



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**POLİMER FİLM MODİFİYE
CAMSİ KARBON ELEKTROTLARIN
GELİŞTİRİLMESİ VE MELATONİNİN
ELEKTROKİMYASAL ANALİZİNDE
KULLANILMASI**

Ümran SOFU

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Dilek KUL

TRABZON-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

12.02.2025
Ümran SOFU

TEŞEKKÜR

Tüm doktora sürecim boyunca benden hiçbir desteğini esirgemeyen, değerli bilgi birikimi ile bana yol gösteren sevgili danışmanım Prof. Dr. Dilek KUL'a;

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Fatma AĞIN'a;

Bulunduğu her ortamı güzelleştiren, 2017 yılından beri bana olan inancı, desteği, sabrı ve teşvik edici tutumu sayesinde bu zorlu sürecin üstesinden gelmemi sağlayan, doktora tezimin ortaya çıkmasında en az benim kadar emeği olan, sevgisi ve şefkatini her zaman kalbimde hissettiğim canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Gökçe ÖZTÜRK'e;

Tez çalışmama verdikleri destek için Doç. Dr. Fatih ERDEMİR ve Arş. Gör. Hamit Ali REİS'e;

Destekleri ve deneyimleriyle daima yanımda olan sevgili meslektaşlarım Ecz. Dilan İFŞAT ve Ecz. Ahmet ÇETİNER'e;

Trabzon'da gerçekleştirdiğim zorlu ve yorucu doktora deneylerim boyunca beni yalnız bırakmayan, oradaki günlerimi anlamlandıran ve bana güzel anılar kazandıran canım arkadaşlarım Arş. Gör. Elif ŞİŞMAN, Arş. Gör. Didem AKKAYA ve Arş. Gör. Batuhan ÇETİN'e;

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, sabırları ve sevgileriyle bana güç veren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ümran SOFU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xx
ÖZET	xxiii
ABSTRACT	xxiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Uykunun Tanımı ve Evreleri	3
2.2. Uyku Bozuklukları ve Tedavisi	3
2.3. Melatonin	5
2.3.1. Melatoninin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	7
2.4. Elektrokimya	7
2.5. Kütle Aktarımı	8
2.6. Elektroanalitik Yöntemler	9
2.7. Voltametri	10
2.8. Voltametrik Hücre	10
2.8.1. Referans Elektrot	11
2.8.2. Yardımcı (Karşıt) Elektrot	11
2.8.3. Çalışma Elektrotu	11
2.8.3.1. Katı Elektrotlar	12
2.8.3.2. Camsı Karbon Elektrot	13
2.8.3.3. Modifiye Elektrotlar	13
2.9. Voltametrik Yöntemler	14
2.9.1. Döngülü Voltametri	14
2.9.2. Puls Voltametrisi	16

2.9.2.1. Diferansiyel Puls Voltametrisi	17
2.9.2.2. Kare Dalga Voltametrisi	18
2.9.3. Sıyırma Voltametrisi	19
2.10. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi	20
2.11. İletken Polimerler	21
2.11.1. Trifenilmetan Boyar Maddeler	22
2.11.1.1. Bromkrezol Moru	22
2.11.1.2. Bromfenol Mavisi	23
2.11.1.3. Bromtimol Mavisi	23
2.12. Analitik Yöntem Validasyonu ve Parametreleri	24
2.13. Melatoninin Literatürdeki Çalışmaları	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Kimyasal Maddeler	30
3.2. Cihazlar ve Gereçler	31
3.3. Elektrokimyasal Sistem ve Bileşenler	31
3.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	32
3.4.1. Melatonin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	32
3.4.2. Destek Elektrolit Çözeltilerinin Hazırlanması	32
3.4.3. Yapay İdrar Çözeltilisinin Hazırlanması	33
3.4.4. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması	33
3.4.5. Serum ve İdrar Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	33
3.4.6. Monomer Çözeltilerinin Hazırlanması	34
3.4.6.1. Bromkrezol Moru Çözeltisi	34
3.4.6.2. Bromfenol Mavisi Çözeltisi	34
3.4.6.3. Bromtimol Mavisi Çözeltisi	34
3.5. Modifiye Elektrotların Hazırlanması	34
3.5.1. PBCP/GCE'nin Hazırlanması	34
3.5.2. PBPB/GCE'nin Hazırlanması	35
3.5.3. PBTB/GCE'nin Hazırlanması	35
3.6. Voltametrik Çalışmalar	36
3.6.1. Elektrokimyasal Polimerizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	36
3.6.1.1. BCP'nin Elektrokimyasal Polimerizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	36

3.6.1.2. BPB'nin Elektrokimyasal Polimerizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	37
3.6.1.3. BTB'nin Elektrokimyasal Polimerizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	38
3.6.2. PBCP, PBPB ve PBTB Filmlerin Karakterizasyon Çalışmaları	38
3.6.3. Melatoninin Elektrokimyasal Analiz Çalışmaları	39
3.6.3.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi	39
3.6.3.2. Tarama Hızı	40
3.6.3.3. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu	40
3.6.3.4. Kalibrasyon Çalışması	40
3.6.3.5. Tekrar Edilebilirlik Çalışması	42
3.6.3.6. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin Çalışması	42
3.6.3.7. Geri Kazanım Çalışması	43
3.6.3.8. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması	43
3.6.3.8.1. Serum Örneklerinden Tayin Çalışması	43
3.6.3.8.2. Yapay İdrar Örneklerinden Tayin Çalışması	44
3.6.3.9. Girişim Çalışması	45
3.6.3.10. Stabilité Çalışması	46
3.6.3.11. Yeniden Üretilirlik Çalışması	46
4. BULGULAR	47
4.1. PBCP/GCE ile Elde Edilen Bulgular	47
4.1.1. Poli(Bromkrezol Moru) Filminin Sentezi	47
4.1.1.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi	47
4.1.1.2. İyonların Etkisi	49
4.1.1.3. Monomer Derişimi	49
4.1.1.4. Tarama Hızı	51
4.1.1.5. Döngü Sayısı	51
4.1.1.6. Optimize Edilmiş Koşullarda PBCP/GCE'nin Hazırlanması	52
4.1.2. PBCP/GCE'nin Karakterizasyonu	53
4.1.3. PBCP/GCE ile Melatoninin Elektrokimyasal Analizi	54
4.1.3.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi	54
4.1.3.2. Tarama Hızı	58
4.1.3.3. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları	59

4.1.3.4. Farmasötik Dozaj Formundan Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları	62
4.1.3.5. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması	64
4.1.3.6. Girişim Çalışması	70
4.1.3.7. PBCP/GCE'nin Stabilite Çalışması	70
4.1.3.8. PBCP/GCE'nin Yeniden Üretilebilirlik Çalışması	71
4.2. PBPB/GCE ile Elde Edilen Bulgular	71
4.2.1. Poli(Bromfenol Mavisi) Filminin Sentezi	71
4.2.1.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi	71
4.2.1.2. İyonların Etkisi	74
4.2.1.3. Monomer Derişimi	74
4.2.1.4. Tarama Hızı	76
4.2.1.5. Döngü Sayısı	77
4.2.1.6. Optimize Edilmiş Koşullarda PBPB/GCE'nin Hazırlanması	77
4.2.2. PBPB/GCE'nin Karakterizasyonu	78
4.2.3. PBPB/GCE ile Melatoninin Elektrokimyasal Analizi	79
4.2.3.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi	80
4.2.3.2. Tarama Hızı	84
4.2.3.3. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları	85
4.2.3.4. Farmasötik Dozaj Formundan Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları	87
4.2.3.5. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması	89
4.2.3.6. Girişim Çalışması	95
4.2.3.7. PBPB/GCE'nin Stabilite Çalışması	95
4.2.3.8. PBPB/GCE'nin Yeniden Üretilebilirlik Çalışması	96
4.3. PBTB/GCE ile Elde Edilen Bulgular	96
4.3.1. Poli(Bromtimol Mavisi) Filminin Sentezi	96
4.3.1.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi	96
4.3.1.2. İyonların Etkisi	99
4.3.1.3. Monomer Derişimi	99
4.3.1.4. Tarama Hızı	101
4.3.1.5. Döngü Sayısı	101
4.3.1.6. Optimize Edilmiş Koşullarda PBTB/GCE'nin Hazırlanması	102
4.3.2. PBTB/GCE'nin Karakterizasyonu	103
4.3.3. PBTB/GCE ile Melatoninin Elektrokimyasal Analizi	104

4.3.3.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi	104
4.3.3.2. Tarama Hızı	108
4.3.3.3. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu	109
4.3.3.4. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları	111
4.3.3.5. Farmasötik Dozaj Formundan Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları	113
4.3.3.6. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması	115
4.3.3.7. Girişim Çalışması	121
4.3.3.8. PBTB/GCE'nin Stabilite Çalışması	121
4.3.3.9. PBTB/GCE'nin Yeniden Üretilirlik Çalışması	122
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	123
5.1. PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE'lerin Hazırlanması	123
5.2. PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE'lerin Karakterizasyonu	126
5.3. PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE ile Melatonin Analizi	127
5.4. PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE'lerin Karşılaştırılması	136
5.5. Melatoninin Kalibrasyon Çalışması Sonuçlarının Literatürdeki Çalışmalar ile Karşılaştırılması	138
6. KAYNAKLAR	140
ÖZGEÇMİŞ	158

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Melatonin için literatürde bulunan voltametrik çalışmalara ait veriler	27
Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler	30
Tablo 3. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve gereçler	31
Tablo 4. Tez çalışması kapsamında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri	32
Tablo 5. Melatoninin PBCP/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri	61
Tablo 6. Melatoninin PBCP/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	62
Tablo 7. PBCP/GCE kullanılarak DPV ve SWV ile pH 8.0 FT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri	63
Tablo 8. PBCP/GCE kullanılarak DPV ve SWV ile pH 8.0 FT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen geri kazanım çalışması verileri	63
Tablo 9. PBCP/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	65
Tablo 10. PBCP/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	66
Tablo 11. PBCP/GCE kullanılarak pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	67
Tablo 12. PBCP/GCE kullanılarak pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	68
Tablo 13. PBCP/GCE kullanılarak DPV için 6.0×10^{-6} M ve SWV için 8.0×10^{-6} M melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	69
Tablo 14. PBCP/GCE kullanılarak DPV ve SWV için 1.0×10^{-6} M melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	69

Tablo 15.	Melatoninin PBPB/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri	86
Tablo 16.	Melatoninin PBPB/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	87
Tablo 17.	PBPB/GCE kullanılarak DPV ve SWV ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri	88
Tablo 18.	PBPB/GCE kullanılarak DPV ve SWV ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen geri kazanım çalışması verileri	89
Tablo 19.	PBPB/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	90
Tablo 20.	PBPB/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	91
Tablo 21.	PBPB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	92
Tablo 22.	PBPB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	93
Tablo 23.	PBPB/GCE kullanılarak DPV ve SWV için 8.0×10^{-6} M melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	94
Tablo 24.	PBPB/GCE kullanılarak DPV için 1.0×10^{-6} M ve SWV için 2.0×10^{-6} M melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	94
Tablo 25.	Melatoninin PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri	112
Tablo 26.	Melatoninin PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	113
Tablo 27.	PBTB/GCE kullanılarak DPSV ve SWSV ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri	114

Tablo 28.	PBTB/GCE kullanılarak DPSV ve SWSV ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen geri kazanım çalışması verileri	115
Tablo 29.	PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	116
Tablo 30.	PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	117
Tablo 31.	PBTB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	118
Tablo 32.	PBTB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	119
Tablo 33.	PBTB/GCE kullanılarak DPSV ve SWSV için 4.0×10^{-7} M melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	120
Tablo 34.	PBTB/GCE kullanılarak DPSV ve SWSV için 4.0×10^{-7} M melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	120

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Hayvanlarda ve bitkilerde melatoninin biyosentetik yollarının karşılaştırılması. TPH: triptofan hidroksilaz; AAAD: aromatik amino asit dekarboksilaz; SNAT: serotonin <i>N</i> -asetiltransferaz; ASMT: <i>N</i> -asetilserotonin <i>O</i> -metiltransferaz, TDC: triptofandekarboksilaz; T5H: triptamin 5-hidroksilaz, CAMT: kafeik asit <i>O</i> -metiltransferaz. Siyah yalnızca hayvanlarda bulunur, yeşil yalnızca bitkilerde bulunur ve kırmızı hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunur	6
Şekil 2. Melatoninin kimyasal yapısı	7
Şekil 3. CV yöntemi için üçgen potansiyel dalga biçimine sahip uyarma sinyali	15
Şekil 4. Tersinir, yarı tersinir ve tersinmez bir elektrot reaksiyonuna ait döngülü voltamogramlar	15
Şekil 5. (A) DPV’de uygulanan potansiyelin zamana karşı değişimi; (B) DPV’de elde edilen voltammogram	18
Şekil 6. (A) SWV’de uygulanan potansiyelin zamana karşı değişimi; (B) SWV’de elde edilen voltammogram	19
Şekil 7. Bromkrezol morunun kimyasal yapısı	22
Şekil 8. Bromfenol mavisinin kimyasal yapısı	23
Şekil 9. Bromtimol mavisinin kimyasal yapısı	24
Şekil 10. (A) pH 2.6 McT, (B) pH 4.5 AT, (C) pH 5.6 FT, (D) pH 6.0 ST, (E) pH 8.0 FT ve (F) pH 9.0 BRT içerisindeki 0.50 mM BCP’nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s ⁻¹ , döngü sayısı 50	48
Şekil 11. pH 5.6 FT içerisinde ilave edilen tuzların PBCP pik akımı artış oranına etkisi. ▼: NaNO ₃ , ■: Na ₂ SO ₄ , ▲: KCl	49
Şekil 12. 0.1 M NaNO ₃ içeren pH 5.6 FT içerisindeki (A) 0.25 mM, (B) 0.50 mM, (C) 0.75 mM ve (D) 1.0 mM BCP’nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s ⁻¹ , döngü sayısı 50	50
Şekil 13. pH 5.6 FT + 0.1 M NaNO ₃ içerisindeki elektropolimerizasyonda BCP monomer derişiminin PBCP pik akımı artış oranına etkisi	51

Şekil 14.	PBCP/GCE hazırlamak için 0.1 M NaNO ₃ içeren pH 5.6 FT içerisindeki 0.50 mM BCP'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s ⁻¹ , döngü sayısı 35. Ekli şekil: 1. döngü (kırmızı) ve 35. döngü (mavi)	52
Şekil 15.	0.1 M KCl içeren 1.5 mM Fe(CN) ₆ ^{-3/-4} çözeltisinde kaydedilen yalın GCE ve PBCP/GCE'nin Nyquist eğrileri. Frekans aralığı: 0.1–10 ⁵ Hz. Uygulanan potansiyel: +0.25 V. Genlik: 0.01 V	53
Şekil 16.	pH 8.0 FT içerisindeki (A) 8.0×10 ⁻⁶ M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltmesi yapılmış diferansiyel puls ve (B) 1.0×10 ⁻⁵ M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltmesi yapılmış kare dalga voltamogramları. (a) Yalın GCE ve (b) PBCP/GCE	54
Şekil 17.	(a) pH 5.0 AT, (b) pH 6.0 ST, (c) pH 7.0 McT, (d) pH 8.0 FT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatonin (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramları	55
Şekil 18.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT (▲), ST (◆), FT (■), McT (▼) ve BRT (×) içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatonin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri	56
Şekil 19.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT (▲), ST (◆), FT (■), McT (▼) ve BRT (×) içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatonin pH'ya karşı pik akımı grafikleri	57
Şekil 20.	pH 8.0 FT içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatonin içeren çözeltiden CV yöntemi ile alınan tek döngülü voltamogramlar	58
Şekil 21.	pH 8.0 FT içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatonin CV yöntemi ile elde edilen (A) I _p – ν ve (B) I _p – ν ^{1/2} grafikleri	59
Şekil 22.	PBCP/GCE ile pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren çalışma çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör	60
Şekil 23.	pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör	65

- Şekil 24.** pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör 66
- Şekil 25.** PBCP/GCE kullanılarak pH 8.0 FT içerisindeki (siyah voltamogram) sadece melatonin içeren çözeltiden ve (kırmızı voltamogram) (a) 8.0×10^{-5} M askorbik asit, (b) 8.0×10^{-6} M ürik asit ve (c) 3.0×10^{-6} M melatonin içeren çözeltiden alınan diferansiyel puls voltamogramları 70
- Şekil 26.** (A) pH 2.6 McT, (B) pH 4.5 AT, (C) pH 5.9 FT, (D) pH 6.0 ST, (E) pH 8.0 FT ve (F) pH 9.0 BRT içerisindeki 0.50 mM BPB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1} , döngü sayısı 50 73
- Şekil 27.** pH 5.9 FT içerisine ilave edilen tuzların PBPB pik akımı artış oranına etkisi. ▼: NaNO_3 , ▲: KCl , ■: Na_2SO_4 74
- Şekil 28.** 0.05 M NaNO_3 içeren pH 5.9 FT içerisindeki (A) 0.25 mM, (B) 0.50 mM, (C) 0.75 mM, (D) 1.0 mM, (E) 1.5 mM, (F) 1.75 mM ve (G) 2.0 mM BPB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1} , döngü sayısı 50 75
- Şekil 29.** pH 5.9 FT + 0.05 M NaNO_3 içerisindeki elektropolimerizasyonda BPB monomer derişiminin PBPB pik akımı artış oranına etkisi 76
- Şekil 30.** PBPB/GCE hazırlamak için 0.05 M NaNO_3 içeren pH 5.9 FT içerisindeki 1.75 mM BPB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1} , döngü sayısı 50. Ekli şekil: 1. döngü (kırmızı) ve 50. döngü (mavi) 78
- Şekil 31.** 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ çözeltisinde kaydedilen yalın GCE ve PBPB/GCE'nin Nyquist eğrileri. Frekans aralığı: $0.1-10^5$ Hz. Uygulanan potansiyel: +0.25 V. Genlik: 0.01 V 79
- Şekil 32.** pH 8.0 BRT içerisindeki 8.0×10^{-6} M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltmesi yapılmış (A) diferansiyel puls ve (B) kare dalga voltamogramları. (a) Yalın GCE ve (b) PBPB/GCE 79
- Şekil 33.** (a) pH 5.0 ST, (b) pH 5.5 AT, (c) pH 6.0 FT, (d) pH 7.0 McT ve (e) pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramları 81

Şekil 34.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT (▲), ST (◆), FT (■), McT (▼) ve BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri	82
Şekil 35.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT (▲), ST (◆), FT (■), McT (▼) ve BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin pH'ya karşı pik akımı grafikleri	83
Şekil 36.	pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çözeltiden CV yöntemi ile alınan tek döngülü voltamogramlar	84
Şekil 37.	pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin CV yöntemi ile elde edilen (A) $I_p - v$ ve (B) $I_p - v^{1/2}$ grafikleri	85
Şekil 38.	PBPB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren çalışma çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör	86
Şekil 39.	pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör	90
Şekil 40.	pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör	91
Şekil 41.	PBPB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki (siyah voltamogram) sadece melatonin içeren çözeltiden ve (kırmızı voltamogram) (a) 8.0×10^{-5} M askorbik asit, (b) 8.0×10^{-6} M ürik asit ve (c) 3.0×10^{-6} M melatonin içeren çözeltiden alınan diferansiyel puls voltamogramları	95
Şekil 42.	(A) pH 7.5 McT, (B) pH 7.5 FT, (C) pH 8.0 McT, (D) pH 8.0 FT, (E) pH 9.0 BRT ve (F) pH 11.0 BRT içerisindeki 0.50 mM BTB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1} , döngü sayısı 30	98
Şekil 43.	pH 7.5 McT içerisine ilave edilen tuzların PBTB pik akımı artış oranına etkisi. ■: Na_2SO_4 , ▼: NaNO_3 , ▲: KCl	99

Şekil 44.	0.05 M Na ₂ SO ₄ içeren pH 7.5 McT içerisindeki (A) 0.10 mM, (B) 0.25 mM ve (C) 0.50 mM BTB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s ⁻¹ , döngü sayısı 30	100
Şekil 45.	pH 7.5 McT + 0.05 M Na ₂ SO ₄ içerisindeki elektropolimerizasyonda BTB monomer derişiminin PBTB pik akımı artış oranına etkisi	101
Şekil 46.	PBTB/GCE hazırlamak için 0.05 M Na ₂ SO ₄ içeren pH 7.5 McT içerisindeki 0.50 mM BTB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s ⁻¹ , döngü sayısı 18. Ekli şekil: 1. döngü (kırmızı) ve 18. döngü (mavi)	102
Şekil 47.	0.1 M KCl içeren 1.5 mM Fe(CN) ₆ ^{-3/-4} çözeltisinde kaydedilen yalın GCE ve PBTB/GCE'nin Nyquist eğrileri. Frekans aralığı: 0.1–10 ⁵ Hz. Uygulanan potansiyel: +0.25 V. Genlik: 0.01 V	103
Şekil 48.	pH 8.0 BRT içerisindeki (A) 4.0×10 ⁻⁷ M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltmesi yapılmış diferansiyel puls sıyırma ve (B) 4.0×10 ⁻⁶ M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltmesi yapılmış kare dalga sıyırma voltamogramları. (a) Yalın GCE ve (b) PBTB/GCE	104
Şekil 49.	(a) pH 5.0 AT, (b) pH 5.5 ST, (c) pH 6.5 McT, (d) pH 7.0 FT ve (e) pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatoninin (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramları	105
Şekil 50.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT (▲), ST (◆), FT (■), McT (▼) ve BRT (×) içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatoninin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri	106
Şekil 51.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT (▲), ST (◆), FT (■), McT (▼) ve BRT (×) içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatoninin pH'ya karşı pik akımı grafikleri	107
Şekil 52.	pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatonin içeren çözeltiden CV yöntemi ile alınan tek döngülü voltamogramlar	108
Şekil 53.	pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10 ⁻⁵ M melatoninin CV yöntemi ile elde edilen (A) I _p – v ve (B) I _p – v ^{1/2} grafikleri	109
Şekil 54.	pH 8.0 BRT içerisindeki (A) 1.0×10 ⁻⁶ M melatoninin DPSV ve (B) 2.0×10 ⁻⁶ M melatoninin SWSV yöntemleri ile elde edilen biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri	110

Şekil 55.	pH 8.0 BRT içerisindeki (A) 1.0×10^{-6} M melatoninin DPSV ve (B) 2.0×10^{-6} M melatoninin SWSV yöntemleri ile elde edilen biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri	110
Şekil 56.	PBTB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren çalışma çözeltilerinden (A ve C) DPSV ve (B ve D) SWSV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör	112
Şekil 57.	pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden (A ve C) DPSV ve (B ve D) SWSV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör	116
Şekil 58.	pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden (A ve C) DPSV ve (B ve D) SWSV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör	117
Şekil 59.	PBTB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki (siyah voltamogram) sadece melatonin içeren çözeltiden ve (kırmızı voltamogram) (a) 8.0×10^{-5} M askorbik asit, (b) 8.0×10^{-6} M ürik asit ve (c) 3.0×10^{-7} M melatonin içeren çözeltiden alınan diferansiyel puls voltamogramları	121
Şekil 60.	Melatoninin muhtemel yükseltgenme mekanizması	129

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AASM	Amerikan Uyku Tıbbı Akademisi
AC	Alternatif akım
AdSV	Adsorptif sıyırma voltametrisi
ASV	Anodik sıyırma voltametrisi
AT	Asetat tamponu
BCP	Bromkrezol moru
BPB	Bromfenol mavisi
BRT	Britton-Robinson tamponu
BTB	Bromtimol mavisi
C	Konsantrasyon
CSV	Katodik sıyırma voltametrisi
CSWV	Döngülü kare dalga voltametrisi
CV	Döngülü voltametri
DC	Doğru akım
DPSV	Diferansiyel puls sıyırma voltametrisi
DPV	Diferansiyel puls voltametri
DSWV	Diferansiyel kare dalga voltametrisi
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
FDA	The Food and Drug Administration
FT	Fosfat tamponu
GCE	Camsı karbon elektrot
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
ICSD	Uyku Bozukluklarının Uluslararası Sınıflandırması
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
LSV	Doğrusal taramalı voltametri
m	Eğim
McT	McIlvaine tamponu
NPV	Normal puls voltametrisi
NSF	Ulusal Uyku Vakfı

pH	Hidrojen konsantrasyonunun kologaritması
R_{ct}	Yük transfer direnci
RSD	Bağıl standart sapma
s	Standart sapma
SRS	Amerikan Uyku Tıbbı Akademisi ve Uyku Araştırmaları Derneği
ST	Sitrat tamponu
SWSV	Kare dalga sıyırma voltametrisi
SWV	Kare dalga voltametrisi
USP	United States Pharmacopeia
Z_{im}	Hayali empedans
Z_{re}	Gerçek empedans
Simgeler	
°C	Santigrat derece
μ	Mikro
cm³	Santimetreküp
E_p	Pik potansiyeli
g	Gram
Hz	Hertz
I_p	Pik akımı
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm²	Milimetrekare
mV	Milivolt
nM	Nanomolar
r	Korelasyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
v	Tarama hızı
V	Volt
μm	Mikrometre
Ω	Ohm

Formüller

Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş klorür
Al(OH)₃	Alüminyum hidroksit
C₁₃H₁₆N₂O₂	Melatonin
C₁₉H₁₀Br₄O₅S	Bromfenol mavisi
C₂₁H₁₆Br₂O₅S	Bromkrezol moru
C₂₇H₂₈Br₂O₅S	Bromtimol mavisi
C₂H₅OH	Etil alkol
C₅H₄N₄O₃	Ürik asit
C₆H₈O₆	L-askorbik asit
C₆H₈O₇	Sitrik asit anhidrus
CaCl₂.2H₂O	Kalsiyum klorür dihidrat
CH₃CN	Asetonitril
CH₃COOH	Asetik asit
CH₄N₂O	Üre
H₃BO₃	Borik asit
H₃PO₄	Fosforik asit
HCl	Hidroklorik asit
K₂SO₄	Potasyum sülfat
K₃[Fe(CN)₆]	Potasyum ferrisiyanür
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
KNO₃	Potasyum nitrat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
Na₂SO₄	Sodyum sülfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH₂PO₄.2H₂O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
NaNO₃	Sodyum nitrat
NaOH	Sodyum hidroksit
NH₄Cl	Amonyum klorür

ÖZET

Polimer Film Modifiye Camsı Karbon Elektrotların Geliştirilmesi ve Melatoninin Elektrokimyasal Analizinde Kullanılması

Bu tez çalışmasında melatoninin voltametrik yöntemlerle hassas tayini için polimer film modifiye camsı karbon elektrotlar geliştirildi. Bromkrezol moru, bromfenol mavisi ve bromtimol mavisi boyar maddelerinin elektrot yüzeyine elektropolimerizasyonu ile camsı karbon elektrot yüzeyleri modifiye edildi. Her bir boyar madde için polimerizasyon prosedürü optimize edildi. Polimer film modifiye bu elektrotlar kullanılarak voltametrik yöntemler ile melatonin analizi gerçekleştirildi. Polimer film modifiye camsı karbon elektrotlar ile melatonin analizi için en uygun tampon ortamlarına karar verildi. Hız taraması ile melatoninin bromkrezol moru modifiyeli camsı karbon elektrot ve bromfenol mavisi modifiyeli camsı karbon elektrot yüzeyindeki yükseltgenme reaksiyonlarının difüzyon kontrollü ve bromtimol mavisi modifiyeli camsı karbon elektrot yüzeyindeki yükseltgenme reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü olduğuna karar verildi. Adsorpsiyon kontrollü sistem için biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi ve karıştırma hızı optimize edildi. Melatoninin kantitatif analizi için voltametrik yöntemler kullanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlandı; doğrusal çalışma aralıkları, teşhis ve tayin sınırları belirlendi. Geliştirilen yöntemlerin kesinliği, gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneyleri sonucunda beş ölçüm üzerinden değerlendirildi ve %1.5'in altında bağıl standart sapma değerleri elde edildi. Ayrıca, geliştirilen elektrotlar ve yöntemler ile melatoninin farmasötik dozaj formları, insan serumu ve yapay idrar örneklerinden başarılı bir şekilde tayini gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, her bir elektrot ve yöntemin hem farmasötik dozaj formlarına hem de biyolojik numunelere uygulanabildiğini ve numunelerdeki diğer maddelerin etkisi olmaksızın melatoninin yüksek doğrulukla analiz edilebildiğini gösterdi. Hazırlanan elektrotların kararlılığı, operasyonel ve zamana karşı stabilite çalışmaları ile değerlendirildi. Melatonine karşı geliştirilen yöntemlerin seçiciliğini belirlemek amacıyla girişim çalışmaları yapıldı. Buna göre, vücut sıvılarında bulunan ve yaygın olarak girişim yapan türlerin melatonin analizini etkilemediği görüldü. Son olarak, elektrotların yeniden üretilebilirliğini değerlendirmek için farklı günlerde bağımsız olarak hazırlanan beş elektrot kullanıldı ve bu parametre bağıl standart sapma üzerinden değerlendirildi.

Anahtar Sözcükler: Bromfenol mavisi, Bromkrezol moru, Bromtimol mavisi, Melatonin, Voltametri

ABSTRACT

Development of Polymer Film Modified Glassy Carbon Electrodes and Their Use in the Electrochemical Analysis of Melatonin

In this thesis study, polymer film modified glassy carbon electrodes were developed for the sensitive determination of melatonin using voltammetric methods. The glassy carbon electrode surfaces were modified by the electropolymerization of the dyes bromocresol purple, bromophenol blue, and bromothymol blue onto the electrode surfaces. The polymerization procedure was optimized for each dye. Melatonin analysis was performed using voltammetric methods with these polymer film modified electrodes. The most suitable buffer media for melatonin analysis with polymer film modified glassy carbon electrodes were decided. It was determined by scan rate studies that the oxidation reactions on the bromocresol purple modified glassy carbon electrode and bromophenol blue modified glassy carbon electrode surfaces were diffusion-controlled, and the oxidation reaction of melatonin on the bromothymol blue modified glassy carbon electrode surface was adsorption-controlled. For adsorption-controlled system, the deposition potential, deposition time, and stirring rate were optimized. Calibration curves were constructed for the quantitative analysis of melatonin using voltammetric methods, and linear working ranges, detection limits, and quantification limits were determined. The precision of the developed methods was evaluated through intra-day and inter-day repeatability experiments over five measurements, with relative standard deviation values below 1.5%. Furthermore, melatonin was successfully determined in pharmaceutical dosage forms, human serum, and synthetic urine samples using the developed electrodes and methods. The results demonstrated that each electrode and method could be applied to both pharmaceutical formulations and biological samples, allowing for the accurate analysis of melatonin without interference from other substances in the samples. The stability of the prepared electrodes was assessed through operational and long-term stability studies. Interference studies were performed to evaluate the selectivity of the developed methods for melatonin, and it was found that common interfering species in biological fluids did not affect melatonin analysis. Finally, to assess the reproducibility of the electrodes, five independently prepared electrodes from different days were used, and this parameter was evaluated based on relative standard deviation.

Keywords: Bromocresol purple, Bromophenol blue, Bromothymol blue, Melatonin, Voltammetry

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Piyasaya sürülen yeni ilaç molekülü ve mevcut ilaç moleküllerinden üretilen eşdeğer ilaç sayısı günden güne artmaktadır. Bu ilaçların etkinliğinin ve güvenliğinin sağlanması amacıyla hem ilaç üretimi hem de yeni ilaç geliştirme süreçlerinde kalite kontrolü ve dolayısıyla da ilaç analizi her geçen gün önemini daha da artırmaktadır. Ayrıca, bir hastalığı tedavi edici veya önleyici özelliklere sahip maddeler olarak tanımlanabilecek ilaçlarda safsızlıkların varlığı; toksisite potansiyelini, yan etkileri veya insan sağlığı üzerindeki diğer olumsuz etkileri artırdığından, bu tür maddelerin varlığını saptayabilmek ve biyolojik etkisini en aza indirmek için hassas bir analize ihtiyaç duyulmaktadır (1).

Analitik kimya, hem ilaç analizi hem de biyolojik örneklerin incelenmesinde önemli bir bilimsel disiplin dalıdır. Temel amacı, farklı numunelerdeki kimyasal maddelerin teşhisi ve tayini için analiz yöntemleri geliştirmek ve kullanmaktır. İlaç endüstrisinde analitik kimya, ilaç aktif maddelerin incelenmesinde, saflıklarının ve stabilitelerinin teşhisinde ve farmasötik ürünlerin üretim ve depolama süreçlerinde kalite standartlarının izlenmesi ve korunmasında önemli bir araç olarak hizmet vermektedir (2). Tıpta analitik kimya, kanda ve diğer biyolojik sıvılardaki farmasötik maddelerin konsantrasyonunun belirlenmesi, hastalıkların teşhisi, tedavilerin etkinliğinin izlenmesi gibi geniş uygulama alanına sahiptir (3).

Analitik kimyanın önemli bir dalı olan elektrokimya, çözeltilerin elektrokimyasal hücrelerde, elektriksel özelliklerinin ölçüldüğü ve sonrasında ölçülen bu özellikler sayesinde kalitatif ve kantitatif analizinin yapılabildiği yöntemler olarak tanımlanabilir. Elektrokimyada akım, zaman ve potansiyel parametrelerindeki değişimler incelenmektedir. Elektrokimyaya olan ilgi her geçen gün artmakla birlikte, geleneksel kromatografik ve spektroskopik analiz yöntemlerine alternatif olarak da tercih edilmektedir.

Voltametri, elektroanalitik kimyanın dört ana metodundan biri olan ve sadece analitik kimyada değil kimyanın diğer alanlarında da kullanılabilen elektrokimyasal bir yöntemdir. Numunelerin kolayca ve hızlı bir şekilde hazırlanabilmesi ve analiz süresinin kısalığı gibi avantajlar nedeniyle, voltametri ilaç analizlerinde sıklıkla tercih edilmektedir.

Melatonin düzeyinin normal değerlerin altında olması, başta insomnia olmak üzere çeşitli uyku bozukluklarına yol açmaktadır. Bu nedenle uyku bozukluğu çeken hastalarda doğal melatonin seviyesinin ölçülmesi ya da melatonin tedavisi altındaki hastaların kandaki

melatonin seviyesinin hızlı, hassas ve etkin bir şekilde analizinin yapılabilmesi büyük önem taşır.

Bu doktora tezi kapsamında, insan vücudunda doğal olarak bulunan bir hormon olan melatoninin analizi için yeni sensörlerin geliştirilmesi ve bu sensörler kullanılarak literatürde bulunan çalışmalara kıyasla daha hassas, hızlı ve düşük maliyetli olarak tayin edilebilmesi için yeni elektrokimyasal yöntemlerin valide edilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen sensörlerle melatoninin farmasötik dozaj formlarından ve biyolojik sıvılardan tayininin yapılması sonucunda bu yöntemlerin doğruluğunun ve güvenilirliğinin ispatlanması da bu çalışma kapsamında planlanmıştır. Sonuç olarak, elde edilen bulgular ile melatoninin analizi için literatüre yeni yöntemler kazandırılacak ve bu yöntemler klinikte hızlı, hassas, güvenilir ve uygun maliyetli olarak kullanılabilir. Ayrıca geliştirilen bu sensörlerin gelecekte farklı ilaç moleküllerinin analizinde kullanımı da umut vericidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uykunun Tanımı ve Evreleri

Uyku, vücut dinlenmesinin ötesine geçen son derece karmaşık temel bir fizyolojik ihtiyaçtır. İnsan ömrünün üçte birini kapsayan bir süreç olan uykunun günümüze kadar birçok tanımı yapılmıştır. Uyku; çevreye karşı algısal kopukluk ve tepkisizlikten oluşan geri dönüşümlü bir davranışsal durum (4), insan sağlığı, performansı ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen fizyolojik bir olay (5), beynin dinlendiği ve kişinin dış uyaranlarla uyandırılabilirdiği bir bilinçsizlik durumu (6), sinir sisteminin bir dizi yaşam fonksiyonunun regülasyonuna izin veren fizyolojik bir süreç (7) ve bireyin çeşitli uyaranlarla uyanabileceği bir bilinçsizlik hali (8) olarak tanımlanabilir. İnsan hayatında en temel fizyolojik gereksinimlerden biri olup yemek, su, solunum ve boşaltım kadar önemlidir.

