-500 µg/ml	20/ 66.7 µg/ml	İnsan plazması, kanı ve farmasötik dozaj	(Belal ve ark., 2009)
Optima delta-6 (30 m x 0,25 mm iç çap, 0,25 m film kalınlığı)	90 ° C'de 1 dakika, daha sonra 15 ° C / dakika hızında 330 ° C'ye, 1 dakika boyunca 330 ° C fırın sıcaklığı. Arayüz, enjektör ve iyon kaynağı 300 ° C, 280 ° C ve 250 ° C'de tutulmuştur.	Raporlanmamış	13 µM	İnsan İdrarı ve plazması	(Trettin ve ark., 2011)
J&W HP-1MS, 12 m uzunluk, 0,25 mm iç çap ve 0,25 mm film kalınlığı	85 ° C'lik başlangıç sıcaklığı ve 3 dakikalık bir başlangıç süresi ve 35 ° C / dakika ile 310 ° C'ye yükseltildi.	10-200mg/L	Raporlanmamış	Farmasötik dozaj	(Meyer ve ark., 2011)
IIP-5MS (30 m x 0,25 mm iç çap, film kalınlık 0,25 µm	100 ° C (3-dk tutma) başlangıç sıcaklığı 250 ° C 15 ° C / dk. kütle seçici detektör arayüzü 150 °, 230 ° ve 280 ° C idi.	0,1-10 ng/L	Raporlanmamış	İnsan saçı	(Saito ve ark., 2008)

Bu tez ile öngörülen çalışmada parasetamol için hassas, duyarlı, hızlı ve tamamen validasyonu yapılmış elektrokimyasal ölçüm temeline dayanan sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Analizlerde kullanılacak katı elektrotların özgün nano malzemelerle modifiye edilerek daha hassas ve düşük tayin sınırına sahip analizlerin yapılması hedeflenmiştir. Elektrokimyasal yöntemlerden amperometri, dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls ve kare dalga voltametresi gibi yöntemler kullanarak, uygun destek elektroliti ve pH belirlenmesi, bu ortamda miktar tayini yapılması, teşhis ve tayin limitleri, tekrar edilebilirlik ve tüm gerekli validasyon parametrelerinin de gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Validasyon parametreleri sonucu geçerliliği kanıtlanan yöntem voltametri tekniği kullanılarak sentetik biyolojik numunelerden parasetamol analizi için kullanılmıştır. Geliştirilen bu yöntemlilerin ileriki aşamalarda da hasta başı analizlerde kullanıma uygun sensörlerin üretilmesine de katkı sağlayabileceği öngörülmektedir. İlgili tez bu yönleriyle de literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Kullanılan araç, gereç ve kimyasallar

Çizelge 2.1. Kullanılan araç ve gereçler

Araç ve gereçler	Marka ve Firma
Potansiyostat	Ivium model CompactStat.h Standard
Karşılaştırma Elektrodu	Ag/AgCl (3M KCl), BASi, MF2021, (Lafayette, ABD)
Çalışma Elektrodu	Camsı karbon elektrot, BASi, MF2070, (Lafayette, ABD)
Yardımcı Elektrot	Platin karşıt elektrot, BASi, MF4130, (Lafayette, ABD)
Elektrokimyasal deney hücresi	Tek bölmeli hücre, BASi, MR1208, (Lafayette, ABD)
Parlatma pedleri	BASi MF 1040, (Lafayette, ABD)
Isıtıcı, manyetik karıştırıcı	Ikamag RII, IKA-Labor Technic, (Staufen, Almanya)
Hassas terazi	Shimadzu Libror AEG-220 (Tokyo, Japonya)
Ultrasonik banyo	Interlab (İstanbul, Türkiye)
pH metre	Model 538 (WTW, Avusturya)
Ultra distile su cihazı	Milli-Q, Merck (Darmstadt, Almanya)

Çizelge 2.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf maddeler

Araç ve gereçler	Marka ve Firma
Altın nanopartikül	Nanocs
Platin nanopartikül	Nanocs
Grafen kuantum noktalar	Dropsens
Kromatografik saflıkta etanol	Sigma-Aldrich
Kromatografik saflıkta metanol	Sigma-Aldrich
Kromatografik saflıkta etanol	Sigma-Aldrich
Nafion	Sigma-Aldrich
Parasetamol	Nobel ilaç
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich

Asetik asit (%99-100)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit (%37)	Sigma-Aldrich
Sülfürik asit (%96)	Sigma-Aldrich
o-Fosforik asit (%85)	Sigma-Aldrich
Alümina süspansiyon	Master Prep
Askorbik asit	Sigma-Aldrich
Ürik asit	Sigma-Aldrich
Dopamin	Sigma-Aldrich
Glikoz	Sigma-Aldrich
Folik asit	Sigma-Aldrich
Magnezyum sülfat	Sigma-Aldrich
Paroksetin HCl	Sigma-Aldrich
Sultamisilin Tosilat	Sigma-Aldrich
Flurbiprofen	Sigma-Aldrich

2.2.Çözeltilerin Hazırlanması

2.2.1. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde tampon çözeltiler (destek elektrolitler) kullanılmıştır. Tampon çözelti seçiminde dikkat edilecek hususların başında parasetamolün çözünmesini zorlaştırmayan, geniş bir pH aralığını taramamızı sağlayan ve akım değerlerinin düşük olduğu tampon çözelti sistemlerinin seçimi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tampon çözelti sistemleri, asetat, fosfat, Britton Robinson tamponları ile birlikte 0,1M ve 0,5 M sülfürik asit çözeltileri de tampon olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır.

Britton-Robinson tamponunun hazırlanışı (pH 2,0-12,0): Tamponu sistemini oluşturan çözeltilerin her birine ait analitik derişimin 0,04 M olacak şekilde alınıp 1000 ml su ile

hazırlanmasıyla oluşturulur. İstenilen pH değerlerine getirmek için farklı derişimlerde NaOH ve HCl kullanılmıştır. 2,47 g H_3BO_3 , 2,7 ml H_3PO_4 ve 2,3 ml CH_3COOH ' nin distile su kullanılarak 1000 ml de hazırlanmasıyla oluşturulur. Kullanım zamanına kadar $-4^{\circ}C$ 'de tutulmuştur.

Asetat tamponunun hazırlanışı (pH 3,7-5,7): Asetat tampon çözelti sistemini hazırlanırken CH_3COOH distile suda çözülmüş ve molaritesi 1 M olacak şekilde hazırlanmıştır. pH değışimleri 5 M NaOH kullanılarak gerçekleştirilerek pH 3,7- 4,7- 5,7 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Fosfat tamponunun hazırlanışı (pH 1,5-8,0): Fosfat tamponu çözelti sistemi için H_3PO_4 ve $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ kullanılarak 0,2 M olacak şekilde tartılarak distile suda çözerek pH (1,5-8,0) aralığında 6 farklı pH değerine ayarlanmıştır.

2.2.2. Parasetamolün Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Parasetamole ait stok çözelti hazırlanırken $1 \times 10^{-4} M$ olacak şekilde hassas bir şekilde tartılan etken madde distile suda çözülmüştür. 100ml' ye balon joje kullanılarak tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri hazırlanırken stok çözeltiden alınan belirli miktarlar tampon çözelti ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.2.3. Farmasötik Dozaj Şekline Ait Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan farmasötik dozaj şekilleri hazırlanırken, Boots® ticari tablet preparatlarından 10^{-3} M' lik parasetamol konsantrasyonuna sahip bir çözelti hazırlanmıştır. Bunun için 5 adet 500 mg parasetamol içeren tablet tartılıp havanda güzelce toz haline getirilmiştir. Gerekli konsantrasyona sahip stok tablet çözeltisi hazırlanırken, tartılan tozdan 4,44 mg alınmış 25 ml su ile balon joje içerisinde çözülmüştür. Çözelti 30 dk ultrasonik banyoda ısınmasını engellemek amacı ile buz aküleri eşliğinde karıştırılmıştır. Süzülen çözelti, destek elektrolit kullanılarak uygun çalışma derişimlerine getirilmiş ve ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemler Minoset® tablet için de uygulanmış, 250 mg parasetamol içeren tabletler tartılıp ezildikten sonra, 9,851 mg toz tartılmış ve 25 ml de çözülmüştür. Süzülen çözeltiler kullanıma kadar buzdolabında saklanmıştır. Farmasötik dozaj formlarında bulunan yardımcı maddelerin analize girişim etkisinin olup olmadığını kontrol etmek için geri kazanım çalışmaları planlanmıştır. Bu çalışmada, tablet çözeltisinden belirli ve sabit bir miktar alınmış üzerine saf standart parasetamol belirli konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Ölçümleri yapılacak çözeltiler destek elektrolit içerisine alınmış ve voltamogramlar kaydedilmiştir. Eklenen standart madde miktarının ne kadarının tayin edilebildiği ölçülmüş ve bu sayede de geri kazanım sonuçlarına ulaşılmıştır.

2.2.4. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması

Tez kapsamında biyolojik örnek olarak kullanılan kan ve idrar örnekleri sağlıklı bireylerden toplanarak bir havuz oluşturulmuştur. Kan örneklerinden serum kısımları alınmış ve analiz yapılacak zamana kadar -20°C ' de tutulmuştur. Her iki numune türünün analiz için hazırlanmasında, 0,9 ml biyolojik numune alınmış ve 1,35 ml asetonitril ilave edilmiştir. Matriks olacak ölçüm için 0,23 ml destek elektrolit çözeltisi ilave edilirken,

biyolojik numune stok çözeltisi olacak çözeltiye de 0,23 ml $1 \times 10^{-3} \text{M}$ parasetamol ilave edilmiş ve stok çözelti konsantrasyonunun $1 \times 10^{-3} \text{M}$ olması sağlanmıştır. Protein denatürasyonu ve çöktürülmesi amacıyla 5000rpm de 10 dakika boyunca santrifüj edilen örneklerin süpernatantları biyolojik numune kalibrasyonu için ayrılmıştır. Çalışma çözeltileri hazırlanırken stok biyolojik numuneden belirli miktarlar alınarak destek elektrolit çözeltisinde seyreltmeler gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Olası Girişim Yapabilecek Maddelerin Çözeltilerinin Hazırlanması

Hedef analitin analizini güçleştirecek veya analizin yapılmasını engelleyecek, girişim yapabilecek olası maddelerin analize etkisinin olup olmadığını belirlemek ve geliştirilen yöntemin seçiciliğini ve hassasiyetini doğrulamak için girişim çalışmaları (interferans) gerçekleştirilmektedir. Aşağıda listelenmiş olan ajanlar insan vücudunda bulunan endojen bazı bileşikler ve dışarıdan alınabilecek olası etken maddeleri ifade etmektedir:

Her bir kimyasal madde için stok çözeltileri, $1 \times 10^{-3} \text{M}$ derişimde olacak şekilde 10 mL su ile balon jojelerde hazırlanmıştır. Detaylı tartımlar aşağıdaki çizelgede mevcuttur (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Girişim yapabilecek maddelerin hazırlığına ilişkin çizelge

Madde	Miligram (mg)	Çözücü (10ml)
Askorbik Asit	1,761	Deiyonize Su
Folik Asit	4,414	NaOH (5M)
Ürik Asit	1,681	Metanol
Dopamin	1,531	Deiyonize Su
Glukoz	1,801	Deiyonize Su
Sodyum Klorit	0,584	Deiyonize Su
Magnezyum Sülfat	1,203	Deiyonize Su
Paroksetin HCl	3,748	Deiyonize Su
Sultamisilin	7,669	Metanol
Flurbiprofen	2,244	Deiyonize Su

2.2.6. CKE' nin Modifikasyonu ve Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında kullanılan nanoyapılar fiziksel ve kimyasal modifikasyon işlemleri kullanılarak hazırlanmıştır. Başlangıç malzemesi olarak ticari olarak elde edilmiş olan aktif karbon kullanılmıştır. İlk önce bilyeli değirmen kullanılarak aktif karbon nanoparçacıklarının yapısında kusurlar oluşturulmuştur. Bu işlemden sonra ise elde edilen nanoyapıların yüzeylerine kimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak gümüş (Ag) nanoparçacıkları çöktürülmüştür.

Bilyeli Değirmen ile Yapısal Modifikasyon işleminde ilk önce aktif karbon daha önce belirlenmiş miktarda sertleştirilmiş çelik vial içerisine koyulmuştur. Daha sonra karbon/bilye oranı ağırlıkça 1/100 olacak şekilde 16 adet serleştirilmiş çelik bilyeler yerleştirilmiştir. Vial içerisine karbon ve bilyelerin yükleme işlemleri glove box (vakum kabini) içerisinde Argon atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Böylece vial içerisinde oksitleyici herhangi bir ortamın bulunmaması sağlanmıştır. Aksi halde öğütme işlemi sırasında oluşan yüksek enerjinin de etkisi ile birlikte yapıda oksit tabakaları veya oksit türleri oluşacak ve ulaşılmak istenilen elektro-katalitik özelliklerin etkisine olumsuz etkileri bulunacaktır. Öğütme işlemine 5 dakika boyunca devam edilmiştir. Öğütme süresinin uzun olması durumunda yapıda meydana gelen kusurların etkisi ve yoğunluğu fazla olacak ve amorf karbon yapıları elde edilecektir. Bu sebepten dolayı 5 dakika öğütme süresi bu malzemelerin modifikasyonu için belirlenmiş ve uygulanmıştır.

Yapısal modifikasyon sonrasında elde edilen nanoyapıların elektro-katalitik özelliklerinin daha da iyileştirilmesi amacıyla yüzeye kimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak Ag nanoparçacıkları çöktürülmüştür. Bu işlemde ise 5 dakika öğütülmüş aktif karbondan 30 mg alınarak 30 mL 11,72 mg AgNO₃ içeren ultra saf su içerisinde 55 °C'de 12 saat boyunca dağıtılmıştır. 12 saatin sonunda 25 mL saf su içerisinde çözdürülmüş 25 mg NaBH₄ yavaşça karışıma eklenmiştir. Ekleme işleminin ardından 1 saat boyunca 55 °C'de karışmaya devam etmiştir. Daha sonra da filtreleme işlemi ile sıvı fazdan ayırma ve ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak vakum ortamında 40 °C'de kurumaya bırakılmıştır.

Tez çalışması kapsamında hazırlanan yüzeye Ag nanoparçacıkları çöktürülmüş 5 dakika öğütme işlemine tabi tutulmuş aktif karbon (bu aşamadan sonra AgAC5DKBM olarak belirtilecektir) fiziksel ve kimyasal karakterizasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Hazırlanan nanoyapıların karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılım spektroskopisi (EDS), termogravimetrik analiz (TGA), Raman Spektroskopisi yöntemleri kullanılmıştır Karakterizasyon çalışmaları için detaylı bilgiler bulgular kısmında verilmiştir.

2.2.7. Modifiye Elektrodun Hazırlanması

Parlatma pedi kullanılarak, az miktarda su ile 0.05 µm alümina süspansiyonu vasıtasıyla elektrot yüzeyi 1-2 dakika boyunca mekanik temizlemeye tabi tutulur. Yüzey tamamen temiz olduğunda öncelikle saf su daha sonra da detaylı temizlik için saf su-etanol (80:20, h/h) çözeltisiyle 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilir. Daha sonra kuruması beklenir. Sensör yüzeylerinin hazırlanması amacıyla AgAC5DKBM kullanımı ile aşağıda verilen bileşime sahip mürekkep karışımları hazırlanmış ve daha önceden parlatılmış camı karbon yüzeyine pipet yardımıyla 5µL damlatılıp kurumaya bırakılmıştır. 1 saat bekletildikten sonra ölçümler yapılmıştır.

- 2 mg Katalizör
- 30 µL Nafion
- 0,2 ml Etanol
- 0,8 ml DI (Deiyonize Su)

3. BULGULAR

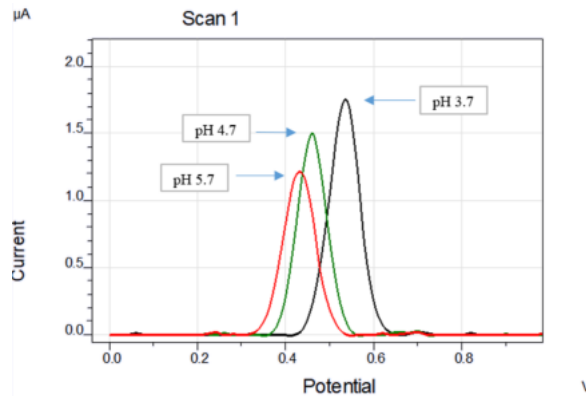
3.1. Camı Karbon Elektrotta Parasetamol Davranışının İncelenmesi

Parasetamole ait camı karbon elektrot ile gerçekleştirilen analizler, DV, DPV, KDV, AdSV teknikleri kullanılarak yapılmıştır.

3.1.1. pH Taraması

pH taraması yapılırken gereç ve yöntem başlığı altında belirtilen tampon çözeltiler, belirtilen aralıklarda kullanılarak destek elektrolit cinsinin akım ve potansiyel etkisi incelenmiştir. 10 μM derişimde hazırlanan parasetamol çözeltilisi, DPV tekniğı kullanılarak farklı destek elektrolit ortamlarda ölçülmüştür.

10 μM Parasetamol 'un pH 3,7- 5,7 asetat tamponu aralığıında incelenen voltamogramları Şekil 3.1'de akım ve potansiyel değlerleri ise Çizelge 3.1'de verilmiştir.

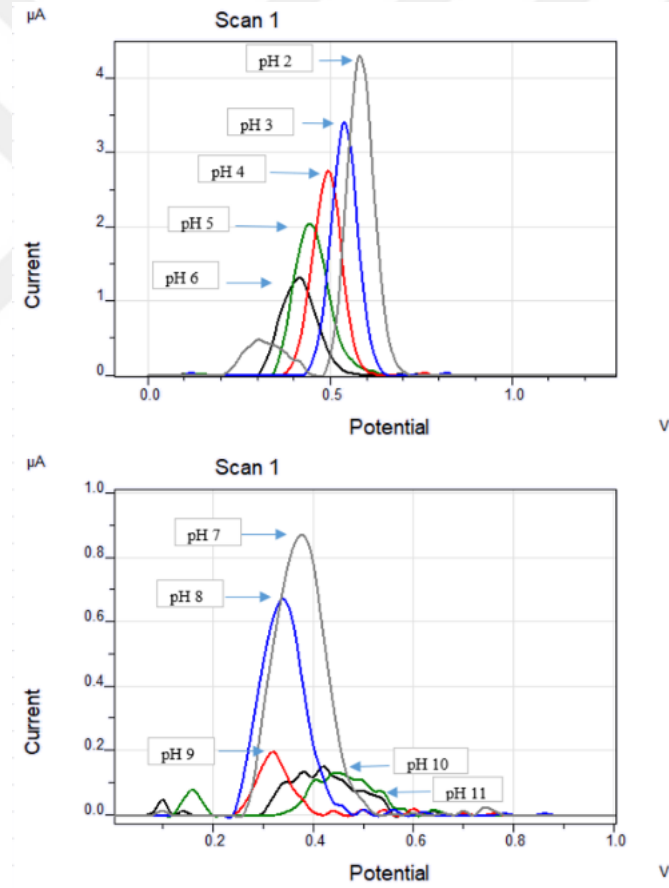


Şekil 3.1. 10 μM Parasetamol 'un camı karbon elektrot ile asetat tamponu (3,7-5,7) içerisinde incelenen voltamogramları (Tarama hızı: 100 mV s^{-1})

Çizelge 3.1. Asetat tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 10 μM Parasetamol 'un farklı pT değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Akım değeri (μA)	Potansiyel (V)
3,7	1,81	0,55
4,7	1,46	0,46
5,7	1,19	0,44

10 μM Parasetamol'un BRT tamponu (pH 1,5- 11) kullanılarak incelenen voltamogramları Şekil 3.2'de ve akım ile pik değerleri ise Çizelge 3.2' de verilmiştir.

