

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BAZI KSANTİN TÜREVLERİNİN MODİFİYE KALEM GRAFİT
ELEKTROTTA ELEKTROKİMYASAL TAYİNİ ve DNA ile ETKİLEŞİMLERİ**

Alper FİTOZ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI KSANTİN TÜREVLERİNİN MODİFİYE KALEM GRAFİT ELEKTROTTA ELEKTROKİMYASAL TAYİNİ ve DNA ile ETKİLEŞİMLERİ

Alper FİTOZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zehra YAZAN

Bu çalışmada ksantin ve iki N-metil türevi teofilin ve teobrominin eşzamanlı elektrokimyasal analizi için yeni bir elektrokimyasal platform üretilmiştir. Elektrokimyasal platformun yüzeyi taramalı elektron mikroskobu ve enerji-dağılımlı X-ışınları spektroskopisi teknikleri ile karakterize edilmiş, performansı ise dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Ksantin ve iki N-metil türevinin bu platform yüzeyindeki elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi teknikleri ile incelenmiştir. NiO, çok duvarlı karbon nano-tüp ve doğal kil materyali ile geliştirilen yeni elektrokimyasal platform diferansiyel puls yöntemi ile birlikte ksantin, teofilin ve teobrominin eşzamanlı tayini için kullanılmıştır. Destek elektrolitin pH değişimi ile ksantin, teofilin ve teobrominin anodik pik akım ve potansiyellerindeki değişim incelenmiştir. Geliştirilen eşzamanlı analiz yöntemi seçicilik, üç farklı matriste yapılan gerçek numune çalışmaları ve girişim çalışmaları ile test edilmiştir. Ayrıca bu üç maddenin DNA etkileşimi geliştirilen elektrokimyasal platformda incelenmiştir. Her üç madde için de DNA ile etkileşimin termodinamik olarak istemli olduğu gösterilmiştir. Eşzamanlı analizde kullanılmayan kafein molekülü için elektrolit etkisi ile seçilen elektrolitin pH etkisi ve çıplak kalem grafit elektrot yüzeyindeki davranışı dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls ve kare dalga voltametri teknikleri ile araştırılmıştır. Belirlenen optimum şartlar altında diferansiyel puls ve kare dalga voltametri teknikleri için birer analiz yöntemi geliştirilmiş ve geliştirilen yöntemler gerçek numune ve girişim çalışmaları ile test edilmiştir. Geliştirilen iki yöntem gerçek numune analizlerini etkili bir şekilde gerçekleştirmiştir. Ayrıca DNA etkileşimi söz konusu iki teknik ile incelenerek kafeinin DNA'ya bağlanmasının termodinamik olarak istemli olduğu da gösterilmiştir. DNA komplekslerinin çalışılan dört madde için de zayıf elektrostatik kuvvetler yardımı ile oluştuğu belirlenmiştir.

Ekim 2021, 103 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ksantin, Teofilin, Teobromin, Kafein, DNA Etkileşimi, Eşzamanlı Analiz

ABSTRACT

PhD Thesis

SIMULTANEOUS ELECTROCHEMICAL DETERMINATION of SOME
XANTHINE DERIVATIVES at MODIFIED PENCIL GRAFITTE ELECTRODE and
THEIR INTERACTIONS with DNA

Alper FİTOZ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Zehra YAZAN

In this study, a new electrochemical platform was produced for simultaneous electrochemical analysis of xanthine and its two N-methyl derivatives theophylline and theobromine. The surface of the electrochemical platform was characterized by scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy techniques, while its performance was examined using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy techniques. The electrochemical behaviors of xanthine and two N-methyl derivatives on the surface of the electrochemical platform were investigated by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry techniques. The novel electrochemical platform developed with NiO, multi-walled carbon nanotube, and natural clay material was used for the simultaneous determination of xanthine, theophylline and theobromine together with the differential pulse method. The changes in the anodic peak currents and potentials of xanthine, theophylline, and theobromine with the pH change of the supporting electrolyte were examined. The developed simultaneous analysis method was questioned with selectivity, real sample studies, and interference studies on three different matrices. In addition, the DNA interaction of these three analytes was investigated on the developed electrochemical platform. For all three analytes, the interaction with DNA was determined to be thermodynamically spontaneous. The electrolyte effect and the pH effect of the selected electrolyte and its behavior on the bare pencil graphite electrode surface were investigated using cyclic voltammetry, differential pulse, and square wave voltammetry techniques for the caffeine molecule that was not used in the simultaneous analysis. An analysis method was developed for the differential pulse and the square wave voltammetry techniques under the determined optimum conditions, and the developed methods were tested with real sample and interference studies. The two developed methods effectively performed real sample analyzes. In addition, DNA interaction was examined with these two techniques, and it was revealed that the binding of caffeine to DNA is thermodynamically spontaneous also DNA interactions were accomplished with the help of weak electrostatic forces for all studied analytes.

October 2021, 103 pages

Keywords: Xanthine, Theophylline, Theobromine, Caffeine, DNA Interaction, Simultaneous Analysis

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

İlk olarak tez çalışmam süresince desteğini bir an olsun esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Zehra YAZAN'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimimin başında ve yüksek lisans dönemimde danışmanlığımı yapan sayın Prof. Dr. Kaan C. EMREGÜL (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü) hocama da öğretileri için teşekkür ederim. Ayrıca doktora yeterlik sınavına hazırlanırken derslerini ilgi ile takip ettiğim değerli hocam sayın Prof. Dr. Mustafa TAŞTEKİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü) teşekkürü bir borç bilirim. Daha bir lisans öğrencisi olduğum günden bugüne geçen sürede yanımda olan ve beni akademik bakış açısı ile tanıştıran değerli hocam sayın Prof. Dr. Ümit ERGUN (Düzce Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü) ve değerli partneri sayın Dr. Ece ERGUN'a (Türkiye Enerji, Nükleer ve Maden Araştırma Kurumu) sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bunlara ek olarak lisans üstü eğitim sürem boyunca destek ve önerilerini aldığım sayın Prof. Dr. Mustafa HAYVALI'ya (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü), sayın Prof. Dr. Orhan ATAKOL'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü) ve sayın Doç. Dr. Hasan NAZIR'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü) teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda 20L0430001 kodlu projeye maddi araştırma desteği sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü birimine teşekkür ederim.

On yıldır birlikte hayatı göğüslediğimiz, iyi günde, kötü günde beraber gülümsediğimiz partnerim sayın Dicle KARABAYIR'a tekrar tekrar teşekkür ederim. Son olarak değerli aileme, annem Suna FİTOZ'a, babam Süleyman FİTOZ'a, ablalarım Doç. Dr. Eda KÜÇÜKTÜLÜ (Trabzon Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi) ve Esra FİTOZ'a, abim Buğra FİTOZ'a tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi tüm emekleri için minnet duyduğumu belirtmek istiyorum.

Alper FİTOZ

Ankara, Ekim 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	10
2.1 Elektrokimyasal Yöntemler ve Sınıflandırılmaları.....	10
2.2 Voltametrik Teknikler.....	17
2.2.1 Voltametrik akım.....	18
2.2.2 Dönüşümlü voltametri.....	21
2.2.3 Diferansiyel puls voltametrisi.....	23
2.2.4 Kare dalga voltametrisi.....	24
2.3 Modifiye Elektrot Kavramı.....	25
2.3.1 Taramalı elektron mikroskobu ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi.....	29
2.3.2 Dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi.....	32
2.4 DNA ile Etkileşimin İncelenmesi.....	39
2.5 Literatür Özetleri.....	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	47
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	47
3.1.1 Kullanılan kimyasallar.....	47
3.1.2 Sodyum montmorillonitin saflaştırılması.....	47
3.1.3 Kullanılan cihazlar ve elektrotlar.....	49
3.2 Kalem Grafit Elektrotun Modifikasyonu.....	50
3.3 Stok Çözeltilerin Hazırlanışı.....	51
3.4 Kalibrasyon Çalışması.....	51
3.5 Seçicilik ve Girişim Çalışmaları.....	52
3.6 Terarlanabilirlik Yeniden Üretilirlik ve Kararlılık Çalışması.....	52
3.7 Gerçek Numunelerin Hazırlanışı.....	53
3.8 DNA Etkileşimi Çalışmaları.....	55
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	56
4.1 Eşzamanlı Analiz için Yapılan Ön Deneme Çalışmaları.....	56
4.2 Modifiye Elektrot için Optimizasyon Karakterizasyon ve Performans Değerlendirmesi.....	58
4.2.1 Modifiye elektrot bileşiminin belirlenmesi.....	59
4.2.2 Modifiyer miktarlarının ve bekletme süresinin optimizasyonu.....	60
4.2.3 Modifiye elektrot yüzeyinin karakterizasyonu.....	62
4.2.4 NiO/MWCNT/NNaM/KGE'nin elektrokimyasal performansı.....	64
4.3 Ksantin Teofilin ve Teobrominin Modifiye Elektrotta Eşzamanlı Tayinleri....	67
4.3.1 NiO/MWCNT/NNaM/KGE yüzeyinde elektrokimyasal davranışlar.....	68
4.3.2 pH etkisi.....	71
4.3.3 DPV ile eşzamanlı analiz.....	72

4.3.4 Seçicilik ve girişim çalışmaları.....	75
4.3.5 Yeniden üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik.....	77
4.3.6 Gerçek numune analizi.....	78
4.3.7 Ksantin teofilin ve teobrominin DNA ile etkileşimleri.....	79
4.4 Kafeinin Çıplak Kalem Grafit Elektrot ile Analizi.....	81
4.4.1 Elektrolit seçimi.....	81
4.4.2 Kafeinin çıplak kalem grafit elektrotta elektrokimyasal davranışı.....	82
4.4.3 pH etkisi.....	83
4.4.4 DPV ile kafein analizi.....	85
4.4.5 KDV ile kafein analizi.....	86
4.4.6 Girişim çalışması.....	87
4.4.7 Gerçek numune analizi.....	88
4.4.8 Kafeinin DNA ile etkileşimi.....	89
5. SONUÇLAR.....	93
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	104

SİMGELER DİZİNİ

E_{pa}	: anodik pik potansiyeli
E_{pk}	: katodik pik potansiyeli
ΔE_p	: anodik ve katodik pik potansiyellerinin farkı
E^0	: standart elektrot potansiyeli
AA	: alternatif akım
i_{pa}	: anodik pik akımı
i_{pk}	: katodik pik akımı
n	: aktarılan elektron sayısı
R	: direnç, ideal gaz sabiti
Z	: empedans
L	: ligand
K_{L-DNA}	: ligand-DNA bağlanma sabit
ΔG^0	: standart Gibbs enerji
Hz	: frekans birimi (s^{-1})
A	: elektro-aktif yüzey alanı
v	: tarama hızı
C	: derişim
L :	: litre
mL	: mili litre
M	: molarite (mol/L)
μM	: mikro molar
nM	: nano molar
V	: volt
mV	: mili volt
A	: amper (akım)
mA	: mili amper
μA	: mikro amper
kJ	: kilo joule

Kısaltmalar

AA	: askorbik asit
CF	: kafein
XT	: ksantin
TP	: teofilin
TB	: teobromin
ÜA	: ürik asit
DNA	: deoksiribonükleik asit
RNA	: ribonükleik asit
MO NP	: metal oksit nano-partikülleri
NiO	: nikel oksit
MWCNT	: çok-duvarlı karbon nanotüp
NNaM	: sodyum-montmorillonit
DV	: dönüşümlü voltametri
DPV	: diferansiyel puls voltametrisi

KDV	: kare dalga voltametrisi
EES	: elektrokimyasal empedans spektroskopisi
TEM	: taramalı elektron mikroskobu
KME	: kimyasal modifiye elektrot
EDX	: enerji-dağılımlı X-ışını spektroskopisi
KGE	: kalem grafit elektrot
çKGE	: çıplak kalem grafit elektrot



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Basit pürin molekülünün üç boyutlu yapısı.....	1
Şekil 1.2 Ksantin ve bazı N-metil türevlerinin üç boyutlu yapısı.....	4
Şekil 1.3 Montmorillonit kilinin üç boyutlu-katmanlı kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.1 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ve $\text{Sn}^{4+}/\text{Sn}^{2+}$ redoks çiftleri için potansiyel şeması.....	12
Şekil 2.2 Elektrottan uzaklığın bir fonksiyonu olarak Fe^{3+} derişiminin değışimi.....	13
Şekil 2.3 Elektrokimyasal ölçümleri için temel cihaz tasarımları; (a) potansiyometre (b) potansiyostat ve (c) galvanostat.....	15
Şekil 2.4 Elektroanalitik yöntemlerin şematik sınıflandırılması.....	16
Şekil 2.5 Voltametrik tekniklerde kullanılan üçlü elektrot sisteminin şeması.....	17
Şekil 2.6 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunun (a) yarı-reaksiyon diyagramı ve (b) indirgenme sırasında elektrot yüzeyindeki hareketi.....	19
Şekil 2.7 Dönüşümlü voltametrde (a) zamana karşı potansiyelin değışimi ve (b) tersinir bir redoks reaksiyonu için beklenen tipik bir dönüşümlü voltamogram.....	22
Şekil 2.8 DPV tekniğı için (a) geğış sinyalinin ölçümü (ΔE ; puls büyüklüğü, t_p ; puls süresi) ve (b) örnek DP voltamogramı.....	24
Şekil 2.9 (a) KDV tekniğinde uygulanan kare dalga formu (T_d : bekleme süresi, τ : kare dalga frekansı, ΔE ; adım yüksekliğı ve E_{KD} ; kare dalga puls büyüklüğü) ve (b) örnek kare dalga voltamogramı.....	25
Şekil 2.10 Entegre elektrokimyasal platform için bir şema.....	28
Şekil 2.11 TEM cihazının temel bileşenleri.....	31
Şekil 2.12 (a) elektron-madde etkileşimini gösteren bir şema ve (b) TEM’de iki aşamalı X-ışını üretimi.....	32
Şekil 2.13 DV tekniğı ile Randles-Sevcik eşitliğinin aktif yüzey alanı hesaplamak için birlikte kullanımı.....	33
Şekil 2.14 EES’de grafik gösterim şekilleri; (a-i) basit bir elektrokimyasal eşdeğer devre, (a-ii) Nyquist eğrisi, (b-i) sanal empedanslı bode eğrisi ve (b-ii) faz elemanlı bode eğrisi.....	36
Şekil 2.15 (a) Nyquist eğrisi ve (b) yük transfer direncini hesaplamak için kullanılan difüzyon örnek bir eşdeğer devre.....	37

Şekil 2.16 DNA-ilaç etkileşiminin elektrokimyasal olarak incelenmesi için bir şema....	42
Şekil 3.1 Sodyum-montmorillonitin XRD modeli (NNaM: nano-sodyum-montmorillonit).....	48
Şekil 3.2 Modifikasyon uygulamasının adımlarını içeren bir şema.....	50
Şekil 3.3 XT, TP, TB ve CF'nin açık molekül yapıları.....	51
Şekil 4.1 70,0 µM XT, 80,0 µM TP ve 45,0 µM TB ve 45,0 µM CF'nin eşzamanlı DP voltamogramları; (a) çeşitli elektrotlarda (pH: 2,0) (b) NiO/MWCNT/NNaM/KGE'de farklı pH'larda.....	56
Şekil 4.2 NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensörü ile BR tamponunda alınan (pH: 2.0) DP voltamogramları; (a) 70,0 µM XT, (b) 80,0 µM TP, (c) 85,0 µM TB ve (d) 85,0 µM CF.....	57
Şekil 4.3 10 ⁻³ M CF'nin çKGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE kullanılarak alınan DP voltamogramları.....	58
Şekil 4.4 Hazırlanan elektrokimyasal platformların 5,0 mM [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} redoks probu ile alınan DV voltamogramları (v: 100 mV/s, potansiyel taraması: (- 0.2) – (+ 0.6) V).....	60
Şekil 4.5 40,0 µM XT, 55,0 µM TP ve 32,0 µM TB'nin farklı modifiyer oranlarında DP voltamogramları: (a); NNaM oranı, (b); MWCNT oranı, (c); NiO oranı ve (d) bekletme süresi (iç grafik: XT, TP ve TB'nin i _{pa} yanıtları).....	61
Şekil 4.6 Üretilen elektrotların SEM görüntüleri; (a) çKGE, (b) NiO/KGE, (c) MWCNT/KGE, (d) NNaM/KGE ve (e) NiO/MWCNT/NNaM/KGE.....	63
Şekil 4.7 Üretilen elektrotların EDX görüntüleri; (a) NiO/KGE, (b) NNaM/KGE, (c) MWCNT/KGE ve (d) NiO/MWCNT/NNaM/KGE.....	64
Şekil 4.8 Hazırlanan elektrotların 5,0 mM [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} redoks probu ile farklı tarama hızlarında DV voltamogramları; (a) çKGE, (b) NiO/KGE, (c) MWCNT/KGE, (d) NNaM/KGE, (e) NiO/MWCNT/NNaM/KGE ile ve (f) i _{pa} – v ^{1/2} grafikleri.....	65
Şekil 4.9 Hazırlanan elektrotlarının EES yöntemi ile elde edilen Nyquist diyagramları (Ek: Eşdeğer devre modeli; R _s çözelti direnci, R _{ct} yük transfer direnci, C _{dl} çift tabaka kapasitansı ve Z _w Warburg empedansı).....	67
Şekil 4.10 (a) 10 ⁻³ M XT, (b) 10 ⁻³ M TP, (c) 10 ⁻³ M TB için DV tekniği ile farklı tarama hızlarında alınan ölçümlere ait voltamogramlar ve (d) i _{pa} – v ^{1/2} , (e) log i _{pa} – log v, (f) E _{pa} – log v grafikleri.....	70

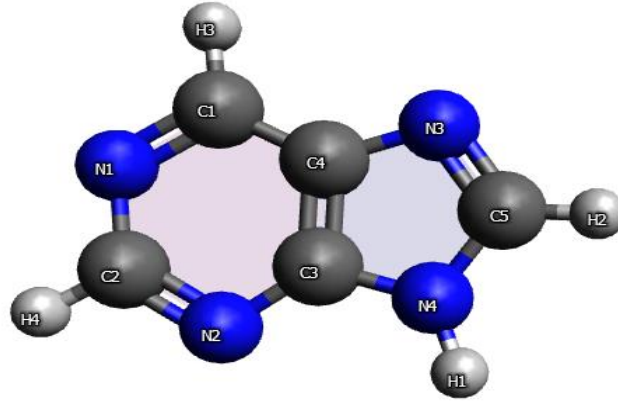
Şekil 4.11 75,0 μM XT, 55,0 μM TP ve 90,0 μM TB'nin çeşitli çalışma elektrotları ile alınan DP voltamogramları.....	71
Şekil 4.12 NiO/MWCNT/NNaM/PGE yüzeyinde çeşitli pH değerlerinde BR tamponu ile 75,0 μM XT, 55,0 μM TP ve 90,0 μM TB'nin DPV voltamogramları (Şekil içi: E_{pa} – pH eğrileri).....	72
Şekil 4.13 (a) optimize edilmiş koşullarda XT (0,5 – 150,0 μM), TP (5,0 – 250,0 μM) ve TB için (5,0 – 250,0 μM) eş zamanlı tayinin DP voltamogramları, (b) XT (siyah), TP (kırmızı) ve TB'nin (yeşil) kalibrasyon eğrileri.....	73
Şekil 4.14 Tekli kalibrasyon çalışmalarının DP voltamogramları; (a) XT, (b) TP, (c) TB ve (d) tekli kalibrasyon eğrileri.....	76
Şekil 4.15 (a) XT, (b) TP, (c) TB'nin DNA ile etkileşimine ilişkin DP voltamogramları ve (d) $\log 1/[\text{DNA}] - \log [\log i_{\text{XT-DNA}} / i_{\text{XT}} - i_{\text{XT-DNA}}]$ grafikleri	79
Şekil 4.16 10^{-4} M CF'nin anodik piklerine çeşitli elektrolitlerin etkisi; (a) DPV ve (b) KDV voltamogramları.....	81
Şekil 4.17 (a) 10^{-3} M CF'nin farklı tarama hızlarında alınan DV voltamogramları, (b) $i_{pa} - v^{1/2}$ grafiği, (c) $\log i_{pa} - \log v$ grafiği ve (d) $E_{pa} - \log v$ grafiği.....	82
Şekil 4.18 10^{-3} M CF'nin farklı pH'larda elde edilen voltamogramları; (a) DPV ve (b) KDV.....	84
Şekil 4.19 CF'nin kalibrasyon çalışmasına ait (a) DP voltamogramları ve (b) kalibrasyon Eğrisi.....	85
Şekil 4.20 CF'nin kalibrasyon çalışmasına ait (a) KD voltamogramları ve (b) kalibrasyon eğrisi.....	86
Şekil 4.21 CF'nin gerçek numune analizine ait voltamogramlar; DPV ile (a-i) Red-Bull'da, (a-ii) Coca-Cola'da ve KDV ile (b-i) Red-Bull'da, (b-ii) Coca-Cola'da.....	89
Şekil 4.22 CF-DNA etkileşimi için elde edilen voltamogramlar; (a) DPV ve (b) KDV (Şekil içi: $\log 1/[\text{DNA}] - \log [i_{\text{CF-DNA}} / i_{\text{CF}} - i_{\text{CF-DNA}}]$ eğrileri).....	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Elektrokimyasal devre elemanları, akım-yük ilişkisi ve empedans verisi.....	36
Çizelge 4.1 Eşzamanlı analiz için kalibrasyon eğrilerinin regresyon parametreleri.....	74
Çizelge 4.2 Geliştirilen elektrokimyasal platform ve yöntemin analitik parametrelerinin karşılaştırılması.....	74
Çizelge 4.3 XT, TP ve TB'nin tekli ve eşzamanlı analizleri için kalibrasyon verilerinin karşılaştırılması.....	77
Çizelge 4.4 XT, TP ve TB'nin elektrokimyasal tayininde girişim yapan türlerin tolerans limitleri.....	77
Çizelge 4.5 Çikolata, siyah çay ve idrar numunelerinde XT, TP ve TB'nin eşzamanlı tayinleri için geri kazanım çalışmalarının sonuçları.....	78
Çizelge 4.6 $\log 1/[DNA] - \log [i_{CF-DNA} / i_{CF} - i_{CF-DNA}]$ eğrisi için kalibrasyon verileri, hesaplanan bağlanma sabitleri ve Gibbs enerjileri.....	80
Çizelge 4.7 DPV ve KDV teknikleri ile elde edilen CF'ye ait kalibrasyon verileri.....	87
Çizelge 4.8 CF'nin DPV ve KDV voltamogramlarına bazı türlerin girişim etkisi.....	87
Çizelge 4.9 Standart ekleme yöntemi ve DPV ile CF'nin gerçek numunelerde analizi için elde edilen sonuçlar.....	88
Çizelge 4.10 Standart ekleme yöntemi ve KDV ile CF'nin gerçek numunelerde analizi için elde edilen sonuçlar.....	88
Çizelge 4.11 $\log 1/[DNA] - \log [i_{CF-DNA} / i_{CF} - i_{CF-DNA}]$ eğrisi için kalibrasyon verileri, hesaplanan bağlanma sabitleri ve Gibbs enerjileri.....	90
Çizelge 4.12 XT, TP, TB ve CF-DNA komplekslerinin bağlanma sabitlerinin bazı anti-kanser etken maddeleri ile karşılaştırılması.....	91

1. GİRİŞ

Pürin molekülleri biri altılı pirimidin halkası diğeri beşli imidazol halkası içeren iki halkalı moleküllerdir. Basit bir pürin çekirdeğinin yapısında dört azot ve beş karbon atomu bulunur (Şekil 1.1). Pürin molekülleri arasında ksantin (XT), hipoksantin, teofilin (TP), teobromin (TB), kafein (CF) ile ürik asit (ÜA) ve izoguanin yer almaktadırlar (Jesny ve Kumar 2017). Pürin molekülleri ayrıca adenosin trifosfat, guanosin trifosfat, siklik adenosin monofosfat, nikotinamid adenin dinükleotid ve koenzim A gibi diğere önemli biyomoleküllerin bileşenleridir (Kumari 2018). Pürin halkası, hücrelerde küçük moleküllerden veya diğere bileşiklerden aktarılan moleküler kısımlardan sentezlenir. Ana başlangıç bileşeni glisin amino asitidir, geriye kalan kısım tek karbonlu kalıntılar veya farklı kaynaklardan aktarılan -NH₂ gruplarıdır (A. Blanco ve G. Blanco 2017).



Şekil 1.1 Basit pürin molekülünün üç boyutlu yapısı

Ksantin ve N-metil türevleri yapısında pürin çekirdeği bulunduran biyomoleküllerdir (Şekil 1.2). Bu moleküller ayrıca yapılarında -NH₂ ve C=O grupları barındırmaları nedeniyle keto↔enol ve amin↔imin tautomerizmi sergilerler (Kumari 2018). Bu bileşikler doğal olarak çay, kahve ve kakao çekirdeği gibi ürünlerde ve dolayısıyla ilgili tüm yiyecek ve içeceklerde karşımıza çıkar. Enerji içecekleri son yıllarda fazlaca tüketilmeleri nedeniyle bunlara önemli bir örnektir. Ksantin N-metil türevleri, çeşitli fizyolojik etkilere neden olmalarından dolayı son yıllarda gıda ve beslenme endüstrisinde artan bir ilgi görmektedirler. Çok yakın bir zamanda, CF ve TP gibi ksantin türevleri,

bakteriyel ailenin mikro-molar inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. Ayrıca antioksidan özelliklerini değerlendirmek için de bu alkaloidler üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Mekassa vd. 2017). Bu tez çalışmasında XT ve onun üç N-metil türevi (TP, TB ve CF) araştırılmıştır.

XT (IUPAC adı: 3,7-dihidro-pürin-2,6-dion) kimyasal olarak 2,6-dihidroksi pürin olarak bilinen molekül (Şekil 1.2) vücutta önemli biyolojik mekanizmalarda yer alır. Pürin parçalanma mekanizmasında ortaya çıkan bir üründür. Örneğin, Adenin ve guaninin ürik aside dönüşüm metabolizmasında bir ara ürün olarak karşımıza çıkar (Anithaa vd. 2017 ve Dervisevic vd. 2015). Ayrıca XT insan vücudu da dahil olmak üzere canlılarda;

- guanin üzerinden guanin deaminaz enzimi ile,
- hipoksantinden ksantin oksidoredüktaz enzimi ile
- ve ksantosinden pürin nükleosit fosforilaz enzimi ile üretilmektedir.

Vücut sıvılarındaki ksantin seviyesi, perinatal asfiksi, erişkin solunum sıkıntısı sendromu, serebral iskemi, tümör hipertermi ve preeklampsi dahil olmak üzere birçok klinik durumun göstergesidir, dolayısıyla ksantin miktarı önemlidir (Xiao vd. 2008). Ksantinin önemli bir kullanım alanı balık eti tazeliğinin ve kalitesinin belirlenmesinde önemli bir bileşen olmasıdır. Bir balığın ölümünden sonra ksantin, balık etinde ATP parçalanması sonucu ortaya çıkan önemli bir metabolit olması sebebiyle, balık tazeliğini tahmin etmek için bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, insan vücudundaki sıvılarda bulunan ksantin içeriğinin de belirli patolojik durumlar için özellikle ksantinüri için faydalı bir indeks sağlayabileceği düşünülmektedir (Shan vd. 2009). Ağustos 2011’de yapılan bir NASA araştırmasında deoksiribo nükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) bileşenleri adenin, guanin ve urasili de içeren ksantin ve ilgili organik bileşiklerin uzayda bulunduğu ve karbon içeren göktaşlarının da geniş bir nükleo-baz çeşitliliğine sahip olduğunu belirtmişlerdir (Michale vd. 2011).

TP, TB ve CF, vücut doku ve sıvılarının çoğunda ve bazı bitkilerde bulunabilen bir pürin bazı olan, metile edilmiş ksantin türevleridir. Başlıca besleyici metil-ksantin kaynakları kahve çekirdekleri, kakao, kola somunu ve çay yapraklarıdır. Kafein, merkezi sinir

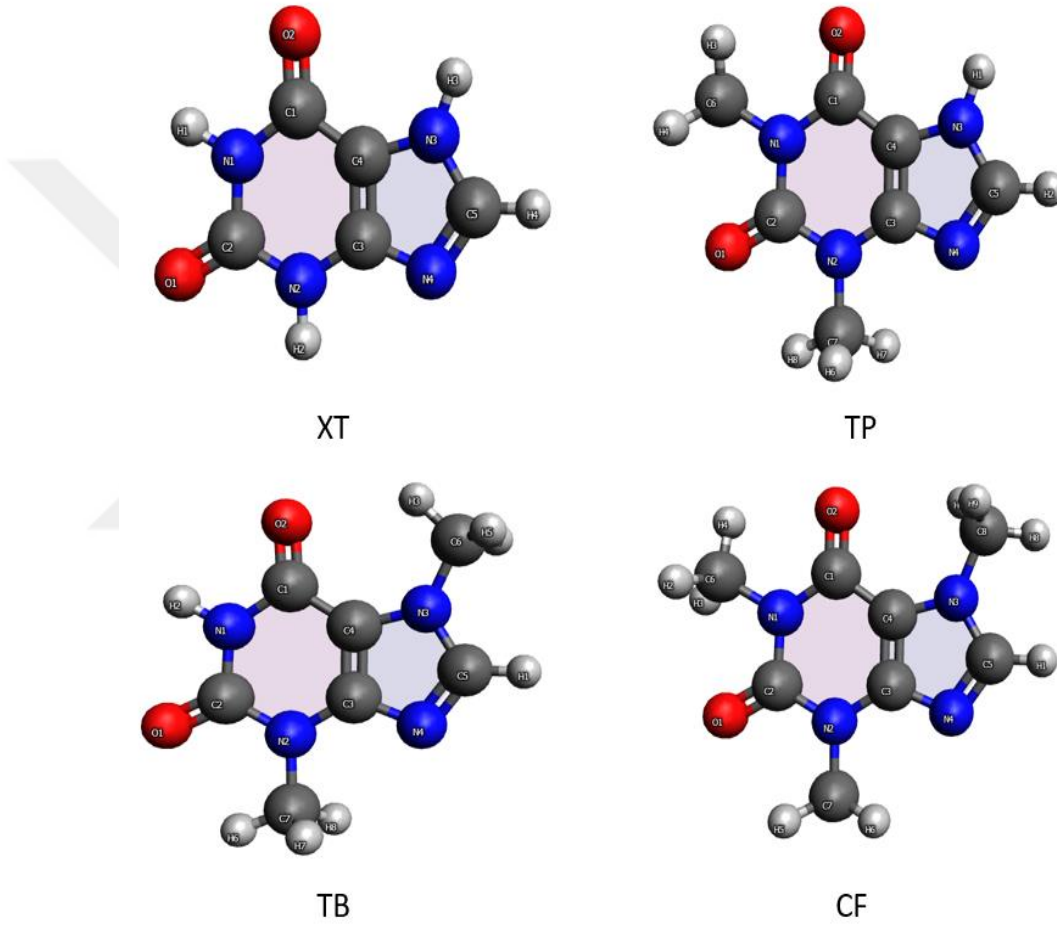
sisteminin uyarılması, diürez ve mide asidi salgılanması gibi insan bedeninde birçok fizyolojik etkiye sahiptir. Teofilin astım ve akciğer hastalıklarını tedavi etmek için kullanılabilmektedir, teobromin diüretik olarak kullanılır (Brunetti ve Desimoni 2009).

TP (IUPAC adı: 1,3-dimetil-7*H*-pürin-2,6-dion) kimyasal olarak 1,3-dimetil ksantin olarak da bilinen doğal bir alkaloiddir (Şekil 1.2). Ksantin ailesinin bir üyesi olarak, TB ve CF ile yapısal ve farmakolojik olarak benzerlikleri bulunur. Doğada çay (*Camellia sinensis*) ve kakaoda (*Theobroma cacao*) bulunduğu bilinmektedir. Ek olarak TP karaciğerde CF'nin metabolit ürünlerinden birisidir. Bronş kasının gevşemesi, mide asidi salgılanması ve merkezi sinir sisteminin uyarılması gibi insan vücudunda çeşitli fizyolojik etkilere neden olabilir (Cinkova vd. 2015).

TB (IUPAC adı: 3,7-dimetil-1*H*-pürin-2,6-dion), kakao bitkisinden elde edilen doğal bir alkaloiddir (Şekil 1.2). Çikolata ile ilgili tüm ürünlerde bulunmakta olduğundan gıda analizlerinde en sık tanımlanan bileşiklerden biridir (Gan vd. 2020). İsmine bromin kökü olmasına rağmen yapısında Br elementi bulunmayan tek bileşiktir. Bunun nedeni 'Theobromine' isminin Yunan köklerden gelen 'Theobroma' kelimesinden türetilmesidir. Burada 'Theo' kökü tanrı anlamı, 'broma' kökü ise yiyecek anlamı taşımaktadır. Buradan 'Theobromine' isminin 'tanrıların yiyeceği' gibi bir anlam taşıdığı düşünülmektedir. Her ne kadar CF ve TP gibi diğer metil ksantinlere kimyasal olarak benzer yapıda olsa da TB merkezi sinir sistemini bu türevlerden daha az uyarır (Svorc vd. 2018).

CF (IUPAC adı: 1,3,7-trimetilpürin-2,6-dion) kahve çekirdeklerinde bulunan aktif bir alkaloiddir (Şekil 1.2). Bitki ürün ve içeceklerinde ve ayrıca enerji içeceklerinde TP ve TB gibi ksantin diğer N-metil türevleri ile birlikte yaygın olarak bulunur. Bazı alkolsüz içecekler dahil olmak üzere çeşitli içeceklerde aroma maddesi olarak kullanılır (Terafa vd. 2016). Enerji içeceklerinde ise yüksek miktarlarda kullanılır. Ayrıca kafein, bitki üzerinde beslenmeye çalışan bazı böcekleri felç edip öldürdüğü için doğal bir böcek ilacı görevi görür (Akilulu vd. 2008). Kafein, dünyada en popüler olarak bilinen kimyasal maddelerden birisidir ve merkezi sinir sisteminin uyarılması, diürez ve kardiyovasküler sisteme etki gibi birçok önemli farmakolojik etkiye sahiptir. Orta dozlarda, uyanıklığı

artırabilir, ince motor koordinasyonunu azaltabilir, uykusuzluk, baş ağrısı, sinirlilik ve baş dönmesine neden olabildiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, zamanla yoğun kafein kullanımı diğer yan etkilerin yanı sıra sinirlilik, DNA inhibisyonu, anksiyete ve titreme gibi mutasyon etkilerine yol açabilir. AB gıda güvenliği gözlem kurumunun ilk rehberinde günlük kafein limitinin en yüksek 400 mg olduğu belirtilmiştir (Zhang vd. 2011).



Şekil 1.2 Ksantin ve bazı N-metil türevlerinin üç boyutlu yapısı

XT, TP, TB ve CF genellikle çay ve çikolata ürünlerinin yanı sıra ilaç bileşimlerinde de bir arada bulunabilmektedirler. Bu pürin molekülleri aynı zamanda insan vücudundaki pürin metabolizma mekanizmasının ürünleridir (Nia vd. 2021). Ek olarak, N-demetilazın etkisi ile karaciğerde TP ve TB'den XT üretilebilir (Patel vd. 2020). Bu nedenle, bu biyomoleküllerin eş zamanlı tayini için güvenilir, düşük alt tayin sınırlarında (LOD),

yüksek duyarlılıkta ve hızlı bir analitik yöntem geliştirilmesi, ilaç, klinik teşhis ve gıda analizi alanlarını desteklemek için gereklidir.

Spektroskopi (Bedini vd. 2013), spektrofotometri (Xia vd. 2013), kromatografi (Yang vd. 2007) ve elektrokimya (Jesny ve Kumar 2017, Patel vd. 2020) yöntemleri, pürin moleküllerinin eşzamanlı belirlenmeleri için literatürde uygulanmaktadır. Yüksek doğruluk ve kesinliklerine rağmen, kromatografi yöntemi, nispeten pahalı ekipman, büyük miktarlarda atık üreten zehirli organik bileşiklerin (çözücüler) kullanımı, spektroskopi ve spektrofotometri yöntemlerinin ise girişim etkisi gibi dikkate alınması gereken bazı dezavantajları vardır. Elektrokimyasal sensörler kullanılarak eşzamanlı algılama ise yüksek doğruluk, seçicilik, tekrarlanabilirlik, düşük maliyet ve kolay çalışma özellikleri nedeniyle kalite kontrol testleri ve saha analizi için güçlü ve pratik bir teknik olarak ortaya çıkmaktadır (Jadon vd. 2016 ve Ferrag vd. 2020). Bu tür biyomoleküller için yapılacak elektrokimyasal eşzamanlı analiz, moleküler yapılarının birbirlerine yakın olması nedeniyle (Şekil 1.2) yükseltgenme piklerinin çakışma ihtimalini içermektedir.

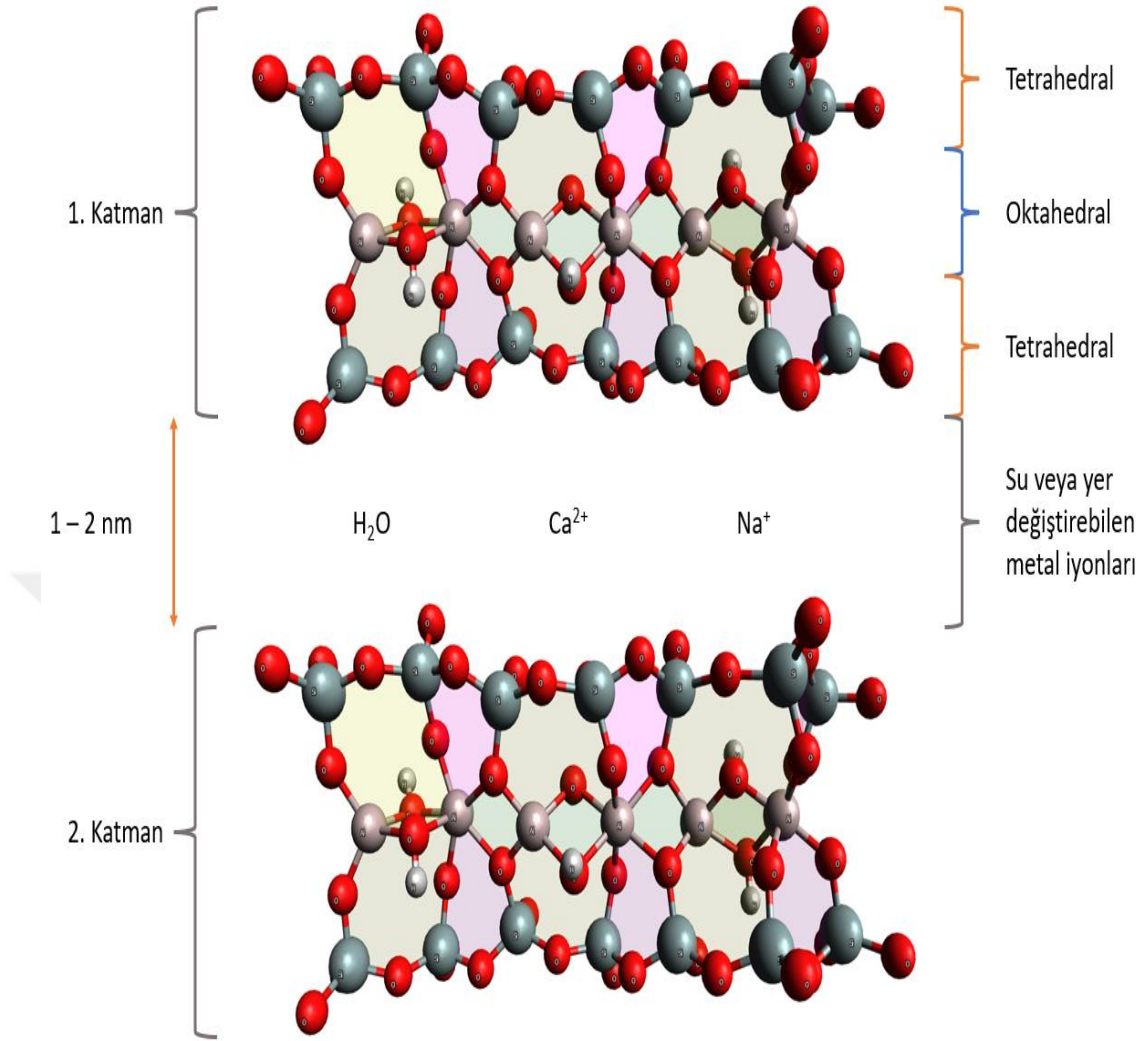
Camsı karbon (Fiorucci ve Cavalheiro 2002) ve karbon pasta elektrotları (Wu vd. 2020), bor katkılı elmas elektrotlar (Medeiros vd. 2010) ve ayrıca serigrafi elektrotlar (Zhang vd. 2019) elektrokimyasal sensör platformları olarak biyomoleküllerin elektrokimyasal olarak belirlenmelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalem grafit elektrotlar (KGE'ler), düşük maliyetleri, kullan-at özelliği ve kırtasiyelerde ticari olarak bulunabilmeleri nedeniyle benzersiz elektrokimyasal sensörlerdir (Kawde vd. 2016 ve Mahnashi vd. 2020). KGE'lerin, modifiyer kimyasalların elektrot yüzeyine tutturulması ve bu sayede fizikokimyasal özelliklerini bu yüzeye aktarılmasını içeren basit bir modifikasyon işlemi ile biyomolekül algılamaya karşı duyarlılığı artırılabilir (Jadon vd. 2016, Santos vd. 2009 ve Heydari vd. 2016).