Uyku REM (Rapid Eye Movements, hızlı göz hareketleri) ve Non-REM (Non-Rapid Eye Movements, hızlı olmayan göz hareketleri) olmak üzere iki evreden oluşmaktadır. REM ve Non-REM uyku, gece boyunca döngüsel bir biçimde dönüşümlü olarak gerçekleşir (9). Hızlı göz hareketleri ile karakterize REM uyku aynı zamanda paradoksal uyku (PS) veya aktif uyku olarak da adlandırılırken, Non-REM uyku olarak tanımlanan evre, sıklıkla yavaş dalga uykusu (SWS) veya sessiz uyku ile eş anlamlı olarak kullanılır (10). Non-REM beynin nispeten hareketsiz olduğu ve iç uyaranlara yanıt verdiği, REM ise yaklaşık %20'sinin aktif olduğu istemsiz bir aktivite durumudur (11). Non-REM uyku N1 en hafif ve N3 en derin olmak üzere üç aşamaya ayrılır (12).

Uyku sağlığı, fiziksel ve zihinsel sağlığın sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Verimsiz uykunun kalitesi ve miktarı; duygusal, akademik, nöropsikolojik ve nörososyal sağlık ve performansla da yakından ilişkilidir (13).

2.2. Uyku Bozuklukları ve Tedavisi

Uykunun miktarı, zamanlaması ve kalitesi ile ilgili problemler genel olarak uyku bozukluğu (dissomni) olarak tanımlanmaktadır. Uyku bozukluğu; uykusuzluk hali, uyku kalitesinin bozulması, devamlı uyku bölünmeleri, gereğinden fazla uyku ihtiyacı, gece-gündüz siklusuna aykırı uyku hali gibi çeşitli durumları ifade eder (14).

Uyku bozukluklarına ilişkin 1979 yılında yapılan ilk sınıflandırma, Amerikan Uyku Tıbbı Akademisi (American Academy of Sleep Medicine, AASM) tarafından 1991 ve 2005 yıllarında revize edilerek; Uyku Bozukluklarının Uluslararası Sınıflandırması-1

(International Classification of Sleep Disorders-1, ICSD-1) ve Uyku Bozukluklarının Uluslararası Sınıflandırması-2 (ICSD-2) olarak yayımlanmıştır (15, 16). 2014 yılında AASM tarafından ICSD-3 olarak güncellenen uyku bozuklukları 7 ana başlık altında toplanarak son halini almıştır (17).

Yetişkinlerin hayatlarının yaklaşık üçte birini uykuda geçiriyor olmasına rağmen uyku, uzun süre hem doktorlar hem de bilim insanları tarafından göz ardı edildi. 1980’li yıllardan itibaren uyku bozuklukları sistematik olarak incelenmeye, anlaşılmaya ve daha yaygın teşhis edilmeye başlandı ve uyku tıbbi bir uzmanlık alanı haline geldi. Son zamanlarda, bilim insanları tarafından uykunun fonksiyonlarını anlama çabası ile yeterli uyku kalitesi ve süresinin hem fiziksel hem de zihinsel sağlık ve yaşam kalitesi açısından ne kadar önemli olduğu anlaşılmaya başlandı.

Bireysel uyku ihtiyaçları farklılık gösterse de Amerikan Uyku Tıbbi Akademisi ve Uyku Araştırmaları Derneği (American Academy of Sleep Medicine and Sleep Research Society, SRS) ortalama bir yetişkinin düzenli olarak gecede 7 saat veya daha fazla uyuması gerektiğini belirtmekte (18) ve Ulusal Uyku Vakfı (National Sleep Foundation, NSF) da yetişkinler için 7 ila 9 saat ve yaşlı yetişkinler için 7 ila 8 saat uyku tavsiye ederek benzer bir fikir öne sürmektedir (19). Pediatrik popülasyonlar için uyku süresi önerileri yaş aralığına göre değişiklik göstermektedir (19, 20).

Yetersiz veya düzensiz uyku ve uyku-uyanıklık bozuklukları bireyin yaşamını iş hayatında başarısızlık ya da psikososyal refahın azalması gibi olaylar ile doğrudan etkilerken aynı zamanda demans, felç, kardiyovasküler hastalık, diyabet, obezite, kanser, depresyon ve ölüm riskini de artırarak farklı olumsuz sonuçlara da neden olmaktadır (21–24).

Uyku bozuklukları sağlık, refah, güvenlik ve üretkenlik üzerindeki doğrudan ya da dolaylı yoldan etkileri nedeniyle devletler için ekonomik bir yük oluşturmaktadır. Bu nedenle, uyku bozuklukları yalnızca küresel sağlığı değil, aynı zamanda dünya çapında her ülkenin ulusal sağlık bütçesini de tehdit etmektedir. Buna ek olarak, uyku bozukluklarının halk sağlığı politikalarının planlanması ve uygulanması için gerekli olan klinik uygulamalar üzerinde de önemli etkileri vardır.

Oldukça yaygın bir hastalık olan uyku bozukluklarından muzdarip nüfusun en az %10’u hem klinik açıdan hem de halk sağlığı açısından büyük bir risk oluşturmaktadır. İnsomnia en sık görülen uyku bozukluğudur, bunu uyku apnesi ve ardından huzursuz bacak sendromu takip etmektedir (25). Genel nüfusun yaklaşık üçte biri uykusuzluktan şikâyetçidir

ancak nüfusun yalnızca %6 ila %15'ine tanı konulabilmektedir (26). Ne yazık ki, yüksek prevalansa rağmen hala yeterince tanımlanamayan uyku bozukluklarından yakınan hastaların çok az bir kısmı doğru teşhis konularak tedavi edilebilmektedir.

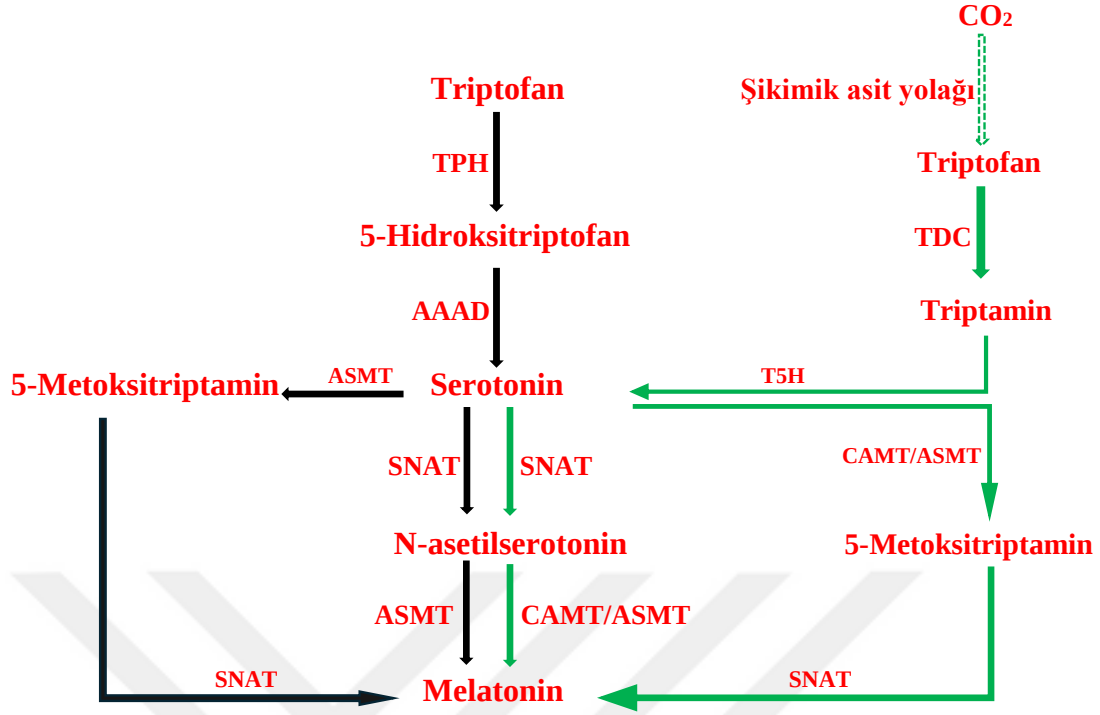
Uyku bozukluklarının tedavisinde genel olarak farmakolojik ve nonfarmakolojik olmak üzere iki ana yaklaşım mevcuttur. Farmakolojik tedavi bakımından gerçekleştirilen çalışmalarda benzodiazepin reseptör agonistleri (27), non-benzodiazepin reseptör agonistleri (28), antidepresanlar (29), barbitüratlar (30) ve antihistaminikler (31) gibi çeşitli ilaçların uyku bozukluğu tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak uyku problemlerinde gözlenen semptomlardaki iyileşmeye karşın bazı vakalarda bu ilaçların kullanımının, psikomotor ve bilişsel bozukluklar, uyuşukluk, zayıf muhakeme ve kimi zaman da ilaç bağımlılığı ve toleransı gibi istenmeyen yan etkilerle bağıntılı olduğu bulunmuştur (32–34). Bu sebeple uyku bozukluğu tedavisinde kullanılacak daha güvenli ve doğal alternatif bir tedaviye gereksinim duyulmaktadır. Bazı çalışmalarda insan vücudunda doğal olarak sentezlenen ve uykunun düzenleyicisi olan melatoninin uyku bozuklukları tedavisindeki etkinliği ve güvenliği gösterilmiştir (35–37).

2.3. Melatonin

İlk olarak 1950'lerin sonlarında tanımlanan melatonin, melanositlerde melanin granüllerinin birikmesine neden olan etkisinden dolayı bu adı almıştır ve ilk kez 1958 yılında Lerner tarafından sığır epifiz bezinden izole edilmiştir (38). Bir zamanlar omurgalılarda epifiz bezinden salgılanan bir hormon olarak keşfedilen melatoninin artık bakterilerde ve farklı filogenetik konumdaki çeşitli algler ve bitkiler de dahil olmak üzere çok sayıda ökaryot taksonunda da oluştuğu bilinmektedir (39–42). Başlangıçta bir hormon olarak tanımlanmış olmasına rağmen artık hormonal olmayan ek etkileri de olduğu düşünülmektedir (43).

Melatonin, beyindeki epifiz bezinden sentezlenen ve organizmadaki sirkadiyen ritmi düzenleyen bir hormondur. Melatonin, esas olarak epifiz bezi tarafından üretilmekle birlikte, aynı zamanda gastrointestinal sistem (44), retina (45), trombositler (46) ve cilt (47) tarafından da çok daha küçük miktarlarda üretilen, doğal olarak oluşan bir maddedir.

Melatonin sentezi ile ilgili çalışmaların çoğunluğu omurgalılarda, özellikle de memelilerde (hamster, sıçan, fare) gerçekleştirilmiştir. Bu hayvanlarda melatonin sentezinin ilk öncüsü, esansiyel amino asit olan triptofandır. Hayvanlarda ve bitkilerde melatonin sentezinin yolları Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Hayvanlarda ve bitkilerde melatoninin biyosentetik yollarının karşılaştırılması. TPH: triptofan hidroksilaz; AAAD: aromatik amino asit dekarboksilaz; SNAT: serotonin *N*-asetiltransferaz; ASMT: *N*-asetilserotonin *O*-metiltransferaz, TDC: triptofandekarboksilaz; T5H: triptamin 5-hidroksilaz, CAMT: kafeik asit *O*-metiltransferaz. Siyah yalnızca hayvanlarda bulunur, yeşil yalnızca bitkilerde bulunur ve kırmızı hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunur (Tan'dan, 48)

Oral melatoninin biyoyararlanımı %10 ile %56 arasında değişmekte olup, ortalama %33'tür. Melatoninin düşük biyoyararlanıma sahip olmasının nedeni, sistemik dolaşıma girmeden önce önemli ölçüde hepatik ilk geçiş etkisine uğramasıdır (49). Melatonin oldukça lipofilik bir molekül olmasının yanı sıra hidrofilik özelliklere de sahiptir; salgı organında depolanmak yerine, biyosentez sonrasında kılcıl damarlara salınır ve burada %70'e kadar albümine bağlanır (50). İntravenöz infüzyondan sonra kandaki yarı ömrü yaklaşık 30 dakika iken (51), oral uygulamayı takiben yarı ömrü yaklaşık 3 ila 45 dakika olan iki fazlı bir eliminasyon modeli sergilemektedir (52, 53). Melatonin öncelikli olarak karaciğerde CYP1A2 ve diğer bazı ilgili sitokromlar tarafından 6-hidroksimelatonine metabolize olurken, bir kısmı da böbrekte metabolize edilir. Daha sonra 6-hidroksimelatonin sülfürik asit (%90) veya glukuronik asit (%10) ile konjugasyona uğrar ve idrar ile atılır. Serum melatonininin yaklaşık %5'i metabolize edilmeden idrarla atılır (54). Ayrıca, karaciğer ve böbrek rahatsızlıklarının (örneğin, siroz ve kronik böbrek yetmezliği gibi) plazma melatonin konsantrasyonunu önemli ölçüde değiştirdiği de bilinmektedir (55, 56).

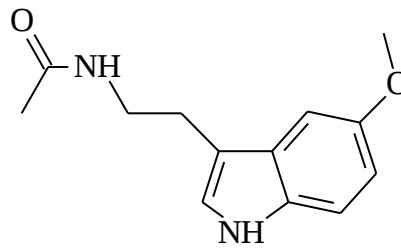
Melatonin için tavsiye edilen günlük doz miktarı 0.1 mg'dan 20 mg'a kadar geniş bir aralıkta değişmektedir. Tipik olarak kullanılan doz miktarı 1-5 mg aralığında olmasına rağmen, çeşitli melatonin kullanımları için kesin optimal doz bilinmemektedir (57). Piyasada ise 1 ve 3 mg olan müstahzarları bulunmaktadır.

Melatoninin birincil potansiyel yan etkisi uyuşukluktur (58). Bununla birlikte; baş dönmesi, mide bulantısı ve baş ağrısı gibi hafif yan etkiler rapor edilmiştir. Hiçbir çalışma melatoninin herhangi bir ciddi olumsuz etkiye neden olabileceğini göstermemiştir (35).

Melatoninin, antioksidan aktivite gösterme (59), immün yanıtı modüle etme (60) ve kanseri önleme (61) gibi çeşitli temel etkileri vardır. Melatonin sadece uykuyu iyileştirmekle kalmamakta, aynı zamanda uyku kalitesini de etkilemektedir (62). İlerleyen yaşlarda melatonin seviyesinin normal değerlerin altına düşmesi çeşitli uyku bozukluklarına neden olur. Bu hastalarda melatonin tedavisi uyku kalitesini iyileştirebilir ve uyku/uyanıklık ritmini düzenleyebilir. Uyku bozukluğu olan hastalarda melatonin düzeylerinin ölçülmesi gerekebildiği için melatoninin analizi oldukça önemlidir.

2.3.1. Melatoninin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) (Şekil 2) sudaki çözünürlüğü 3.17 g/L olan kirli beyaz toz yapıda bir maddedir (63, 64). Kapalı formülü $C_{13}H_{16}N_2O_2$, molekül ağırlığı 232.28 g/mol ve yoğunluğu 1.175 g/cm³'tür. Erime noktası 116.5 ile 118 °C arasında değişirken; kaynama noktası 512.8 °C'dir (64). pK_a değeri 12.3 olarak bildirilmiştir (65).



Şekil 2. Melatoninin kimyasal yapısı

2.4. Elektrokimya

Elektrokimya, elektrik ve kimya çalışmalarını bir araya getiren önemli bir multidisipliner araştırma alanını temsil etmektedir. Diğer bir tanımla, elektrikli cihazlar aracılığıyla kontrol edilebilen elektriksel yük değişimleri ile maddenin atomik

çizelgesindeki dönüşümleri analiz eden ve açıklayan bir bilimdir. Bu tür dönüşümlere *indirgeme-yükseltgenme reaksiyonları* adı verilir. Bu nedenle indirgeme-yükseltgenme reaksiyonlarının bir elektrik akımı veya bir voltajla kontrol edilmesi esastır (66, 67).

Elektrokimya, genellikle çözelti gibi sıvı ortamlarda yük taşınmasıyla ilişkili kimyasal olaylarla ilgilenmektedir. Yükün taşınması genellikle çözeltideki farklı kimyasal türler arasında homojen olarak veya çözelti ile elektrot ara yüzeyi arasında heterojen olarak meydana gelmektedir (68).

Elektrokimyasal bir hücre; analit çözeltisi veya eriyik bir tuz ve buna daldırılmış elektrotlar ile bu elektrotların birbirine bağlanmış olduğu bir dış devreden oluşmaktadır. Redoks reaksiyonlarının meydana geldiği bu düzeneklerde anot kısmında yükseltgenme gerçekleşirken, katot kısmında da indirgenme gerçekleşmektedir.

Elektrokimyasal hücreler, kimyasal reaksiyonlardan elektrik enerjisinin elde edildiği, *voltaik hücreler* olarak da bilinen *galvanik hücreler* ve elektrik enerjisinin kimyasal reaksiyonlar oluşturmak için kullanılabildiği *elektrolitik hücreler* olarak ikiye ayrılır. Galvanik hücreler ile elektrolitik hücreler birbirine tam zıt bir sistemle çalışmaktadır.

Elektrokimyasal reaksiyonlar iki ya da üç elektrotun bulunduğu hücrelerde gerçekleştirilebilir. İki elektrotlu hücreler *çalışma (indikatör) elektrotu* ve sabit potansiyeldeki bir *referans elektrottan* oluşurken; üç elektrotlu hücrelerde çalışma ve referans elektrotun yanında *yardımcı (karşıt) elektrot* da bulunur. İki elektrotlu hücrelerde elektrot potansiyeli ve indirgenme-yükseltgenme potansiyeli belirlenemezken, üç elektrotlu hücrelerde çalışma elektrotunun potansiyeli referans elektrotta göre tayin edildiği için bu hücre sisteminde elektrot potansiyeli bilinen bir değere sahiptir (69, 70).

2.5. Kütle Aktarımı

Elektrokimyasal hücre içerisindeki iyonik bir çözelti ile elektrot arasında bulunan ara yüzeyde gerçekleşen redoks reaksiyonları kütle aktarım mekanizması ile oluşmaktadır. Kütle aktarımı; difüzyon, konveksiyon ve göç olmak üzere üç farklı mekanizma ile sağlanır (71, 72).

Difüzyon; çözeltinin farklı noktalarında oluşan konsantrasyon farkından dolayı kendiliğinden gerçekleşen kütle aktarım mekanizmasıdır. Bu mekanizma ile kütlenin aktarımı, derişimin yüksek olduğu bölgeden daha seyreltik olduğu bölgeye doğru derişim

farkı eşitleninceye kadar kendiliğinden devam eder. Difüzyon hızı ile derişim farkı arasında doğru orantı söz konusudur (72).

Konveksiyon; çözeltinin karıştırılması, sarsılması veya elektrotun döndürülmesi gibi mekanik taşınma ya da sıcaklık veya yoğunluk farkından kaynaklı oluşan doğal taşınma yoluyla gerçekleşen çözelti içerisindeki türün yoğun olduğu bölgeden elektrot yüzeyine taşınmasıdır (72).

Göç; anot ve katot arasındaki potansiyel farkın etkisiyle elektrostatik alanın meydana gelmesi ve böylece çözeltide bulunan yüklü iyonların hareketinin gerçekleşmesi olayıdır. Bu elektriksel alanda anyonlar anoda taşınırken katyonlar ise katoda taşınır (72).

2.6. Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik kimya, elektrokimyasal hücrelerde çözeltilerin elektriksel özelliklerinin saptanması ve devamında bu özellikler üzerinden kalitatif ve kantitatif analizinin gerçekleştirildiği yöntemler bütünüdür (73). Elektroanalitik yöntemler; akım, zaman ve potansiyel gibi parametrelerin, analiz edilecek tür ve bu türün derişimine karşı değişimlerini değerlendirmektedir.

Elektroanalitik yöntemlerin, düşük tayin sınırlarına ulaşabilme, özel yükseltgenme basamağında bulunan elementlerin her biri için sonuçlarının ayırt edici olması, diğer analiz cihazlarına göre nispeten ekonomik olması ve kimyasal türlerin derişiminden ziyade aktiviteleri hakkında bilgi sağlaması gibi üstünlükleri vardır. Bununla birlikte, ara yüzeyde gerçekleşen yük aktarımı stokiyometrisi, kütle transfer hızı, kimyasal tepkimelerin hızı ve denge sabitleri ve adsorpsiyon ve kemisorpsiyon derecesi gibi konularda da bilgi sunar.

Elektroanalitik yöntemler; ara yüzeyde gerçekleşen (potansiyometri ve voltametri) ya da tüm analiz ortamında gerçekleşen yöntemler olarak iki gruba ayrılır. Kimyasal ve/veya fiziksel dönüşümler, ara yüzey yöntemlerinde elektrot yüzeyi ile bu yüzeye bitişik çok ince çözelti tabakası arasında gerçekleşirken; tüm analiz ortamında gerçekleşen yöntemlerde ise çözeltinin tamamında meydana gelmektedir (74, 75).

Elektroanalitik kimyada kullanılan başlıca yöntemler; potansiyometri, kulometri, kondüktometri ve voltametri olarak tasnif edilebilir. Potansiyometri; uygun bir çalışma elektrotunun potansiyelinin, sabit potansiyele sahip bir elektrota yani bir referans elektrotuna karşı ölçüldüğü ve elde edilen bu ölçümler üzerinden çözelti içerisindeki madde derişiminin tayin edilebildiği bir yöntemdir (76). Kulometri; bir reaksiyonda kullanılan elektronların

sayılarak analit derişiminin bulunmasını sağlayan analiz yöntemidir (77). Kondüktometri; elektrolitlerde iletkenlik ölçümünden faydalanılarak analit miktarının belirlendiği yöntemdir (73). Voltametri ise bu tez kapsamında melatoninin analizinde kullanıldığı için aşağıda daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.7. Voltametri

Çek kimya dergisi Chemické Listy, Jaroslav Heyrovský tarafından polarografinin ilk kez tanımladığı bir makaleyi 1922’de (78) yayımladı. Jaroslav Heyrovský 1959 yılında “polarografik analiz yöntemlerini keşfetmesi” nedeniyle Nobel Ödülü’ne layık görüldü. Daha sonraki yıllarda polarografik yöntemlerden yola çıkılarak voltametrik yöntemler geliştirildi. Bu iki yöntem arasındaki fark ise polarografide çalışma elektrotu olarak damlayan cıva elektrotun kullanılmasıdır (79).

Voltametri; bir elektrokimyasal sistemdeki çalışma elektrotuna bir potansiyel uygulanması ve buna karşılık gelen akımın ölçülmesine dayanan analitik bir yöntemdir. Tüm voltametrik tekniklerin ortak özelliği, bir elektrotta bir potansiyelin uygulanması ve sonuçta elektrokimyasal hücreden geçen akımın izlenmesidir. Çoğu durumda belirli bir süre boyunca uygulanan potansiyel değiştirilir veya akım izlenir. Dolayısıyla tüm voltametrik teknikler potansiyel, akım ve zamanın bir fonksiyonu olarak tanımlanabilir. Akımın potansiyele karşı kaydedilmesine *voltamogram* adı verilir (80).

Organik yapılı maddelerden inorganik yapılı maddelere kadar birçok tür için çok geniş bir doğrusal konsantrasyon aralığında (10^{-12} ila 10^{-1} M) yüksek hassasiyetle çalışılabilmesi, çok çeşitli çözücü ve elektrolit kullanımına imkan vermeleri, geniş bir sıcaklık aralığında çalışılabilmesi, saniyeler içerisinde sonuç almayı sağlayacak kadar hızlı analiz süreleri sunmaları, kinetik ve mekanik parametrelerin belirlenebilmesi ve birden fazla analitin eř zamanlı olarak analizinin yapılabilmesi voltametrik yöntemlerin öne çıkan avantajları arasında yer alır (80).

2.8. Voltametrik Hücre

Voltametrik hücre, analitin belirli bir çözücü içinde çözündüğü ve bu çözünmüş numunenin iyonik bir elektrolite yerleştirildiği bir sistemdir. Bu hücreler ihtiyaca göre farklı tasarımlara sahip olabilen, numune ile reaksiyon vermeyen, cam, polietilen ve teflon gibi farklı malzemelerden üretilebilmektedir.

Voltametrik bir hücre, çalışma elektrotu, referans elektrot, yardımcı (karşıt) elektrot ve elektrolitik çözeltiden oluşur.

2.8.1. Referans Elektrot

Çoğu elektrokimyasal ölçümde, elektrokimyasal hücredeki elektrotlardan birinin sabit potansiyelde tutulması gerekir. Referans elektrot olarak adlandırılan bu elektrot, çalışma elektrotunun potansiyelinin kontrol edilmesine olanak sağlar. Referans elektrotun karşılaması gereken bazı kriterler vardır: Kimyasal ve elektrokimyasal olarak tersinir olmalıdır (yani potansiyeli Nernst denklemi ile yönetilir ve zamanla değişim göstermez), elektrottan küçük bir akım geçip orijinal değerine geri döndüğünde (yani polarize olmayan bir elektrot) potansiyel neredeyse sabit kalmalıdır ve potansiyelin termal katsayısı küçük olmalıdır. Doymuş kalomel ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$), gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl) veya cıva-cıva sülfat ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4$) elektrotları en sık kullanılan referans elektrotlardır (81, 82).

2.8.2. Yardımcı (Karşıt) Elektrot

İki elektrotlu sistemlerde akım geçişi sırasında çalışma elektrotunun polarize olmasının önüne geçmek için üçüncü bir elektrota ihtiyaç duyulmuş ve böylece üç elektrotlu sistemler geliştirilerek hücreye yardımcı (karşıt) elektrot eklenmiştir. Yardımcı elektrot, elektrokimyasal hücrede akım taşır ve referans elektrot gibi tepkimeye herhangi bir etkisi olmaz. En yaygın kullanılan yardımcı elektrotlar platin tel ve grafit çubuk gibi inert iletken malzemelerdir. Ayrıca elektrokimyasal hücrenin metalik olduğu durumlarda hücre yardımcı elektrot gibi davranabilir (81, 83).

2.8.3. Çalışma Elektrotu

Çalışma elektrotu; üzerinde elektrokimyasal olayın (redoks reaksiyonları) gerçekleştiği, referans elektrota karşı potansiyelinin doğrusal bir şekilde değiştiği elektrottur. Çalışma elektrotu çalışılan potansiyel aralıkta inert malzemeden oluşur ve bu onun en önemli özelliğidir (83). Çalışma elektrotunun polarize olabilmesi için yüzey alanının küçük tutulması gerekir.

Çalışma elektrotları; cıva kökenli elektrotlar (durgun cıva damla, damlayan cıva, asılı cıva damla ve cıva film), dönen elektrotlar (dönen disk ve halka disk), katı elektrotlar ve modifiye elektrotlar olarak dört grupta sınıflandırılabilir. Klasik polarografi işleminde çalışma elektrotu olarak ilk kez cıva kullanılmıştır. Cıva, indirgeme için yüksek aşırı potansiyel sunma, çoğu metalle bir amalgam oluşturma ve yeni bir damla oluşturarak

elektrot yüzeyini kolayca yenileme yeteneği dâhil olmak üzere çalışma elektrotu olarak bir dizi avantaja sahiptir. Cıvanın çalışma elektrotu olarak geniş kullanımını kısıtlayan sınırlamalar ise oksitlenme kolaylığı ve toksik olmasıdır (84).

Bir motor sistemi aracılığıyla dönme hızlarının ölçülebildiği dönen elektrotlar camsı karbon veya platinden oluşabilirler. Dönen disk elektrotlar, yalıtım malzemesinden yapılmış bir çubuğun içine yerleştirilmiş elektrot malzemesinin bulunduğu bir diskten oluşur. Halka disk elektrot ise genel olarak üç elemandan oluşur: r_1 yarıçaplı merkezi bir disk elektrotu, iç yarıçapı r_2 ve dış yarıçapı r_3 olan bir halka elektrot ve disk ile halka elektrotları ayıran kalınlıkta $(r_2 - r_1)$ ince bir yalıtım boşluğu. Her iki elektrotun ve ara parça yüzeyinin çalışma yüzeyleri aynı düzlemde bulunur ve böylece düzlemsel bir yüzey oluşturur. Bu elektrotların yüzeyine madde taşınması konvektif difüzyonla olur (85–88). Katı elektrot ve modifiye elektrot bu tez kapsamında melatoninin analizinde kullanıldığı için aşağıda daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.8.3.1. Katı Elektrotlar

Elektroanalitik kimyadaki gelişmeler, katı elektrotların en hızlı büyüyen elektrot sınıfını temsil ettiğini, oldukça yaygın olarak kullanıldığını ve pratik elektrot malzemeleri olduğunu göstermektedir. Karbon, altın, platin ve rutenyum, katı çalışma elektrotlarında yaygın olarak kullanılan malzemelerden bazılarıdır. Bazı özel deneyler için gümüş, nikel, bizmut ve bakır da kullanılabilir. Platin dayanıklıdır ve susuz organik çözücülerde kolayca işlenebilir ve geniş bir potansiyel aralığına sahiptir. Altının daha az kullanışlı olmasının nedeni, yüzeyinin uygun miktarda pozitif potansiyelde bile oksidasyona uğramasıdır. Katı elektrotlar tüp, halka, düzlemsel, makro ve mikro boyutlu gibi çeşitli topolojik formlarda ve boyutlarda hazırlanabilir. Ayrıca, katı elektrotlar, cıva elektrotlarla mümkün olmayan analitik ve mekanik uygulamalara da olanak sağlarlar (85, 88, 89).

Elektrokimyasal olay çalışma elektrotu yüzeyinde meydana geldiğinden, elektrot yüzeyinin son derece temiz olması ve yüzey alanının iyi tanımlanmış olması zorunludur. Elektrotları temizleme prosedürü, elektrot tipine göre farklılık gösterirken, laboratuvarı laboratuvara bile değişebilir. Polarografide kullanılan cıva elektrotlardan farklı olarak katı elektrotların yüzeyindeki safsızlık veya kirlilikleri uzaklaştırmak için elektrotun “ön işlemlere tabi tutulması” gerekir (90, 91).

Çalışma elektrotları olarak; yaygın bir şekilde, geniş bir potansiyel aralığı ve yüksek iletkenliğe sahip, ekonomik ve yapısal olarak stabil olan çeşitli karbon formları kullanılır.

Karbon elektrotlar homojen (camsı karbon, grafit, ekran baskılı, fullerener, karbon nanotüpler ve elmas) veya heterojen (karbon pasta ve modifiye karbon pasta) olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca çeşitli maddelerle modifiye edilmeye uygundurlar (85, 89).

2.8.3.2. Camsı Karbon Elektrot

Camsı karbon, adından da anlaşılacağı gibi camın bazı özelliklerini bazı normal endüstriyel karbonlarla birleştiren cam benzeri bir karbon şeklidir. Camsı karbon elektrot (GCE), mükemmel elektriksel ve mekanik özellikleri, geniş potansiyel aralığı, kimyasal inertliği ve tekrarlanabilir performansı nedeniyle çok popülerdir. Önceden modellenmiş bir polimerik reçine gövdesinin inert bir atmosferde dikkatle kontrol edilen bir ısıtma programı aracılığıyla hazırlanan camsı karbon, düşük yoğunluğa, düşük termal genleşmeye, yüksek korozyon direncine ve yüksek termal ve elektrik iletkenliğine sahiptir.

Camsı karbon, birçok grafitleşmeyen karbonun aksine gazlara karşı geçirimsizdir. Ayrıca aside karşı oldukça dayanıklıdır. Normal grafit, oda sıcaklığında konsantre asitlerle toz haline getirilirken, camsı karbon bu işlemde etkilenmez. Camsı karbonun yapısı, karmaşık bir topolojide rastgele düzenlenmiş grafit düzlemlerden oluşur. Neredeyse tüm GCE'ler, pürüzsüz bir parlatma bezi üzerinde daha küçük alüminyum tozu (0.05 µm) ile art arda parlatılır. Parlatma işlemi sırasında ultra saf su kullanılmalıdır. Bu ön işlemler genellikle GCE'nin aktif ve tekrarlanabilir yüzeyini oluşturmak ve analitik performansını artırmak için gerçekleştirilir. Sulu alüminyum karışımı ile parlatılan elektrot, kullanımdan önce ultra saf su ile durulanmalıdır. Çoğu zaman performansı artırmak için elektrokimyasal, kimyasal, vakumlu ısı veya lazer işlemi vb. gibi bazı ek aktivasyon adımları da kullanılır. GCE, kolay yüzey modifikasyonu nedeniyle elektroanalizde yaygın olarak kullanılan inert bir elektrot malzemesi haline gelmiştir (75, 89, 92–94).

2.8.3.3. Modifiye Elektrotlar

Modifiye elektrotlar, elektrot sistemlerine modern bir yaklaşım getirmektedir. Elektrot yüzeylerinin bu şekilde istemli olarak değiştirilmesi birçok elektroanalitik probleme bir çözüm yolu sunmakta ve yeni analitik uygulamaların temelini oluşturmaktadır. Geleneksel katı elektrotlarla karşılaştırıldığında, modifiye edici materyalin fizikokimyasal özellikleri elektrot yüzeyine aktarıldığı için yüzey modifikasyonu ile elektrot özellikleri üzerinde daha fazla kontrol sağlanabilmektedir. Modifikasyonla elektrotlara farklı bir çalışma aralığı kazandırılırken, aynı zamanda karmaşık bir ortamda çok küçük miktardaki analitin çok düşük teşhis değerleriyle tayin edilebilmesi de sağlanmaktadır. Ayrıca modifiye

edici olarak kullanılan elektrokimyasal reaktif malzemeler elektrokatalizi hızlandırır ve modifiye edici molekül, içinde bulunduğu çözelti ile elektrot arasında hızlı bir elektron transfer aracı olarak görev yapar. Bu nedenle modifiye edici maddelerin iletkenliklerinin de çok iyi olması gerekmektedir (95).

Bu alana duyulan ilgi, barındırdığı birçok potansiyel uygulamasından kaynaklı olarak her geçen gün artmaktadır. Örnekler arasında, yüksek kimyasal seçicilik ve aktiviteye sahip elektrokatalitik sistemlerin geliştirilmesi, ışığa duyarlı ve antikorozyon özelliklere sahip yarı iletken elektrotların kaplanması, elektrokromik cihazlar ve moleküler elektronik ve elektrokimyasal sensörler alanına yönelik mikroeletrokimyasal cihazlar yer alır. Analitik uygulamaların ana faydaları arasında elektron transfer reaksiyonlarının hızlandırılması, planlı birikim veya seçici membran geçirgenliği ve girişimin engellenmesi yer alır (96).

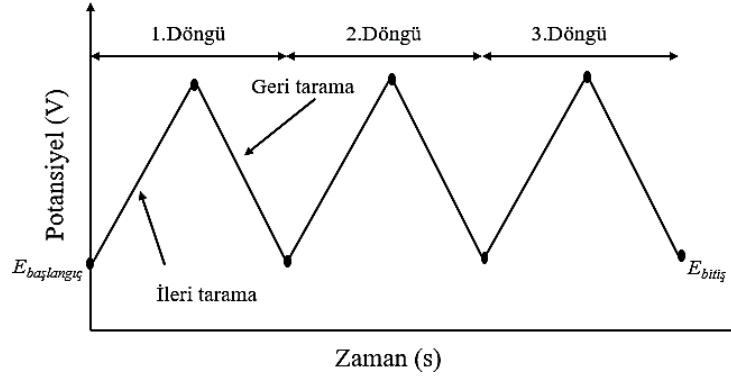
Katı elektrotların yüzeyine modifiye edici ajanların modifikasyonu elektropolimerizasyon, kemisorpsiyon, kovalent (kimyasal) bağlanma, sol-jel kapsülleme, fiziksel adsorpsiyon ve Langmuir-Blodgett yöntemi (yüksek düzeyde düzenli tek katmanlı filmler oluşturma) ile gerçekleştirilebilir (89, 96, 97).