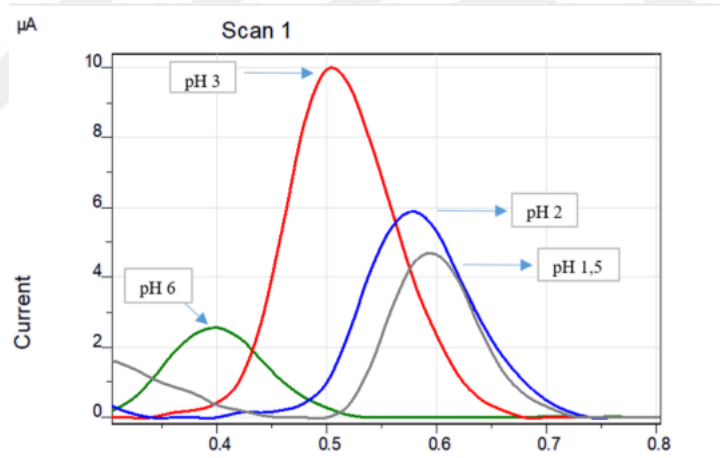


Şekil 3.2. 10 μM Parasetamol 'un camı karbon elektrot ile BRT tamponu içerisinde incelenen voltamogramları (Tarama hızı: 100 mV s^{-1})

Çizelge 3.2. BRT tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 10 μM Parasetamol 'un farklı pII değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pII	Akım değeri (μA)	Potansiyel (V)
2	4,26	0,58
3	3,35	0,54
4	2,7	0,5
5	2,2	0,44
6	1,28	0,42
7	0,86	0,4
8	0,663	0,34
9	0,185	0,32
10	0,122	0,48
11	0,116	0,44

10 μM Parasetamol'un fosfat tamponu (pH 1,5-8) kullanılarak incelenen voltamogramları Şekil 3.3'te verilmiştir.

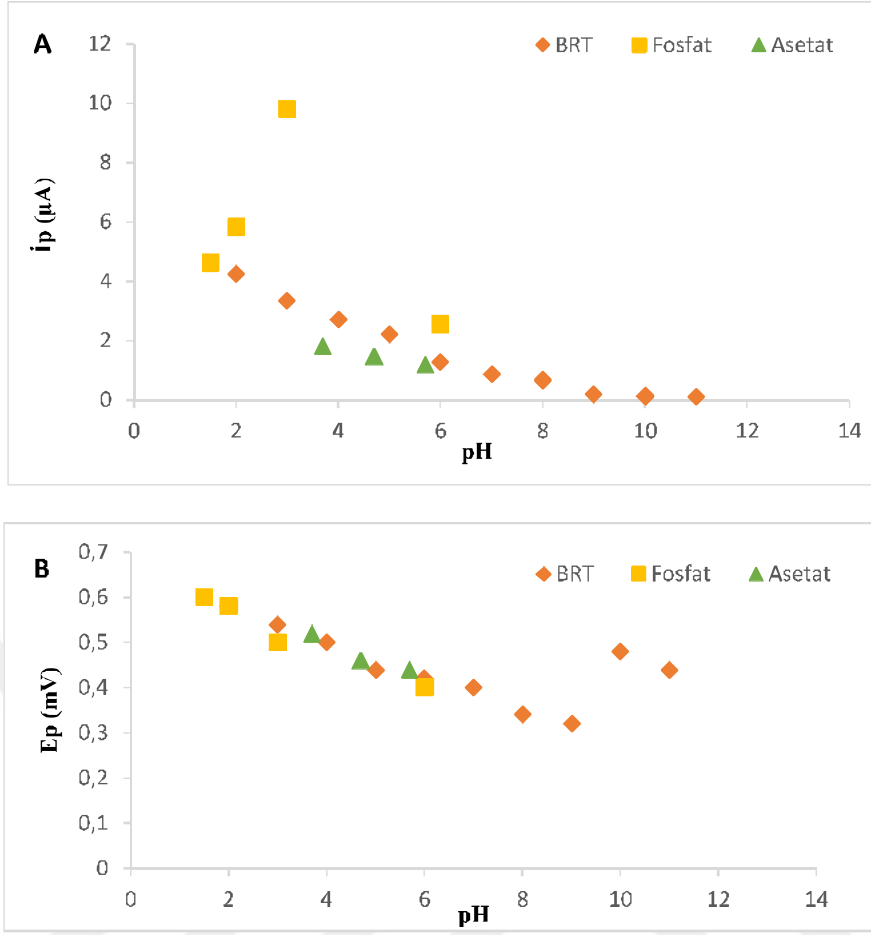


Şekil 3.3. 10 μM Parasetamol 'un camı karbon elektrot ile fosfat tamponu içerisinde incelenen voltamogramları (Tarama hızı: 100 mV s^{-1})

Çizelge 3.3. Fosfat tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 10 μ M Parasetamol 'un farklı pII değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pII	μ A	Potansiyel
1,5	4,62	0,6
2	5,83	0,58
3	9,8	0,5
6	2,5	0,4

Yukarıdaki sonuçlar bağlamında, destek elektrolitin pH değerinin azalmasıyla yani daha asidik bölgelere yaklaşıldığında, potansiyel değerlerin daha pozitif değerlere kayarak arttığı görülmektedir. Ep-pH doğrusu ve denklemi aşağıda gösterilmektedir (Şekil 3.4.). Farklı şekillerde, pII değeri arttıkça, parasetamolün pik noktasının voltamogramın soluna doğru yani daha negatif potansiyele doğru hareket ettiği voltaj değerlerinin 0,5'in altına düşürdüğü açıkça görülmektedir.



Şekil 3.4. 10 μM Parasetamol 'un camısı karbon elektrot ile kaydedilen voltamogramlarına göre farklı pH değerleri için pik akımı (A) ve pik potansiyeli (B) üzerine etkisini gösteren eğriler. (Δ): Asetat tamponu, ($\square$): Fosfat tamponu, ($\diamond$): BRT tamponu (Tarama hızı: 100 mV s⁻¹)

pH taramaları sonucunda analite ait voltamogramlar ve grafiklerin de incelenmesi sonucunda, sinyalin şekli ve sinyale ait akım açısından bir değerlendirme yapıldığında, analizlerin devamı için en uygun destek elektrolitin fosfat tamponu olduğu ve en uygun pH değerinin de 3,0 olduğu görülmektedir. Optimum koşul olarak belirlenen bu destek elektrolit ortamında mekanizmayı aydınlatmak adına hız taramaları gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Camsı Karbon Elektrot ile Hız Taraması

Hız taramasında temel amaç, elektrot yüzeyine madde taşınmasının adsorpsiyon veya difüzyon yoluyla olup olmadığını belirlemektir. Bu sebeple, pH 3,0 fosfat tamponu kullanarak ve 10 µM parasetamol derişimde, 5–1000 mV s⁻¹ (n:10) aralığında hız taramaları DV tekniğiyle yapılarak sonuçlar aşağıda verilmiştir. 10x10⁻⁶M parasetamol'un pH 3 fosfat tamponu ortamında yapılan hız taraması çalışmasında tarama hızı ile pik akımı arasında doğrusal bir ilişki olduğu aşağıdaki denklem ile gösterilmiştir.

$$i_p (\mu A) = 0,0305v (mVs^{-1}) + 1,519 (r: 0,9916; n: 10)$$

Aynı ortamda tarama hızının kare kökü ile pik akımı arasındaki ilişki ise aşağıdaki denklem ile gösterilmiştir.

$$i_p (\mu A) = 0,9487v^{1/2} (mVs^{-1}) - 3,0709 (r: 0,9862; n:10)$$

Parasetamol için pH 3,0 fosfat tamponu içerisinde $\log v - \log i_p$ eğrisinin eğim değeri 0,715 olarak bulunmuştur ve elde edilen doğruya ait denklem aşağıda verilmiştir.

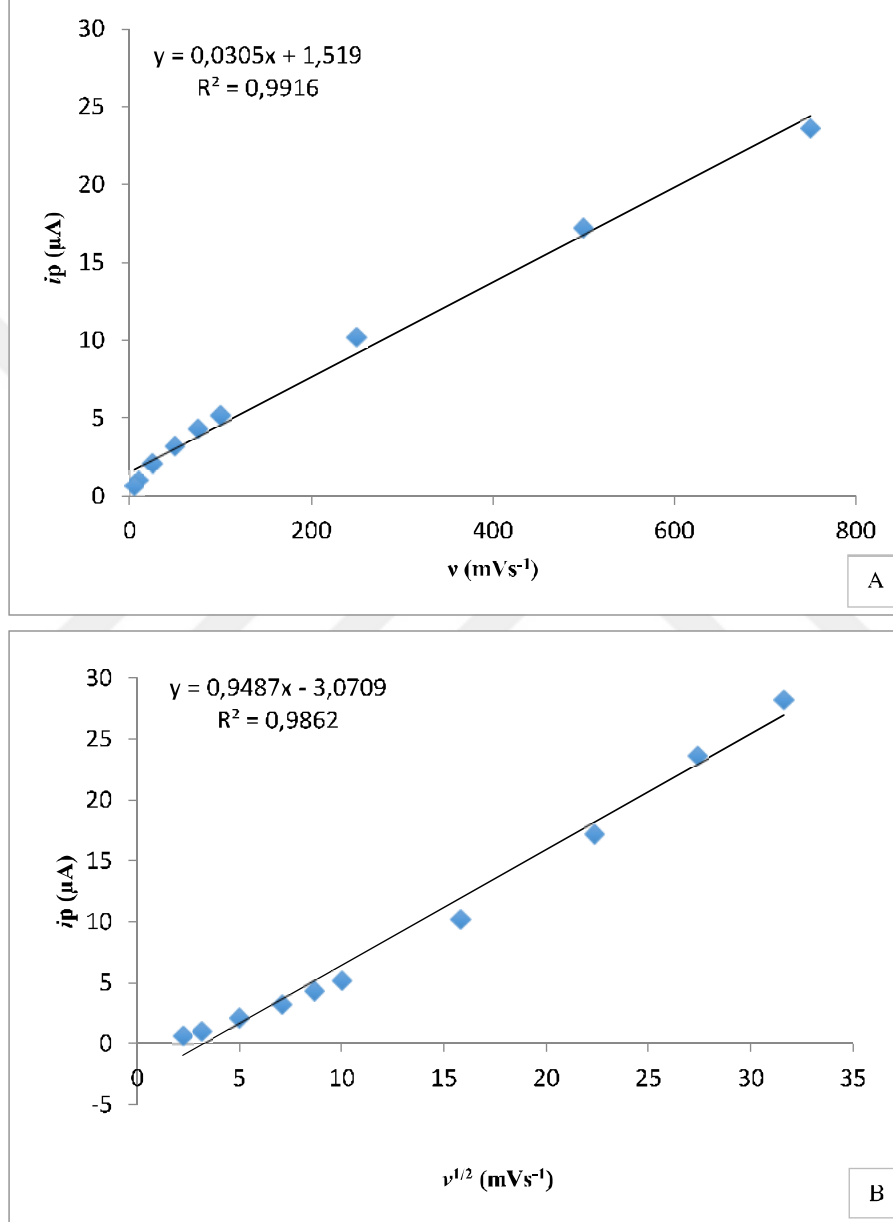
$$\log i_p (\mu A) = 0,715 \log v (mVs^{-1}) - 0,6982 (r: 0,9993; n: 10)$$

Parasetamol için camısı karbon elektrot ile yapılan hız taraması sonuçlarına göre çizilen $E_p - \log v$ eğrisine ait eğim değeri 0,0288 olarak bulunmuştur, buradan elde edilen doğru

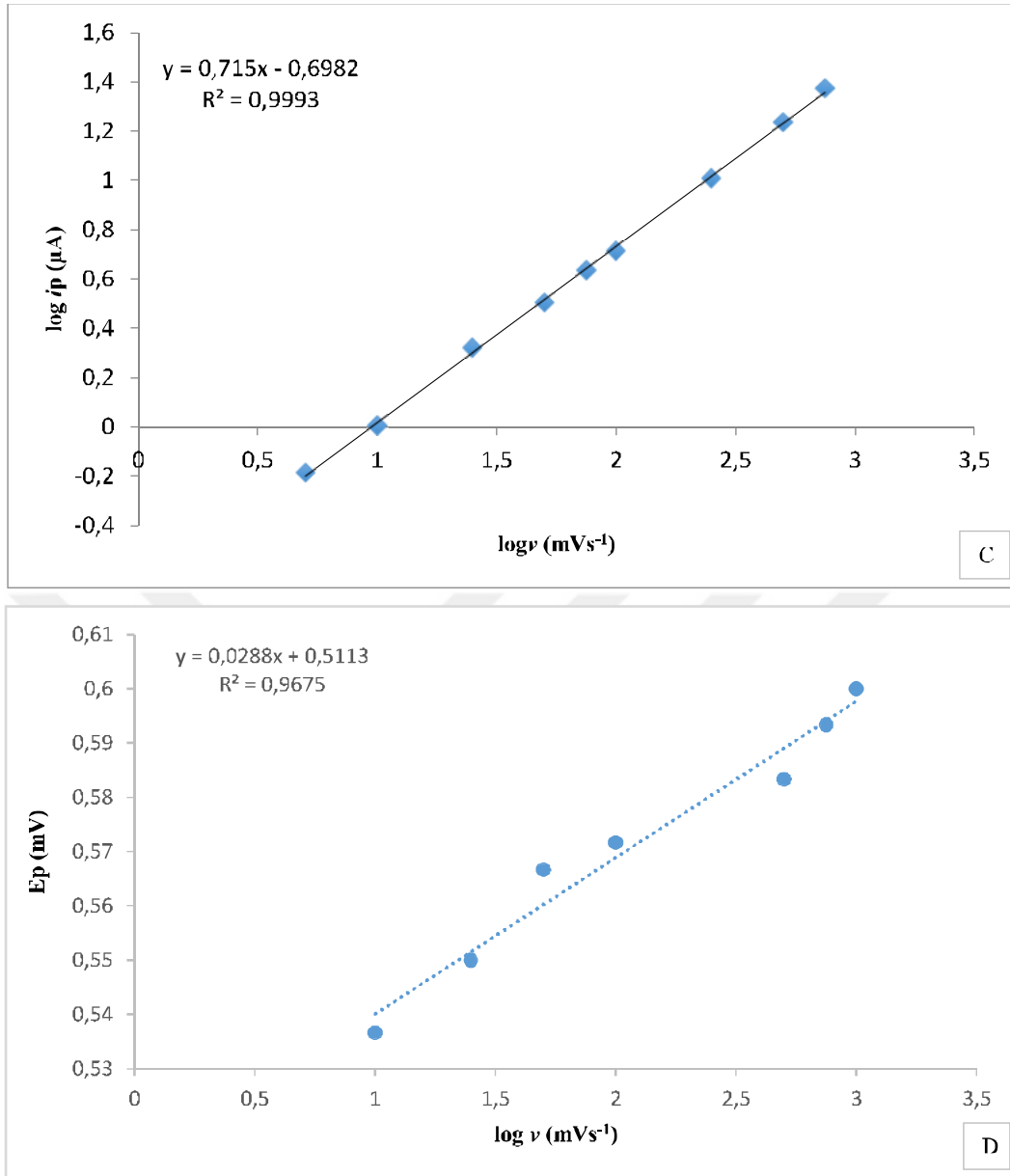
Denklemini aşağıda sunulmuştur,

$$E_p (mV) = 0,0288 \log v (mV s^{-1}) + 0,5113 (r = 0,967 n = 7) \text{ şeklindedir.}$$

10×10^{-6} M parasetamol 'un pH 3 fosfat tamponu ortamında yapılan hız taraması çalışmasında elde edilen tarama hızının kare kökü- akım eğrisi, $\log v - \log i_p$ eğrisi, tarama hızının logaritması ile pik potansiyeli eğrisi ve tarama hızı- pik akımı eğrisi sırasıyla Şekil 3.5 ve 3.6' da verilmiştir.



Şekil 3.5. $10 \mu M$ Parasetamol 'un camısı karbon elektrotta ile pH 3 fosfat tamponu ortamında $5-1000 mVs^{-1}$ aralığında yapılan, tarama hızı-pik akımı (A), hız taraması çalışmasının kare kökü ile pik akımı (B) arasındaki ilişkiyi gösteren eğriler.



Şekil 3.6. 10 µM Parasetamol 'un camısı karbon elektrotta ile pH 3 fosfat tamponu ortamında 5–1000 mV s⁻¹ aralığında yapılan, tarama hızının logaritması ile pik akımının logaritması (C) ve tarama hızının logaritması ile pik potansiyeli (D) arasındaki ilişkiyi gösteren eğriler.