Metal oksit nano-partikülleri (MO NP'ler) (George vd. 2018), iletken polimerler (Opallo ve Lesniewski 2011), doğal killer (Yadav vd. 2017) ve karbon bazlı malzemeler (Collony vd. 2012) gibi birçok tür elektrot yüzeylerinin modifikasyonu için literatürde kullanılmaktadır. MO NP'ler boyutları, kararlılıkları ve yüksek yüzey alanları nedeniyle

etkili elektriksel özellikler sergiler (George vd. 2018). Nikel oksit (NiO) nano-parçacıkları yüksek elektriksel iletkenliğe, belirgin bir elektro aktif yapıya ve oldukça etkili bir yüzey alanına sahiptir (Raeisi-Kheirabadi vd. 2021).

Çok duvarlı karbon nano-tüpler (MWCNT'ler), üstün termal, elektriksel, mekanik ve akım taşıma kapasitesi gibi ayrıcalıklı özelliklerinden dolayı elektrokimyasal sensörlerin yüzey modifikasyonunda önemli bir kullanıma sahiptir. Karbon nano-tüple modifiye edilmiş elektrotların ana avantajları, benzersiz uzunluk, etkili elektro-aktivite ve modifiye elektrotlara biyomoleküllerle etkileşime girmelerine izin veren yüzey alanı sağlar (Collony vd. 2012 ve Beitollahi vd. 2019).

Doğal kil, genel olarak içeriğinde kil mineralleri içeren doğal, taneli toprak türüdür. Kil mineralleri, parametre miktarlarda demir, magnezyum, alkali metaller, alkalın topraklar ve yer kabuğu yüzeyinde veya yakınında diğer katyonlarla birlikte bulunan sulu alüminyum fillosilikatlar olarak tanımlanabilirler. Killer genellikle etrafı su tabakası ile kaplandığında plastisite oluşturan maddeler olarak tanımlanırlar. Montmorillonit, nano katmanlı yapıya sahip fillosilikat bir kil mineralidir. Üst üste yığılmış katmanlardan oluşan katmanlı yapısında (yaklaşık 1 nm kalınlığında) her katman, iki O-Si-O tetrahedral levha arasında bir O-Al(Mg)-O oktahedral levhadan (genişlik ve uzunluk olarak yaklaşık 100 nm × 100 nm) oluşur. İzomorf süstitüsyon nedeniyle, katman pozitif olarak yüklenir ve daha sonra montmorillonitin bu ara katman boşluğuna katyonlar yerleşir. Komşu katmanlar, öncelikle van der Waals kuvvetleri ve elektrostatik kuvvetler tarafından bir arada tutulur. Bu komşu katmanlar arasına yerleşen katyonlara göre montmorillonitin farklı formları oluşturulabilir. Doğada doğal olarak bulunan Ca^{2+} -Montmorillonit, sulu bir süspansiyonda Na^+ ve Ca^{2+} iyonları arasındaki bir iyon değişim reaksiyonu ile Na^+ -Montmorillonite dönüştürülebilir (Zhou vd. 2019). Bir nano kil minerali olan Na-Montmorillonit (NNaM), yüksek kimyasal ve mekanik kararlılığa, iyi katmanlı bir yapıya, nispeten yüksek yüzey alanına, etkili iyon değişim kapasitesine ve mükemmel penetrasyona sahip umut verici bir nano malzemedir ve bu özellikleri nedeniyle MO NP'leri için mükemmel yüzey stabilizatörleridir (Yadav vd. 2017, Dongmo vd. 2021 ve Hoang ve Holze 2006). Şekil 1.3'te NNaM'ın kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.3 Montmorillonit kilinin üç boyutlu-katmanlı kimyasal yapısı

DNA, canlılarda kalıtsal bilgileri taşıması, canlı hücrelerde genetik bilginin kopyalanması ve transkripsiyon süreci ile protein ve enzimlerin sentezlerini gerçekleştirmesi gibi özellikleri ile tüm canlı yaşamı için kritik bir moleküldür (Sirajuddin vd. 2013). Küçük organik moleküllerin DNA'ya bağlanma mekanizmalarının araştırılması son yılların önemli konularından biridir (Erdem ve Özsoz 2002). Nükleik asitlerin elektro-aktif türler olduklarının keşfinden sonra günümüze kadar elektrokimyasal teknikler bu türlerin etkileşimlerini incelemek için kullanılmaktadır (Rauf vd. 2005). Ayrıca DNA'nın yapısal özelliklerinin anlaşılması gen mutasyonun incelenmesi, genetik hastalıkların kaynağının araştırılması, ilaçların DNA ile etkileşiminin incelenerek daha yeni ve daha etkili ilaçların tasarlanması için de önemlidir. Ek olarak, DNA toksisitesi için maruziyet süresi ve

sıklığına bağılı olarak besinler, ilaçlar ve endüstriyel maddeler DNA'ya toksik olarak etki etmekte mutasyonlara ve teratojen etkilere neden olabilmektedir. Bu tür maddelerin DNA'ya bağlanmaları sonucunda DNA yapısında ortaya çıkan değişiklikler 'toksisite' olarak düşünülebilir.

XT, TP, TB ve CF molekülleri insan diyetinde önemli rolleri olduğu, hatta biyolojik sistemlerde birbirlerine dönüşebildiği ve bu sistemlerde bazı görevler alabildiğini belirtilmiştir. Bunlara ek olarak bu moleküller hem gıda hem de ilaç sektöründe günümüzde sıklıkla kullanılan, insan vücudunda etkileşim halinde olan biyomoleküller oldukları ve birçok ilaçta ilaç-etken madde olarak kullanılmaları da düşünüldüğünde bu moleküllerin DNA ile etkileşimini incelemek ilgi çekici olacaktır. Yapılan literatür araştırmaları ile bu maddelerin DNA ile etkileşimlerinin özellikle elektrokimyasal olarak neredeyse hiç incelenmediği görülmektedir. TP ve CF'nin DNA ile etkileşimini UV-Spektroskopisi yöntemi ile inceleyen bir çalışma (Nafisi vd. 2008) ve buna ek olarak yine aynı yöntem ile TP, TB ve CF'nin DNA ile etkileşimini inceleyen bir çalışma bulunmaktadır (Johnson vd. 2012). Araştırmacılar XT, TP, TB ve CF gibi metil-ksantin türevlerinin elektrokimyasal olarak belirlenmeleri için sayısız çalışma yayınlamışlardır. Bu maddelerin hem tek başına (Dervisevic vd. 2015, Svorc vd. 2018) hem ikili (Jesny ve Kumar 2017) hem de üçlü (Nia vd. 2021 ve Patel vd. 2020) karışımları literatürde incelenmektedir. Bu çalışmalar nispeten pahalı ve uzun elektrot hazırlama prosesleri içeren elektrotlarla gerçekleştirilse de KGE gibi basit ve kullanışlı bir elektrotun kullanılmadığı görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, KGE yüzeyi, optimum miktarlarda NiO NP, MWCNT ve NNaM ile modifiye edilmiştir. Elektrokimyasal platform (NiO/MWCNT/NNaM/KGE) yüzeyi taramalı elektron mikroskobu (TEM) ve enerji-dağılımlı X-Işını spektroskopisi (EDX) teknikleri ile karakterize edilmiştir. Ayrıca, NiO/MWCNT/NNaM/KGE'nin elektrokimyasal performansını araştırmak için dönüşümlü voltametri (DV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EES) teknikleri uygulanmıştır. XT, TP ve TB'nin eşzamanlı analizi, Britton-Robinson (BR) tamponunda (pH: 2.0) geliştirilen yeni sensör ile diferansiyel puls voltametrisi (DPV) tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yeni sensör ve geliştirilen yöntem, siyah çay, çikolata ve insan idrarı örneklerinde tatmin

edici sonuçlarla geri kazanım çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Sensör, üç biyomolekölün tümüne karşı gelişmiş kararlılık, tekrarlanabilirlik, yüksek seçicilik ve hassasiyet göstermiştir. Ayrıca geliştirilen yeni sensör üzerinde XT, TP ve TB'nin DNA ile etkileşimleri DPV tekniği ile yine çözelti içinde etkileşim yöntemi ile incelenmiştir. Yükseltgenme potansiyeli TB ile çakışan CF molekülü için çıplak KGE kullanılarak iki farklı teknikle (DPV, KDV) iki analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bu analizler için destek elektrolit H_2SO_4 (pH: 1.0) kullanılmıştır. CF'nin DNA ile etkileşimi DPV ve KDV teknikleri ile incelenmiştir. Yapılan tüm bu çalışmaların detayları 3. ve 4. Bölümde verilmiştir.



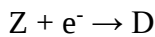
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Elektrokimyasal Yöntemler ve Sınıflandırılmaları

Elektrokimyasal yöntemler genel olarak maddelerin akım, potansiyel ve yük gibi bazı elektriksel niceliklerinin ölçümü ve bu niceliklerin kimyasal parametrelerle ilişkisi ile ilgilidir. Bu tarz yöntemlerde elektrokimyasal proses elektrot-çözelti ara yüzeyinde gerçekleşir (Wang 2000). Elektrokimyasal hücre olarak tanımlanan en az iki elektrot ve temas edeceği bir çözelti (elektrolit) içeren sistem ile ölçümler yapılır. İki elektrottan birisi analiti hedefleyen çalışma elektrotu, diğeri ise elektrolit çözeltisinin özelliklerinden etkilenmeden sabit potansiyel veren karşıt elektrottur. Karşıt elektrotun sabit potansiyel üretemediği durumlarda ise sisteme onun yerine iki elektrot eklenir ve toplamda üçlü elektrot sistemi kullanılır. Karşıt elektrotun yerine referans elektrot (elektrolit çözeltisinden etkilenmeden sabit potansiyel oluşturan elektrot) ve yardımcı elektrot (elektrokimyasal hücre devresini tamamlayan elektrot) eklenir (Harvey 2011 ve Lasia 2014).

Elektrokimyasal yöntemleri birbirlerinden ayıran nokta, ölçüm için kullanılan elektriksel sinyalin türüdür. Elektrokimyasal teknikler, uygulanan elektriksel sinyalin türüne göre ‘Potansiyometrik’ ve ‘Potansiyostatik’ olarak iki ana başlık altında toplanırlar. Potansiyometrik yöntemler (statik yöntemler) sıfır akım şartlarında potansiyelin ölçülmesi esasına dayanırken, Potansiyostatik yöntemler (dinamik yöntemler) uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımı ölçmektedirler (Wang 2000). Bu tez çalışmasında dinamik teknikler detaylı olarak incelenecektir.

Dinamik elektrokimyasal deneylerin amacı hedef analitin derişimi ile ilişkili bir akım yanıtı elde etmektir. Bunun için analitin redoks reaksiyonu sırasındaki elektron aktarımı incelenir;



Burada Z ve D sırasıyla analitin yükseltgenmiş ve indirgenmiş formunu göstermektedir. Bu reaksiyon, elektron transferinin termodinamik veya kinetik olarak tercih edildiği bir

potansiyel aralığında gerçekleşir. Termodinamik yasaları ile kontrol edilen bu tarz bir reaksiyon için, Nernst Eşitliğine göre elektrot potansiyeli elektrot yüzeyindeki elektro-aktif türün derişimini tahmin etmek için kullanılabilir;

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \log \frac{[C_D]}{[C_Z]} \quad 2.1$$

Burada R ideal gaz sabitini (8.314 J/K.mol), T sıcaklığı (Kelvin, K) ve F faraday sabitini (96485 Coulomb), E hücrenin potansiyelini, E^0 ilgili reaksiyonun standart indirgenme potansiyelini, C_D indirgenmiş formun derişimini ve C_Z yükseltgenmiş formun derişimini göstermektedir.

Dinamik tekniklerde elektrokimyasal türün yükseltgenme/indirgenme derecesindeki değişimden kaynaklı oluşan akım, ‘faradayik akım’ olarak adlandırılır. Ölçülen bu faradayik akım redoks reaksiyonunun hızının direkt bir ölçüsüdür (Harvey 2011). Ortaya çıkan akım-potansiyel eğrisi (voltamogram) akıma karşı geçiş potansiyelinin sergilenmesinden ibarettir. Voltamogramın şekli elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal mekanizmalar tarafından belirlenir. Toplam akım değeri ise analit ve çözeltinin faradayik akımları ile faradayik olmayan arka plan akımlarının toplamını içermektedir (Wang 2000).

Elektrokimyasal teknikleri anlamak için aşağıda sıralanan beş temel yaklaşımın anlaşılması çok önemlidir;

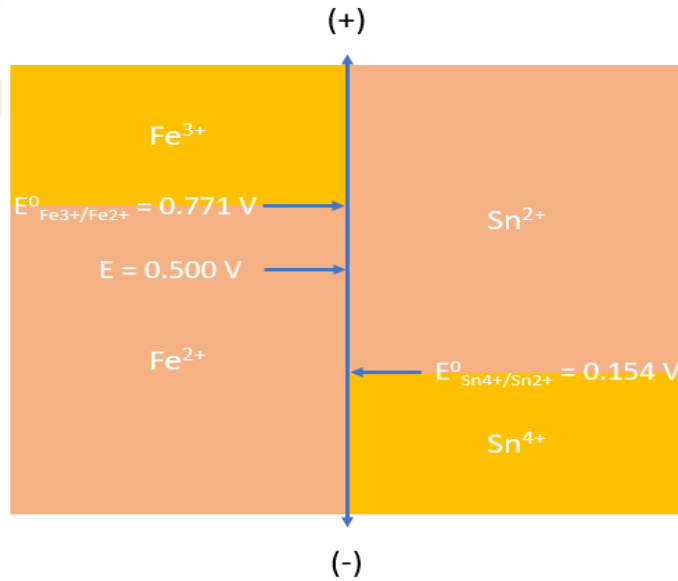
- i. Elektrot potansiyeli elektrot yüzeyinde bulunan analitin formunu belirler,
- ii. Analitin elektrot yüzeyindeki derişimi ile çözeltideki derişimi aynı olmayabilir,
- iii. Yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarına ek olarak analit bazı diğer reaksiyonlara katılabilir,
- iv. Akım analitin yükseltgenme/indirgenme hızının direkt bir ölçüsüdür,
- v. Akım ve potansiyel aynı anda kontrol edilemez.

Denge reaksiyonlarının yönünü çözelti şartlarının belirlediği bilinmektedir (Le Chatelier İlkesi). Elektrokimyasal bir reaksiyonda ise potansiyel, bu reaksiyonun yönünü ve

dolayısıyla analitin formunu belirlemektedir. Şekil 2.1’de gösterilen elektrokimyasal sistem düşünülecek olursa, bu sisteme 0,5 V potansiyel uygulandığında Fe^{3+} iyonu Fe^{2+} iyonuna indirgenecek ve Sn^{4+} iyonu ise herhangi bir değişime uğramayacaktır. $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redoks çiftinin potansiyeli için elektrokimyasal yöntemlerin temel eşitliği olan Nernst Eşitliği aşağıdaki gibi gösterilir;

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \log \frac{[\text{Fe}^{2+}]}{[\text{Fe}^{3+}]} = E^0 - \frac{0.0592}{1} \log \frac{[\text{Fe}^{2+}]}{[\text{Fe}^{3+}]} \quad 2.2$$

Burada; E elektrot potansiyelini, E^0 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ için standart indirgenme potansiyelini ve n aktarılan elektron sayısını (bu reaksiyon için n: 1) göstermektedir. Uygulanan potansiyelin analitin elektrot yüzeyindeki formunu belirlediğini bildiğimize göre, yukarıdaki eşitlikte bulunan derişim değerlerinin elektrot yüzeyindeki derişimleri gösterdiği önemlidir (Lefrou vd. 2012).

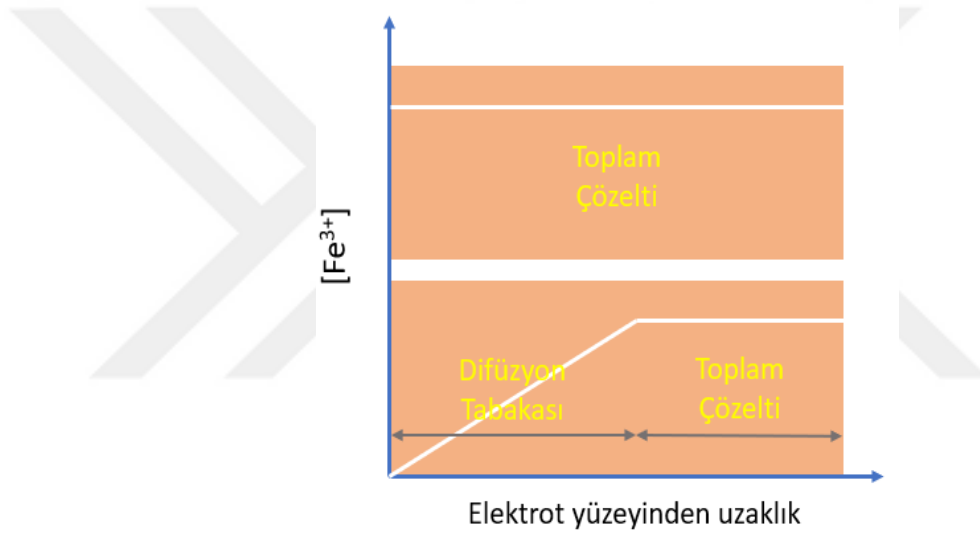


Şekil 2.1 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ve $\text{Sn}^{4+}/\text{Sn}^{2+}$ redoks çiftleri için potansiyel şeması

Şekil 2.1’de sisteme 1,00 V potansiyel uygulanırsa Fe^{3+} iyonunun (bu potansiyelde kararludur) derişimi çözeltinin her yerinde değişmeden kalır. Fakat 0,50 V potansiyel uygulanırsa elektrot yüzeyindeki Fe^{3+} iyonunun derişimi neredeyse sıfır olacak kadar azalır. Fakat elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça Fe^{3+} iyonunun derişimi belli uzaklığa kadar

artacak ve bu aşamadan sonra çözelti derişimi ile eşit olacaktır (Şekil 2.2). Elektrot yüzeyindeki derişimin çözelti derişimine eşit olana kadar arttığı bu mesafeye ise ‘difüzyon tabakası’ adı verilir.

Şekil 2.2’de elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak Fe^{3+} iyonunun derişimini gösterilmektedir. Nernst eşitliğinin kontrol ettiği $\text{Fe}^{3+/2+}$ indirgenmesi sistemdeki tek reaksiyon olmayabilir. Fe^{3+} iyonunun elektrot yüzeyine adsorpsiyonu ve/veya ortamda oluşabilecek metal-ligand kompleksleri de bu iyonun derişimini etkileyebilir.



Şekil 2.2 Elektrottan uzaklığın bir fonksiyonu olarak Fe^{3+} derişiminin değişimi

$\text{Fe}^{3+/2+}$ indirgenmesi düşünüldüğünde sistem bir elektron tüketir ve bu elektron elektrot tarafından alınır. Sistemdeki başka bir türün (örneğin çözücünün) yükseltgenmesi ise bu tüketilen elektronun kaynağıdır. Bu elektron transferi elektrotlar arasında ölçülebilir bir akım oluşturur ve bu akım indirgenme reaksiyonunun hızı için direkt bir ölçüdür. Sistem denge haline ulaştığında ise akımın sıfır olduğu unutulmamalıdır (Lefrou vd. 2012).

$\text{Fe}^{3+/2+}$ redoks çiftinin dengede olduğu bir sistemde akım sıfırdır ve potansiyel ise Nernst eşitliğindeki gibi verilir. Potansiyeli sistemin denge potansiyeli değerinden farklı bir şekilde uygularsak bu sistem yeni denge konumuna doğru ilerler. Başlangıçta akım fazla

olsa da zaman geçtikçe sifıra doğru yaklaşır. Böylece akım uygulanan potansiyele göre değişir. Diğer taraftan, sistemden $\text{Fe}^{3+/2+}$ indirgenmesini zorlayan kontrollü bir akım geçirilirse, bu potansiyel Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonlarının derişimine göre Eşitlik 2.1'deki gibi zamanla değişir. Sonuç olarak, elektrokimyasal çalışmalarda eğer potansiyel kontrol edilmek isteniyorsa ortaya çıkan akım, akım kontrol edilmek isteniyorsa ortaya çıkan potansiyel değerlendirilir (Harvey 2011).

Akım ve potansiyeli aynı anda kontrol edilemediğinden dolayı elektrokimyasal yöntemlerde üç çeşit temel ölçüm yapılabilir;

- a. Akım sıfırken potansiyel ölçülebilir,
- b. Akım kontrol edilirken potansiyel ölçülebilir,
- c. Potansiyel kontrol edilirken akım ölçülebilir.

Tüm bu deney tasarımları Ohm Yasasına uyan tasarımlardır. Ohm yasası ise bir elektrik direnç devresinden geçen akımın potansiyel oluşturduğunu açıklar;

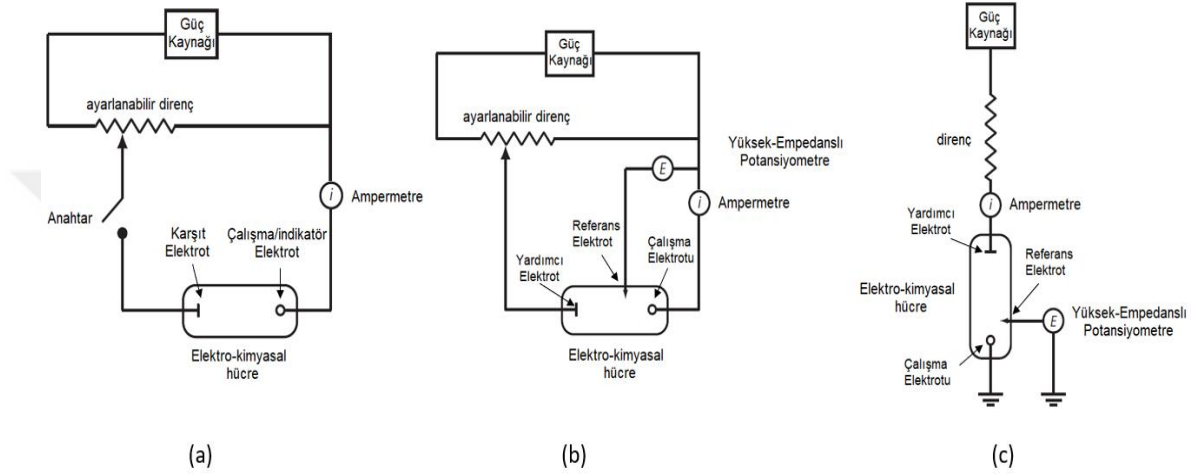
$$E = i \times R$$

2.3

Burada E potansiyeli, i akımı ve R direnci göstermektedir (Skoog vd. 2014 ve Wang 2000).

Yukarıda bahsedilen bu deneysel tasarımların tümü farklı tipte cihazlar kullanırlar. Günümüzde kullandığımız modern cihazlar, akım veya potansiyeli kontrol edebilmek için otomatik, bilgisayar destekli elektronik cihazlardır. Sıfır akım şartlarında bir elektrokimyasal hücrenin potansiyelini ölçmek için kullanılan cihazlara 'potansiyometre' adı verilir. Bu cihazlar temel olarak bir güç kaynağı, bir çalışma elektrotu ve bir karşıt elektrot içeren bir elektrokimyasal hücre, akımı ölçmek için bir ampermetre, ayarlanabilir kayar telli bir direnç ve elektrokimyasal devreyi kapatmak için bir kademe anahtarı içerir (Şekil 2.3a). Potansiyeli kontrol etmemize yarayan cihazlara ise 'potansiyostat' adı verilir. Bu cihazlar temel olarak bir güç kaynağı, bir referans elektrot, bir çalışma elektrotu, bir yardımcı elektrot içeren bir elektrokimyasal hücre, hücreden geçen akımı

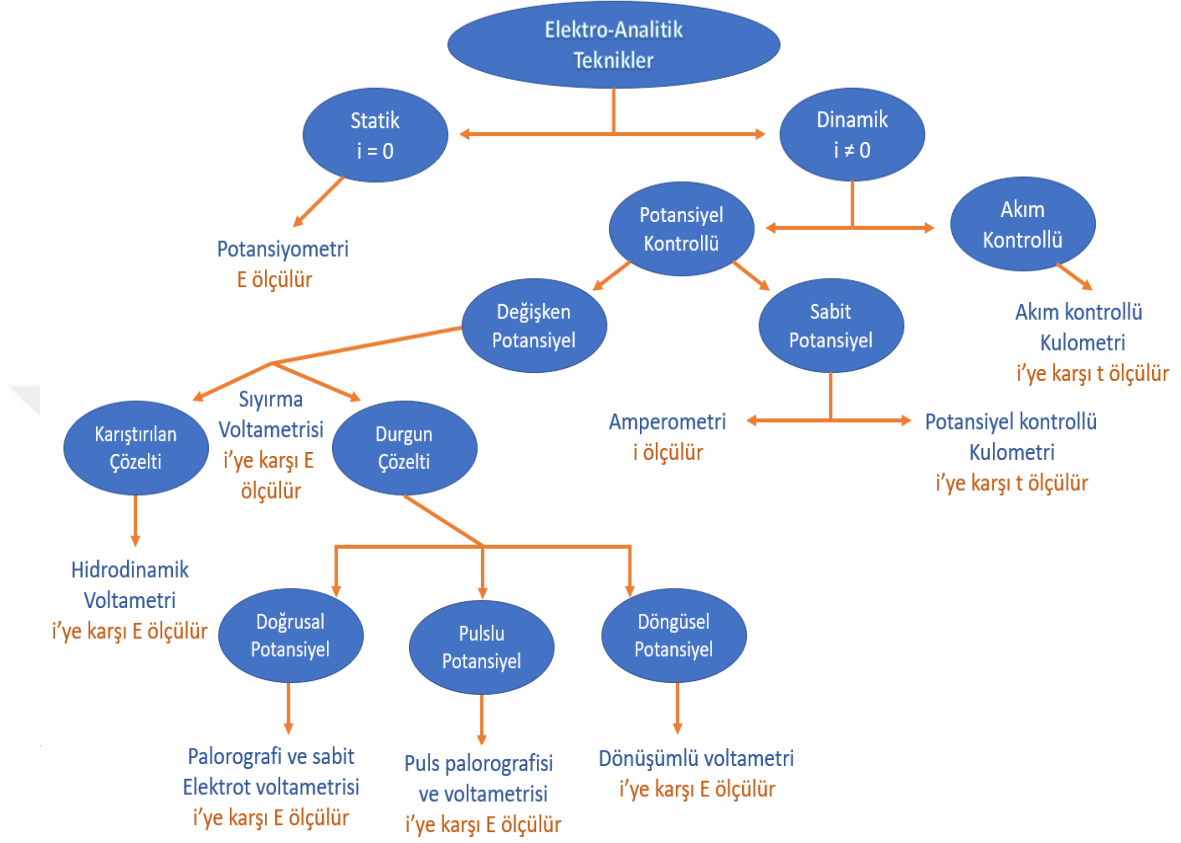
ölçmek için bir ampermetre, ayarlanabilir kayar telli bir direnç ve elektrokimyasal hücreden geçen devreyi kapatmak için bir kademe anahtarı içerir (Şekil 2.3b). Akımı kontrol etmemizi sağlayan cihazlara ise ‘galvanostat’ adı verilmektedir. Bu cihazlar temel olarak bir güç kaynağı, bir referans elektrot, bir yardımcı elektrot ve bir çalışma elektrotu içeren bir elektro-kimyasal hücre, yüksek empedanslı bir potansiyometre, akımı ölçmek için bir ampermetre ve bir direnç elemanından oluşur (Şekil 2.3c).



Şekil 2.3 Elektrokimyasal ölçümler için temel cihaz tasarımları; (a) potansiyometre, (b) potansiyostat ve (c) galvanostat

Potansiyometri sıfır akım şartlarında çalışan önemli bir yöntemdir. Bu yöntemde örnek hakkında elde edilen bilgi membran boyunca uygulanan potansiyelden elde edilir. İyon-algılama membranları için birçok farklı membran materyalleri üretilmiş ve iyonik türlerin direkt ölçümleri için kullanılmaktadır. Potansiyometrinin aksine potansiyostatik yöntemlerde (potansiyel veya akım kontrollü) ise elektrot-çözelti ara yüzeyindeki yük-transfer prosesi dinamik (akım sıfırdan farklı) olarak incelenir. Burada kontrol edilen potansiyel, elektron-transfer reaksiyonunu başlatmak için kullanılır ve sonuçta açığa çıkan akım ölçülür (Harvey 2011). Böyle düşünüldüğünde dinamik tekniklerde kontrollü-potansiyel, spektroskopik yöntemlerdeki maksimum absorban veren dalga boyu (λ_{max}) terimi gibi düşünülebilir. Spektroskopik yöntemlerde dalga boyu molekülü absorban veya ışığa yapmaya teşvik ederken, dinamik elektrokimyasal yöntemlerde ise potansiyel molekülün elektron alması (indirgenme) veya vermesine (yükseltgenme) teşvik eder. Bu

reaksiyonun elektron geçişi ise akıma karşı potansiyel grafiği ile gözlemlenir (Wang 2000).

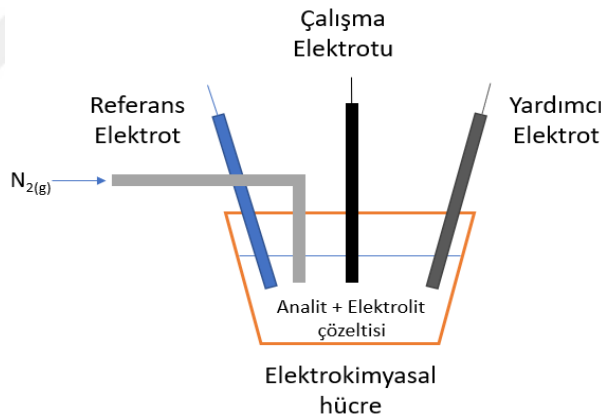


şekil 2.4 Elektroanalitik yöntemlerin şematik sınıflandırılması (Yılmaz 2012)

Elektrokimyasal tekniklerin basitçe sınıflandırılmaları şekil 2.4'te gösterilmektedir. Burada teknikler sınıflandırılırken ölçülen elektrokimyasal parametreler de belirtilmiştir. İlk olarak bu teknikler sistemden akım geçip geçmediğine göre iki gruba ayrılmışlardır. Statik tekniklerde akımın analit çözeltisinden geçmesine izin verilmezken, dinamik tekniklerde akım analit çözeltisinden geçer. Potansiyometrik yöntem sıfır akım şartlarının olduğu ve sistemin potansiyelinin ölçümüne dayanan statik bir yöntemdir ve kantitatif birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Dinamik yöntemler ise akımın analit çözeltisinden geçirildiği en geniş ara-yüzey elektrokimyasal teknikleri içerir. Kulometri tekniğinde akım zamanın bir fonksiyonu olarak ölçülürken, amperometri ve voltametri tekniklerinde ise akım sabit veya parametre potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülür (Harvey 2011). Bu tez çalışmasında voltametrik teknikler üzerinde durulacaktır.

2.2 Voltametrik Teknikler

Voltametrik tekniklerde elektrokimyasal hücreye zamana bağlı bir potansiyel taraması uygulanarak akım bu potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmektedir. Uygulanan potansiyele karşı akımın grafiğe geçirildiği bu eğrilere ‘voltamogram’ adı verilir ve bu spektroskopide oluşturulan spektrumun elektrokimyasal karşılığı olarak düşünülebilir. Voltamogramlar yükseltgenen ve/veya indirgenen türler için kalitatif ve kantitatif veriler sağlarlar. Çalışmalar elektrokimyasal hücrelerde gerçekleştirilir. Günümüzde üretilen modern cihazlar genellikle üçlü elektrot sistemi kullanmaktadırlar. Voltametrde çalışma elektrotuna zamana bağlı, uyarma sinyali niteliğinde potansiyel uygulanırken, bu potansiyel referans elektrotun sabit potansiyeli ile ilişkili olarak değiştirilir ve yardımcı elektrot ile çalışma elektrotu arasında akan akım ölçülür (Şekil 2.5). Yardımcı elektrot olarak sıklıkla platin tel, referans elektrot olarak da standart kalomel elektrot veya Ag/AgCl elektrotu kullanılır (Skoog vd. 2014).



Şekil 2.5 Voltametrik tekniklerde kullanılan üçlü elektrot sisteminin şeması

Cıva, platin, altın, gümüş ve karbon temelli birçok farklı materyal ile çalışma elektrotları hazırlanabilmektedir. Cıva sıvı olduğundan dolayı bu elektrot bir kapiler tüp olarak düşünülebilir. Voltametrinin ilk çalışma elektrotu olan cıvanın birçok farklı formu oluşturulmuştur. Bunlar arasında asılı cıva damla elektrot, düşen cıva elektrotu, statik cıva damla elektrotu ve cıva film elektrotu (katı elektrot) bulunur. Asılı cıva elektrot kullanan tekniklere ‘palorografi’ adı verilir. Fakat cıva temelli elektrotlar ile analitin sadece

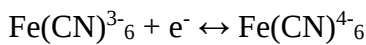
indirgenme reaksiyonları incelenebilmektedir. Bu eksiği kapatmak için son yıllarda katı elektrotlar geliştirilmiştir. Katı elektrotlar platin, altın, gümüş ve karbon temelli elektrotlardır. Günümüzde bu tarz katı elektrotların modifiyer maddeler ile kaplanması sonucu yüzey alanı arttırılarak daha iyi ölçümler ortaya çıkması sağlanmaktadır.

2.2.1 Voltametrik akım

Voltametrik tekniklerin aslında en büyük avantajı tam polarizasyon şartlarında çalışmasıdır. Potansiyometrik tekniklerde potansiyel, türlerin derişimlerini belirlemede kullanılır. Belli bir derişim değerinden sonra potansiyel artık derişimin artması ile daha az artmaya başlar ve hatta sabit kalmaya başlar. Aynı şekilde spektroskopik tekniklerde de absorbans derişim arttırıldıkça belli bir derişim noktasından sonra daha az artmaya ve hatta sabit kalmaya başlar. Bu bahsedilen noktalar polarizasyon durumlarını temsil etmektedir. Voltametrde ise dışarıdan uygulanan potansiyel, ölçüm şartlarını tam polarizasyon noktasına getirmekte ve ölçülen akım değeri direkt analit ile değışim göstermektedir (Yılmaz 2012).

Voltametrik tekniklerde analit çalışma elektrotunda yükseltgendiğinde ortaya çıkan elektronlar potansiyostat üzerinden yardımcı elektrota geçerek burada çözücüyü veya başka bir bileşeni indirgemektedir. Eğer çalışma elektrotu üzerinde indirgenme gerçekleşirse akım yardımcı elektrottan katoda yani çalışma elektrotuna doğru akar. Her iki durumda da ortaya çıkan akım, faradayik akım olarak adlandırılır. İlgili reaksiyon çalışma elektrotu üzerinde gerçekleştiğinden dolayı, bu reaksiyon indirgenme ise katodik akım, yükseltgenme ise anodik akım olarak adlandırılır (Harvey 2011). Bu çalışmada katodik akımın işareti (-), anodik akımın işareti de (+) olarak gösterilecektir.

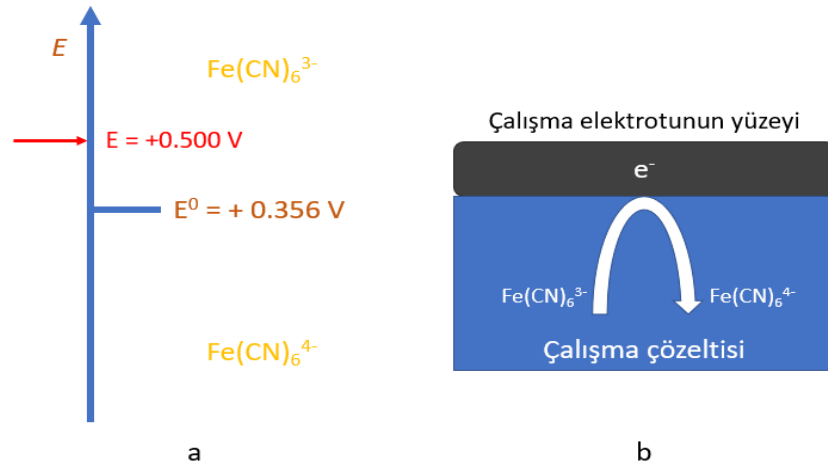
Elektrokimyada standart olarak kullanılan $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu üzerinden voltametrik akım anlatılabilir;



Bu reaksiyona göre Nernst eşitliği yazılarak türlerin derişimleri ile potansiyel arasındaki ilişki aşağıdaki şekilde gösterilir;

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \log \frac{[\text{Fe(CN)}_6^{4-}]}{[\text{Fe(CN)}_6^{3-}]} = +0.356 - \frac{0.0592}{1} \log \frac{[\text{Fe(CN)}_6^{4-}]}{[\text{Fe(CN)}_6^{3-}]} \quad 2.4$$

Başlangıçta 0,10 mM Fe(CN)_6^{3-} ile reaksiyon başladığını varsayar ve çalışma elektrotuna + 0,50 V potansiyel uygulanırsa, elektrot yüzeyinde ki türlerin derişimlerinde herhangi bir değişim olmayacaktır. Bunun nedeni bu redoks reaksiyonun uygulanan potansiyelde gerçekleşmemesi ve bunun sonucunda faradayik akımın oluşmamasıdır (Şekil 2.6a). Uygulanan potansiyel + 0,356 V değerine değiştirilirse elektrot yüzeyindeki Fe(CN)_6^{3-} , Fe(CN)_6^{4-} 'ya indirgenecektir. Bu durum elektrot yüzeyinde denge kurulana kadar ($[\text{Fe(CN)}_6^{3-}] = [\text{Fe(CN)}_6^{4-}] = 0,05 \text{ mM}$) devam edecek, bu sırada faradayik akım oluşacak ve dengeye ulaştığında akım hızlıca sıfır değerine gelecektir. Elektrot yüzeyinde iki türün derişimi 0,05 mM olmasına rağmen çalışma çözeltisindeki derişim değerleri değişmeyecektir. Derişimler arasındaki bu farktan dolayı, çalışma çözeltisi ve elektrot yüzeyi arasında bir derişim farkı ortaya çıkar. Oluşan bu fark sayesinde $[\text{Fe(CN)}_6]^{4-}$ elektrot yüzeyinden uzaklaşırken, $[\text{Fe(CN)}_6]^{3-}$ elektrot yüzeyine yaklaşır (Şekil 2.6b).



Şekil 2.6 $[\text{Fe(CN)}_6]^{3-/4-}$ redoks probunun (a) yarı-reaksiyon diyagramı ve (b) indirgenme sırasında elektrot yüzeyindeki hareketi

Hücre ortamında bu şekilde gerçekleşen redoks reaksiyonu iki türün elektrot yüzeyinde ve çalışma çözeltisindeki derişimi eşit olana kadar devam ederken, faradayik akım oluşturur. Çalışma elektrotunun potansiyeli ortaya çıkan faradayik akım ile belirlense de akımın büyüklüğü oluşan yükseltgenme/indirgenme reaksiyonunun hızı ile belirlenir. Elektrokimyasal reaksiyonun hızını iki faktör etkilemektedir; birincisi yukarıda bahsedilen kütle transferi ve ikincisi çalışma çözeltisinde elektrot ve redoks türleri arasında aktarılan elektronların hızıdır (Lefrou vd. 2012 ve Harvey 2011).