Modifikasyon işlemi, elektrotların duyarlılığını, seçiciliğini, kararlılığını ve yanıtını artırmak amacıyla iletken polimerler, nanomalzemeler ve biyolojik ajanlar gibi çeşitli malzemeler kullanılarak gerçekleştirilebilir.

2.9. Voltametrik Yöntemler

2.9.1. Döngülü Voltametri

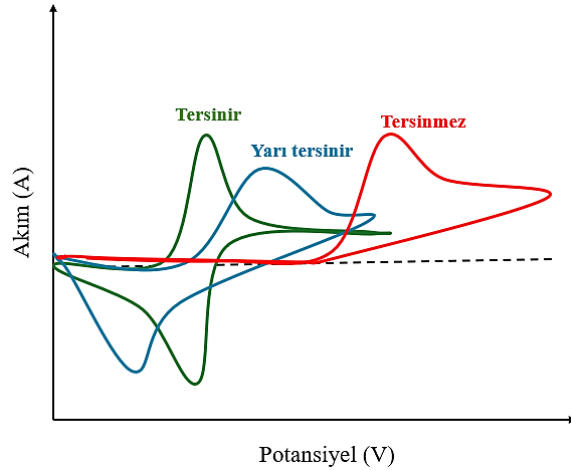
Döngülü voltametri (CV), redoks çiftlerinin yükseltgenme ve indirgeme süreçlerini araştırmak için yaygın şekilde kullanılan oldukça popüler bir voltametrik tekniktir. CV ayrıca katalizi de içeren elektron transferi ile başlatılan kimyasal reaksiyonları araştırmak için de kullanışlıdır. CV uygulanması ile çözeltideki bir redoks çifti önce oksidasyona sonra da redüksiyona (veya tam tersi) uğrar. Bu yöntemde potansiyel ilk olarak istenilen bir değere çıkarılır devamında ise başlangıç potansiyeline veya istenilen başka bir potansiyele getirilir (Şekil 3). Eğer ki başlangıç potansiyelinden istenilen potansiyele ulaşıldıktan sonra tersi yönde bir tarama gerçekleştirilmez ise bu yöntem doğrusal taramalı voltametri (LSV) adını alır. CV’de potansiyel zamanın bir fonksiyonu olarak tanımlanır. Analize bağlı olarak bir tam döngü, bir kısmi döngü veya bir dizi döngü gerçekleştirilebilir (79, 98). Genellikle bu yöntem, hassasiyetinin zayıf olması nedeniyle kantitatif analiz için kullanılmaz.



Şekil 3. CV yöntemi için üçgen potansiyel dalga biçimine sahip uyarma sinyali

Elektron transfer hızı, difüzyon katsayısı, redoks potansiyeli ve adsorpsiyon miktarı (adsorpsiyon sistemindeki) gibi bilgiler CV yöntemi ile elde edilebilir. CV'deki elektrokimyasal tersinirlik; tersinir, yarı-tersinir ve tersinmez olarak sınıflandırılır (Şekil 4). CV, aşağıda belirtildiği gibi, elektron transfer hızı ile difüzyonun kütle transfer hızı arasındaki korelasyonun büyüklüğüne güçlü bir şekilde bağlıdır (98):

- Tersinir sistem: elektron transfer hızı $\gg$ difüzyonun kütle transfer hızı
- Yarı-tersinir sistem: tersinirden tersinmeze değişim
- Tersinmez sistem: elektron transfer hızı $\ll$ difüzyonun kütle transfer hızı



Şekil 4. Tersinir, yarı tersinir ve tersinmez bir elektrot reaksiyonuna ait döngülü voltamogramlar

Döngülü bir voltamogramdaki önemli parametreler sırasıyla katodik ve anodik pik potansiyelleri (E_{pc} ve E_{pa}) ve pik akımlarıdır (i_{pc} ve i_{pa}). Eğer elektron transfer süreci diğer

süreçlerle (difüzyon gibi) karşılaştırıldığında hızlı ise reaksiyonun elektrokimyasal olarak tersinir olduğu söylenir ve pik ayrımı şu şekilde olur (Eşitlik 1):

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = \frac{2.303 RT}{nF} \quad (1)$$

Bu nedenle, 25 °C’de n elektronlu tersinir bir redoks reaksiyonu için ΔE_p , $0.0592/n$ V veya bir elektron için yaklaşık ~59 mV olmalıdır. Uygulamada hücre direnci gibi faktörler sebebiyle bu değere ulaşmak zordur. Yavaş elektron transfer hızına bağlı tersinmezlik, $\Delta E_p > 0.0592/n$ V ile sonuçlanır, örneğin tek elektronlu bir reaksiyon için 70 mV’den daha yüksektir. Tersinir bir çift için indirgeme potansiyeli (E^0) Eşitlik 2’deki gibidir:

$$E^0 = \frac{E_{pa} - E_{pc}}{2} \quad (2)$$

Tersinir bir reaksiyon için konsantrasyon, Randles-Sevcik ifadesiyle (25 °C’de) pik akımıyla Eşitlik 3’teki şekilde ilişkilidir:

$$i_p = 2.686 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2} \quad (3)$$

Burada, i_p amper cinsinden pik akımı, A elektrot alanı (cm^2), D difüzyon katsayısı ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C konsantrasyon (mol cm^{-3}) ve ν tarama hızı (V s^{-1})’dır (80).

2.9.2. Puls Voltametrisi

1960’ların ortasından bu yana, elektrot mekanizmalarının anlaşılabilmesi için CV’ye benzer özelliklerde ancak CV’den çok daha hızlı ve iyi hassasiyete sahip yeni voltametrik tekniklerin tasarlanması için çalışmalar sürdürülmüştür (80, 99).

Puls voltametrisi ilk olarak damlayan cıva elektrot için tanıtıldı ve bu nedenle başlangıçta puls polarografisi olarak adlandırıldı. O zamanlar damlayan cıva elektrotun her damlasına bir puls uygulamak mantıklı ve çok avantajlı görünmekteydi. Çünkü böyle bir elektrot sürekli olarak yenilenen bir cıva yüzeyi sunmaktaydı (çünkü damlalar birbiri ardına oluşup büyür); ancak aynı zamanda bu elektrot büyük kapasitif akımlar ve elektrot yüzeyinde kontrol edilmesi zor bir konveksiyon oluşturarak ölçümleri karmaşık hale getirmekteydi. Artık yirmi birinci yüzyılda araştırmacılar damlayan cıva elektrotunu nadiren kullanmaktadır.

Voltametrde akım ölçümleri elektrokimyasal reaksiyon mekanizmaları hakkında bilgi verir ve aynı zamanda analit konsantrasyonunun çok hassas bir şekilde tayin edilmesini

sağlar. Burada elde edilen bilginin kalitesini iki faktör sınırlar: Birincisi, ölçümün hassasiyetidir, yani oluşan akımın (i) kalibrasyon eğrisinin analitin konsantrasyonuna (C) karşı eğimidir (m). Hassasiyet ne kadar yüksek olursa, gerekli hassasiyetle ölçülebilen bir akımın elde edilmesi için gereken konsantrasyon da o kadar küçük olur. Diğer bir faktör ise reaksiyonla ilgisi olmayan arka plan akımlarıdır. Voltametrde, elektrotun bir kapasitör olması nedeniyle akan akımdır. Bu akım, akım ile konsantrasyon arasındaki doğrudan ilişkiye müdahale eder ve denklemimiz $i = mC$ yerine $i = mC + b$ olur. Buradaki b arka plan akımıdır. Her ne kadar bazı durumlarda b tahmin edilebilse ve ölçülen akımdan (i) çıkarılabilse de, orantılı bir miktar elde etmek için i , mC ile orantılı bir miktar elde etmek için b 'nin değerinin veya daha doğrusu b/i oranının daha küçük yapılması her zaman arzu edilir. b ne kadar küçük olursa, C ile ilişkilendirilebilecek i değeri de o kadar düşük olur. Puls voltametrisinin amacı, m 'nin büyük değerlerini ve b 'nin küçük değerlerini vermektir.

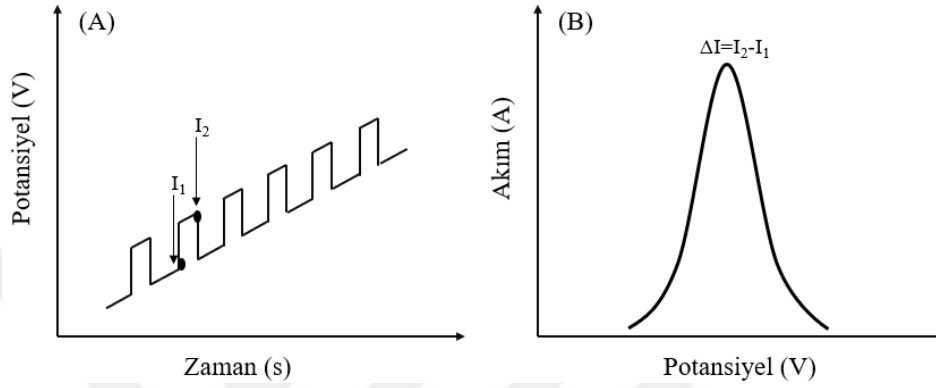
Puls voltametrisinde, potansiyel bir E_0 değerinde tutulur ve ardından anında (pulsu) ikinci bir değer olan E_i 'ye adımlanır. Puls uygulandıktan bir süre sonra (t_m 'de) akım ölçülür. Puls uygulandığında büyük bir kapasitif akım akar; ancak bu akım, elektrokimyasal reaksiyon nedeniyle zamanla akımdan çok daha hızlı azalır. t_m 'yi yeterince büyük yaparak arka plan akımı çok küçük hale getirilebilir. Ancak öte yandan, elektrokimyasal reaksiyondan kaynaklanan akım da t_m arttıkça azalır, ancak bu daha yavaş bir oranda olur. m 'yi büyük ve b 'yi küçük yapmanın püf noktası, t_m 'yi optimum bir ara değerde seçmektir. Elektrota potansiyel pulsun uygulanması, çoğu deneysel durumda, doğrusal tarama voltametrisine kıyasla kapasitif ve faradayik akımların oranında önemli bir iyileşmeye (artışa) yol açar (100, 101).

Günümüzde, modern potansiyostatlarda ticari olarak temin edilebilen birkaç puls voltametri tekniği vardır. Bunlar; diferansiyel puls voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (SWV), normal puls voltametrisi (NPV), diferansiyel kare dalga voltametrisi (DSWV) veya döngülü kare dalga voltametrisidir (CSWV) (102–108). Bu tez çalışmasında DPV ve SWV kullanılmıştır.

2.9.2.1. Diferansiyel Puls Voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisinin elektrokimyasal analizdeki önemi, kapasitif (arka plan) akımı üstün bir şekilde ortadan kaldırmasına dayanmaktadır. Akım her puls için iki noktada ölçülür; ilk nokta pulsun uygulanmasından hemen önce ve ikinci nokta pulsun sonundadır. Bu ölçüm noktaları, kapasitif akımın azalmasına izin verecek şekilde seçilir. Bu

şekilde pulsun hemen öncesindeki ve sonundaki akım arasındaki fark ölçülürse kapasitif akımdan daha az etkilenen bir okuma gerçekleştirilebilir. Her puls için bu noktadaki akım ölçümleri arasındaki fark belirlenir ve net akım elde edilir. Bu teknik çok hassastır ve teşhis sınırları 10–100 µg/L civarındadır. DPV yöntemi için uygulanan potansiyelin zamana göre değişimi ve elde edilen voltamogram Şekil 5’te verilmiştir (79).



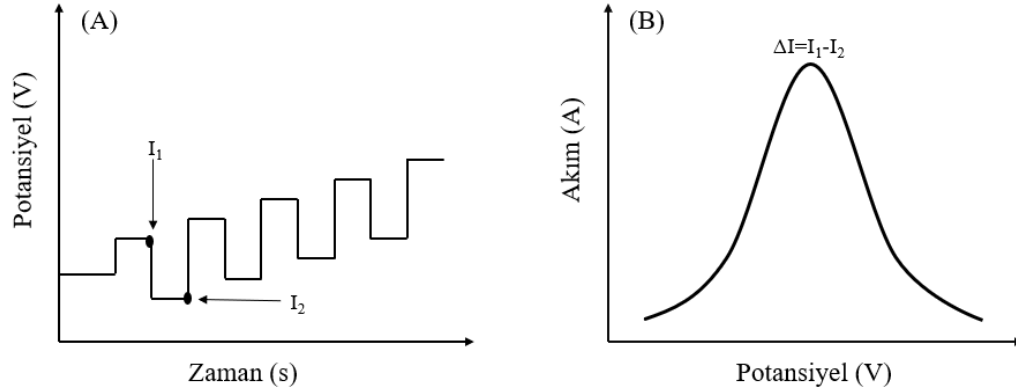
Şekil 5. (A) DPV’de uygulanan potansiyelin zamana karşı değişimi; (B) DPV’de elde edilen voltammogram

2.9.2.2. Kare Dalga Voltametri

Kare dalga voltametri, elektroanalizde yüksek hassasiyet ile bilinir ve aynı zamanda çözelti fazı ve yüzeyle sınırlı redoks sistemlerinin elektrot kinetiği ve reaksiyon mekanizmalarının incelenmesinde kullanılan güçlü bir tekniktir. Bu teknikte, elektrotta hızlı adımlı bir potansiyel taraması uygulanır ve ayrıca her adımda yüksek frekanslı bir kare dalga (20–100 Hz) üst üste bindirilir. Akım, iki yarım dalganın sonunda iki kez ölçülür (79). Bu teknik, konsantrasyonların doğrudan değerlendirilmesi için en hassas yöntemlerden biridir; özellikle farmasötik bileşikler üzerinde eser analizler için yaygın olarak kullanılır.

SWV’nin avantajı, yüksek etkili tarama hızında bir yanıtın bulunabilmesi ve böylece tarama süresinin kısaltılabilmesidir. Bu nedenle SWV, NPV ve DPV tekniklerinden daha sık kullanılır. Ayrıca hem LSV hem de CV ile karşılaştırıldığında, kapasitif akımın verimli bir şekilde ayrıştırılması nedeniyle çok daha geniş bir dinamik aralık ve daha düşük teşhis sınırı sunar. SWV’nin sunduğu bir diğer avantaj ise DPV’ye göre analizde daha yüksek hız ve elektroaktif bileşiklerin daha düşük tüketimi nedeniyle elektrot yüzeyinin bloke edilmesiyle ilgili sorunların azalmasıdır. SWV, tersinir ve tersinmez sistemler için sırasıyla DPV yanıtından 4 ve 3 kat daha yüksektir. Bu nedenle, tipik SWV ölçümleri yalnızca 1–5 saniye

sürerken, DPV yaklaşık 2–4 dakika gibi çok daha uzun analiz süreleri gerektirir. Analitik tayinler 10 nM kadar düşük konsantrasyonlarda yapılabilir (103, 109–112). SWV'nin bir diğer avantajı ise, akım farkının ileri veya geri akımlardan daha büyük olmasıdır, bu nedenle pik yüksekliğinin okunması genellikle oldukça kolaydır. SWV için uygulanan potansiyelin zamana göre değişimi ve elde edilen voltammogram Şekil 6'da verilmiştir (112).



Şekil 6. (A) SWV’de uygulanan potansiyelin zamana karşı değişimi; (B) SWV’de elde edilen voltammogram

2.9.3. Sıyırma Voltametrisi

Sıyırma voltametrisi en hassas elektrokimyasal tekniklerden biridir ve gücü, son derece düşük teşhis sınırlarının (10^{-10} – 10^{-11} M) elde edilmesine imkân sunmasındadır. Dikkate değer hassasiyeti, hedef analitin çalışma elektrotları üzerinde biriktirildiği bir önderiştirme adımıyla elde edilir. Bu adımı, önderiştirilmiş analitin çözeltiye geri sıyrıldığı ölçüm (sıyırma) adımı takip eder; bu işlem, numunedeki analit konsantrasyonu ile orantılı bir akım tepkisi ile sonuçlanır (113).

En sık kullanılan üç sıyırma voltametrisi yöntemi anodik sıyırma voltametrisi (ASV), katodik sıyırma voltametrisi (CSV) ve adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV). Anodik, katodik ve adsorptif sıyırma voltametrisinin her birinin kendine özgü özellikleri olsa da hepsinin önderiştirme ve sıyırma adımları ortaktır. ASV’de analit katodik (negatif) yönde potansiyel uygulanarak çalışma elektrotu üzerinde biriktirilir ve ardından anodik (pozitif) potansiyel taraması sırasında ölçülür. CSV’de ise anodik (pozitif) önderiştirme adımı gerçekleştirilir, ardından katodik (negatif) potansiyel taraması sırasında ölçülür. AdSV, anodik ve katodik sıyırma yöntemlerine oldukça benzerdir. Temel fark, analitin önderiştirme aşamasının, elektroliz yoluyla biriktirmek yerine, elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu ile

gerçekleştirilmesidir. Sıyırma basamağında voltametrik yöntem olarak DPV kullanıldığında, yöntem diferansiyel puls sıyırma voltametrisi (DPSV) adını alırken, SWV kullanıldığında ise kare dalga sıyırma voltametrisi (SWSV) olarak adlandırılır (80, 113, 114).

2.10. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) veya başka bir deyişle alternatif akım (AC) empedans yöntemleri, son yıllarda oldukça fazla popülerlik kazanmıştır. Başlangıçta çift katmanlı kapasitansın ve AC polarografisinin belirlenmesinde uygulanmış olup, artık elektrot süreçlerini ve karmaşık arayüzleri karakterize etmek için kullanılmaktadır (115). EIS, alternatif bir potansiyel (veya akım) uygulanarak ve ortaya çıkan akım (veya potansiyel) ölçülerek elektrotların ve elektrokimyasal hücrelerin elektrokimyasal sürecinin incelenmesini sağlar. Elektrotun direnci ve kapasitans bileşenleri, bir AC voltajı uygulanarak ve frekans değiştirilerek değerlendirilebilir (116). Bu yöntemde, KCl destek elektrolitinde ferrisiyanürün indirgenmesine ilişkin empedans verilerinin analizi, empedans ölçümlerindeki hata yapısını, ölçüm ve süreç modellerinin uygulanmasını ve empedansın elektrot özelliklerindeki değişimlere duyarlılığını göstermek amacıyla kullanılır (117).

EIS'nin en temel devresi, Randles-Ershler devresi olarak bilinir. Randles-Ershler eşdeğer devresinin temel bileşenleri; çözeltinin direnci (R_s), yük transfer direnci (R_{ct}), Warburg empedansı (Z_w) ve elektrotun çift katman kapasitansı (C_{dl}) olarak sıralanabilir. Empedans spektrumlarının görselleştirilmesinde en yaygın kullanılan yöntemler Nyquist ve Bode grafikleridir. EIS'de, düşük genlikli (genellikle 5–10 mV) bir sinüzoidal potansiyel, probun redoks reaksiyonunu destekleyen sabit bir doğru akım (DC) potansiyelinin üzerine bindirilir. Elde edilen sinüzoidal akım, geniş bir frekans aralığında empedansı hesaplamak için kullanılır. Nyquist grafiği (hayali empedans (Z_{im}) ile gerçek empedansın (Z_{re}), azalan frekansın bir fonksiyonu olarak grafiği), elektrot reaksiyonunun niteliğine bağlı olarak farklı özellikler gösterir. Eğer probun elektron transfer reaksiyonu elektrot reaksiyonunun hız belirleyici adımı ise, Nyquist grafiği bir yarım daire gösterir; eğer probun difüzyonu hız belirleyici ise, grafik doğrusal bir form alır. İlk durumda, yarım dairenin yüksek frekans bölgesi, C_{dl} tarafından baskın şekilde etkilenir ve bu bölge genellikle Z_{re} ekseninde, R_s 'ye karşılık gelen bir ofset gösterir. Yarım dairenin düşük frekans bölgesindeki Z_{re} eksenindeki kesişim noktası, R_s ile elektron transfer direncinin (Z_{et}) toplamını temsil eder. Diğer bir deyişle, Z_{et} , Z_{re} eksenindeki yarım dairenin çapından kolayca tahmin edilebilir (118).

2.11. İletken Polimerler

1977 yılında organik maddeler için benzersiz, yüksek elektriksel iletkenlik sergileyen organik polimer poliasetilen keşfedildi. Bu tarihten itibaren araştırmacılar için iletken polimerler kendilerine özgü elektriksel özellikleri nedeniyle önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir (119). Bu iletken polimerlerin, elektrot yüzeyinin modifikasyonunda kullanıldığında elektroaktif yüzey alanının arttığı ve elektron transfer işlemlerinin daha kolay gerçekleştiği görülmüştür. Makromoleküler tabakalarda gerçekleşen elektrot reaksiyonlarının elektrokatalizi, polimer malzeme ile doğrudan ilişkilidir. Elektrot ile çözeltideki redoks aktif madde arasındaki doğrudan elektron transferi yerine (ki bu klasik elektrokatalitik durumdur), elektron transferine elektrot yüzeyine tutturulmuş polimer film aracılık eder. Polimer film kaplı elektrotta en az iki tür ara yüzey vardır: İletken polimer/çözelti ara yüzeyi ve iletken polimer/elektrot ara yüzeyi. Dahası, polimerle modifiye edilmiş elektrotta meydana gelen bir redoks reaksiyonunun hızı, yalın bir elektrotla kıyasla önemli ölçüde azaltılabilir. Böylelikle elektroaktif polimer tabakası iletkenlikte anahtar bir rol oynar (120, 121).

İletken polimerlerin yüksek stabilite, tekrarlanabilirlik ve kolay hazırlanabilme gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır. Ayrıca iletken polimerler hedef moleküllere seçici bir yanıt sağlayabilir (121). Elektroaktif polimerler, elektrokromik görüntüleme cihazları, kapasitörler, korozyon kontrolüne yönelik koruyucu kaplamalar, elektromanyetik koruyucu cihazların yanı sıra kimyasal sensörler ve biyosensörler gibi çeşitli uygulama alanları nedeniyle kullanımı her geçen gün artan malzemelerdir (122–124).

Elektrot yüzeyine bir modifiye edicinin eklenmesinde kullanılan yaygın uygulamalardan biri, yüzeyin uygun bir polimer film ile kaplanmasıdır. Çoğu polimer, önceden oluşturulmuş polimerler veya elektrokimyasal polimerizasyon kullanılarak adsorptif çekim ve elektrolit çözeltisindeki düşük çözünürlük etkisi ile elektrot yüzeylerine tutturulur. Bu polimerlerin sentezi, özellikle katı elektrotların yüzeyinde elektropolimerizasyon yoluyla kolaylıkla gerçekleştirilebilir (125, 126). Polimerin elektropolimerizasyonu; döngü sayısı, uygulanan potansiyel aralığı ve tarama hızı gibi CV parametrelerinin ayarlanmasıyla kontrol edilebilir (127).

Bu tez çalışması kapsamında bazı trifenilmetan türü boyar maddeler seçilmiş ve bu maddeler elektropolimerizasyon yöntemi ile elektrot yüzeyinde polimerleştirilerek elektrotlar modifiye edilmiştir.

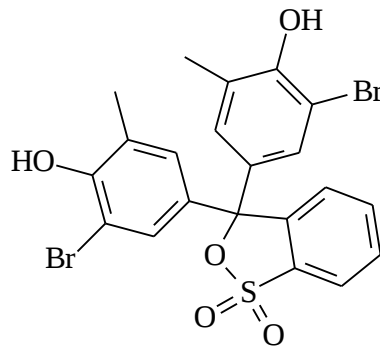
2.11.1. Trifenilmetan Boyar Maddeler

Trifenilmetan boyar maddeler, omurgası trifenilmetan olan sentetik organik bileşiklerdir. Trifenilmetanlar, yapılarında bulunan aril gruplarındaki substitue gruplara göre metil menekşeler, fuskın boyalar ve fenil boyalar olarak gruplandırılabilir ve adlandırılabilir (128). Bromkrezol moru, bromfenol mavisi, bromtimol mavisi, bromkrezol yeşili, kristal menekşe, malakit yeşili ve parlak yeşil en yaygın kullanılan trifenilmetan boyalar arasındadır. Bu boyalar pH indikatörü olarak yaygın olarak kullanılır. Bunun yanı sıra, elektrokimyasal olarak polimerizasyona uğratılabilirler ve oluşan polimer filmler elektrot modifikasyonunda kullanılabilir.

Bu tez çalışması kapsamında bromkrezol moru, bromfenol mavisi ve bromtimol mavisi seçilmiş ve elektrot modifikasyonunda kullanılmıştır.

2.11.1.1. Bromkrezol Moru

Bromkrezol moru (BCP), 4,4'-(1,1-dioksido-3H-2,1-benzoksatiol-3,3-diil)-bis(2-bromo-6-metilfenol, trifenilmetan grubunda yer alan mor renkli ve suda çözünebilen bir boyar maddedir (Şekil 7). BCP'nin kapalı formülü $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$ ve molekül ağırlığı 540.24 g/mol'dür (129). pH indikatörü ve protein probu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Deniz ürünlerinin tazeliğini tespit etmek için de kullanılır (130). Ayrıca tıbbi laboratuvarlarda BCP kullanılarak serum albümin tayini yapılmaktadır (131).



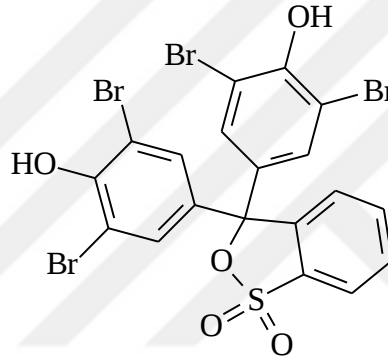
Şekil 7. Bromkrezol morunun kimyasal yapısı

Literatürde askorbik asit, guaifenesin, ürik asit, ksantin, hipoksantin ve kadmiyum gibi bazı moleküllerin BCP ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak (132–135), serotonin ve levodopanın BCP modifiyeli kalem grafit elektrot kullanılarak (136), L-tirozin ve sülfanilik

asitin çok duvarlı karbon nanotüpler ve BCP modifiyeli karbon pasta elektrot kullanılarak (137, 138) analizinin yapıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur.

2.11.1.2. Bromfenol Mavisi

Bromfenol mavisi (BPB), 3,3-bis(3,5-dibrom-4-hidroksifenil)-2,1λ⁶-benzoksatiyol-1,1(3H)-dion, trifenilmetan grubunda yer alan mavi renkli bir boyar maddedir (Şekil 8). BPB'nin kapalı formülü C₁₉H₁₀Br₄O₅S ve molekül ağırlığı 669.96 g/mol'dür (139). Biyolojik renklendirici ve endüstriyel boya olarak kullanılır (140). Ayrıca agaroz jel elektroforezinde ve poliakrilamid jel elektroforezinde izleme boyası olarak da kullanılmaktadır (141, 142).



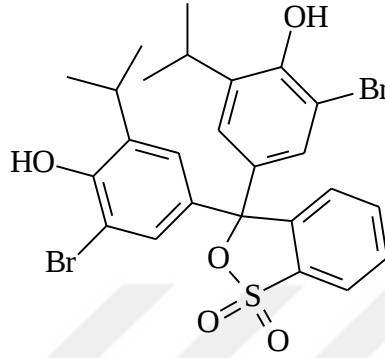
Şekil 8. Bromfenol mavisinin kimyasal yapısı

Literatürde bakır(II) iyonunun BPB ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak (143), kalayın bizmut ve BPB ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak (144), ürik asitin BPB ve altın nanopartikülleri kompozit modifiye GCE kullanılarak (145) ve dihidroksibenzen izomerlerinin BPB ve çok duvarlı karbon nanotüp nanopartikülleri kompozit modifiye camı karbon nanotüpler kompozit modifiye GCE kullanılarak (146) analizine yönelik bazı çalışmalar mevcuttur.

2.11.1.3. Bromtimol Mavisi

Bromtimol mavisi (BTB), 4,4'-(1,1-dioksido-3H-2,1-benzoksatiyole-3,3-diil)bis(2-bromo-6-izopropil-3-metilfenol), trifenilmetan grubunda yer alan ve genellikle pH indikatörü olarak kullanılan bir boyadır (Şekil 9). BTB'nin kapalı formülü C₂₇H₂₈Br₂O₅S ve molekül ağırlığı 624.38 g/mol'dür. Çözelti içerisinde zayıf bir asit davranışı gösterir ve çoğunlukla nispeten nötr pH'ya sahip maddelerin ölçülmesini gerektiren uygulamalarda

kullanılır. Asidik pH'da sarı, alkali pH'da mavidir (147, 148). Yaygın bir kullanımı, bir sıvıdaki karbonik asidin varlığını ölçmek içindir. Solunum bozukluklarının tedavisinde faydalıdır (149). Tüm bunların dışında, BTB, elektrokimyasal sinyalleri ve elektron transferini iyileştirmek için ara madde olarak da kullanılır (150).



Şekil 9. Bromtimol mavisinin kimyasal yapısı

Literatürde dopamin, askorbik ve ürik asitin BTB ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak (151, 152), 5-fluorourasilin BTB ve çok duvarlı karbon nanotüplerle modifiye edilmiş GCE kullanılarak (153) analizine yönelik çalışmalar mevcuttur.

2.12. Analitik Yöntem Validasyonu ve Parametreleri

Validasyon, kullanışlı analitik veriler sağlamak için metodolojinin uygunluğunu belirleme sürecidir. Diğer bir deyişle yöntem validasyonu, analitik bir yöntemin amaçlanan kullanım için kabul edilebilir olduğunun (bilimsel çalışmalar yoluyla) kanıtlanması süreci olarak da tanımlanabilir (154, 155).

Kalite ve güvenlik standartlarına uygunluğu sağlamak amacıyla Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa, Japonya ve diğer ülkeler, pazarlanan birçok ilaç ürünü için resmi test yöntemlerini açıklayan özetler veya farmakopeler yayımlamıştır. Bunlara örnek olarak USP (United States Pharmacopeia), ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) ve FDA (The Food and Drug Administration) verilebilir (155, 156). Bu kılavuzlara göre doğruluk, kesinlik, seçicilik (özgüllük), doğrusalık ve doğrusal aralık, teşhis sınırı, tayin sınırı, duyarlık, sağlamlık, tutarlık ve stabilite analitik yöntemin geçerliliğini gösteren validasyon parametrelerindendir. Validasyon gereklilikleri test yönteminin türüne bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (154–158).

Özgüllük: Analitik yöntemin kompleks karışımlardaki analiti ayırt etme ve miktarını tayin etme yeteneğini ifade eder. Ayrıca bir ICH kılavuzu, özgüllüğü, mevcut olması muhtemel diğer bileşiklerin varlığında analitin kesin olarak değerlendirilmesi yeteneği olarak tanımlar. Tipik olarak bunlar safsızlıklar, parçalayıcı maddeler, matris vb. olabilir (156).

Doğruluk: Bir ölçümün doğruluğu; ölçülen değerin gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanır. Doğruluğu yüksek bir yöntemde “gerçek değeri” bilinen bir numune analiz edilir ve ölçülen değer gerçek değerle aynıdır. Tipik olarak doğruluk, geri kazanım çalışmaları tarafından temsil edilir ve belirlenir. Doğruluğu belirlemenin üç yolu vardır (156):

- I. Bir referans standardıyla karşılaştırma
- II. Boş matrise eklenen analitin geri kazanımı
- III. Analite standart eklenmesi

Kesinlik: Analitik bir prosedürün kesinliği; öngörülen koşullar altında tek tip bir numunenin farklı numunelerinden elde edilen bir grup ölçüm arasındaki uyumunun yakınlığını (dağılım derecesi) ifade eder ve üç kategoriye ayrılır (159):

- I. Tekrarlanabilirlik: Kısa bir zaman aralığında aynı çalışma koşulu altındaki kesinliği ifade eder.
- II. Orta düzey kesinlik: Farklı günler, farklı ekipmanlar ve farklı analistler gibi laboratuvar içi farklılıkları yansıtır.
- III. Tekrar üretilebilirlik: Farklı analitik laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder.

Doğrusallık: Bir yöntemin doğrusallığı, konsantrasyona karşı yanıtın değişimine ilişkin kalibrasyon grafiğinin düz bir çizgiye ne kadar iyi yaklaştığının bir ölçüsüdür. Doğrusallık, çeşitli analit konsantrasyonlarında tek ölçümler alınarak değerlendirilebilir. Veriler daha sonra doğrusal bir grafik haline getirilir. Ortaya çıkan grafiğin eğimi, kesim noktası ve korelasyon katsayısı (r), doğrusallık hakkında istenen bilgiyi sağlar. Doğrusal aralık ise elde edilen bu grafikte analitin üst ve alt konsantrasyonlarını kapsayan aralık olarak ifade edilebilir (156, 157).

Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ): LOD, bilinen analit konsantrasyonuna sahip numunelerin analiziyle ve belirtilen deneysel koşullar altında analitin güvenilir bir şekilde teşhis edilebildiği, ancak kesin değer olarak miktarının belirlenemediği

konsantrasyondur. LOQ ise, onaylanmış deneysel koşullar altında uygun kesinlik ve doğrulukla ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonudur. LOD ve LOQ sırasıyla $LOD=3.3 s/m$ ve $LOQ=10 s/m$ denklemleriyle hesaplanır. Burada s ölçüm sonuçlarının standart sapması, m ise kalibrasyon eğrisinin eğimidir (156).

Sağlamlık: Analitik bir prosedürün sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük ama kasıtlı değişikliklerden etkilenmeden kalma ve normal kullanım sırasında güvenilirliğinin bir göstergesini sağlama kapasitesinin ölçüsüdür. Sağlamlık, elde edilen sonuçlarda beklenmeyen farklılıklar ortaya çıkmadan, yöntemi farklı laboratuvarlarda veya farklı koşullar altında yeniden üretebilme yeteneği ve bir yöntemin sağlamlığını değerlendirmek için bir deney düzeneği olarak sağlamlık testi şeklinde tanımlanabilir (160).

Stabilite: Belirli bir matristeki bir analitin belirli zaman aralıklarında belirli koşullar altında kimyasal veya fiziksel olarak bozulmadan kalma süresi olarak ifade edilir. Stabilite testinin amacı; numune toplama, işleme, saklama, hazırlama ve analiz sürecinin tamamı boyunca ilgilenilen analitlerdeki herhangi bir bozulmayı tespit etmektir. Stabilitenin belirlendiği koşul büyük ölçüde analitin doğasına, biyolojik matrise ve beklenen saklama süresine bağlıdır (160).

Duyarlılık: Analit konsantrasyonu değiştikçe yanıtın ne kadar değiştiğini açıklayan bir parametredir. Doğrusal kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak ifade edilebilir ve doğrusallık testleri ile aynı anda ölçülür. Duyarlılık, analitin yapısına ve analiz yöntemine bağlıdır (158).

Tutarlılık: Farklı laboratuvarlar, farklı analistler, farklı cihazlar, çevre koşulları ve operatörler vb. gibi farklı durumlar altında tekrarlanabilirliğin derecesi veya ölçüsüdür. Yüzde bağıl standart sapma (%RSD) üzerinden ifade edilir (157).