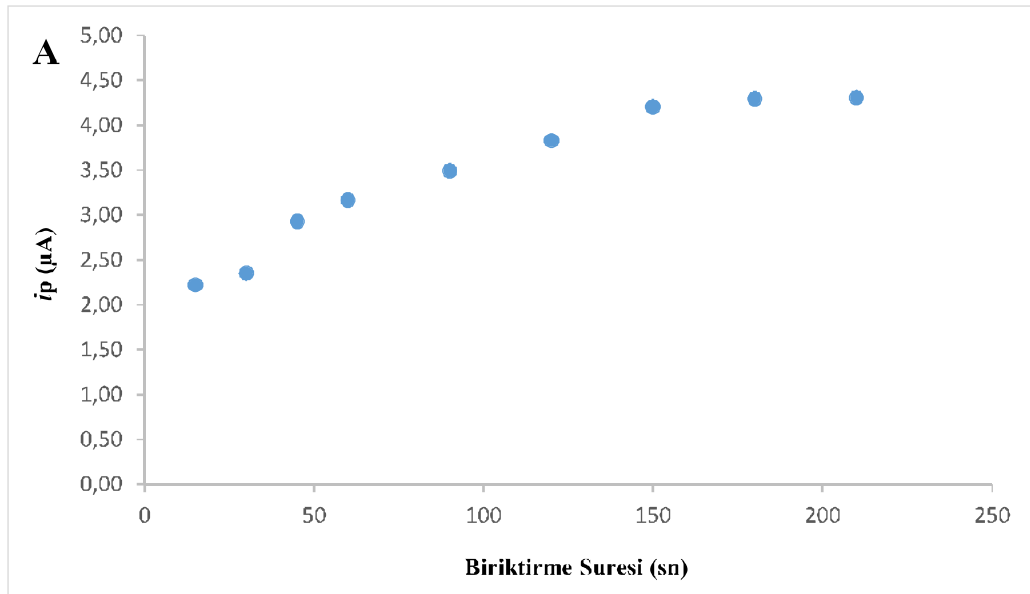
Literatüre göre, hızın logaritması ile akım değerlerinin logaritması grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denkleminin ait eğim, 0,5 değerine yakınsa elektronların elektrot yüzeyine taşınması difüzyon yoluyla, bu değer 1'e yakın çıkması durumunda ise mekanizma adsorpsiyon kontrollü olarak kabul edilmektedir. (Laviron ve ark., 1980). Tez kapsamında CKE ile yapılan bu tarama sonucunda potansiyel kaymasının pozitif yönde 70 mV olduğu görülmüş olup, $\log v - \log i_p$ eğrisinden elde edilen eğim 0,715 olarak

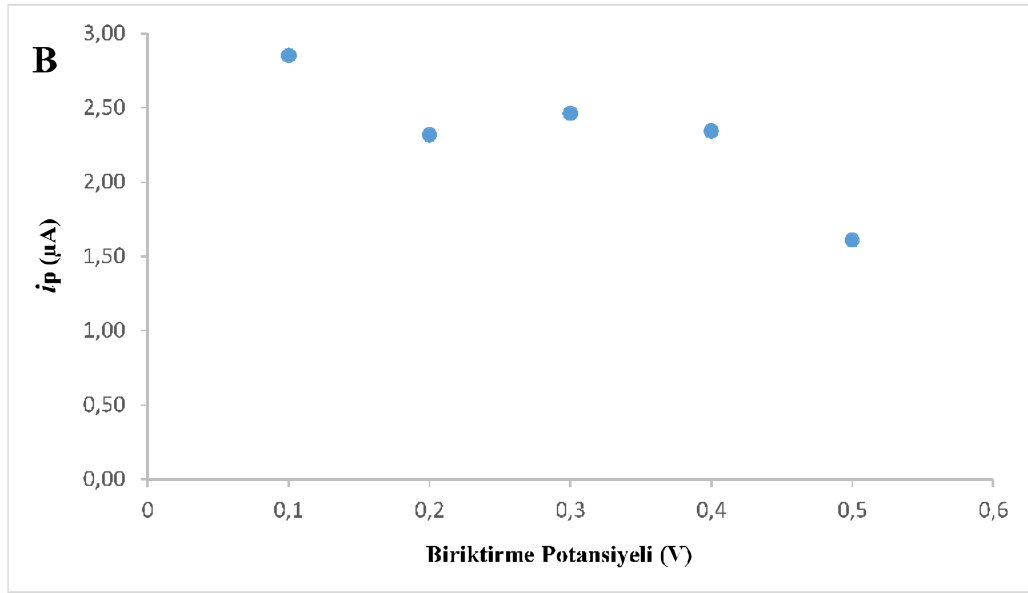
hesaplanmıştır ve bu sonuçlar ışığında taşınma mekanizmasının adsorpsiyon olduğu görülmüştür.

3.2. Camı Karbon Elektrotta DPV Tekniğinin Optimizasyonu

Uygun pH ve hız taraması sonuçları alındıktan sonra DPV tekniğine ait diğer parametrelerin (biriktirme süresi ve biriktirme potansiyeli) optimizasyonuna ait çalışmalar CKE ile gerçekleştirilmiştir.

DPV tekniği için optimum olarak bulduğumuz pH 3,0 fosfat tamponu içerisinde biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi çalışmaları $10 \times 10^{-6} \text{M}$ derişimde yapılmıştır (Şekil 3.7). Biriktirme potansiyeli çalışmalarında biriktirme süresi olarak 150 saniye kullanılmıştır. En yüksek akım değerinin elde edildiği potansiyel 0,1 V olarak belirlendikten sonra 15–210 saniye aralığında biriktirme süresi optimizasyonu yapılmış ve en uygun değer 150 saniye olarak seçilmiştir (Şekil 3.7).



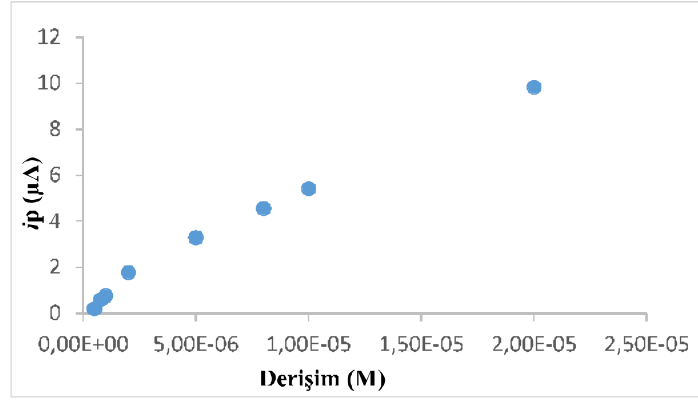


Şekil 3.7. 10 μM Parasetamol 'un camısı karbon elektrotta ile pH 3 fosfat tamponu ortamında DPV ile elde edilen biriktirme süresine karşı akım (A) ve biriktirme potansiyeline karşı akım (B) grafikleri.

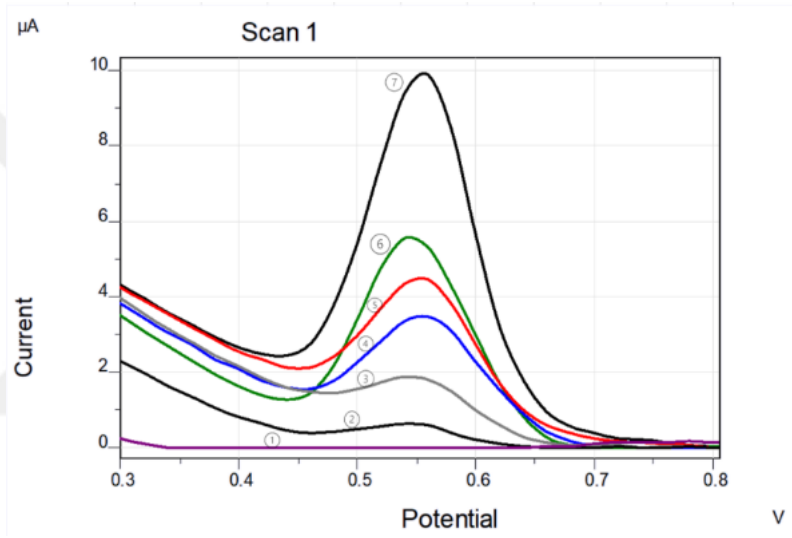
3.3. Camısı Karbon Elektrot Kullanılarak Gerçekleştirilen Analiz Çalışmaları

pH 3,0 fosfat tamponu ve CKE kullanılarak oluşturulan parasetamole ait kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 3.8.). Doğrusallık $5 \times 10^{-7} M - 2 \times 10^{-5} M$ derişimleri arasında sağlanmış olup sabit bir potansiyelde, parasetamol derişimine karşı çizilen pik akımları sonucunda elde edilen voltamogramlar (Şekil 3.9) doğru denklemleri ve kalibrasyona ait veriler aşağıdadır:

$$i_p (\mu A) = 4,822 \times 10^5 C (M) + 0,443; r = 0,9895 (n = 8)$$



Şekil 3.8. Parasetamol 'un CKE kullanılarak ile $5 \times 10^{-7} \text{M}$ - $2 \times 10^{-5} \text{M}$ derişim aralığında pH 3,0 fosfat tamponu içerisinde DPV tekniği ile elde edilen kalibrasyon grafikleri.



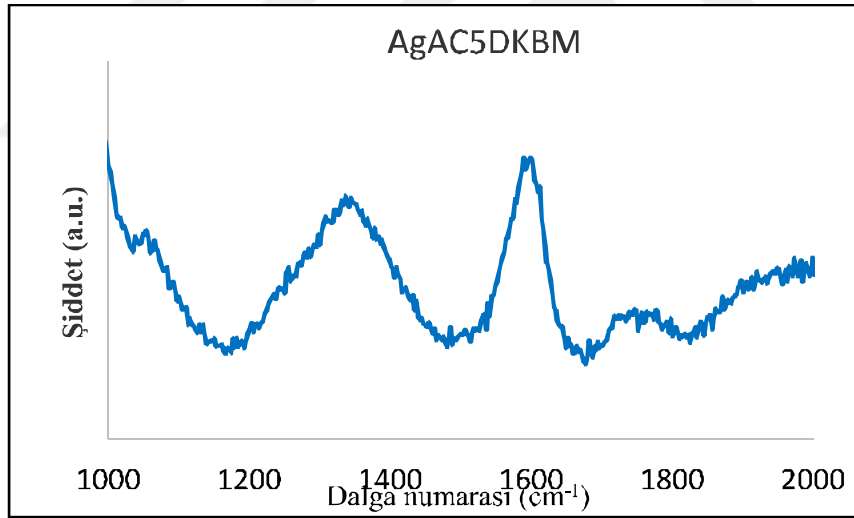
Şekil 3.9. CKE kullanılarak pII 3,0 fosfat tamponu içerisinde parasetamol 'un seçilmiş derişimlerindeki DPV ile elde edilen voltamogramları. 1) Destek elektrolit; 2) $8,0 \times 10^{-7} \text{M}$; 3) $2,0 \times 10^{-6} \text{M}$; 4) $5,0 \times 10^{-6} \text{M}$; 5) $8,0 \times 10^{-6} \text{M}$ 6) $1,0 \times 10^{-5} \text{M}$ 7) $2,0 \times 10^{-5} \text{M}$

DPV yöntemi ile gerçekleştiren modifiye edilmemiş CKE kullanılarak yapılan analizlere ait kalibrasyon eğrisine dair elde edilen veriler çizelge 3.9'te özetlenmiştir. İlgili çizelgede modifiye CKE kullanılarak yapılan analiz sonuçları da mevcuttur.

3.4. Parasetamol Analizi için CKE Üzerinde Yapılan Modifikasyon Çalışmaları

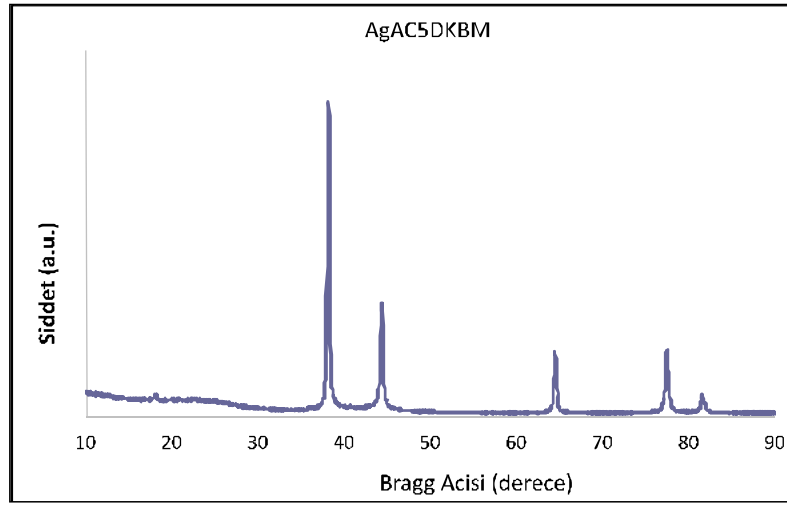
3.4.1. Modifikasyon Malzemesinin Karakterizasyonu

Raman Spektroskopisi yöntemi bağ yapısının karakterizasyonu için kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.10’ da verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde karbon yapılarına ait karakteristik Raman piklerinin elde edildiği görülmektedir. 1350 ve 1590 cm^{-1} dalga numaralarında elde edilen pikler karakteristik D ve G bantlarının varlığını göstermektedir.



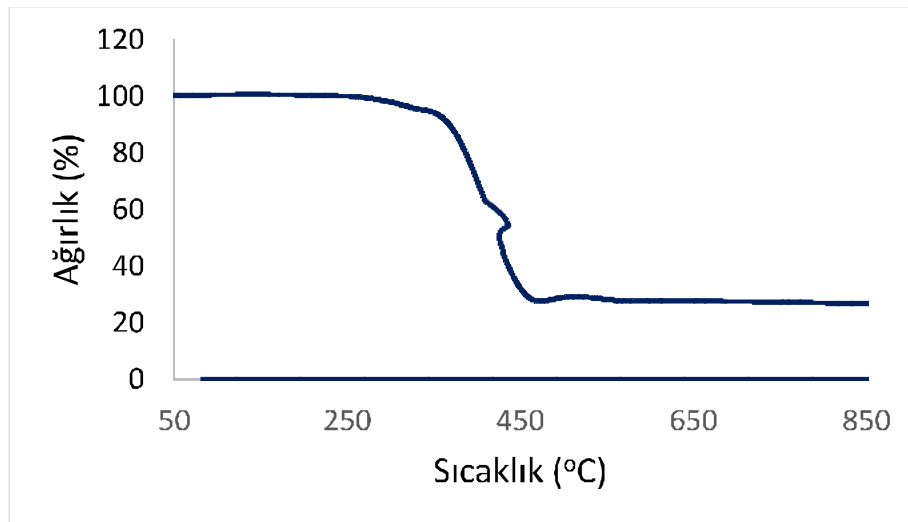
Şekil 3.10. Raman Spektroskopisi sonucu

Hazırlanan malzemelerin faz analizi X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. XRD sonucu şekil 3.11’ de verilmektedir. 38.3, 44.3, 64.6, 77.5 ve 81.9 açılarında elde edilen XRD pikleri yüzey merkezli kübik yapıya sahip (YMK) Ag fazının varlığını göstermektedir. Bu pikler sırasıyla (111), (200), (220), (311) ve (331) düzlem ailelerine karşılık gelmektedir. Elde edilen sonuç, aktif karbon yüzeyinin Ag nanoparçacıkları ile başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir.



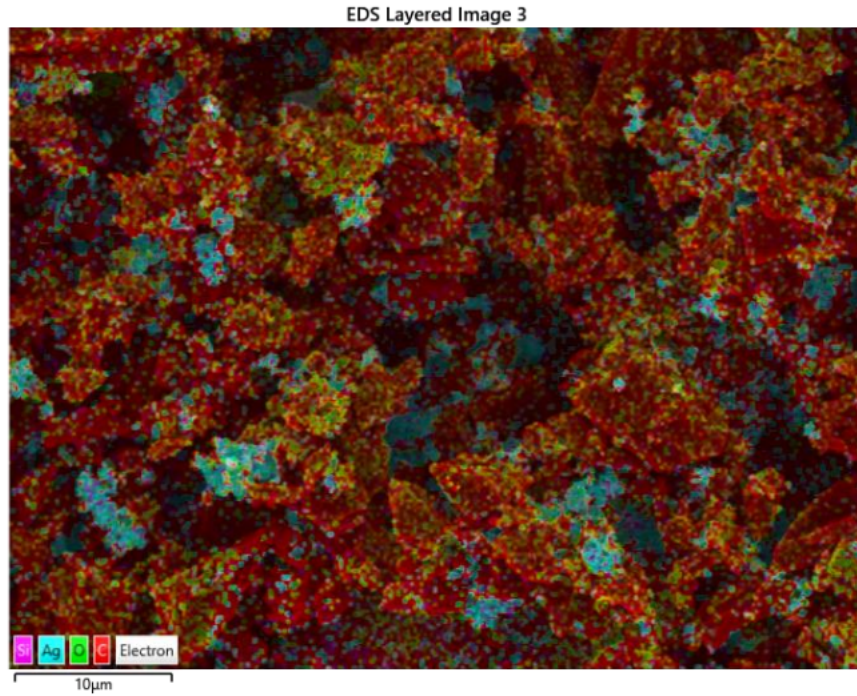
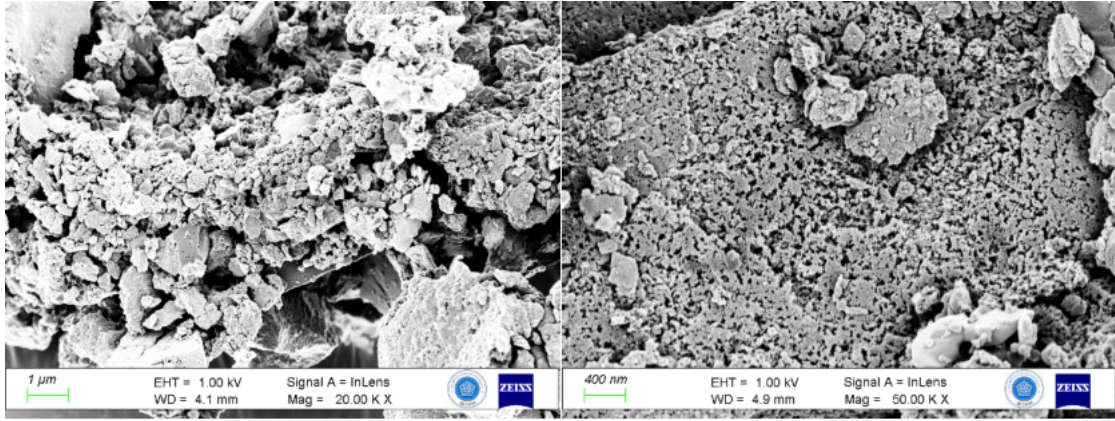
Şekil 3.11. Hazırlanan nanoyapıların XRD faz analizi.