Elektrokimyasal hücre içinde redoks türlerinin elektrot yüzeyine hareketini etkileyen üç çeşit kütle transferi vardır; difüzyon, göç ve konveksiyon. Difüzyon, elektrot yüzeyinde ve çalışma çözeltisinde ilgili türün derişimleri arasında fark olduğunda oluşur. Difüzyonun gerçekleştiği çözelti ve elektrot yüzeyi arasındaki bölgeye ‘difüzyon tabakası’ adı verilir. Konveksiyon ise çözelti mekanik olarak karıştırıldığında ortaya çıkar. Böylece ürün elektrot yüzeyinden uzaklaşırken reaktant elektrot yüzeyine doğru hareket eder. Göç ise çözeltideki yüklü bir parçacığın yüklü elektrot yüzeyi tarafından çekilmesi ve/veya itilmesi ile oluşur.

Voltametrde akımı etkileyen bir faktör de kütle transferinin hızıdır. Ayrıca elektronların elektrot yüzeyindeki türler ile elektrot arasındaki hareketi de akımı etkiler. Elektron transfer kinetiği hızlı olduğunda redoks reaksiyonu dengededir. Bu durumda redoks reaksiyonu elektrokimyasal olarak tersinirdir. Elektron transfer kinetiği belirgin şekilde yavaş olduğunda, reaktant ve ürünlerin elektrot yüzeyindeki derişimi ve faradayik akımın büyüklüğü Nernst eşitliği ile tahmin edilemez. Bu durumda redoks reaksiyonu elektrokimyasal olarak tersinmezdir (Harvey 2011 ve Lefrou vd. 2012).

Bu tez çalışmasında modifiye edilen elektrotların performansını değerlendirmek ve çalışılacak maddelerin redoks mekanizmasını değerlendirmek için dönüşümlü voltametri (DV) tekniği, çalışılacak maddelerin analizini gerçekleştirmek için de diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve kare dalga voltametrisi (KDV) teknikleri ile çalışılmıştır. Ayrıca üretilen elektrotların yük aktarım direncini incelemek için ise elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EES) kullanılmıştır. Aşağıda bu tekniklerin teorileri ayrıntılı olarak incelenecektir.

2.2.2 Dönüşümlü voltametri

DV tekniği, elektrokimyasal reaksiyonlar için en çok kullanılan ve analit ile ilgili kalitatif veriler sağlayan tekniktir. Bu veriler; redoks prosesinin termodinamik verileri, elektron-transfer reaksiyonlarının kinetiği ve adsorpsiyon özellikleridir. DV tekniği elektrokimyasal çalışmalarda analitin incelenmesi için genellikle ilk kullanılan tekniktir (Wang 2000). Bunun nedenleri; maddelerin redoks potansiyellerinin belirlenmesi, elektrot yüzeyinde tersinir/tersinmez redoks reaksiyonu verip vermediğinin incelenmesi, daha sonra yapılacak tarama hızı (v) çalışmaları ile ilgili maddenin elektrot yüzeyindeki reaksiyonunun adsorpsiyon/difüzyon kontrollü olup olmadığının kontrol edilebilmesidir. Ayrıca modifiye edilen elektrotların elektro-aktif yüzey alanlarının (A) hesaplanmasında da yine DV tekniği kullanılmaktadır.

DV tekniği, çalışma elektrotuna zamana bağlı üçgen dalga formunda uygulanan doğrusal potansiyel taramasından ibarettir (Şekil 2.7a). Potansiyel taraması sırasında potansiyostat, uygulanan potansiyel sonucu ortaya çıkan akımı ölçer. Ölçülen akıma karşı potansiyelin gösterildiği grafiğe ‘dönüşümlü voltamogram’ adı verilir (Kissinger ve Heineman 1983).

Tersinir bir elektro-kimyasal reaksiyon için pik akımı (25°C) Randles-Sevcik Eşitliği ile verilir;

$$i = (2.687 \times 10^5) \times n^{3/2} \times D^{1/2} \times v^{1/2} \times A \times C \quad 2.4$$

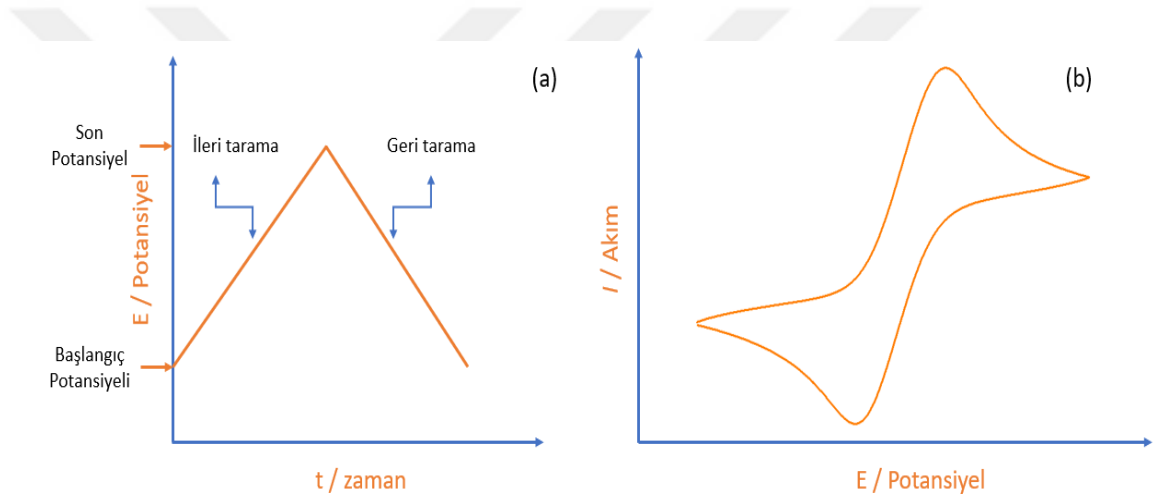
Burada i anodik (i_{pa}) veya katodik (i_{pk}) pik akımını, n aktarılan elektron sayısını, A elektrotun yüzey alanını (cm^2), C ilgili türün derişimini (mol/cm^3), D difüzyon katsayısını (cm^2/s) ve v tarama hızını (V/s) göstermektedir. Eşitlikten görüleceği üzere akım, derişim ile direk orantılı ve tarama hızının kare kökü arttıkça artmaktadır. İleri (anot) ve geri (katot) reaksiyonların pik akımları oranı redoks prosesi sırasında oluşan kimyasal reaksiyonlardan güçlü şekilde etkilenir. Tersinir sistemlerde piklerin pozisyonu sistemin standart potansiyeline bağlıdır, anodik ve katodik pik potansiyellerinin ortalamasına eşittir;

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pk}}{2} \quad 2.5$$

Tersinir sistemde pik potansiyellerinin birbirinden farkı aşağıdaki şekilde verilir ve aktarılan elektron sayısını (n) hesaplamak için kullanılabilir;

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pk} = 0,059 \text{ V/n} \quad 2.6$$

Bu eşitlikten hızlı bir tek elektronluk transferin 59 mV ΔE_p değerine sahip olması gerektiği görülebilir (Skoog vd. 2014).



Şekil 2.7 Dönüşümlü voltametrde (a) zamana karşı potansiyelin değişimi ve (b) tersinir bir redoks reaksiyonu için beklenen tipik bir dönüşümlü voltamogram

Tersinmez bir proses için pik akımı da yine Randles-Sevcik eşitliği (Eşitlik 2.4) verilir. Bu durumda akım analite göre anodik veya katodik olabilir. Fakat tersinmez sistemlerde pikler boyut açısından tersinir sistemlere göre daha küçük ve birbirinden iyice ayrılmışlardır. Bu sistemlerde sistem potansiyeli ve tarama hızı birbiri ile ilişkilidir ve aşağıda gösterilen Laviron Eşitliği ile verilir;

$$E_p = E^0 + \left(\frac{2,303RT}{\alpha nF} \right) \log \left(\frac{RTk^0}{\alpha nF} \right) + \left(\frac{2,303RT}{\alpha nF} \right) \log v \quad 2.7$$

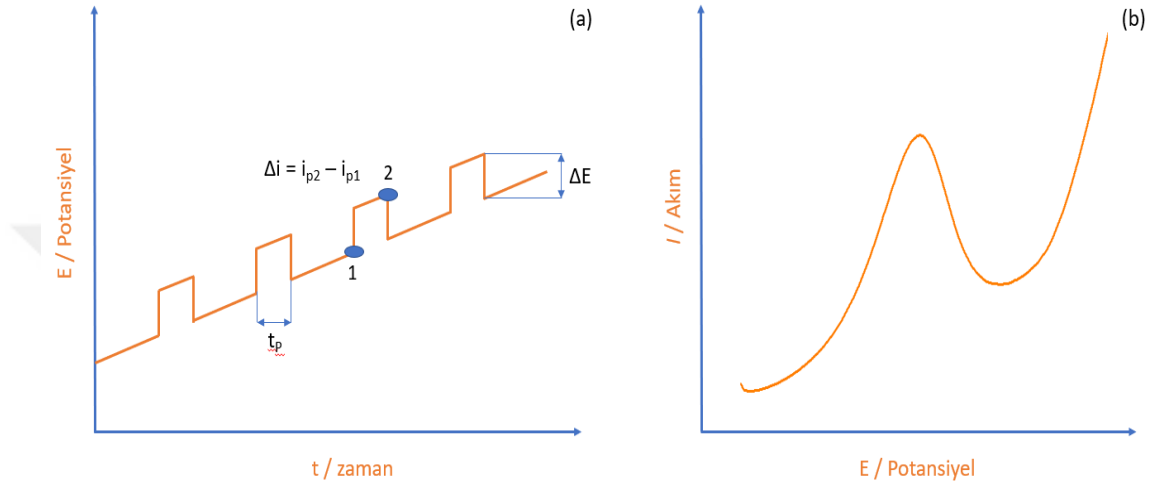
Burada E anodik (E_{pa}) veya katodik (E_{pk}) pik potansiyelini, E^0 standart elektrot potansiyelini, R gaz sabitini (8.314 J/mol.K), T sıcaklığı (Kelvin, K), k^0 standart heterojen hız sabitini, F faraday sabitini, v tarama hızını, α elektron transfer katsayısını ve n aktarılan elektron sayısını göstermektedir. Tersinmez sistemler için α : 0.5 kabul edilerek $E_p - \log v$ grafiğinin eğimi yardımı ile herhangi bir türün elektrot yüzeyinde aktarılan elektron sayısı hesaplanabilir (Patel vd. 2020).

Eşitlik 2.4 kullanılarak, akımın tarama hızı ile değişimi literatürde $\log i - \log v$ ve $i - v^{1/2}$ grafikleri ile incelenerek, elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal prosesin karakteristikleri belirlenebilir. $\log i - \log v$ doğrusal grafiğinin eğimi 0.5 civarlarında ise elektrot yüzeyindeki proses difüzyon kontrollü, eğim 1 civarlarında ise adsorpsiyon kontrollü olarak değerlendirilir (Anvari vd. 2021). Ayrıca $i - v^{1/2}$ eğrisinin doğrusal olması da prosesin difüzyon kontrollü olduğunu belirtmektedir. Bunlara ek olarak pik potansiyelleri ve tarama hızı arasındaki ilişki Eşitlik 2.7 ile çizilen $E_p - \log v$ grafiği birlikte incelenerek elektrot yüzeyinde aktarılan elektron sayısı hesaplanabilir. Bu değer elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks tepkimesinin mekanizmasının belirlenmesi için de önemlidir.

2.2.3 Diferansiyel puls voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisi (DPV) tekniği organik, inorganik ve biyomoleküllerin iz seviyelerinde analizi için çok uygun bir tekniktir (Gupta vd. 2011). Bu teknikte, doğrusal potansiyel taramanın üzerinde sabit büyüklükte üst üste bindirilmiş pulslar çalışma elektrotuna uygulanır. Akım iki kere ölçülür; pulsdan hemen önce (t_1) ve puls ömründen hemen sonra (t_2) (yaklaşık 40 ms sonra) (Şekil 2.8a). Ölçülen ilk akım ikinci akımdan çıkarılarak ortaya çıkan akım uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilir (Şekil 2.8b). Bu grafiğe ‘diferansiyel puls voltamogramı’ denir ve akım piklerinden oluşur. Bu akım piklerinin yüksekliği direkt analitin derişimi ile orantılıdır. Diferansiyel puls ölçümleri pulstan önce ve sonra okunan akımların farkını alarak voltamograma işlediği için arka plan akımının çok etkili bir doğrulamasını verir. Ayrıca DPV ile elde edilen pik potansiyelleri (E_p) ilgili türleri tanımak için kullanılabilir. DPV’nin pik şeklinde gösterdiği yükseltgenme-indirgenme yanıtları, redoks potansiyelleri birbirlerine yakın olan türlerin eşzamanlı analizi için çok kullanışlıdır (Laborda vd. 2014).

DPV tekniğinde puls büyüklüğü ve potansiyel tarama hızı değerlerinin seçimi, duyarlılık, hız ve ayırma arasında bir seçim yapılarak gerçekleştirilir. Örneğin büyük puls değerleri seçimi daha büyük ve geniş pikler ortaya çıkarır. 25 – 50 mV puls büyüklüğü ve 5 mV/s potansiyel tarama hızı genellikle uygulanır. DPV tekniği ile 10^{-8} M örneklerde ölçüm alınabilmektedir (Skoog vd. 2014).



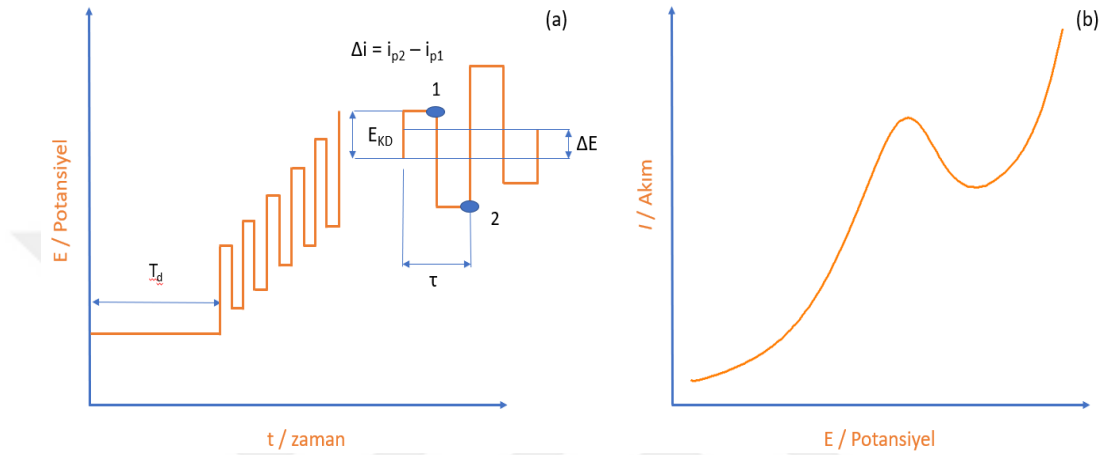
Şekil 2.8 DPV tekniği için (a) geçiş sinyalinin ölçümü (ΔE ; puls büyüklüğü, t_p ; puls süresi) ve (b) örnek DP voltamogramı

2.2.4 Kare dalga voltametrisi

Kare dalga voltametrisi (KDV) simetrik bir kare dalga formundan oluşan, bir merdiven gibi üst üste bindirilmiş potansiyel adımlarını içeren ve bu potansiyeli çalışma elektrotuna uygulayan bir tekniktir (Gupta vd. 2011). KDV tekniğinde akım her kare dalga döngüsünde iki kez ölçülür; ilki ileri pulsun sonunda (t_1) ve ikincisi ters pulsun sonunda (t_2) (Şekil 2.9a). İki ölçüm arasındaki fark uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Bu grafiğe ‘kare dalga voltamogramı’ denir. Elde edilen akım değerleri analitin derişimi ile direk orantılıdır. KDV tekniğinin mükemmel duyarlılığı net akımın ileri ve geri taramanın ikisinden de elde edilen akımdan daha fazla olmasıdır (Mirceski vd. 2013).

KDV tekniğinin temel avantajı analiz süresinin çok kısa olması yani hızıdır. Bu teknikte etkili bir potansiyel taraması şu şekilde tanımlar; $f \cdot \Delta E_s$. Burada f kare dalga frekansını,

ΔE_s ise adım yüksekliğini göstermektedir. Örneğin $f=50$ Hz ve $\Delta E_s=10$ mV değerinde olduğunda etkili tarama hızı $0,5 \text{ V.s}^{-1}$ olmaktadır. Bunun sonucunda analiz süresi etkili bir biçimde azalmıştır. Tüm voltamogram birkaç saniyede oluşturulabilmektedir. DPV ile karşılaştırıldığında KDV tekniği hızı ile öne çıkmaktadır ve aynı aralığı DPV birkaç dakika içinde taramaktadır (Skoog vd. 2014).



Şekil 2.9 (a) KDV tekniğinde uygulanan kare dalga formu (T_d : bekleme süresi, τ : kare dalga frekansı, ΔE ; adım yüksekliği ve E_{KD} ; kare dalga puls büyüklüğü) ve (b) örnek kare dalga voltamogramı

2.3 Modifiye Elektrot Kavramı

Kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotlar (KME), elektrot sistemleri için modern bir yaklaşımdır. KME'ler, çeşitli organik ve inorganik modifiyerlerin elektrot yüzeyine yerleştirilmesi ile elde edilirler. Modifiye edilmiş elektrotlar voltametrik, amperometrik ve potansiyometrik sensörler olarak analitik tayinlerde hassasiyetin, seçiciliğin veya kararlılığın artırılması amacı ile tasarlanırlar. Elektrot yüzeyinin modifikasyonu temel olarak organik veya inorganik maddelerin veya bunların karışımlarının elektrot yüzeyine tutturularak, bu maddelerin fizikokimyasal özelliklerinin elektrot yüzeyine aktarılmasını içermektedir. Elektrokimya alanında çalışma elektrotlarının kimyasal olarak modifiye edilmeleri, elektrotların elektrokimyasal performanslarını geliştirmesi amacıyla kullanılan ve yakın geçmişten günümüze yükselen bir trenddir. Elektrot modifikasyonunda temel amaç, modifiyer materyaller yardımıyla geleneksel elektrotların

aktif yüzey alanlarının artırılması ve elektron transfer kinetiğinin hızlandırılarak duyarlılığın artırılması ve/veya daha düşük alt tayin sınırlarına ulaşılmasıdır (Jadon vd. 2016, Santos vd. 2009 ve Heydari vd. 2016).

Elektrot yüzeylerini modifiye etmek için kullanılan nano materyaller (karbon temelli yapılar, metal oksitler, iletken polimerler, iyonik sıvılar vb.) genel olarak ‘modifiyer materyaller’ olarak adlandırılırlar. Elektrot yüzeyinin modifikasyonu ile elektrot, modifiyer maddenin fizikokimyasal özelliklerinin elektrot yüzeyine aktarılması sayesinde daha iyi hassasiyet, geniş yüzey alanı, geliştirilmiş elektro-katalitik aktivite ve yüzeye sabitlenen fonksiyonel gruplar ve katkı maddeleri ile analite karşı seçicilik gibi özelliklere sahip olur (Fiorucci ve Cavalheiro 2002, Heydari vd. 2016). Modifiyer materyaller olarak tercih edilen malzemelerin ortak özelliği genel olarak elektro-aktif türler olmalarıdır. Karbon nano tüpler en sıklıkla kullanılan modifiyer materyallerdir. Buna ek olarak günümüzde s ve p tipi yarı-iletken özelliği taşıyan metal oksit nano-partikülleri de elektrot yüzeylerine sabitlenen nano materyallerdir. İletken polimerlerin elektrot yüzeylerine elektrokimyasal olarak bağlanmaları, iyonik sıvıların kullanımı laboratuvar şartlarına göre veya incelenecek analite göre tercih edilen diğer modifiyer materyallerdir (George vd. 2018).

Elektrot modifikasyon uygulamaları hakkında ayrıntılı bilgiler vermeden önce bazı terimleri tanımlamak gerekmektedir; KME, kimyasal bir modifiyernin mono moleküler, çoklu moleküler, iyonik veya polimerik filmi ile kaplanmış iletken veya yarı iletken bir malzemeden yapılmış bir elektrot olarak tanımlanabilir. Modifiye edilen elektrot, faradayik reaksiyonları (yük transferi) veya ara-yüzey potansiyel farklılıkları vasıtasıyla elektrot yüzeyindeki filmin kimyasal, elektrokimyasal ve/veya optik özelliklerini sergiler. Ara-yüzeyde gerçekleşen elektron transferi, elektrokimyasal yükün kimyasal filmlerden elektrotlara taşındığı, elektronun ortam difüzyonuna bağlı olarak kendi değişimi ve filmin yüksek oranda konjuge moleküler bileşenleri tarafından iletimi dahil olmak üzere, elektrokimyasal yüklerin taşındığı prosesler için genel bir terimdir. Biyosensör, biyokimyasal tanıma elemanının uygun bir elektrokimyasal dönüştürücüye bağlandığı özel bir KME türüdür. Elektrot yüzeyi, biyolojik tanıma elemanı veya biyokimyasal reseptör olarak işlev gören bir biyo-bileşenin (örn., enzim, antijen/antikor, bitki veya

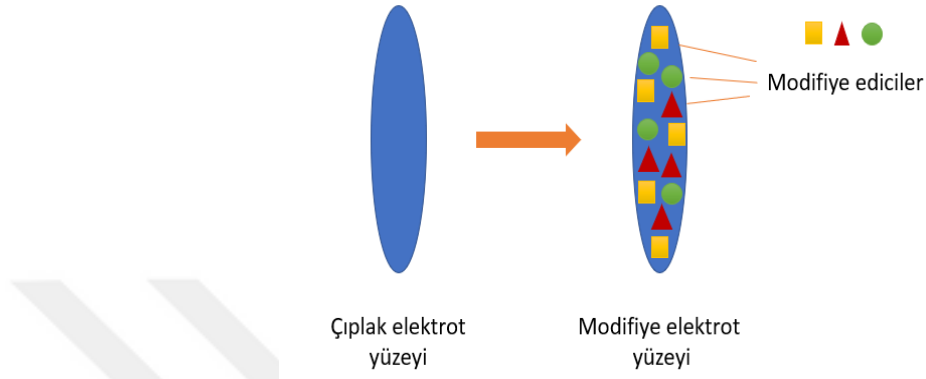
hayvan dokusu, vb.) eklenmesiyle değiştirilir. Kemoreseptör ise analit tanıma ve/veya bir reaksiyon için seçici algılama bölgeleri bulunduran elektrotlardır. Günümüzde bu tarz reseptörlere elektrokimyasal platformlar adı da verilmektedir (Durst vd. 1997).

Elektrotlar genel olarak dört yaklaşım ile modifiye edilmektedir;

- a. Kemisorpsiyon; modifiyer maddenin valans elektronları yardımıyla tıpkı kimyasal bir bileşik olumu gibi elektrot yüzeyi ile etkileşmeleri sonucu oluşur. Oluşan kimyasal film, elektrot yüzeyine güçlü bir şekilde ve ideal olarak geri dönüşümsüz olarak adsorbe edilir. Bu yaklaşım genellikle tek katmanlı (veya daha az) kaplama sağlar. Bu tip modifikasyon, birbiriyle ilişkili olmayan moleküllerin bir süper örgü oluşturmak için elektrot yüzeyindeki belirli bölgelerde kendiliğinden kimyasal olarak soğurulmasını içerir.
- b. Kovalent bağlanma; modifiyerin bir veya birkaç mono moleküler tabakasını elektrot yüzeyine kovalent olarak eklemek olarak tanımlanabilir.
- c. Polimer film kaplama; iletken ve iletken olmayan polimer filmler, temas eden çözeltide kimyasal adsorpsiyon, çözünürlük farklılığına göre veya gözenekli bir elektrotta fiziksel sabitleme ile elektrot yüzeyinde tutturulur. Polimer film organik, organo-metalik veya inorganik olabilir, arzu edilen modifiyer maddeyi zaten içerebilir veya bu kimyasal, ikincil bir fonksiyonlandırma adımında polimere eklenebilir ve modifiyerin birkaç ve/veya binlerce mono moleküler katmanını içerebilir.
- d. Kompozit; modifiyer madde, bir karbon pasta elektrotunun karbon parçacıkları (artı bağlayıcı) ile birleştirilmiş bir elektron transfer aracı (elektrokatalizör) gibi bir elektrot matris malzemesi ile basitçe karıştırılır. Alternatif olarak, modifiyer maddeyi eklemek için belirli Langmuir-Blodgett filmleri, zeolitler, killeri ve moleküler elekler gibi interkalasyon matrisleri kullanılabilir (Durst vd. 1997 ve Zoski vd. 2007).

KME'ler ayrıca modifiyer maddelerin bir karışımını içerebilir ve bazen bu modifiyerler özel olarak tasarlanmış bir konfigürasyona sahip olabilir. Yani bir KME, bir substrat ile reaksiyona giren bir donör veya alıcı olarak hareket eden bir elektro-katalizör ve elektrot arasında yükü taşımak için ikinci bir elektro-katalizör içerebilir veya bir KME, iki farklı

kimyasal polimerle kaplanmış bir substrattan oluşabilir, ikinci polimer, bir çift polimer film tabakası oluşturmak üzere birincisinin üzerine yerleştirilebilir. Bu daha karmaşık KME'ler, 'mikro yapılı elektrotlar' veya 'entegre elektrokimyasal platformlar' olarak adlandırılırlar (Tasic vd. 2021). Şekil 2.10'da bu tarz bir KME'nin şematiği gösterilmiştir.



Şekil 2.10 Entegre elektrokimyasal platform için bir şema

Yüzey modifikasyonları analitin elektrokimyasal yanıtları üzerinde katalitik bir rol oynar ve yüzey özelliklerinde gerçekleşen çok küçük bir değişiklik bile elektro-analitik uygulamalarda ölçümün duyarlılığını etkileyebilir. Modifiye edilmiş yüzeyler genel olarak;

- i. Modifiyerlerin fizikokimyasal özelliklerinin elektrot yüzeyine aktarımı,
- ii. Daha iyi hassasiyet sağlayan geniş yüzey alanına sahip malzemelerin kullanımı nedeniyle geliştirilmiş elektro-katalitik aktivite,
- iii. Yüzeye sabitlenmiş fonksiyonel gruplar ve katkı maddeleri sayesinde analite karşı daha yüksek seçicilik,
- iv. Bazı nano malzemeler yardımıyla hızlı difüzyon kinetiği ve
- v. Elektrot yüzeyinde bir analitin çıkarılması ve biriktirilmesi gibi kullanışlı sonuçlar ortaya çıkarırlar.

KME'ler yukarıda belirtilen tekniklerden biri ile modifiye edildikten sonra elektrotun kullanılan materyaller ile gerçekten modifiye edilip edilmediği incelenmelidir. Bunun için X-ışını gibi spektroskopik yöntemler veya yüzeyin direk gözlemlendiği optik veya

taramalı elektron mikroskobu gibi yöntemler kullanılabilir. Yüzey karakterizasyonu tamamlandıktan sonra ise oluşturulan yeni elektrokimyasal platformun elektrokimyasal performansı değerlendirilmelidir. Performans parametreleri için de birçok yöntem kullanılsa da elektrokimya alanında dönüşümlü voltametri ile yapılan tarama hızı çalışması ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemleri günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır.

Kalem grafit elektrot, modifikasyon için uygun, düşük maliyetli ve kolay temin edilebilir bir malzeme olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, elektrokimyasal analizin çeşitli alanlarındaki uygulamalarıyla ilgili olarak son yıllarda yayınlanan inceleme makalelerinde görülebileceği gibi, giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu tez çalışmasında kalem grafit elektrot hem çıplak hem de modifiye edilerek kullanılmıştır.

2.3.1 Taramalı elektron mikroskobu ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi

1930 yılında sunulan taramalı elektron mikroskobu (TEM) tekniği çıkışından bu yana malzeme ve materyal bilimi, tıp ve hatta yaşam bilimlerinde kendine önemli kullanım alanları bulmuştur. Herhangi bir yüzey veya bir numunenin yüzeye yakın bir bölgesi için mikroskopik bir bilgi gerektiğinde TEM tekniği önemli bir araçtır. Bu nedenle TEM, bilimden teknolojiye ve endüstriyel faaliyetlere kadar birçok alanda kullanılmaktadır. TEM yöntemi genel olarak görüntüsü çıkarılacak yüzey üzerinde odaklanmış bir elektron demeti yardımıyla tarama yapar. Elektron demetinde yer alan elektronlar yüzeyde bulunan türler ile etkileşir ve yüzey topografyası ve kompozisyonu hakkında bilgi edinilmesini sağlayan sinyaller ortaya çıkarılırlar. Malzemeler ve cihazlar için boyutlar küçüldükçe, birçok yapı artık geleneksel ışık mikroskobu ile karakterize edilemez. Örneğin, bir nanofiber tabakasının bütünlüğünü belirlemek ve numuneyi karakterize etmek için elektron mikroskobu gereklidir.

Bir TEM cihazı beş ana parçadan oluşmaktadır;

- i. Elektron kaynağı
- ii. Elektronların elektromanyetik lenslerle hareket ettiği bir sütun
- iii. Elektron dedektörü

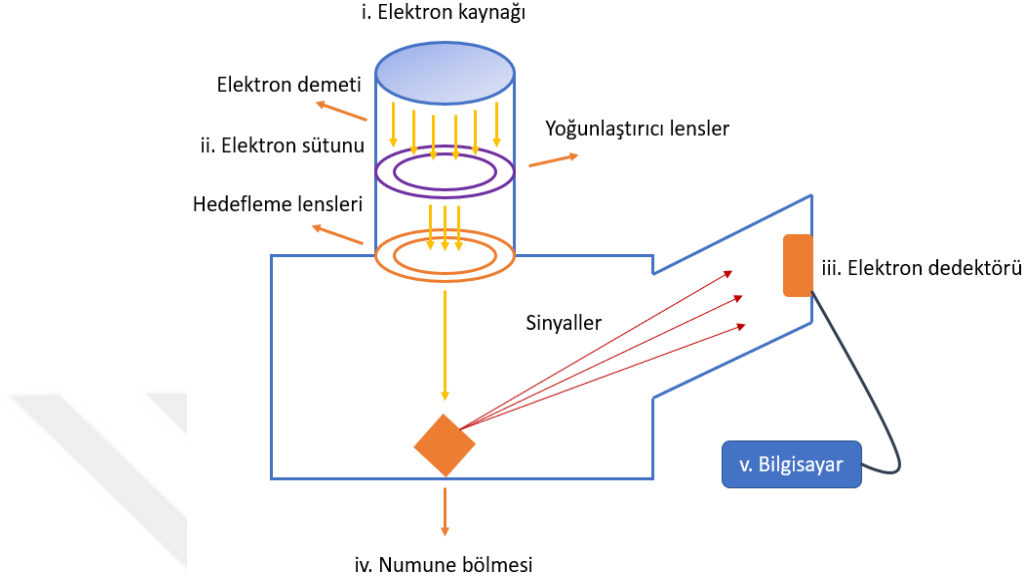
- iv. Numune bölmesi
- v. TEM görüntülerini oluşturmak ve izlemek için bir bilgisayar ve ekran

TEM, numuneyi yüksek enerjili bir elektron demeti ile tarayarak görüntüler üretir. Elektronlar numune ile etkileşirken ikincil elektronlar, geri saçılan elektronlar ve karakteristik X-ışınları üretirler. Bu sinyaller, daha sonra bilgisayar ekranında görüntülenen görüntüleri oluşturmak için bir veya daha fazla dedektör tarafından toplanır. Elektron ışını numunenin yüzeyine çarptığında, hızlanma voltajına ve numunenin yoğunluğuna bağlı olarak numuneye birkaç mikron derinliğe kadar nüfuz eder. Numune içindeki bu etkileşimin bir sonucu olarak ikincil elektronlar ve X ışınları gibi birçok sinyal üretilir. Bir TEM'de elde edilen maksimum çözünürlük, elektron noktası boyutu ve elektron demetinin numune ile etkileşim hacmi gibi birçok faktöre bağlıdır. Atomik çözünürlük sağlayamazken, bazı TEM'ler 1 nm'nin altında çözünürlük elde edebilir. Tipik olarak modern tam boyutlu TEM'ler 1-20 nm arasında çözünürlük sağlarken, masaüstü sistemler 20 nm veya daha fazla çözünürlük sağlayabilir (Skoog vd. 2014).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan elektrokimyasal platformlar modifiye edildikten sonra yüzey morfolojileri TEM tekniği ile incelerken karakterize edilebilirler. Modifiye edilmemiş elektrot yüzeylerinin modifikasyondan sonra kazanması beklenen üç boyutlu yapıları TEM tekniği ile gösterilebilmektedir. Literatürde standart haline gelen TEM tekniği ile modifiye elektrotların yüzeylerinin incelenmesi bu tez çalışmasında da aynı şekilde kullanılmıştır.

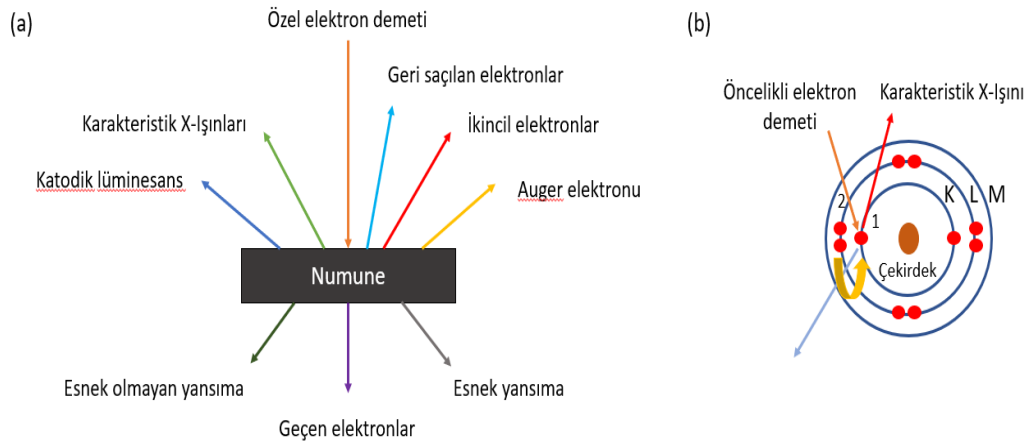
TEM'ler, nano ölçekte bir numuneden bilgi almak için elektron ışınları kullanır. Tespit edilen ana sinyal türü, örneğin çok yüksek yakınlıktır. Gri tonlamalı bir görüntüsünü oluşturan geri saçılan ve ikincil elektronlardır. Bununla birlikte, elektron-madde etkileşimini sonucu oluşabilecek başka birçok sinyal vardır ve bunlar numune hakkında ek bilgi sağlayabilir. Enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisinde element içeriği ve birbirlerine oranları belirlenebilir. Elektron ışını-madde etkileşimi, numune hakkında farklı bilgiler taşıyan çeşitli sinyaller üretir (Şekil 2.12a). Örneğin, geri saçılan elektronlar ve atom numarasındaki farklılıklar hakkında bilgi taşıyan kontrastlı görüntüler üretir; ikincil elektronlar topografik yapı hakkında bilgi verir; katodo-lüminesans ise

malzemelerin elektronik yapısı ve kimyasal bileşimi hakkında bilgi verebilir ve iletilen elektronlar numunenin iç yapısını ve kristalografisini tanımlayabilir.



Şekil 2.11 TEM cihazının temel bileşenleri

TEM'lerde yaygın olarak kullanılan bir başka sinyal türü de X-ışınlarıdır. Her atom, normal koşullar altında kuantlı tabakalarda bulunan benzersiz elektronlara sahiptir. Bu tabakalar, farklı enerjilere sahip belirli elektron kabuklarına aittir. Bir TEM'de X-ışınlarının üretilmesi iki aşamalı bir işlemdir (Şekil 2.12b). İlk adımda, elektron ışını numuneye çarpar ve enerjisinin bir kısmını numunenin atomlarına aktarır. Bu enerji, atomların elektronları tarafından daha yüksek enerjili bir enerji kabuğuna geçiş veya emisyon için kullanılabilir. Böyle bir geçiş meydana gelirse, elektron bir boşluk bırakır. Bu boşluk pozitif bir yüke sahiptir ve sürecin ikinci adımında, daha yüksek enerjili kabuklardan negatif yüklü elektronları çeker. Böyle yüksek enerjili bir kabuktan bir elektron, düşük enerjili kabuğun boşluğunu doldurduğunda, bu geçişin enerji farkı bir X-ışını şeklinde serbest kalır. Bu X-ışını, bu iki kabuk arasındaki kuantlı enerji farkını yansıtır ve bu enerji farkı her elementin benzersiz bir özelliği olan atom numarasına bağlıdır. Böylece, X-ışınları bir elementin bir 'parmak izi' olarak düşünülebilir ve bir numunede bulunan elementlerin türünü tanımlamak için kullanılabilir (Shindo ve Oikawa 2002).



Şekil 2.12 (a) elektron-madde etkileşimini gösteren bir şema ve (b) TEM’de iki aşamalı X-ışını üretimi

EDX analizi ile üretilen veriler, numunede mevcut olan tüm farklı elementlere karşılık gelen pik noktalarına sahip spektrumlardan oluşur. Çoğu TEM’de, özel bir yazılım, pik noktalarının otomatik olarak tanımlanmasını ve tespit edilen her bir elementin atomik yüzdesinin hesaplanmasını sağlar. EDX tekniğinin bir diğer avantajı, çok az veya hiç numune hazırlama gerektirmeyen tahribatsız bir karakterizasyon tekniği olmasıdır. Bu tez çalışmasında da modifiye elektrot yüzeyinde modifiyer materyallerin tutunup tutunmadıkları ve modifiyerlerin yüzeydeki yüzdeleri EDX tekniği yardımı ile belgelenmiştir.

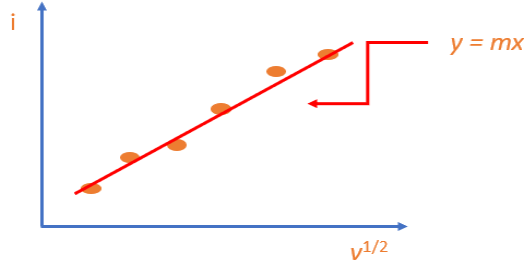
2.3.2 Dönüştürümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi

DV tekniği yukarıda detaylı olarak incelense de bu kısımda elektrot performansı için bu yöntemin nasıl değerlendirileceği kısaca incelenecektir. KME’nin performansı DV tekniği ile birlikte standart $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu kullanılarak tarama hızı çalışması gerçekleştirilir. Tarama hızı çalışmasından elde edilen pik akımları (anodik ve katodik) tarama hızının kare köküne ($v^{1/2}$) karşı grafiğe geçirilir ve Eşitlik 2.4’te verilen Randles-Sevcik eşitliği ile üretilen yeni KME’nin aktif yüzey alanı hesaplanabilir. Bu yöntem günümüzde sıklıkla modifiye edilen elektrotların modifikasyon işleminden sonra yüzey alanlarının arttırılıp arttırılmadığını belirlemek için kullanılmaktadır. Şekil 2.13’te bunun için bir şema gösterilmiştir;

Randles-Sevcik Eşitliği:

$$i = (2.687 \times 10^5) \times n^{3/2} \times D^{1/2} \times A \times C \times v^{1/2}$$

y m x



Şekil 2.13 DV tekniği ile Randles-Sevcik eşitliğinin aktif yüzey alanı hesaplamak için birlikte kullanımı

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EES) modifiye edilen elektrotların performansını değerlendirmek için kullanışlı bir yöntemdir. Modifikasyonda temel amacın elektron transfer hızının artırılması olduğu düşünüldüğünde, bunu incelemenin etkili bir yolu da EES tekniğidir. EES tekniği, bir standart çözelti yardımı ile modifiye edilen ve modifiye edilmemiş (çıplak) elektrotların elektron transfer kinetiğinin karşılaştırılmasını sağlayan yük transfer direncini (R_{CT}) hesaplamamızı sağlar. Elektrotların R_{CT} değerleri bir standart yardımı ile EES yöntemi kullanılarak belirlenebilir. Standart olarak yine $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ redoks probu sıklıkla kullanılmaktadır. EES tekniğinin üretilen KME'nin performansını değerlendirmek için nasıl kullanıldığını anlattıktan sonra biraz da yöntemin detayları ile ilgili bilgi vermek gereklidir.