2.13. Melatoninin Literatürdeki Çalışmaları

Bu tez kapsamında çalışılması planlanan ilaç etkin maddesi melatonin ile ilgili olarak, bugüne kadar farklı voltametrik yöntemler ve elektrotlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar aşağıda özetlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Melatonin için literatürde bulunan voltametrik çalışmalara ait veriler

Elektrot	Yöntem	Destek Elektrolit	Doğrusal aralık (μM)	LOD (μM)	Örnek	Kaynak
CPE	LSV	0.02 M HClO_4	3 – 550	2.3	Kapsül dozaj formu	(161)
CPE	DPSV	0.04 M BRT pH 2.0	0.05 – 0.1	0.001	Serum	(162)
CPE	DPV	0.04 M BRT pH 5.0	6 – 30	-	İdrar	(163)
CPEMO			6 – 30	-		
CPE	DPSV	-	0.0086 – 43.05	0.000646	-	(164)
AGCE	OSWSV	0.04 M BRT pH 6.7	0.8 – 10	0.05	Kapsül ve tablet dozaj formu	(165)
GCE	LSV	0.05 M FT pH 3.0	27 – 215	11	Tablet dozaj formu	(166)
CPE	CV	0.1 M HClO_4	0.06 – 0.8	0.03	Kapsül dozaj formu	(167)
CPE	CV	0.1 M HClO_4	0.01 – 0.4	0.05	Serum	(168)
	ACV		0.0001 – 0.001	0.00009		
HMDE	SWAdSV	AT pH 5.0	0.01 – 0.1*	0.00818	Serum ve tablet dozaj formu	(169)
			0.002 – 0.02**	0.00195		
			0.001 – 0.02***	0.000313		
MWNT-DHP/GCE	LSV	0.1 M FT pH 7.5	0.08 – 10	0.02	Kapsül dozaj formu	(170)
CoPc	SWV	0.01 M FT pH 7.4	100 – 10000	1.70	Kapsül dozaj formu	(171)
CoTCpC				0.119		
CoOCpC				0.144		
GCE	DPV	BRT pH 4.3	20 – 500	1.48	Serum ve tablet dozaj formu	(172)
	SWV		40 – 500	1.94		
MnHCF-PEDOT/GCE	CV	0.1 M KCl pH 1.5	100 – 4600	100	-	(173)
BDDE	CV	1.0 M KCl	344 – 689	10.33	Tablet dozaj formu	(174)
BDDE	SWV	0.1 M BRT pH 3.0	0.5 – 4	0.11	İdrar ve tablet dozaj formu	(175)
GPH-CSPE	CV	0.1 M FT pH 7.0	1 – 300	0.87	Tablet dozaj formu	(176)

Tablo 1. (Devam)

AHNSA: PdNPs: ErGO/ GCE	SWV	1.0 M FT pH 7.2	5 – 100	0.09	İdrar ve tablet dozaj formu	(177)
GCE	SWV	-	5 – 200	0.3432	İdrar ve farmasötik dozaj formu	(178)
CBGCE	DPV	0.1 M FT pH 6.2	0.05 – 12	0.019	Tablet dozaj formu	(179)
SPCE	DPV	0.1 M FT pH 7.0	4.3 – 43.1	4.6	-	(180)
SPCE- Chi-CeO ₂			0.4 – 4.3	0.775		
SPE	DPV	0.1 M FT pH 6.4	-	0.52	Kapsül dozaj formu	(181)
		0.1 M FT pH 7.0	-	0.39		
0.1 M FT pH 7.4		-	0.47			
GSPE		0.1 M FT pH 6.4	-	0.065		
		0.1 M FT pH 7.0	-	0.13		
		0.1 M FT pH 7.4	-	0.26		
CFME	FSCV	Üçlü tampon pH 7.4	0.05 – 10	0.024	Lenf nodülü dokusu	(182)
GPT/ WPE	SWV	0.1 M FT pH 7.4	0.8 – 100	0.033	Tükürük, idrar ve tablet dozaj formu	(183)
GCE	CV, LSV	0.04 M BRT pH 7.0	-	-	Tablet dozaj formu	(184)
AuE			-	-		
PtE			-	-		
CFEs	SWV	Yapay beyin omurilik sıvısı, pH 7.4	0.1 – 2	0.0381	Fare beyinlerinin görsel korteksi	(185)
CFEs	FSCV	Yapay beyin omurilik sıvısı, pH 7.4	0.1 – 5	0.0202	Fare beyinlerinin görsel korteksi	(186)
GCE/3DG/ AuNPs	DPV	0.04 M FT pH 7.4	0.05 – 50	0.0082	Tablet dozaj formu	(187)
Gr-Av	SWV	0.5 M McT pH 7.0	10 – 100	0.47	Serum, idrar ve kapsül dozaj formu	(188)
SPE	SWV	0.1 M FT pH 5.0	0.25 – 75	0.0258	Tükürük ve idrar	(189)

Tablo 1. (Devam)

f-MWCNT-AuNP-Si ₄ Pic ⁺ Cl ⁻ /GCE	SWV	0.2 M FT pH 2.0	4.9 – 55.5	1.6	Serum, idrar ve tükürük	(190)
Cu ₃ P ₂ O ₈ /NbC/GCE	DPV	0.1 M FT pH 7.0	0.014 – 1517.68	0.0083	Serum, idrar	(191)
ErO ₂ /MnO ₂ -CPE	DPV	BRT pH 2.0	0.04 – 20	0.006	Tablet dozaj formu	(192)
GC/MoS ₂ /CB[8]	DPV	0.2 M FT pH 7.0	1.25 – 50	0.38	Serum, idrar ve tablet dozaj formu	(193)
WO ₃ /FCH	SWV	0.1 M FT	0.05 – 1000	0.0049	Serum, idrar ve tükürük	(194)
α -Fe ₂ O ₃ /C-Fe-gC ₃ N ₄ /SPCE	DPV	0.05 M FT pH 7.0	0.1 – 233.1	0.004	İdrar, ekşi kiraz ve tablet dozaj formu	(195)
HD-CNT-fiber cross-section micro electrode	SWV	0.42 M FT pH 7.25	0.05 – 100	0.01	İdrar, maş fasülyesi ve tablet dozaj formu	(196)
BDDE	SWV	0.1 M FT pH 4.0	1.2 – 10.8	0.29	Nehir suyu	(197)
Tween/h-BDD/SPE	DPV	0.1 M FT pH 7.0 + 0.1 M KCl	0.057 – 10, 10 – 200	0.017	Tablet dozaj formu	(198)

CPE: karbon pasta elektrot, LSV: doğrusal tarama voltametrisi, CPEMO: oleik asit modifiyeli karbon pasta elektrot, AGCE: aktifleştirilmiş camısı karbon elektrot, OSWSV: Osteryoung kare dalga sıyırma voltametrisi, ACV: alternatif akım voltametrisi, HMDE: asılı cıva damla elektrotu, SWAdSV: kare dalga katodik adsorptif sıyırma voltametrisi, MWNT-DHP/GCE: çok duvarlı nanotüp ve diheksadesil hidrojen fosfat modifiyeli camısı karbon elektrot, CoPc: kobalt ftalosiyenin, CoTCPc: kobalt tetrakarboksi ftalosiyenin, CoOCPc: kobalt oktakarboksi ftalosiyenin, MnHCF-PEDOT/GCE: Mangan hekzasiyanoferrat karışık değerlikli poli(3,4-etilendioksitiyofen) hibrit filmi modifiyeli camısı karbon elektrot, BDDE: bor katkılı elmas elektrot, GPH-CSPE: grafen-karbon ekran baskılı elektrot, AHNSA: PdNPs:ErGO/GCE: 4-amino-3-hidroksi-1-naftalin sülfonik asit ve paladyum nanopartiküller ile elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit modifiyeli camısı karbon elektrot, CBGCE: karbon siyahı modifiyeli camısı karbon elektrot, SPCE: ekran baskılı karbon elektrot, SPCE-Chi-CeO₂: seryum oksit-kitosan modifiyeli ekran baskılı karbon elektrot, SPE: ekran baskılı elektrot, GSPE: grafen modifiyeli ekran baskılı elektrot, CFME: karbon-fiber mikroeletrot, FSCV: hızlı-tarama döngülü voltametri, GPT/WPE: su geçirmez kağıt alt tabakasında tınak cilası ve grafitten oluşan iletken bir mürekkeple oluşturulmuş tek kullanımlık bir grafit sensör, AuE: altın elektrot, PtE: platin elektrot, CFES: elektrokimyasal olarak ön aktiveli karbon fiber mikroeletrotlar, GCE/3DG/AuNPs: bozulmamış üç boyutlu grafen ve altın nanopartikül modifiyeli camısı karbon elektrot, Gr-Av: grafit-otomotiv verniği karışımına dayalı kendinden yapışkanlı elektrot, f-MWCNT-AuNP-Si₄Pic⁺Cl⁻/GCE: 3-n-propil-(4-metilpiridinyum) silseskioksan klorür ile sentezlenmiş altın nanopartikül ve çok duvarlı karbon nanotüp modifiyeli camısı karbon elektrot, Cu₃P₂O₈/NbC/GCE: bakır fosfatla iç içe geçmiş niyobyum karbür modifiyeli camısı karbon elektrot, ErO₂/MnO₂-CPE: erbiyum oksit ve mangan dioksit modifiyeli karbon pasta elektrot, GC/MoS₂/CB[8]: molibden disülfür nano tabakaları ve sukabağı[8]uril modifiyeli camısı karbon elektrot, WO₃/FCH: tungsten oksit nanoküreler dekorlu kitosan elektrot, α -Fe₂O₃/C-Fe-gC₃N₄/SPCE: gözenekli çiçek benzeri hematit nanopartikülleri, karbon ve demir kodoplu grafitli karbon nitrür modifiyeli ekran baskılı karbon elektrot, HD-CNT-fiber cross-section microelectrode: yüksek yoğunluklu karbon nanotüp liflerinin kesitlerine dayanan bir mikroeletrot, Tween/h-BDD/SPE: Tween kaplamalı yüksek oranda bor katkılı elmas nano tozu modifiye edilmiş ekran baskılı elektrot, *: 0 sn önderiştirme süresi, **: 30 sn önderiştirme süresi, ***: 60 sn önderiştirme süresi

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal maddelerin tamamı analitik saflıkta olup herhangi bir saflaştırma prosedürü uygulanmadan satın alındığı haliyle kullanılmıştır ve Tablo 2’de temin edildiği firma bilgileriyle birlikte listelenmiştir.

Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal adı	Formülü	Saflık Derecesi	Firma adı
Alüminyum hidroksit	Al(OH) ₃	Referans standart	Merck
Amonyum klorür	NH ₄ Cl	≥%99.5	Sigma-Aldrich
Asetik asit	CH ₃ COOH	≥%99.8	Merck
Asetonitril	CH ₃ CN	≥%99.9	Sigma-Aldrich
Borik asit	H ₃ BO ₃	≥%99.5	Sigma-Aldrich
Bromkrezol moru	C ₂₁ H ₁₆ Br ₂ O ₅ S	%90.0	Sigma-Aldrich
Bromfenol mavisi	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	Referans standart	Sigma-Aldrich
Bromtimol mavisi	C ₂₇ H ₂₈ Br ₂ O ₅ S	%95	Sigma-Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat	Na ₂ HPO ₄	≥%99.0	Sigma-Aldrich
Etil alkol	C ₂ H ₅ OH	≥%99.9	Merck
Fosforik asit	H ₃ PO ₄	≥%85	Merck
Hidroklorik asit	HCl	%37.0	Sigma-Aldrich
İnsan serumu	Erkek AB plazma	-	Sigma-Aldrich
Kalsiyum klorür dihidrat	CaCl ₂ .2H ₂ O	≥%99.0	Sigma-Aldrich
L-askorbik asit	C ₆ H ₈ O ₆	≥%99.0	Sigma-Aldrich
Melatonin ve Ocean melatonin® tablet	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	%99.9	Orzaks İlaç ve Kimya San. Tic. A.Ş.
Potasyum dihidrojen fosfat	KH ₂ PO ₄	≥%99.5-100.5	Sigma-Aldrich
Potasyum ferrisiyanür	K ₃ [Fe(CN) ₆]	≥%99.0	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür	KCl	≥%99.0-100.5	Merck
Potasyum nitrat	KNO ₃	≥%99.0	Sigma-Aldrich
Potasyum sülfat	K ₂ SO ₄	≥%99.0	Merck
Sitrik asit anhidrus	C ₆ H ₈ O ₇	≥%99.5-100.5	Carlo Erba Reagents
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	≥%99	Merck
Sodyum hidroksit	NaOH	≥%98.0	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	NaCl	≥%99.0	Sigma-Aldrich
Sodyum nitrat	NaNO ₃	≥%99.0	Merck
Sodyum sülfat	Na ₂ SO ₄	≥%99.0	Sigma-Aldrich
Üre	CH ₄ N ₂ O	≥%99.0-100.5	Sigma-Aldrich
Ürik asit	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	≥%99.0	Acros Organics

3.2. Cihazlar ve Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve gereçler Tablo 3’te marka/model bilgileriyle birlikte listelenmiştir.

Tablo 3. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve gereçler

Cihazlar	Marka/Model
Potansiyostat cihazı	Autolab/PGSTAT128N, Nova 1.19 yazılım
EIS cihazı	Gamry/1010E Potansiyostat/Galvanostat/ZRA
Saf su/Ultra saf su cihazı	Santorius/Arium 61316/Arium proUV
pH metre	Hanna/HI2211
Analitik terazi	Ohaus/PA214C
Ultrasonik banyo	Soltec/Sonica 3300MH
Manyetik karıştırıcı	Heidolph/MR Hei
Karıştırıcı, vortex	Heidolph/Reax top
Buzdolabı	Profilo/BD2046W2NN
Santrifüj cihazı	Sigma/3-30K
Deney tüpü (10 mL)	Borox
Eppendorf tüpü (1.5 mL)	Sigma-Aldrich
Cam pipetler (2, 5 ve 10 mL)	Isolab
Beherler	Isolab
Porselen havan ve havaneli	Isolab
Silindirik manyetik balık (10×6 mm)	Isolab
Balon jojeler (10 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL)	Isolab
Otomatik mikropipetler (0.5-10, 20-200, 100-1000 µL ve 0.5-5 mL) ve uygun pipet uçları	Isolab, Socorex, Eppendorf

3.3. Elektrokimyasal Sistem ve Bileşenler

Tez çalışması kapsamında kullanılan elektrokimyasal sisteme ait bileşenler marka/model bilgileriyle birlikte Tablo 4’te listelenmiştir.

Tablo 4. Tez çalışması kapsamında kullanılan elektrokimyasal sistem ve bileşenleri

Bileşen	Marka/Model
Çalışma elektrotu (GCE, 3.0 mm, 7.069 mm ² yüzey alanı)	BASi® / MF 2012
Referans elektrot (Ag/AgCl)	BASi® / MF 2052
Yardımcı elektrot (Platin tel)	BASi® / MW 1032
Elektrot yüzeyi parlatma/cilalama pedi	BASi® / MF 1040

3.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Melatonin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Saf melatoninin 1.0×10^{-3} M'lık stok çözeltisi ultra saf su ile günlük taze olarak hazırlandı. Bunun için 5.8 mg saf etkin madde tartılarak 25 mL'lik balon jojede ultra saf suyla hacme tamamlanıp tamamen çözünmesi için ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi. Melatonin çalışma çözeltileri ise hazırlanan stok çözeltilerden gerekli hacim alınıp destek elektrolit çözeltisi ile 5 mL'ye seyreltilerek hazırlandı.

3.4.2. Destek Elektrolit Çözeltilerinin Hazırlanması

0.1 M fosfat tamponu (FT) çözeltileri $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve Na_2HPO_4 tuzları kullanılarak istenilen pH'larda (5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 7.7, 7.8 ve 8.0) hazırlandı. pH ayarlaması 5 M NaOH çözeltisi ile yapıldı.

0.04 M Britton-Robinson tamponu (BRT) çözeltileri H_3PO_4 , CH_3COOH ve H_3BO_3 kullanılarak istenilen pH'larda (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 ve 11.0) hazırlandı. pH ayarlaması 5 M NaOH çözeltisi ile yapıldı.

0.1 M asetat tamponu (AT) çözeltileri CH_3COOH kullanılarak kullanılarak istenilen pH'larda (3.5, 4.5, 5.0 ve 5.5) hazırlandı. pH ayarlaması 5 M NaOH çözeltisi ile yapıldı.

McIlvaine tamponu (McT) çözeltileri 0.2 M Na_2HPO_4 stok çözeltisi ve 0.1 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ stok çözeltisinin uygun miktarlarda karıştırılması ile istenen pH'larda (2.6, 3.5, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 7.7, 7.8 ve 8.0) hazırlandı.

0.1 M sitrat tamponu (ST) çözeltileri 0.1 M NaOH stok çözeltisi ve 0.1 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ stok çözeltisinin uygun miktarlarda karıştırılması ile istenen pH'larda (3.0, 4.0, 5.0, 5.5 ve 6.0) hazırlandı.

Tüm destek elektrolit çözeltileri ultra saf su kullanılarak oda sıcaklığında hazırlandı ve buzdolabında saklandı. Çözeltiler elektrokimyasal çalışmalarda kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelene kadar karanlıkta bekletildi.

3.4.3. Yapay İdrar Çözeltisinin Hazırlanması

Yapay idrar çözeltisi hazırlamak için gerekli miktarlarda $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (25.00 g), NH_4Cl (1.00 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.08 g), Na_2SO_4 (1.40 g), KCl (1.60 g), KH_2PO_4 (1.40 g) ve NaCl (2.92 g) tartıldı ve ultra saf su ile 1.0 L'lik balon jojede hacme tamamlandı. Hazırlanan yapay idrar çözeltisinin istenilen pH'ya (6.0) ayarlanması için 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl çözeltisi kullanıldı. Yapay idrar çözeltisi kullanılana kadar karanlıkta bekletildi (199, 200).

3.4.4. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

Melatoninin 1.0×10^{-3} M'lık tablet stok çözeltisini hazırlamak için her biri 3 mg etkin madde içeren 10 adet Ocean Melatonin® tablet 1.6754 g olarak tartıldı ve bir havanda iyice ezilerek ince bir toz haline getirildi. 1.0×10^{-3} M'lık tablet ana stok çözeltisi için gerekli olan tablet içeriğinin miktarı tartılarak 10 mL'lik bir balon jojeye alındı ve ultra saf su ile hacme tamamlandı. Hazırlanan çözelti 15 dakika ultrasonik banyoda ve sonrasında iri parçacıkların dibe çökmesi için 15 dakika karanlıkta bekletildi.

Tablet çalışma çözeltileri, hazırlanan stok çözeltilerden gerekli hacim alınıp destek elektrolit çözeltisi ile 5 mL'ye seyreltilerek hazırlandı.

3.4.5. Serum ve İdrar Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

Serum ve yapay idrar çalışmaları için öncelikle saf melatonin stok çözeltisi ultra saf su içerisinde hazırlandı. Bu stok çözelti, 1.0×10^{-4} M melatonin içeren serum ve yapay idrar stok çözeltilerinin ayrı ayrı hazırlanmasında kullanıldı. Bunun için, 3.6 mL saf serum veya yapay idrar çözeltisi, 5.4 mL asetonitril ve 1.0 mL 1.0×10^{-3} M saf melatonin stok çözeltisi 10 mL'lik bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve melatonin konsantrasyonu 1.0×10^{-4} M olan serum veya yapay idrar ana stok çözeltileri elde edildi.

Destek (boş) serum veya yapay idrar ana stok çözeltilerinin hazırlanması için 0.9 mL saf serum veya yapay idrar çözeltisi, 1.35 mL asetonitril ve 0.25 mL ultra saf su ile karıştırıldı.

Saf melatonin içeren serum ve yapay idrar stok çözeltileri ile destek serum ve yapay idrar çözeltileri hazırlandıktan sonra vortex ile karıştırıldı ve her biri ultrasonik banyoda

15 dakika bekletildi. Daha sonra 15 dakika boyunca 5000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj edilen çözeltilerin süpernatant kısımları alındı ve deney tüplerine aktararak elektrokimyasal çalışmalarda kullanıldı.

3.4.6. Monomer Çözeltilerinin Hazırlanması

3.4.6.1. Bromkrezol Moru Çözeltisi

0.1 M NaNO_3 içeren 5.0×10^{-4} M BCP monomer çözeltisi için 2.70 mg BCP ve 84.99 mg NaNO_3 tartılıp 10 mL’lik bir balon jojeye alındı ve pH 5.6 FT çözeltisi ile hacme tamamlandı. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tam çözünme sağlandı.

3.4.6.2. Bromfenol Mavisi Çözeltisi

0.05 M NaNO_3 içeren 1.75×10^{-3} M BPB monomer çözeltisi için 11.72 mg BPB ve 42.50 mg NaNO_3 tartılıp 10 mL’lik bir balon jojeye alındı ve pH 5.9 FT çözeltisi ile hacme tamamlandı. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tam çözünme sağlandı.

3.4.6.3. Bromtimol Mavisi Çözeltisi

0.05 M Na_2SO_4 içeren 5.0×10^{-4} M BTB monomer çözeltisi için 3.12 mg BTB ve 71.02 mg Na_2SO_4 tartılıp 10 mL’lik bir balon jojeye alındı ve pH 7.5 McT çözeltisi ile hacme tamamlandı. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tam çözünme sağlandı.

3.5. Modifiye Elektrotların Hazırlanması

Modifikasyon öncesinde camısı karbon elektrot yüzeyi cilalanarak temizlendi. Cilalama işlemi için cilalama pedi üzerine az miktarda $\text{Al}(\text{OH})_3$ tozu döküldü ve dairesel hareketlerle sekiz (8) çizildi. Elektrot yüzeyi $\text{Al}(\text{OH})_3$ kalıntılarından arındırılmak amacıyla saf su ile yıkandı. Devamında elektrot sırasıyla etanol (1:1) ve ultra saf su içerisinde onar dakika ultrasonik banyoda bekletildi.

3.5.1. PBCP/GCE’nin Hazırlanması

Poli(bromkrezol moru) (PBCP) filminin GCE yüzeyi üzerine polimerizasyonu için elektrot yüzeyi; Bölüm 3.5.’te anlatıldığı şekilde temizlendikten sonra stabil bir voltamogram elde etmek amacıyla pH 5.6 FT çözeltisinin bulunduğu hücrede -0.4 ile +1.6 V arasında CV ile 20 döngü tarandı. Sonrasında Bölüm 3.4.6.1.’de anlatıldığı şekilde hazırlanan polimerizasyon çözeltisi içerisinde CV yöntemi kullanılarak -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında ve 100 mV s^{-1} tarama hızında 35 döngü alınarak PBCP filmi kaplanmış modifiye camısı karbon elektrot (PBCP/GCE) hazırlandı. Hazırlanan elektrot, yüzeyinin

kuruması için 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra yüzeyi aktifleştirmek için pH 5.6 FT çözeltisi içerisinde -0.4 ile +1.6 V potansiyelleri arasında 20 döngülü CV alındı. PBCP/GCE'yi hazırlamak için uygulanan bu elektrokimyasal polimerizasyon prosedürünün optimizasyon aşamaları Bölüm 3.6.1.1.'de detaylı olarak açıklanacaktır.

3.5.2. PBPB/GCE'nin Hazırlanması

Poli(bromfenol mavisi) (PBPB) filminin GCE yüzeyine polimerizasyonu için elektrot yüzeyi; Bölüm 3.5.'te anlatıldığı şekilde temizlendikten sonra stabil bir voltamogram elde etmek amacıyla pH 5.9 FT çözeltisinin bulunduğu hücrede -0.4 ile +1.4 V arasında CV ile 20 döngü tarandı. Sonrasında Bölüm 3.4.6.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan polimerizasyon çözeltisi içerisinde CV yöntemi kullanılarak -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında ve 100 mV s^{-1} tarama hızında 50 döngü alınarak PBPB filmi kaplanmış modifiye camı karbon elektrot (PBPB/GCE) hazırlandı. Hazırlanan elektrot, yüzeyinin kuruması için 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra yüzeyi aktifleştirmek için pH 5.9 FT çözeltisi içerisinde -0.4 ile +1.4 V potansiyelleri arasında 20 döngülü CV alındı. PBPB/GCE'yi hazırlamak için uygulanan bu elektrokimyasal polimerizasyon prosedürünün optimizasyon aşamaları Bölüm 3.6.1.2.'de detaylı olarak açıklanacaktır.

3.5.3. PBTB/GCE'nin Hazırlanması

Poli(bromtimol mavisi) (PBTB) filminin GCE yüzeyine polimerizasyonu için elektrot yüzeyi; Bölüm 3.5.'te anlatıldığı şekilde temizlendikten sonra stabil bir voltamogram elde etmek amacıyla pH 7.5 McT çözeltisinin bulunduğu hücrede -0.8 ile +1.8 V arasında CV ile 20 döngü tarandı. Sonrasında Bölüm 3.4.6.3.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan polimerizasyon çözeltisi içerisinde CV yöntemi kullanılarak -0.8 ile +1.8 V potansiyel aralığında ve 100 mV s^{-1} tarama hızında 18 döngü alınarak PBTB filmi kaplanmış modifiye camı karbon elektrot (PBTB/GCE) hazırlandı. Hazırlanan elektrot, yüzeyinin kuruması için 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra yüzeyi aktifleştirmek için pH 7.5 McT çözeltisi içerisinde -0.8 ile +1.8 V potansiyelleri arasında 20 döngülü CV alındı. PBTB/GCE'yi hazırlamak için uygulanan bu elektrokimyasal polimerizasyon prosedürünün optimizasyon aşamaları Bölüm 3.6.1.3.'te detaylı olarak açıklanacaktır.

3.6. Voltametrik Çalışmalar

3.6.1. Elektrokimyasal Polimerizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

3.6.1.1. BCP'nin Elektrokimyasal Polimerizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

BCP'nin elektrokimyasal polimerizasyonu için CV yöntemi kullanıldı. Polimerizasyon koşullarını optimize etmek için destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen iyon etkisi, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı gibi çeşitli parametreler değerlendirildi. Bunun için BCP monomerinin -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogramı alınarak PBCP filminin GCE yüzeyinde elektrosentezi gerçekleştirildi.

İlk olarak, BCP monomerinin GCE yüzeyinde elektrokimyasal polimerizasyonu FT (pH 5.5, 5.6, 5.7, 6.0, 7.0 ve 8.0), BRT (pH 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0), AT (pH 3.5, 4.5 ve 5.5), McT (pH 2.6, 3.5, 4.5, 5.5, 6.0, 6.5 ve 7.0) ve ST (pH 3.0, 4.0, 5.0, 5.5 ve 6.0) çözeltileri içerisinde 5.0×10⁻⁴ M'lık 10 mL çözeltileri hazırlanarak -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogram alınarak gerçekleştirildi. Böylece elektropolimerizasyon için en uygun tampon ortamı ve pH belirlendi.

Farklı iyonların polimer sentezi üzerindeki elektrokatalitik etkisini araştırmak amacıyla elektropolimerizasyon çözeltisi içerisine 0.05, 0.1 ve 0.2 M konsantrasyonlarda KCl, Na₂SO₄ ve NaNO₃ tuzları eklendi.

BCP'nin elektropolimerizasyonu için en uygun monomer derişimini belirlemek için 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.0 mM konsantrasyonlarda BCP monomeri içeren 10 mL'lik elektropolimerizasyon çözeltileri hazırlandı.

Tarama hızının polimerizasyon sürecine olan etkisini incelemek için; elektropolimerizasyon çözeltisi içerisinde 50 mV s⁻¹ ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında 50 döngülü voltamogram alındı.

Son olarak, elektropolimerizasyonun kaçınıcı döngüde sona erdiğini tespit etmek için, oluşan polimer pik akımındaki artışın ve monomer pik akımındaki azalmanın meydana geldiği döngü belirlendi.

Elektropolimerizasyondan sonra, PBCP/GCE ultra saf su ile yıkandı ve 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.6.1.2. BPB'nin Elektrokimyasal Polimerizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

BPB'nin elektrokimyasal polimerizasyonu için CV yöntemi kullanıldı. Polimerizasyon koşullarını optimize etmek için destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen iyon etkisi, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı gibi çeşitli parametreler değerlendirildi. Bunun için BPB monomerinin -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogramı alınarak PBPB filminin GCE yüzeyinde elektrosentezi gerçekleştirildi.

İlk olarak, BPB monomerinin GCE yüzeyinde elektrokimyasal polimerizasyonu, FT (pH 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 7.0 ve 8.0), BRT (pH 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0), AT (pH 3.5, 4.5 ve 5.5), McT (pH 2.6, 3.5, 4.5, 5.5, 6.0, 6.5 ve 7.0) ve ST (pH 3.0, 4.0, 5.0, 5.5 ve 6.0) çözeltileri içerisinde 5.0×10⁻⁴ M'lık 10 mL çözeltileri hazırlanarak -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogram alınarak gerçekleştirildi. Böylece elektropolimerizasyon için en uygun tampon ortamı ve pH belirlendi.

Farklı iyonların polimer sentezi üzerindeki elektrokatalitik etkisini araştırmak amacıyla elektropolimerizasyon çözeltisi içerisine 0.05, 0.1 ve 0.2 M konsantrasyonlarda KCl, Na₂SO₄ ve NaNO₃ tuzları eklendi.

BPB'nin elektropolimerizasyonu için en uygun monomer derişimini belirlemek için 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75 ve 2.0 mM konsantrasyonlarda BPB monomeri içeren 10 mL'lik elektropolimerizasyon çözeltileri hazırlandı.

Tarama hızının polimerizasyon sürecine olan etkisini incelemek için; elektropolimerizasyon çözeltisi içerisinde 50 mV s⁻¹ ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında 50 döngülü voltamogram alındı.

Son olarak, elektropolimerizasyonun kaçınıcı döngüde sona erdiğini tespit etmek için, oluşan polimer pik akımındaki artışın ve monomer pik akımındaki azalmanın meydana geldiği döngü belirlendi.

Elektropolimerizasyondan sonra, PBPB/GCE ultra saf su ile yıkandı ve 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.6.1.3. BTB'nin Elektrokimyasal Polimerizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

BTB'nin elektrokimyasal polimerizasyonu için CV yöntemi kullanıldı. Polimerizasyon koşullarını optimize etmek için destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen iyon etkisi, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı gibi çeşitli parametreler değerlendirildi. Bunun için BTB monomerinin -0.8 ile +1.8 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 30 döngülü voltamogramı alınarak PBTB filminin GCE yüzeyinde elektrosentezi gerçekleştirildi.

İlk olarak, BTB monomerinin GCE yüzeyinde elektrokimyasal polimerizasyonu, FT (pH 7.5, 7.7, 7.8 ve 8.0), BRT (pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 ve 11.0) ve McT (pH 7.5, 7.7, 7.8 ve 8.0) çözeltileri içerisinde 5.0×10⁻⁴ M'lık 10 mL çözeltileri hazırlanarak -0.8 V ile +1.8 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 30 döngülü voltamogram alınarak gerçekleştirildi. Böylece elektropolimerizasyon için en uygun tampon ortamı ve pH belirlendi.

Farklı iyonların polimer sentezi üzerindeki elektrokatalitik etkisini araştırmak amacıyla elektropolimerizasyon çözeltisi içerisine 0.05, 0.1 ve 0.2 M konsantrasyonlarda KCl, Na₂SO₄ ve NaNO₃ tuzları eklendi.

BTB'nin elektropolimerizasyonu için en uygun monomer derişimini belirlemek için 0.1, 0.25 ve 0.50 mM konsantrasyonlarda BTB monomeri içeren 10 mL'lik elektropolimerizasyon çözeltileri hazırlandı.

Tarama hızının polimerizasyon sürecine olan etkisini incelemek için; elektropolimerizasyon çözeltisi içerisinde 50 mV s⁻¹ ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında 30 döngülü voltamogram alındı.

Son olarak, elektropolimerizasyonun kaçınıcı döngüde sona erdiğini tespit etmek için, oluşan polimer pik akımındaki artışın ve monomer pik akımındaki azalmanın meydana geldiği döngü belirlendi.

Elektropolimerizasyondan sonra, PBTB/GCE ultra saf su ile yıkandı ve 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.6.2. PBCP, PBPB ve PBTB Filmlerin Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE'lerin, ayrıca elektropolimerizasyondan önceki ve elektropolimerizasyondan sonraki sonuçları

karşılaştırmak için yalın GCE'lerin, CV ve EIS yöntemleri kullanılarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Yalın ve polimer film modifiyeli elektrotların elektroaktif yüzey alanlarını tayin etmek için, 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemiyle 10 ile 300 mV s^{-1} arasında değişen tarama hızlarında voltamogramlar alındı. Bölüm 2.9.1.'de verilen Randles-Sevcik eşitliği (Eşitlik 3) kullanılarak her bir polimer filmi ile modifiye edilmiş elektrotların elektroaktif yüzey alanları hesaplandı.

Yalın ve polimer film modifiyeli elektrotların arayüzey özelliklerini belirlemek için EIS yöntemi kullanıldı. Bunun için, yalın ve polimer film modifiyeli GCE'ler ayrı ayrı olmak üzere Ag/AgCl referans ve Pt tel karşıt elektrotla birlikte 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ çözeltisi içerisine yerleştirildi ve 0.1 ile 10^5 Hz frekans aralığında oda sıcaklığında ($\sim 25^\circ\text{C}$) EIS ölçümleri alındı. Çizilen Nyquist eğrileri değerlendirilerek elektrot arayüzlerindeki R_{ct} değişiklikleri yorumlandı.

3.6.3. Melatoninin Elektrokimyasal Analiz Çalışmaları

3.6.3.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi

Melatoninin PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE ile elektrokimyasal analiz çalışmaları için ilk olarak CV, DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak en uygun tampon ortamı ve pH belirlendi. Bu amaçla üç elektrot için ayrı ayrı olmak üzere pH'ları 5.0 ve 5.5 olan AT, pH'ları 5.0, 5.5 ve 6.0 olan ST, 5.5–8.0 pH aralığındaki FT, 5.0–9.0 pH aralığındaki BRT ve 5.0–8.0 pH aralığındaki McT çözeltileri kullanıldı.

Melatonin konsantrasyonu 1.0×10^{-5} M olan çalışma çözeltileri, son hacim 5 mL olacak şekilde bu tampon çözeltiler ile seyreltilerek hazırlandı ve pH taraması çalışması için kullanıldı.

PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE kullanılarak yapılan melatoninin pH taraması çalışmaları CV için -0.3 ile +1.4 V, DPV ve SWV için 0.0 ile +1.2 V potansiyel tarama aralıklarında gerçekleştirildi. CV yöntemi için tarama hızı 100 mV s^{-1} olarak uygulandı.

Her bir elektrot için yüzey temizliği, elektropolimerizasyonda kullanılan ve melatonin içermeyen tampon çözeltinin bulunduğu hücrede CV yöntemi kullanılarak -0.3 ile +1.4 V arasında 100 mV s^{-1} tarama hızında beş döngülü tarama yapılarak gerçekleştirildi.

CV, DPV ve SWV yöntemleri ile elde edilen pH taraması sonuçlarına göre melatoninin en simetrik ve en yüksek pik akım değerlerinin elde edildiği tampon çözeltisi destek elektrolit olarak seçildi ve bundan sonraki çalışmalar seçilen tampon çözeltisi içerisinde gerçekleştirildi.

3.6.3.2. Tarama Hızı

Melatoninin PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE üzerindeki elektrokimyasal yükseltgenme sürecinin difüzyon kontrollü mü yoksa adsorpsiyon kontrollü mü olduğuna hız taraması çalışmaları sonucunda karar verildi. Bunun için, pH taraması çalışmaları sonucunda belirlenen tampon çözelti (PBCP/GCE için pH 8.0 FT, PBPB/GCE ve PBTB/GCE için pH 8.0 BRT) ortamlarında 1.0×10^{-5} M'lık melatoninin çalışma çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiler, CV yöntemi kullanılarak -0.3 ile +1.3 V potansiyel aralığında 250 ile 50 mV s⁻¹ arasındaki tarama hızlarında tek döngü ile tarandı. Çalışılan tarama hızlarında elde edilen pik akım değerleri okundu ve her bir elektrot için hem tarama hızına karşı hem de tarama hızının kareköküne karşı pik akımı grafikleri ve ayrıca tarama hızının logaritmasına karşı pik potansiyeli grafiği çizildi.

3.6.3.3. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu

Melatoninin PBTB/GCE ile gerçekleştirilen kantitatif analiz çalışmaları için öncelikle sıyırma parametreleri optimize edildi. pH taramasında seçilen tampon çözelti kullanılarak melatoninin çalışma çözeltisi hazırlandı ve ilk olarak 60 s biriktirme süresi ve 100 rpm karıştırma hızı sabit tutularak DPSV ve SWSV yöntemleri için biriktirme potansiyeli 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 ve 1.0 V olarak değiştirildi. En yüksek pik akımına sahip en simetrik melatonin pikinin elde edildiği biriktirme potansiyeli iki yöntem için de ayrı ayrı olarak belirlendi. Ardından, belirlenen biriktirme potansiyelleri ve 100 rpm karıştırma hızı sabit tutularak biriktirme süreleri her bir yöntem için 15, 30, 60, 90, 120, 180, 200, 240, 300 ve 400 s olarak değiştirildi. Böylece, DPSV ve SWSV için en yüksek pik akım değerine sahip en simetrik melatonin pikinin elde edildiği biriktirme süreleri belirlendi. Son olarak, biriktirme süresini azaltmak için karıştırma hızı 100, 250, 500 ve 750 rpm olarak ayarlandı. Ölçülen piklerin değerlendirilmesi ile optimum karıştırma hızları belirlendi.