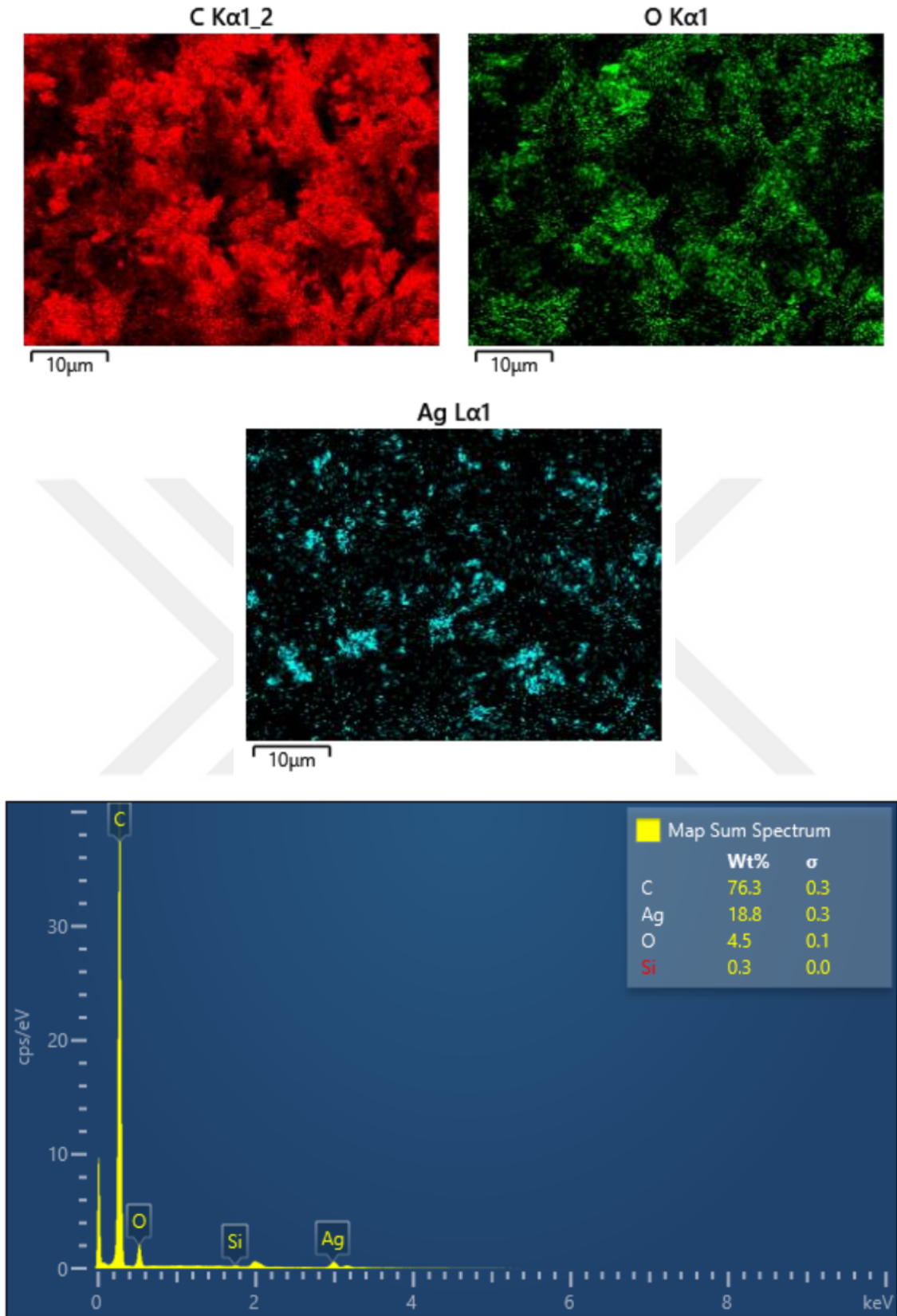
Karbon esaslı nanoyapıların yüzeylerinin modifiye edilmesinde kullanılan Ag miktarının belirlenmesi amacıyla TGA analizi kullanılmıştır. TGA analizinde numune oksijen zengin ortamda oda sıcaklığından 900 °C' ye kadar ısıtılmış ve yanma reaksiyonlarına bağlı olarak kütlede meydana gelen değişim incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğine (Şekil 3.12) 350 C' den sonra kütlede hızlı bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu kütle kaybı yapıda bulunan karbon esaslı fazın yanmasına bağlıdır. 550 C' den sonra ise kütle kaybı sabitlenmiştir. Geride kalan kütle yüzey modifikasyonu için kullanılan Ag miktarını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar karbon esaslı yapılarda ağırlıkça %26,6 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.12. TGA analizi sonuçları

Şekil 3.13’ de, hazırlanan malzemelerin yüzeylerinden elde edilen SEM görüntüleri ve EDS sonuçları verilmektedir. SEM resimlerinde görüldüğü gibi hazırlanan nanoyapılar gözenekli bir özellik göstermektedir. Bu yapı yüksek elektrokimyasal performans elde edilebilmesi için önemlidir. EDS sonuçları incelendiğinde ise yapıda C, Ag ve O atomlarının bulunduğunu göstermektedir. EDS haritalama yönteminde (Şekilde verildiği gibi) bu elementler yüzeye homojen bir şekilde dağılmış ve modifikasyonun tüm malzeme bünyesinde homojen bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

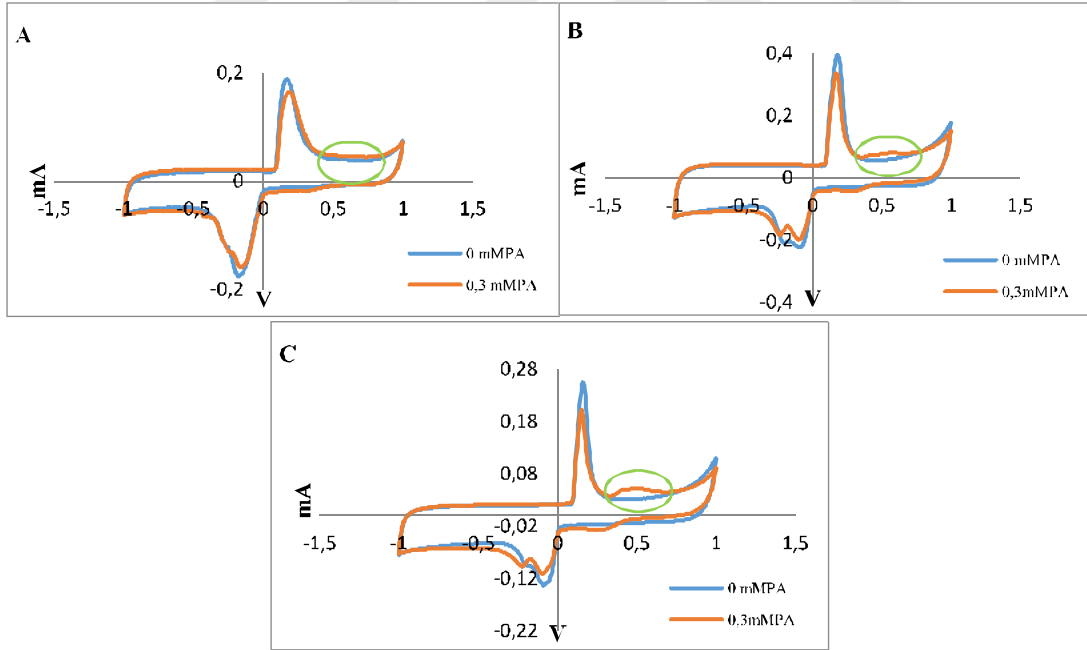




Şekil 3.13. Farklı SEM görüntüleri ve EDS grafiği

3.4.2. Modifikasyon Malzemesi Üzerine Çalışmalar

DV tekniği kullanılarak gerçekleştirilen analizler vasıtasıyla parasetamol analizi için kullanacağımız karbon siyahına ait çeşitli modifikasyonlar yapılmış ve gümüş parçacıklarla birleştirilmiş karbon siyahının (Ag-AC) daha yüksek akım değerlerine ulaşabileceği öngörülmüştür. Destek elektrolit ve 0,3 mM parasetamol derişimine sahip bir numune ölçüldüğünde, seçmiş olduğumuz modifikasyon yüzeyinin sinyal gücünü çok arttırmadığı görülmüştür ancak ardından gerçekleştirilen modifikasyon çalışmalarında farklı bekleme sürelerinde bilyeli öğütücü (ball-miling) cihazında bekletilen materyalin analiz sonuçlarına etkisi incelenmiş olup 0,5 V voltaj değerindeki cevaplar gösterilmiştir. (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Ag-AC için 2,5 dk, 5 dk, 10 dk olarak uygulanan bilyeli öğütücü süreleri sonrası DV cevabı

Öğütme süreleri arttıkça, parasetamole ait 0,5 V' a ait sinyalin arttığı gözlemlenmiş ve sonraki çalışmalara 5 ve 10 dakika öğütme süreleri ile devam etme kararı alınmıştır.

Bilyeli öğütme kullanılasının avantajları, partikül boyutunun küçültülmesi ile yüzey alanının artışı, daha kolay homojenizasyon ve malzemeye ait performansın iyileştirilmesidir. (El-Eskandarany, 2015). Ayrıca öğütme sırasında karbon eklenmesi, elektrot malzemesi parçacıkları arasındaki elektriksel iletkenliğin de artmasına sebep olarak parçacık aglomerasyonunu da azaltabilir (Taniguchi ve Bakenov). Her ne kadar bizim durumumuzda öğütme sürelerinin artışı performansın artmasına sebep olmuş olsa da seçilcek modifikasyon malzemesi ve analitin türüne göre bu durum değişiklik gösterebilmektedir. Çizelge 3.4'te her bir modifikasyona ait akım artışları tablolanmıştır.

Çizelge 3.4. Seçilen modifikasyon türüne göre akım farklarının ölçülmesi

Modifikasyon Cinsi	Akım Artış Miktarı
Ag-AC	4,6
Ag-AC 2,5 dk	7,4
Ag-AC 5 dk	20,6
Ag-AC 10 dk	19,34

Yukarıda da açıklandığı gibi, bilye öğütme süresi arttıkça spesifik yüzey alanı önemli ölçüde artar. Ancak, bilyalı öğütme süresinde daha fazla artış olması, spesifik yüzey alanının kademeli olarak azalmasına, yüzeyin kapanmasına ve dolayısıyla performans azalmasına sebebiyet verebilmektedir (Konarova and Taniguchi, 2009) 10 dakika öğütme süresinde akımın artık düşmeye başladığını gördüğümüz için öğütme süresine yönelik farklı dakikalarda daha fazla test yapılmamıştır. Elektrotun performansını arttırmak amacıyla, altın, platin nanopartiküller ve grafen kuantum noktaları tabaka-tabaka (layer by layer) olacak şekilde geliştirilmiş olan yüzeye modifiye edilmiştir ve Parasetamol standartları, 150 saniyelik birikme süresiyle 1 μ M konsantrasyonda ölçülerek Çizelge 3.5. teki sonuçlar alınmıştır.

Çizelge 3.5. Farklı yüzey modifikasyonlarına ait sonuçlar

Modifikasyon Cinsi	Akım (μA)	Potansiyel (V)
Ag-AC 5dk BM	6,65	0,52
Ag-AC 5dk BM-AuNP	6,1	0,52
Ag-AC 5dk BM-PtNP	5,14	0,52
DRP-GQD	5,446	0,52

Çizelgeden de görüldüğü üzere test edilmiş ek modifikasyonlardan yapılacak fazladan bir modifikasyonun analiz performansı üzerine bir etkisi olmadığı görülmüştür.

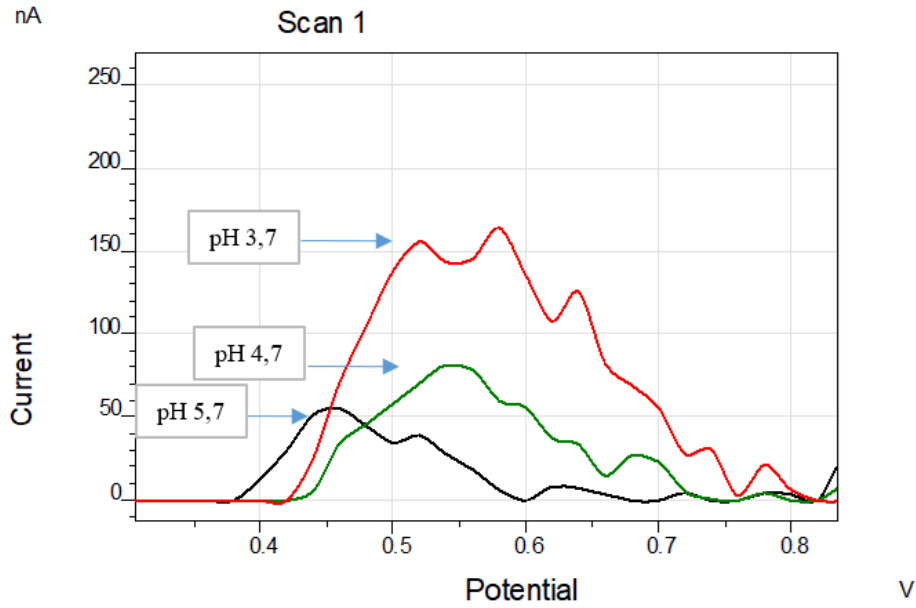
3.4.2.1. Modifiye elektrot ile pH Taraması

Bir çözeltinin pH değeri, parasetamolün redoks akımları ile redoks potansiyelini daha pozitif veya negatif yönler kaydırarak genellikle elektrokimyasal reaksiyonu etkiler. Bu nedenle, pik akımlarının düşük pik potansiyellerindeki yoğunluğunu en üst düzeye çıkarmak için optimum bir pH gerekir (Alam ve ark., 2018). Daha öncede belirtildiği gibi ası amaç etkin ve hassas bir analizin yapılacağı optimum pH değerinin bulunmasıdır. Bu sebeple DPV yöntemi kullanılarak farklı pH ortamlarında $1\mu\text{M}$ parasetamol numunesi ölçülmüştür. Geri kalan deneysel parametreler aşağıda belirtildiği gibidir.

E start: 0 V, E end: 1,8 V, Cycles: 1 cls, Pulse Time: 10ms, Pulse Amplitude: 100mV

E step: 20 mV, Scan rate: 40mVs⁻¹

$1\mu\text{M}$ Parasetamol 'un pH 3,7-5,7 asetat tamponu aralığında incelenen voltamogramları Şekil 3.15 te, sonuçlara ait veriler de çizelge 3.6 da verilmiştir.

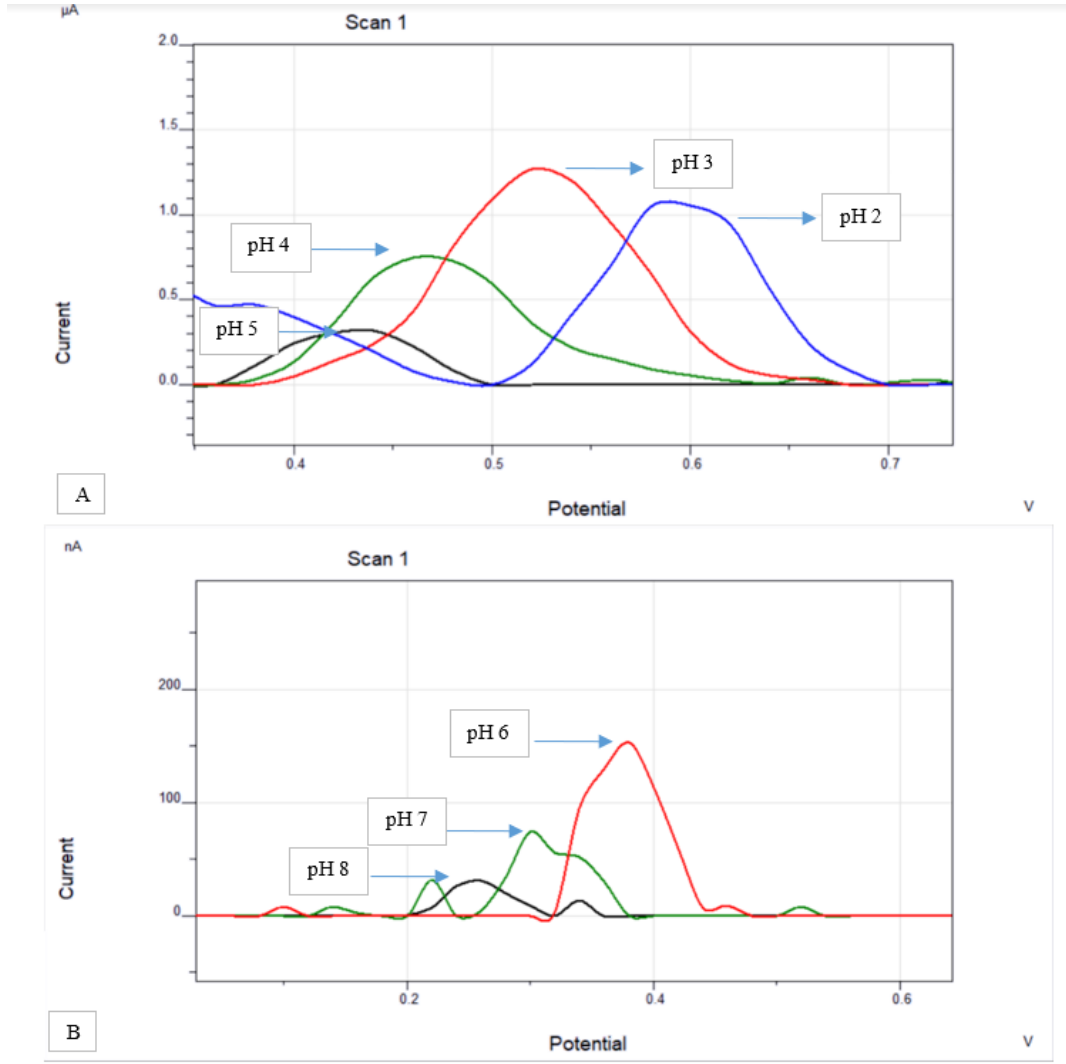


Şekil 3.15. 1 µM Parasetamol 'un asetat tamponu içerisinde incelenen voltamogramları.

Çizelge 3.6. Asetat tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 1 µM Parasetamol 'un farklı pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Akım değeri (µA)	Potansiyel (V)
3,7	0,131	0,54
4,7	0,072	0,54
5,7	0,035	0,48

1 µM Parasetamol 'un pH 1,5-8 BRT tamponu aralığında incelenen dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.16 ye, sonuçlara ait veriler de çizelge 3.7 ye verilmiştir.

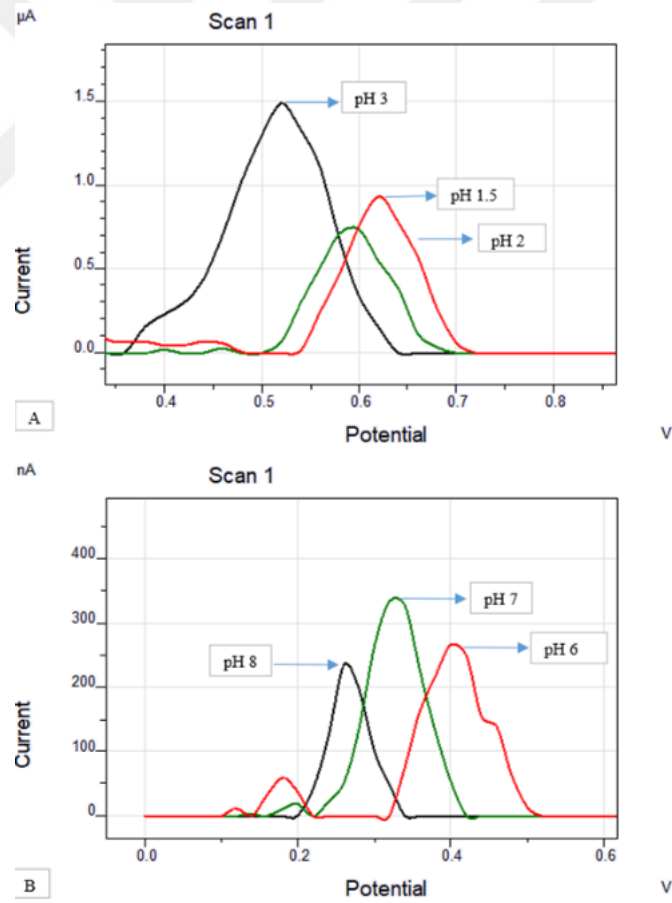


Şekil 3.16. 1 μM Parasetamol 'un BRT tamponu içerisinde incelenen voltamogramları. Mikro amper değerleri (A) nano amper değerleri (B)

Çizelge 3.7. BRT tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 1 μM Parasetamol 'un farklı pTİ değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Akım değeri (μA)	Potansiyel (V)
2	1,049	0,58
3	1,26	0,52
4	0,751	0,46
5	0,317	0,44
6	0,152	0,38
7	0,052	0,34
8	0,0244	0,26

1 μM Parasetamol'un pH 1,5-8 fosfat tamponu aralığında incelenen dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.17 de, sonuçlara ait veriler de çizelge 3.8 de verilmiştir.