EES veya alternatif akım (AA) empedansı son yıllarda kullanımı önemli derecede artan bir tekniktir. Daha önce potansiyometrik teknikler arasında incelenen EES günümüzde ayrı bir elektrokimyasal teknik olarak ele alınmaktadır. Başlangıçta çift-tabaka kapasitansını ölçmek için ve AA palorografisinde kullanılırken şimdi kompleks ara yüzeylerin ve elektrot proseslerinin karakterizasyonu için uygulanmaktadır. EES, sisteme periyodik küçük genlikte bir alternatif akım sinyalinin uygulanması sonucu ortaya çıkan yanıtları inceler. Bu ölçümler farklı AA frekanslarında gerçekleştirilir. Sistem

yanıtlarının analizi ara-yüzey, onun yapısı ve ara-yüzeyde gerçekleşen reaksiyon hakkındaki bilgileri içerir.

Elektriksel direnç kavramı hemen herkes tarafından bilinir ve elektrik akımının akışına karşı gösterilen direnç olarak tanımlanır. 1. Ohm yasası elektriksel direnci (R) Eşitlik 2.3'teki gibi tanımlar ($E = i.R$). Buradaki sınırlama direncin sadece bir devre elemanı için tanımlanmasıdır. Bu devre elemanı tüm akım ve voltajlarda Ohm Yasasına uyar, direnç frekansa bağlı değildir ve bir dirençten geçen alternatif akım ve voltaj sinyalleri birbiriyle aynı fazdadır gibi birkaç basit özelliğe sahiptir. Fakat, gerçekte elektrokimyasal hücrede daha kompleks davranışlar sergilerler (ara-yüzey, difüzyon vb.). Bu nedenle bu teknikte direnç yerine empedans terimi kullanılır ve yöntemin ismi de buradan gelir. Tıpkı direnç gibi empedans da elektrik akımının akışına karşı gösterilen direnç olarak adlandırılır fakat yukarıda sıralanan basit direnç özellikleri ile sınırlı değildir (Lasia 2014).

EES'de uyarma potansiyeli elektrokimyasal hücreye sinüs eğrisi şeklinde uygulanır ve bu uygulanan potansiyele karşı alternatif akım yanıtı ölçülür. Uygulanan uyarma sinyali aşağıdaki eşitlikteki gibi ifade edilebilir;

$$E_t = E_0 \sin(\omega t) \quad 2.8$$

Burada E_t ; t süresindeki potansiyeli, E_0 ; sinyalin genliğini, ω ; radyal frekansı göstermektedir. Radyal frekans ω (radyan/saniye) ile frekans f (Hz) arasındaki ilişki aşağıdaki gibi ifade edilir;

$$\omega = 2\pi f \quad 2.9$$

Doğrusal bir sistemde uygulanan sinüs eğrisi şeklindeki potansiyele karşı ölçülen akım yanıtı (I_t) bir faz elemanı (Φ) ile değişir ve I_0 'dan daha farklı bir genliğe sahiptir;

$$I_t = I_0 \sin(\omega t + \Phi) \quad 2.10$$

Böylece empedans, Ohm yasasına benzer bir yaklaşım üzerinden açıklanan aşağıdaki eşitlik ile hesaplanabilir;

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \Phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \Phi)} \quad 2.11$$

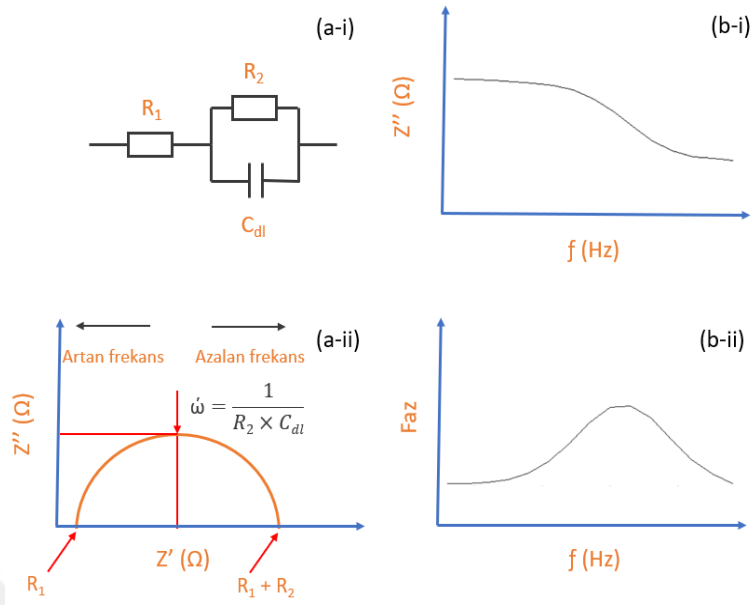
Sonuç olarak empedans, genlik (Z_0) ve faz değişimi (Φ) ile açıklanır. Uygulanan sinüs eğrisi şeklindeki potansiyele karşı ölçülen akım diğer elektrokimyasal yöntemlerde olduğu gibi direkt grafiğe geçirilirse karmaşık bir eğri (Lissajous Şekli) ortaya çıkmaktadır. Bu karmaşık durumun giderilmesi için ‘Euler Eşitliği’ (Eşitlik 2.12) kullanılarak empedans kompleks bir fonksiyon olarak açıklanabilir;

$$\exp(j\Phi) = \cos(\Phi) + j \sin(\Phi) \quad 2.12$$

Uygulanan sinüs dalgası şeklindeki potansiyel $E_t = E_0 \exp(j\omega t)$ ve akım yanıtı $I_t = I_0 \exp(j\omega t - \Phi)$ şeklinde tanımlanarak Eşitlik 2.10 ile birleştirilirse, empedans kompleks bir sayı olarak aşağıdaki gibi ifade edilir;

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} = Z_0 \exp(j\Phi) = Z_0 \exp(\cos(\Phi) + j \sin(\Phi)) \quad 2.13$$

Burada belirtilen $Z(\omega)$ terimi gerçekte ve sanal kısımlardan oluşmaktadır ve empedans ölçümlerinin sonuçları bu iki kısım kullanılarak iki farklı grafik halinde incelenebilmektedir. Bunlar Nyquist ve Bode eğrileri olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.14). Z değerinin gerçekte kısmı x-eksenine ve sanal kısmı y-eksenine karşılık gelecek şekilde grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğri Nyquist eğrisi (Şekil 2.14a-ii) olarak adlandırılır. Bu egride y-ekseni (-) işaretlidir ve gösterilen her nokta bir frekans değeri için hesaplanır. Bu gösterim şeklindeki en büyük eksik, şekle bakıldığında hangi noktanın hangi frekansta ölçüldüğünün bilinmemesidir. Bode eğrisi (Şekil 2.14b) olarak bilinen gösterim şeklinde ise frekansın x-ekseni ve empedansın mutlak değeri y-eksenine karşılık gelecek şekilde (Şekil 2.14b-i) ve frekansın x-ekseni faz değişimi y-eksenine karşılık gelecek şekilde (Şekil 2.14b-ii) grafiğe geçirilir (Lasia 2014).



Şekil 2.14 EES’de grafik gösterim şekilleri; (a-i) basit bir elektrokimyasal eşdeğer devre, (a-ii) Nyquist eğrisi, (b-i) sanal empedanslı bode eğrisi ve (b-ii) faz elemanlı bode eğrisi

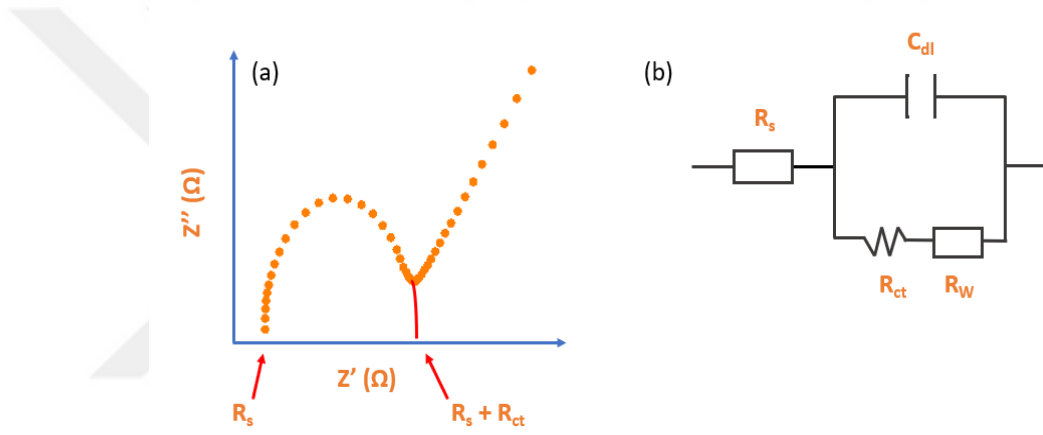
EES ölçümleri ile elde edilen ve cihaz tarafından verilen eğriler eşdeğer elektriksel devre modelleri kullanılarak analiz edilir. Bunun için literatürde sıklıkla direnç, kapasitör ve indüktör olarak adlandırılan terimler kullanılır. Çizelge 2.1’de bu terimlerin akım ve voltaj ilişkisi ve bunların empedans verileri listelenmiştir. Bu terimlerin her biri elektrokimyasal hücrede bir görevi vardır. Buradan görüleceği gibi direnç terimi frekanstan bağımsızdır ve sanal bir eklentisi yoktur. İndüktör teriminin empedansı ise frekans arttıkça artmaktadır ve bir sanal empedans bileşeni vardır. Kapasitör teriminin empedansı ise frekans arttıkça azalmaktadır ve bir sanal empedans bileşeni vardır.

Çizelge 2.1 Elektrokimyasal devre elemanları, akım-yük ilişkisi ve empedans verisi

Bileşen	Akım vs. Voltaj	Empedans
Direnç	$E = I.R$	$Z = R$
İndüktör	$E = L \, di/dt$	$Z = j\omega L$
Kapasitör	$I = C \, dE/dt$	$Z = 1/j\omega C$

Şekil 2.14a-i’de gösterildiği gibi basit Randles devresi olarak adlandırılan eşdeğer devre ile Nyquist grafiği (Şekil 2.14a-ii) üzerinden çözelti direnci (R_1), sistemdeki toplam direnç ($R_1 + R_2$), çift tabaka etkisi (C_{dl}) ve R_2 değeri; çalışmanın yaklaşımına göre yük transfer hızı (R_{CT}) veya yüzeyin polarizasyon direnci (R_P) hesaplanabilir.

Voltametrik elektrokimyasal bir sistemde EES eğrilerinin analizi için modellenecek eşdeğer devrede elektrolit direnci (R_s), çift-tabaka kapasitansı (C_{dl}), yük transfer direnci (R_{CT}) ve elektrot yüzeyi ile çözelti arasındaki derişim farkından kaynaklanan difüzyon terimleri tanımlanmalıdır (Şekil 2.15);

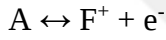


Şekil 2.15 (a) Nyquist eğrisi ve (b) yük transfer direncini hesaplamak için kullanılan difüzyon terimli (R_w) örnek bir eşdeğer devre

Elektrolit direnci: Çözelti direnci bir elektrokimyasal hücrenin empedansı için önemlidir. Modern üç elektrotlu potansiyostatlar referans elektrot ile yardımcı elektrot arasındaki çözelti direncini hesaba katarak işlem yapsalar da referans elektrot ve çalışma elektrotu arasındaki çözelti direnci eşdeğer devre çizilirken hesaba katılmalıdır. Bir çözeltinin direnci çözeltinin iyonik şiddetine, iyon türlerine ve ortam geometrisine bağlıdır. Fakat çoğu elektrokimyasal hücrede kesin bir elektrolit alanı boyunca akım dağılımı yoktur. Bu nedenle çözelti direnci genellikle modellenen eşdeğer devre EES eğrisine uyduğunda hesaplanır.

Çift-tabaka kapasitansı; Bir elektriksel çift-tabaka elektrot yüzeyi ve onu çevreleyen çözücü tabakası arasındaki ara-yüzeyde bulunur. Bu tabaka çözeltiden elektrot yüzeyine adsorplanan iyonlar ile oluşur. Yüklü elektrot yüzeyi, yüklü iyonlardan yalıtkan bir boşluk ile ayrılır. Bir yalıtkan ile ayrılan yükler bir kapasitör oluşturur böylece çözeltiye daldırılan elektrot bir kapasitör gibi davranır. Elektrot potansiyeli, sıcaklık, iyonik şiddet, iyon türleri, oksit tabakası, elektrot sertliği ve adsorpsiyon gibi kaynaklar kapasitörü etkileyen kaynaklardır.

Yük-transfer direnci; Elektrot yüzeyinde oluşan kinetik-kontrollü elektrokimyasal bir reaksiyonda benzer bir direnç oluşur. Burada sabit potansiyel yerine denge halinde bir sistem vardır. Örneğin elektro-aktif bir türün bir elektrolit ile etkileşim halinde olduğu düşünülürse aşağıdaki reaksiyona göre elektro-aktif tür elektron verecektir;



İleri yönde reaksiyonda elektrot yüzeyinde A türü elektron vererek elektrolit çözelti içine difüze olur ve elektron transferi gerçekleşir. Bu elektron transferinin belirli bir hızı vardır ve reaksiyonun tipine, sıcaklığa, türlerin derişimine ve potansiyele bağlıdır. R_{CT} , ara-yüzeyde gerçekleşen bu elektron transferinin hızının bir ölçüsüdür. Aşırı potansiyel çok düşük olduğunda ve elektrokimyasal sistem denge halinde ise R_{CT} aşağıdaki şekilde ifade edilir;

$$R_{ct} = \left(\frac{RT}{nFI_0} \right) \quad 2.14$$

Burada R gaz sabitini, T sıcaklığı (Kelvin), n aktarılan elektron sayısını ve I_0 akım değişiminin tahmini değerini göstermektedir. I_0 değeri literatürde modifiye edilen elektrotların katalitik aktivitesini karşılaştırmak için kullanılır (Lasia 2014 ve Kaedi vd. 2019).

Difüzyon; Elektrot yüzeyi ve elektrolit çözeltisi arasındaki derişim farkından ortaya çıkan difüzyon da bir empedans yaratır ve buna ‘Warburg empedansı’ adı verilir. Burada

empedans uygulanan parametre potansiyelin frekansına bağlıdır. Yüksek frekanslarda empedans küçüktür ve türler elektrolit çözeltisi içinde hareket etmezlerken, düşük frekanslarda daha fazla hareket ederek Warburg empedansını arttırmaları. Literatürde modifiye edilen elektrotların yük transferi difüzyon-kontrollü prosesler olduğunda empedans Şekil 2.15b’te gösterilen eşdeğer elektrokimyasal devre elemanları kullanılarak hesaplanır (Lasia 2014).

2.4 DNA ile Etkileşimin İncelenmesi

DNA-Ligand etkileşimleri genellikle üç farklı yolla oluşur;

- a. Ligand DNA’ya bağlı olan proteinler ile etkileşir,
- b. Nükleik asit-DNA çift sarmalına bağlanarak üçlü sarmal yapılar oluşturur veya RNA hibridizasyonu (diziye özgü bağlanma) ile DNA-RNA kompleksi oluşturur,
- c. DNA çift sarmal yapılarına bağlanan küçük aromatik ligand moleküllerinin L-DNA kompleksi oluşturması. DNA’ya bu tür bağlanmalar üç şekilde gerçekleşir;
 - i. Genellikle spesifik olmayan negatif yüklü nükleik şeker-fosfat yapısı ile elektrostatik etkileşim,
 - ii. Birkaç aromatik halka içeren düzlemsel organik moleküllerin DNA’nın baz çiftleri arasına girmesi (interkalasyon),
 - iii. Oluk bağlanma ile etkileşim: Ligand, DNA çift sarmalının iki oluğu (minör ve majör) ile etkileşime girer;

Minör oluk bağlanma: Çok sayıda hidrojen bağı ve baz/fosfat omurgası ile elektrostatik etkileşim.

Major oluk bağlanma: Ligand DNA ile hidrojen bağları üzerinden etkileşerek üçlü sarmal yapı oluşturur (Erdem ve Ozsoz 2002).

Bu bağlanma türlerinin sonucunda, DNA ve bağlanan ligandın yapısında değişiklikler meydana gelir. DNA’nın ikili yapısında oluşan bu değişimler onun termodinamik kararlılığının değişmesine neden olur ve bu DNA’nın fonksiyonel özelliklerindeki değişimler olarak ortaya çıkar. DNA ve ligand arasında oluşabilecek bu etkileşimlerin

elektrokimyasal yanıtı, etkileşimin gücü/doğası ve DNA hedefli ligandların davranışları ile doğrudan ilişkilidir. DNA'nın elektrokimyasal yanıtlarının etkileşimden önce ve sonra incelenmesi etkileşim mekanizması hakkında bilgi sağlar. Elektro-aktif ilaç türlerinin çözelti içinde veya elektrot yüzeyinde etkileşimden önce ve sonraki elektrokimyasal yanıtlarının incelenmesi de bu iki molekülün etkileştiğinde nasıl davrandığı hakkında veriler elde edilmesini sağlar. Bu etkileşimleri elektrokimyasal olarak incelemek için temelde iki yaklaşım kullanılır;

- a. Elektrot yüzeyinde etkileşim
 - i. DNA modifiye sensör
 - ii. İlaç modifiye sensör
- b. Çözelti içinde etkileşim

Her yaklaşım için de etkileşimden önce ve sonra ölçümler alınarak akım azalması incelenir (Şekil 2.16) (Rauf vd. 2005). Bu tez çalışmasında ise XT, TP, TB ve CF'nin DNA ile etkileşimleri çözelti içinde etkileşim yaklaşımı ile incelenecektir. Çözeltideki etkileşimin tespiti için, ligand ve DNA aynı çözeltiye yerleştirilir ve belirli bir etkileşim süresinden sonra, ilaç-DNA kompleksinin elektrokimyasal sinyallerindeki değişiklikler, DNA ve tek başına ilaç ile elde edilen sinyallerle karşılaştırılır. Şekil 2.16'da bunun için bir şema gösterilmiştir.

DNA'nın bir ligand ile etkileşiminin elektrokimyasal sinyalleri incelendikten sonra DNA-Ligand kompleksinin bağlanma sabiti ($K_{DNA-ilaç}$) ve bu reaksiyonun standart Serbest Gibbs Enerji Değişimi (ΔG^0) değerleri hesaplanarak etkileşimin doğası belirlenebilir. İki tür arasında sadece bir tür 'DNA-Ligand kompleksi' ortaya çıktığı ve 1:1 oranda reaksiyon verdiği varsayılarak bu reaksiyon için kimyasal ve matematiksel açıklama aşağıdaki şekilde yapılabilir;



Burada L DNA'ya bağlanacak ligandı, K_{L-DNA} oluşan L-DNA kompleksine ait bağlanma sabitini göstermektedir. Elektrokimyasal hücre içindeki bir L-DNA kompleksi için voltametrik akım aşağıdaki eşitlikteki gibi gösterilir;

$$i = K_{L-DNA} \times C_{DNA} \quad 2.16$$

Burada i akımı, C_{DNA} ise çözeltideki DNA derişimini göstermektedir. Eşitlik aşağıdaki şekilde düzenlendiğinde ve logaritması alındığında DNA derişimi ve akım arasındaki bağıntı Eşitlik 2.17'de gösterilmiştir;

$$\frac{1}{i} = K_{L-DNA} \times \frac{1}{C_{DNA}} \Rightarrow \log \frac{1}{i} = \log K_{L-DNA} + \log \frac{1}{C_{DNA}} \quad 2.17$$

Ortamda sadece ligand varken ölçülen akım (i_L) ile DNA eklendikten sonra ölçülen akımın (i_{L-DNA}) farkı hesaba katılarak Eşitlik 2.17'teki $\log 1/i$ ifadesi aşağıdaki gibi değiştirilir;

$$\log \frac{i_{L-DNA}}{i_L - i_{L-DNA}} = \log K_{L-DNA} + \log \frac{1}{C_{DNA}} \quad 2.18$$

Son olarak, $\log (1/C_{DNA})$ x-ekseni ve $\log [i_{L-DNA}/(i_L - i_{L-DNA})]$ terimi y-ekseni olacak şekilde grafiğe geçirildiğinde doğrusal bir eğri elde edilmelidir. Bu doğru denklemini $y = mx + n$ olarak gösterirsek; burada n kesişim değeri $\log K_{L-DNA}$ terimine eşit olacaktır (Yazan vd. 2020).

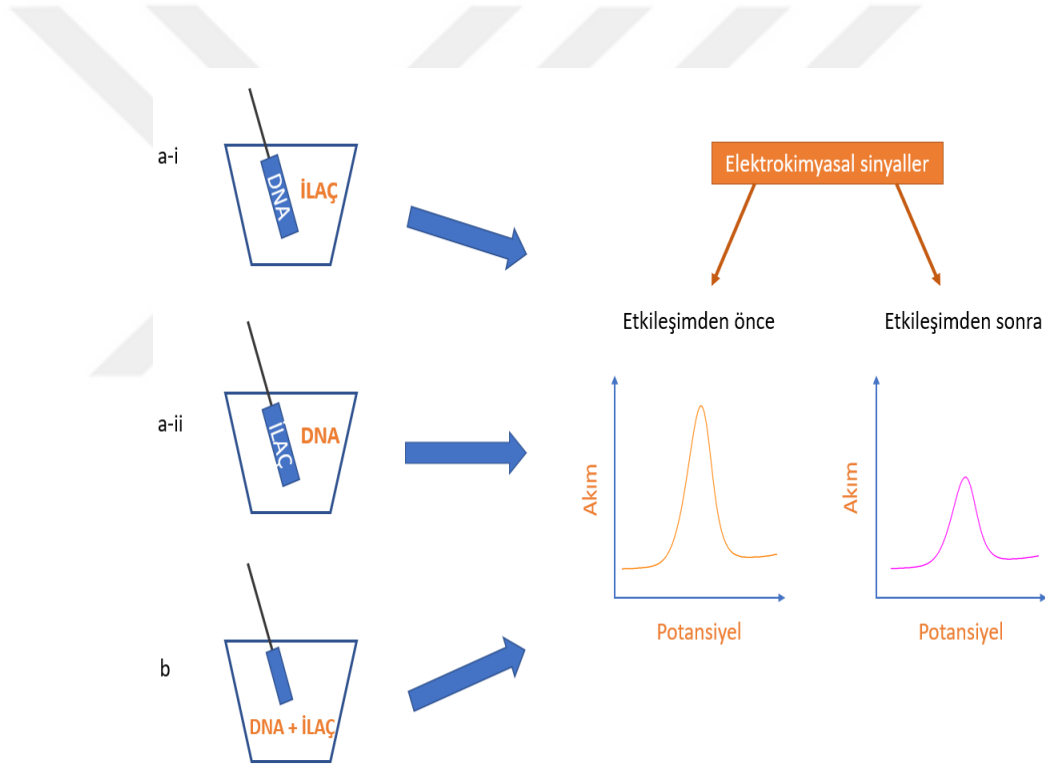
DNA'ya ilgili türün bağlanma sabiti hesaplandıktan sonra aşağıda gösterilen serbest Gibbs Enerjisi değişimi eşitliği ile bağlanmanın termodinamik olarak istemli/istemsiz olup olmadığı incelenebilir;

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q \quad 2.19$$

Burada R gaz sabitini, T sıcaklığı, Q herhangi bir durumdaki denge ifadesini, ΔG ve ΔG^0 ise sırasıyla herhangi bir anda ve standart haldeki serbest Gibbs enerjisini göstermektedir. Dengedeki bir sistemde ileri ve geri yönlü reaksiyon hızları eşit olduğu ve bu anda $Q=K$ ifadesi Eşitlik 2.19'a eklendiğinde L-DNA kompleksi için bağlanmanın standart Gibbs enerji değişimi Eşitlik 2.20'deki ifade ile hesaplanabilir;

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{L-DNA} \quad 2.20$$

ΔG^0 sıfırdan büyük ise bağlanma termodinamik olarak istemsiz, sıfırdan küçük ise bağlanmanın termodinamik olarak istemli olduğu gösterilmiş olur.



Şekil 2.16 DNA-ilaç etkileşiminin elektrokimyasal olarak incelenmesi için bir şema

2.5 Literatür Özetleri

Zen ve Ting 1996 yılında yaptıkları çalışmada CF ve asetaminofen (AAF) bileşiklerinin ilaç formülasyonlarında eş zamanlı tayinini için bir modifiye CKE yardımı ile KDV tekniği kullanarak gerçekleştirmişleridir. 0,05 M perklorik asit ortamında CF ve AAF

doğrusal aralıklar sırasıyla 10,0 – 250,0 ve 5,0 – 250,0 μM ve LOD değerleri sırasıyla 2,2 ve 1,2 μM bulmuşlardır.

Spataru ve ekibinin 2001 yılında yaptıkları çalışmada XT, TP, TB ve CF moleküllerinin bor-katkılı elmas elektrot (BKEE) kullanılarak her bir madde için anodik voltametri tekniği ile birer analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada pH etkisi ve tarama hızı çalışmaları da yapılarak BİEE'nin performansı değerlendirilmiştir. XT, TP, TB ve CF için elde ettikleri doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla 1,0 – 100,0; 1,0 – 400,0; 1,0 – 400,0 ve 1,0 – 400,0 μM değerleri önerilmiştir. Fakat LOD verilerine yer verilmemiştir.

Zhao ve ekibinin 2002 yılında yaptıkları çalışmada XT için anodik sıyırma voltametri tekniği ve karbon nano-tüp modifiye bir CKE ile bir tayin metodu geliştirmişlerdir. XT için 2×10^{-7} – 2×10^{-5} M doğrusal çalışma aralığını bir dakikalık biriktirme süresi ile elde etmişlerdir. LOD için 4×10^{-9} M değerini ise üç dakikalık biriktirme süresi ile hesaplamışlardır. Geliştirilen yöntemi insan serumunda XT tayini için kullanmışlar ve %98,0 – 99,0 geri kazanım değerleri elde etmişlerdir.

Ly ve ekibi 2004 yılında yayımladıkları çalışmada CF'nin analizi için kare dalga adsorptif sıyırma voltametri (KDAdSV) tekniği ile çıplak KGE kullanmışlardır. Optimize şartlar olarak; biriktirme süresi 20 saniye, biriktirme potansiyeli 0,0 V ve pH: 9,0 değerlerini kullanıldığı çalışmada belirtilmiştir. CF için doğrusal çalışma aralığı 0,0 – 500,0 mg/L ve LOD 9,2 mg/L değerlerini elde etmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemi 300 mg CF içerdiği bilinen ticari içeceklerde CF tayini için kullanmışlar ve %100,0 geri kazanım elde etmişlerdir.

Nafisi ve ekibinin 2008 yılında yaptıkları çalışmada CF ve TP moleküllerinin DNA ile etkileşimini UV-Spektroskopisi yöntemi incelemişlerdir. Spektroskopik sonuçlardan elde ettikleri veriler ile CF ve TP'nin DNA ile Guanin-Sitozin/Adenin-Timin ve PO_2 grupları ile etkileştiğini göstermişler ve bağlanma sabitlerini sırasıyla $9.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ve $1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplamışlardır.

Brunetti ve Desimoni 2009 yılında yayımladıkları çalışmada TP'nin sisteik asit modifiye CKE'de DPV tekniği ile belirlenmesi için bir yöntem önermişlerdir. Modifiye elektrotun çıplak CKE'ye göre daha iyi performans gösterdiği belirtilmiştir. Çeşitli elektrolit çözeltileri denenerek en iyi sonuç alınan 0.05 M H₂SO₄ çözeltisini elektrolit çözeltisi olarak seçmişlerdir. 1.2×10^{-6} M LOD değeri ile 2.5×10^{-6} – 6.8×10^{-5} M doğrusal çalışma aralığı elde ettikleri yöntemi son olarak 200 mg TP içerdiği bilinen meditasyon ilaçlarında denemişler ve %97,5 – 99,0 aralığında geri kazanım değerleri elde etmişlerdir.

Johnson ve ekibinin 2012 yılında yaptıkları çalışmada TP, TB ve CF'nin DNA ile etkileşimini UV-spektrofotometrisi ve IR-spektroskopi teknikleri incelemişlerdir. TP, TB ve CF için bağlanma sabitlerini sırasıyla 3.56×10^3 M⁻¹, 1.16×10^3 M⁻¹ ve 3.86×10^3 M⁻¹. Olarak hesaplamışlar ve etkileşimin elektrostatik kuvvetler ile gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Malode ve ekibi 2012 yılında yayımladıkları çalışmada TP'nin voltametrik davranışını incelemek için MWCNT modifiye bir CKE geliştirmişlerdir. Modifiye elektrot ve DPV yöntemi bir arada kullanılarak bir tayin yöntemi de geliştirmişlerdir. Elektrolit çözeltisi olarak fosfat tamponu kullanmışlar ve pH: 3,0 değerinde en iyi sonuçları aldıklarını belirtmişlerdir. Geliştirdikleri analiz yöntemi 1.97×10^{-8} M LOD değeriyle birlikte 2.0×10^{-6} – 1.5×10^{-4} M doğrusal çalışma aralığı elde etmişlerdir. Geliştirilen yöntem ayrıca ilaç formülasyonları ve idrar örneğinde TP tayini için denemiş ve %96,5 – 100,2 geri kazanım değerleri elde etmişlerdir.

Amiri-Aref ve ekibi 2014 yılında yayımladıkları çalışmada noradrenalin (NA), asetaminofen (AAF), XT ve CF'nin eş zamanlı analizini ilk defa gerçekleştirmişlerdir. Bunun için CKE'nin yüzeyine sabitlenen fonksiyonlandırılmış MWCNT üzerinde luteolin'in elektrokimyasal olarak toplanmıştır. Dört maddenin eşzamanlı tayini için elektrolit çözeltisi olarak fosfat tamponu (pH: 7,0) kullanmışlardır. Geliştirilen DPV tekniği ile NA, AAF, XT ve CF için LOD değerleri sırasıyla 0,53; 0,78; 0,65 ve 3,54 µM ve doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla 0,7 – 100,0; 0,9 – 80,0; 1,0 – 70,0 ve 10,0 – 110,0 µM değerlerini elde etmişlerdir. Geliştirilen yöntem ilaç numunelerinde dört maddenin ayrı ayrı tayini için kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Peng ve ekibi 2017 yılında yaptıkları çalışmada yiyecek örneklerinde TB'nin belirlenmesi için DPV tekniği ile birlikte modifiye bir CKE kullanmışlardır. Modifiyer olarak karboksil-fonksiyonlandırılmış MWCNT kullanmışlar ve geliştirilen elektrotun karakterizasyonunu TEM, DV, EES, IR-spektroskopisi teknikleri ile gerçekleştirmişlerdir. TB'nin voltametrik davranışını incelediklerinde geliştirilen modifiye CKE üzerinde iki elektron:iki proton içeren bir yükseltgenme reaksiyonu verdiğini göstermişlerdir. Çalışmada TB için 0,21 μM LOD ile birlikte 0,5 – 80,0 μM doğrusal çalışma aralığı belirlemişlerdir. Geliştirilen yöntem yeşil çay, çikolata ve kahve örneklerinde TB tayini için denemiş ve %93,5 – 109,7 aralığında geri kazanım verileri elde etmişlerdir.

Mekassa ve ekibinin 2017 yılında yaptıkları çalışmada TP ve CF'nin eşzamanlı tayini için KDV tekniği ile poli(L-aspartik asit) fonksiyonlu MWCNT kompozit modifiye bir CKE kullanılmıştır. TP ve CF için LOD değerleri sırasıyla 0,02 ve 0,28 μM , doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla 0,1 – 50,0 ve 1,0 – 150,0 μM değerlerini elde etmişlerdir. Ayrıca yeşil çay, kan serumu ve ilaç formülasyonlarında gerçek numune analizleri yapılmış ve %92,0 – 106,0 aralığında geri kazanım değerleri elde etmişlerdir.

Svorc ve ekibinin 2018 yılında yayımladıkları çalışmada TB'nin çikolata ürünlerinde tayini için BKEE kullanarak DPV ve KDV teknikleri ile bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem için 0,1 M H_2SO_4 'ü elektrolit çözeltisi olarak kullanılmışlardır. Her iki teknik için de 0,99 – 54,5 μM doğrusal çalışma aralığını belirlemişlerdir. DPV ve KDV yöntemleri için LOD değerleri sırasıyla 0,42 ve 0,51 μM bulmuşlardır.

Ferrag ve ekibinin 2020 yılında yaptıkları çalışmada XT, CF onların metabolit ürünü ürik asitin (ÜA) eşzamanlı analizini tiyol fonksiyonlu MWCNT üzerine altın kaplı kompozit bir karbon seramik elektrot (KSE) kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem için DPV tekniği 0,1 M fosfat tamponu (pH: 6,0) kullanmışlardır. ÜA, XT ve CF için LOD değerleri sırasıyla 50,0; 63,0 ve 354,0 nM ve doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla 2,5 – 225,0; 2,5 – 275,0 ve 10,0 – 1500,0 μM olarak bulmuşlardır. İnsan serumu ve idrarı

ile yapılan gerçek numune analizlerinde %98,1 – 102,6 aralığında geri kazanım değerleri elde etmişlerdir.

Jesny ve Kumar 2020 yılında yayımladıkları çalışmalarında XT, TP ve CF'nin eşzamanlı analizini enzimatik olmayan bir sensör kullanarak gerçekleştirmişleridir. Bunun için p-amino benzen sülfonik asidin yüzeyinde elektro-polimerize edildiği CKE ile KDV tekniğini kullanmışlardır. XT, TP ve CF için LOD değerleri sırasıyla 0,35; 7,02 ve 11,95 µM olarak ve doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla 0,9 – 100,0; 10,0 – 100,0 ve 10,0 – 100,0 µM olarak belirlemişlerdir. Geliştirdikleri yöntemi birçok ticari marka kahve, ilaç, insan serumu ve idrarında denemişler ve %99,5 – 99,9 aralığında geri kazanım değerleri elde etmişlerdir.

Gomes Junior ve ekibinin 2020 yılında yaptıkları çalışmada TB ve CF'nin eşzamanlı analizini fermente ve fermente edilmemiş Amazon kakao (*Theobroma cacao* L.) ekirdekleri üzerinde KDV tekniği kullanarak kromatik ayırma işlemi sonrası gerçekleştirmişlerdir. Elektrokimyasal tayin için BKEE kullanmışlardır. CF ve TB için LOD değerleri sırasıyla 0,027 ve 0,025 µM, doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla 0,027 – 0,093 ve 0,025 – 0,085 µM olarak belirlemişlerdir.

Patel ve çalışma arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmada dopamin (DP), askorbik asit (AA), ÜA, XT, TP ve TB'nin eşzamanlı belirlenmesi için TiO₂ nano çubukları ve MWCNT ile modifiye edilmiş CKE'ye dayalı yeni bir sensör geliştirmişler ve bunu DPV tekniği ile birlikte kullanmışlardır. Bu alışma XT, TP ve TB'nin eşzamanlı analizini ve altı molekülün eşzamanlı analizini içeren literatürdeki ilk çalışma olarak geçmektedir. DP, AA, ÜA, XT, TP ve TB için LOD değerleri sırasıyla 0,51; 0,06; 0,05; 0,09; 0,56 ve 0,75 µM, doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla 1,5 – 191,0; 0,45 – 147,0; 0,40 – 61,0; 0,50 – 586,0; 1,0 – 893,0 ve 1,5 – 1653,0 µM olarak belirtmişlerdir. İnsan idrarı ve çikolata tozunda yaptıkları gerçek numune analizleri sonucu %95,95 – 103,73 aralığında geri kazanım çalışmaları elde etmişlerdir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

Ksantin ($\geq \%99$), teofilin ($\geq \%99$), teobromin ($\geq \%98$), kafein ($\geq \%99$), ürik asit ($\geq \%99$), askorbik asit ($\geq \%99$), L-glisin ($\geq \%99$), asetik asit ($\geq \%100$), DNA (Sodyum tuzu, Calf Thymus), borik asit ($\geq \%99,5$), fosforik asit ($85,0 - 88,0$), sülfürik asit ($95 - 97$), nitrik asit ($\geq \%65$), NiO nano-partikülleri ($\geq \%99,8$; 50 nm) ve kitosan (orta moleküler ağırlıkta) ayrıca HCl ($36,5 - 38,0$) ve KCl ($99,0 - 100,5$) Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. Yaklaşık 10 nm çapında ve ortalama 1 – 2 μm uzunluğunda olan çok katmanlı karbon nano tüpler (MWCNT) Dropsens Company'den (İspanya) alınmıştır. Perklorik asit ($\geq \%60$) ve NaOH ($\geq \%97$) ise MERCK (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

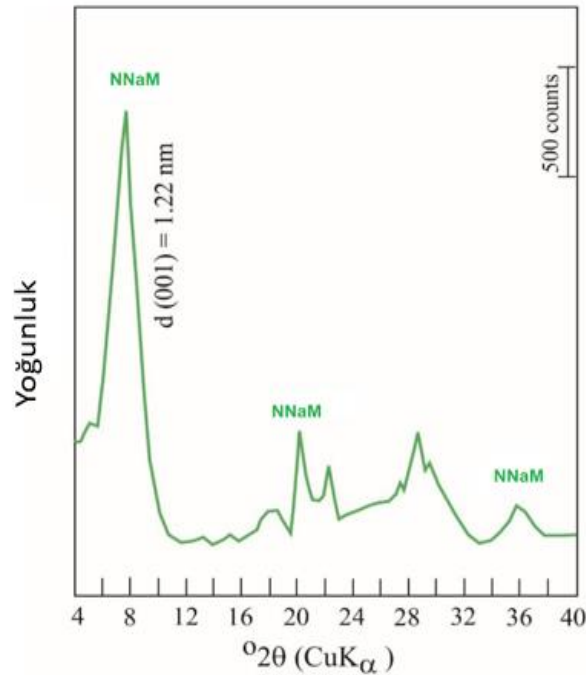
DNA stok çözeltisi (1000,0 mg/L) 5 mg DNA'nın 5 mL saf suda çözülmesi ile hazırlanmıştır. Stok çözeltinin derişimi 260 nm'de (λ_{max}) ölçülen UV-Spektrometresi sonuçları ile 2×10^{-3} M olarak belirlenmiştir (Bayraktepe 2021).

Çalışmada CF'nin DPV ve KDV analizleri için destek elektrolit olarak HNO_3 , H_2SO_4 , HCl ve HClO_4 0,1'er M kullanılmıştır. Geniş bir pH aralığına sahip BR tamponu XT, TP ve TB'nin eşzamanlı analizinde destek elektrolit olarak kullanılmıştır ve belirli miktarlarda borik asit, asetik asit ve fosforik asit karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.2 Sodyum montmorillonitin saflaştırılması

Na-Montmorillonit Ankara Üniversitesi Fizikokimya bölümünden Sayın Prof. Dr. Müşerref Önal ve çalışma grubu tarafından saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. NNaM'ın X-ışını kırınım (XRD) modeli, 0,15418 nm'ye sahip $\text{CuK}\alpha$ radyasyonu ve bir Ni filtresi ile bir Rigaku D-Max 2200 Toz Kırınım ölçer kullanılarak elde etmişlerdir. Numunenin kasyon değişim kapasitesini metilen mavisi standart yöntemi ile belirlemişlerdir. Aynı numunenin spesifik yüzey alanı ve spesifik gözenek hacmi, sıvı

Azot sıcaklığında (-195°C) azot adsorpsiyon/desorpsiyon verileri ile değerlendirmişler, Quantachrome Nova 2200 yüzey alanı ve bir gözenek boyutu analizörü ile ölçmüşlerdir. Türkiye, Reşadiye/Tokat bölgesinde bulunan ham bentonitten elde edilen Na-montmorillonit kil minerali, kil mineralleri olarak sodyum montmorillonit (NNaM), kalsiyum montmorillonit (NCaM) ve illit ile klinoptilolit, kalsit, dolomit, kuvars, feldispat, kil olmayan safsızlıklar olarak opal-CT içerdiğini bildirmişlerdir. (Koç vd. 2013). Kalsit ve dolomiti, seyreltik hidroklorik asit çözeltisi içinde çözülerek uzaklaştırılmışlar, daha sonra geri kalan kısım santrifüj edip distile su ile yıkamışlardır. Elde ettikleri katıyı, sodyum klorür (NaCl) çözeltisine (1.70 M) eklemişler ve 30 dakika kaynattıktan sonra 24 saat oda sıcaklığında dinlendirmişlerdir. Bu işlem sırasında NCaM'ı kation değişimi yoluyla NNaM'a dönüştürmüşlerdir. Heterojen karışımı deflokülasyon ederek üst fraksiyonu, süzerek ayırmışlar ve santrifüjlemişlerdir. Son olarak çökelttiyi, seyreltik bir AgNO_3 çözeltisi ile klorür iyonlarından arındırılınca kadar yıkamışlardır.