3.6.3.4. Kalibrasyon Çalışması

Melatoninin, PBCP/GCE ve PBPB/GCE ile gerçekleştirilen kantitatif analiz çalışmaları için DPV ve SWV yöntemleri, PBTB/GCE ile gerçekleştirilen kantitatif analiz

çalışmaları için ise DPSV ve SWSV yöntemleri kullanıldı. Potansiyel tarama aralığı tüm yöntemler için +0.1 ile +0.9 V aralığında idi. Her bir voltametrik analiz öncesinde elektrot yüzeyinin temizliği için melatonin içermeyen tampon çözeltinin bulunduğu hücrede CV yöntemi kullanılarak -0.2 ile +1.4 V arasında 100 mV s^{-1} tarama hızında beş döngü ile tarama yapıldı.

Yöntemlerin operasyonel parametreleri DPV ve DPSV için; 3 mV puls potansiyeli, 50 mV modülasyon genliği, 50 ms modülasyon zamanı ve 200 ms aralık zamanı olarak ve SWV ve SWSV için; 5 mV puls potansiyeli, 35 mV puls genliği ve 10 Hz frekans olarak uygulandı.

Çalışmanın güvenilirliğini artırmak amacıyla çözeltiler analitik hassasiyette hazırlandı. Bunun için, öncelikle $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ melatonin ana stok çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 1000 μL alınıp hacminin ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ 'lık birinci ara stok çözeltisi hazırlandı. Birinci ara stok çözeltiden 1000 μL alınıp hacminin ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 'lık ikinci ara stok çözeltisi, ikinci ara stok çözeltiden 1000 μL alınıp hacminin ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 'lık üçüncü ara stok çözeltisi ve son olarak da üçüncü ara stok çözeltiden 1000 μL alınıp hacminin ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ 'lık dördüncü ara stok çözeltisi hazırlandı. Voltametrik analizlerde kullanılan melatonin çalışma çözeltilerini hazırlamak için uygun stok çözeltiden belirlenen hacimde alındı ve her bir elektrot için seçilen destek elektrolit ile seyreltildi. Buna göre, $1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ konsantrasyondaki melatonin çalışma çözeltisi $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ 'lık dördüncü ara stok çözeltiden, 2.0×10^{-8} – $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ konsantrasyondaki melatonin çalışma çözeltileri $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 'lık üçüncü ara stok çözeltiden, 2.0×10^{-7} – $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ konsantrasyondaki melatonin çalışma çözeltileri $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 'lık ikinci ara stok çözeltiden, 2.0×10^{-6} – $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyondaki melatonin çalışma çözeltileri $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ 'lık birinci ara stok çözeltiden ve 2.0×10^{-5} – $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ konsantrasyondaki melatonin çalışma çözeltileri $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ 'lık ana stok çözeltiden hazırlandı.

Üç farklı elektrotun her biri için kullanılan voltametrik yöntemlerin voltamogramlarından elde edilen pik akım değerleri melatonin konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi ve regresyon analizi yapılarak kalibrasyon çalışması tamamlandı. Bölüm 2.12'de belirtildiği şekilde kalibrasyon verileri kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

3.6.3.5. Tekrar Edilebilirlik Çalışması

Melatoninin elektrokimyasal analizi için geliştirilen yöntemlerin kesinliğinin belirlenmesi amacıyla gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı.

PBCP/GCE ve PBPB/GCE ile gerçekleştirilen tekrar edilebilirlik çalışmalarında DPV ve SWV yöntemleri, PBTB/GCE ile gerçekleştirilen tekrar edilebilirlik çalışmalarında ise DPSV ve SWSV yöntemleri kullanıldı. Buna göre, PBCP/GCE ile pH 8.0 FT içerisinde DPV ve SWV için sırasıyla 6.0×10^{-6} M ve 6.0×10^{-5} M, PBPB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisinde DPV ve SWV için 6.0×10^{-6} M ve PBTB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisinde DPSV ve SWSV için sırasıyla 6.0×10^{-7} M ve 2.0×10^{-6} M melatonin içeren çalışma çözeltilerinden, her birinden üçer adet olacak şekilde hazırlandı.

Seçilen konsantrasyonlarda hazırlanan çalışma çözeltileri her yöntem ve her elektrot için ayrı ayrı olacak şekilde, gün içi tekrar edilebilirlik çalışmaları için aynı gün içerisinde okunan pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinden seçilen beş ölçümün ortalaması alınarak ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışması için ise bir hafta içerisinde farklı günlerde elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinden seçilen beş ölçümün ortalaması alınarak standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri hesaplandı.

3.6.3.6. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin Çalışması

Melatoninin farmasötik dozaj formundan tayini çalışmaları, PBCP/GCE ve PBPB/GCE için DPV ve SWV yöntemleri ile ve PBTB/GCE için ise DPSV ve SWSV yöntemleri ile gerçekleştirildi. Bunun için, bir tablette 3 mg melatonin içeren Ocean Melatonin® tablet kullanıldı. 1.0×10^{-3} M'lık tablet ana stok çözeltisi Bölüm 3.4.4.'te açıklandığı şekilde hazırlandı. Analitik hassasiyette farmasötik çalışma çözeltileri hazırlamak için 1.0×10^{-3} M'lık tablet ana stok çözeltisi kullanılarak 1.0×10^{-4} M'lık birinci ara stok ve 1.0×10^{-5} M'lık ikinci ara stok çözeltileri Bölüm 3.6.3.4'te anlatıldığı şekilde hazırlandı. Hazırlanan tablet ana veya ara stok çözeltileri kullanılarak PBCP/GCE ile pH 8.0 FT içerisinde DPV ve SWV için sırasıyla 6.0×10^{-6} M ve 6.0×10^{-5} M, PBPB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisinde DPV ve SWV için 6.0×10^{-6} M ve PBTB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisinde DPSV ve SWSV için sırasıyla 6.0×10^{-7} M ve 2.0×10^{-6} M melatonin içeren farmasötik çalışma çözeltileri, her birinden üçer adet olacak şekilde hazırlandı. Üç farklı elektrotun her biri için kullanılan voltametrik yöntemlerin voltamogramlarından elde edilen pik akım değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve yüzde bağıl standart sapmaları seçilen beş değer üzerinden hesaplandı.

3.6.3.7. Geri Kazanım Çalışması

Melatoninin elektrokimyasal analizi için geliştirilen yöntemlerin doğruluğu geri kazanım çalışmaları ile gösterildi. PBCP/GCE ve PBPB/GCE ile gerçekleştirilen geri kazanım çalışmaları DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak, PBTB/GCE ile gerçekleştirilen geri kazanım çalışmaları ise DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak yapıldı.

PBCP/GCE ile DPV için melatoninin 6.0×10^{-6} M'lık farmasötik çalışma çözeltisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-6} M ve SWV için melatoninin 6.0×10^{-5} M'lık farmasötik çalışma çözeltisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-5} M olacak şekilde, PBPB/GCE ile DPV ve SWV için melatoninin 6.0×10^{-6} M'lık farmasötik çalışma çözeltisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-6} M olacak şekilde ve PBTB/GCE ile DPSV için melatoninin 6.0×10^{-7} M'lık farmasötik çalışma çözeltisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-7} M ve SWSV için melatoninin 2.0×10^{-6} M'lık farmasötik çalışma çözeltisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-6} M olacak şekilde bilinen miktarda ilave edilerek pH taraması sonucunda seçilen tampon çözeltiyle hacmi 5 mL'ye tamamlandı. Her bir elektrot ve yöntem için aynı çalışma çözeltisinden üçer adet hazırlandı. Üç farklı elektrotun her biri için kullanılan voltametrik yöntemlerin voltamogramlarından elde edilen pik akımlarının ortalamaları ve yüzde bağıl standart sapmaları elde edilen beş değer üzerinden hesaplandı. Geri kazanım değerleri yüzde geri kazanım olarak verildi.

3.6.3.8. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması

Biyolojik sıvılardan tayin çalışması serum ve yapay idrar örnekleri kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6.3.8.1. Serum Örneklerinden Tayin Çalışması

Serum örnekleri ile ilk olarak kalibrasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar yapılırken saf melatonin için gerçekleştirilen kalibrasyon çalışmalarında elde edilen doğrusal aralıklar göz önünde bulundurularak düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru artan bir şekilde serum çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çalışma çözeltileri, Bölüm 3.4.5.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan melatoninin serum stok çözeltileri kullanılarak Bölüm 3.6.3.4.'teki gibi hazırlandı. PBCP/GCE ve PBPB/GCE için DPV ve SWV yöntemlerinden ve PBTB/GCE için DPSV ve SWSV yöntemlerinden elde edilen voltamogramlardan okunan melatoninin pik akım değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi ve serum çözeltileri için kalibrasyon grafikleri çizilerek regresyon analizleri yapıldı.

Kalibrasyon çalışması tamamlandıktan sonra gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları için PBCP/GCE ile pH 8.0 FT içerisinde DPV ve SWV için sırasıyla 4.0×10^{-6} M ve 6.0×10^{-6} M, PBPB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisinde DPV ve SWV için 6.0×10^{-6} M ve PBTB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisinde DPSV ve SWSV için 2.0×10^{-7} M melatonin içeren serum çalışma çözeltilerinden her birinden üçer adet olacak şekilde hazırlandı. Her bir elektrot için ayrı ayrı olacak şekilde, gün içi tekrar edilebilirlik çalışmaları için aynı gün içerisinde okunan pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinden seçilen beş ölçümün ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışması için ise bir hafta içerisinde farklı günlerde elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinden seçilen beş ölçümün ortalaması alınarak standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri hesaplandı.

Geri kazanım çalışmaları için, PBCP/GCE ile DPV için melatoninin 4.0×10^{-6} M'lık serum çalışma çözeltilisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-6} M ve SWV için melatoninin 6.0×10^{-6} M'lık serum çalışma çözeltilisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-6} M olacak şekilde, PBPB/GCE ile DPV ve SWV için melatoninin 6.0×10^{-6} M'lık serum çalışma çözeltilisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-6} M olacak şekilde ve PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV için melatoninin 2.0×10^{-7} M'lık serum çalışma çözeltilisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-7} M olacak şekilde, bilinen miktarda ilave edilerek pH taraması sonucunda seçilen tampon çözeltilerle hacmi 5 mL'ye tamamlandı. Her bir elektrot ve yöntem için aynı çalışma çözeltilisinden üçer adet hazırlandı. Üç farklı elektrotun her biri için kullanılan voltametrik yöntemlerin voltamogramlarından elde edilen pik akım değerlerinin ortalamaları ve yüzde bağıl standart sapmaları elde edilen beş değer kullanılarak hesaplandı. Geri kazanım değerleri yüzde geri kazanım olarak verildi.

3.6.3.8.2. Yapay İdrar Örneklerinden Tayin Çalışması

Yapay idrar örnekleri ile ilk olarak kalibrasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar yapılırken saf melatonin için gerçekleştirilen kalibrasyon çalışmalarında elde edilen doğrusal aralıklar göz önünde bulundurularak düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru artan bir şekilde yapay idrar çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çalışma çözeltileri, Bölüm 3.4.5'te anlatıldığı şekilde hazırlanan melatoninin yapay idrar stok çözeltileri kullanılarak Bölüm 3.6.3.4.'teki gibi hazırlandı. PBCP/GCE ve PBPB/GCE için DPV ve SWV yöntemlerinden ve PBTB/GCE için DPSV ve SWSV yöntemlerinden elde edilen voltamogramlardan okunan melatoninin pik akım değerleri konsantrasyona karşı

grafiğe geçirildi ve serum çözeltileri için kalibrasyon grafikleri çizilerek regresyon analizleri yapıldı.

Kalibrasyon çalışması tamamlandıktan sonra gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları için PBGP/GCE ile pH 8.0 FT içerisinde DPV ve SWV için 8.0×10^{-7} M, PBPB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisinde DPV ve SWV için sırasıyla 8.0×10^{-7} M ve 1.0×10^{-6} M ve PBTB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisinde DPSV ve SWSV için 2.0×10^{-7} M melatonin içeren yapay idrar çalışma çözeltilerinden, her birinden üçer adet olacak şekilde hazırlandı. Her bir elektrot için ayrı ayrı olacak şekilde, gün içi tekrar edilebilirlik çalışmaları için aynı gün içerisinde okunan pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinden seçilen beş ölçümün ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışması için ise bir hafta içerisinde farklı günlerde elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinden seçilen beş ölçümün ortalaması alınarak standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri hesaplandı.

Geri kazanım çalışmaları için, PBGP/GCE ile DPV ve SWV için melatoninin 8.0×10^{-7} M'lık yapay idrar çalışma çözeltilisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-7} M olacak şekilde, PBPB/GCE ile DPV için melatoninin 8.0×10^{-7} M'lık yapay idrar çalışma çözeltilisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-7} M ve SWV için melatoninin 1.0×10^{-6} M'lık yapay idrar çalışma çözeltilisine saf melatonin stok çözeltisinden 1.0×10^{-6} M olacak şekilde ve PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV için melatoninin 2.0×10^{-7} M'lık yapay idrar çalışma çözeltilisine saf melatonin stok çözeltisinden 2.0×10^{-7} M olacak şekilde, bilinen miktarda ilave edilerek pH taraması sonucunda seçilen tampon çözeltilerle hacmi 5 mL'ye tamamlandı. Her bir elektrot ve yöntem için aynı çalışma çözeltisinden üçer adet hazırlandı. Üç farklı elektrotun her biri için kullanılan voltametrik yöntemlerin voltamogramlarından elde edilen pik akım değerlerinin ortalamaları ve yüzde bağıl standart sapmaları beş değer üzerinden hesaplandı. Geri kazanım değerleri ise yüzde geri kazanım olarak verildi.

3.6.3.9. Girişim Çalışması

Melatoninin elektrokimyasal analizi için geliştirilen yöntemlerin seçiciliğini göstermek amacıyla PBGP/GCE ve PBPB/GCE için DPV ve PBTB/GCE için DPSV yöntemleri kullanılarak girişim çalışmaları gerçekleştirildi. PBGP/GCE ve PBPB/GCE için, 3 μ M melatonine 80 μ M askorbik asit ve 8 μ M ürik asit endojen maddeleri ve PBTB/GCE için 0.3 μ M melatonine 80 μ M askorbik asit ve 8 μ M ürik asit endojen maddeleri eklenerek her bir elektrot için seçilen tampon çözelti ile hacim 5 mL'ye tamamlandı. Yine PBGP/GCE ve PBPB/GCE için 4 μ M melatonine 400 μ M olacak şekilde ve PBTB/GCE için 0.4 μ M

melatonine 40 μM olacak şekilde Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , NO_3^- ve SO_4^{-2} iyonları eklenerek her bir elektrot için seçilen tampon çözelti ile hacim 5 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltilerinden elde edilen voltamogramlarda melatoninin pik akımındaki değişim değerlendirildi.

3.6.3.10. Stabilité Çalışması

Hazırlanan polimer modifiyeli elektrotların kararlılığını değerlendirmek amacıyla PBCP/GCE ve PBPB/GCE için CV ve DPV yöntemleri ile ve PBTB/GCE için CV ve DPSV yöntemleri ile hem operasyonel hem de zamana karşı stabilité çalışması yapıldı. Operasyonel stabilité için her bir elektrot için seçilen tampon çözelti içerisinde hazırlanmış 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çalışma çözeltisi içerisinde CV yöntemi ile 100 döngülü voltamogram alındı. Tekrarlı döngüler sonucunda elde edilen melatonin pik akım değerindeki değişim üzerinden elektrotların stabilitesi değerlendirildi.

Elektrotların zamana karşı stabilitesini değerlendirmek için karanlıkta muhafaza edilen PBCP/GCE ve PBPB/GCE için DPV yöntemi kullanılarak seçilen tampon çözelti içerisinde hazırlanmış 4.0×10^{-6} M ve PBTB/GCE için DPSV yöntemi kullanılarak seçilen tampon çözelti içerisinde hazırlanmış 4.0×10^{-7} M melatonin içeren çalışma çözeltisinden gün aşırı ölçümler alındı. Bu süre boyunca melatoninin pik akımındaki değişimler üzerinden elektrotların stabil kalma süreleri değerlendirildi.

3.6.3.11. Yeniden Üretilirlik Çalışması

Hazırlanan polimer modifiyeli elektrotların yeniden üretilebilirliği, farklı günlerde birbirinden bağımsız olarak hazırlanan beşer adet PBCP/GCE ve PBPB/GCE için DPV yöntemi ile ve PBTB/GCE için DPSV yöntemi ile saptandı. PBCP/GCE ve PBPB/GCE için seçilen tampon çözelti içerisinde hazırlanmış 6.0×10^{-6} M ve PBTB/GCE için seçilen tampon içerisinde hazırlanmış 4.0×10^{-7} M melatonin içeren çalışma çözeltilerinden, hazırlanan elektrotlar ile elde edilen voltamogramlardan melatoninin pik akımı okunarak yüzde bağıl standart sapma değerleri hesaplandı.

4. BULGULAR

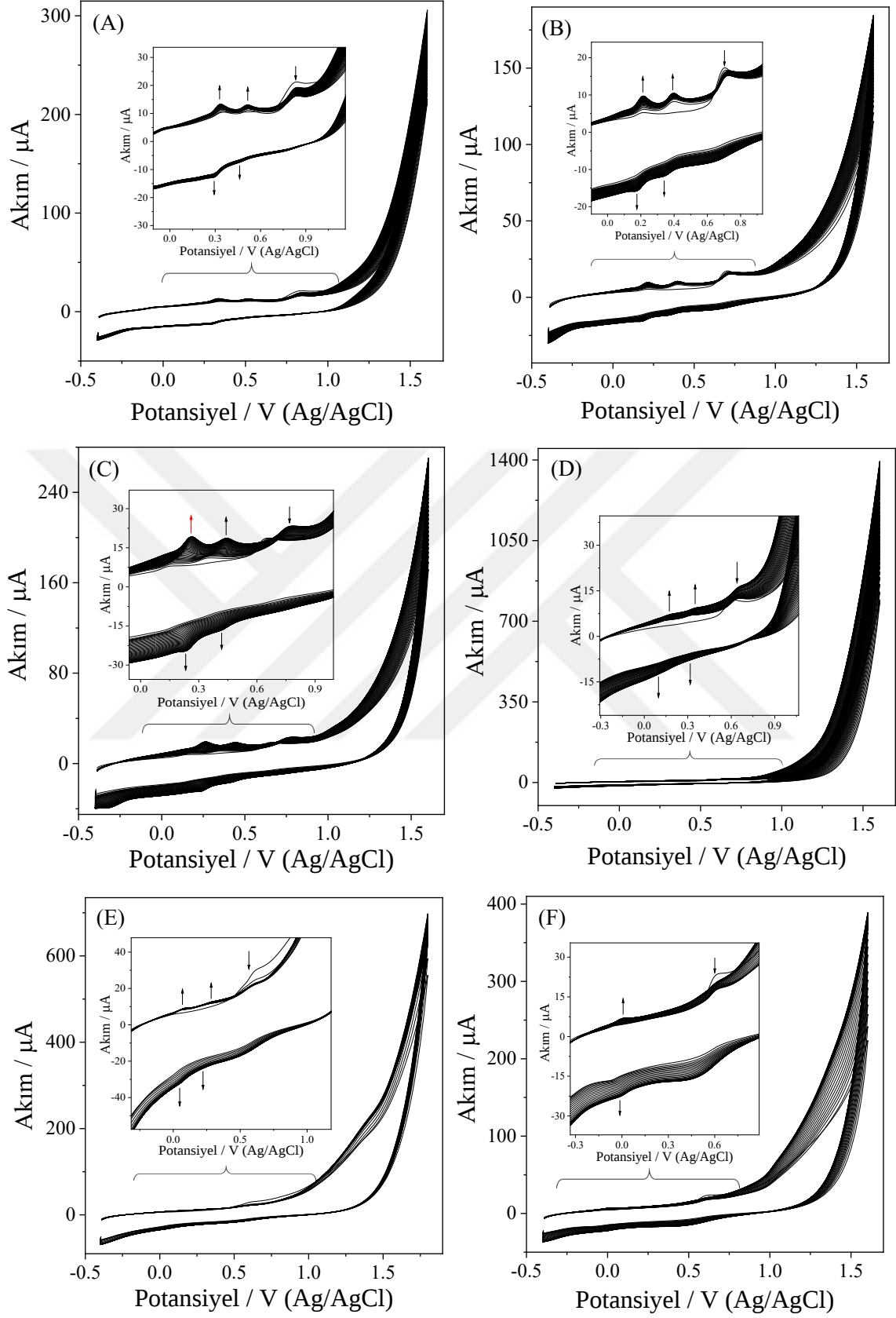
4.1. PBCP/GCE ile Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Poli(Bromkrezol Moru) Filminin Sentezi

PBCP filmi GCE yüzeyi üzerine CV yöntemi ile elektrokimyasal olarak sentezlenerek PBCP/GCE hazırlandı. En hızlı ve kontrollü elektropolimerizasyon için öncelikle sentez sırasında kullanılan koşullar optimize edildi. Bu amaçla, destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen farklı iyonların etkisi, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı gibi çeşitli parametreler incelendi.

4.1.1.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi

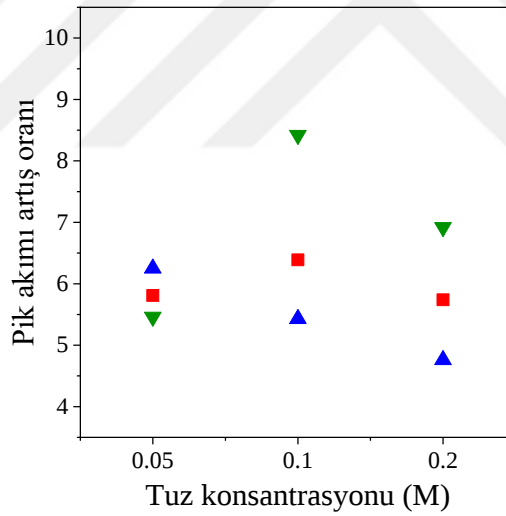
Destek elektrolitin türü ve pH'sı polimer filmin sentezinde önemli bir etkiye sahip olduğundan öncelikle bu parametreler optimize edildi. Bunun için, pH 5.5–8.0 FT, pH 5.0–9.0 BRT, pH 2.6–7.0 McT, pH 3.0–6.0 ST ve pH 3.5, 4.5 ve 5.5 AT içerisinde 10 mL 0.50 mM BCP çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak, literatürde boyar maddelerin elektropolimerizasyonunda sıklıkla tercih edilen parametreler seçildi ve böylece -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogram alınarak GCE yüzeyinde PBCP filminin sentezi gerçekleştirildi. Şekil 10'da farklı tamponlar içerisindeki 0.50 mM BCP içeren çözeltilerden elde edilen 50 döngülü elektropolimerizasyon voltamogramları verilmiştir. Buna göre, voltamogramlarda en pozitif potansiyelde bulunan ve her döngüde akım değeri azalan tersinmez yükseltgenme pikinin BCP monomerine ve monomere ait pikin solunda daha negatif potansiyelde bulunan ve her döngüde akım değeri artan yükseltgenme/indirgenme piklerinin ise PBCP'ye ait olduğuna karar verildi. Piklere karar verildikten sonra polimer pik akımlarının her bir döngüdeki artış oranları belirlenerek en yüksek artışın meydana geldiği ortam tespit edildi. Artış oranları, tüm polimer optimizasyonu çalışmaları için, polimere ait daha negatif potansiyeldeki yükseltgenme pikinin son döngüde ölçülen pik akımının, ikinci döngüde ölçülen pik akımına oranı alınarak hesaplandı. Örneğin pH 5.6 FT için bu hesaplama, +0.19 V'de görülen (Şekil 10C, kırmızı ok ile işaretlenmiş) polimere ait yükseltgenme piki üzerinden yapıldı. Bu değerlendirmelere göre, tüm tampon çözeltiler arasında, PBCP redoks piklerinin 50. döngüdeki artış oranının en yüksek olduğu en kontrollü ve en yüksek PBCP film oluşumu pH 5.6 FT içerisinde hazırlanmış olan polimerizasyon çözeltisi ile elde edildi.



Şekil 10. (A) pH 2.6 McT, (B) pH 4.5 AT, (C) pH 5.6 FT, (D) pH 6.0 ST, (E) pH 8.0 FT ve (F) pH 9.0 BRT içerisindeki 0.50 mM BCP'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1} , döngü sayısı 50

4.1.1.2. İyonların Etkisi

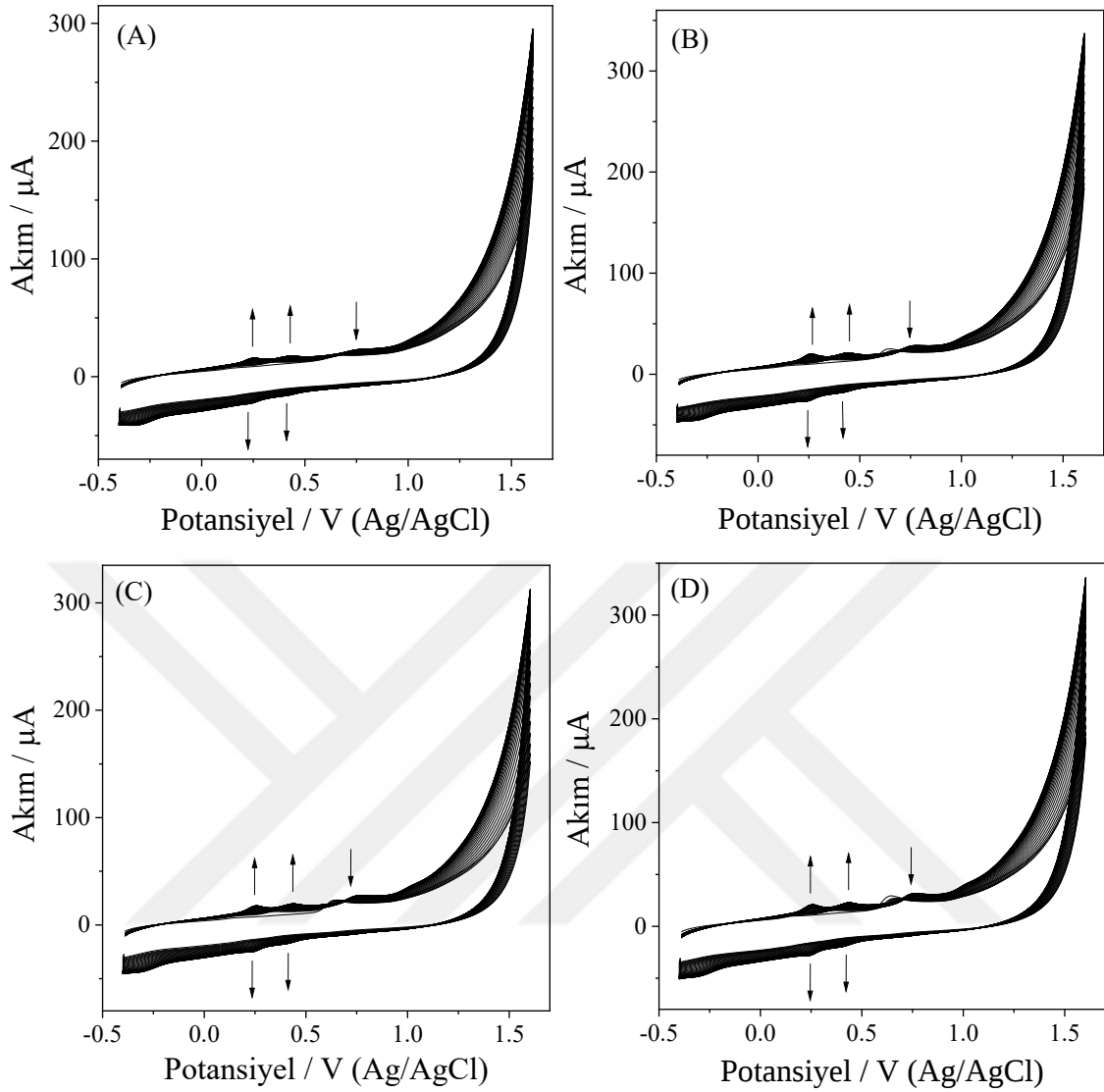
Elektropolimerizasyon çözeltisine ilave edilen iyonların bu çalışmadaki polimer filmlerin polimerizasyonu üzerinde herhangi bir elektrokatalitik etkiye sahip olup olmadığını araştırmak amacıyla, elektropolimerizasyon çözeltisi içerisine farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.1 ve 0.2 M) KCl, Na₂SO₄ ve NaNO₃ tuzları eklendi. CV ile -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogram alındı. Buna göre, 0.1 M NO₃⁻ iyonları içeren polimerizasyon çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen elektropolimerizasyonda, polimer pik akımı artış oranının en yüksek olduğu ve NO₃⁻ iyonları eklendikten sonra pik akımı artış oranının 1.51 kat arttığı gözlemlendi. İlave edilen diğer iyonların varlığında polimer pik akımı artış oranları NO₃⁻ ile elde edilene göre daha düşük kaldı (Şekil 11). Bu nedenle, BCP'nin elektropolimerizasyonunda destek elektrolit olarak 0.1 M NaNO₃ içeren pH 5.6 FT çözeltisinin kullanılmasına karar verildi.



Şekil 11. pH 5.6 FT içerisine ilave edilen tuzların PBCP pik akımı artış oranına etkisi.
▼: NaNO₃, ■: Na₂SO₄, ▲: KCl

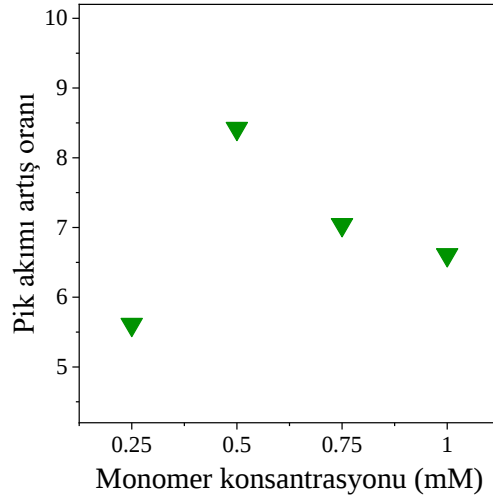
4.1.1.3. Monomer Derişimi

Monomer derişiminin elektropolimerizasyona etkisi de ayrıca incelendi. Bu amaçla 0.1 M NaNO₃ içeren pH 5.6 FT çözeltisi içerisine 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.0 mM konsantrasyonlarda BCP monomeri eklendi ve CV yöntemi ile -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogram alındı (Şekil 12).



Şekil 12. 0.1 M NaNO₃ içeren pH 5.6 FT içerisindeki (A) 0.25 mM, (B) 0.50 mM, (C) 0.75 mM ve (D) 1.0 mM BCP'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s⁻¹, döngü sayısı 50

Elektropolimerizasyon sonucunda elde edilen verilerden, PBCP redoks piklerinin pik akımı artış oranları 0.25 mM için 5.61 kat, 0.50 mM için 8.42 kat, 0.75 mM için 7.04 kat ve 1.0 mM için 6.61 kat olarak hesaplandı (Şekil 13). Buna göre, en yüksek pik akımı artış oranına sahip, en kontrollü ve iyi tanımlanmış PBCP piklerinin 0.50 mM BCP monomeri içeren pH 5.6 FT + 0.1 M NaNO₃ çözeltisi içerisinde elde edildiği görüldü (Şekil 12B). 0.50 mM'den daha düşük ve daha yüksek monomer derişimlerdeki pik akımı artış oranları 0.50 mM'ye kıyasla düşük kaldı. Bu nedenle, polimerizasyon için optimum monomer derişiminin 0.50 mM olduğuna karar verildi.



Şekil 13. pH 5.6 FT + 0.1 M NaNO₃ içerisindeki elektropolimerizasyonda BCP monomer derişiminin PBCP pik akımı artış oranına etkisi

4.1.1.4. Tarama Hızı

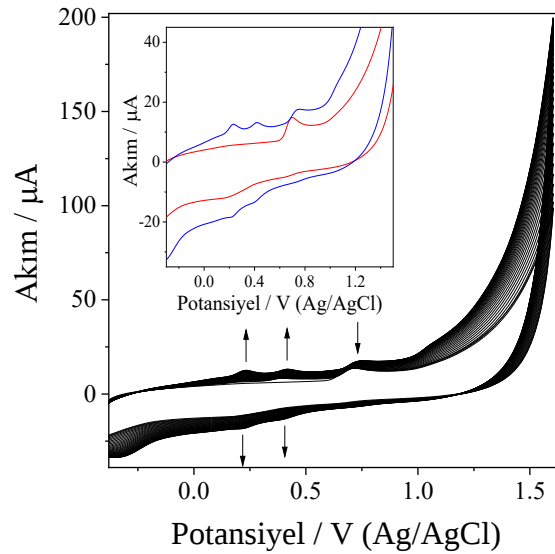
Tarama hızının elektropolimerizasyon sürecine olan etkisini incelemek için 0.50 mM BCP içeren pH 5.6 FT + 0.1 M NaNO₃ çözeltisinde CV yöntemi ile -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında 50 mV s⁻¹ ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 50 döngülü voltamogram alındı. Buna göre, 50 ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında polimerin pik akımı artış oranları sırasıyla 4.14 kat ve 8.42 kat olarak belirlendi. Tarama hızı 50 mV s⁻¹ olarak tutulduğunda polimer pik akımının önemli ölçüde azalması nedeniyle elektropolimerizasyon için optimum tarama hızı 100 mV s⁻¹ olarak seçildi.

4.1.1.5. Döngü Sayısı

Polimerizasyonun sona erdiği döngü sayısını belirlemek için CV yöntemi ile 0.50 mM BCP içeren pH 5.6 FT + 0.1 M NaNO₃ çözeltisinde -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 50 döngülü voltamogram alındı ve polimer piklerinin akımındaki artış oranları her döngüden sonra hesaplandı. Buna göre, optimize edilen koşullar altında polimer pik akımındaki artış ve monomer pik akımındaki azalmanın 36. döngüye kadar düzenli olarak devam ettiği ve sonrasında aynı kaldığı görüldü. Bu nedenle, PBCP filminin GCE yüzeyi üzerine elektropolimerizasyon süreci 35. döngüde sonlandırıldı.

4.1.1.6. Optimize Edilmiş Koşullarda PBCP/GCE'nin Hazırlanması

Destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen iyon, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı optimize edildikten sonra BCP'nin GCE yüzeyi üzerine elektropolimerizasyonunun en kontrollü şekilde, 0.50 mM monomer içeren pH 5.6 FT + 0.1 M NaNO₃ çözeltisinde -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 35 döngülü CV ile elde edildiğine karar verildi. Şekil 14, bu koşullar altında yapılan BCP elektropolimerizasyonunun voltamogramını göstermektedir. Şekil 14'te ekli küçük şekilde görüldüğü gibi, elektrokimyasal polimerizasyon süreci monomerin +0.69 V'deki (Şekil 14-ekli şekil, kırmızı renkli 1. döngü) tersinmez yükseltgenme piki ile başladı. Bu döngüde herhangi bir polimer piki görülmedi. Monomere ait olan bu anodik pikin akım değeri, artan döngü sayısı ile birlikte düzenli olarak azaldı. İkinci döngüden itibaren, monomer pikinin sol tarafında +0.19 V civarında bir yükseltgenme/indirgenme çifti ve +0.35 V civarında ise ikinci bir yükseltgenme/indirgenme çifti gözlemlendi (Şekil 14-ekli şekil, mavi renkli 35. döngü). Polimerin yükseltgenme/indirgenme sürecine karşılık gelen bu iki redoks çiftinin pik akımları 36. döngüye kadar her döngüde düzenli olarak arttı ve pik potansiyelleri daha pozitif yöne doğru kaydı.