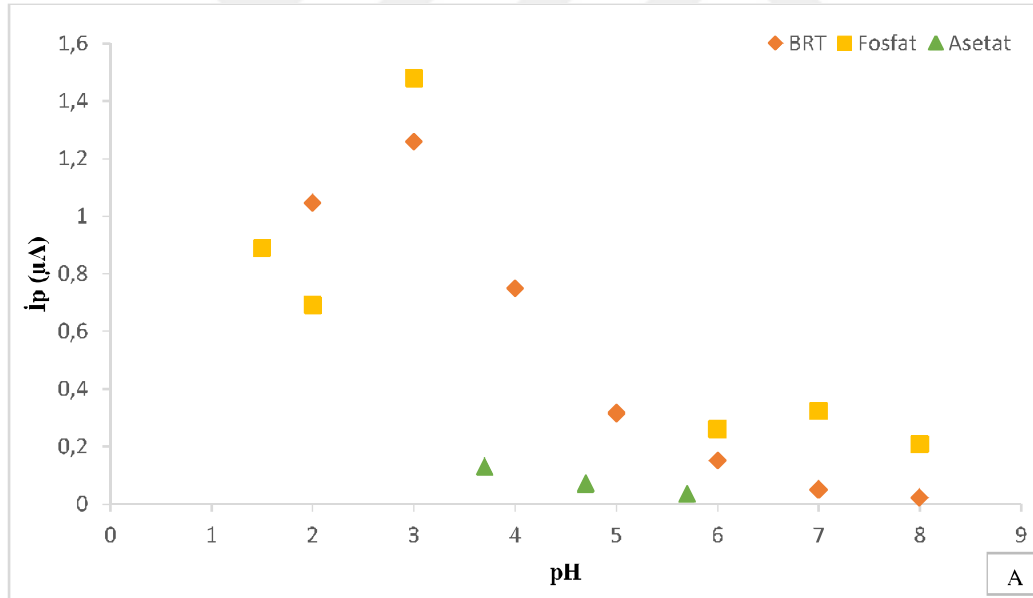


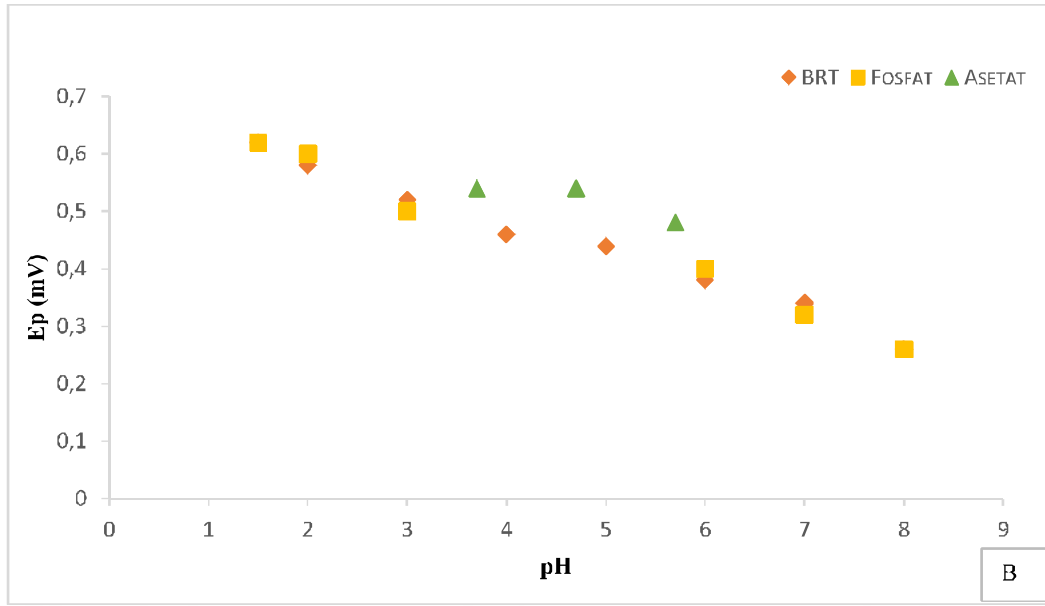
Şekil 3.17. 1 μM Parasetamol 'un fosfat tamponu içerisinde incelenen voltamogramları. Mikro amper değerleri (A) nano amper değerleri (B)

Çizelge 3.8. Fosfat tamponu içerisinde camı karbon elektrot ile 1 μM Parasetamol 'un farklı pHT değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	μA	Potansiyel
1,5	0,889	0,62
2	0,693	0,6
3	1,480	0,5
6	0,261	0,4
7	0,325	0,32
8	0,209	0,26

Fosfat tamponu için, pH daha asidik olduğunda, potansiyel değerlerin artışı gözükmemektedir





Şekil 3.18 1 μ M Parasetamol 'un DPV voltamogramlarına göre farklı pII değerleri için pik akımı (A) ve pik potansiyeli (B) üzerine etkisini gösteren eğriler. (Δ): Asetat tamponu, ($\square$): Fosfat tamponu, ($\diamond$): BRT tamponu.

Şekil 3.18 de gösterilen grafik sayesinde pH taraması sonuçlarına ait verilerin pik akımı ve pik potansiyeli olarak değişimleri gözlenmektedir. Bu veriler incelendiğinde pik akımı ve pik şekli açısından analitik çalışmalar için uygun olan ortamın pII 3 fosfat tampon ortamı olduğu görülmüş ve bu ortam çalışmalarımızda kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.4.2.2. Seçilen Modifikasyon ile Gerçekleştirilmiş Hız Taraması

pH taramaları neticesinde fosfat tamponunun pH 3 olduğu koşula karar verildikten sonra 1×10^{-5} M derişimde parasetamolün 5-1000 mV s^{-1} aralığında hız taraması yapılmıştır. Bu çalışmalarda potansiyel tarama hızı sistematik olarak değiştirilerek pik akımının tarama hızı ile değişimi incelenir. Bu incelemede aşağıda tanımlanan grafikler oluşturulur (Lavi ron ve ark., 1980)

- i. Tarama hızına karşı pik akımı ($i_p - v$)
- ii. Tarama hızının kareköküne karşı pik akımı ($i_p - \sqrt{v}$)
- iii. Tarama hızının logaritmasına karşı pik akımının logaritması ($\log i_p - \log v$)

1×10^{-5} M parasetamol 'un pH 3 fosfat tamponu ortamında yapılan hız taraması çalışmasında tarama hızı ile pik akımı arasında doğrusal bir ilişki olduğu,

$$i_p (\mu A) = 0,0405 v (mVs^{-1}) + 3,3887 (r: 0,9579; n: 10)$$

denklemleri ile verilmiştir.

Aynı ortamda tarama hızının kare kökü ile pik akımı arasında bir ilişki olduğu,

$$i_p (\mu A) = 1,3935 v^{1/2} (mVs^{-1}) - 3,9887 (r: 0,9917; n: 10)$$

denklemleri ile verilmiştir.

Parasetamol için pH 3 fosfat tamponu içerisinde $\log v - \log i_p$ eğrisinin eğim değeri 0,7324 olarak bulunmuştur; buradan elde edilen doğru,

$$\log i_p (\mu A) = 0,7324 \log v (mVs^{-1}) - 0,5514 (r: 0,9982; n: 10)$$

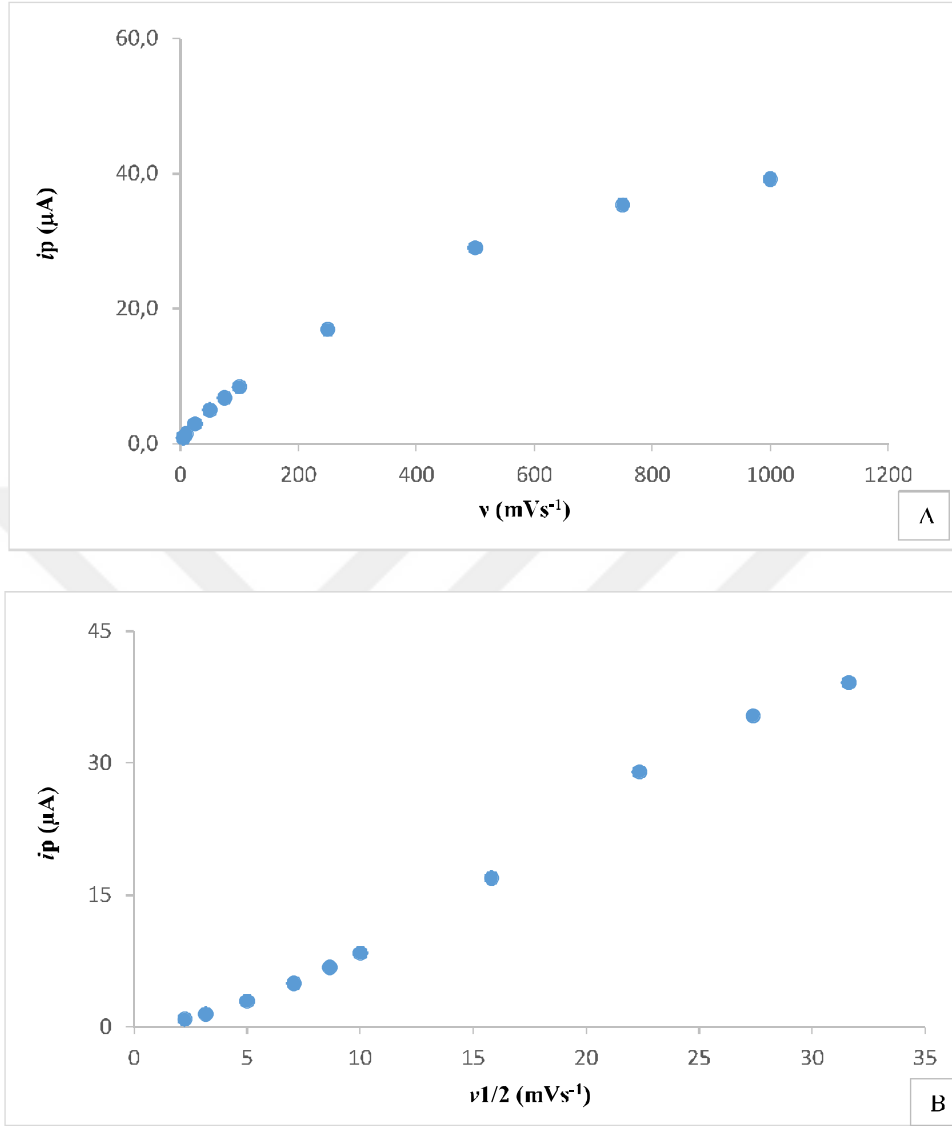
denklemleri ile verilmiştir.

Parasetamol için AgAC 5dk BM ile yapılan hız taraması sonuçlarına göre çizilen $E_p - \log v$ eğrisine ait eğim değeri 0,0263 olarak bulunmuştur, buradan elde edilen doğru denklemleri,

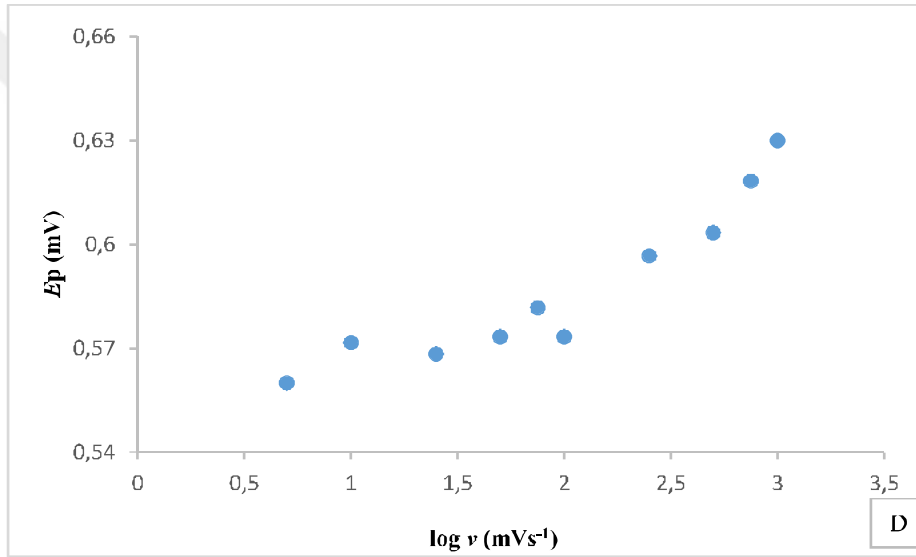
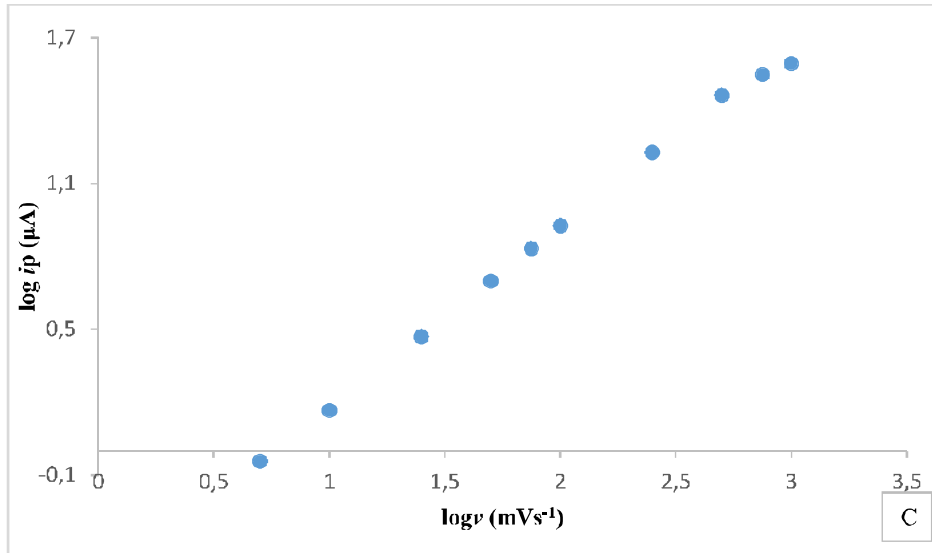
$$E_p (mV) = 0,0263 \log v (mV s^{-1}) + 0,5347 (r = 0,935 n = 7) \text{ şeklindedir.}$$

1×10^{-5} M parasetamol 'un pH 3 fosfat tamponu ortamında yapılan hız taraması çalışmasında elde edilen tarama hızının kare kökü- akım eğrisi, $\log v - \log i_p$ eğrisi,

tarama hızının logaritması ile pik potansiyeli eğrisi ve tarama hızı- pik akımı eğrisi sırasıyla Şekil 3.19 ve 3.20 da verilmiştir.



Şekil 3.19 1 μ M Parasetamol 'un pH 3 fosfat tamponu ortamında 5–1000 mV s^{-1} aralığında yapılan tarama hızı-pik akımı (A), hız taraması çalışmasının kare kökü ile pik akımı (B) arasındaki ilişkiyi gösteren eğriler.



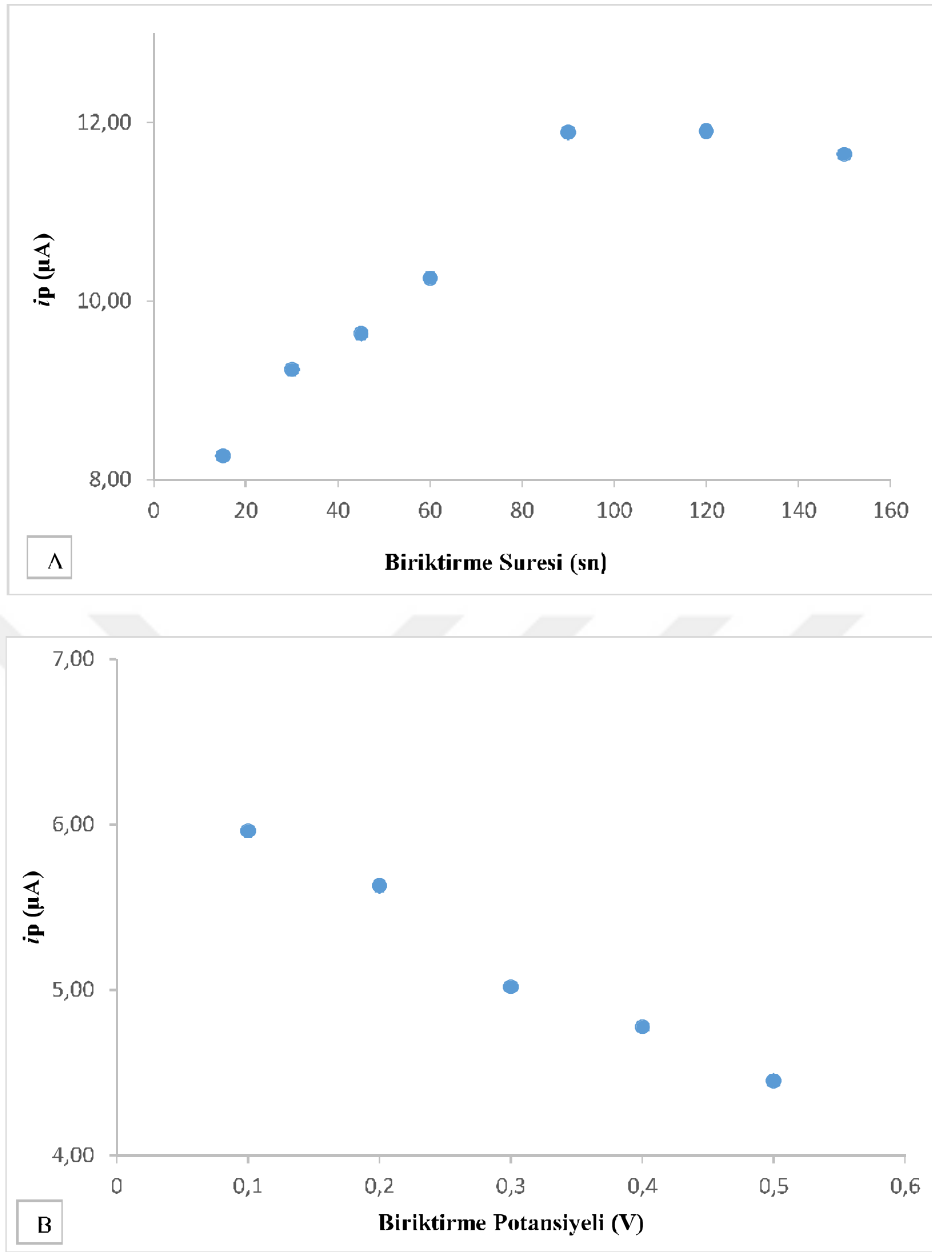
Şekil 3.20 1 μM Parasetamol 'un pH 3 fosfat tamponu ortamında 5–1000 mV s^{-1} aralığında yapılan tarama tarama hızının logaritması ile pik akımının logaritması (C) ve tarama hızının logaritması ile pik potansiyeli (D) arasındaki ilişkiyi gösteren eğriler.