Şekil 3.1 Sodyum-montmorillonitin XRD modeli (NNaM: nano-sodyum-montmorillonit)

İzole edilmiş NNaM'ın varlığı, Şekil 3.1'deki XRD modelindeki karakteristik piklerinden görülmektedir. Bu kil minerali için ara katman aralığı değerini, d_{001} , Bragg denklemini

($d=n\lambda / 2\sin\theta$) kullanarak 1,22 nm hesapladıklarını belirtmişlerdir. Numunenin katyon değişim kapasitesini 1,15 mol/kg olarak elde etmişlerdir. NNaM'nin spesifik yüzey alanını, Brunauer-Emmett-Teller (BET) yöntemini kullanılarak adsorpsiyon izoterminden 51,0 m²/g olarak türetmişlerdir. Spesifik gözenek hacmini (maksimum adsorpsiyon kapasitesinin sıvı Azot hacmi) ise 0,071 cm³/g olarak belirlemişlerdir.

3.1.3 Kullanılan cihazlar ve elektrotlar

Tampon ve destek elektrolit çözeltilerinin pH değerleri HANNA HI2211 pH/ORP metre ile ayarlanmıştır. Tampon çözeltinin pH değerini cihazda ölçerken ayarlama için 0,01; 0,1 ve 1,0 M HCl ve NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Ayrıca tüm çözelti ve deneyler için saf su mpMINipure damıtma cihazı ile üretilmiştir.

Voltametrik deneyler (DV, DPV ve KDV) ve EES yöntemi, CHI 760B Potansiyostat/Galvanostat cihazı ve BAS C3 hücre-stant sistemi ile üçlü elektrot sistemi beraber kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu (BASi MF-2052), yardımcı elektrot olarak Platin tel (BASi MW-1032) ve çalışma elektrotu olarak çıplak kalem grafit elektrot (çKGE), NiO nanopatkilülleri (NiO) ile modifiye edilmiş KGE (NiO/KGE), çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ile modifiye edilmiş KGE (MWCNT/KGE), Na-montmorilonit nanokili ile modifiye edilmiş KGE (NNaM/KGE) ve NiO-MWCNT-NNaM modifiyerlerinin üçü ile modifiye edilmiş KGE (NiO/MWCNT/NNaM/KGE) kullanılmıştır.

DPV ölçümleri şu şartlarda gerçekleştirilmiştir; Potansiyel artışı: 0,004 V; Genlik: 0,05 V; Puls genişliği: 0,05 s; Örnek genişliği: 0,0167 s; Puls süresi: 0,5 sn. XT için potansiyel taraması 0,7 – 1,2 V; TP için potansiyel taraması 1,1 – 1,4 V; TB için potansiyel taraması 1,2 – 1,7 V; CF için potansiyel taraması 1,2 – 1,7 V.

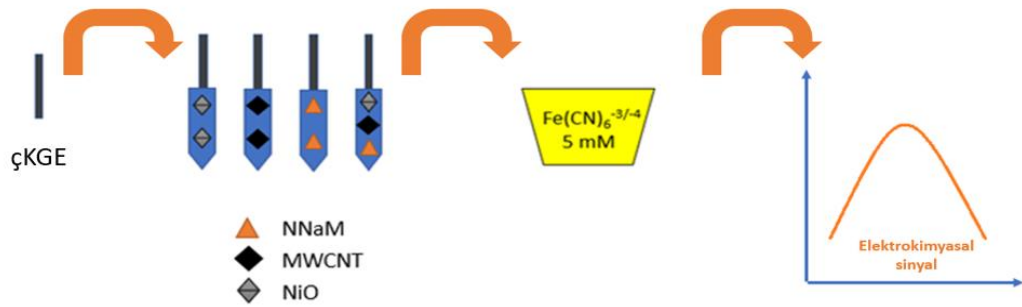
KDV ölçümleri şu şartlarda gerçekleştirilmiştir; Genlik: 0,025 V; Frekans: 15 Hz; Potansiyel artışı: 0,004 V CF için potansiyel taraması 1,2 – 1,7 V.

EES ölçümleri şu şartlarda gerçekleştirilmiştir; Frekans 0,1 – 100000 Hz aralığında açık devre potansiyelinde (E_{ADP}) uygulanmıştır.

Taramalı elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri ve EDX ölçümleri Carl Zeiss AG, EVO® 50 Serisi cihazı ile uygulanmıştır.

3.2 Kalem Grafit Elektrotun Modifikasyonu

Modifiye kalem grafit elektrotlar bir kompozit çözeltisi içinde belli bir süre bekletilerek üretilmişlerdir. Kompozit çözeltisi ilk olarak, %2,0 (v/v)'lik asetik asit çözeltisine kitosan (%1,0 (m/v)) eklenip homojen olarak dağılıncaya kadar karıştırılması ile hazırlanmaya başlanmıştır. Daha sonra modifiyer maddeler NiO NP, MWCNT ve NNaM ayrı ayrı kitosan çözeltilerine eklenip yine homojen olarak dağılıncaya kadar karıştırılarak kompozit çözeltileri hazırlanmış ve bu kompozit çözeltilerinde 1 saat bekletilerek sırasıyla NiO/KGE, MWCNT/KGE ve NNaM/KGE elektrotları üretilmiştir. NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensörü hazırlanırken ise kitosanın çözünme aşaması bittikten sonra kompozit çözeltisine sırasıyla NNaM, MWCNT ve NiO nano partikülleri eklenmiş ve çözelti homojen olarak dağılıncaya kadar karıştırılmıştır.

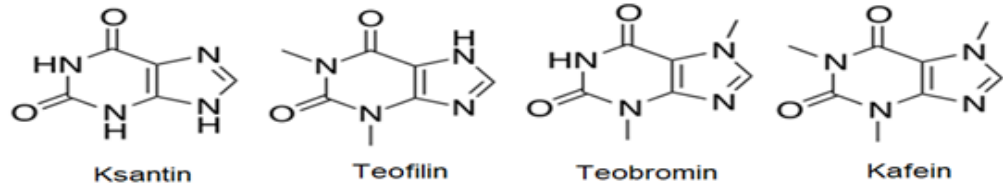


Şekil 3.2 Modifikasyon uygulamasının adımlarını içeren bir şema

Oluşturulan bu kompozit çözeltide çKGE bir saat bekletilerek NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensörü üretilmiştir. Daha sonra üretilen modifiye elektrotlar açık havada kurumaya bırakılmışlardır. Şekil 3.2’de modifikasyon şeması gösterilmektedir. Üretilen elektrotların hücre bağlantısı ise bakır teller ile yapılmıştır.

3.3 Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

XT, TP, TB ve CF'nin stok çözeltileri 10^{-2} M (10 mL) içerecek şekilde uygun miktarları tartılıp hazırlanmışlardır. TP ve CF direkt saf su ile ultrasonik banyoda hazırlanırken, XT ve TB'nin çözeltileri saf suda düşük çözünürlüğe sahip olmaları nedeniyle 0,05 M NaOH çözeltisi ile hazırlanmıştır. CF için kullanılan H_2SO_4 çözeltisi 0,1 M olarak hazırlanmış ve 0,01; 0,1 ve 1,0 M'lık HCl ve NaOH çözeltileri ile istenilen pH değeri pH metre yardımıyla ölçülmüştür. BR tamponu borik asit (0,04 M), asetik asit (0,04 M) ve fosforik asit (0,04 M) karıştırılarak hazırlanmıştır (Yılmaz 2012). BR tamponun (yaklaşık 0,04 M) pH değeri de aynı şekilde pH metre ile 0,01; 0,1 ve 1,0 M'lık HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Şekil 3.3'te bu tez çalışmasında kullanılan maddelerin açık yapıları gösterilmiştir.



Şekil 3.3 XT, TP, TB ve CF'nin açık molekül yapıları

Girişim çalışması için kullanılan ÜA, AA, L-glisin, Na_3PO_4 çözeltileri de yine 10^{-2} M olarak ölçümlerden hemen önce taze olarak hazırlanmışlardır. DNA etkileşimi için ise daha önce UV-Spektrometresi ile derişimi 2×10^{-3} M olarak belirlenen DNA çözeltileri kullanılmıştır. Çözeltiler ölçümlerden hemen önce laboratuvar ortamına bırakılıp oda sıcaklığına geldikten sonra elektrokimyasal hücreye eklenmişlerdir.

3.4 Kalibrasyon Çalışması

CF'nin analizi için çKGE ile yapılan DPV ve KDV ön deneme ölçümleri ile başlangıç derişimi olarak sırasıyla 30,0 ve 10,0 μ M değeri belirlenmiştir. Daha sonra derişim belirlenen oranlarda arttırılarak i_{pa} artışı incelenmiştir. DPV tekniğinde (30,0 – 1000,0) μ M CF, KDV tekniğinde ise (10,0 – 1000,0) μ M CF derişim aralıklarında standart

çözeltiler kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Benzer şekilde XT, TP ve TB'nin eşzamanlı analizi için de sırasıyla (0,5 – 150,0) μM , (5,0 – 250,0) μM ve (5,0 – 250,0) μM derişim aralıklarında kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

Tüm analiz yöntemlerinde LOD ve LOQ değerleri sırasıyla için 3s/m ve 10s/m yaklaşımı kullanılmıştır. Burada m, i_{pa} – C eğrisinin eğimini ve s ise kalibrasyonun en düşük derişimde elde edilen akım değerlerinin ortalamasının standart sapmasını ifade etmektedir.

3.5 Seçicilik ve Girişim Çalışmaları

Üçlü karışımın eş zamanlı analizinde NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensörünün seçiciliğini test etmek için iki molekülün derişimi sabit tutulup diğerinin derişimi arttırılarak XT, TP ve TB'nin tekli kalibrasyon çalışmaları uygulanmıştır. XT, TP ve TB için sırasıyla (0,5 – 150,0) μM , (5,0 – 250,0) μM ve (5,0 – 250,0) μM derişim aralıklarında incelenmiştir.

CF 50,0 μM 'ını içeren çözeltiye 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 oranlarında Na_3PO_4 , L-Glisin, ÜA, XT, TP ve TB eklenerek çKGE sensöründe girişim çalışmaları DPV ve KDV teknikleri ile uygulanmış ve tolerans limitleri hesaplanmıştır. XT, TP ve TB'nin eşzamanlı 50,0 μM 'ını içeren çözeltilere 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 ve 1:100 oranlarında Na_3PO_4 , L-Glisin, AA, ÜA ve CF eklenerek NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensöründe girişim çalışmaları gerçekleştirilmiş ve tolerans limitleri hesaplanmıştır. Tolerans sınırının belirlenmesi için, girişim yapan tür ortamdayken ölçülen analitin pik akımının, girişim yapan tür ortamda yokken ölçülen analitin pik akımına oranı en yüksek $\pm \%10$ hata oluşturan derişim değerleri belirlenmiştir.

3.6 Tekrarlabirlik Yeniden Üretilibilirlik ve Kararlılık Çalışması

NiO/MWCNT/NNaM/KGE elektrokimyasal sensörünün tekrar üretilibilirlik testleri aynı şartlarda üretilen beş özdeş elektrotun XT, TP ve TB'yi aynı anda içeren çözeltilerden DPV ölçümleri (n: 5) yapılarak incelenmiştir. Beş özdeş elektrot ile her bir analit için elde

edilen anodik akım değerlerine göre % RSD hesaplanmıştır. NiO/MWCNT/NNaM/PGE sensörünün tekrarlanabilirliği, üretilen bir elektrot üzerinden XT, TP ve TB'yi aynı anda içeren çözeltiden alınan çoklu DPV ölçümleri (n: 5) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir analite için elde edilen anodik akım değerlerine göre % RSD hesaplanmıştır.

NiO/MWCNT/NNaM/KGE elektrokimyasal platformunun kararlılığı 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/3-$ standart redoks probunun elli döngü DV analizi alınarak gerçekleştirilmiştir. Elli ölçüm sonunda elde edilen akım değerleri üzerinden bağıl standart sapma (% RSD) hesaplanmıştır.

% RSD değeri aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır;

$$\% RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad 3.1$$

Burada $\bar{x}$; elde edilen akım veya derişim değerlerinin ortalamasını ve s bu ortalamanın standart sapmasını göstermektedir.

3.7 Gerçek Numunelerin Hazırlanışı

XT, TP ve TB için yapılacak gerçek numune analizleri için yerel bir marketten Lipton earl grey siyah çay ve Ülker bitter çikolata örnekleri satın alınmıştır. Ürünlerde üç biyomolekülün de içeriğine yer verilmemesi nedeniyle standart ekleme metodu kullanılmıştır.

Siyah çay dikkatlice 4,0 g tartılmış ve 50,0 mL su ile 10 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra soğumaya bırakılmış ve süzülüp elde edilen çözelti stok çözelti olarak kullanılmıştır. Ölçümler için bu çözeltiden alınan 0,1 mL'lik kısım BR tamponu ile 10,0 mL'ye tamamlanmış ve elektrokimyasal hücreye aktarılmıştır. Sonuçlar üç ölçümün ortalaması alınarak %95 güven seviyesinde hesaplanmıştır.

Bitter ikolata 0,04 g/mL olacak şekilde dikkatlice tartılmış ve Bain-Maria yöntemi ile eritilmiştir (elik ve Gökmen 2018). Daha sonra eriyen çikolata 50,0 mL sıcak suda 15 dakika boyunca karıştırılıp daha sonra soğumaya bırakılıp szlmştir. Szlen bu çözelti stok çözelti olarak kullanılmıştır. Ölçümler için bu çözeltiden alınan 0,1 mL'lik kısım BR tamponu (pH: 2,0) ile 10,0 mL'ye tamamlanmış ve elektrokimyasal hücreye aktarılmıştır. Sonuçlar üç ölçümün ortalaması alınarak %95 güven seviyesinde hesaplanmıştır.

İnsan idrar numunesi için yetişkin bir bireyden numune alınmış ve bu numuneden direk 0,1 mL alınarak BR tamponu (pH: 2,0) ile 10 mL'ye tamamlanmış ve elektrokimyasal hücreye aktarılmıştır. Bu zelti üzerinden ölçümler alınmış daha sonra elektrokimyasal hücreye standart ekleme yöntemi ile bilinen miktarlarda XT, TP ve TB ilavesi yapılarak yine ölçümler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar üzerinden yüzde geri kazanım ve yüzde bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar üç ölçümün ortalaması alınarak %95 güven seviyesinde hesaplanmıştır.

Kola ve enerji içeceği için Coca Cola (150,0 mg/L CF) ve Red-Bull (150,0 mg/L CF) markaları kullanılmış ve bunların CF içerikleri geliştirilen iki yöntem ile hesaplanmıştır. Kalibrasyon çalışmalarında derişim değeri olarak mikro molar (µM) kullanılacağı için verilen mg/L terimi 194.19 g/mol molekül kütlesine sahip CF için 772 µM olarak hesaplanmıştır. Gazlı içecek türündeki bu örnekler analizden önce 10 dakika boyunca karıştırılarak gaz çıkışı sağlanmıştır. Daha sonra iki örnekten DPV ve KDV lmleri için belirli miktarlarda karıştırılan çözeltilerden alınıp zeri H₂SO₄ (pH: 1,0) ile 10,0 mL'ye tamamlanmıştır. Bu zeltiler üzerinden ölçümler alınmış daha sonra elektrokimyasal hücreye standart ekleme yöntemi bilinen miktarlarda CF ilavesi yapılarak yine ölçümler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar üzerinden yüzde geri kazanım ve yüzde bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar üç ölçümün ortalaması alınarak %95 güven seviyesinde hesaplanmıştır.

Yüzde geri kazanım değerleri (% GK) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır;

$$\% GK = \frac{C_2}{C_1} \times 100$$

3.2

Burada C₂ ölçülen derişim değerini, C₁ ise eklenen veya bilinen derişimi göstermektedir.

3.8 DNA Etkileşimi Çalışmaları

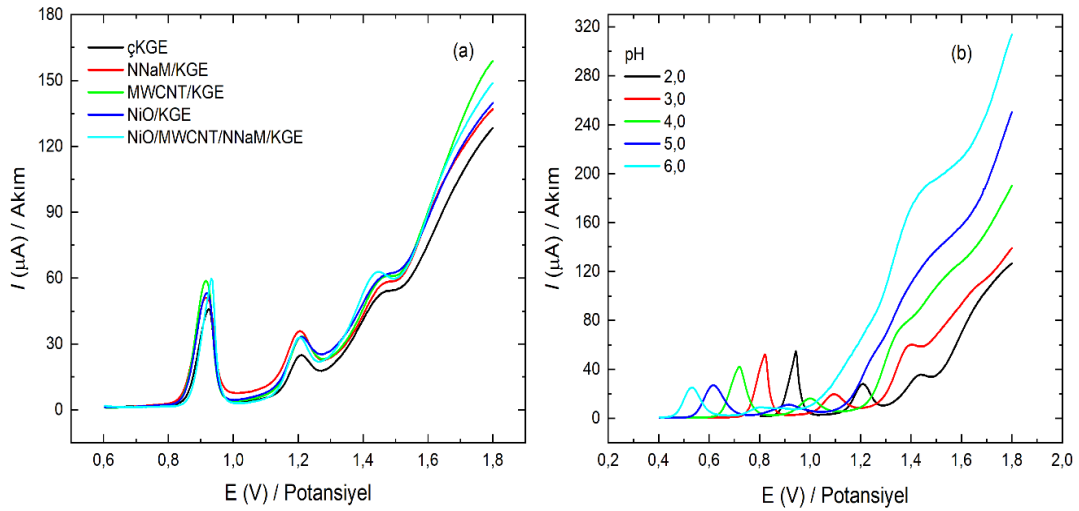
XT, TP ve TB için geliştirilen eşzamanlı analizin optimum verileri kullanılarak üç maddenin DNA ile etkileşimi DPV tekniği ve geliştirilen yeni NiO/MWCNT/NNaM/KGE ile ayrı ayrı incelenmiştir. Bunun için derişimi bilinen DNA elektrokimyasal hücre ortamına eklenerek DNA eklenmeden önce ve sonra yapılan ölçümler Eşitlik 2.18 ve 2.20 ile değerlendirilmiştir. DNA'nın XT, TP ve TB ile etkileşimi için bekleme süresi yapılan denemeler sonucunda 90 saniye olarak belirlenmiştir.

CF için geliştirilen analiz yönteminde elde edilen optimum koşullar kullanılarak çKGE yüzeyinde CF'nin DNA ile etkileşimi DPV ve KDV teknikleri ile incelenmiştir. Bunun için derişimi bilinen DNA elektrokimyasal hücre ortamına eklenerek DNA eklenmeden önce yapılan ölçümler Eşitlik 2.18 ve 2.20 ile değerlendirilmiştir. DNA ve CF'nin etkileşimi için bekleme süresi yapılan denemeler sonucunda 150 saniye olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Eşzamanlı Analiz için Yapılan Ön Deneme Çalışmaları

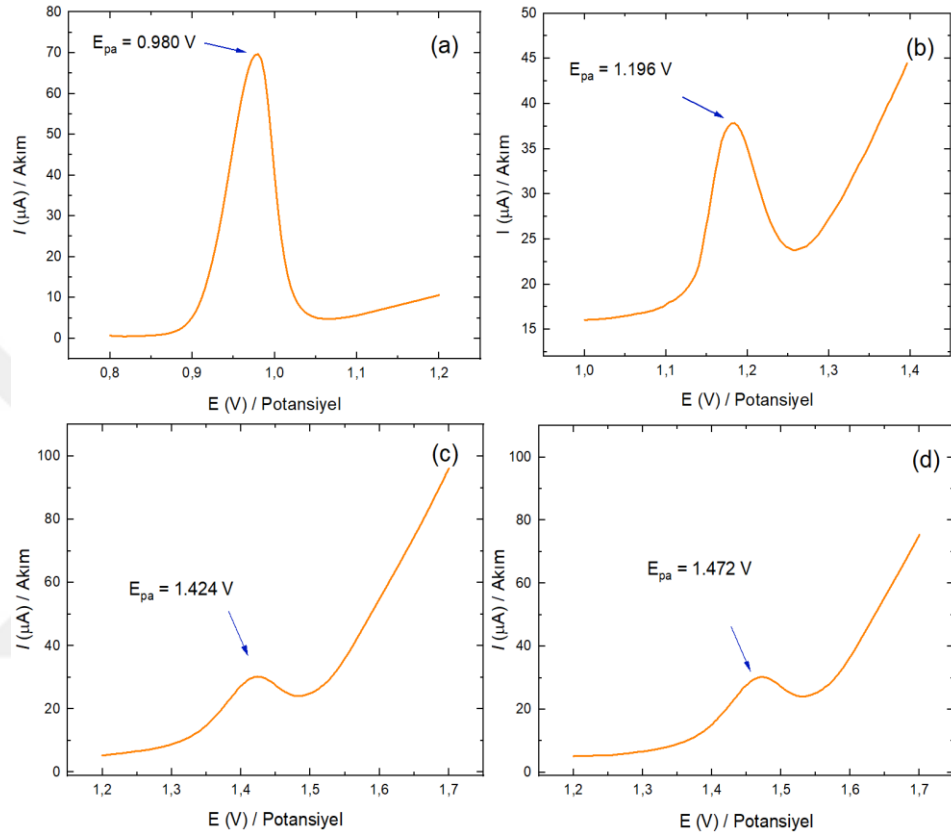
XT, TP, TB ve CF'nin eşzamanlı analizi için öncelikle özel bir modifiye elektrot geliştirilmiştir. Geliştirilen bu elektrokimyasal platform ile ilgili ayrıntılı değerlendirmelere geçmeden önce üretilen modifiye elektrotlar ile XT, TP, TB ve CF'nin eşzamanlı analizi için DPV yöntemi ile ön deneme çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1a). DPV yöntemi için belirtilen optimum koşullar ile 0,6 – 1,8 V potansiyel aralığında destek elektrolit BR tamponunda yapılan ölçümler sonucunda tüm elektrotlarda üç yükseltgenme piki gözlemlenmiştir. Buradan iki biyomolekülün yükseltgenme piklerinin çakıştığı açıkça görülmektedir. Ayrımı gerçekleştirmek için destek elektrolit çözeltisinin pH değeri değiştirilerek DPV ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.2b).



Şekil 4.1 70,0 μ M XT, 80,0 μ M TP ve 45,0 μ M TB ve 45,0 μ M CF'nin eşzamanlı DP voltamogramları; (a) çeşitli elektrotlarda (pH: 2,0) (b) farklı pH'larda NiO/MWCNT/NNaM/KGE'de

Voltamogramlarda her pH değerinde üç yükseltgenme piki gözlenmiştir. Yükseltgenme pikleri çakışan iki biyomolekülün ayrımı gerçekleştirilemediğinden her dört maddenin en yüksek pik akımlarının görüldüğü pH: 2,0'da ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensörü kullanılarak ayrı ayrı DPV ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.2). XT ve TP'nin bu

elektrokimyasal sensörde sırasıyla 0,940 V (Şekil 4.2a) ve 1,204 V'da (Şekil 4.2b) yükseltgenme pikleri vermiştir. TB ve CF'nin ise sırasıyla 1,424 V (Şekil 4.2c) ve 1,472 V'da (Şekil 4.2d) birer yükseltgenme piki verdiği görülmüştür. Elde edilen bu sonuç, dörütlü karışımında CF ve TB'nin yükseltgenme piklerinin üst üste çakıştığı göstermiştir.

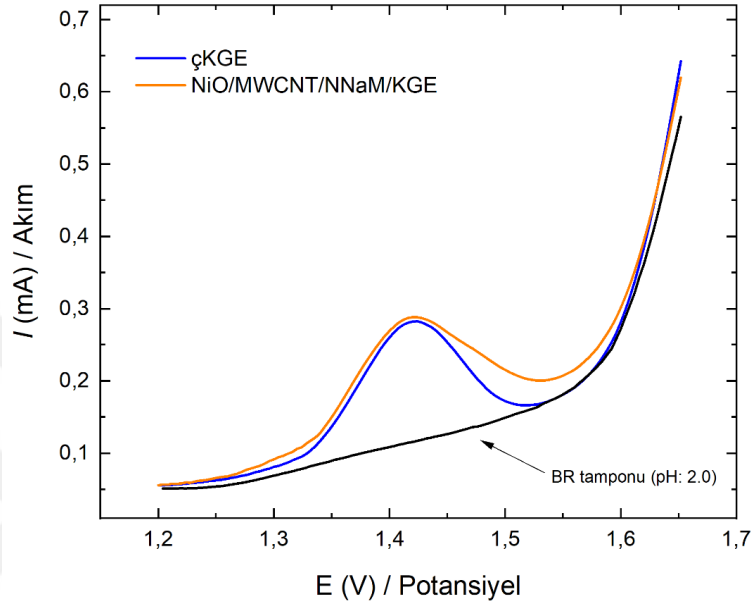


Şekil 4.2 NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensörü ile BR tamponunda alınan (pH: 2,0) DP voltamogramları; (a) 70,0 μM XT, (b) 80,0 μM TP, (c) 85,0 μM TB ve (d) 85,0 μM CF

Daha sonra yapılan literatür araştırmaları sonucunda XT, TP ve CF'nin eşzamanlı analizini içeren bir literatür bulunduğu (Jesny ve Kumar 2020) da göz önüne alınarak yeni geliştirilen elektrokimyasal platform ile XT, TP ve TB'nin eşzamanlı analizi gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

CF molekülü için de geliştirilen yeni elektrot ile deneme çalışmaları yapılarak CF'nin bu elektrot üzerindeki anodik pik akımları incelenmiştir. Bunun için CF'nin aynı şartlarda

çKGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensörü kullanılarak DPV ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.3). Buradan görüleceği gibi modifikasyonun CF'nin pik akımı üzerinde önemli bir geliştirme yapmadığı görülmektedir. Böylece CF için çKGE kullanılarak DPV ve KDV yöntemleri ile birer analiz yöntemi geliştirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.3 10^{-3} M CF'nin çKGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE kullanılarak alınan DP voltamogramları

4.2 Modifiye Elektrot için Optimizasyon Karakterizasyon ve Performans Değerlendirmesi

Başlangıçta, modifiyer maddelerin karışımına karar vermek için referans bir standart olan $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ probu (5,0 mM) ve destek elektrolit olarak 0,1 M KCl kullanılarak DV tekniği ile üretilen elektrotların 100 mV/s tarama hızında ölçümleri alınmıştır. Probun yükseltgenme ve indirgenme potansiyeli arasındaki fark (ΔE_p) ve daha yüksek pik akımı parametrelerine göre çalışma elektrotunun içeriği belirlenmiştir. Daha sonra bileşimi belirlenen sensör ile XT, TP ve TB'nin karışımını içeren çözeltide DPV yöntemi ile eşzamanlı analiz uygulanmıştır.

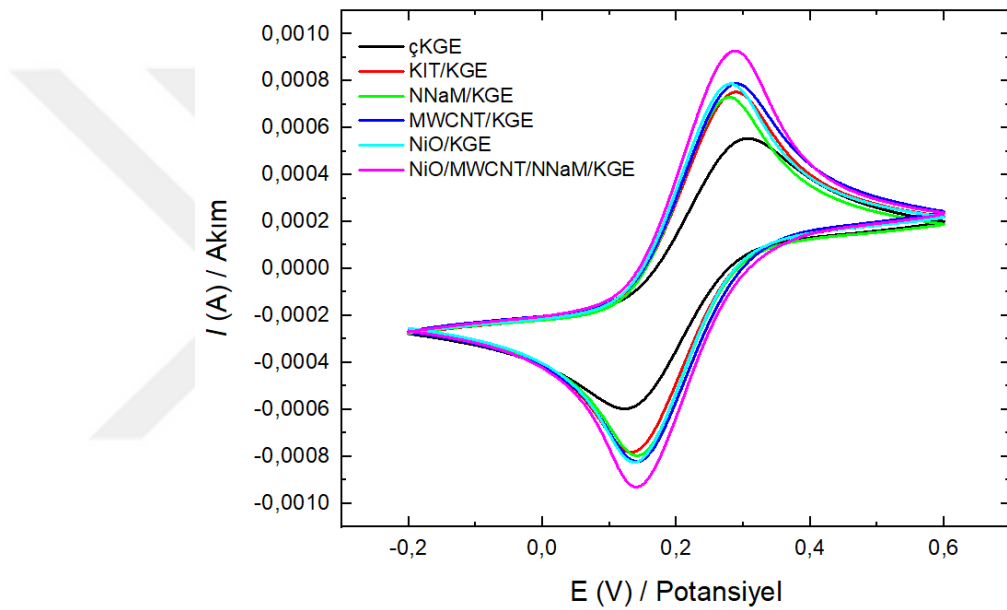
XT, TP ve TB'nin eşzamanlı analizini gerçekleştirmek için öncelikle geliştirilen elektrokimyasal platform ile modifiyer maddelerin miktarlarının optimizasyonu, üçlü karışımda yapılan DPV ölçümleri ile değerlendirilmiştir. XT, TP ve TB'nin anodik pik akımlarının hangisinde en yüksek değerde olduğu ve pik potansiyellerinin birbirlerinden ayrımları gibi veriler değerlendirilerek çalışma elektrotu seçimi yapılmıştır. Bu aşamadan sonra SEM-EDX çalışması ile üretilen elektrokimyasal platformların yüzey morfolojileri ve bileşimleri incelenmiştir. Son olarak modifiye elektrotun performansı DV ve EES yöntemleri ile sırasıyla elektrotun aktif yüzey alanı (A) ve yük transfer direnci (R_{CT}) araştırılmıştır.

4.2.1 Modifiye elektrot bileşiminin belirlenmesi

Hazırlanacak kompozit çözeltisinin içeriğini belirlemek için çKGE, NiO, MWCNT ve NNaM bileşenleri ile tekli (NiO/KGE, MWCNT/KGE ve NNaM/KGE) ve üçlü (NiO/MWCNT/NNaM/KGE) kompozit elektrotlar hazırlanmış, DV tekniği ile 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ redoks probu kullanılarak hazırlanan çalışma elektrotlarının 100 mV/s tarama hızında DV ölçümleri alınmıştır. Bu voltamogramlar Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Voltamogramlardan görüldüğü gibi en yüksek anodik ve katodik pik akımı NiO/MWCNT/NNaM/KGE ile elde edilmiştir. çKGE, NNaM/KGE, MWCNT/KGE, NiO/KGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE elektrotları için ΔE_p değerleri sırasıyla 0,185 V; 0,159 V; 0,148 V; 0,142 V ve 0,137 V olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar modifiyerlerin, elektrokimyasal pikleri sinerjik olarak geliştirdiğini göstermektedir. Buna göre, NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensörünün eşzamanlı analiz için daha iyi bir elektrokimyasal performansla sahip olabileceği düşünülmüştür.

Bu aşamadan sonra üretilen elektrotlar ile DV tekniği ve $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ redoks probu kullanılarak çoklu DV ölçümü alınmış (50 döngü) ve elektrotların kararlılığı karşılaştırılmıştır. Elli döngü şeklinde alınan ölçümler sonucunda elde edilen anodik ve katodik pik akımlarından elde edilen veriler (i_{pa} ve i_{pk}) üzerinden % RSD değerleri hesaplanmıştır. Bu değer çKGE, NNaM/KGE, MWCNT/KGE, NiO/KGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE için sırasıyla %3,03; %2,82; %4,83; %4,21 ve %1,51 olarak hesaplanmıştır. NiO/KGE ve MWCNT/KGE için elde edilen % RSD verileri çKGE'ye

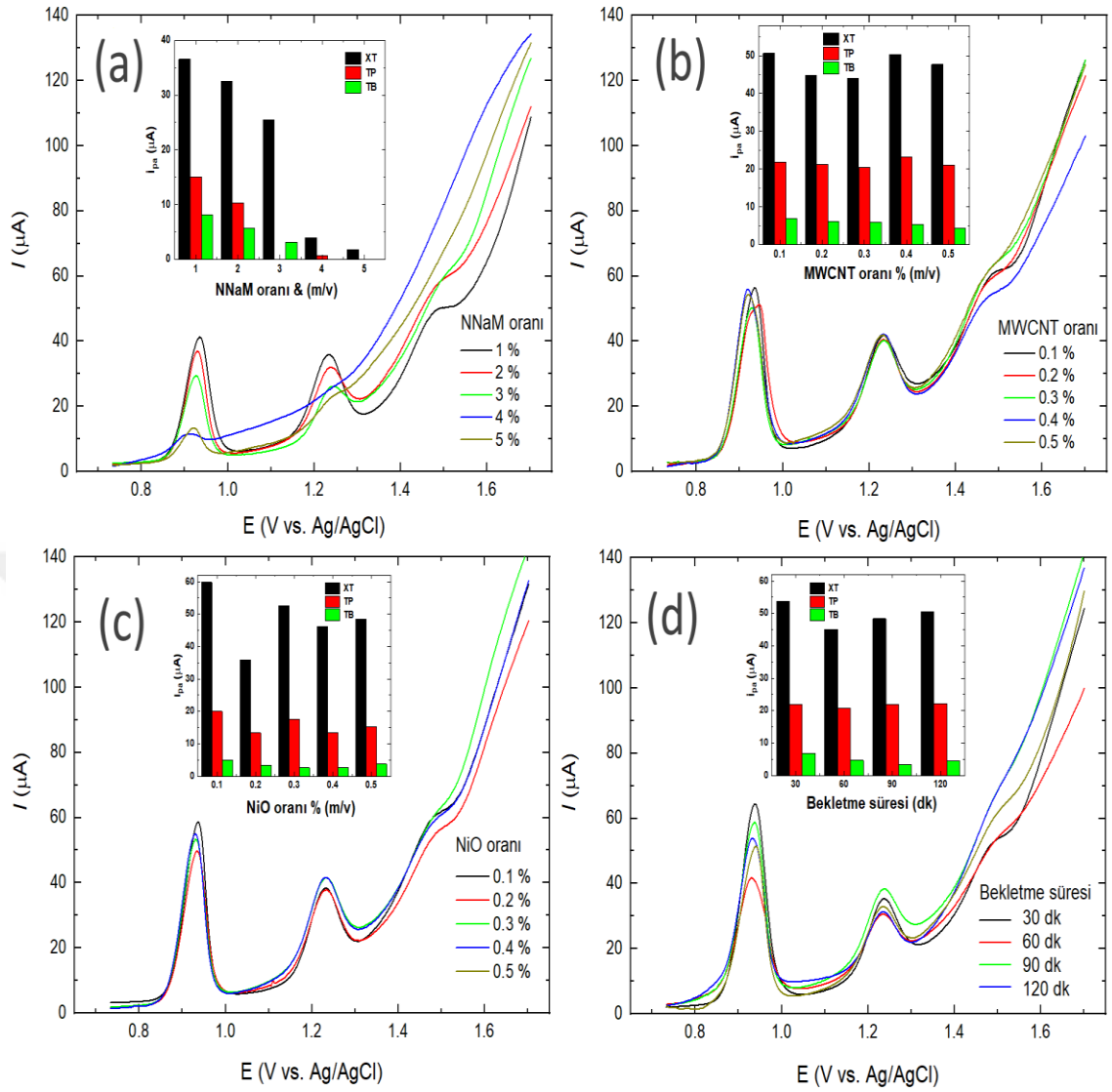
göre daha yüksek sonuçlardır. NiO ve MWCNT akım değerlerini arttırsa da ölçümlerin kesinliği konusunda çKGE'den daha kötü sonuç gösterdikleri görülmektedir. NNaM/KGE, çKGE'ye göre daha kesin ve kararlı sonuçlar vermiştir ve üç modifiyerin birleşiminde MWCNT ve NiO nano partiküllerinin elektrot yüzeyinde bolca bulunan NNaM nano partikülleri üzerinde homojen yayılarak daha kesin ve geliştirilmiş akım yanıtları vermiştir. Buradan XT, TP ve TB'nin eşzamanlı analizi için NiO/MWCNT/NNaM/KGE elektrokimyasal platformunun kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.4 Hazırlanan elektrokimyasal platformların 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu ile alınan DV voltamogramları (v : 100 mV/s, potansiyel taraması: (- 0,2) – (+ 0,6 V)

4.2.2 Modifiyer miktarlarının ve bekletme süresinin optimizasyonu

Eşzamanlı analiz için kullanılacak karşımin (XT, TP ve TB) ve modifiye elektrokimyasal platformda kullanılacak kompozit karşıminı belirlendikten sonra, modifiyerlerin kompozit çözeltideki optimum miktarları XT, TP ve TB'nin DPV pik akım yanıtları incelenerek belirlenmiştir. Bu analizlerle ilgili sonuçlar Şekil 4.5'te gösterilmektedir.



Şekil 4.5 40,0 μM XT; 55,0 μM TP ve 32,0 μM TB'nin farklı modifiyer oranlarında DP voltamogramları: (a); NNaM oranı, (b); MWCNT oranı, (c); NiO oranı ve (d) bekletme süresi (iç grafik: XT, TP ve TB'nin i_{pa} yanıtları)

NNaM miktarının optimizasyonu için MWCNT ve NiO miktarları sabit (%0,2 (m/v)) tutulup NNaM miktarı %1,0 – 5,0 (m/v) aralığında değiştirilerek ölçümler alınmıştır. %4,0 oranında sadece XT molekülü için 0.902 V'da yayvan bir pik vermiştir. %3,0 NNaM oranında XT ve TP için sırasıyla 0.93 ve 1.242 V'da belirgin yükseltgenme pikleri gösterse de TB için çok yayvan bir pik vermiştir. En iyi iki sonuç %1,0 ve %2,0 değerlerinde alınırken en yüksek pik akımı gösteren ve yükseltgenme potansiyelleri arasındaki fark daha az olan %1,0 NNaM oranı optimum değer olarak alınmıştır (Şekil

4.5a). Burada XT, TP ve TB için sırasıyla 0,934; 1,238 ve 1,484 V'da belirgin yükseltgenme pikleri gözlenmiştir.

MWCNT optimizasyonu için NNaM (%1,0 (m/v)) ve NiO (%0,2 (m/v)) miktarı sabit tutulup MWCNT miktarı %0,1 – 0,5 (m/v) aralığında değiştirilerek ölçümler alınmıştır. MWCNT oranı %0,1; %0,4 ve %0,5 değerlerinde XT için sırasıyla 0,937; 0,921 ve 0,925 V değerlerinde birbirlerine yakın pik akımı değerleri veren keskin yükseltgenme pikleri gözlenmiştir. %0,5 MWCNT oranında TB için pik gözlenememiştir, TP için her yüzde MWCNT oranı aynı pik potansiyel değeri ve yakın pik akımı değerleri vermiştir. %0,1 MWCNT oranında ise her üç molekül için belirgin iyi tanımlı pikler görülmektedir. Bu nedenle %0,1 değeri optimum değer olarak alınmıştır (Şekil 4.5b). Burada XT, TP ve TB için sırasıyla 0,933; 1,233 ve 1,485 V'da belirgin yükseltgenme pikleri gözlenmiştir.

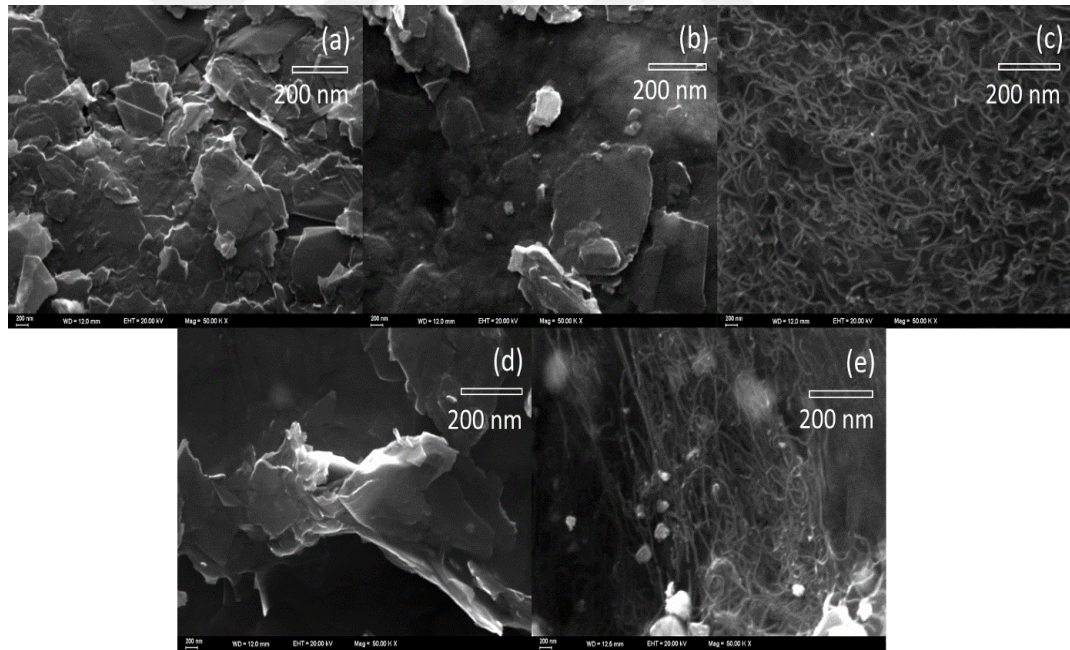
NiO miktarı optimizasyonu için NNaM (%1,0 (m/v)) ve MWCNT (%0,1 (m/v)) miktarı sabit tutulup NiO miktarı %0,1 – 0,5 (m/v) aralığında değiştirilerek ölçümler alınmıştır. %0,4 ve %0,5 NiO oranlarında üç madde için kararlı pikler gözlenememiştir. Sadece %0,1 NiO oranında XT, TP ve TB'nin belirgin iyi tanımlı pikler görüldüğünden %0,1 değeri optimum değer olarak alınmıştır (Şekil 4.5c). Burada XT, TP ve TB için sırasıyla 0,937; 1,237 ve 1,489 V'da belirgin yükseltgenme pikleri gözlenmiştir.