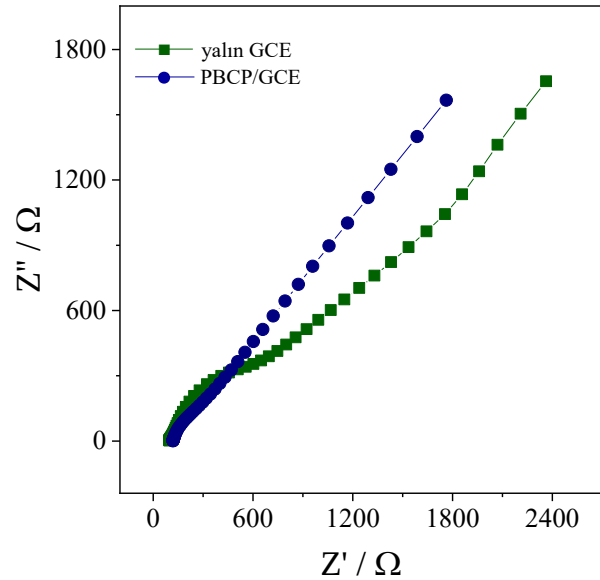
Şekil 14. PBCP/GCE hazırlamak için 0.1 M NaNO₃ içeren pH 5.6 FT içerisindeki 0.50 mM BCP'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s⁻¹, döngü sayısı 35. Ekli şekil: 1. döngü (kırmızı) ve 35. döngü (mavi)

4.1.2. PBCP/GCE'nin Karakterizasyonu

Bölüm 4.1.1.6.'ya göre hazırlanan PBCP/GCE ve yalın GCE'nin karakterizasyonu CV ve EIS yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Yalın ve polimer film modifiyeli elektrotların elektroaktif yüzey alanları, 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ çözeltisinde, tarama hızı 10 ile 300 mV s^{-1} arasında değiştirilerek tek döngülü CV yöntemiyle incelendi. Hesaplamalar, Bölüm 2.9.1.'de verilen Eşitlik 3'teki Randles-Sevcik eşitliği kullanılarak yapıldı. Buna göre, yalın GCE ve PBCP/GCE'nin elektroaktif yüzey alanları sırasıyla 0.0705 cm^2 ve 0.1402 cm^2 olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuç PBCP filmi ile kaplanan GCE'nin elektroaktif yüzey alanının yalın GCE'ye göre 1.99 kat arttığını gösterdi.

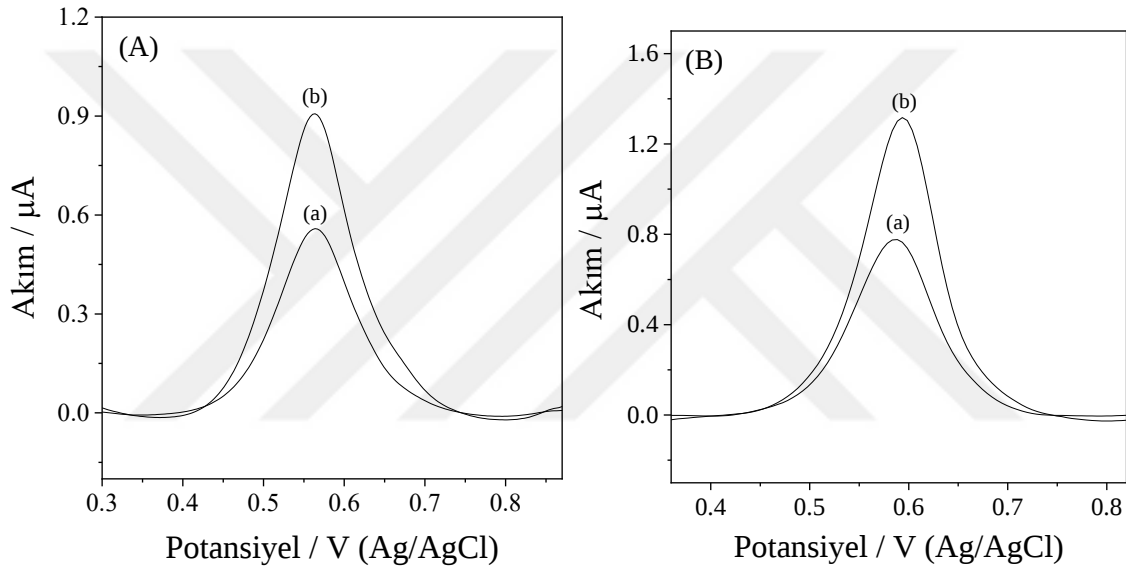
Yalın ve polimer modifiyeli elektrotların arayüzey özellikleri, 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ çözeltisinde EIS yöntemi ile incelendi ve Nyquist grafikleri elde edildi. Şekil 15'te hem PBCP/GCE hem de yalın GCE için +0.25 V potansiyelde elde edilen Nyquist grafikleri görülmektedir. Yalın GCE ve PBCP/GCE'nin +0.25 V'deki yarı dairelerinden elde edilen R_{ct} değerleri, Nyquist grafikleri uygun devre ile modellendikten sonra sırasıyla 894.1 Ω ve 189.9 Ω olarak bulundu.



Şekil 15. 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ çözeltisinde kaydedilen yalın GCE ve PBCP/GCE'nin Nyquist eğrileri. Frekans aralığı: 0.1–10⁵ Hz. Uygulanan potansiyel: +0.25 V. Genlik: 0.01 V

4.1.3. PBCP/GCE ile Melatoninin Elektrokimyasal Analizi

Melatoninin elektrokimyasal analiz çalışması için yalnız GCE ve PBCP/GCE kullanılarak DPV ve SWV yöntemleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Bu amaçla, pH 8.0 FT içerisinde DPV yöntemi için 8.0×10^{-6} M ve SWV yöntemi için ise 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çalışma çözeltileri kullanılarak diferansiyel puls ve kare dalga voltamogramları elde edildi (Şekil 16). PBCP/GCE ile elde edilen melatonin pik akım değeri, yalnız GCE'den DPV için yaklaşık 1.52 kat, SWV için ise yaklaşık 1.55 kat daha yüksekti.

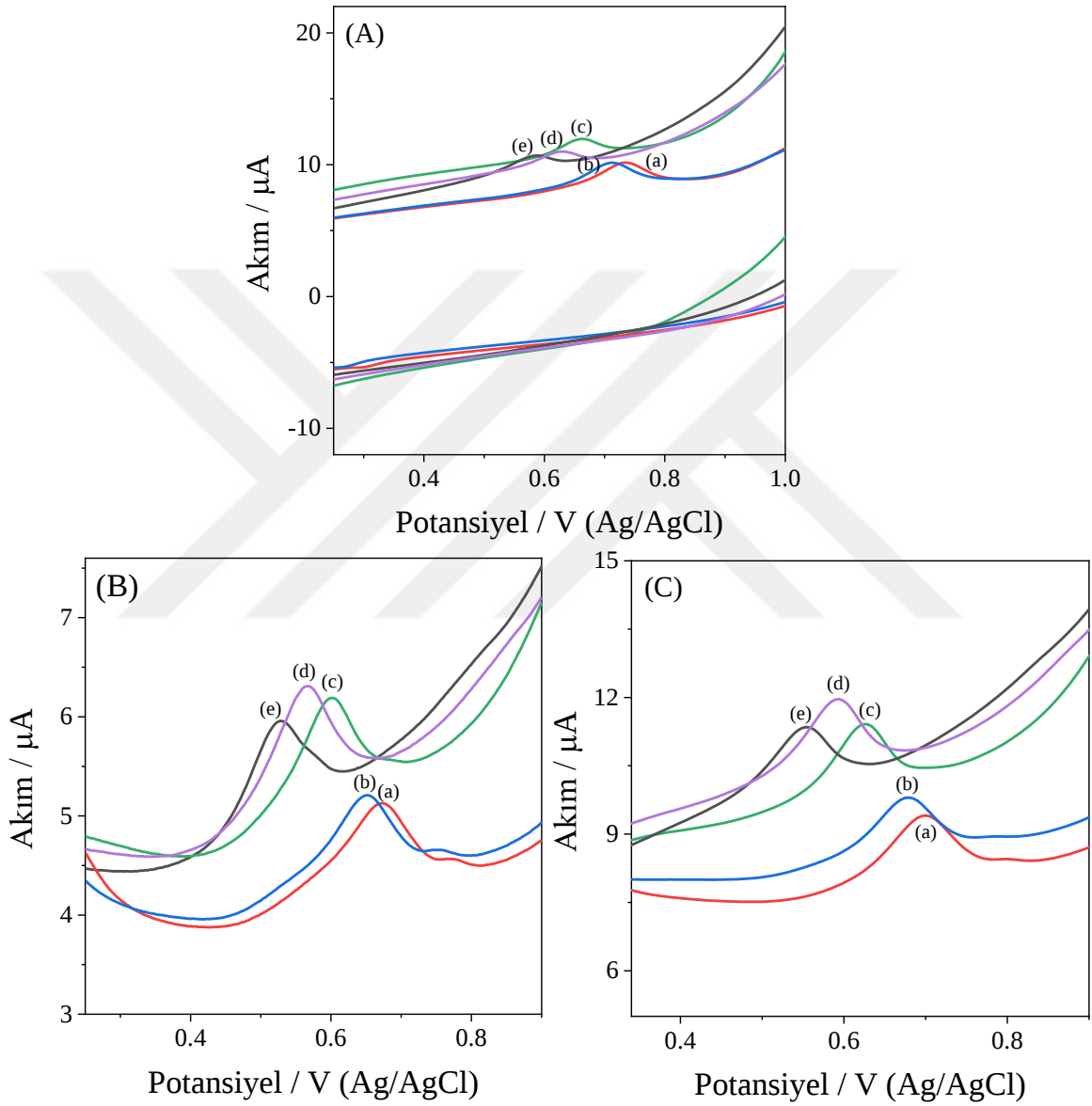


Şekil 16. pH 8.0 FT içerisindeki (A) 8.0×10^{-6} M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltmesi yapılmış diferansiyel puls ve (B) 1.0×10^{-5} M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltmesi yapılmış kare dalga voltamogramları. (a) Yalnız GCE ve (b) PBCP/GCE

4.1.3.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi

Melatoninin PBCP/GCE ile elektrokimyasal analizi için en uygun destek elektrolit türünün ve pH'nın belirlenebilmesi için pH taraması yapıldı. Bunun için, pH değerleri 5.0 ve 5.5 olan AT, pH'sı 5.5 ile 8.0 arasında yarım birimde bir değişen FT, pH'sı 5.0 ile 9.0 arasında yarım birimde bir değişen BRT, pH'sı 5.0 ile 6.0 arasında yarım birimde bir değişen ST ve pH'sı 5.0 ile 8.0 arasında yarım birimde bir değişen McT içerisinde 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çalışma çözeltileri hazırlanarak CV, DPV ve SWV yöntemleri ile voltamogramlar alındı. PBCP filmlerinin stabilitesini korumak amacıyla pH 5.0'dan daha

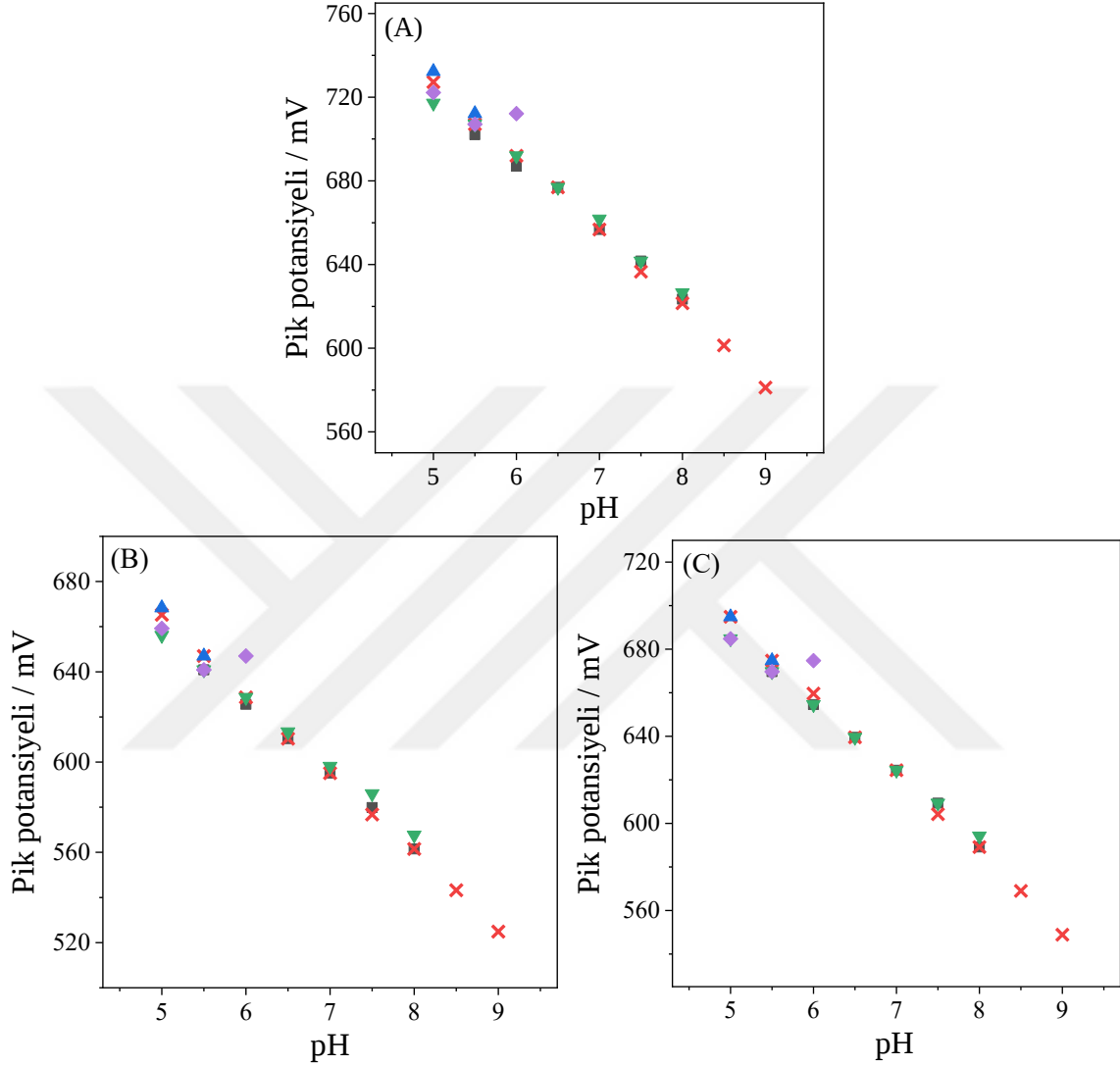
asidik ve pH 9.0'dan daha alkali tamponlar kullanılmadı. Şekil 17'de melatoninin farklı tampon çözeltiler içerisindeki döngülü, diferansiyel puls ve kare dalga voltamogramları verilmektedir. Şekil 17A'daki döngülü voltamogramlarda yükseltgenme yönünde melatoninin bir piki gözlenirken indirgenme yönünde herhangi bir pik gözlenmedi.



Şekil 17. (a) pH 5.0 AT, (b) pH 6.0 ST, (c) pH 7.0 McT, (d) pH 8.0 FT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramları

Destek elektrolitlerin melatoninin pik potansiyeli üzerindeki etkisi Şekil 18'de gösterildi. Şekil 18'e göre, pH 5.0 ile 9.0 arasında pH arttıkça pik potansiyelinde daha negatif

potansiyele doğru bir kayma gözlemlendi. Bu pH aralığında doğrusallıkta herhangi bir kırılma noktası gözlenmedi.



Şekil 18. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT ($\blacktriangle$), ST ($\blacklozenge$), FT ($\blacksquare$), McT ($\blacktriangledown$) ve BRT ($\times$) içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri

pH 5.0 ile 9.0 arasında melatonin pik potansiyelinin (E_p) pH'ya karşı doğrusallık grafiklerine ait denklemler Eşitlik 4–6'da verildi:

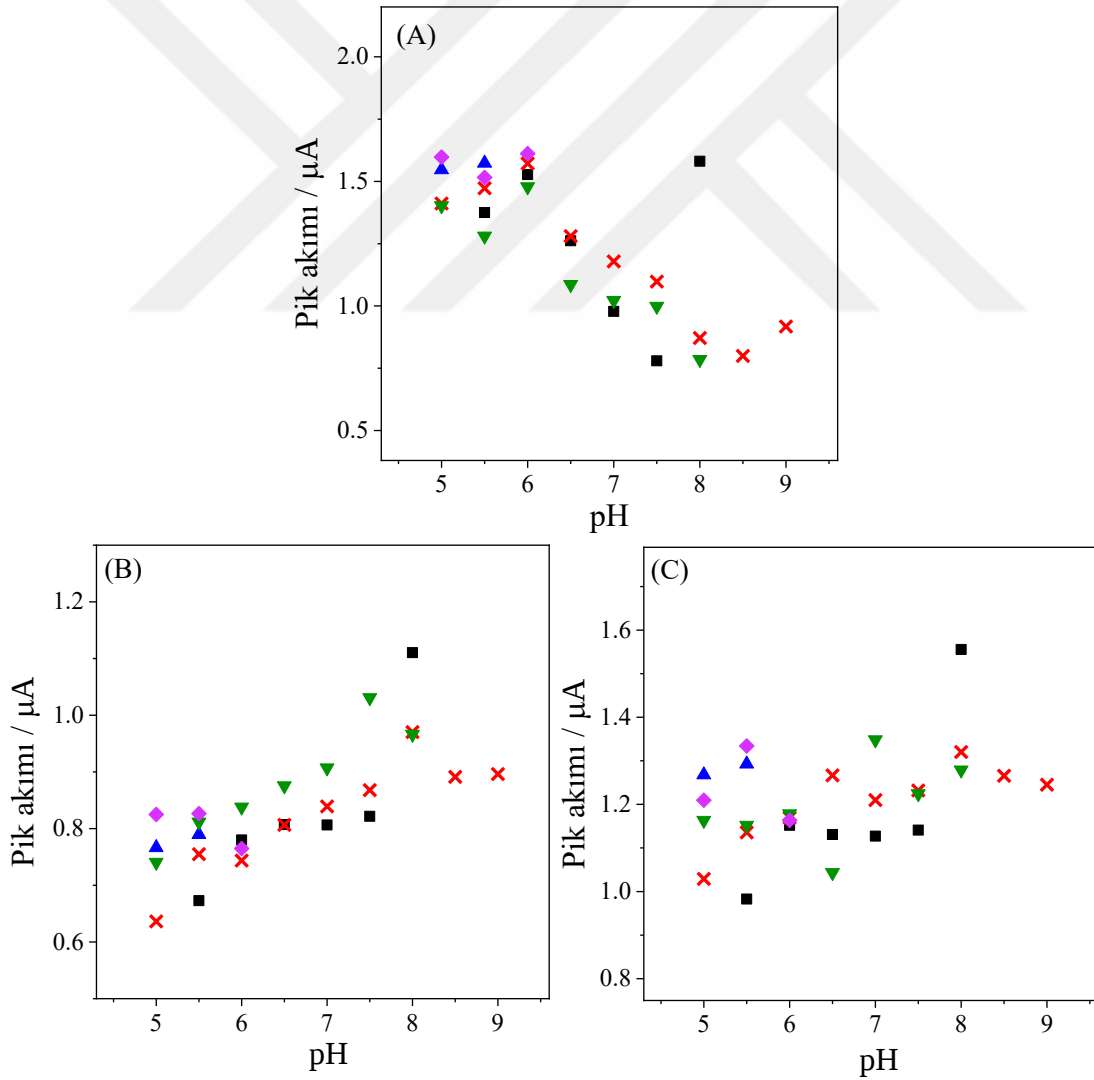
$$E_p \text{ (mV)} = 908.2 - 36.1 \text{ pH} \text{ (} r = 0.998, \text{ CV için)} \quad (4)$$

$$E_p \text{ (mV)} = 837.6 - 34.7 \text{ pH} \text{ (} r = 0.999, \text{ DPV için)} \quad (5)$$

$$E_p \text{ (mV)} = 874.1 - 35.9 \text{ pH} \text{ (} r = 0.999, \text{ SWV için)} \quad (6)$$

E_p – pH grafiklerinin pH 5.0 ile 9.0 aralığında elde edilen eğim değerleri, CV, DPV ve SWV yöntemleri için sırasıyla -36.1, -34.7 ve -35.9 mV pH⁻¹'dir. Bu eğim değerleri -59 mV pH⁻¹ olan teorik değerin yaklaşık yarısı kadardır ve bu da hız belirleme adımında iki elektron ve bir proton transferinin gerçekleştiğini göstermektedir (92, 201, 202).

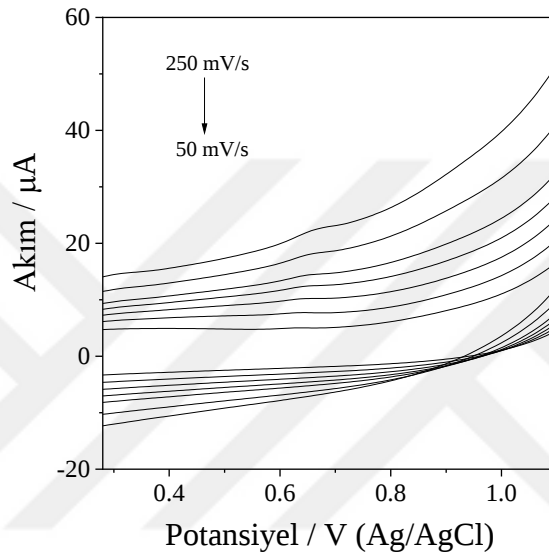
Melatoninin elektrokimyasal analizi için en uygun destek elektrolit türü ve pH'sına, CV, DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen pH taramasında elde edilen melatonin pik akım değerlerine ve piklerin simetrisine bakılarak karar verildi. Melatoninin pik akım değerleri her yöntem için ayrı ayrı pH'ya karşı grafiğe geçirildi (Şekil 19). Buna göre, en yüksek pik akımına sahip en simetrik melatonin piklerinin tüm yöntemlerde pH 8.0 FT ortamında elde edildiği görüldü.



Şekil 19. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT (▲), ST (◆), FT (■), McT (▼) ve BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin pH'ya karşı pik akımı grafikleri

4.1.3.2. Tarama Hızı

Melatoninin PBCP/GCE yüzeyindeki yükseltgenme reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü mü difüzyon kontrollü mü olduğuna karar vermek amacıyla hız taraması çalışması gerçekleştirildi. Bunun için pH 8.0 FT içerisinde 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çalışma çözeltisi hazırlanarak 250 mV s^{-1} 'den 50 mV s^{-1} 'e değişen tarama hızlarında CV yöntemi ile tek döngülü voltamogramlar alındı (Şekil 20).



Şekil 20. pH 8.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çözeltiden CV yöntemi ile alınan tek döngülü voltamogramlar

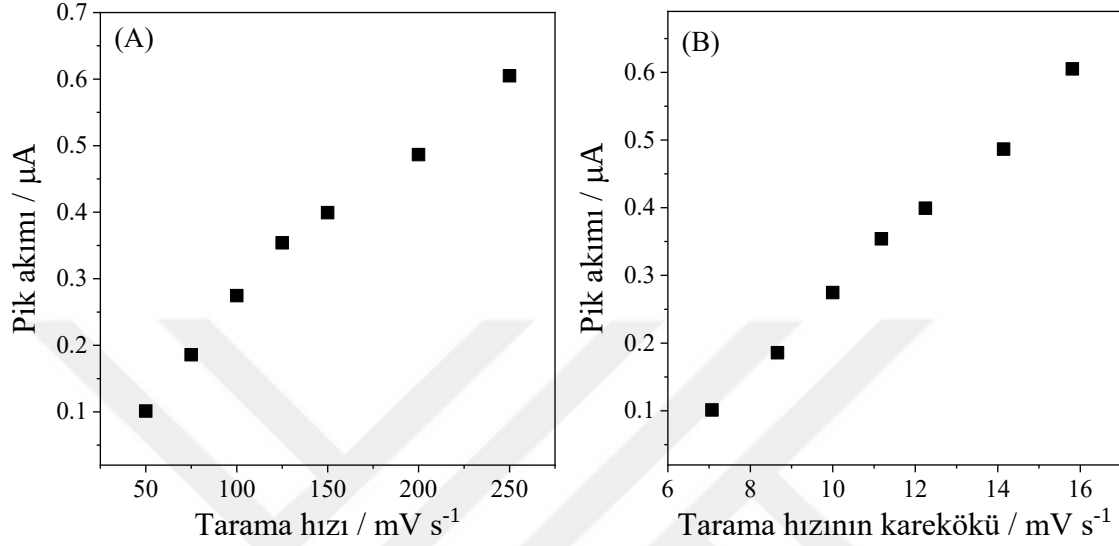
Uygulanan tarama hızına (v) ve tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) karşı CV yöntemi ile elde edilen melatonin pik akımı (I_p) değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 21). Şekil 21A'da görüldüğü gibi $I_p - v$ grafiğinde bir doğrusallığın elde edilemediği, fakat Şekil 21B'deki $I_p - v^{1/2}$ grafiğinde yüksek korelasyon katsayısı ile birlikte doğrusallık olduğu görüldü. Elde edilen doğrusal grafiğin regresyon denklemi Eşitlik 7'de verilmiştir.

$$I_p (\mu\text{A}) = 0.0567 v^{1/2} (\text{m V s}^{-1}) - 0.2969 \quad (r = 0.996) \quad (7)$$

Uygulanan tarama hızının logaritmasına ($\log v$) karşı melatoninin anodik pik potansiyeli (E_p) değerleri de ayrıca grafiğe geçirildi ve elde edilen grafikte bir doğrusallık olduğu görüldü. Elde edilen doğrusal grafiğin regresyon denklemi Eşitlik 8'de verilmiştir. Tersinmez bir sistem için Laviron teorisine (203) göre, α yük transfer katsayısı ve n elektron sayısı olmak üzere an , $E_p - \log v$ grafiğinin eğiminden hesaplanmaktadır. Tersinmez bir

sistem için α değerinin 0.5 olduğu varsayımıyla, melatonin için elektron sayısı 2.08 olarak hesaplandı (161, 170).

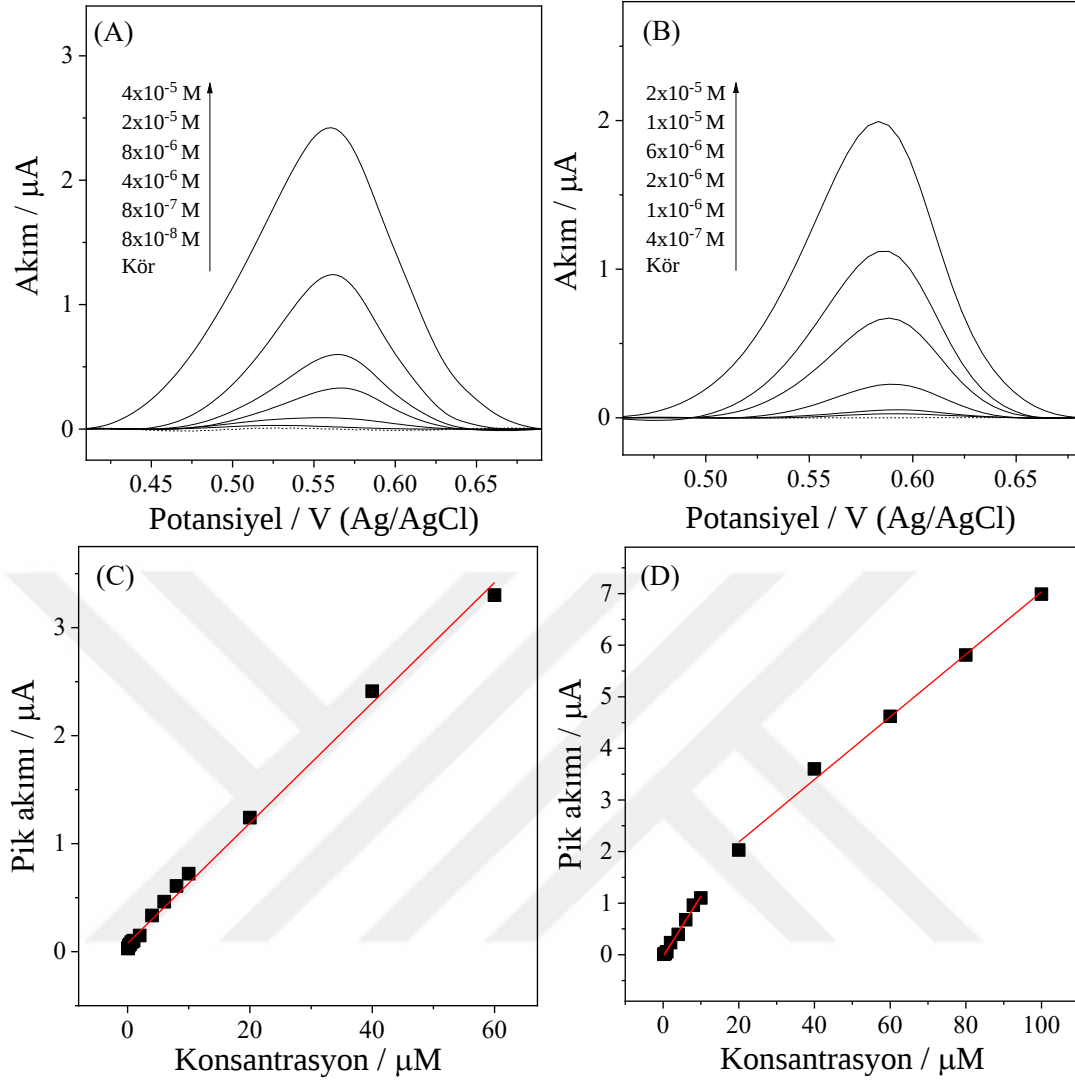
$$E_p \text{ (V)} = 0.057 \log v \text{ (V s}^{-1}\text{)} + 0.515 \text{ (} r = 0.988 \text{)} \quad (8)$$



Şekil 21. pH 8.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin CV yöntemi ile elde edilen (A) $I_p - v$ ve (B) $I_p - v^{1/2}$ grafikleri

4.1.3.3. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları

Melatoninin kantitatif analizi için DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak kalibrasyon çalışması gerçekleştirildi. Bu amaçla hem DPV hem de SWV yöntemleri için pH 8.0 FT içerisinde 1.0×10^{-8} ile 1.0×10^{-4} M aralığındaki 21 farklı konsantrasyon için saf melatonin çalışma çözeltileri hazırlandı. Alınan ölçümler sonucunda, pik akım değeri okunabilen ilk melatonin derişimi DPV yöntemi için 8.0×10^{-8} M ve SWV yöntemi için 2.0×10^{-7} M oldu. Ayrıca, DPV ile tek kalibrasyon grafiğı elde edilirken, SWV ile farklı regresyon denkleminde sahip iki kısım kalibrasyon grafiğı elde edildi. DPV ve SWV yöntemleri için melatonin konsantrasyonundaki artış ile pik akımının doğrusal değışimi Şekil 22’de ve bu derişim aralıklarındaki kalibrasyon grafiklerinin regresyon analizi verileri Tablo 5’te verilmiştir.



Şekil 22. PBCP/GCE ile pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren çalışma çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör

Tablo 5. Melatoninin PBCP/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV	SWV
Pik potansiyeli (mV)	560	577
Doğrusal aralık (μM)	0.08 – 60	0.2 – 10 20 – 100
Eğim ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.056 ± 0.001	0.117 ± 0.003 0.061 ± 0.002
Kesim noktası (μA)	0.077 ± 0.020	-0.033 ± 0.017 0.971 ± 0.157
Korelasyon katsayısı, r	0.996	0.994 0.995
Teşhis sınırı, LOD (nM)	24.4	51.8
Tayin sınırı, LOQ (nM)	74.0	156.9

Geliştirilen yöntemlerin kesinliğini değerlendirmek amacıyla tekrar edilebilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için pH 8.0 FT içerisinde DPV için 6.0×10^{-6} M ve SWV için 6.0×10^{-5} M melatonin çalışma çözeltileri hazırlanarak gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. Her bir yöntem için aynı konsantrasyonda üçer adet farklı melatonin çözeltilerinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli verilerinin %RSD oranları hesaplandı. Veriler ve sonuçlar Tablo 6’da verildi.

Tablo 6. Melatoninin PBCP/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPV</u>		<u>SWV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.558	0.558	0.573	0.573
		0.561	0.561	0.578	0.578
		0.561	0.561	0.578	0.578
		0.561	0.558	0.578	0.578
		0.561	0.564	0.578	0.578
	Ortalama (V)	0.560	0.560	0.577	0.577
	s	0.0012	0.0023	0.0020	0.0020
	%RSD	0.22	0.41	0.35	0.35
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.5085	0.5070	4.8823	4.9491
		0.5072	0.5097	4.9326	4.8987
		0.5087	0.5073	4.9032	4.8713
		0.5102	0.5067	4.9063	4.8823
		0.5067	0.5102	4.8701	4.9063
	Ortalama (μ A)	0.5083	0.5082	4.8989	4.9015
	s	0.0014	0.0016	0.0241	0.0299
	%RSD	0.27	0.32	0.49	0.61

4.1.3.4. Farmasötik Dozaj Formundan Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğunu değerlendirebilmek amacıyla melatoninin farmasötik preparatlardan tayini ve geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi. Farmasötik preparatlardan tayin çalışması için, tablet dozaj formundan hazırlanan pH 8.0 FT içerisindeki melatoninin DPV için 6.0×10^{-6} M ve SWV için 6.0×10^{-5} M'lık çalışma çözeltileri hazırlandı. Her bir yöntem için aynı konsantrasyonda üçer adet farklı melatonin çözeltilerinden beş adet pik akımı değeri elde edildi. Pik akımı değerleri üzerinden melatonin miktarı hesaplandı ve tablet dozaj formunda beyan edilen miktar ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. PBCP/GCE kullanılarak DPV ve SWV ile pH 8.0 FT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri

		DPV	SWV
Farmasötik preparatlardan tayin	Tablette beyan edilen melatonin miktarı (mg)	3.000	3.000
	Bulunan melatonin miktarları (mg)	3.034	3.046
		3.019	3.112
		2.995	3.059
		2.990	3.100
		3.052	3.074
	Bulunan ortalama melatonin miktarı (mg)	3.018	3.078
	s	0.026	0.028
	%RSD	0.87	0.89
	%Bağıl hata	0.59	2.61

Geri kazanım çalışmasında DPV yöntemi için melatonin tablet dozaj formundan hazırlanan 6.0×10^{-6} M melatonin çözeltisi üzerine toplam melatonin konsantrasyonu 8.0×10^{-6} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden, SWV yöntemi için ise melatonin tablet dozaj formundan hazırlanan 6.0×10^{-5} M melatonin çözeltisi üzerine toplam melatonin konsantrasyonu 8.0×10^{-5} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden ilave edildi. Son konsantrasyonları DPV için 8.0×10^{-6} M ve SWV için 8.0×10^{-5} M olan çözeltilerden üçer adet hazırlanarak voltamogramlar alındı. Beşer adet pik akımı değerleri üzerinden hesaplanan %RSD ve %geri kazanım verileri Tablo 8’de verilmiştir.