Oluşturulan bu grafiklerden birincisinin ($i_p - v$) doğrusal bulunması ve üçüncünün ($\log i_p - \log v$) eğiminin 1,0 değerine yaklaşması incelenen elektron transferinin elektrot yüzeyinde gerçekleştiğini (adsorpsiyon kontrollü olduğunu) belirtirken; ikinci grafiğin ($i_p - \sqrt{v}$) doğrusal ve üçüncü grafiğin eğiminin 0,5 değerine yaklaşması ise incelenen elektron aktarımının elektrot – çözelti ara yüzeyinde gerçekleştiğini (difüzyon kontrollü olduğunu) göstermektedir (Laviron ve ark., 1980).

0,7324 olarak elde edilen eğimin bahsedilen teorik değerlerin arasında olması reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

3.4.2.3.Modifiye Elektrotta Biriktirme Potansiyeli ve Biriktirme Süresi

Uygun pH ve hız taraması sonuçları alındıktan sonra biriktirme süresi ve biriktirme potansiyeli optimizasyonu test yapılmıştır. Camı karbon elektrotla modifikasyon ile (AgAC5DKBM) DPV tekniği kullanılarak incelemeler gerçekleştirilmiştir. DPV tekniği için pH 3 fosfat tamponu içerisinde biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi çalışmaları $1 \times 10^{-5} \text{M}$ derişimde yapılmıştır (Şekil 3.21 B). Biriktirme potansiyeli çalışmalarında biriktirme süresi olarak 90 saniye kullanılmıştır. En yüksek akım değerinin elde edildiği potansiyel belirlendikten sonra 15–160 saniye aralığında biriktirme süresi optimizasyonu yapılmış ve en uygun değer 90 saniye olarak seçilmiştir (Şekil 3.22 A).



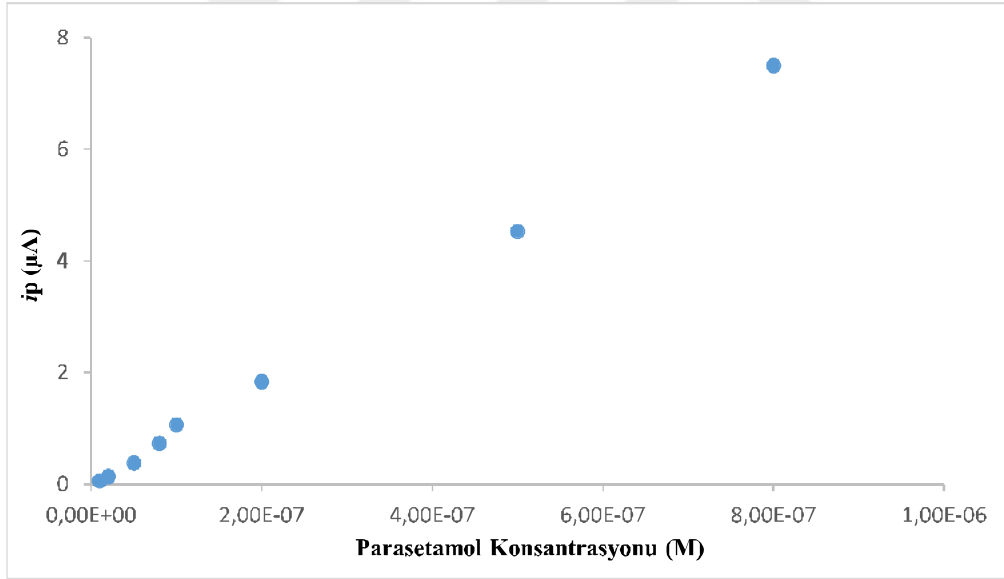
Şekil 3.21 1 μM Parasetamol 'un pH 3 fosfat tamponu ortamında DPV ile elde edilen biriktirme süresine karşı akım (A) ve biriktirme potansiyeline karşı akım (B) grafikleri.

3.4.3. Modifiye Elektrot ile Parasetamol Miktar Tayini Çalışmaları

3.4.3.1. Modifiye Elektrot ile Standart Çözelti ile Kalibrasyon Oluşturma

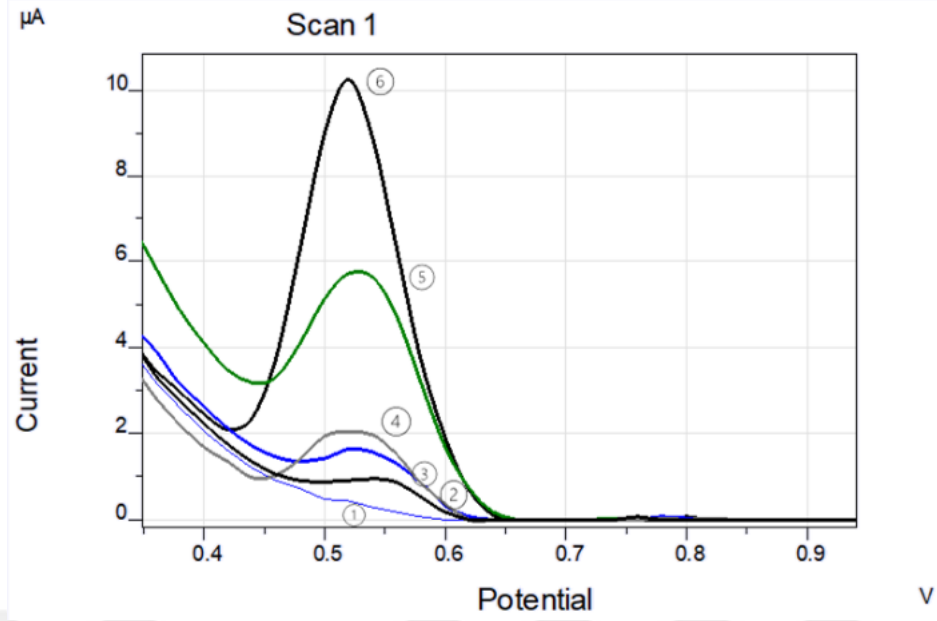
pH 3,0 fosfat tamponu ve modifiye edilmiş yüzeye sahip CKE kullanılarak oluşturulan parasetamole ait kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 3.22). Doğrusallık 1×10^{-8} - 8×10^{-7} M derişimleri arasında sağlanmış olup sabit bir potansiyelde, parasetamol derişimine karşı çizilen pik akımları sonucunda elde edilen voltamogramlar (Şekil 3.23) doğru denklemleri ve kalibrasyona ait veriler aşağıda verilmektedir.

$$i_p (\mu A) = 9,335 \times 10^6 C (M) + 0,0275; r = 0,9991 (n = 8)$$



Şekil 3.22 Parasetamol 'un 1×10^{-8} - 8×10^{-7} M derişim aralığında pH 3,0 fosfat tamponu içerisinde DPV ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

DPV ile kalibrasyon aralığı içerisindeki farklı derişimlerde elde edilen bazı seçilmiş voltamogramlar Şekil 3.23 'te verilmiştir.



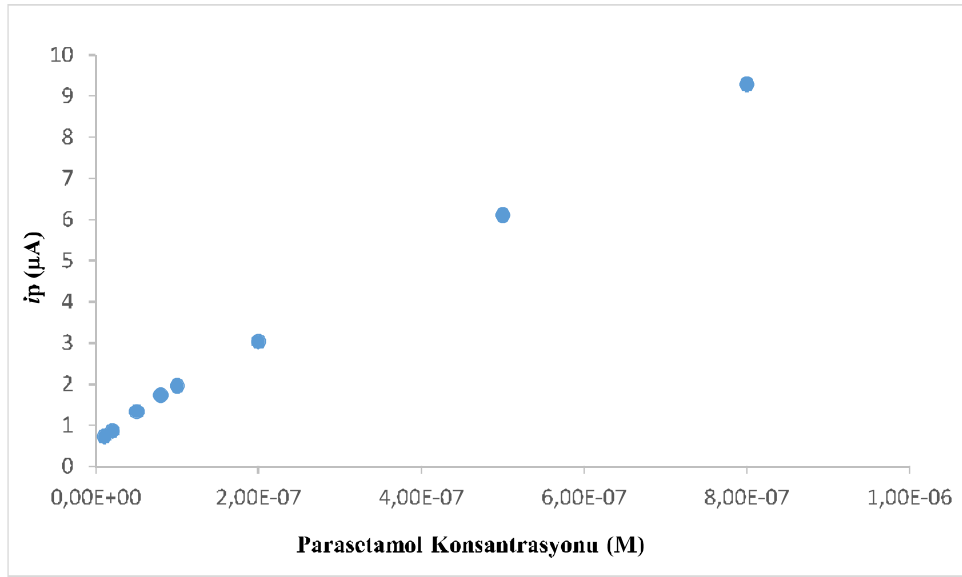
Şekil 3.23. Modifiye elektrot kullanılarak, pH 3,0 fosfat tamponu içerisinde parasetamol'un seçilmiş derişimlerdeki DPV ile elde edilen voltamogramları. 1) Destek elektrolit; 2) $5,0 \times 10^{-8}$ M; 3) $8,0 \times 10^{-8}$ M; 4) $1,0 \times 10^{-7}$ M; 5) $5,0 \times 10^{-7}$ M 6) $8,0 \times 10^{-7}$ M

DPV yöntemi ile gerçekleştiren modifiye CKE kullanılarak yapılan analizlere ait kalibrasyon eğrisine dair elde edilen veriler, bölüm 3.4.3.3'deki çizelge 3.9'de belirtilmiştir.

3.4.3.2. Modifiye Elektrotta Serum ile Kalibrasyon Oluşturma

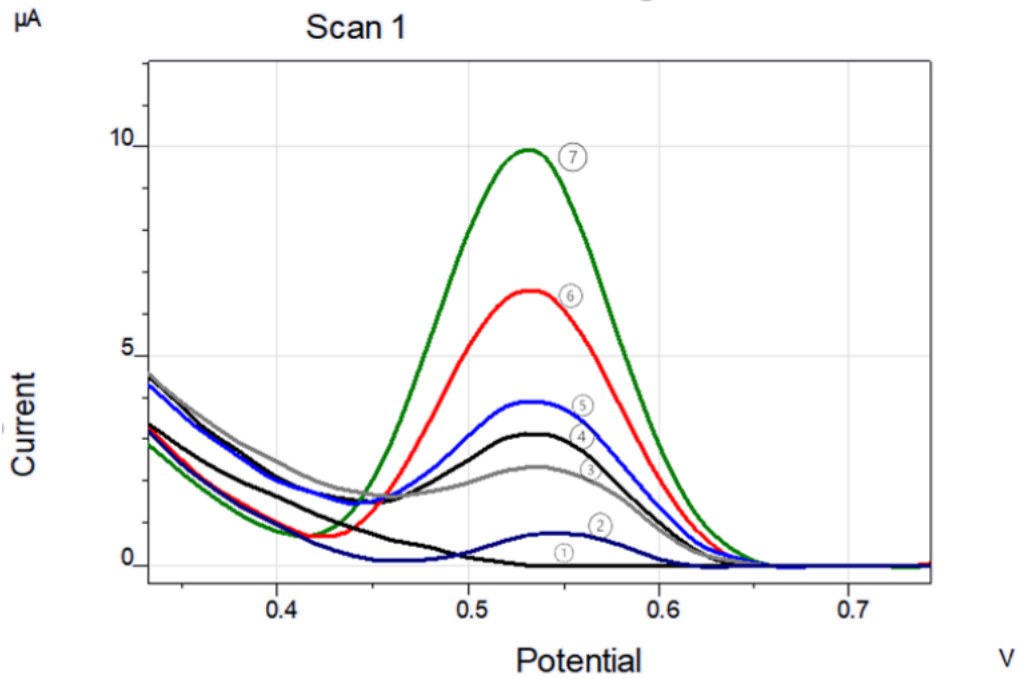
Gereç yöntem bölümünde hazırlığı anlatılan serum çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyona ait doğrusallık, 8×10^{-8} - 1×10^{-7} M derişim aralığında elde edilmiştir. DPV tekniği kullanılarak parasetamol derişimi-pik akımı arasında elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı değerleri aşağıdaki verilmektedir.

$$i_p (\mu A) = 1,068 \times 10^{-7} C (M) + 0,7815; r = 0,9988 (n = 8)$$



Şekil 3.24. Modifiye elektrot kullanılarak, Parasetamol 'un 1×10^{-8} - 8×10^{-7} M derişim aralığında pH 3 fosfat tamponu kullanılarak serum içerisinde oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi

Serum çözeltilerine ait kalibrasyon aralığının oluşturulduğu farklı derişimlerde elde edilen bazı seçilmiş voltamogramlar Şekil 3.25 'te verilmiştir.



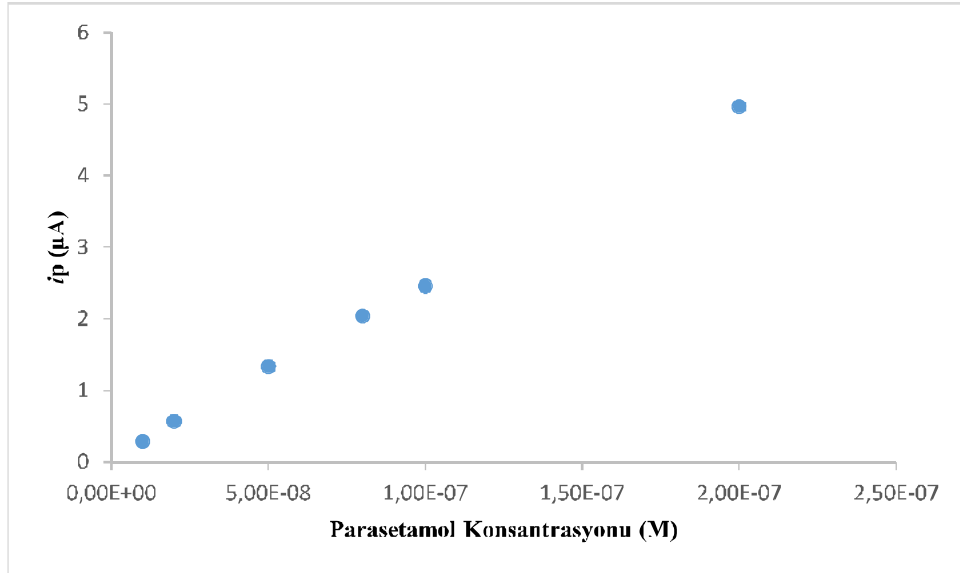
Şekil 3.25 Modifiye elektrot kullanılarak, pH 3 fosfat tamponu ve serum içerisinde parasetamol 'un bazı derişimlerindeki DPV ile elde edilen voltamogramları. 1) Destek; 2) $1,0 \times 10^{-8}$ M; 3) $5,0 \times 10^{-8}$ M; 4) $1,0 \times 10^{-7}$ M; 5) $2,0 \times 10^{-7}$ M 6) $5,0 \times 10^{-7}$ M 7) $8,0 \times 10^{-7}$ M

Serum içerisinde yardımcı maddelerin etken madde sinyaline etkisi olup olmadığına dair sonuçlar da % geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilerek bulunmuştur.

3.4.3.3. Modifiye Elektrotta İdrar ile Kalibrasyon Oluşturma

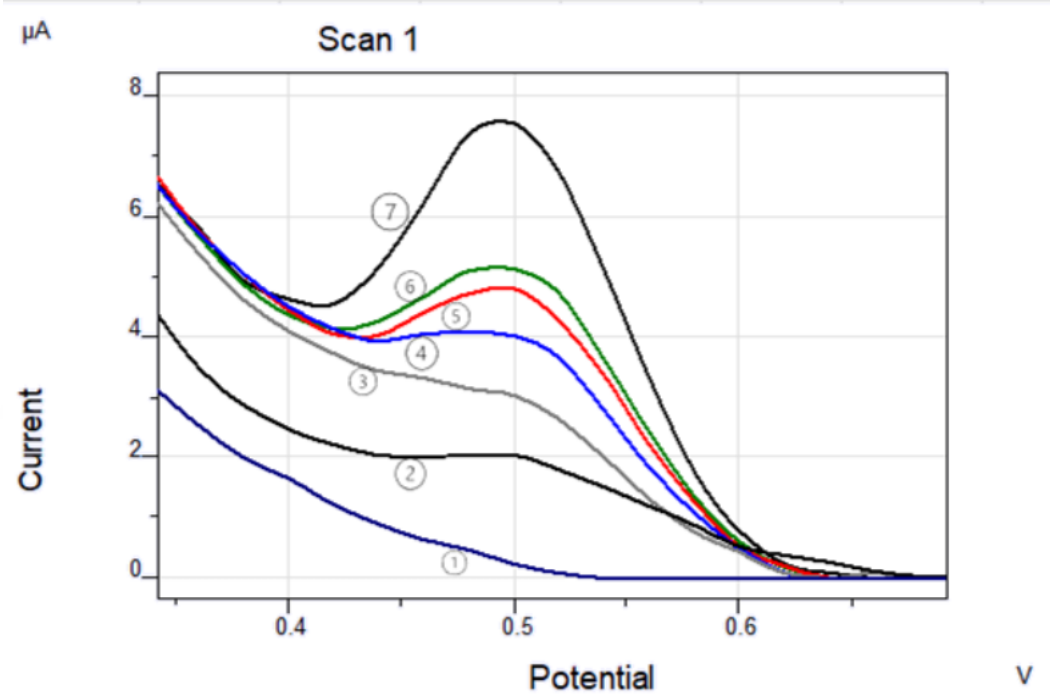
Serum ile benzer şekilde hazırlanan idrar çözeltileri ile pH 3 fosfat tamponu ortamında DPV yöntemi kullanılarak 1×10^{-8} - 2×10^{-7} M derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Parasetamol derişimi-pik akımı arasında elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayısı değerleri aşağıda verilmektedir.

$$i_p (\mu A) = 2,443 \times 10^7 C (M) + 0,0697; r = 0,9996 (n = 6)$$



Şekil 3.26 Modifiye elektrot kullanılarak, Parasetamol 'un 1×10^{-8} - 8×10^{-7} M derişim aralığında pH 3 fosfat tamponu kullanılarak idrar içerisinde oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi

İdrar çözeltilerine ait kalibrasyon aralığının oluşturulduğu farklı derişimlerde elde edilen bazı seçilmiş voltamogramlar Şekil 3.27’de verilmiştir.