Modifiyerlerin optimum miktarları belirlendikten sonra son olarak kompozit çözeltisinde bekletme süresi optimize edilmiştir. Bunun için elektrotlar kompozit çözeltisi içinde 30, 60, 90, 120 ve 150 dakika bekletilerek ölçümler yapılmış ve sonuç olarak 30 dakika değeri optimum bekletme süresi olarak alınmıştır (Şekil 4.5d). 30 dakika hem kısa bir süre olması ve bu sürede XT, TP ve TB için en yüksek pik akımı değerlerini verdiği için seçilmiştir.

4.2.3 Modifiye elektrot yüzeyinin karakterizasyonu

Üretilen elektrotlardan NiO/KGE, MWCNT/KGE, NNaM/KGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE elektrotlarının yüzeyi TEM yöntemi ile incelenmiştir.

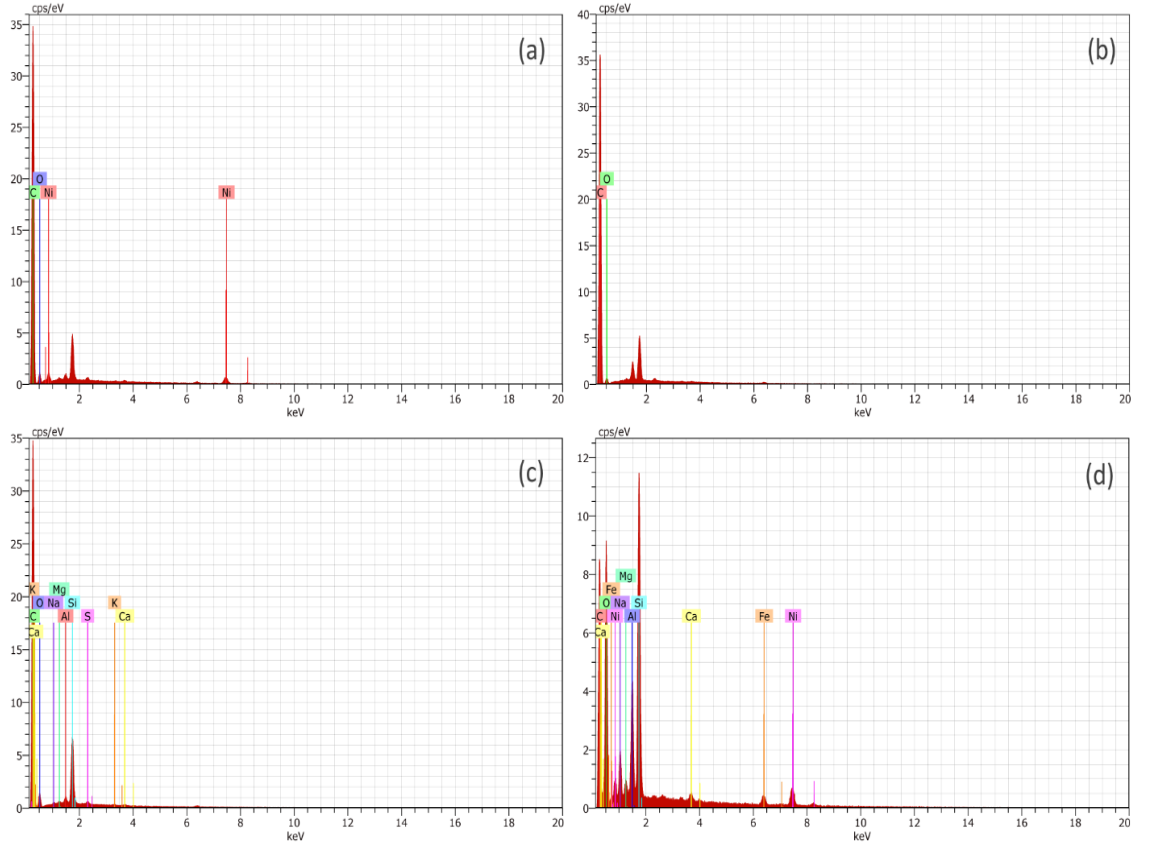
Çekilen görüntüler Şekil 4.6'da gösterilmektedir. çKGE'nin yüzeyi (Şekil 4.6a), düzensiz grafit levhalar nedeniyle pürüzlü ve katmanlı bir yüzeydir (Findik vd. 2021). NiO/KGE yüzeyi ise kompozit çözeltideki kitosan moleküllerinin katmanlı ve düzensiz grafit yüzeyini kapladığı, NiO NP'lerinin kitosan kaplı bu KGE yüzeyinde elektrokimyasal algılama noktaları gibi yerleştiği görülmektedir (Şekil 4.6b) (Opallo ve Lesniewski 2011, Jahani ve Beitollahi 2016). MWCNT/KGE yüzeyi, MWCNT'lerin karakteristik 3D yapısı nedeniyle çKGE yüzeyinden tamamen farklıdır (Şekil 4.6c) (Dehnavi ve Soleymanpour 2020). NNaM/KGE yüzeyinde, kitosan ile kaplanmış yüzeyde NNaM'nin dışa doğru gözenekli bir pozisyon aldığı gözlemlenmiştir. (Şekil 4.6d) (Mosai ve Tutu 2020). NiO/MWCNT/NNaM/KGE yüzeyinde ise NiO, NNaM ve MWCNT'nin oluşturduğu girintili çıkıntılı yüzeyde beyaz noktalar halinde görülmektedir (Şekil 4.6e). NiO/MWCNT/NNaM/KGE'nin katmanlı yapısı, kompozitin çKGE'ye göre daha geniş bir yüzey alanına sahip olabileceği görülmektedir.



Şekil 4.6 Üretilen elektrotların SEM görüntüleri; (a) çKGE, (b) NiO/KGE, (c) MWCNT/KGE, (d) NNaM/KGE ve (e) NiO/MWCNT/NNaM/KGE

NiO/KGE, NNaM/KGE, MWCNT/KGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE'nin EDX görüntülemesi Şekil 4.7'de gösterilmektedir. NiO/KGE'nin EDX spektrumu (Şekil 4.7a),

elektrot yüzeyinde NiO NP'lerinin varlığını göstermektedir (Opallo ve Lesniewski 2011, Jahani ve Beitollahi 2016). MWCNT/KGE'nin EDX spektrumu (Şekil 4.7b) ise sadece MWCNT bileşenleri olan C ve O elementlerini içermektedir (Dehnavi ve Soleymanpour 2020). NNaM/KGE yüzeyinde ise (Şekil 4.7c), NNaM kilinin yapısındaki karakteristik elementler gözlenmiştir (Mosai ve Tutu 2020). NiO/MWCNT/NNaM/KGE (Şekil 4.7d), kompozit filmdeki her içeriğin karakteristik pikleri EDX spektrumunda gösterilmiştir.

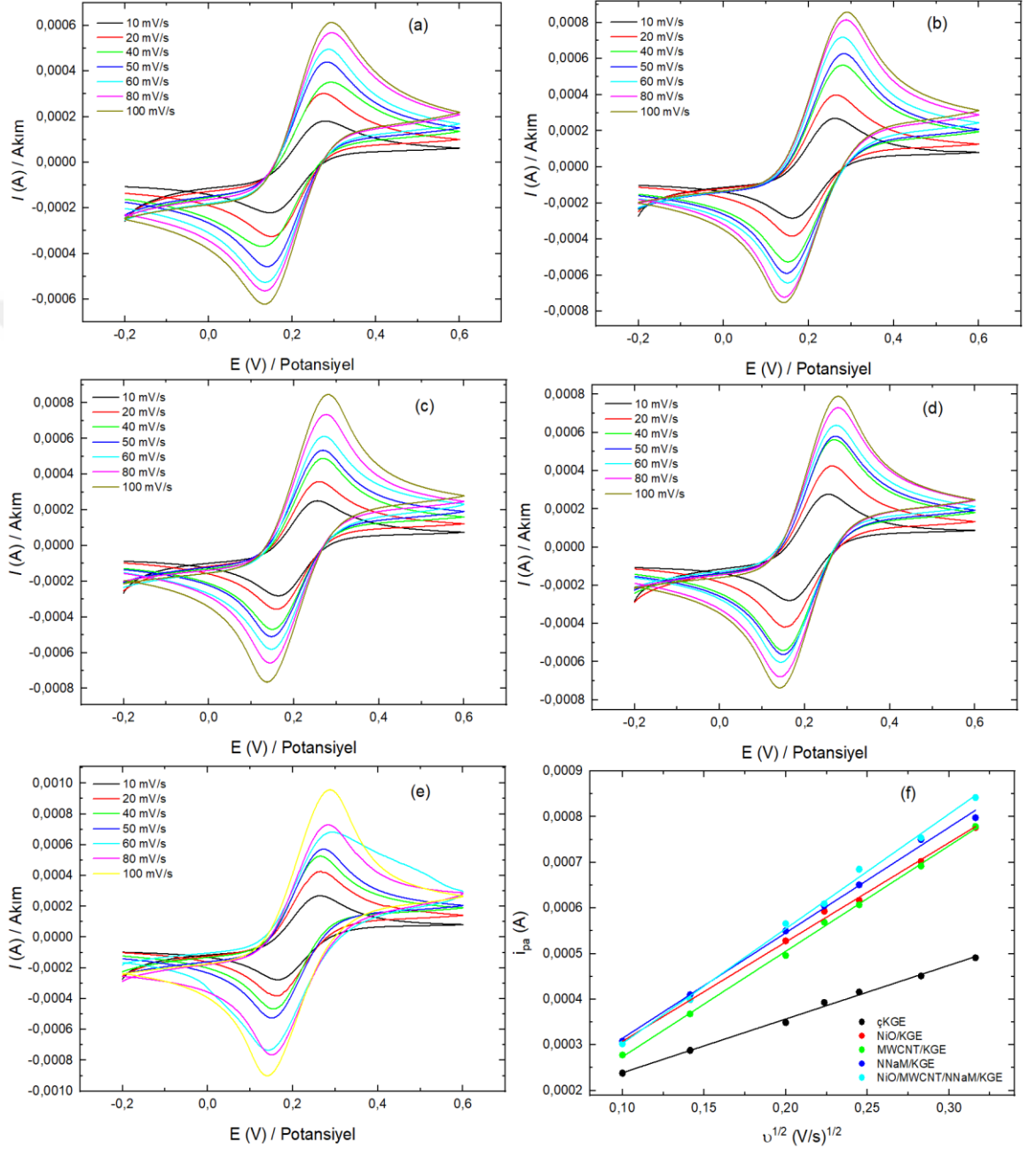


Şekil 4.7 Üretilen elektrotların EDX görüntüleri; (a) NiO/KGE, (b) NNaM/KGE, (c) MWCNT/KGE ve (d) NiO/MWCNT/NNaM/KGE

4.2.4 NiO/MWCNT/NNaM/KGE'nin elektrokimyasal performansı

çKGE ve modifiye KGE'lerin elektro-aktif yüzey alanlarını (A) hesaplamak için 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu kullanılarak çeşitli tarama hızlarında (v : 10, 20, 40, 50, 60, 80 ve 100 mV/s) DV ile ölçümler alınmıştır (Şekil 4.8). Tüm ölçümler, destek elektrolit

olarak 0,1 M KCl varlığında (- 0,2) – (+ 0,6 V) potansiyel aralığında uygulanmıştır. $i_{pa} - v^{1/2}$ grafiklerinin doğrusallığı (Şekil 4.8f), araştırılan tüm elektrotlardaki elektrokimyasal sürecin difüzyon-kontrollü olduğunu ifade etmiştir.



Şekil 4.8 Hazırlanan elektrotların 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu ile farklı tarama hızlarında DV voltamogramları; (a) cKGE , (b) NNaM/KGE , (c) MWCNT/KGE , (d) NiO/KGE , (e) $\text{NiO/MWCNT/NNaM/KGE}$ ile ve (f) $i_{pa} - v^{1/2}$ grafikleri

çKGE, NNaM/KGE, MWCNT/KGE, NiO/KGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE için $i_{pa} - v^{1/2}$ grafikleri için doğru denklemleri sırasıyla Eşitlik 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'te gösterilmektedir;

$$i_{pa} (A) = 1,180 \times 10^{-3} (\pm 3,310 \times 10^{-5}) v^{1/2} + 1,214 \times 10^{-4} (\pm 7,510 \times 10^{-6}), R^2 = 0,9953 \quad 4.1$$

$$i_{pa} (A) = 2,310 \times 10^{-3} (\pm 5,463 \times 10^{-5}) v^{1/2} + 8,337 \times 10^{-5} (\pm 1,239 \times 10^{-5}), R^2 = 0,9967 \quad 4.2$$

$$i_{pa} (A) = 2,310 \times 10^{-3} (\pm 3,732 \times 10^{-5}) v^{1/2} + 4,276 \times 10^{-5} (\pm 8,462 \times 10^{-6}), R^2 = 0,9984 \quad 4.3$$

$$i_{pa} (A) = 2,180 \times 10^{-3} (\pm 4,559 \times 10^{-5}) v^{1/2} + 9,020 \times 10^{-5} (\pm 1,034 \times 10^{-5}), R^2 = 0,9974 \quad 4.4$$

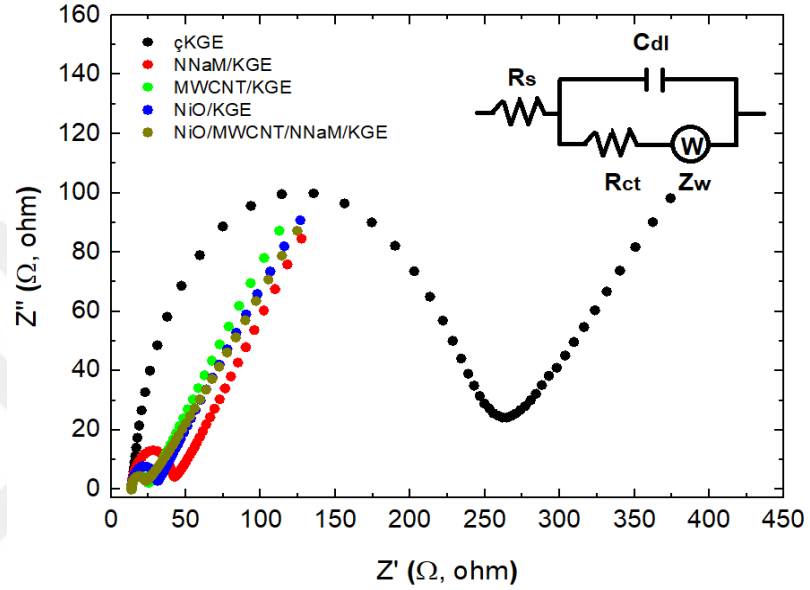
$$i_{pa} (A) = 2,510 \times 10^{-3} (\pm 5,973 \times 10^{-5}) v^{1/2} + 5,206 \times 10^{-5} (\pm 1,354 \times 10^{-5}), R^2 = 0,9966 \quad 4.5$$

çKGE, NNaM/KGE, MWCNT/KGE, NiO/KGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE için $i_{pa} - v^{1/2}$ grafiklerinin eğimleri sırasıyla 0,00118 (A/Vs⁻¹); 0,00231 (A/Vs⁻¹); 0,00231 (A/Vs⁻¹), 0,00218 (A/Vs⁻¹) ve 0,00251 (A/Vs⁻¹) olarak bulunmuştur. $i_{pa} - v^{1/2}$ grafiğinin eğimi ve Randles-Sevcik denklemi kullanılarak hesaplanan çKGE, NNaM/KGE, MWCNT/KGE, NiO/KGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE için aktif yüzey alanları sırasıyla 0,319 cm²; 0,624 cm²; 0,624 cm²; 0,589 cm² ve 0,678 cm² olarak hesaplanmıştır (Patel vd. 2020).

Elektrotların sertlik faktörleri (fr), [Fe(CN)₆]^{3-/4-} redoks probunun tersinir akımlarına göre modifikasyonun etkisini daha fazla değerlendirmek için kullanılmıştır. ' fr ' şu şekilde tanımlanır; $[A_2/A_1] = [i_{p2}/i_{p1}]$ (Krzyszmonik vd. 2014). Tersinir prosesler için Randles-Sevcik denkleminde göre, çKGE ve NiO/MWCNT/NNaM/KGE için, A_1 ve A_2 aktif yüzey alanlarını temsil ederken, i_{p1} ve i_{p2} sırasıyla yükseltgenme pik akımlarıdır. NiO/MWCNT/NNaM/KGE 1,93 ($\pm 0,29$) fr değerine sahiptir ve bu uygulanan modifikasyonun çKGE'ye kıyasla yüzey sertliğini ve yüzey alanını yaklaşık iki kat arttırdığını göstermiştir.

Hesaplanan yüzey alanı değerlerini desteklemek için çKGE ve modifiye KGE'lerin yük transfer dirençleri (R_{CT}) EES çalışmaları ile belirlenmiştir (Tohidinia vd. 2018). Şekil 4.9,

Randles eşdeğer devresi ile birlikte çKGE , NNaM/KGE , MWCNT/KGE , NiO/KGE ve $\text{NiO/MWCNT/NNaM/KGE}$ 'nin Nyquist diyagramlarını temsil etmektedir. R_{ct} değerleri sırasıyla $210,2 \, \Omega$; $26,65 \, \Omega$; $10,51 \, \Omega$; $16,24 \, \Omega$ ve $9,46 \, \Omega$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, modifikasyonun bir sonucu olarak $\text{NiO/MWCNT/NNaM/KGE}$ 'nin yük transfer direncinin büyük ölçüde azaldığını göstermektedir.



Şekil 4.9 Hazırlanan elektrotlarının EES yöntemi ile elde edilen Nyquist diyagramları

(Ek: Eşdeğer devre modeli; R_s çözelti direnci, R_{CT} yük transfer direnci, C_{dl} çift tabaka kapasitansı ve Z_w Warburg empedansı)

Katalitik aktiviteyi karşılaştırmak için literatürde akım değişiminin (I_0) tahmini değeri kullanılır ve Eşitlik 2.14 kullanılarak hesaplanabilir. Bu eşitliğe göre, çKGE ve $\text{NiO/MWCNT/NNaM/KGE}$ için hesaplanan I_0 değerleri sırasıyla $0,122 \, \text{mA}$ ve $2,617 \, \text{mA}$ olup, modifikasyonun katalitik aktiviteyi şiddetli şekilde arttırdığını göstermiştir.

4.3 Ksantin Teofilin ve Teobrominin Modifiye Elektrotta Eşzamanlı Tayinleri

XT, TP ve TB'nin eşzamanlı analizi için çalışma elektrotu $\text{NiO/MWCNT/NNaM/KGE}$ elektrokimyasal platformu seçilmiştir. Analiz yöntemi belirlenmeden önce XT, TP ve TB'nin geliştirilen yeni elektrottaki elektrokimyasal davranışları BR tamponu içinde DV

ve DPV teknikleri kullanılarak araştırılmıştır. Daha sonra kalibrasyon seçicilik, girişim ve gerçek numune analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.1 NiO/MWCNT/NNaM/KGE yüzeyinde elektrokimyasal davranışlar

Üç pürin molekülünün elektro-yükseltgenme mekanizmaları ve davranışları BR tamponunda (pH: 2,0) hazırlanan yeni sensör üzerinde tarama hızı çalışmaları ile araştırılmıştır. XT, TP, TB'nin 3. Bölümde belirtilen şartlarda alınan DV voltamogramları sırasıyla Şekil 4.10a, b ve c'de gösterilmektedir. Ayrıca $i_{pa} - v^{1/2}$, $\log i_{pa} - \log v$ ve $E_{pa} - \log v$ grafikleri sırasıyla Şekil 4.9d, e ve f'de gösterilmektedir. Voltamogramlardan görüldüğü gibi tarama hızı 25 – 300 mV/s'ye yükseldikçe, analitlerin anodik pik akımları artarken pik potansiyelleri daha pozitif potansiyellere kaymıştır. Ters taramada hiç pik gözlenmemesi XT, TP ve TB'nin çalışılan elektrokimyasal platform yüzeyindeki elektrokimyasal davranışlarının tersinmez yükseltgenme reaksiyonları olduğunu göstermiştir.

NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensörü yüzeyindeki yükseltgenme mekanizmaları için ilk olarak $i_{pa} - v^{1/2}$ grafiklerinin doğrusallığı araştırılmıştır. Elde edilen doğru denklemleri aşağıda gösterilmektedir;

$$i_{pa} \text{ (mA, XT)} = 0,008 \text{ (0,0001)} v^{1/2} - 0,0130 \text{ (0,0010)}, R^2 = 0,9996 \quad 4.6$$

$$i_{pa} \text{ (mA, TP)} = 0,003 \text{ (0,0001)} v^{1/2} - 0,0005 \text{ (0,0012)}, R^2 = 0,9950 \quad 4.7$$

$$i_{pa} \text{ (mA, TB)} = 0,005 \text{ (0,0003)} v^{1/2} + 0,0183 \text{ (0,0034)}, R^2 = 0,9833 \quad 4.8$$

$i_{pa} - v^{1/2}$ grafiklerinin doğrusallığı XT TP ve TB'nin sensör yüzeyi ile difüzyon-kontrollü bir mekanizma ile etkileştiğini belirtmektedir. Ayrıca $\log i_{pa} - \log v$ eğrilerinin eğimleri üzerinden de üç biyo-molekülün elektrot yüzeyiyle etkileşimini incelenmiş elde edilen doğru denklemleri aşağıda sıralanmıştır;

$$\log i_{pa} \text{ (mA, XT)} = 0,62 (\pm 0,02) \log v \text{ (mV/s)} - 2,43 (\pm 0,03), R^2 = 0,9970 \quad 4.9$$

$$\log i_{pa} \text{ (mA, TP)} = 0,49 (\pm 0,02) \log v \text{ (mV/s)} - 2,48 (\pm 0,04), R^2 = 0,9927 \quad 4.10$$

$$\log i_{pa} \text{ (mA, TB)} = 0,37 (\pm 0,02) \log v \text{ (mV/s)} - 1,66 (\pm 0,03), R^2 = 0,9922 \quad 4.11$$

XT, TP ve TB'nin $\log i_{pa} - \log v$ doğru denklemlerinin eğimleri sırasıyla 0,62; 0,49 ve 0,37'dir. Eğim değerleri 0,5'e yakın olması elektrot yüzeyinde XT, TP ve TB için difüzyon-kontrollü bir mekanizma ile yürütülen elektrokimyasal reaksiyonları göstermektedir (Anvari vd. 2021).

Tersinir olmayan bir mekanizma için, Laviron denklemi ile elektrot yüzeyinde transfer edilen elektron sayısını belirlemek için kullanılan $E_{pa} - \log v$ grafiklerinin doğru denklemleri aşağıda gösterilmiştir;

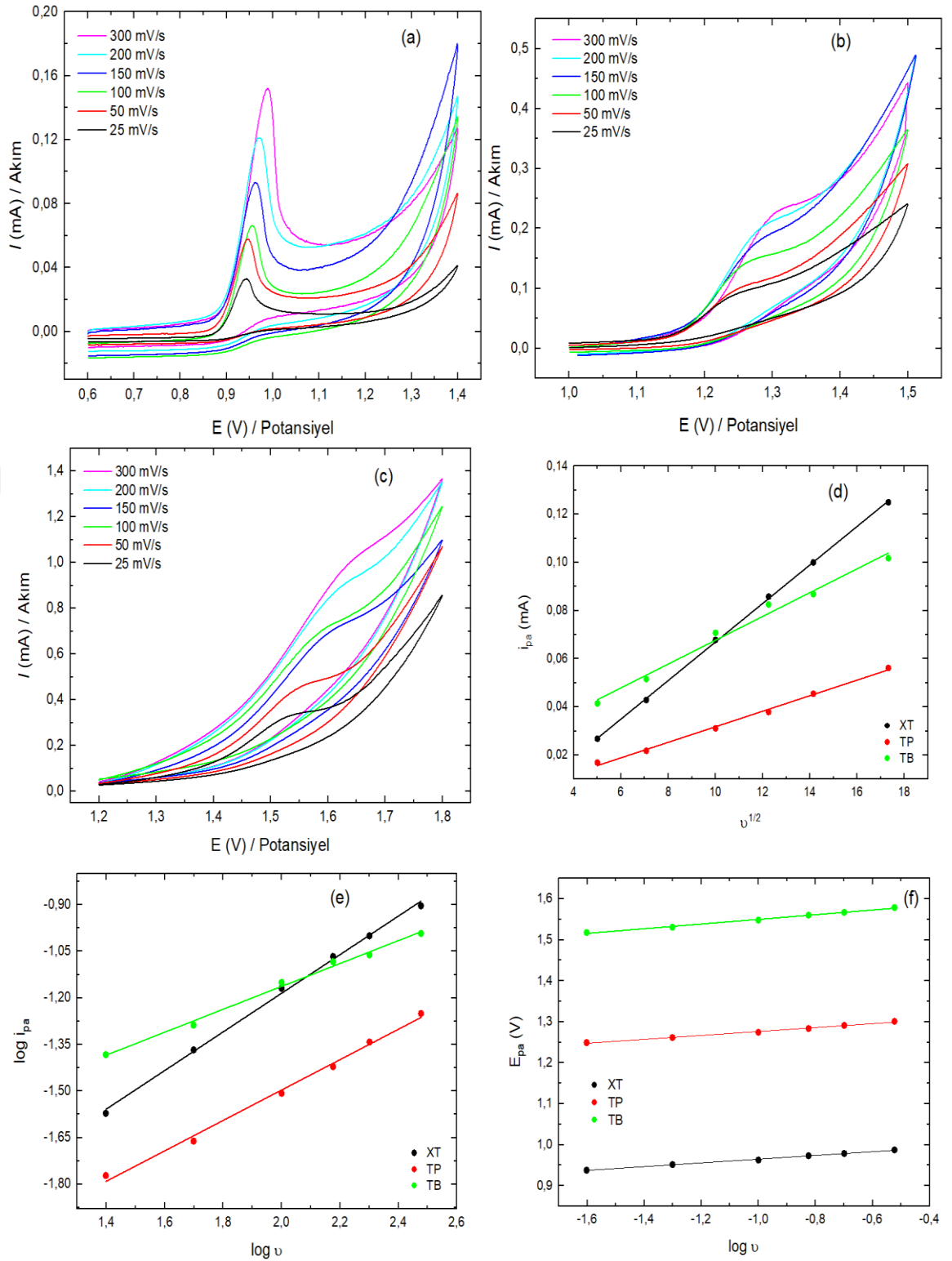
$$E_{pa} \text{ (V, XT)} = 0,046 (\pm 0,001) \log v \text{ (V/s)} + 1,010 (\pm 0,001), R^2 = 0,9957 \quad 4.12$$

$$E_{pa} \text{ (V, TP)} = 0,048 (\pm 0,002) \log v \text{ (V/s)} + 1,324 (\pm 0,002), R^2 = 0,99235 \quad 4.13$$

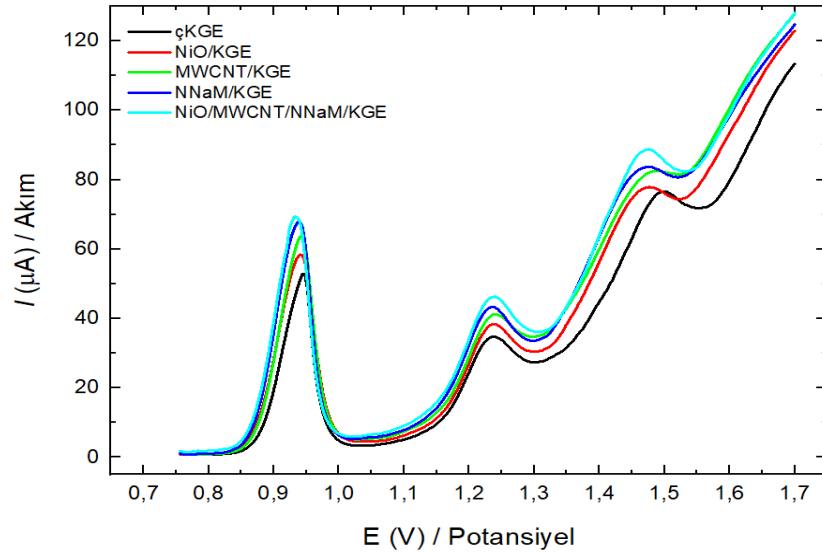
$$E_{pa} \text{ (V, TB)} = 0,057 (\pm 0,002) \log v \text{ (V/s)} + 1,607 (\pm 0,002), R^2 = 0,9936 \quad 4.14$$

Laviron eşitliği ile $[\alpha n]$ değerinin hesaplanması için $E_{pa} - \log v$ grafiğinin eğimi kullanılır. α , tersinmez reaksiyonlar için 0,5 olarak kabul edilir (Govda ve Nandibewoor 2014). Böylece XT, TP ve TB için hesaplanan elektrot yüzeyinde aktarılan elektrot sayıları (n) sırasıyla 2,38; 2,27 ve 1,90'dır.

75,0 μM XT, 55,0 μM TP ve 85,0 μM TB'nin elektrokimyasal sinyalleri, BR tamponunda (pH: 2,0) DPV tekniği kullanılarak çKGE ve modifiye KGE'ler ile incelenmiştir (Şekil 4.11). Tüm elektrotlar XT, TP ve TB'yi eşzamanlı tespit edebilse de $\text{NiO/MWCNT/NNaM/KGE}$, diğerlerine kıyasla en yüksek elektron transfer kinetiğinin olduğunu gösteren üç biyomolekülün tümü için en yüksek yükseltgenme pik akımlarını vermiştir. Ek olarak, $\text{NiO/MWCNT/NNaM/KGE}$, XT (0,932 V) ve TB (1,476 V) için çKGE 'ye kıyasla elektrot yüzeyinde katalitik aktiviteyi gösteren daha negatif yükseltgenme potansiyeli sergilemiştir. Bununla birlikte, TP'nin (1,233 V) yükseltgenme pik potansiyeli hemen hemen sabit kalmıştır.



Şekil 4.10 (a) 10^{-3} M XT, (b) 10^{-3} M TP, (c) 10^{-3} M TB için DV tekniği ile farklı tarama hızlarında alınan ölçümlere ait voltamogramlar ve (d) $i_{pa} - v^{1/2}$, (e) $\log i_{pa} - \log v$, (f) $E_{pa} - \log v$ grafikleri



Şekil 4.11 75,0 μM XT, 55,0 μM TP ve 90,0 μM TB'nin çeşitli çalışma elektrotları ile alınan DP voltamogramları

4.3.2 pH etkisi

Üç biyomolekülün elektrokimyasal davranışlarına ortam pH değerinin etkisi, evrensel geniş bir pH aralığı olan BR tampon çözeltisi ile pH 2,0 – 7,0 aralığında çalışılmıştır. BR tamponunun pH değerinin XT, TP ve TB'nin anodik pik akım ve potansiyellerine etkisi değerlendirilmiştir. Pik potansiyellerinin pH ile değişimini içeren voltamogramlar Şekil 4.12'de gösterilmektedir. Voltamogramlarda en yüksek pik akımı veren pH değerlerinin 2,0 ve 4,0 olduğu görülmektedir. Bunlar arasında pH: 4,0'da pH: 2,0 ile karşılaştırıldığında XT ve TP için hemen hemen aynı ve TB için daha düşük i_{pa} değerleri gözlemlenmiştir. pH: 2,0'da ise TB için daha yüksek i_{pa} değerleri verdiği görülmüştür. Bu nedenle eşzamanlı analiz için optimum değer olarak pH: 2,0 alınmıştır.

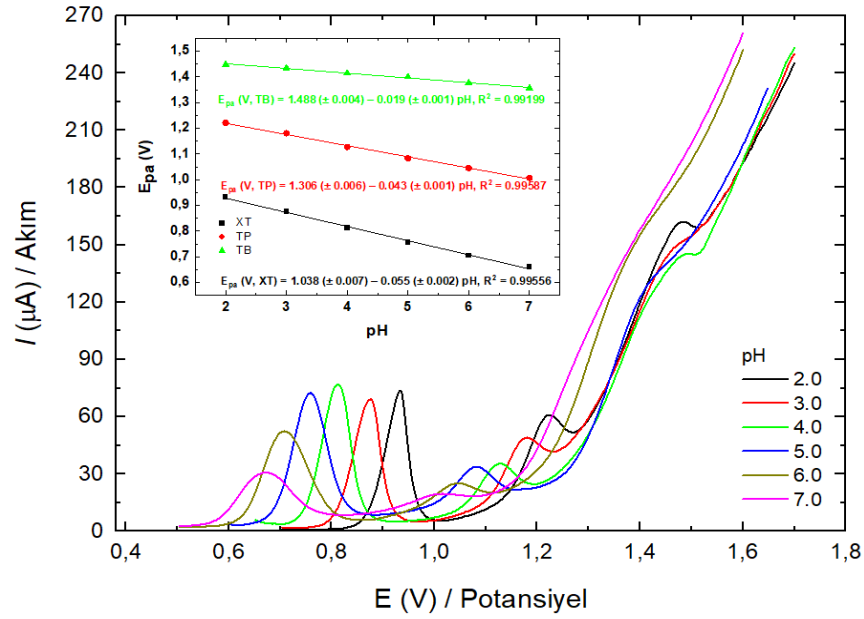
E_{pa} – pH eğrileri de Şekil 4.12 içinde gösterilmektedir. Bu eğrilere ait doğru denklemleri ise aşağıda gösterilmektedir;

$$E_{pa} (\text{V}, \text{XT}) = 1,038 (\pm 0,007) - 0,055 (\pm 0,002) \text{ pH}, R^2 = 0,9956 \quad 4.15$$

$$E_{pa} (\text{V}, \text{TP}) = 1,306 (\pm 0,006) - 0,043 (\pm 0,001) \text{ pH}, R^2 = 0,9959 \quad 4.16$$

$$E_{pa} (V, TB) = 1,488 (\pm 0,004) - 0,019 (\pm 0,001) \text{ pH}, R^2 = 0,9920$$

4.17



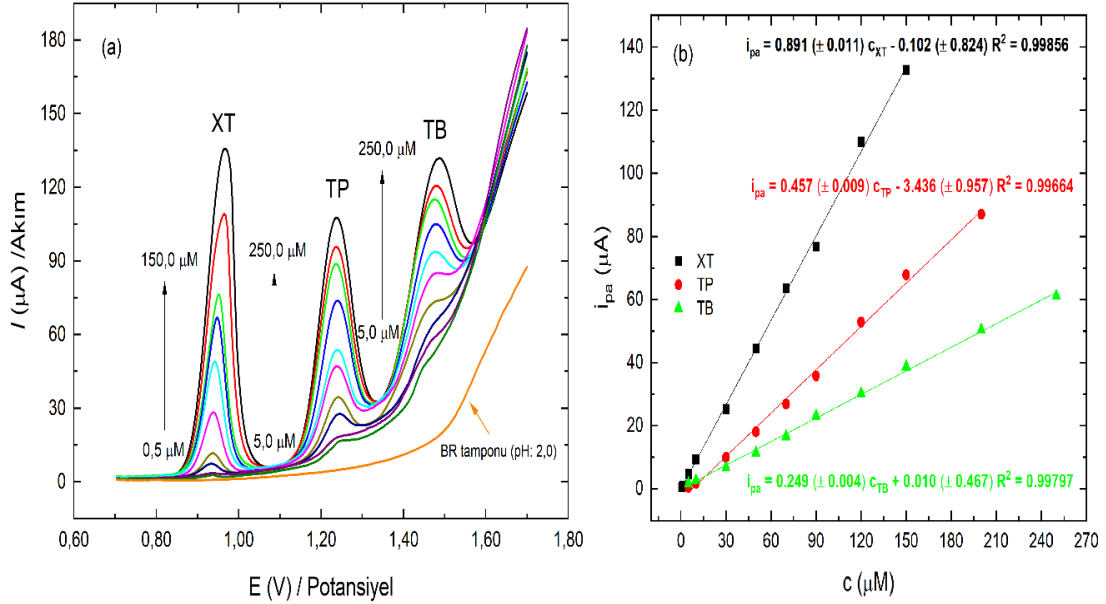
Şekil 4.12 NiO/MWCNT/NNaM/PGE yüzeyinde çeşitli pH değerlerinde BR tamponu ile 75,0 μM XT, 55,0 μM TP ve 90,0 μM TB'nin DPV voltamogramları (Şekil içi: E_{pa} – pH eğrileri)

Eğim değerleri, XT ve TP için 0,059 V/pH Nernst eğimine yakındır ve literatürdeki verilerle tutarlıdır, bu da XT ve TP'nin elektrokimyasal sensör üzerindeki yükseltgenme mekanizmasının eşit sayıda proton ve elektron içerdiğini göstermektedir (iki proton: iki elektron) (Li vd. 2019, Cinkova vd. 2015). TB için 0,019 V/pH'lik bir eğim, 0,059 V/pH'lik Nernst eğiminin yaklaşık üçte biri kadardır; bu durum, elektro-yükseltgenme mekanizmasının 4 proton:4 elektron içeren iki aşamalı bir yükseltgenme süreci olduğunu ortaya koyan literatür verileriyle uyumludur (Patel vd. 2020, Ferrak vd. 2020 ve Svorc vd. 2012).

4.3.3 DPV ile eşzamanlı analiz

Optimize edilen koşullar altında, XT, TP ve TB'nin derişimleri ile anodik pik akımları arasındaki ilişki, BR tampon çözeltisinde (pH: 2,0) hassas DPV yöntemi kullanılarak

NiO/MWCNT/NNaM/KGE elektrokimyasal platformu ile eş zamanlı olarak araştırılmıştır. Belirtilen derişimlerde alınan DP voltamogramları Şekil 4.13a'da ve kalibrasyon eğrileri 4.13b'de gösterilmektedir.



Şekil 4.13 (a) optimize edilmiş koşullarda XT (0,5 – 150,0 μM), TP (5,0 – 250,0 μM) ve TB için (5,0 – 250,0 μM) eş zamanlı tayinin DP voltamogramları, (b) XT (siyah), TP (kırmızı) ve TB'nin (yeşil) kalibrasyon eğrileri

Tüm regresyon parametreleri Çizelge 4.1'de gösterilmektedir. XT, TP ve TB için i_{pa} değerleri ile derişimleri arasındaki eş zamanlı doğrusal ilişki aşağıdaki denklemlerde gösterilmektedir;

$$i_{pa} (\mu\text{A}) = 0,891 (\pm 0,011) c_{XT} (\mu\text{M}) - 0,102 (\pm 0,824), R^2 = 0,9986 \quad 4.18$$

$$i_{pa} (\mu\text{A}) = 0,458 (\pm 0,009) c_{TP} (\mu\text{M}) - 3,436 (\pm 0,957), R^2 = 0,9966 \quad 4.19$$

$$i_{pa} (\mu\text{A}) = 0,249 (\pm 0,004) c_{TB} (\mu\text{M}) + 0,010 (\pm 0,467), R^2 = 0,9980 \quad 4.20$$

XT, TP ve TB için doğrusal aralıklar sırasıyla 0,5 – 150,0 μM ; 5,0 – 200,0 μM ve 5,0 – 250,0 μM ve LOD değerleri sırasıyla 0,08 μM ; 0,36 μM ve 0,46 μM 'dir (Çizelge 4.1).

Geliştirilen elektrokimyasal platform ve DPV tekniği üç biyomolekül arasında en yüksek duyarlılığı XT'ye karşı göstermiştir.