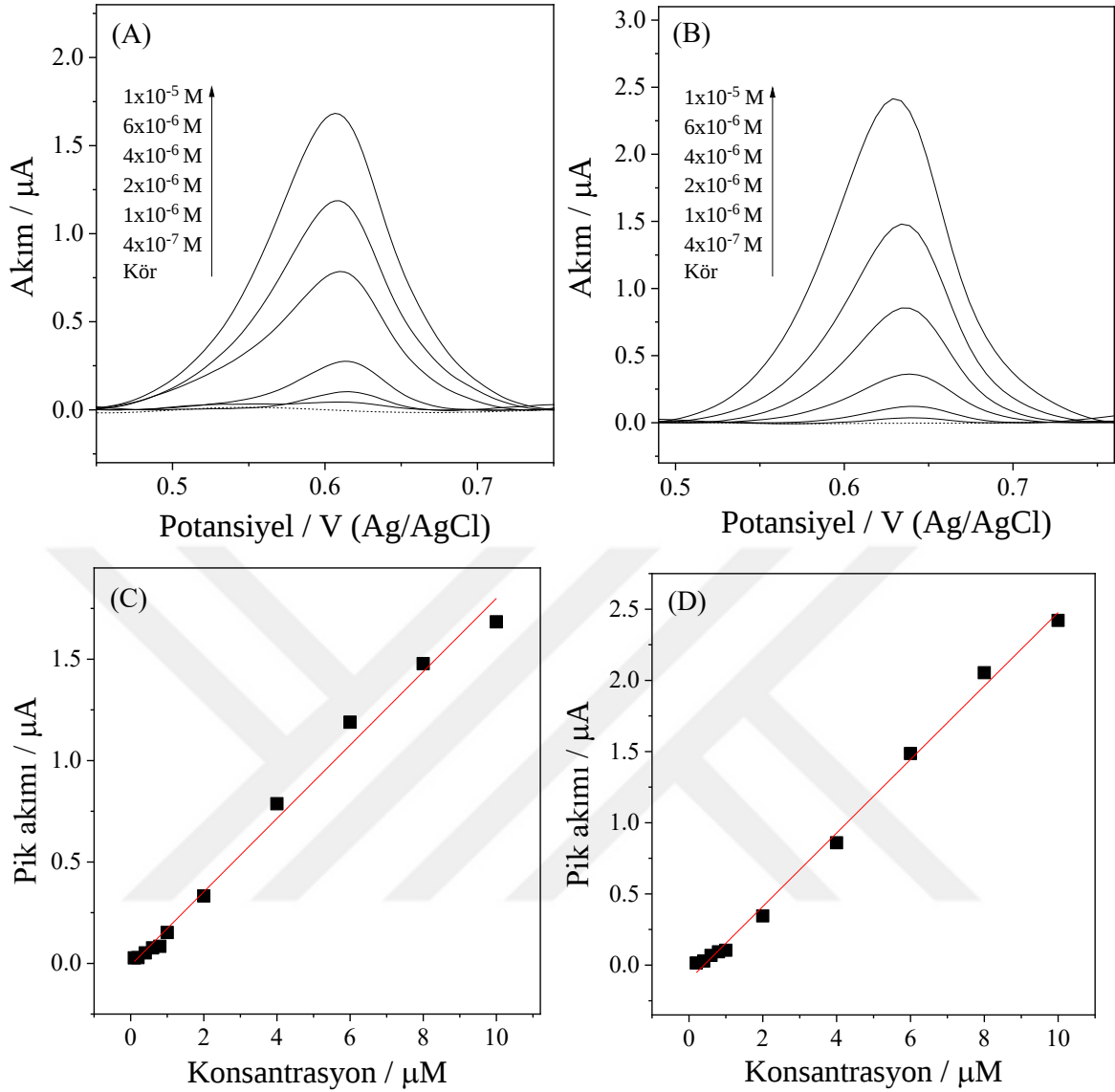
Tablo 8. PBCP/GCE kullanılarak DPV ve SWV ile pH 8.0 FT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen geri kazanım çalışması verileri

	DPV	SWV
İlave edilen melatonin konsantrasyonu (μ M)	2.000	20.000
Bulunan melatonin konsantrasyonu (μ M)	1.986	19.991
	2.006	19.911
	1.986	20.055
	2.014	19.818
	2.007	19.891
Bulunan ortalama melatonin konsantrasyonu (μ M)	2.000	19.933
Ortalama geri kazanım (%)	99.98	99.67
s	0.65	0.46
%RSD	0.65	0.46
%Bağıl hata	-0.02	-0.33
t-testi		0.40
F-testi		0.52

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

4.1.3.5. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması

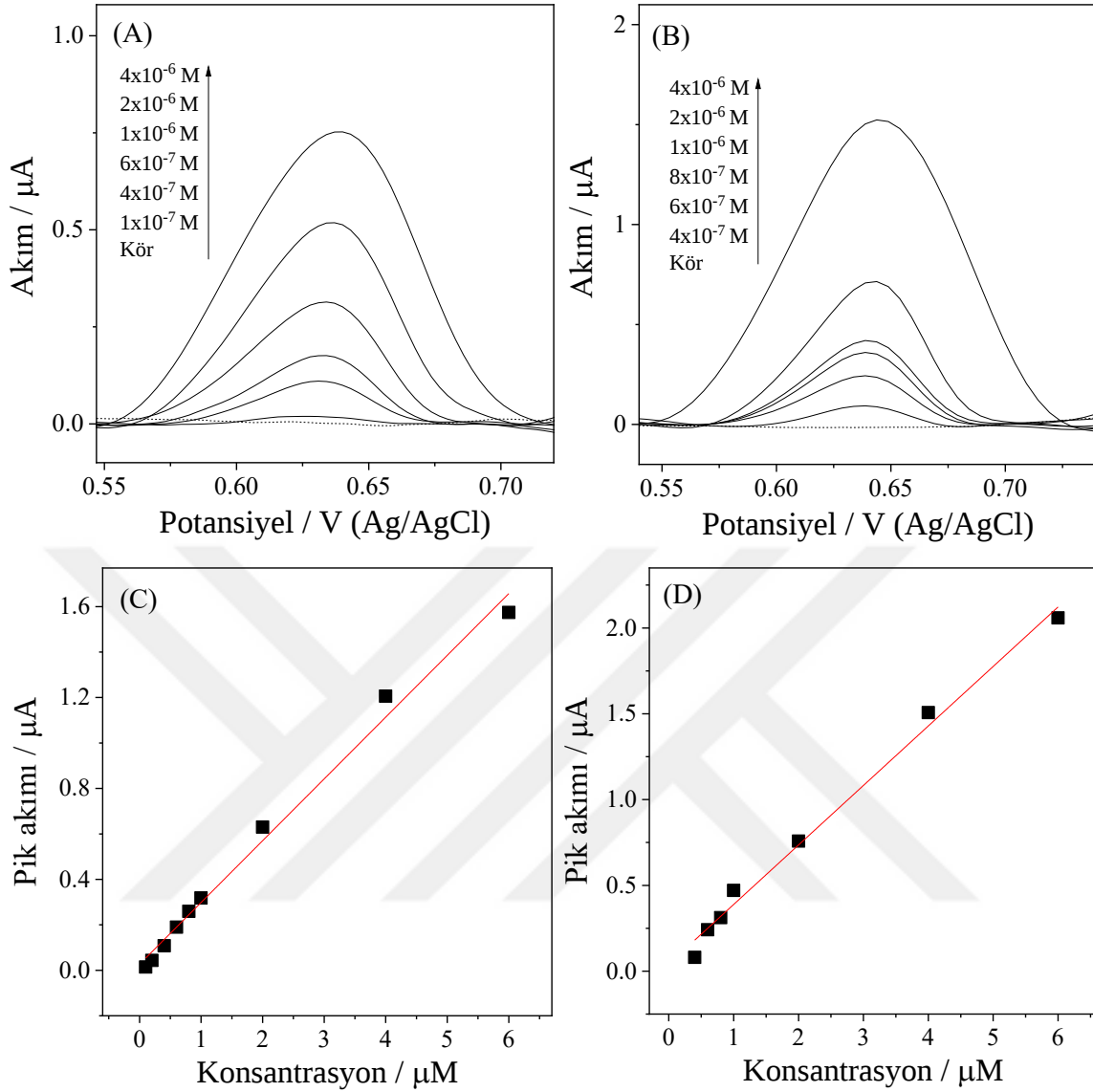
Geliştirilen yöntemlerle insan serumu ve yapay idrar çözeltisi örneklerinden melatonin tayini için çalışmalar gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak Bölüm 3.4.5.'te açıklandığı şekilde serum ve yapay idrar çözeltileri hazırlandı. DPV ve SWV ile yapılan kalibrasyon çalışmalarından elde edilen doğrusal aralıklar göz önüne alınarak pH 8.0 FT içerisinde melatonin içeren serum ve yapay idrar çözeltileri ile kalibrasyon çalışmaları yapıldı. Serum çözeltilerinden elde edilen voltamogramlarda pik akımının okunabildiği en düşük konsantrasyon DPV için 1.0×10^{-7} M ve SWV için 2.0×10^{-7} M iken, yapay idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlarda ise pik akımının okunabildiği en düşük konsantrasyon DPV için 1.0×10^{-7} M ve SWV için 4.0×10^{-7} M olarak bulundu. Şekil 23'te serum çözeltilerinden ve Şekil 24'te yapay idrar çözeltilerinden DPV ve SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramlar ve melatonin konsantrasyonuna karşı pik akımı grafikleri verilmiştir. Ayrıca, serum ve yapay idrar çözeltilerinin kalibrasyon grafiklerinin regresyon analizi sonuçları da sırasıyla Tablo 9 ve 10'da verilmiştir.



Şekil 23. pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör

Tablo 9. PBCP/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV	SWV
Pik potansiyeli (mV)	609	635
Doğrusal aralık (μM)	0.1 – 10	0.2 – 10
Eğim ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.181 ± 0.006	0.258 ± 0.006
Kesim noktası (μA)	-0.009 ± 0.026	-0.105 ± 0.028
Korelasyon katsayısı, r	0.991	0.996
Teşhis sınırı, LOD (nM)	27.1	39.1
Tayin sınırı, LOQ (nM)	82.2	118.4



Şekil 24. pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör

Tablo 10. PBCP/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV	SWV
Pik potansiyeli (mV)	624	641
Doğrusal aralık (μM)	0.1 – 6	0.4 – 6
Eğim ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.272 ± 0.010	0.347 ± 0.014
Kesim noktası (μA)	0.027 ± 0.026	0.042 ± 0.041
Korelasyon katsayısı, r	0.991	0.992
Teşhis sınırı, LOD (nM)	28.4	66.7
Tayin sınırı, LOQ (nM)	86.1	202.2

Tekrar edilebilirlik çalışmasına, DPV için 4.0×10^{-6} M saf melatonin içeren serum ve 8.0×10^{-7} M saf melatonin içeren yapay idrar çalışma çözeltileri; SWV için ise 6.0×10^{-6} M saf melatonin içeren serum ve 8.0×10^{-7} M saf melatonin içeren yapay idrar çalışma çözeltileri hazırlanarak başlandı. Her bir yöntem için üçer adet çözeltiden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerleri kullanılarak gün içi ve günler arası %RSD oranları hesaplandı. Tablo 11 ve 12’de sırasıyla serum ve yapay idrar çözeltileri için elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Tablo 11. PBCP/GCE kullanılarak pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPV</u>		<u>SWV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.610	0.607	0.634	0.634
		0.610	0.607	0.634	0.639
		0.610	0.607	0.634	0.634
		0.610	0.613	0.634	0.634
		0.613	0.613	0.634	0.634
	Ortalama (V)	0.610	0.609	0.634	0.635
	s	0.0014	0.0033	0.0001	0.0023
	%RSD	0.22	0.55	0.01	0.36
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.8051	0.8141	1.5914	1.5738
		0.8063	0.8103	1.5616	1.6230
		0.8106	0.7984	1.5734	1.5851
		0.8048	0.8106	1.5836	1.5616
		0.8131	0.8063	1.5723	1.5723
	Ortalama (μ A)	0.8080	0.8079	1.5765	1.5832
	s	0.0037	0.0060	0.0114	0.0238
	%RSD	0.46	0.74	0.72	1.50

Tablo 12. PBCP/GCE kullanılarak pH 8.0 FT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPV</u>		<u>SWV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.625	0.628	0.644	0.639
		0.625	0.628	0.644	0.644
		0.625	0.622	0.639	0.639
		0.625	0.622	0.639	0.639
		0.625	0.622	0.639	0.644
	Ortalama (V)	0.625	0.624	0.641	0.641
	s	0.0001	0.0033	0.0028	0.0028
	%RSD	0.01	0.54	0.43	0.43
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.2459	0.2435	0.3224	0.3245
		0.2451	0.2474	0.3241	0.3225
		0.2447	0.2442	0.3230	0.3208
		0.2419	0.2447	0.3217	0.3241
		0.2443	0.2419	0.3235	0.3235
	Ortalama (μ A)	0.2444	0.2443	0.3229	0.3231
	s	0.0015	0.0020	0.0009	0.0015
	%RSD	0.62	0.83	0.29	0.46

Serum örneklerinden yapılan geri kazanım çalışmalarında, DPV için 4.0×10^{-6} M melatonin içeren serum çözeltisi üzerine son konsantrasyonu 6.0×10^{-6} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden ve SWV için ise 6.0×10^{-6} M melatonin içeren serum çözeltisi üzerine son konsantrasyonu 8.0×10^{-6} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden eklenerek pH 8.0 FT ile hacme tamamlandı. Yapay idrar örneklerinden geri kazanım çalışmalarında ise hem DPV hem de SWV için 8.0×10^{-7} M melatonin içeren yapay idrar çözeltisi üzerine son konsantrasyonu 1.0×10^{-6} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden eklenerek pH 8.0 FT ile hacme tamamlandı. Her bir yöntem için üçer adet hazırlanan serum ve yapay idrar çalışma çözeltilerinden elde edilen değerler sırasıyla Tablo 13 ve 14’te verildi.

Tablo 13. PBCP/GCE kullanılarak DPV için 6.0×10^{-6} M ve SWV için 8.0×10^{-6} M melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

	DPV	SWV
İlave edilen saf melatonin konsantrasyonu (μM)	2.000	2.000
Bulunan saf melatonin konsantrasyonu (μM)	2.036	2.015
	2.022	2.016
	2.013	1.983
	2.027	1.999
	2.008	2.020
Bulunan ortalama saf melatonin konsantrasyonu (μM)	2.021	2.006
Ortalama geri kazanım (%)	101.06	100.32
s	0.57	0.77
%RSD	0.56	0.77
%Bağıl hata	1.06	0.32
t-testi		0.13
F-testi		0.56

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

Tablo 14. PBCP/GCE kullanılarak DPV ve SWV için 1.0×10^{-6} M melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

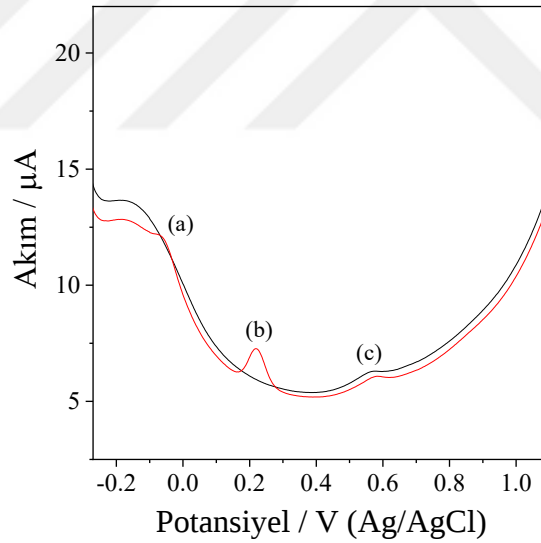
	DPV	SWV
İlave edilen saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.200	0.200
Bulunan saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.199	0.199
	0.198	0.199
	0.199	0.200
	0.199	0.202
	0.199	0.198
Bulunan ortalama saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.199	0.200
Ortalama geri kazanım (%)	99.36	99.90
s	0.17	0.73
%RSD	0.17	0.73
%Bağıl hata	-0.64	-0.10
t-testi		0.15
F-testi		0.02

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

4.1.3.6. Girişim Çalışması

PBCP/GCE ile geliştirilen voltametrik yöntemlerin melatonine karşı seçiciliği, insan vücut sıvılarında bulunan askorbik asit ve ürik asit endojen maddelerinin ve Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , NO_3^- ve SO_4^{2-} iyonlarının varlığında incelendi. Bunun için, 4.0×10^{-6} M melatonin içeren pH 8.0 FT içerisine her biri 4.0×10^{-4} M olacak şekilde NaCl, KNO₃, CaCl₂ ve K₂SO₄ tuzları eklendi. Bu tuzların ilavesinden sonra melatonin pik akımındaki değişimin $\pm\%2.0$ 'dan az olduğu görüldü.

Vücut sıvılarında bulunan ve yaygın olarak girişim yapan türlerden askorbik asit ve ürik asit, çözeltideki konsantrasyonları sırasıyla 8.0×10^{-5} M ve 8.0×10^{-6} M olacak şekilde, 3.0×10^{-6} M melatonin içeren pH 8.0 FT çözeltisine eklendi. Şekil 25'te görüldüğü gibi, -0.06 V'de askorbik asite, +0.22 V'de ürik asite ve +0.58 V'de melatonine ait iyi tanımlanmış üç anodik pik elde edildi. Bu maddelerin ilavesi ile melatonin pik akımındaki değişimin $\pm\%3.9$ 'dan az olduğu görüldü.



Şekil 25. PBCP/GCE kullanılarak pH 8.0 FT içerisindeki (siyah voltamogram) sadece melatonin içeren çözeltiden ve (kırmızı voltamogram) (a) 8.0×10^{-5} M askorbik asit, (b) 8.0×10^{-6} M ürik asit ve (c) 3.0×10^{-6} M melatonin içeren çözeltiden alınan diferansiyel puls voltamogramları

4.1.3.7. PBCP/GCE'nin Stabilité Çalışması

Hazırlanan PBCP/GCE'nin kararlılığını değerlendirmek amacıyla CV ve DPV yöntemleri kullanılarak hem operasyonel hem de zamana karşı stabilité çalışmaları

gerçekleştirildi. Modifiye elektrotun operasyonel stabilitesi için 1.0×10^{-5} M melatonin içeren pH 8.0 FT çözeltisinde 100 döngülü CV alındı. Buna göre, 100. döngü sonunda elde edilen melatonin pik akımı, ilk döngüdeki değerini %99.4 oranında korudu.

PBCP/GCE'nin uzun süreli stabilitesi, 4.0×10^{-6} M melatonin içeren pH 8.0 FT çözeltisinden DPV yöntemi ile gün aşırı ölçümler alınarak belirlendi. Hazırlanan PBCP/GCE, ortam koşullarından etkilenmemesi amacıyla, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklandı. Analiz sonuçlarına göre PBCP/GCE'nin 14. güne kadar stabilitesini %95.9 oranında koruduğu belirlendi.

4.1.3.8. PBCP/GCE'nin Yeniden Üretilirlik Çalışması

PBCP/GCE'nin yeniden üretilirliği, farklı günlerde birbirinden bağımsız olarak hazırlanan beş elektrot kullanılarak 6.0×10^{-6} M melatonin içeren pH 8.0 FT çözeltisinden DPV ile elde edilen pik akım değerleri üzerinden belirlendi. Elde edilen beş adet pik akım değeri ile %RSD değeri 0.38 olarak hesaplandı.

4.2. PBPB/GCE ile Elde Edilen Bulgular

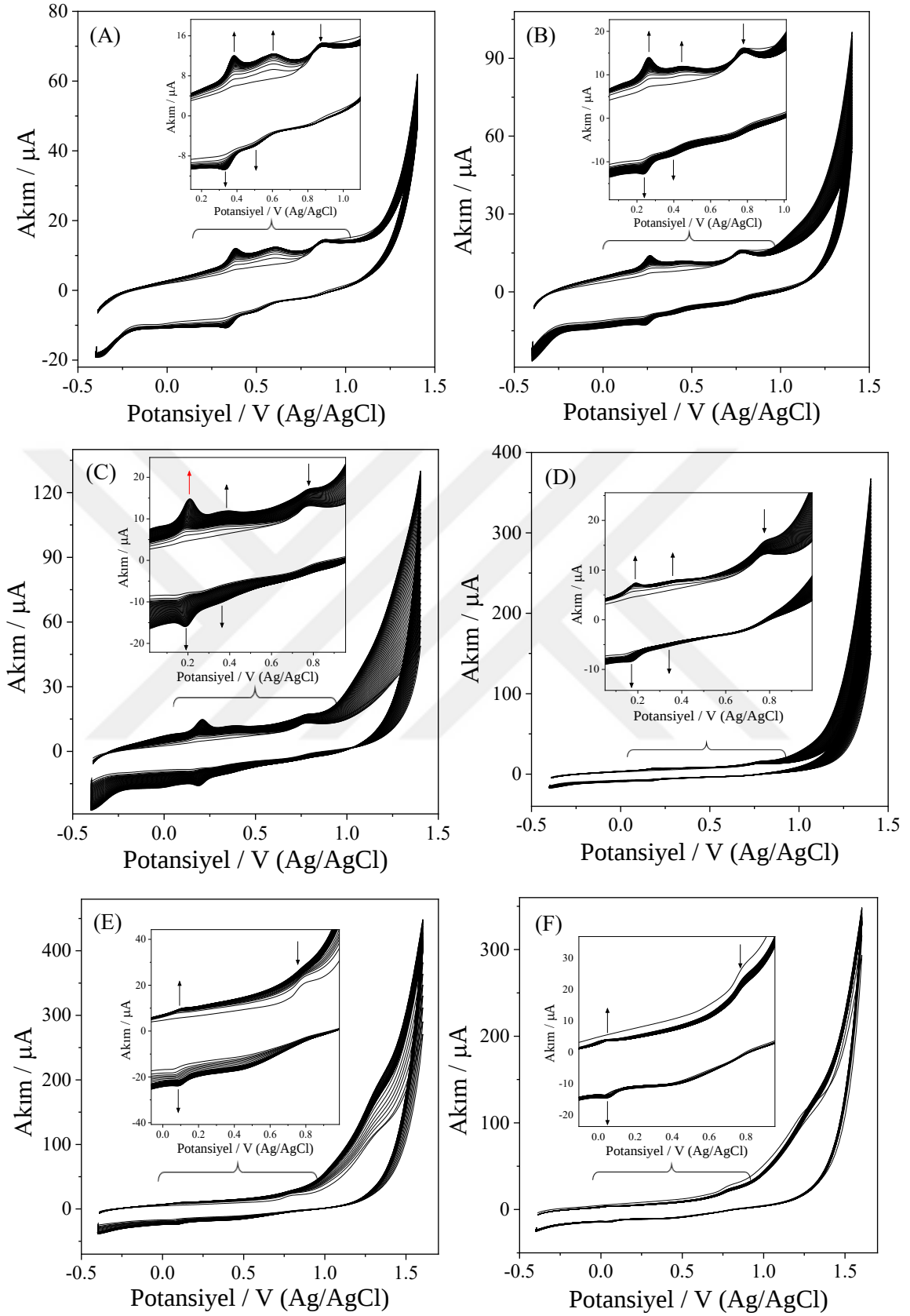
4.2.1. Poli(Bromfenol Mavisi) Filminin Sentezi

PBPB filmi GCE yüzeyi üzerine CV yöntemi ile elektrokimyasal olarak sentezlenerek PBPB/GCE hazırlandı. En hızlı ve kontrollü elektropolimerizasyon için öncelikle sentez sırasında kullanılan koşullar optimize edildi. Bu amaçla, destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen farklı iyonların etkisi, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı gibi çeşitli parametreler incelendi.

4.2.1.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi

Destek elektrolitin türü ve pH'sı polimer filmin sentezinde önemli bir etkiye sahip olduğundan öncelikle bu parametreler optimize edildi. Bunun için, pH 5.5–8.0 FT, pH 5.0–9.0 BRT, pH 2.6–7.0 McT, pH 3.0–6.0 ST ve pH 3.5, 4.5 ve 5.5 AT içerisinde 10 mL 0.50 mM BPB çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak, literatürde boyar maddelerin elektropolimerizasyonunda sıklıkla tercih edilen parametreler seçildi ve böylece, -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogram alınarak GCE yüzeyinde PBPB filminin sentezi gerçekleştirildi. Şekil 26'da farklı tamponlar içerisindeki 0.50 mM BPB içeren çözeltilerden elde edilen 50 döngülü elektropolimerizasyon voltamogramları verilmiştir. Buna göre, voltamogramlarda en pozitif potansiyelde bulunan ve her döngüde akım değeri azalan tersinmez yükseltgenme

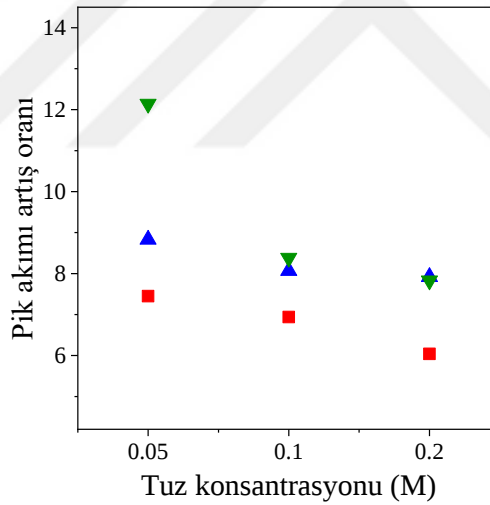
pikinin BPB monomerine ve monomere ait pikin solunda daha negatif potansiyelde bulunan ve her döngüde akım değeri artan yükseltgenme/indirgenme piklerinin ise PBPB'ye ait olduğuna karar verildi. Piklere karar verildikten sonra polimer pik akımlarının her bir döngüdeki artış oranları belirlenerek en yüksek artışın meydana geldiği ortam tespit edildi. Artış oranları, tüm polimer optimizasyonu çalışmaları için, polimere ait daha negatif potansiyeldeki yükseltgenme pikinin son döngüde ölçülen pik akımının, ikinci döngüde ölçülen pik akımına oranı alınarak hesaplandı. Örneğin pH 5.9 FT için bu hesaplama, +0.18 V'de görülen (Şekil 26C, kırmızı ok ile işaretlenmiş) polimere ait yükseltgenme piki üzerinden yapıldı. Bu değerlendirmelere göre, tüm tampon çözeltiler arasında, PBPB redoks piklerinin 50. döngüdeki artış oranının en yüksek olduğu en kontrollü ve en yüksek PBPB film oluşumu pH 5.9 FT içerisinde hazırlanmış olan polimerizasyon çözeltisi ile elde edildi.



Şekil 26. (A) pH 2.6 McT, (B) pH 4.5 AT, (C) pH 5.9 FT, (D) pH 6.0 ST, (E) pH 8.0 FT ve (F) pH 9.0 BRT içerisindeki 0.50 mM BPB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1} , döngü sayısı 50

4.2.1.2. İyonların Etkisi

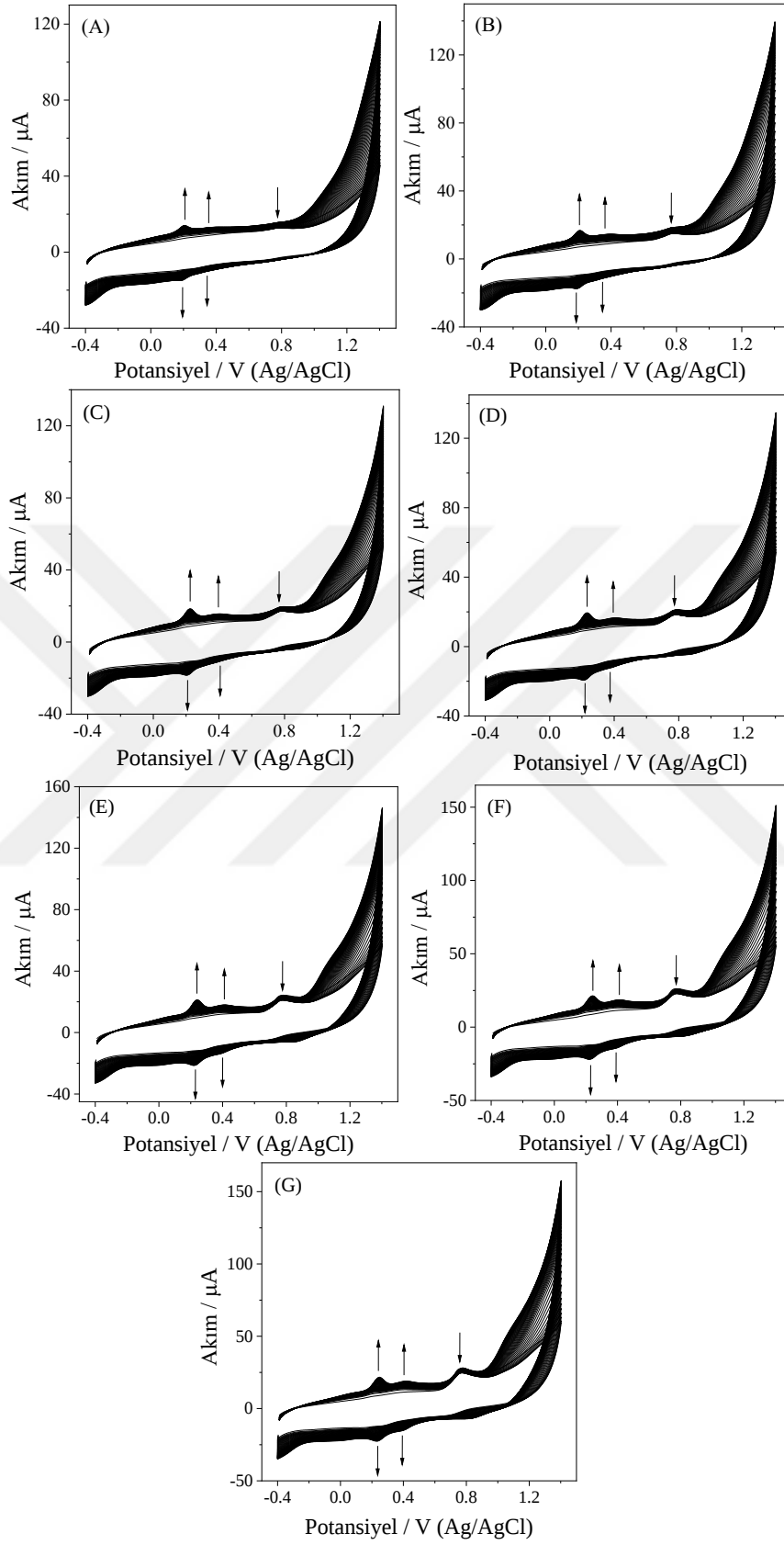
Elektropolimerizasyon çözeltisine ilave edilen iyonların bu çalışmadaki polimer filmlerin polimerizasyonu üzerinde herhangi bir elektrokatalitik etkiye sahip olup olmadığını araştırmak amacıyla, elektropolimerizasyon çözeltisi içerisine farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.1 ve 0.2 M) KCl, Na₂SO₄ ve NaNO₃ tuzları eklendi. CV ile -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogram alındı. Buna göre, 0.05 M NO₃⁻ iyonları içeren polimerizasyon çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen elektropolimerizasyonda, polimer pik akımı artış oranının en yüksek olduğu ve NO₃⁻ iyonları eklendiğinde pik akımı artış oranının 1.32 kat arttığı gözlemlendi. İlave edilen diğer iyonların varlığında polimer pik akımı artış oranları NO₃⁻ ile elde edilene göre daha düşük kaldı (Şekil 27). Bu nedenle, BPB'nin elektropolimerizasyonunda destek elektrolit olarak 0.05 M NaNO₃ içeren pH 5.9 FT çözeltisinin kullanılmasına karar verildi.



Şekil 27. pH 5.9 FT içerisine ilave edilen tuzların BPB pik akımı artış oranına etkisi.
▼ : NaNO₃, ▲ : KCl, ■ : Na₂SO₄

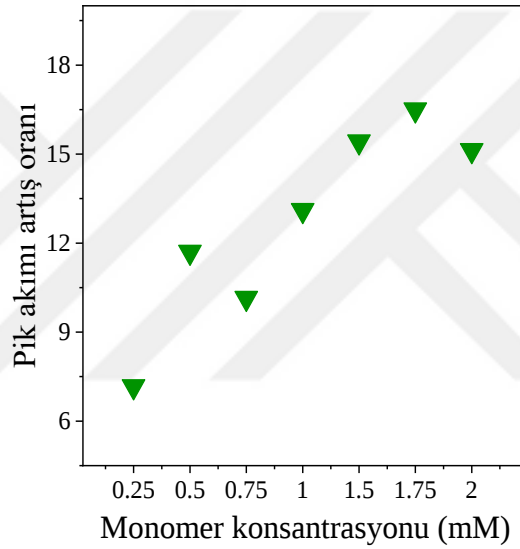
4.2.1.3. Monomer Derişimi

Monomer derişiminin elektropolimerizasyona etkisi de ayrıca incelendi. Bu amaçla 0.05 M NaNO₃ içeren pH 5.9 FT çözeltisi içerisine 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75 ve 2.0 mM konsantrasyonlarda BPB monomeri eklendi ve CV yöntemi ile -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 50 döngülü voltamogram alındı (Şekil 28).



Şekil 28. 0.05 M NaNO₃ içeren pH 5.9 FT içerisindeki (A) 0.25 mM, (B) 0.50 mM, (C) 0.75 mM, (D) 1.0 mM, (E) 1.5 mM, (F) 1.75 mM ve (G) 2.0 mM BPB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s⁻¹, döngü sayısı 50

Elektropolimerizasyon sonucunda elde edilen verilerden, BPB redoks piklerinin pik akımı artış oranları 0.25 mM için 7.17 kat, 0.50 mM için 11.70 kat, 0.75 mM için 10.15 kat, 1.0 mM için 13.11 kat, 1.5 mM için 15.42 kat, 1.75 mM için 16.50 kat ve 2.0 mM için 15.13 kat olarak hesaplandı (Şekil 29). Buna göre, en yüksek pik akımı artış oranına sahip, en kontrollü ve iyi tanımlanmış BPB piklerinin 1.75 mM BPB monomeri içeren pH 5.9 FT + 0.05 M NaNO₃ çözeltisi içerisinde elde edildiği görüldü (Şekil 28F). 1.75 mM'den daha düşük ve daha yüksek monomer derişimlerdeki pik akımı artış oranları 1.75 mM'ye kıyasla düşüktü. Bu nedenle, polimerizasyon için optimum monomer derişiminin 1.75 mM olduğuna karar verildi.



Şekil 29. pH 5.9 FT + 0.05 M NaNO₃ içerisindeki elektropolimerizasyonda BPB monomer derişiminin BPB pik akımı artış oranına etkisi

4.2.1.4. Tarama Hızı

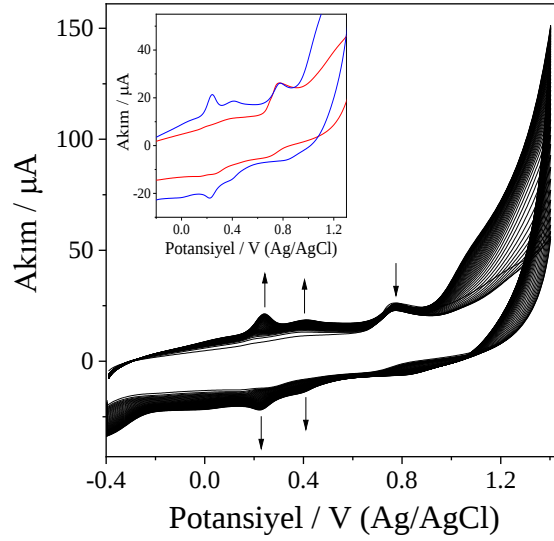
Tarama hızının elektropolimerizasyon sürecine olan etkisini incelemek için 1.75 mM BPB içeren pH 5.9 FT + 0.05 M NaNO₃ çözeltisinde CV yöntemi ile -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında 50 mV s⁻¹ ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 50 döngülü voltamogram alındı. Buna göre, 50 ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında polimerin pik akımı artış oranları sırasıyla 3.80 kat ve 10.5 kat olarak belirlendi. Tarama hızı 50 mV s⁻¹ olarak tutulduğunda polimer pik akımının önemli ölçüde azalması nedeniyle elektropolimerizasyon için optimum tarama hızı 100 mV s⁻¹ olarak seçildi.

4.2.1.5. Döngü Sayısı

Polimerizasyonun sona erdiği döngü sayısını belirlemek için CV yöntemi ile 1.75 mM BPB içeren pH 5.9 FT + 0.05 M NaNO₃ çözeltisinde -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 50 döngülü voltamogram alındı ve polimer piklerinin akımındaki artış oranları her döngüden sonra hesaplandı. Buna göre, optimize edilen koşullar altında polimer pik akımındaki artış ve monomer pik akımındaki azalma 50 döngü boyunca düzenli olarak devam etti. Bu nedenle, PBPB filminin GCE yüzeyi üzerine elektropolimerizasyon süreci 50. döngüde sonlandırıldı.