Şekil 3.27 Modifiye elektrot kullanılarak, pH 3 fösfat tamponu ve idrar içerisinde parasetamol ’un bazı derişimlerdeki DPV ile elde edilen voltamogramları. 1) DesteK; 2) $1,0 \times 10^{-8}$ M; 3) $2,0 \times 10^{-8}$ M; 4) $5,0 \times 10^{-8}$ M; 5) $8,0 \times 10^{-8}$ M 6) $1,0 \times 10^{-7}$ M 7) $2,0 \times 10^{-7}$ M

İdrar içerisinde yardımcı maddelerin etken madde sinyaline etkisi olup olmadığına dair sonuçlar da % geri kazanım çalışmaları ile incelenmiştir.

Çizelge 3.9. Camı karbon elektrot ve modifiye edilmiş yüzey kullanılarak, serum ve idrar ile parasetamol ’un pH 3 fösfat tamponu içerisinde elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

Parametreler	CKE ile standart Parasetamol	Modifiye Elektrot ile standart Parasetamol	Serum	İdrar
Ölçüm potansiyeli (V)	0,540	0,520	0,520	0,500
Doğrusal aralığı (M)	$5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-8} - 8 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-8} - 8 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-7}$
Eğim ($\mu A/M$)	$4,826 \times 10^5$	$9,335 \times 10^6$	$1,068 \times 10^7$	$2,443 \times 10^7$

Kesişim (μA)	0,444	-0,028	0,7815	0,0696
Korrelasyon katsayısı (r)	0,990	0,999	0,998	0,999
Teşhis sınırı (M)	5.569×10^{-8}	$1,249 \times 10^{-9}$	$3,370 \times 10^{-9}$	$3,26 \times 10^{-9}$
Tayin alt sınırı (M)	1.69×10^{-7}	$3,787 \times 10^{-9}$	$1,00 \times 10^{-8}$	$9,88 \times 10^{-9}$
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS) *	1,294	1,027	2,903	1,832
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS) *	0,261	0,110	1,904	1,980
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) *	1,341	1,633	3,644	2,634
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS) *	0,407	1,904	1,970	2,064

* Akım ve potansiyel için tekrarlanabilirlik çalışmaları 1×10^{-6} M konsantrasyonundan elde edilmiştir (n:5).

3.4.3.4. Modifiye Elektrot ile Gerçekleştirilen Geri Kazanım Çalışmaları

DPV tekniğini kullanarak önceki bölümlerde belirtildiği gibi iki tür farmasötik dozaj şekli üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Tablet içerisinde yardımcı maddelerin etken madde sinyaline etkisi olup olmadığına dair sonuçlar da % geri kazanım çalışmaları ile gösterilmektedir. Parasetamol içeren Boots® ve Minoset Plus® tablet ile birlikte serum ve idrar pH 3 fosfat tamponu içerisinde elde edilen gerçek numunelere uygulama ve geri kazanım analiz sonuçları çizelge 3.10'da verilmiştir.

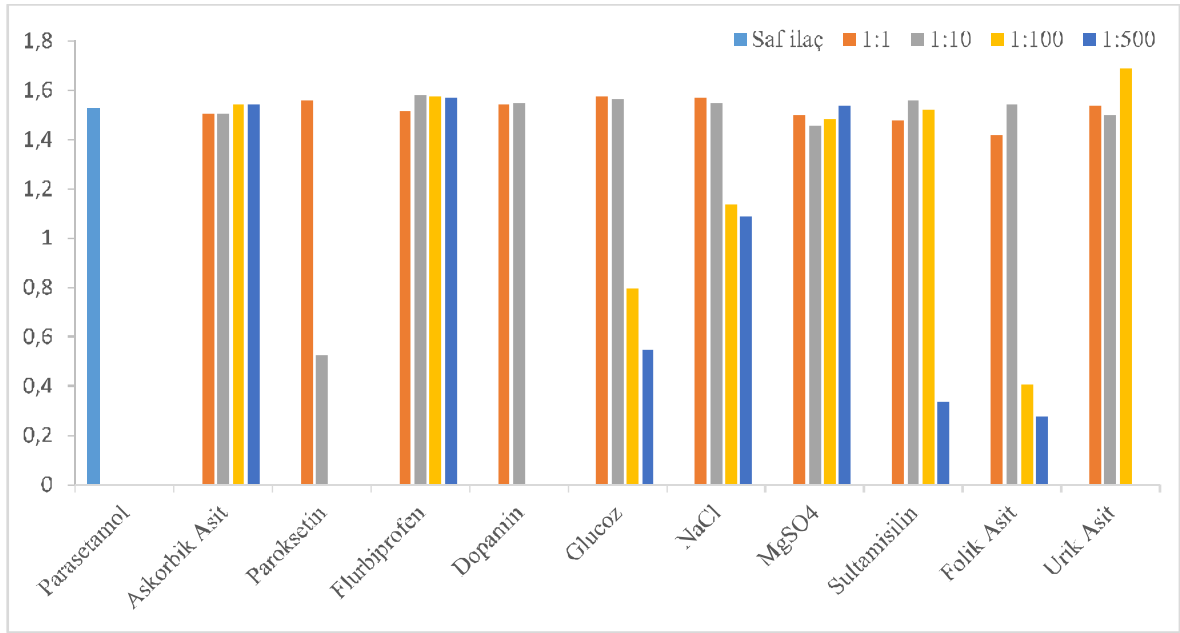
Çizelge 3.10. Farmasötik dozaj şekli ve biyolojik numunelere ait gerçek numune ve geri kazanım sonuçları

	Boots	Minoset Plus	Serum	İdrar
Etiket Miktarı (mg)	500	250	-	-
Bulunan Miktar (mg)	507,5	257,5	-	-
%BSS*	4,42	2,97	-	-
%Bağlı Hata*	-1,50	-3,0	-	-
İlave edilen madde miktarı (mg)	50	50	50	50
Bulunan madde miktarı (mg)	50,93	50,10	50,80	50,66
% Ortalama geri kazanım*	101,877	100,199	101,618	101,328
% BSS*	0,295	4,347	4,175	3,784
% Bağlı Hata*	-1,88	-0,199	-1,62	-1,33

* (n:5)

3.4.3.5. Modifiye Elektrotta Gerçekleştirilen Girişim Çalışmaları

Geliştirilen yöntem için gerçekleştirilen girişim çalışmalarına ait sonuçlar 3.29 de ifade edilmektedir. Sunulmuş olan çubuk grafikte, saf parasetamol ile ortama eklenen diğer olası girişim ajanları eş zamanlı olarak analiz edilmiş ve analize olan etkileri farklı oranlardaki katılımları da gösterilerek sunulmuştur.



Şekil 3.28. Modifiye elektrota ait girişim çalışmaları sonuçları

Şekil 3.28’de, 1×10^{-7} M derişimde hazırlanan parasetamol örneğine göre olası girişim yapabilecek ajanların etkisi açıkça görülmektedir. Ayrıca eklenen her bir farklı girişim ajanı için farklı kombinasyonların etkileri de sunulmaktadır.

4. TARTIŞMA

Bu tez ile öngörülen çalışma kapsamında dünya çapında çok yaygın olarak kullanılan, kolay ulaşım sağlanan ve dolayısıyla intihar teşebbüsü vakalarında da başrol oyuncularından birisi olan parasetamol için hassas, duyarlı, hızlı ve tamamen validasyonu yapılmış elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Analizlerde kullanılan camı karbon elektrot özgün nano malzemelerle modifiye edilerek daha hassas ve düşük tayin sınırına sahip analizlerin yapılması sağlanmıştır. Elektrokimyasal yöntemlerden amperometri, dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls ve kare dalga voltametresi gibi yöntemler kullanarak, uygun destek elektroliti ve pH belirlenerek, seçilen ortamda miktar tayini yapılması, teşhis ve tayin limitleri, tekrar edilebilirlik ve tüm gerekli validasyon parametrelerinin incelenmesi de gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında camı karbon elektrot yüzeyine gümüş modifiye edilmiş aktif karbonun 5 dakika boyunca ball-milling cihazında öğütülmesiyle geliştirilmiş olan bir yüzey modifikasyonu kullanılmış ve bu modifikasyon yükseltgenme davranışları incelenerek maddenin elektrokimyasal davranışları aydınlatılmıştır.

Çalışmalarda öncelikle etken maddeye ait davranışlar modifiye edilmemiş CKE elektrotta gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, asetat, fosfat, Britton-Robinson tamponları gibi tampon sistemleri kullanılarak farklı elektrokimyasal ölçüm teknikleri ile parasetamole ait yükseltgenme davranışları incelenmiştir. pII taramaları sonucunda analite ait voltamogramlar ve grafiklerin de incelenmesi sonucunda, sinyalin şekli ve sinyale ait akım açısından bir değerlendirme yapıldığında, analizlerin devamı için en uygun destek elektrolitin fosfat tamponu olduğu ve en uygun pII değerinin de 3,0 olduğu görülmektedir. Optimum koşul olarak belirlenen bu destek elektrolit ortamında mekanizmayı aydınlatmak adına hız taramaları gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında CKE ile yapılan bu tarama sonucunda potansiyel kaymasının pozitif yönde 70 mV olduğu görülmüş olup, log v-log *i*_p eğrisinden elde edilen eğim 0,715 olarak hesaplanmıştır ve bu sonuçlar ışığında taşınma mekanizmasının difüzyonun da etkili olabileceği adsorpsiyon kontrollü olduğu görülmüştür. DPV tekniği için optimum koşullarda biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi çalışmaları $10 \times 10^{-6} \text{M}$ derişimde yapılmıştır ve optimum koşullar 0,1 V 150 saniye olarak tespit edilmiştir. Modifiye edilmemiş CKE ile

gerçekleştirilen analiz çalışmalarında Parasetamol kalibrasyon eğrisi 5×10^{-7} M- 2×10^{-5} M arasında doğrusal bulunmuştur.

Tez çalışmalarının ikinci kısmında yüzeyi modifiye edilen elektrot performansı incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle yüzey modifikasyon malzemesine ait karakterizasyon ve performans çalışmaları yapılmıştır. DV tekniği kullanılarak farklı modifikasyon materyalleri ve bilyeli öğütme dakikaları ile sentezlenmiş, aktif karbon için en yüksek ve kararlı akım değerleri 5 dakika süren bilyeli öğütme ile öğütülmüş gümüş katkılı aktif karbonda elde edilmiştir.

Bu modifikasyon üzerine sinyali arttırmak adına katman üzerine katman eklemeye yöntemiyle farklı nano malzemeler denenmiş olup altın nanopartikül, platin nanopartikül ve en son grafen kuantum noktaları eklemesi ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Ancak bu katman eklemeleri sonucunda kayda değer bir gelişme sağlanamamıştır. Bu nedenle, elektrot yüzeyi modifikasyonu için AgAC 5dK BM modifikasyonu metodolojimiz için en etkili ve hassas olarak seçilmiştir. Seçilen modifiye yüzeyin kararlılık ve raf ömrü çalışmaları neticesinde 1 ay kararlı olduğu saptanmıştır. Gümüş, modifikasyonlar gerçekleştirilirken yaygın olarak kullanılan çok tercih edilen malzemelerden biridir. Ancak metallerin istenmeyen oksidasyonu sadece iletkenliği azaltmamakta kalmaz, aynı zamanda yüzeyin performansını da etkilemektedir. (Venkata Krishna Rao ve ark., 2015). Dolayısıyla yüzeyi modifiye edilen elektrot buzdolabında karanlık bir kapta tutulmalıdır. Aksi takdirde 1 ay sonunda yüzey modifiye edici ajanların elektrokimyasal aktivitesi parasetamol pikinin akım değerinin ölçülmesini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür.

Yüzeyi modifiye edilmiş elektrot ile gerçekleştirilen pH taramalarında çok asidik veya çok bazik olmayan ve elektrodun yüzeyine hasar vermeyecek tampon sistemlerinden olan asetat, BRT ve fosfat tamponları kullanılmıştır. DPV tekniği kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiş olup. Parasetamolün akım değerinin en uygun olduğu tampon çözelti sistemi pII 3'teki fosfat tamponu olduğu tespit edilmiştir. Hız taraması için parasetamolün akım değerine etkisini araştırdık ve bulunan değere göre modifikasyonumuzun kontrol difüzyonu mu yoksa adsorpsiyon mu olduğu belirlendi. Bu amaçla, parasetamol ölçümleri CV tekniği kullanılarak 1×10^{-6} M konsantrasyonda içerisinde $5 - 1000$ mV s^{-1} aralığında incelenmiştir. pH, 3,0 fosfat tampon ortamında yapılan hız taraması çalışmaları incelendiğinde $\log i_p - \log \nu$ eğrisinin eğimi olan 0,7324 değeri maddenin elektrot

yüzeyine taşınmasının çoğunlukla adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermiştir. Biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi belirlemek için, 1×10^{-6} M'lik bir parasetamol çözeltisi DPV tekniği ile ölçülmüş, biriktirme süresi için 15s -150s arasında değişen süreler uygulanmıştır. Sabit biriktirme potansiyelinde en yüksek akım 90 saniye biriktirme süresinde görülmüştür.

Modifiye elektrot ile gerçekleşen analizlerde kalibrasyon eğrisi oluşturmak için farklı derişimlerde çözeltiler hazırlanmış ve DPV tekniği ile ölçümler gerçekleştirilmiştir (1×10^{-9} M- 5×10^{-5} M). Özellikle daha düşük konsantrasyonlarda karşılaşılan tekrarlanabilirlik sorunları yüzünden doğrusallık ve çalışma aralığı 1×10^{-8} M- 8×10^{-7} M aralığındadır, R^2 : 0.999, LOD: $1,24 \times 10^{-9}$ M ve LOQ: $3,78 \times 10^{-9}$ M olarak hesaplanmıştır.

Biyolojik numuneler ile çalışırken, serum ile gerçekleştirilen kalibrasyon denemelerinde en uygun aralık 1×10^{-8} M ile 8×10^{-7} M arasındadır ve R^2 değeri 0.998'dir. Geri kazanım sonuçlarının %99,3 ila %101,7 aralığında olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde idrar için gerçekleştirilen çalışmalarda da tüm numuneler aynı gün ve taze olarak hazırlandı kuvvetli yaz sıcaklığı nedeniyle tüm deneyler, sonuçlarda değişiklik olmaması için klimalı bir odada gerçekleştirildi. İdrar kalibrasyon eğrisi 1×10^{-8} M ile 2×10^{-7} M arasında doğrusallığa sahip olmakla birlikte R^2 değeri 0.999 bulunmuştur. Geri kazanım sonuçları %100,09 ila %100,06 aralığında olduğu belirlenmiştir.

Parasetamol ilacının uygun bir kalibrasyonu elde edildikten sonra, 500 mg parasetamol içeren Boots® tablet dozaj şekli ve 250 mg parasetamol içeren Minoset Plus® tablet dozaj şekli analiz edilmiş ve geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu gerçek numune çalışmalarının ana amacı, farmasötik dozaj şekillerinin elektrodun analiz kalitesini ve modifikasyonumuzu etkileyip etkilemediğini göstermektir. Gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde parasetamolün tabletlerden analiz için uygun olduğu ve geri kazanım sonuçlarının %101 ila %102 olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen tekniklerin validasyon çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde, bu tekniklerin doğru, tekrarlanabilir, sağlam ve uygulanabilir olduğu sonucuna varılmaktadır.

Son olarak interferans analizleri gerçekleştirilmiş ve olası girişim yapabilecek analitlerin ya da endojen maddelerin her birinin etkisi analiz edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda

geliştirilen yüzeyin olası girişimlerin yanında parasetamolün analizini seçici ve duyarlı olarak gerçekleştirbildiğimiz gösterilmiştir. Birçok analitte 1:1 ve 1:10 kombinasyonlarının parasetamolün sinyali üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı ve elektrotun işlevselliğinin etkilenmediği görülmüş olup. Ayrıca Askorbik Asit, Flurbiprofen ve Magnezyum Sülfata ait her orandaki etkileşimin parasetamol piki için herhangi bir etki göstermediğini söylemek mümkün olmaktadır. Ancak, analizlerimizi en çok etkileyen ve girişim yapabilecek analitler incelendiğinde, paroksetin ve 1:100 ve 1:500 kombinasyonlarında bulunan dopamin ile 1:100 oranlarında eklenen ürik asit analizlerimizi etkileme potansiyeline sahiptir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan yüksek lisans tezi kapsamında, parasetamolün hızlı, kararlı, doğru ve tekrar edilebilir analizi için yüzeyi modifiye edilmiş camı karbon elektrot ile analizi üzerine bir yöntem önerilmiştir. Parasetamolün elektrokimyasal davranışı, destek elektrolit cinsi ve pII 'si ile birlikte tarama hızlarının etkileri açısından da incelenmiştir. Hem modifiye edilmemiş CKE ile hem de yüzeyi modifiye edilmiş CKE ile yapılan analizler sonrasında en uygun destek elektrolitin fosfat tamponu olduğu ve en uygun pH değerinin de 3,0 olduğu görülmektedir.

Ayrıca gerçekleştirilen hız taramaları sonucunda elde edilen grafikler ve doğru denklemleri incelendiğinde log v-log ip eğrilerinin sonuçlarına göre eğimleri hesaplanmış ve bulunan 0,7324 değeri sonrasında elektrot yüzeyine taşınma mekanizmasının adsorpsiyon kontrollü olduğu önerilmiştir.

Parasetamol için seçilen ortam ve optimum koşullarda kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve gerekli validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen regresyon analizi sonrasında AgAC5DKBM ile pH 3,0 asetat tamponu içinde DPV yöntemi kullanıldığında hesaplanan teşhis sınırı değerleri $1,249 \times 10^{-9}$ M olarak tespit edilmiştir. Bu değer literatür ile karşılaştırıldığında birçok yöntemden üstün olarak görülmüştür. Yöntemde kullanılan modifikasyon malzemesinin hazırlığının da kompleks olmayıp birçok yöneme göre uygun maliyetli olduğu belirtilmelidir.

Geliştirilen elektroanalitik yöntem serum, idrar ve farmasötik dozaj, şekline de uygulanmış ve % geri kazanım çalışmalarıyla yardımcı maddeler ve endojen bileşikler yanında Parasetamol 'un analizinin seçici bir şekilde yapılabilirdiği gösterilmiştir. Ayrıca interferans çalışmaları sonucunda da birçok girişim yapabilecek madde yanında geliştirilen yöntem ile analizin mümkün olduğu da görülmektedir.

ÖZET

Parasetamol analizi için elektrokimyasal sensör geliştirilmesi

Parasetamol, birçok insanın kolay erişebileceği ve yaygın olarak kullanılan bir analjeziktir. Aşırı dozda alınması sonucunda, NAC (N-asetilsistein) ve acil bir destekleyici bakım ile tedavi edilmediğinde ölümcül olma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte uygulanan erken tedavi ile önemli ölçüde iyileşme kaydedilir.