Çizelge 4.1 Eşzamanlı analiz için kalibrasyon eğrilerinin regresyon parametreleri

Parametreler/Analit	XT	TP	TB
Doğrusal çalışma aralığı (μM)	0,5 – 150,0	5,0 – 200,0	5,0 – 250,0
Eğim (μA/μM)	0,891 (± 0,011)	0,458 (± 0,009)	0,249 (± 0,004)
Kesim noktası	- 0,102 (± 0,824)	- 3,436 (± 0,957)	+ 0,010 (± 0,467)
R ²	0,9986	0,9966	0,9980
LOD (μM)	0,08	0,36	0,46
LOQ (μM)	0,26	1,20	1,53
Tekrarlanabilirlik (% RSD)	2,35	4,62	6,33
Yeniden üretilebilirlik (% RSD)	2,08	2,85	4,08

Çizelge 4.2 Geliştirilen elektrokimyasal platform ve yöntemin analitik parametrelerinin karşılaştırılması

Analit	LOD (μM)	Doğrusal çalışma aralığı (μM)	Elektrot	Kaynak
XT	0.06	2,5 – 35,0; 35,0 – 300,0	MWCNT-AuNP-CCE*	(Wu vd. 2020)
	0.35	0,9 – 100,0	pPABSA/GCE*	(Jesny ve Kumar 2017)
	0.09	0,5 – 97,0; 97,0 – 586,0	TiO ₂ NRs-MWCNTs/GCE*	(Patel vd. 2020)
	0.08	0,5 – 150,0	NiO/MWCNT/NNaM/PGE	Bu çalışma
TP	0.01	0,01 – 250,0	MIP/SL-MoS ₂ -BOMC/GCE*	(Hu vd. 2019)
	7.02	10,0 – 100,0	pPABSA/GCE	(Jesny ve Kumar 2017)
	0.0059	0,01 – 320,0	βH-MnO ₂ -NF/GCE*	(Nia vd. 2021)
	0.56	1,0 – 203,0; 203,0 – 893,0	TiO ₂ NRs-MWCNTs/GCE	(Patel vd. 2020)
	0.36	5,0 – 200,0	NiO/MWCNT/NNaM/PGE	Bu çalışma
TB	0.42	0,99 – 54,5	BDDE*	(Svorc vd. 2018)
	0.0087	0,01 – 320,0	βH-MnO ₂ -NF/GCE	(Nia vd. 2021)
	0.75	1,5 – 368,0; 368,0 – 1653,0	TiO ₂ NRs-MWCNTs/GCE	(Patel vd. 2020)
	0.46	5,0 – 250,0	NiO/MWCNT/NNaM/PGE	Bu çalışma

Kısaltmalar: MWCNT: Çok duvarlı karbon nanotüp; AuNP: Altın nanoparçacık; CCE: Karbon seramik elektrot; SDS: Sodyum dodesil sülfat; GCE: Camsı karbon elektrot; pPABSA: Para amino benzen sülfonik asit; TiO₂NRs: Titanyum dioksit nanoçubukları; MIP: Moleküler baskılı polimer; SL-MoS₂: Tek katmanlı

molibden disülfür; BOMC: Born-doping sipariş edilen mezogözenekli karbon; β H-MnO₂-NF: β -tipi MnO₂ nano-çiçekler BDDE: Bor katkılı elmas elektrot; AuNR: Altın nano çubuk.

Literatürde, bu üç biyomolekülün eşzamanlı tayinini içeren sadece bir yayın olduğundan bahsetmiştik. Bahsi geçen bu çalışmada (Patel vd. 2020), XT, TP ve TB için LOD değerleri sırasıyla 0,09 μ M; 0,56 μ M ve 0,75 μ M olarak verilmiştir. DPV yöntemi ve geliştirdiğimiz elektrokimyasal platform, yukarıda bahsedilen çalışmaya kıyasla her üç pürin molekülü için daha düşük LOD değerleri sunmaktadır (Çizelge 4.2). Ayrıca kalem grafit elektrot gibi basit ve kullanışlı bir elektrot ile eş zamanlı analizde nano molar seviyelere inilmesi de kalem grafit elektrotun biyomoleküllerin eşzamanlı belirlenmeleri için kullanılabileceğini göstermektedir.

4.3.4 Seçicilik ve girişim çalışmaları

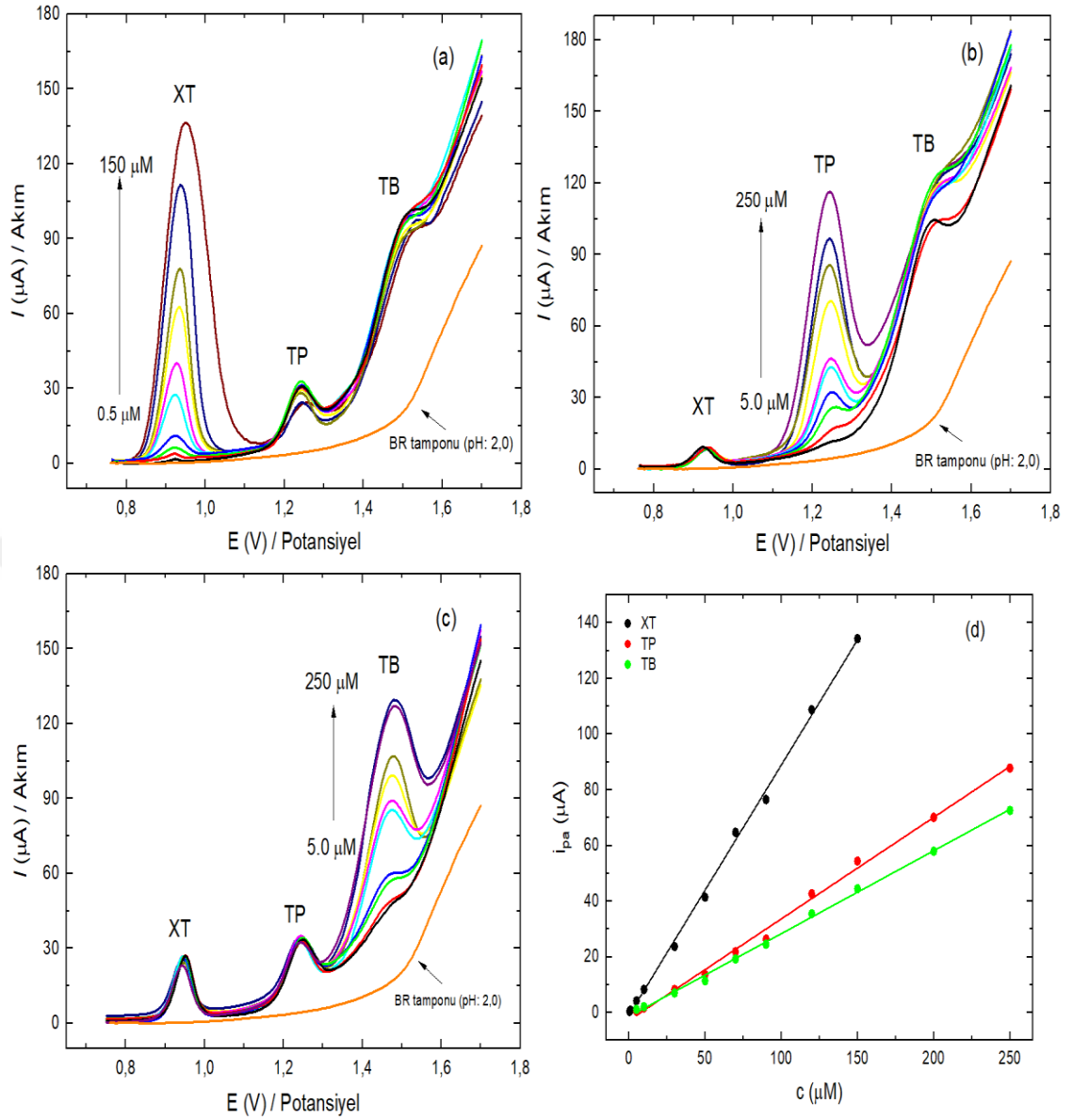
XT, TP ve TB tekli bu biyomoleküllerin tekli kalibrasyonları gerçekleştirilmiştir. DP voltamogramları sırasıyla Şekil 4.14a, b, c’de ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.14d’de gösterilmektedir. Kalibrasyona ait doğru denklemleri aşağıda sıralanmıştır;

$$i_{pa} (\mu A) = 0,899 (\pm 0,014) C_{XT} (\mu M) - 0,965 (\pm 0,564), R^2 = 0,9980 \quad 4.21$$

$$i_{pa} (\mu A) = 0,365 (\pm 0,008) C_{TP} (\mu M) - 2,780 (\pm 0,972), R^2 = 0,9959 \quad 4.22$$

$$i_{pa} (\mu A) = 0,298 (\pm 0,005) C_{TB} (\mu M) - 1,337 (\pm 0,564), R^2 = 0,9982 \quad 4.23$$

XT, TP ve TB için tekli analizlerinde doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla 0,5 – 150,0; 5,0 – 250,0; 5,0 – 250,0 μ M ve LOD değerleri sırasıyla 0,04; 0,17; 0,73 μ M olarak hesaplanmıştır. XT, TP ve TB için tekli ve üçlü karışımda tayin için kalibrasyon verileri Çizelge 4.3’te karşılaştırılmıştır. Çalışılan aralıklarda maddelerin birbirlerinin anodik akımlarına %10 tolerans sınırından daha az etki yaptığı görülmüştür. Ayrıca eşzamanlı analizden farklı olarak TP biyomolekülü için biraz daha uzun doğrusal çalışma aralığı elde edilmiştir.



Şekil 4.14 Tekli kalibrasyon çalışmalarının DP voltamogramları; (a) XT, (b) TP, (c) TB ve (d) tekli kalibrasyon eğrileri

Girişim çalışması optimize şartlarda 50,0 μM XT, TP ve TB içeren bir çözeltiye bazı organik, inorganik ve biyolojik girişim ajanların eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Girişim yapan türlerin tolerans sınırları Çizelge 4.4'te gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre ürik asit ve Na_3PO_4 aynı tolerans limit seviyesine (1:10) sahipken, CF, AA ve L-Glisin sırasıyla 1:1, 1:100, 1:50'dir.

Çizelge 4.3 XT, TP ve TB'nin tekli ve eşzamanlı analizleri için kalibrasyon verilerinin karşılaştırılması

Analit	XT		TP		TB	
Parametreler / Analiz	Tekli	Eşzamanlı	Tekli	Eşzamanlı	Tekli	Eşzamanlı
Doğrusal çalışma aralığı (μM)	0,5 – 150,0	0,5 – 150,0	5,0 – 250,0	5,0 – 200,0	5,0 – 250,0	5,0 – 250,0
Eğim ($\mu\text{A}/\mu\text{M}$)	0,899	0,891	0,365	0,458	0,298	0,249
Kesim noktası	- 0,965	- 0,102	- 2,780	- 3,436	- 1,337	+ 0,010
R^2	0,9980	0,9986	0,9959	0,9966	0,9982	0,9980
LOD (μM)	0,04	0,08	0,17	0,36	0,38	0,46
LOQ (μM)	0,14	0,26	0,56	1,20	1,27	1,53

Çizelge 4.4 XT, TP ve TB'nin elektrokimyasal tayininde girişim yapan türlerin tolerans limitleri

Girişim yapan tür	Tolerans Limiti	Hata (%)*		
		XT	TP	TB
ÜA	1:10	- 5,73	-8,14	- 9,32
CF	1:1	+1,01	+1,34	+ 32,4
AA	1:100	- 5,52	- 9,38	+ 3,21
L-Glisin	1:50	- 8,39	- 6,63	+ 5,23
Na_3PO_4	1:10	- 7,68	- 2,31	+ 7,72

* Her değer üç deneysel ölçümün ortalamasını göstermektedir

4.3.5 Yeniden üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik

NiO/MWCNT/NNaM/PGE elektrokimyasal sensörünün tekrar üretilebilirlik analizleri, aynı anda XT, TP ve TB içeren çözeltiden çoklu DPV ölçümleri (n: 5) ile uygulanmıştır. Bu ölçümler, tekrarlanabilirliği test etmek için aynı koşullar altında üretilen beş elektrot ile gerçekleştirilmiştir. XT, TP ve TB için anodik pik akımlarının bağıl standart sapmaları (% RSD) sırasıyla %2,08; %2,85 ve %4,08 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Bu sonuçlar, elektrotun tekrar üretilebilirliğinin her üç biyomolekül için de mükemmel

olduğunu göstermektedir. Elektrokimyasal sensörün tekrarlanabilirliği de çoklu DPV ölçümleriyle (n: 5) değerlendirilmiş ve XT, TP ve TB için sırasıyla %2,35; %4,62 ve %6,33'lük % RSD değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

4.3.6 Gerçek numune analizi

Deneysel bölümünde anlatıldığı gibi üç matrisin test çözeltileri hazırlanmış ve XT, TP ve TB için yüzde geri kazanım (% GK) değerleri, standart ekleme yöntemi ile hesaplanmıştır. Hesaplanan geri kazanım değerleri ve eklenen XT, TP ve TB miktarları Çizelge 4.5'te gösterilmektedir. Bu sonuçlar, geliştirilen elektrokimyasal sensörün üç farklı matriste üç biyomolekülün aynı anda belirlenmesini etkin bir şekilde gerçekleştirdiğini göstermektedir.

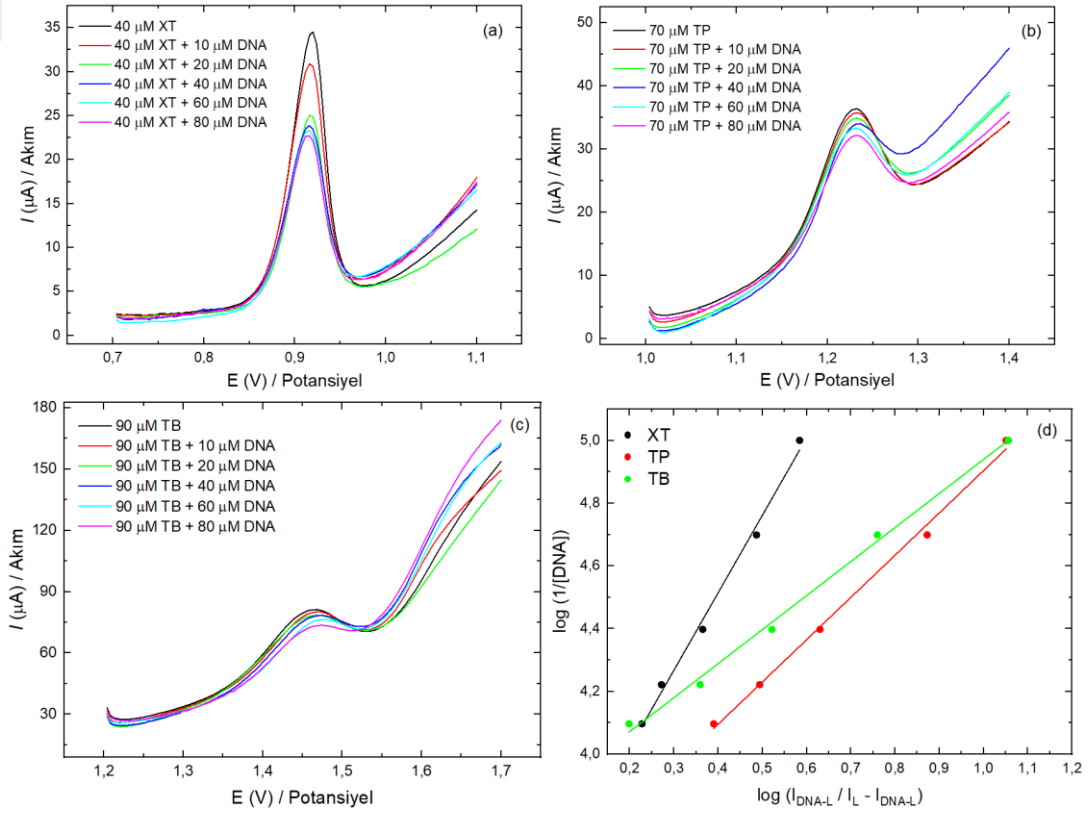
Çizelge 4.5 Çikolata, siyah çay ve idrar numunelerinde XT, TP ve TB'nin eşzamanlı tayinleri için geri kazanım çalışmalarının sonuçları

Örnek	Analit	Bulunan* (μM)	Eklenen (μM)	Ölçülen* (μM)	GK (%)	RSD (%)
Çikolata	XT	-	1,0	$0,996 \pm 0,030$	99,6	3,01
		-	8,0	$7,83 \pm 0,35$	97,9	4,41
	TP	-	12,0	$11,63 \pm 0,42$	96,9	3,61
		-	25,0	$24,38 \pm 0,77$	97,5	3,16
	TB	-	7,0	$7,28 \pm 0,34$	104,1	4,71
		-	14,0	$13,59 \pm 0,55$	97,1	4,05
Siyah çay	XT	-	1,8	$1,87 \pm 0,04$	103,9	2,14
	TP	-	12,0	$11,81 \pm 0,57$	98,4	4,83
	TB	$18,61 \pm 0,75$	14,0	$32,25 \pm 1,42$	101,1	4,40
İnsan idrarı	XT	$2,56 \pm 0,05$	10,0	$12,11 \pm 0,45$	96,4	3,72
	TP	-	16,0	$16,54 \pm 0,40$	103,4	2,42
	TB	-	13,0	$13,04 \pm 0,62$	100,3	4,76

*Her değer %95 güven seviyesinde (n: 3) güven aralıklarını göstermektedir

4.3.7 Ksantin teofilin ve teobrominin DNA ile etkileşimleri

XT, TP ve TB'nin DNA ile etkileşimi yukarıda belirtilen optimum şartlarda DPV tekniği ile ayrı ayrı incelenmiştir. XT, TP ve TB için elde edilen voltamogramlar Şekil 4.15a, b ve c'de gösterilmektedir. Ortama belirli miktarda DNA eklenip belirlenen etkileşim süresinden (90 saniye) sonra alınan ölçümlerde her üç molekül için de geçerli olmak üzere pik akımının düştüğü ve pik potansiyellerinin çok daha negatif değerlere kaydığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). Bu durum XT, TP ve TB'nin DNA ile etkileşimlerinin elektrostatik olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.15 (a) XT, (b) TP, (c) TB'nin DNA ile etkileşimine ilişkin DP voltamogramları ve (d) $\log 1/[DNA] - \log [\log i_{XT-DNA} / i_{XT} - i_{XT-DNA}]$ grafikleri

Voltamogramların içinde gösterilen $\log 1/[DNA] - \log [\log i_{XT-DNA} / i_{XT} - i_{XT-DNA}]$ kalibrasyon eğrileri (Şekil 4.15) ile hesaplanan XT-DNA, TP-DNA ve TB-DNA için

bağlanma sabitleri ve standart Serbest Gibss Enerjileri (ΔG^0) Çizelge 4.6'da listelenmiştir.

Eklenen DNA'nın derişimi ile ölçülen akım arasındaki ilişki Eşitlik 2.19'da verilmiştir. Elde edilen doğru denklemleri aşağıda sıralanmıştır;

$$\log [1/\text{DNA}] = 2,4686 \log i_{\text{XT-DNA}} / i_{\text{XT}} - i_{\text{XT-DNA}} + 3,5275, R^2 = 0,9917 \quad 4.25$$

$$\log [1/\text{DNA}] = 1,3466 \log i_{\text{TP-DNA}} / i_{\text{TP}} - i_{\text{TP-DNA}} + 3,5573, R^2 = 0,9947 \quad 4.26$$

$$\log [1/\text{DNA}] = 1,0838 \log i_{\text{TB-DNA}} / i_{\text{TB}} - i_{\text{TB-DNA}} + 3,8555, R^2 = 0,9947 \quad 4.27$$

Çizelge 4.6 $\log 1/[\text{DNA}] - \log [i_{\text{CF-DNA}} / i_{\text{CF}} - i_{\text{CF-DNA}}]$ eğrisi için kalibrasyon verileri, hesaplanan bağlanma sabitleri ve standart serbest Gibbs enerjileri

Kalibrasyon verileri / Analit	XT	TP	TB
Eğim	2,4686 (± 0.1127)	1,3466 ($\pm 0,0491$)	1,0838 ($\pm 0,0394$)
Kesim noktası ($\log K_{\text{L-DNA}}$)	3,5275 (± 0.0461)	3,5573 ($\pm 0,0358$)	3,8555 ($\pm 0,0257$)
R^2	0,9917	0,9947	0,9947
$K_{\text{L-DNA}} (\text{M}^{-1})^*$	$3,37 (\pm 0,36) \times 10^3$	$3,61 (\pm 0,30) \times 10^3$	$7,17 (\pm 0,43) \times 10^3$
$-\Delta G^0 (\text{kJ/mol})^*$	20,13 ($\pm 0,01$)	20,31 ($\pm 0,01$)	22,01 ($\pm 0,01$)

* Parantez içindeki değerler üç ölçümün ortalamasının standart sapmasını göstermektedir

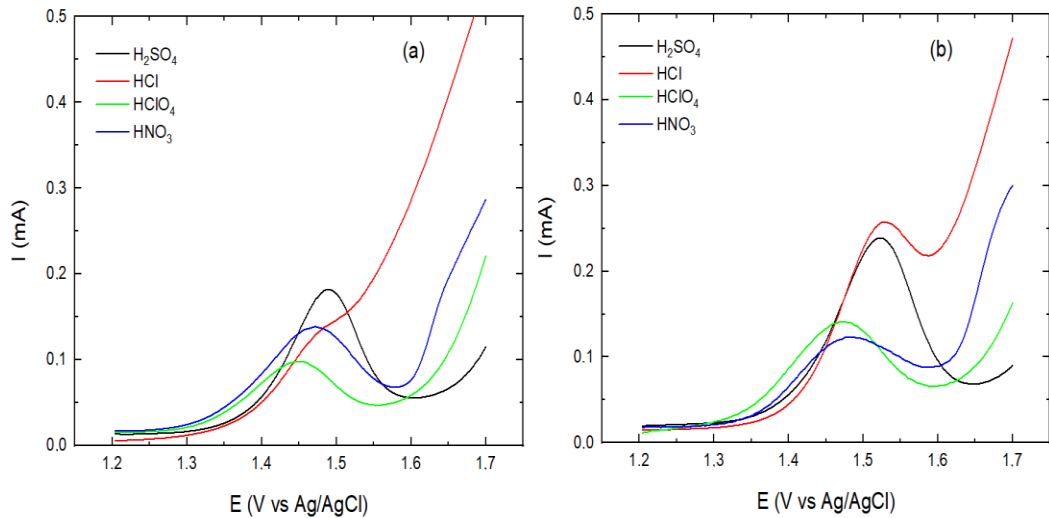
Hesaplanan 10^3 M^{-1} derecesindeki bağlanma sabiti değerleri her üç biyo-molekülün DNA ile etkileşiminin interkalasyon ile olmadığını belirtmektedir. L-DNA bağlanma afiniteleri şu sıradadır; $\text{TB} > \text{TP} > \text{XT}$. En yüksek bağlanma sabiti değerine sahip olan TB molekülünün DNA'ya erişilebilirliği diğer iki moleküle iki kat daha yüksektir (Rauf vd. 2005). DNA'ya bağlanma ile ilgili normal şartlar altında ($T: 298,15 \text{ K}$) hesaplanan ΔG^0 değerleri her üç molekül için de sıfırdan küçüktür ve bu XT, TP ve TB'nin DNA'ya bağlanmalarının termodinamik olarak istemli olduğunu göstermektedir. Hesaplanan ΔG^0 değerleri sıralaması şu şekildedir; $\text{TB} > \text{TP} > \text{XT}$. Buradan, TB'nin DNA etkileşiminin diğer iki moleküle göre termodinamik olarak daha fazla tercih edilen bağlanma olduğu yorumu yapılabilir. TP ve TB için elde edilen bağlanma sabitleri ve standart Gibbs

enerjileri, literatürde UV-spektroskopisi ile elde edilen verilerle uyumludur (Nafisi vd. 2008 ve Johnson vd. 2012). Sonuç olarak hesaplanan termodinamik parametreler XT, TP ve TB'nin NiO/MWCNT/NNaM/KGE sensöründe DNA ile interkalasyon yöntemi ile etkileşmediğini, zayıf elektrostatik kuvvetler üzerinden veya DNA yapısındaki nükleotitler ve PO₂ grupları ile kendi moleküler yapılarında bulunan π -bağları üzerinden zayıf hidrojen bağları ile oluk bağlanması şeklinde gerçekleştiğini göstermektedir (Nafisi vd. 2008).

4.4 Kafeinin Çıplak Kalem Grafit Elektrot ile Analizi

4.4.1 Elektrolit seçimi

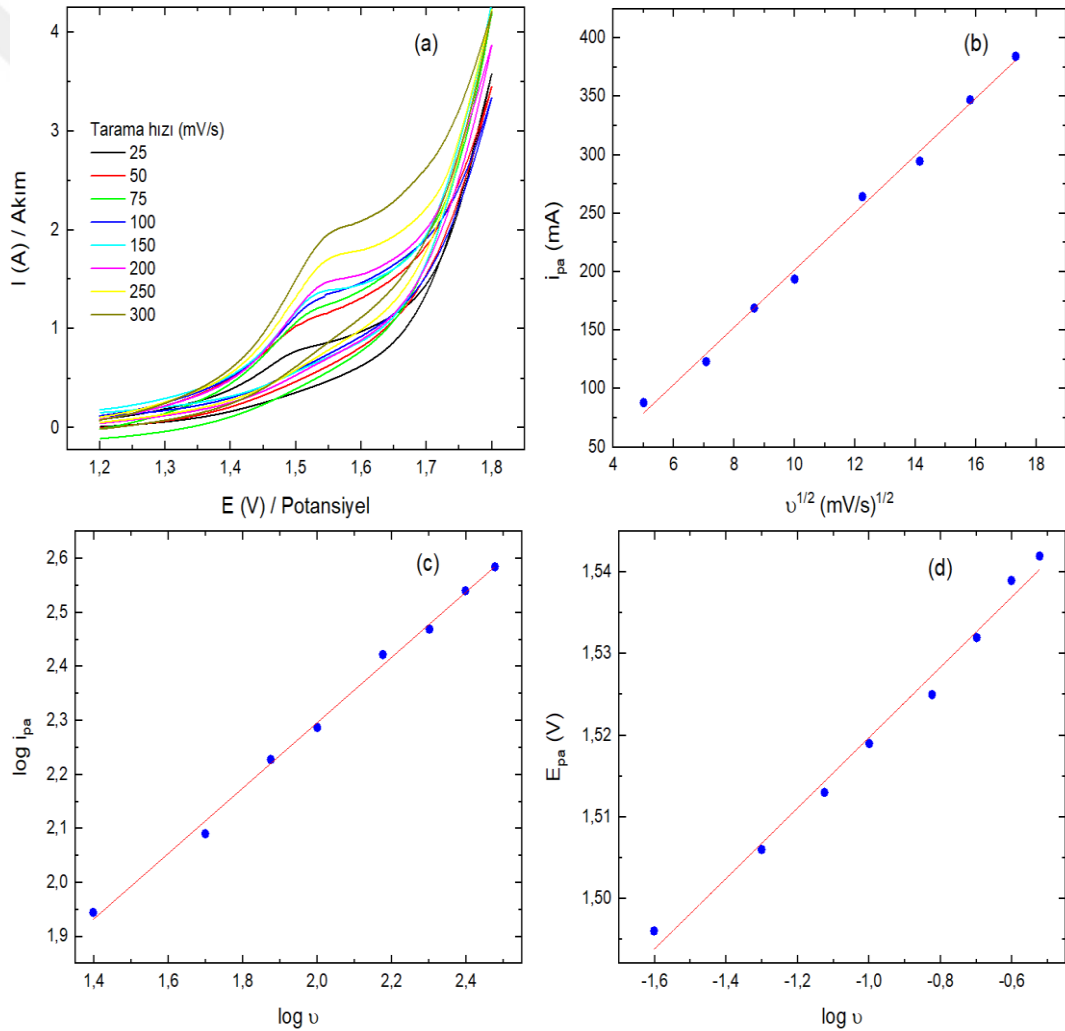
CF için çKGE ile geliştirilecek analiz yöntemi için ilk olarak uygun elektrolit seçimi 0,1'er M H₂SO₄, HNO₃, HClO₄ ve HCl çözeltilerinin CF'nin yükseltgenme piklerine etkisi gözlenerek yapılmıştır. DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen voltamogramlar Şekil 4.15'te gösterilmektedir. Her iki yöntemde de en yüksek pik akımı ve daha kararlı pikler 0,1 M H₂SO₄ ile elde edilmiştir. Bu durum, sülfürik asit çözeltisi içinde diğerlerine kıyasla daha hızlı yük aktarımı gerçekleştiğini belirtmektedir ve bu nedenle destek elektrolit olarak her iki teknik için de 0,1 M H₂SO₄ seçilmiştir.



Şekil 4.16 10⁻⁴ M CF'nin anodik piklerine çeşitli elektrolitlerin etkisi; (a) DPV ve (b) KDV voltamogramları

4.4.2 Kafeinin çıplak kalem grafit elektrotta elektrokimyasal davranışı

DV tekniği ile CF'nin çKGE üzerinde 0,1 M H₂SO₄ çözeltisi içinde anodik pik potansiyeli 1,519 V (v : 100 mV/s) olarak belirlenmiştir. Ayrıca burada CF'nin çKGE yüzeyinde tersinmez olarak yükseltgendiği ve yayvan bir yükseltgenme piki verdiği görülmüştür (Şekil 4.17a). Elektrot yüzeyindeki prosesin karakteristiğini incelemek için DV tekniği kullanılarak 25 – 300 mV/s tarama hızları aralığında ölçümler alınmış ve voltamogramlar Şekil 4.17a'da gösterilmiştir. Tarama hızı arttıkça anodik pik akımlarının arttığı ve anodik pik potansiyellerinin daha pozitif değerlere kaydığı voltamogramlardan görülmektedir.



Şekil 4.17 (a) 10⁻³ M CF'nin farklı tarama hızlarında alınan DV voltamogramları, (b) $i_{pa} - v^{1/2}$ grafiği, (c) $\log i_{pa} - \log v$ grafiği ve (d) $E_{pa} - \log v$ grafiği

Tarama hızı çalışmaları ile Randles-Sevcik eşitliği kullanılarak (Eşitlik 2.4) CF'nin çKGE yüzeyiyle etkileşimi $i_{pa} - v^{1/2}$, $\log i_{pa} - \log v$ ve $E_{pa} - \log v$ grafikleri (sırasıyla Şekil 4.17b, c ve d) incelenerek değerlendirilmiştir. Aşağıda CF'nin $i_{pa} - v^{1/2}$, $\log i_{pa} - \log v$ ve $E_{pa} - \log v$ grafiklerinden elde edilen doğru denklemleri gösterilmektedir;

$$i_{pa} \text{ (mA)} = 24,496 (\pm 0,652) v^{1/2} - 43,295 (\pm 7,826), R^2 = 0,9958 \quad 4.28$$

$$\log i_{pa} = 0,605 (\pm 0,015) \log v + 1,085 (\pm 0,031), R^2 = 0,9963 \quad 4.29$$

$$E_{pa} \text{ (V)} = 0,043 (\pm 0,001) \log v + 1,563 (\pm 0,001), R^2 = 0,9884 \quad 4.30$$

$i_{pa} - v^{1/2}$ grafiğinin doğrusal olması ve $\log i_{pa} - \log v$ grafiğinin eğiminin 0,5 değerine yakın olması CF'nin çKGE yüzeyi ile difüzyon-kontrollü bir proses yardımıyla etkileştiği göstermektedir (Anvari vd. 2021). Randles-Sevcik eşitliği ile $E_{pa} - \log v$ grafiğinin eğimi (Şekil 4.17d) üzerinden CF'nin çKGE yüzeyinde yükseltgenmesi sırasında transfer edilen elektron sayısı 2,25 olarak hesaplanmıştır.

CF'nin DPV ölçümleri ise 1,2 – 1,7 V potansiyel aralığında çKGE ile gerçekleştirilmiştir. 80,0 μM CF 0,1 M H_2SO_4 (pH: 1,0) elektrolit çözeltisi ile 1,432 V'da bir yükseltgenme piki vermiştir. KDV ölçümleri aynı potansiyel aralığında gerçekleştirilmiş ve 1,472 V'de bir yükseltgenme piki gözlenmiştir.

4.4.3 pH etkisi

Protonların elektrokimyasal reaksiyonlarda önemli rol oynaması nedeniyle ortam pH değişimine karşılık maddenin elektrokimyasal yanıtlarının incelenmesi hem geliştirilecek analiz yöntemi hem de ilgili maddenin elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal reaksiyonunun mekanizmasının incelenmesi için büyük öneme sahiptir. Destek elektrolit çözeltisi olarak seçilen 0,1 M H_2SO_4 çözeltisinin pH değeri 0,5 – 3,5 aralığında değiştirilerek CF'nin DPV ve KDV ölçümleri alınmıştır. Elde edilen voltamogramlar sırasıyla Şekil 4.18a ve b'de gösterilmektedir. Geliştirilecek analiz yöntemi için optimum

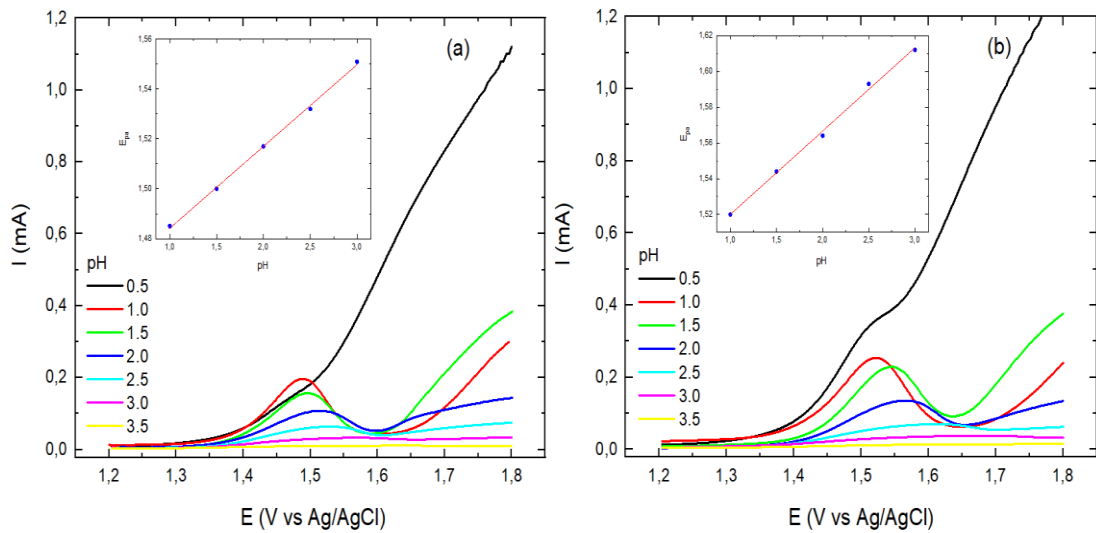
değer pH: 1,0 her iki yöntem için de daha yüksek anodik pik akımı, daha az arka plan akımı ve daha kararlı yükseltgenme pikleri göstermesi nedeniyle seçilmiştir.

pH değerine karşılık CF'nin anodik pik potansiyelindeki değişim pH 1,0 – 3,0 aralığında doğrusal ilişki göstermiştir. E_{pa} – pH grafiği her iki yöntem için de voltamogramlar içinde gösterilmiştir (Şekil 4.18 şekil içi). CF'nin anodik pik potansiyelinin pH ile doğrusal ilişkisi aşağıdaki eşitliklerde verilmiştir;

$$\text{DPV için; } E_{pa} \text{ (V)} = 0,033 (\pm 0,001) \text{ pH} + 1,451 (\pm 0,002), R^2 = 0,9992 \quad 4.31$$

$$\text{KDV için } E_{pa} \text{ (V)} = 0,047 (\pm 0,002) \text{ pH} + 1,473 (\pm 0,003), R^2 = 0,9983 \quad 4.32$$

DPV ve KDV teknikleri ile elde edilen sırasıyla 0,033 ve 0,047 V/pH'dır. Bu değerler 0,059 V/pH değerindeki Nernst eğimine yakın değildir. Fakat CF'nin tıpkı TB molekülü gibi 0,059 V/pH Nernst eğimi trendini izlemediği ve elektro-yükseltgenme mekanizmasının 4 proton:4 elektron içeren iki aşamalı bir yükseltgenme süreci olduğunu ortaya koyan literatür verileriyle uyumludur (Patel vd. 2020, Ferrak vd. 2020 ve Svorc vd. 2012).



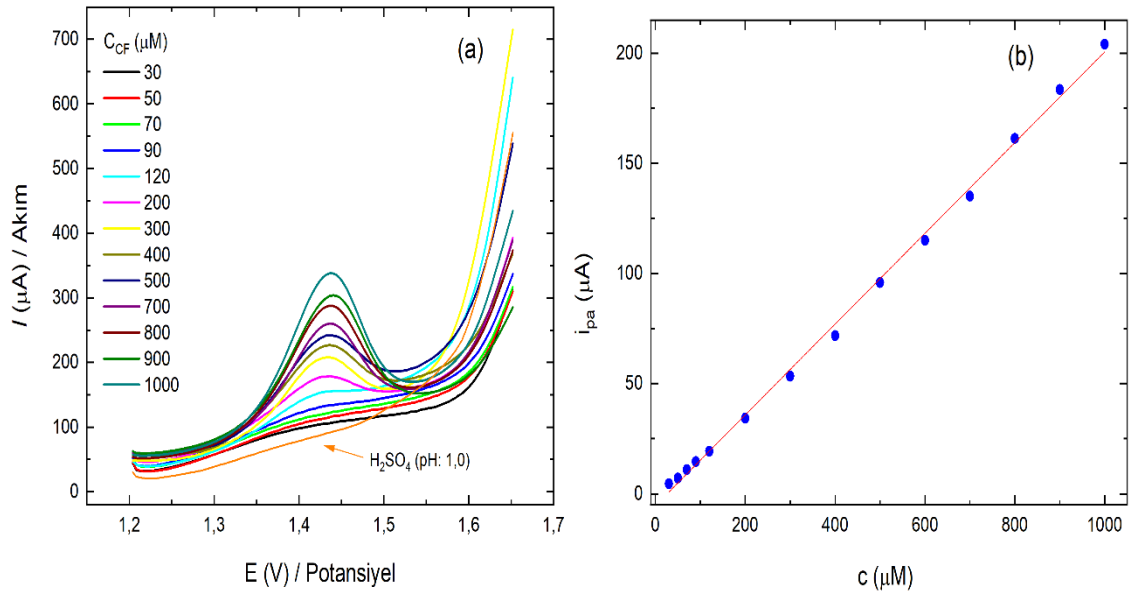
Şekil 4.18 10^{-3} M CF'nin farklı pH'larda elde edilen voltamogramları; (a) DPV ve (b) KDV

4.4.4 DPV ile kafein analizi

Optimum şartlar belirlendikten sonra DPV yöntemi ile CF'nin anodik pik akımı (i_{pa}) ve derişimi arasındaki bağıntı incelenmiştir. Yapılan kalibrasyon çalışmasına ait voltamogramlar Şekil 4.19a'da gösterilmektedir. Derişim 30,0 – 1000,0 μM aralığında arttırıldıkça i_{pa} da artmıştır. 1000,0 μM CF değerinden sonra akım değerleri daha fazla artmamış ve sabit kalmıştır. CF'nin derişimi ve i_{pa} arasındaki doğrusal ilişki aşağıda verilmiştir;

$$i_{pa} (\mu\text{A}) = 0,206 (\pm 0,003) C_{CF} (\mu\text{M}) - 5,390 (\pm 1,352), R^2 = 0,9981 \quad 4.33$$

Doğru denkleminde ait kalibrasyon grafiğı Şekil 4.19b'de gösterilmiştir. Sonuç olarak 0,1 M H_2SO_4 (pH: 1,0) destek elektrolit çözeltisinde çKGE ve DPV tekniğı ile yapılan kalibrasyon çalışmasında CF için doğrusal çalışma aralığı; 30,0 – 1000,0 μM , LOD: 8,84 μM ve LOQ: 29,46 μM olarak hesaplanmıştır.



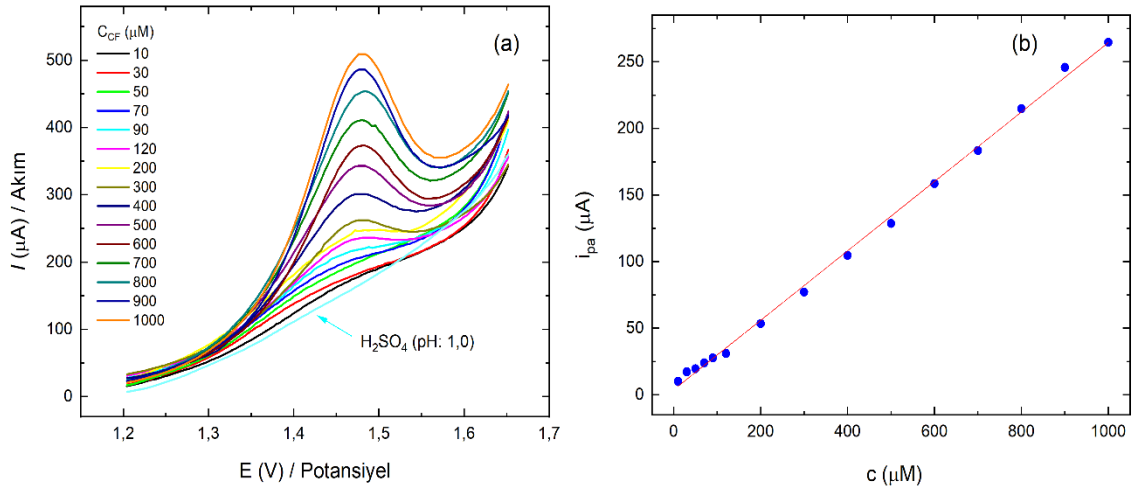
Şekil 4.19 CF'nin kalibrasyon çalışmasına ait (a) DP voltamogramları ve (b) kalibrasyon eğrisi

4.4.5 KDV ile kafein analizi

Optimum şartlar belirlendikten sonra KDV yöntemi ile CF'nin anodik pik akımı (i_{pa}) ve derişimi arasındaki bağıntı incelenmiştir. Yapılan kalibrasyon çalışmasına ait voltamogramlar Şekil 4.20a'da gösterilmektedir. Derişim 10,0 – 1000,0 μM aralığında arttırıldıkça i_{pa} da artmıştır. CF'nin derişimi ve i_{pa} arasındaki doğrusal ilişki aşağıda verilmiştir;

$$i_{pa} (\mu\text{A}) = 0,261 (\pm 0,003) C_{CF} (\mu\text{M}) + 3,815 (\pm 1,607), R^2 = 0,9981 \quad 4.34$$

Doğru denkleminde ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.20b'de gösterilmiştir. Sonuç olarak 0,1 M H_2SO_4 (pH: 1,0) destek elektrolit çözeltisinde çKGE ve KDV tekniği ile yapılan kalibrasyon çalışmasında CF için doğrusal çalışma aralığı; 10,0 – 1000,0 μM , LOD: 11,35 μM ve LOQ: 31,19 μM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.20 CF'nin kalibrasyon çalışmasına ait (a) KD voltamogramları ve (b) kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.7'de DPV ve KDV teknikleri ile elde edilen kalibrasyon parametreleri karşılaştırılmıştır. İki yöntem arasında göze çarpan farklar; KDV yöntemi ile daha geniş doğrusal çalışma aralığı elde edilse de DPV yöntemi ile daha düşük LOD verisine ulaşılmasıdır.

Çizelge 4.7 DPV ve KDV teknikleri ile elde edilen CF'ye ait kalibrasyon verileri

Parametreler / Yöntem	DPV	KDV
Doğrusal çalışma aralığı (μM)	30,0 – 1000,0	10,0 – 1000,0
LOD (μM)	8,84	9,36
LOQ (μM)	29,46	31,19
Eğim ($\mu\text{A}/\mu\text{M}$)	0,206 ($\pm 0,003$)	0,261 ($\pm 0,003$)
Kesim noktası	- 5,390 ($\pm 1,352$)	+ 3,815 ($\pm 1,607$)
R^2	0,9981	0,9981

4.4.6 Girişim çalışması

DPV ve KDV yöntemleri ile geliştirilen yöntemin kalibrasyonuna bazı biyolojik ve anorganik maddelerin girişim etkisi çalışılmıştır. CF'nin benzer yapılı olduğu diğer metil ksantinlerin (XT, TP ve TB) girişim etkisine ek olarak ÜA, AA, L-Glisin ve Na_3PO_4 türlerinin CF'nin DPV ve KDV voltamogramlarına etkisi ayrı ayrı çalışılmıştır. Çizelge 4.8'de her iki yöntem için %10 tolerans limitine göre girişim yaptıkları derişim oranları belirtilmiştir. TB molekülü CF ile benzer yükseltgenme potansiyeline sahip olmaları nedeniyle analize 1:1 oranında direkt girişim yapmıştır.

Çizelge 4.8 CF'nin DPV ve KDV voltamogramlarına bazı türlerin girişim etkisi

Girişim yapan moleküller	Tolerans Limiti		Hata (%)*	
	DPV	KDV	DPV	KDV
XT	1:3	1:3	- 13,59	- 15,17
TP	1:2	1:2	- 11,17	- 11,81
TB	1:1	1:1	+ 49,18	+ 51,36
ÜA	1:5	1:5	- 11,95	- 11,59
L-Glisin	1:5	1:5	- 10,60	- 11,62
Na_3PO_4	1:2	1:2	+ 15,80	+ 18,49

* Her değer üç deneysel ölçümün ortalamasını göstermektedir

4.4.7 Gerçek numune analizi

CF'nin gerçek numunelerde analizi için iyi bilinen iki ticari markanın kola ve enerji içeceği ürünleri test edilmiştir. 3. Bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanan numunelerle ölçümler alınmış daha sonra standart ekleme yöntemi ile yüzde geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.21'de gösterilmektedir. DPV ve KDV yöntemleri için sırasıyla Çizelge 4.9 ve 4.10'da gösterilen sonuçlara göre başarılı %GK ve %RSD değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar geliştirilen analiz yönteminin iki farklı içecek numunelerinde CF analizinin etkili bir şekilde yapılabildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.9 Standart ekleme yöntemi ve DPV ile CF'nin gerçek numunelerde analizi için elde edilen sonuçlar

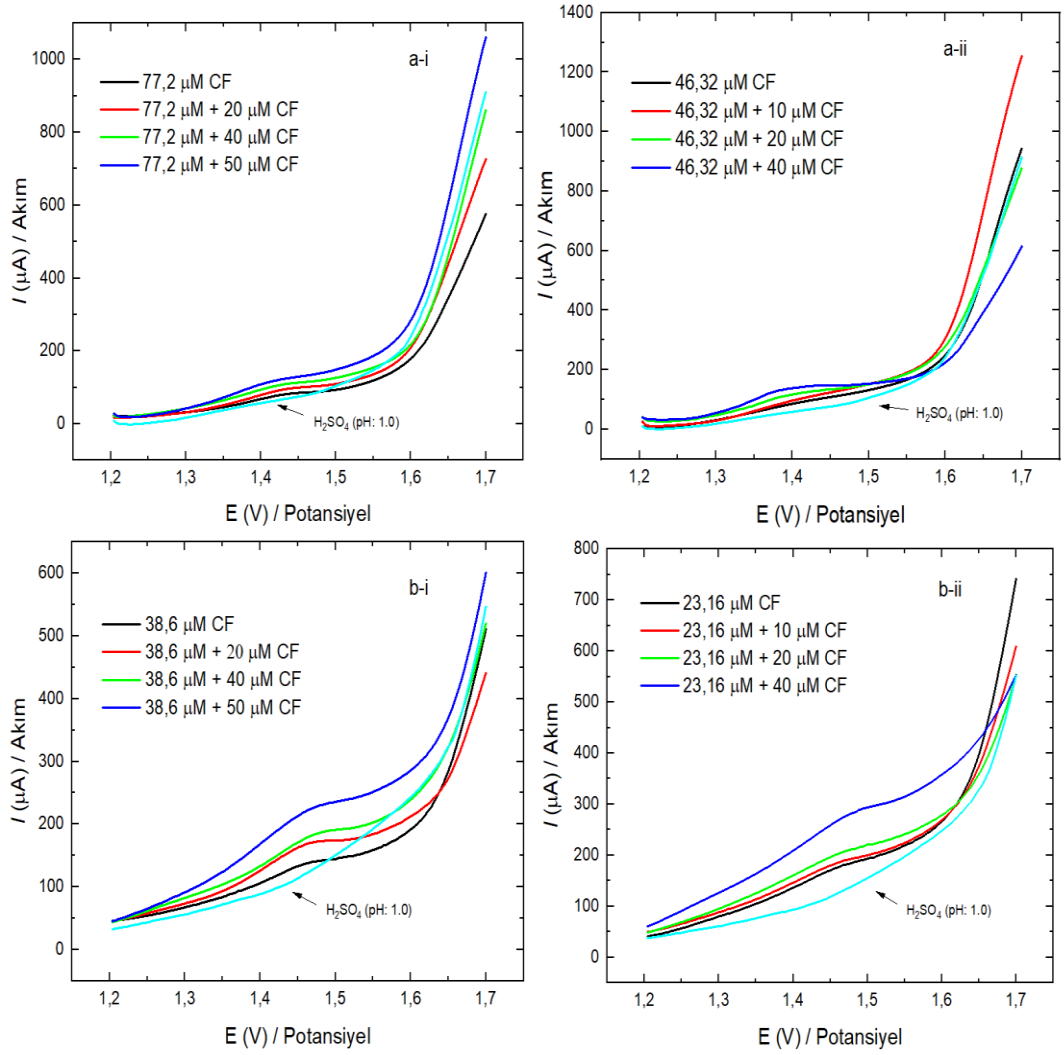
Örnek	Eklenen numune (mL)	İçerik (µM)	Bulunan* (µM)	GK* (%)	RSD* (%)	Eklenen standart (µM)	Ölçülen* (µM)	GK (%)	RSD (%)
Red-Bull	1,0	77,20	78,00 ± 2,86	101,0	3,67	20,0	97,96 ± 3,68	103,8	3,76
						40,0	116,7 ± 5,78	99,6	4,95
						50,0	127,8 ± 6,11	99,6	4,78
Coca-Cola	0,6	46,32	45,70 ± 1,75	98,7	3,83	10,0	54,20 ± 1,36	96,2	2,51
						20,0	63,39 ± 2,93	95,6	4,62
						40,0	82,93 ± 4,13	96,1	4,98

*Her değer %95 güven seviyesinde (n: 3) güven aralıklarını göstermektedir

Çizelge 4.10 Standart ekleme yöntemi ve KDV ile CF'nin gerçek numunelerde analizi için elde edilen sonuçlar

Örnek	Eklenen numune (mL)	İçerik (µM)	Bulunan* (µM)	GK* (%)	RSD* (%)	Eklenen standart (µM)	Ölçülen* (µM)	GK (%)	RSD (%)
Red-Bull	0,5	38,60	37,67 ± 1,85	97,5	4,91	20,0	60,96 ± 2,81	104,0	4,61
						40,0	79,44 ± 3,87	101,1	4,87
						50,0	85,32 ± 4,13	96,3	4,84
Coca-Cola	0,3	23,16	23,77 ± 1,12	102,6	4,71	10,0	32,41 ± 1,44	97,7	4,44
						20,0	41,87 ± 2,93	97,0	4,62
						40,0	63,55 ± 3,17	100,6	4,98

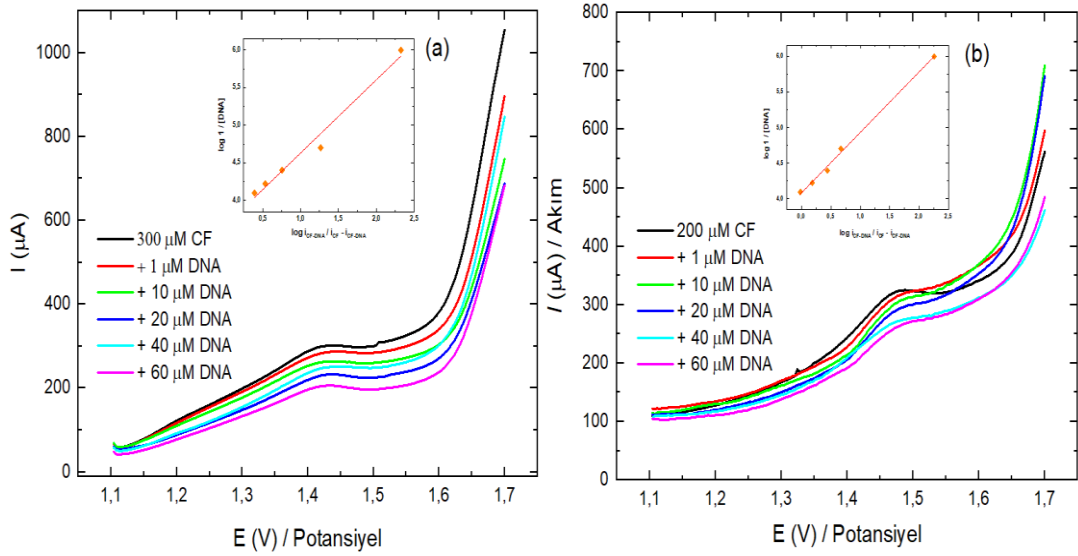
*Her değer %95 güven seviyesinde (n: 3) güven aralıklarını göstermektedir



Şekil 4.21 CF'nin gerçek numune analizine ait voltamogramlar; DPV ile (a-i) Red-Bull'da, (a-ii) Coca-Cola'da ve KDV ile (b-i) Red-Bull'da, (b-ii) Coca-Cola'da

4.4.7 Kafeinin DNA ile etkileşimi

CF'nin DNA ile etkileşimi yukarıda belirtilen optimum şartlarda DPV ve KDV yöntemleri ile ayrı ayrı incelenmiştir. DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen voltamogramlar sırasıyla Şekil 4.22a ve b'de gösterilmektedir. Ortama belirli miktarda DNA eklendikten sonra belirlenen etkileşim süresinden (150 saniye) sonra alınan ölçümlerde CF'nin pik akımının düştüğü ve pik potansiyellerinin her iki teknik içinde daha negatif değerlere kaydığı gözlemlenmiştir. Bu durum, CF'nin DNA ile etkileşiminin elektrostatik kuvvetler üzerinden gerçekleştiğini belirtmektedir.



Şekil 4.22 CF-DNA etkileşimi için elde edilen voltamogramlar; (a) DPV ve (b) KDV (Şekil içi: $\log 1/[DNA] - \log [i_{CF-DNA} / i_{CF} - i_{CF-DNA}]$ eğrileri)

Eklenen DNA'nın derişimi ile ölçülen akım arasındaki ilişki Eşitlik 2.18'de verilmiştir. Elde edilen kalibrasyon verileri, hesaplanan K_{CF-DNA} bağlanma sabiti ve ΔG^0 Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Voltamogramların içinde gösterilen $\log 1/[DNA] - \log [\log i_{XT-DNA} / i_{XT} - i_{XT-DNA}]$ kalibrasyon eğrileri (Şekil 4.22) ile hesaplanan CF-DNA için bağlanma sabitleri ve standart Serbest Gibbs Enerji Değişimleri (ΔG^0) Çizelge 4.11'de listelenmiştir.

Çizelge 4.11 $\log 1/[DNA] - \log [i_{CF-DNA} / i_{CF} - i_{CF-DNA}]$ eğrisi için kalibrasyon verileri, hesaplanan bağlanma sabitleri ve Gibbs enerjileri

Kalibrasyon verileri / Yöntem	DPV	KDV
Eğim	$0,9744 \pm 0,0805$	$0,84998 \pm 0,0266$
Kesim noktası ($\log K_{CF-DNA}$)	$3,6547 \pm 0,1020$	$3,93657 \pm 0,0285$
R^2	0,9799	0,9971
$K_{CF-DNA} (M^{-1})^*$	$4,52 (\pm 1,06) \times 10^3$	$8,64 (\pm 0,08) \times 10^3$
$-\Delta G^0 (kJ/mol)^*$	$20,85 (\pm 0,10)$	$23,29 (\pm 0,01)$

* Parantez içindeki değerler üç ölçümün ortalamasının standart sapmasını göstermektedir

Eklenen DNA'nın derişimi ile ölçülen akım arasındaki ilişki Eşitlik 2.20'de verilmiştir. Elde edilen doğru denklemleri aşağıda sıralanmıştır;

$$\text{DPV; } \log [1/\text{DNA}] = 0,9744 \log [i_{\text{XT-DNA}} / i_{\text{XT}} - i_{\text{XT-DNA}}] + 3,6547, R^2 = 0,9799 \quad 4.35$$

$$\text{KDV; } \log [1/\text{DNA}] = 0,8500 \log [i_{\text{TP-DNA}} / i_{\text{TP}} - i_{\text{TP-DNA}}] + 3,9366, R^2 = 0,9971 \quad 4.36$$

Hesaplanan 10^3 M^{-1} derecesindeki bağlanma sabiti değerleri CF'nin DNA ile etkileşiminin interkalasyon ile olmadığını belirtmektedir. KDV yöntemi ile DPV yöntemine göre iki kat daha yüksek bir değer elde edilmiştir. DNA'ya bağlanma ile ilgili normal şartlar altında (T: 298,15 K) hesaplanan ΔG^0 değeri her teknik için de sıfırdan küçüktür ve bu CF'nin DNA'ya bağlanmasının termodinamik olarak istemli olduğunu göstermektedir. CF için elde edilen bağlanma sabitleri ve standart Gibbs enerji değişimleri, literatürde UV-spektroskopisi ile elde edilen verilerle uyumludur (Nafisi vd. 2008 ve Johnson vd. 2012).

Çizelge 4.12 XT, TP, TB ve CF-DNA komplekslerinin bağlanma sabitlerinin bazı anti-kanser etken maddeleri ile karşılaştırılması

L-DNA kompleksi	$K_{L\text{-DNA}} (\text{M}^{-1})$	Elektrot	Kaynak
XT-DNA	$3,37 \times 10^3$	NiO/MWCNT/NNaM/KGE	Bu çalışma
TP-DNA	$3,61 \times 10^3$	NiO/MWCNT/NNaM/KGE	Bu çalışma
TB-DNA	$7,17 \times 10^3$	NiO/MWCNT/NNaM/KGE	Bu çalışma
CF-DNA	$8,64 \times 10^3$	KGE	Bu çalışma
5-FU-DNA*	$2,00 \times 10^5$	P(BCP)/CKE*	Zeybek vd. 2015
6-MP-DNA*	$1,69 \times 10^4$	ACE*	Huang vd. 2011

5-FU-DNA*; Fluorouracil-DNA kompleksi, 6-MP-DNA*; Merkaptopürin-DNA kompleksi, P(BCP)/CKE*; Poli bromokrezol moru modifiye camısı karbon elektrot, ACE*; asılı civa elektrot

Sonuç olarak hesaplanan termodinamik parametreler CF'nin çKGE sensöründe DNA ile interkalasyon yöntemi ile etkileşmediğini, zayıf elektrostatik kuvvetler üzerinden veya DNA yapısındaki nükleotitler ve PO_2 grupları ile kendi moleküler yapılarında bulunan π -bağları üzerinden zayıf hidrojen bağları ile oluk bağlanması şeklinde gerçekleştiğini

göstermektedir (Nafisi vd. 2008 ve Johnson vd. 2012). Maddelerin DNA'ya bağlanmalarının bir toksisite oluşturduğundan bahsetmiştik. Bu açıdan XT, TP, TB ve CF-DNA kompleksleri için hesaplanan bağlanma sabitleri değerleri literatürde kanser tedavisi için sıklıkla kullanılan iki ilaç etken madde ile Çizelge 4.12'de karşılaştırılmıştır. Kanser tedavisinde kullanılan bu ilaçların değerlerine yakın bağlanma sabiti değerleri göstermeleri nedeniyle XT, TP, TB ve CF biyomoleküllerinin benzer toksisiteye sahip olabileceği düşünülebilir.



5. SONUÇLAR

- Üretilen NiO/MWCNT/NNaM/KGE, literatürde daha önce kullanılmamış yeni ve etkili bir elektrokimyasal platform olarak göze çarpmaktadır. XT, TP ve TB'nin eş zamanlı analizini nM seviyelerinde LOD değerleri ile gerçekleştirmiştir.
- Ksantin, teofilin ve teobromin için diferansiyel puls yöntemi ile NiO/MWCNT/NNaM/KGE elektrokimyasal sensörü kullanılarak analiz yöntemi ile sırasıyla 0,5 – 150,0; 5,0 – 200,0; 5,0 – 250,0 μM doğrusal çalışma aralıkları 0,08; 0,36; 0,46 μM LOD değerleri ile elde edilmiştir.
- Eşzamanlı analiz için üç farklı matriste yapılan gerçek numune çalışmalarında %96,9 – 104,1 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir.
- Ksantin teofilin ve teobrominin DNA ile etkileşimi NiO/MWCNT/NNaM/KGE elektrokimyasal platformu ve diferansiyel puls voltametrisi kullanılarak incelenmiş, Ksantin teofilin ve teobrominin DNA'ya bağlanmaları için sırasıyla $3,37 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; $3,61 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; $7,17 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ bağlanma sabiti değerleri ve -20,13 kJ/mol; -20,31 kJ/mol; -22,01 kJ/mol ΔG^0 değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar her bir molekül için DNA ile etkileşimin termodinamik olarak istemli olduğunu ve etkileşimin zayıf elektrostatik kuvvetler aracılığı ile gerçekleştiğini belirtmiştir.
- Kafeinin elektrokimyasal analizi basit kalem grafit elektrot ile ve iki ayrı voltametrik teknik kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- Diferansiyel puls ve kare dalga voltametrisi ile sırasıyla 30,0 – 1000,0 ve 10,0 – 1000,0 μM doğrusal çalışma aralıkları 8,84 ve 9,36 μM LOD değerleri ile elde edilmiştir.
- Gerçek numune analizlerinde kafein için her iki yöntemle %95,6 – 103,8 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir.
- Kafeinin DNA ile etkileşimi için diferansiyel puls ve kare dalga voltametrisi teknikleri ile sırasıyla $4,52 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; $8,64 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ bağlanma sabiti değerleri ve -20,85; -23,29 kJ/mol ΔG^0 değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar CF'nin DNA ile etkileşiminin termodinamik olarak istemli olduğunu ve bağlanmanın zayıf elektrostatik kuvvetler ile gerçekleştiğini belirtmiştir.

- Elektro-oksidasyon mekanizmaları için hesaplanan parametreler (aktarılan elektron sayısı ve E-pH eğrisinin eğimi) literatürde hesaplanan değerler ile karşılaştırılmış ve bu sonuçların uyumlu olduğu gösterilmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar yukarıda listelenmiştir. Eşzamanlı analizde geliştirilen sensör yüzeyinde reaksiyon hızı en yüksek molekül ksantindir. Aynı trend seçicilik çalışmalarında yapılan tekli analizler ile de uyumludur. Eşzamanlı analize dahil edilmeyen kafein molekülünün yapılan girişim çalışmasında teobromine yüksek bir girişim yapması neden kafeini eşzamanlı analize dahil etmediğimizi açıklamaktadır.

Kafein için DPV ve KDV yöntemleri ile geliştirilen analiz yöntemlerinde KDV ile daha düşük derişimlerde ölçüm yapılmakla birlikte DPV ile daha düşük LOD değerlerine ulaşılması DPV yönteminin daha kesin akım değerleri verdiğini göstermektedir.

Ksantin, teofilin, teobromin ve kafeinin DNA ile etkileşimi incelendiğinde literatürde UV-spektrometresi ile elde edilen verilerle uyumlu değerler bulunmuştur. Ksantin için literatürde bu konuda bir çalışma bulunmasa da elde edilen verilerin, yakın moleküler yapıları nedeniyle birbirleri ile uyum gösterdiği düşünülmektedir.

Bütün moleküller için araştırılan DNA etkileşimlerinin termodinamik olarak istemli olduğu elde edilen standart Serbest Gibbs Enerji değişimi değerleri ile gösterilmiştir. Ek olarak çalışılan tüm moleküller için DNA ile etkileşim zayıf elektrostatik kuvvetler tarafından yönetildiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Aklilu, M., Tessema, M., Redi-Abshiro, M. 2008. Indirect voltammetric determination of caffeine content in coffee using 1,4-benzoquinone modified carbon paste electrode. *Talanta*, 76; 742–746.
- Anithaa, A.C., Asokan, K., Sekara, C. 2017. Voltammetric determination of epinephrine and xanthine based on sodium dodecyl sulphate assisted tungsten trioxide nanoparticles. *Electrochimica Acta*, 237; 44-53.
- Anvari, L., Ghoreishi, S.M., Faridbod, F., Ganjali, M.R. 2021. Electrochemical Determination of Methamphetamine in Human Plasma on a Nanoceria Nanoparticle Decorated Reduced Graphene Oxide (rGO) Glassy Carbon Electrode (GCE). *Analytical Letters*, 54(15); 2509-2522.
- Bayraktepe, D.E., Yazan, Z., Önal, M. 2019. Sensitive and cost effective disposable composite electrode based on graphite, nano-smectite and multiwall carbon nanotubes for the simultaneous trace level detection of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in pharmaceuticals. *Talanta*, 203; 131-139.
- Bayraktepe D.E. 2020. A voltammetric study on drug-DNA interactions: Kinetic and thermodynamic aspects of the relations between the anticancer agent dasatinib and ds-DNA using a pencil lead graphite electrode. *Microchemical Journal*, 157; 104946.
- Bedini, A., Zanolli, V., Zanardi, S., Bersellini, U., Dalcanale, E., Suman, M. 2013. Rapid and Simultaneous Analysis of Xanthines and Polyphenols as Bitter Taste Markers in Bakery Products by FT-NIR Spectroscopy. *Food Anal. Methods*, 6; 17–27.
- Beitollahi, H., Movahedifar, F., Tajik, S., Jahani, S. 2019. A Review on the Effects of Introducing CNTs in the Modification Process of Electrochemical Sensors. *Electroanalysis*, 31; 1195-1203.
- Blanco, A. and Blanco, G. 2017. *Medical Biochemistry*. Elsevier, 805, Arjantin.
- Brunetti, B., Desimoni, E. 2009. Determination of Theophylline at a Cysteic Acid Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis* 21(6); 772 – 778.
- Cinkova, K., Zbojekova, N., Vojs, M., Marton, M., Samphaoc, A., Svorc, L. 2015. Electroanalytical application of a boron-doped diamond electrode for sensitive voltammetric determination of theophylline in pharmaceutical dosages and human urine. *Anal. Methods*, 7; 6755.
- Connolly, D., Currivan, S., Paull, B. 2012. Polymeric monolithic materials modified with nanoparticles for separation and detection of biomolecules: A review. *Proteomics*, 12; 2904-2917.

- Çelik, E.E., Gökmen, V. 2018. A study on interactions between the insoluble fractions of different coffee infusions and major cocoa free antioxidants and different coffee infusions and dark chocolate. *Food Chemistry*, 255; 8–14.
- Dehnavi, A. and Soleymanpour, A. 2020. Titanium Dioxide/Multi-Walled Carbon Nanotubes Composite Modified Pencil Graphite Sensor for Sensitive Voltammetric Determination of Propranolol in Real Samples. *Electroanalysis*, 32, 1-11.
- Dervisevic, M., Custiuc, E., Cevik, E., Şenel, M. 2015. Construction of novel xanthine biosensor by using polymeric mediator/MWCNT nanocomposite layer for fish freshness detection. *Food Chemistry*, 181; 277-283.
- Dongmo, L.M., Guenang, L.S., Jiokeng, S.L.Z., Kamdem, A.T., Doungmo, G., Victor, B.C., Jović, M., Lesch, A., Tonlé, I.K., Girault, H. 2021. A new sensor based on an amino-montmorillonite-modified inkjet-printed graphene electrode for the voltammetric determination of gentisic acid. *Microchimica Acta*, 188; 36.
- Durst, R.A., Baumner, A. J., Murray, R.W., Buck, R.P., Andrieux, C.P. 1997. CHEMICALLY MODIFIED ELECTRODES: RECOMMENDED TERMINOLOGY AND DEFINITIONS. *Pure & App. Chem.*, 69(6); 1317-1323.
- Erdem, A., Ozsoz M. 2002. Electrochemical DNA Biosensors Based on DNA-Drug Interactions. *Electroanalysis*, 14(14); 965-974.
- Ferrag, C., Noroozifar, M., Kerman, K. 2020. Thiol functionalized carbon ceramic electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles for simultaneous determination of purine derivatives. *Materials Science & Engineering C*, 110; 110568.
- Findik, M., Bingol, H., Erdem, A. 2021. Hybrid nanoflowers modified pencil graphite electrodes developed for electrochemical monitoring of interaction between Mitomycin C and DNA. *Talanta*, 222; 121647.
- Fiorucci, A.R., Cavaleiro, E.T.G. 2002. The use of carbon paste electrode in the direct voltammetric determination of tryptophan in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28; 909-915.
- Gan, T., Li, J., Xu, L., Guo, S., Zhao, A., Sun, J. 2020. Multishell Au@Ag@SiO₂ nanorods embedded into a molecularly imprinted polymer as electrochemical sensing platform for quantification of theobromine *Microchimica Acta*, 187; 291.
- George, J.M., Antony, A., Mathew, B. 2018. Metal oxide nanoparticles in electrochemical sensing and biosensing: a review. *Microchimica Acta*, 185; 358.
- Gowda, J.I. and Nandibewoor, S.T. 2014. Simultaneous electrochemical determination of 4-aminophenazone and caffeine at electrochemically pre-treated graphite pencil electrode *Anal. Methods*, 6; 5147.

- Gupta, V. K., Jain, R., Radhapyari, K., Jadon, N., Agarwal, S. 2011. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review. *Analytical Biochemistry*, 408; 179–196.
- Harvey, D. 2011. *Analytical Chemistry 2.0—an open-access digital textbook*. *Anal. Bioanal. Chem.* 399; 149–152.
- Heydari, H., Gholivand, M.B., Abdolmaleki, A. 2016. Cyclic voltammetry deposition of copper nanostructure on MWCNTs modified pencil graphite electrode: An ultra-sensitive hydrazine sensor. *Materials Science and Engineering C*, 66; 16-24.
- Hoang, H.V., Holze, R. 2006. Electrochemical Synthesis of Polyaniline/Montmorillonite Nanocomposites and Their Characterization *Chem. Mater.* 2006, 18, 1976-1980.
- Huang, Y., Xue, S.F., Tao, Z., Zhu, Q.J., Ma, Y.H., Zhong, S.H. 2011. Voltammetric studies of the interaction of 6-mercaptopurine with cucurbit[7]uril and DNA. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 69; 131-137.
- Jadon, N., Jain, R., Sharma, S., Singh, K. 2016. Recent trends in electrochemical sensors for multianalyte detection – A review. *Talanta*, 161; 894-916.
- Jahani, S. and Beitollahi, H. 2016. Selective Detection of Dopamine in the Presence of Uric Acid Using NiO Nanoparticles Decorated on Graphene Nanosheets Modified Screen-printed Electrodes *Electroanalysis*, 28; 2022-2028.
- Jesny, S., Kumar, K. G. 2017. Non-enzymatic Electrochemical Sensor for the Simultaneous Determination of Xanthine, its Methyl Derivatives Theophylline and Caffeine as well as its Metabolite Uric Acid. *Electroanalysis*, 29; 1828-1837.
- Johnson I.M., Prakash H., Prathiba J., Raghunathan R., Malathi R. 2012. Spectral Analysis of Naturally Occurring Methylxanthines (Theophylline, Theobromine and Caffeine) Binding with DNA. *PLoS ONE*, 7(12); e50019.
- Kaedi, F., Yavari, Z., Asmaei, M., Abbasian, A.R. and Noroozifar, M. 2019. Ethanol electrooxidation on high-performance mesoporous ZnFe₂O₄-supported palladium nanoparticles *New J. Chem.*, 43; 3884.
- Kawde, A.N., Baig, N., Sajid, M. 2016. Graphite pencil electrodes as electrochemical sensors for environmental analysis: a review of features, developments, and applications. *RSC Adv.*, 6; 91325.
- Kissinger, P.T., Heineman, W.R. 1983. Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.*, 60(9); 702-706.
- Koç, Z., Çelik, M., Önal, M., Sarıkaya, Y., Mogulkoc, Y. 2013. Preparation and characterization of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)/Na-montmorillonite intercalated nanocomposites. *J. Polym. Eng.*, 33(1); 27-32.

- Krzyczmonik, P., Socha, E., Skrzypek, S., Soliwoda, K., Celichowski, G., Grobelny, J. 2014. Honeycomb-structured porous poly(3,4-ethylenedioxythiophene) composite layers on a gold electrode. *Thin Solid Films*, 565; 54–61.
- Kumari, A. 2018. *Sweet Biochemistry Remembering Structures, Cycles, and Pathways by Mnemonics*. Elsevier, 123, Hindistan.
- Laborda, E., González, J., Molina, Á. 2014. Recent advances on the theory of pulse techniques: A mini review. *Electrochemistry Communications*, 43; 25-30.
- Lasia, A. 2014. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*. Springer, 367, Kanada.
- Lefrou, C., Fabry, P., Poignet, J. C. 2012. *Electrochemistry The Basics with Examples*. Springer, 352, Fransa.
- Li, S., Noroozifar, M. and Kerman, K. 2019. Nanocomposite of ferricyanide-doped chitosan with multi-walled carbon nanotubes for simultaneous sensory detection of redox-active biomolecules *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 849; 113376.
- Mahnashi, M.H., Mahmoud, A.M., Alkahtani, S.A., Ali, R., El-Wakil, M.M. 2020. Facile fabrication of a novel disposable pencil graphite electrode for simultaneous determination of promising immunosuppressant drugs mycophenolate mofetil and tacrolimus in human biological fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412; 355-364.
- Medeiros, R.A., Rocha-Filho, R.C., Fatibello-Filho, O. 2010. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. *Food Chemistry*, 123; 886–891.
- Mekassa, B., Tessema, M., Chandravanshi, B. S. 2017. Simultaneous determination of caffeine and theophylline using square wave voltammetry at poly(L-aspartic acid)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite modified electrode. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 16; 46–54.
- Michael, P., Callahan, K., Smith, E., Cleaves II, H. J. and Ruzicka, J., Stern, J. C., Glavin, D. P., House, C. H. and Dworkin, J. P. 2011. Carbonaceous meteorites contain a wide range of extraterrestrial nucleobases. *PNAS*, 108(34); 13995–13998.
- Mirceski, V., Gulaboski, R., Lovric, M., Bogeski, I., Kappl, R., Hoth, M. 2013. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. *Electroanalysis*, 25(11); 2411 – 2422.
- Mosai, A.K., Tutu, H. 2020. Recovery of platinum (IV) from aqueous solutions using 3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane functionalized bentonite. *Journal of Dispersion Science and Technology*.

- Nafisi, S., Manouchehri, F., Tajmir-Riahi, H. A., Varavipour M. 2008. Structural features of DNA interaction with caffeine and theophylline. *Journal of Molecular Structure*, 875; 392–399.
- Nia, N.A., Foroughi, M.M., Jahani, S. 2021. Simultaneous determination of theobromine, theophylline, and caffeine using a modified electrode with petal-like MnO₂ nanostructure. *Talanta*, 222; 121-563.
- Opallo, M., Lesniewski, A. 2011. A review on electrodes modified with ionic liquids *Electroanalytical Chemistry*, 656; 2–16.
- Patel, B.R., Noroozifar, M., Kerman, K. 2020. Review—Nanocomposite-Based Sensors for Voltammetric Detection of Hazardous Phenolic Pollutants in Water. *Journal of The Electrochemical Society*, 167; 037568.
- Patel, B.R., Imran, S., Ye, W., Weng, H., Noroozifar, M., Kerman, K. 2020. Simultaneous voltammetric detection of six biomolecules using a nanocomposite of titanium dioxide nanorods with multi-walled carbon nanotubes. *Electrochimica Acta*, 362; 137094.
- Raeisi-Kheirabadi, N., Nezamzadeh-Ejhieh, A., Aghaei, H. 2021. A brief study on the kinetic of the voltammetric behavior of the modified carbon paste electrode with NiO nanoparticles towards loratadine as a carboxylate-amidic drug compound. *Microchemical Journal*, 162; 105869.
- Rauf, S., Gooding, J.J., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anwar, M.A., Khalid, A.M. 2005. Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37; 205–217.
- Santos, W.J.R., Lima, P.R., Tanaka, A.A., Tanaka, S.M.C.N., Kubota, L.T. 2009. Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode. *Food Chemistry*, 113; 1206–1211.
- Shan, D. Wang, Y., Xue, H., Cosnier, S. 2009. Sensitive and selective xanthine amperometric sensors based on calcium carbonate nanoparticles. *Sensors and Actuators B*, 136; 510–515.
- Shindo, D., Oikawa, T. 2002. *Analytical Electron Microscopy for Materials Science*. Springer, 155, Japonya.
- Sirajuddin M., Ali, S., Badshah A. 2013. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124; 1–19.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. 2014. *Principles of Instrumental Analysis* 6th Edition. Thomson Higher Education, 1040, Canada.
- Svorc, L., Haško, M., Sarakhman, O., Kianičková, K., Stanković, D.M., Otrisal, P. 2018. A progressive electrochemical sensor for food quality control: Reliable

- determination of theobromine in chocolate products using a miniaturized boron-doped diamond electrode. *Microchemical Journal*, 142; 297-304.
- Svorc, L., Tomcik, P., Svitkova, J., Rievaj, M., Bustin, D. 2012. Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode. *Food Chemistry*, 135; 1198–1204.
- Tasic, Z.Z., Mihajlovic, M.B.P., Simonovic, A.T., Radovanovic, M.B., Antonijevic, M.M. 2021. Review of applied surface modifications of pencil graphite electrodes for paracetamol sensing. *Results in Physics*, 22; 103911.
- 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 Chemistry*, 210 (2016) 156–162.
- Tohidinia, M., Farsadrooh, M., Bahmanzadeh, S., Sabbaghi, N. and Noroozifar, M. 2018. Poly(quercetin)-bismuth nanowires as a new modifier for simultaneous voltammetric determination of dihydroxybenzene isomers and nitrite. *RSC Adv.* 8; 1237.
- Wang, J. 2000. *Analytical Electrochemistry 2nd Edition*. Wiley-VCH, 209, Amerika Birleşik Devletleri.
- Wu, Y., Deng, P., Tian, Y., Ding, Z., Li, G., Liu, J., Zuberi, Z., He, Q. 2020. Rapid recognition and determination of tryptophan by carbon nanotubes and molecularly imprinted polymer-modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 131; 107393.
- Xia, Z., Ni, Y., Kokot, S. 2013. Simultaneous determination of caffeine, theophylline and theobromine in food samples by a kinetic spectrophotometric method. *Food Chemistry*, 141; 4087–4093.
- Xiao, F., Ruan, C., Li, J., Liu, L., Zhao, F., Zeng, B. 2008. Voltammetric Determination of Xanthine with a Single-Walled Carbon Nanotube-Ionic Liquid Paste Modified Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis* 20(4); 361-366.
- Yadav, D.K., Gupta, R., Ganesan, V., Sonkar, P.K. 2017. Individual and simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, uric acid and folic acid by using a glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles linked to bentonite via cysteine groups. *Microchim Acta*, 184; 1951-1957.
- Yang, X.R., Ye, C.X., Xu, J.K., Jiang, Y.M. 2007. Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia assamica* var. Kucha by HPLC. *Food Chemistry*, 100; 1132–1136.
- Yazan Z., Bayraktepe D.E., Dinç E. 2020. Four-way parallel factor analysis of voltammetric four-way dataset for monitoring the etoposide-DNA interaction with its binding constant determination. *Bioelectrochemistry*, 134; 107525.

Yılmaz, S. 2012. Elektroanalitik Kimya. Kriter, 286, Türkiye.

Zeybek, D.K., Demir, B., Zeybek, B., Pekyardımcı Ş. 2015. A sensitive electrochemical DNA biosensor for antineoplastic drug 5-fluorouracil based on glassy carbon electrode modified with poly(bromocresol purple). Talanta, 144; 793-800.

Zhang, J., Wang, L. P., Guo, W., Peng, X. D., Li, M., Yuan, Z. B. 2011. Sensitive Differential Pulse Stripping Voltammetry of Caffeine in Medicines and Cola Using a Sensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes and Nafion. Int. J. Electrochem. Sci., 6; 997 – 1006.

Zhang, Y., Jiang, X., Zhang, J., Zhang, H., Li, Y. 2019. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and isoniazid using MXene modified screen-printed electrode. Biosensors and Bioelectronics, 130; 315–321.

Zhou, C., Tong, D. and Yu, W. 2019. 7 - Smectite Nanomaterials: Preparation, Properties, and Functional Applications, Micro and Nano Technologies, 335-364

Zoski, C.G. 2007. Handbook of Electrochemistry. Elsevier, 892, Amerika Birleşik Devletleri.