Elektrokimyasal sensörler, adli uygulamalar ve klinik yaklaşım için çekici bir seçenektir, çünkü çok yönlülük, taşınabilirlik, seçicilik, hassasiyet ve çok az ön işleme veya hiç işleme tabi tutulmamış numuneleri analiz etme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, basit ve ekonomik sensörler, sofistike ve pahalı cihazları kullanmak, yerine modern bilimde hızlı tanı için çok önemli bir yaklaşımdır.

Bu çalışma kapsamında, sentetik biyolojik numunelerden parasetamol analizi için hassas, seçici, hızlı ve tamamen analitik yöntem geçerlilik testleri yapılmış elektrokimyasal sensörler ile ilgili yeni bir metodoloji geliştirmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca geliştirilen yöntemin sonuçları farklı analitik tekniklerle kıyaslanacaktır.

Anahtar Sözcükler: Biyolojik numune, Elektrokimya, Parasetamol, Sensör, Validasyon.

SUMMARY

Development of electrochemical sensor for the determination of Paracetamol

Paracetamol is easily accessible by many people and is commonly used as an analgesic. In overdose, it has the potential to prove lethal if not treated with NAC (N-acetylcysteine) and supportive care quickly. With treatment, outcomes improve significantly, and fatalities are rare.

Electrochemical sensors are an attractive option to forensic applications and health care systems because they provide versatility, portability, selectivity, sensitivity, and the ability to analyze samples with little to no pre-treatment. Therefore, substituting multi-functional sophisticated and expensive instrumentation with simple and economical sensors is a very important trend in modern science.

In this study, it is aimed to develop a new methodology for electrochemical sensors. These sensors have been tested for sensitive, selective, rapid, and fully analytical method validation tests for paracetamol analysis using synthetic and biological samples. In addition, the results of the developed method will be compared with different analytical techniques.

Key words: Biological samples, Electrochemistry, Paracetamol, Sensors, Validation.

KAYNAKLAR

- ABDEL-SABOUR, IIR and M (2017) Analytical & Pharmaccutical Electrochemistry: the Electrochemical. **9**: 351–364.
- ABOUL-ENEIN, HY (2012) Sibel A. Ozkan: Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation. *Chromatographia*,.. doi:10.1007/s10337-012-2268-7.
- AFRASIABI, M, KIANIPOUR, S, BABAEI, A, NASIMI, AA, SIABANIAN, M (2016) A new sensor based on glassy carbon electrode modified with nanocomposite for simultaneous determination of acetaminophen, ascorbic acid and uric acid. *J. Saudi Chem. Soc.*, **20**: S480–S487.
- ALAM, AU, QIN, Y, HOWLADER, MMR, HU, NX, DEEN, MJ (2018) Electrochemical sensing of acetaminophen using multi-walled carbon nanotube and B-cyclodextrin. *Sensors Actuators, B Chem.*, **254**: 896–909.
- ALTUN, ML (2002) HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone. *Turkish J. Chem.*, **26**: 521–528.
- ASADPOUR-ZEYNALI, K, AMINI, R (2017) Nanostructured Hexacyanoferrate Intercalated Ni/Al Layered Double Hydroxide Modified Electrode as a Sensitive Electrochemical Sensor for Paracetamol Determination. *Electroanalysis*, **29**: 635–642.
- BABAEI, A, BABAZADEH, M, AFRASIABI, M (2011) A sensitive simultancous determination of adrenalin and paracetamol on a glassy carbon electrode coated with a film of chitosan/room temperature ionic liquid/single-walled carbon nanotubes nanocomposite. *Chinese J. Chem.*, **29**: 2157–2164.
- BACCARIN, M, SANTOS, FA, VICENTINI, FC, ZUCOLOTTO, V, JANEGITZ, BC, FATIBELLO-FILHO, O (2017) Electrochemical sensor based on reduced graphene oxide/carbon black/chitosan composite for the simultaneous determination of dopamine and paracetamol concentrations in urine samples. *J. Electroanal. Chem.*, **799**: 436–443.
- BARANOWSKA, I, MARKOWSKI, P, BARANOWSKI, J (2006) Simultaneous detcrmination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *Anal. Chim. Acta*, **570**: 46–58.
- BARANOWSKA, I, WILCZEK, A (2009) Simultaneous RP-HPLC determination of sotalol, metoprolol, α -hydroxymetoprolol, paracetamol and its glucuronide and sulfate metabolites in human urine. *Anal. Sci.*, **25**: 769–772.

- BARD, AJ, FULKNER, L (2001) *Electrochemical Methods, Fundamental Applications*.
- BATISTADEROCO, P, VICENTINI, FC, FATIBELLO-FILHO, O (2015) An Electrochemical Sensor for the Simultaneous Determination of Paracetamol and Codeine Using a Glassy Carbon Electrode Modified with Nickel Oxide Nanoparticles and Carbon Black. *Electroanalysis*, **27**: 2214–2220.
- BEHPOUR, M, GHOREISHI, SM, MESHKI, M, NAEMI, H (2014) Electrochemical determination of acetaminophen in the presence of propranolol using an electrode modified with a Schiff base from 2-hydroxy-1-naphthaldehyde and ethylenediamine and multi-walled carbon nanotubes. *J. Anal. Chem.*, **69**: 982–989.
- BELAL, T, AWAD, T, CLARK, CR (2009) Determination of paracetamol and tramadol hydrochloride in pharmaceutical mixture using HPLC and GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.*, **47**: 849–854.
- BLAKELY, P, MCDONALD, BR (1995) Acute renal failure due to acetaminophen ingestion: A case report and review of the literature. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **6**: 48–53.
- C., CV and B (2014) Electrochemical Studies of Paracetamol at Poly (Aniline Blue) Modified Carbon Paste Electrode: A Voltammetric Study. **6**: 573–582.
- CASTRO, M (2016) Intoxicación por acetaminofén en adultos. *Med. Leg. Costa Rica*, **33**: 103–109.
- CHAMBERS, S, ROAD, SPM (2010) G. amphray laboratories. 9–10.
- CHAVES, SC, AGUIAR, PNC, TORRES, LMFC, GIL, ES, LUZ, RCS, DAMOS, FS, MUNOZ, RAA, RICHTER, EM, DOSSANTOS, WTP (2015) Simultaneous Determination of Caffeine, Ibuprofen, and Paracetamol by Flow-injection Analysis with Multiple-pulse Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, **27**: 2785–2791.
- CHIERAGHI, S, TAIER, MA, KARIMI-MALEII, II (2016) A Novel Strategy for Determination of Paracetamol in the Presence of Morphine Using a Carbon Paste Electrode Modified with CdO Nanoparticles and Ionic Liquids. *Electroanalysis*, **28**: 366–371.
- CHOKKAREDDY, R, THONDAVADA, N, BHAJANTHRI, NK (2019) Analytical Methods and ionic liquid based electrochemical sensor for. 6204–6212.
- DHAWANE, SH, KUMAR, T, HALDER, G (2018) Recent advancement and prospective of heterogeneous carbonaceous catalysts in chemical and enzymatic transformation of biodiesel. *Energy Convers. Manag.*, **167**: 176–202.
- EL-ESKANDARANY, MS (2015) The history and necessity of mechanical alloying. doi:10.1016/b978-1-4557-7752-5.00002-4.
- FILIK, H, AYDAR, S, AVAN, AA (2015) Poly(2,2'-(1,4-phenylenedivinylene) Bis-8-hydroxyquinoline) Modified Glassy Carbon Electrode for the Simultaneous

- Determination of Paracetamol and p-Aminophenol. *Anal. Lett.*, **48**: 2581–2596.
- FRANETA, JT, AGBABA, D, ERIC, S, PAVKOV, S, ALEKSIC, M, VLADIMIROV, S (2002) HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. **57**: 709–713.
- GE, M (2018) Analitik Metotların Amaca Uygunluğu.
- GORAIN, B, CHOUDHURY, H, NANDI, U, DAS, A, DAN, S, PAL, TK (2013) Development and validation of an HPLC method for simultaneous detection and quantification of paracetamol and etodolac in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J. AOAC Int.*, **96**: 573–579.
- GRALE, TJ, SWARTZLANDER, EE (2018) SKOOG, Hooler and Crouch. doi:10.1109/ACSSC.2017.8335505.
- GULMEZ, SE, LARREY, D, PAGEAUX, GP, BERNUAU, J, BISSOLI, F, HORMANS, Y, THORBURN, D, MCCORMICK, PA, STRICKER, B, TOUSSI, M, LIGNOT-MALEYRAN, S, MICON, S, HAMOUD, F, LASSALLE, R, JOVÉ, J, BLIN, P, MOORE, N (2015) Liver transplant associated with paracetamol overdose: Results from the seven-country SALT study. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **80**: 599–606.
- HELMY, SA, EL-BEDAIWY, HM (2014) Simultaneous determination of paracetamol and methocarbamol in human plasma by HPLC using UV detection with time programming: Application to pharmacokinetic study. *Drug Res. (Stuttg.)*, **64**: 363–367.
- HEWAVITHARANA, AK, LEE, S, DAWSON, PA, MARKOVICH, D, SIAW, PN (2008) Development of an HPLC-MS/MS method for the selective determination of paracetamol metabolites in mouse urine. *Anal. Biochem.*, **374**: 106–111.
- HOUSSIN, T, SENEZ, V (2013) Electrochemical Detection. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-59543-0.00006-2.
- KANG, X, WANG, J, WU, H, LIU, J, AKSAY, IA, LIN, Y (2010) A graphene-based electrochemical sensor for sensitive detection of paracetamol. *Talanta*, **81**: 754–759.
- KARIMI-MALEH, H, HATAMI, M, MORADI, R, KHALILZADEH, MA, AMIRI, S, SADEGHIFAR, H (2016) Synergic effect of Pt-Co nanoparticles and a dopamine derivative in a nanostructured electrochemical sensor for simultaneous determination of N-acetylcysteine, paracetamol and folic acid. *Microchim. Acta*, **183**: 2957–2964.
- KISSINGER, PT, HEINEMAN, WR (1983) Cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.*, **60**: 702–706.
- KONAROVA, M, TANIGUCHI, I (2009) Physical and electrochemical properties of LiFePO₄ nanoparticles synthesized by a combination of spray pyrolysis with wet ball-milling. *J. Power Sources*, **194**: 1029–1035.

- LANCASTER, EM, HIATT, JR, ZARRINPAR, A (2015) Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Arch. Toxicol.*, **89**: 193–199.
- LAVIRON E, ROULLIER L, DEGRAND CA (1980) Multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes. Part II. Theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction. *J Electroanal Chem*, **112**: 11–23.
- LI, J, LIU, J, TAN, G, JIANG, J, PENG, S, DENG, M, QIAN, D, FENG, Y, LIU, Y (2014) High-sensitivity paracetamol sensor based on Pd/graphene oxide nanocomposite as an enhanced electrochemical sensing platform. *Biosens. Bioelectron.*, **54**: 468–475.
- LOCATELLI, M, CIFELLI, R, DI LEGGE, C, BARBACANE, RC, COSTA, N, FRESTA, M, CELIA, C, CAPOLUPO, C, DI MARZIO, L (2015) Simultaneous determination of eperisone hydrochloride and paracetamol in mouse plasma by high performance liquid chromatography-photodiode array detector. *J. Chromatogr. A*, **1388**: 79–86.
- MACHADO ALENCAR, L, BACKES DOS SANTOS, R, DE JESUS GUEDES, T, TORRES PIO DOS SANTOS, W, BATISTA GOMES DE SOUZA, J, SOUZA FERREIRA, V, AMORIM BEZERRA DA SILVA, R (2018) Fast and Selective Simultaneous Determination of Acetaminophen, Aspirin and Caffeine in Pharmaceutical Products by Batch Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection. *Electroanalysis*, **30**: 296–303.
- MANCIPE, LC, FERNÁNDEZ, DC, DANIEL, A (2010) Intoxicación por Acetaminofén Farmacología y Fisiopatología. *Rev. Med*, **18**: 221–227.
- MAO, A, LI, H, JIN, D, YU, L, HU, X (2015) Fabrication of electrochemical sensor for paracetamol based on multi-walled carbon nanotubes and chitosan-copper complex by self-assembly technique. *Talanta*, **144**: 252–257.
- MARZILAWATI, AR, NGAU, YY, MAHADEVA, S (2012) Low rates of hepatotoxicity among Asian patients with paracetamol overdose: A review of 1024 cases. *BMC Pharmacol. Toxicol.*, **13**: 1.
- MEHMET, G (2011) The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. *Open Anal. Chem. J.*, **5**: 1–21.
- MEYER, MR, WELTER, J, WEBER, AA, MAURER, HH (2011) Development, validation, and application of a fast and simple GC-MS method for determination of some therapeutic drugs relevant in emergency toxicology. *Ther. Drug Monit.*, **33**: 649–653.
- MICHAUT, A, MOREAU, C, ROBIN, MA, FROMENTY, B (2014) Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.*, **34**: 171–179.
- MUND, ME, QUARCOO, D, GYO, C, BRÜGGMANN, D, GRONEBERG, DA (2015) Paracetamol as a toxic substance for children: Aspects of legislation in selected

- countries. *J. Occup. Med. Toxicol.*, **10**: 1–7.
- NADLER, A, FEIN, DM (2018) Acetaminophen poisoning. *Pediatr. Rev.*, **39**: 316–318.
- (ORA LABORATORY MANUAL) (2013) Section 3 Drug Analysis. **IV**: 1–56.
- OZKAN, SA, KAUFFMANN, J-M, ZUMAN, P (2015) Electroanalysis in Pharmaceutical Biomedical and Pharmaceutical Sciences. doi:10.1007/978-3-662-47138-8_1.
- PEREIRA, PF, MARRA, MC, LIMA, AB, DOS SANTOS, WTP, MUNOZ, RAA, RICHTER, EM (2013) Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. *Diam. Relat. Mater.*, **39**: 41–46.
- PUBLICACIONES, O de (2005) Universidad de Murcia. *All rights Reserv. IJES*, **281**: 1–30.
- ROCHA, DP, DORNELLAS, RM, NOSSOL, E, RICHTER, EM, SILVA, SG, SANTANA, MHP, MUNOZ, RAA (2017) Electrochemically Reduced Graphene Oxide for Forensic Electrochemistry: Detection of Cocaine and its Adulterants Paracetamol, Caffeine and Levamisole. *Electroanalysis*, **29**: 2418–2422.
- SAITO, T, MORITA, S, INOUE, S, YAMAMOTO, I, INOKUCHI, S (2008) GC-MS assay for acetaminophen in human hair segments. *Forensic Toxicol.*, **26**: 27–30.
- SANTOS, AM, VICENTINI, FC, FIGUEIREDO-FILHO, LCS, DEROCO, PB, FATIBELLO-FILHO, O (2015) Flow injection simultaneous determination of acetaminophen and tramadol in pharmaceutical and biological samples using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode. *Diam. Relat. Mater.*, **60**: 1–8.
- SCHOLZ, F (2015) Voltammetric techniques of analysis: the essentials. **1**: 1–24.
- SHAIKH, KA, DEVKHILE, AB (2008) Simultaneous determination of aceclofenac, paracetamol, and chlorzoxazone by RP-HPLC in pharmaceutical dosage form. *J. Chromatogr. Sci.*, **46**: 649–652.
- SIMKIN, S, HAWTON, K, KAPUR, N, GUNNELL, D (2012) What can be done to reduce mortality from paracetamol overdoses? A patient interview study. doi:10.1093/qjmed/hcr135.
- SULTANA, N, ARAYNE, MS, ALI, SN, ZUBERI, MH (2012) Simultaneous determination of glipizide and glimepiride by Rp-Hplc in dosage formulations and in human serum. *Med. Chem. Res.*, **21**: 2443–2448.
- TANAM, AA, KHAN, MF, RASHID, R Bin, SULTAN, MZ, RASHID, MA (2014) Validation and optimization of a simple RP-HPLC method for the determination of paracetamol in human serum and its application in a pharmacokinetic study with healthy Bangladeshi male volunteers. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.*, **13**: 125–131.

- TANIGUCHI, I, BAKENOV, Z Electrochemical Performance of Nanocomposite LiMnPO₄/C Cathode Materials for Lithium Batteries. *Dep. Chem. Eng. Tokyo Inst. Technol.*,: 1–10.
- TEFERA, M, GETO, A, TESSEMA, M, ADMASSIE, S (2016) Simultaneous determination of caffeine and paracetamol by square wave voltammetry at poly(4-amino-3-hydroxynaphthalene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrode. *Food Chem.*, **210**: 156–162.
- TRETTIN, A, ZOERNER, AA, BÖHMER, A, GUTZKI, FM, STICHTENOTH, DO, JORDAN, J, TSIKAS, D (2011) Quantification of acetaminophen (paracetamol) in human plasma and urine by stable isotope-dilution GC-MS and GC-MS/MS as pentafluorobenzyl ether derivative. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **879**: 2274–2280.
- VENKATA KRISHNA RAO, R, VENKATA ABHINAV, K, KARTHIK, PS, SINGH, SP (2015) Conductive silver inks and their applications in printed and flexible electronics. *RSC Adv.*, **5**: 77760–77790.
- WADHER, S, MOMIN, M, YHOLE, P, PURANIK, M (2006) Reverse phase HPLC method for determination of aceclofenac and paracetamol in tablet dosage form. *Indian J. Pharm. Sci.*,... doi:10.4103/0250-474x.26672.
- XUE HONG-YUAN, LIU JIAN-FANG, LIU HUI-CHEN, WANG GANG, LW (2005) Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in human plasma by HPLC. *Chinese J.*,... http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-ZGYZ200508009.htm.
- YAN-BIN, Z, FANG, L, JIN-SONG, D (2009) Simultaneous determination of paracetamol and vitamin C in human plasma by HPLC method with gradient elution. *Chinese Pharm. J.*,...
- YANG, N, SWAIN, GM, JIANG, X (2016) Nanocarbon Electrochemistry and Electroanalysis: Current Status and Future Perspectives. *Electroanalysis*, **28**: 27–34.
- YANG, N, WALDVOGEL, SR, JIANG, X (2016) Electrochemistry of Carbon Dioxide on Carbon Electrodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**: 28357–28371.
- YIĞİT, A, YARDIM, Y, ŞENTÜRK, Z (2016) Voltammetric Sensor Based on Boron-Doped Diamond Electrode for Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine, and Aspirin in Pharmaceutical Formulations. *IEEE Sens. J.*, **16**: 1674–1680.
- ZHANG, Y, LIU, X, LI, L, GUO, Z, XUE, Z, LU, X (2016) An electrochemical paracetamol sensor based on layer-by-layer covalent attachment of MWCNTs and a G4.0 PAMAM modified GCE. *Anal. Methods*, **8**: 2218–2225.
- ZITTEL, HE, MILLER, FJ (1965) A Glassy-Carbon Electrode for Voltammetry. *Anal. Chem.*, **37**: 200–203.