4.2.1.6. Optimize Edilmiş Koşullarda PBPB/GCE'nin Hazırlanması

Destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen iyon, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı optimize edildikten sonra BPB'nin GCE yüzeyi üzerine elektropolimerizasyonunun en kontrollü şekilde, 1.75 mM monomer içeren pH 5.9 FT + 0.05 M NaNO₃ çözeltisinde -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 50 döngülü CV ile elde edildiğine karar verildi. Şekil 30, bu koşullar altında yapılan BPB elektropolimerizasyonunun voltamogramını göstermektedir. Şekil 30'da ekli küçük şekilde görüldüğü gibi, elektrokimyasal polimerizasyon süreci monomerin +0.76 V'deki (Şekil 30-ekli şekil, kırmızı renkli 1. döngü) tersinmez yükseltgenme piki ile başladı. Bu döngüde herhangi bir polimer piki görülmedi. Monomere ait olan bu anodik pikin akım değeri, artan döngü sayısı ile birlikte düzenli olarak azaldı. İkinci döngüden itibaren, monomer pikinin sol tarafında +0.18 V civarında bir yükseltgenme/indirgenme çifti ve +0.33 V civarında ise ikinci bir yükseltgenme/indirgenme çifti gözlemlendi (Şekil 30-ekli şekil, mavi renkli 50. döngü). Polimerin yükseltgenme/indirgenme sürecine karşılık gelen bu iki redoks çiftinin pik akımları 50 döngü boyunca her döngüde düzenli olarak arttı ve pik potansiyelleri daha pozitif yöne doğru kaydı.



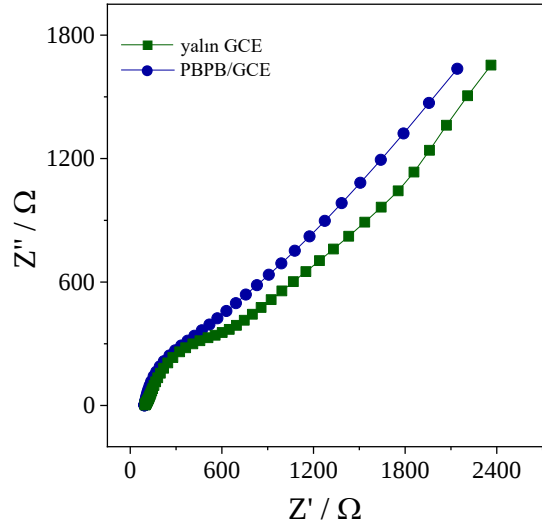
Şekil 30. PBPB/GCE hazırlamak için 0.05 M NaNO₃ içeren pH 5.9 FT içerisindeki 1.75 mM BPB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s⁻¹, döngü sayısı 50. Ekli şekil: 1. döngü (kırmızı) ve 50. döngü (mavi)

4.2.2. PBPB/GCE'nin Karakterizasyonu

Bölüm 4.2.1.6'ya göre hazırlanan PBPB/GCE ve yalın GCE'nin karakterizasyonu CV ve EIS yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Yalın ve polimer film modifiyeli elektrotların elektroaktif yüzey alanları, 0.1 M KCl içeren 1.5 mM Fe(CN)₆^{-3/-4} çözeltisinde, tarama hızı 10 ile 300 mV s⁻¹ arasında değiştirilerek tek döngülü CV yöntemiyle incelendi. Hesaplamalar, Bölüm 2.9.1'de verilen Eşitlik 3'teki Randles-Sevcik eşitliği kullanılarak yapıldı. Buna göre, yalın GCE ve PBPB/GCE'nin elektroaktif yüzey alanları sırasıyla 0.0705 cm² ve 0.1375 cm² olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuç PBPB filmi ile kaplanan GCE'nin elektroaktif yüzey alanının yalın GCE'ye göre 1.95 kat arttığını gösterdi.

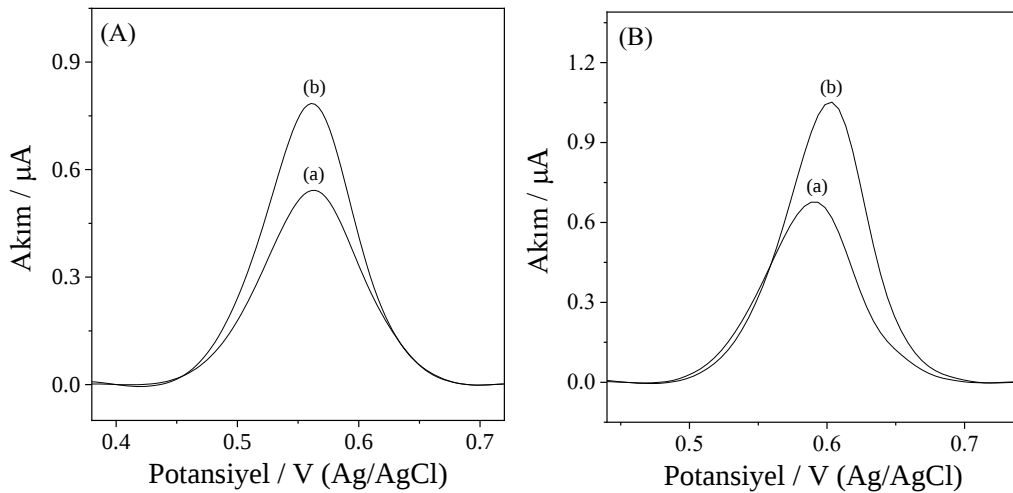
Yalın ve polimer modifiyeli elektrotların arayüzey özellikleri, 0.1 M KCl içeren 1.5 mM Fe(CN)₆^{-3/-4} çözeltisinde EIS yöntemi ile incelendi ve Nyquist grafikleri elde edildi. Şekil 31'de hem PBPB/GCE hem de yalın GCE için +0.25 V potansiyelde elde edilen Nyquist grafikleri görülmektedir. Yalın GCE ve PBPB/GCE'nin +0.25 V'deki yarı dairelerinden elde edilen R_{ct} değerleri, Nyquist grafikleri uygun devre ile modellendikten sonra sırasıyla 894.1 Ω ve 551.8 Ω olarak bulundu.



Şekil 31. 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisinde kaydedilen yalın GCE ve PBPB/GCE'nin Nyquist eğrileri. Frekans aralığı: 0.1–10⁵ Hz. Uygulanan potansiyel: +0.25 V. Genlik: 0.01 V

4.2.3. PBPB/GCE ile Melatoninin Elektrokimyasal Analizi

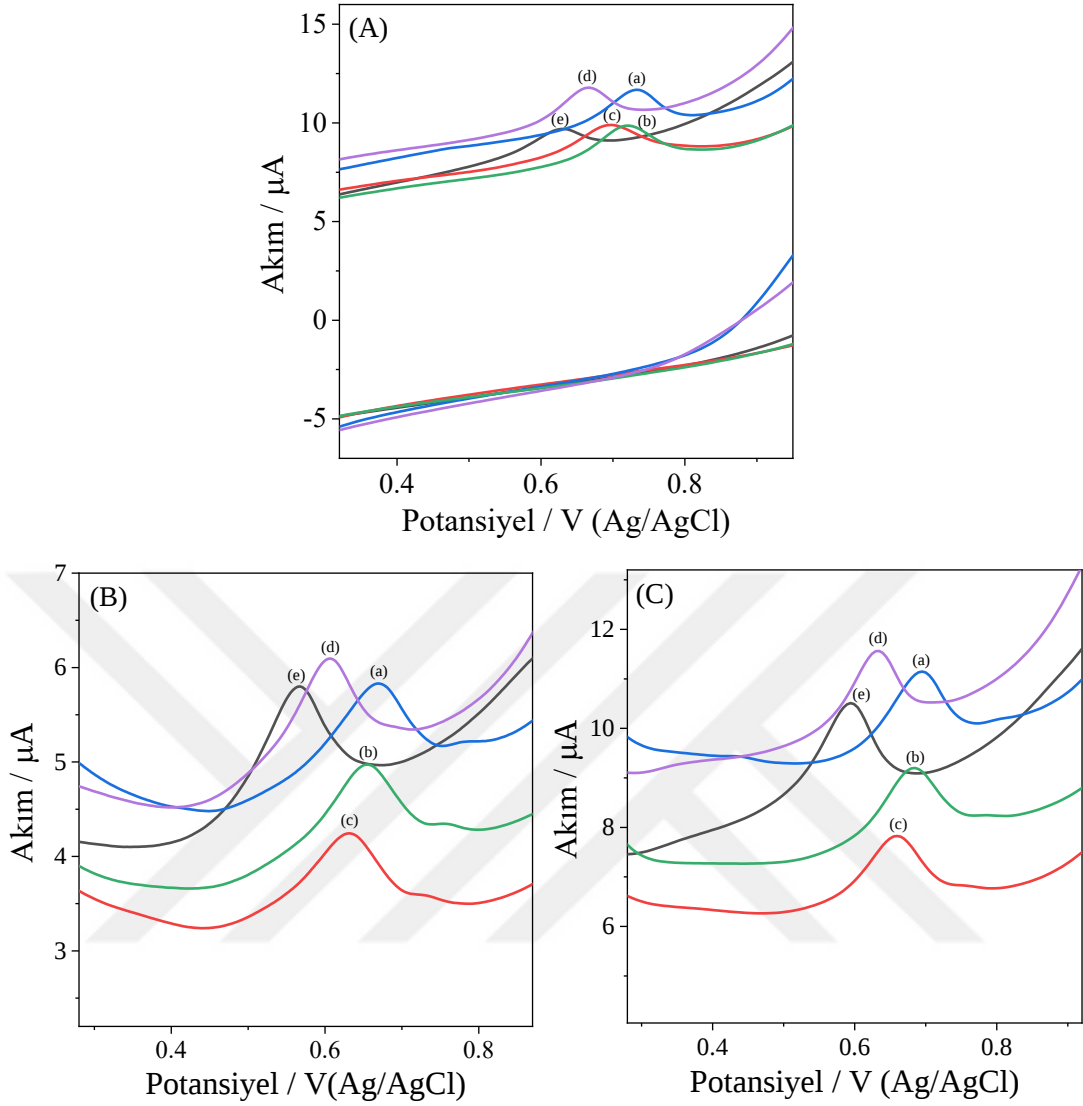
Melatoninin elektrokimyasal analiz çalışması için yalın GCE ve PBPB/GCE kullanılarak DPV ve SWV yöntemleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Bu amaçla, DPV ve SWV yöntemleri için pH 8.0 BRT içerisinde 8.0×10^{-6} M melatonin içeren çalışma çözeltileri ile diferansiyel puls ve kare dalga voltamogramları elde edildi (Şekil 32). PBPB/GCE ile elde edilen melatonin pik akım değeri, yalın GCE'den DPV için yaklaşık 1.59 kat, SWV için ise yaklaşık 1.54 kat daha yüksekti.



Şekil 32. pH 8.0 BRT içerisindeki 8.0×10^{-6} M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltilmesi yapılmış (A) diferansiyel puls ve (B) kare dalga voltamogramları. (a) Yalın GCE ve (b) PBPB/GCE

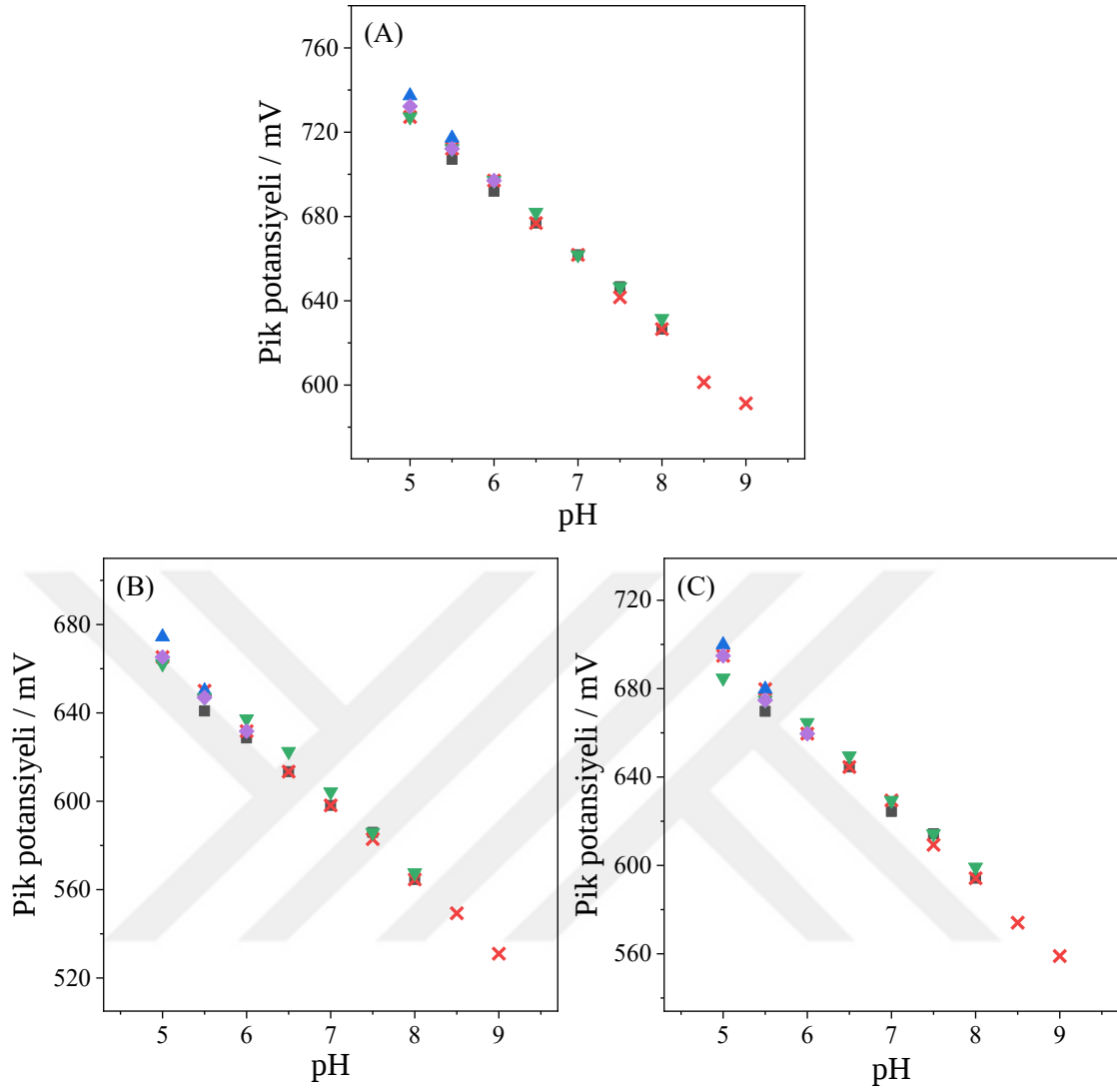
4.2.3.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi

Melatoninin PBPB/GCE ile elektrokimyasal analizi için en uygun destek elektrolit türünün ve pH'nın belirlenebilmesi için pH taraması yapıldı. Bunun için, pH değerleri 5.0 ve 5.5 olan AT, pH'sı 5.5 ile 8.0 arasında yarım birimde bir değişen FT, pH'sı 5.0 ile 9.0 arasında yarım birimde bir değişen BRT, pH'sı 5.0 ile 6.0 arasında yarım birimde bir değişen ST ve pH'sı 5.0 ile 8.0 arasında yarım birimde bir değişen McT içerisinde 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çalışma çözeltileri hazırlanarak CV, DPV ve SWV yöntemleri ile voltamogramlar alındı. PBPB filmlerinin stabilitesini korumak amacıyla pH 5.0'dan daha asidik ve pH 9.0'dan daha alkali tamponlar kullanılmadı. Şekil 33'te melatoninin farklı tampon çözeltiler içerisindeki döngülü, diferansiyel puls ve kare dalga voltamogramları verilmektedir. Şekil 33A'daki döngülü voltamogramlarda yükseltgenme yönünde melatoninin bir piki gözlenirken indirgenme yönünde herhangi bir pik gözlenmedi.



Şekil 33. (a) pH 5.0 ST, (b) pH 5.5 AT, (c) pH 6.0 FT, (d) pH 7.0 McT ve (e) pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramları

Destek elektrolitlerin melatoninin pik potansiyeli üzerindeki etkisi Şekil 34'te gösterildi. Şekil 34'e göre, pH 5.0 ile 9.0 arasında pH arttıkça pik potansiyelinde daha negatif potansiyele doğru bir kayma gözlemlendi. Bu pH aralığında doğrusallıkta herhangi bir kırılma noktası gözlemlenmedi.



Şekil 34. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT ($\blacktriangle$), ST ($\blacklozenge$), FT ($\blacksquare$), McT ($\blacktriangledown$) ve BRT ($\times$) içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri

pH 5.0 ile 9.0 arasında melatonin pik potansiyelinin (E_p) pH'ya karşı doğrusallık grafiklerine ait denklemler Eşitlik 9–11'de verildi:

$$E_p \text{ (mV)} = 905.1 - 35.1 \text{ pH} \text{ (} r = 0.997, \text{ CV için)} \quad (9)$$

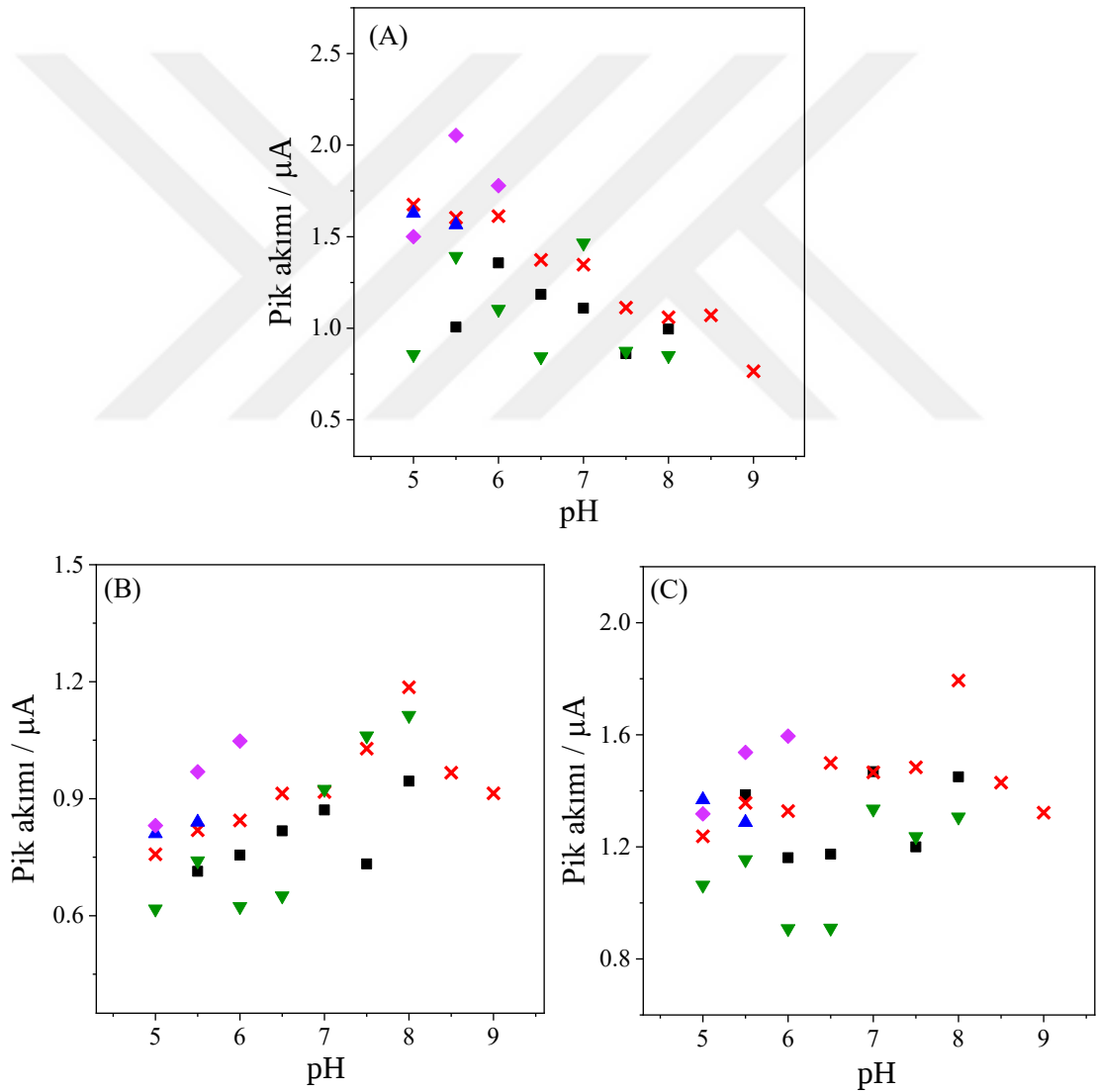
$$E_p \text{ (mV)} = 832.7 - 33.5 \text{ pH} \text{ (} r = 0.999, \text{ DPV için)} \quad (10)$$

$$E_p \text{ (mV)} = 866.9 - 34.2 \text{ pH} \text{ (} r = 0.999, \text{ SWV için)} \quad (11)$$

E_p – pH grafiklerinin pH 5.0 ile 9.0 aralığında elde edilen eğim değerleri, CV, DPV ve SWV yöntemleri için sırasıyla -35.1, -33.5 ve -34.2 mV pH^{-1} 'dir. Bu eğim değerleri

-59 mV pH⁻¹ olan teorik değerin yaklaşık yarısı kadardır ve bu da hız belirleme adımında iki elektron ve bir proton transferinin gerçekleştiğini göstermektedir (92, 201, 202).

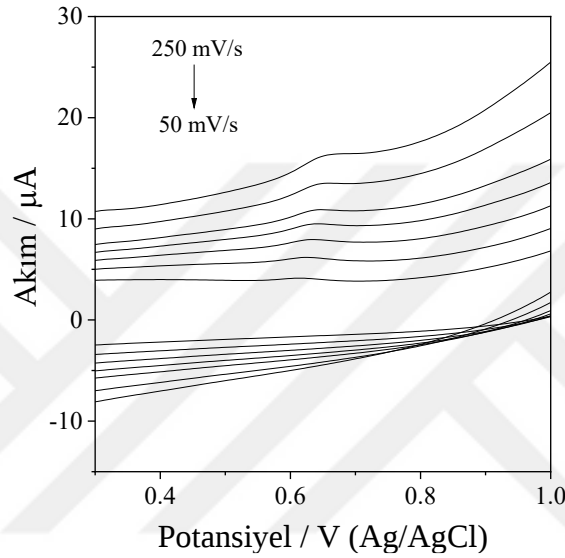
Melatoninin elektrokimyasal analizi için en uygun destek elektrolit türü ve pH'sına, CV, DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak yapılan pH taramasında elde edilen melatonin pik akım değerlerine ve piklerin simetrisine bakılarak karar verildi. Melatoninin pik akım değerleri her yöntem için ayrı ayrı pH'ya karşı grafiğe geçirildi (Şekil 35). Buna göre, en yüksek pik akımına sahip en simetrik melatonin piklerinin tüm yöntemlerde pH 8.0 BRT ortamında elde edildiği görüldü.



Şekil 35. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT ($\blacktriangle$), ST ($\blacklozenge$), FT ($\blacksquare$), McT ($\blacktriangledown$) ve BRT ($\times$) içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin pH'ya karşı pik akımı grafikleri

4.2.3.2. Tarama Hızı

Melatoninin PBPB/GCE yüzeyindeki yükseltgenme reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü mü difüzyon kontrollü mü olduğuna karar vermek amacıyla hız taraması çalışması gerçekleştirildi. Bunun için pH 8.0 BRT içerisinde 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çalışma çözeltisi hazırlanarak 250 mV s^{-1} 'den 50 mV s^{-1} 'e değişen tarama hızlarında CV yöntemi ile tek döngülü voltamogramlar alındı (Şekil 36).



Şekil 36. pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çözeltiden CV yöntemi ile alınan tek döngülü voltamogramlar

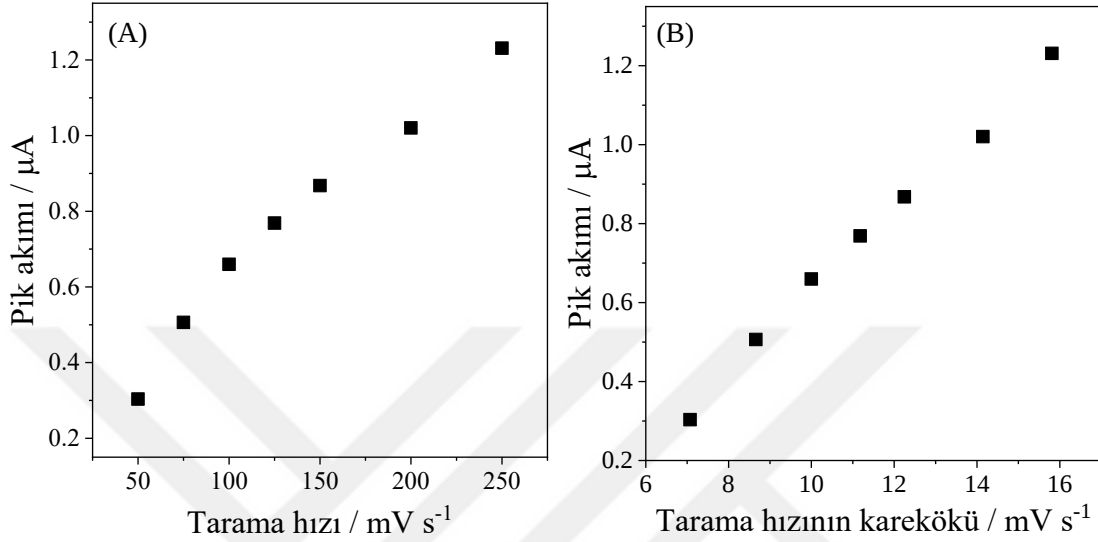
Uygulanan tarama hızına (v) ve tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) karşı CV yöntemi ile elde edilen melatonin pik akımı (I_p) değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 37). Şekil 37A'da görüldüğü gibi $I_p - v$ grafiğinde bir doğrusallığın elde edilemediği, fakat Şekil 37B'deki $I_p - v^{1/2}$ grafiğinde yüksek korelasyon katsayısı ile birlikte doğrusallık olduğu görüldü. Elde edilen doğrusal grafiğin regresyon denklemi Eşitlik 12'de verilmiştir.

$$I_p (\mu\text{A}) = 0.1020 v^{1/2} (\text{m V s}^{-1}) - 0.3869 (r = 0.994) \quad (12)$$

Uygulanan tarama hızının logaritmasına ($\log v$) karşı melatoninin anodik pik potansiyeli (E_p) değerleri de ayrıca grafiğe geçirildi ve elde edilen grafikte bir doğrusallık olduğu görüldü. Elde edilen doğrusal grafiğin regresyon denklemi Eşitlik 13'te verilmiştir. Tersinmez bir sistem için Laviron teorisine (203) göre, α yük transfer katsayısı ve n elektron sayısı olmak üzere αn , $E_p - \log v$ grafiğinin eğiminden hesaplanmaktadır. Tersinmez bir

sistem için α değerinin 0.5 olduğu varsayımıyla, melatonin için elektron sayısı 2.21 olarak hesaplandı (161, 170).

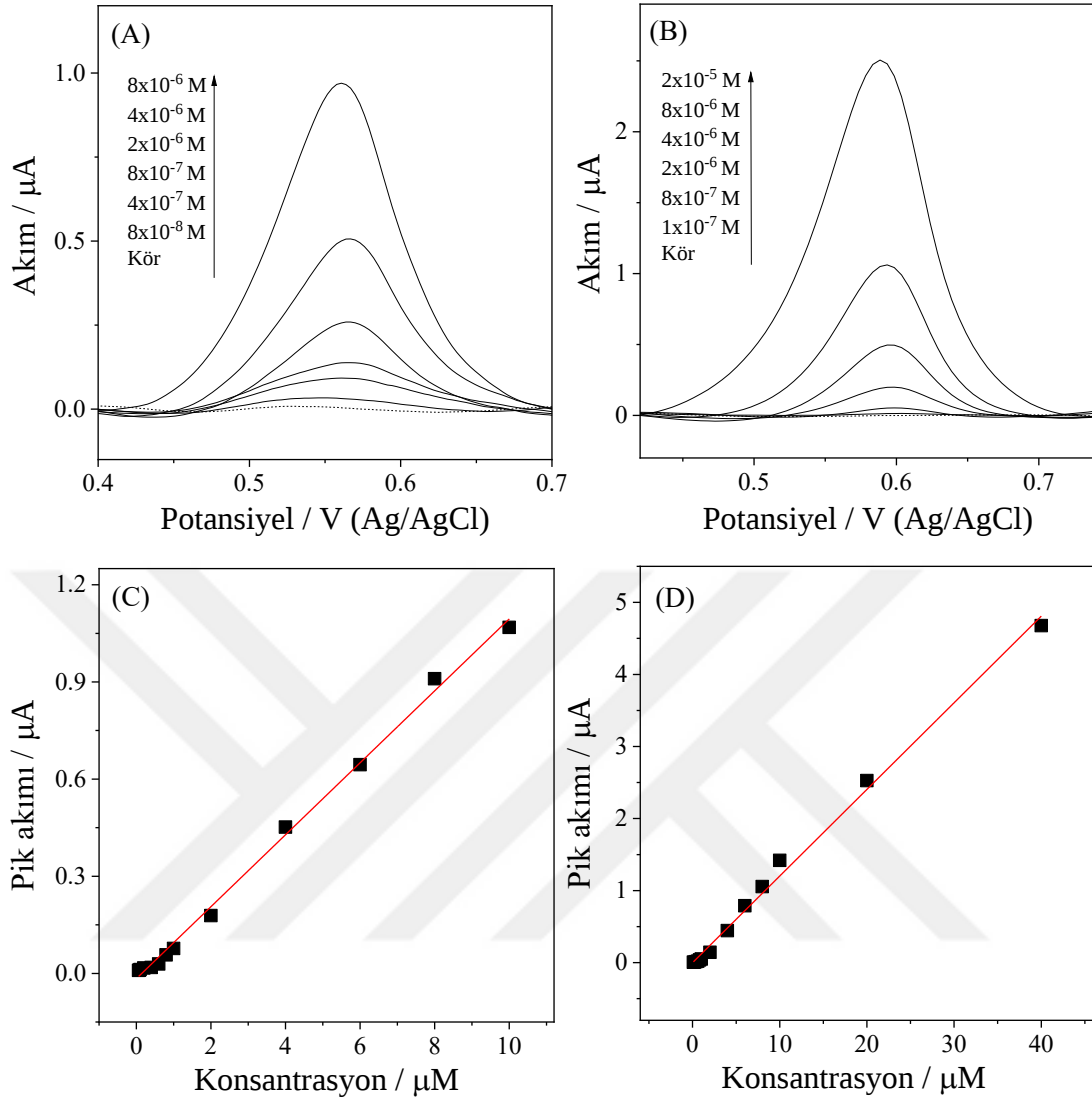
$$E_p \text{ (V)} = 0.054 \log v \text{ (V s}^{-1}\text{)} + 0.522 \text{ (} r = 0.973 \text{)} \quad (13)$$



Şekil 37. pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin CV yöntemi ile elde edilen (A) $I_p - v$ ve (B) $I_p - v^{1/2}$ grafikleri

4.2.3.3. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları

Melatoninin kantitatif analizi için DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak kalibrasyon çalışması gerçekleştirildi. Bu amaçla hem DPV hem de SWV yöntemleri için pH 8.0 BRT içerisinde 1.0×10^{-8} ile 1.0×10^{-4} M aralığındaki 21 farklı konsantrasyon için saf melatonin çalışma çözeltileri hazırlandı. Alınan ölçümler sonucunda, pik akım değeri okunabilen ilk melatonin derişimi DPV yöntemi için 6.0×10^{-8} M ve SWV yöntemi için 1.0×10^{-7} M oldu. DPV ve SWV yöntemleri için melatonin konsantrasyonundaki artış ile pik akımının doğrusal değişimi Şekil 38’de ve bu derişim aralıklarındaki kalibrasyon grafiklerinin regresyon analizi verileri Tablo 15’te verilmiştir.



Şekil 38. PBPB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren çalışma çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör

Tablo 15. Melatoninin PBPB/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV	SWV
Pik potansiyeli (mV)	569	593
Doğrusal aralık (μM)	0.06 – 10	0.1 – 40
Eğim ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.111 ± 0.002	0.120 ± 0.003
Kesim noktası (μA)	-0.0161 ± 0.0079	0.0001 ± 0.0341
Korelasyon katsayısı, r	0.997	0.995
Teşhis sınırı, LOD (nM)	17.0	29.9
Tayin sınırı, LOQ (nM)	51.6	90.5

Geliştirilen yöntemlerin kesinliğini değerlendirebilmek amacıyla tekrar edilebilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için pH 8.0 BRT içerisinde DPV ve SWV için 6.0×10^{-6} M melatonin çalışma çözeltileri hazırlanarak gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. Her iki yöntem için de aynı konsantrasyonda üçer adet farklı melatonin çözeltilerinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli verilerinin %RSD oranları hesaplandı. Veriler ve sonuçlar Tablo 16’da verildi.

Tablo 16. Melatoninin PBPB/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPV</u>		<u>SWV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.570	0.570	0.599	0.593
		0.570	0.570	0.588	0.593
		0.567	0.573	0.593	0.583
		0.570	0.567	0.593	0.599
		0.567	0.567	0.593	0.599
	Ortalama (V)	0.569	0.569	0.593	0.593
	s	0.0017	0.0026	0.0036	0.0062
	%RSD	0.29	0.45	0.60	1.04
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.6271	0.6268	0.8004	0.8216
		0.6264	0.6313	0.8146	0.8131
		0.6273	0.6244	0.8121	0.8133
		0.6289	0.6271	0.8057	0.8004
		0.6230	0.6273	0.8204	0.8057
	Ortalama (μ A)	0.6266	0.6274	0.8107	0.8108
	s	0.0022	0.0025	0.0078	0.0081
	%RSD	0.35	0.39	0.96	1.00

4.2.3.4. Farmasötik Dozaj Formundan Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğunu değerlendirebilmek amacıyla melatoninin farmasötik preparatlardan tayini ve geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi. Farmasötik preparatlardan tayin çalışması için, tablet dozaj formundan hazırlanan pH 8.0 BRT içerisindeki melatoninin DPV ve SWV için 6.0×10^{-6} M’lık çalışma çözeltileri hazırlandı. Her iki yöntem için de aynı konsantrasyonda üçer adet farklı melatonin çözeltilerinden beş adet pik akımı değeri elde edildi. Pik akımı değerleri üzerinden melatonin miktarı hesaplandı

ve tablet dozaj formunda beyan edilen miktar ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. PBPB/GCE kullanılarak DPV ve SWV ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri

		DPV	SWV
Farmasötik preparatlardan tayin	Tablette beyan edilen melatonin miktarı (mg)	3.000	3.000
	Bulunan melatonin miktarları (mg)	3.089	3.088
		3.096	3.081
		3.082	3.074
		3.107	3.084
		3.095	3.091
	Bulunan ortalama melatonin miktarı (mg)	3.094	3.084
	s	0.0092	0.0066
	%RSD	0.30	0.21
	%Bağıl hata	3.13	2.79

Geri kazanım çalışmasında DPV ve SWV yöntemleri için melatonin tablet dozaj formundan hazırlanan 6.0×10^{-6} M melatonin çözeltisi üzerine toplam melatonin konsantrasyonu 8.0×10^{-6} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden ilave edildi. Son konsantrasyonları DPV ve SWV için 8.0×10^{-6} M olan çözeltilerden üçer adet hazırlanarak voltamogramlar alındı ve beşer adet pik akımı değerleri üzerinden hesaplanan %RSD ve %geri kazanım verileri Tablo 18’de verilmiştir.

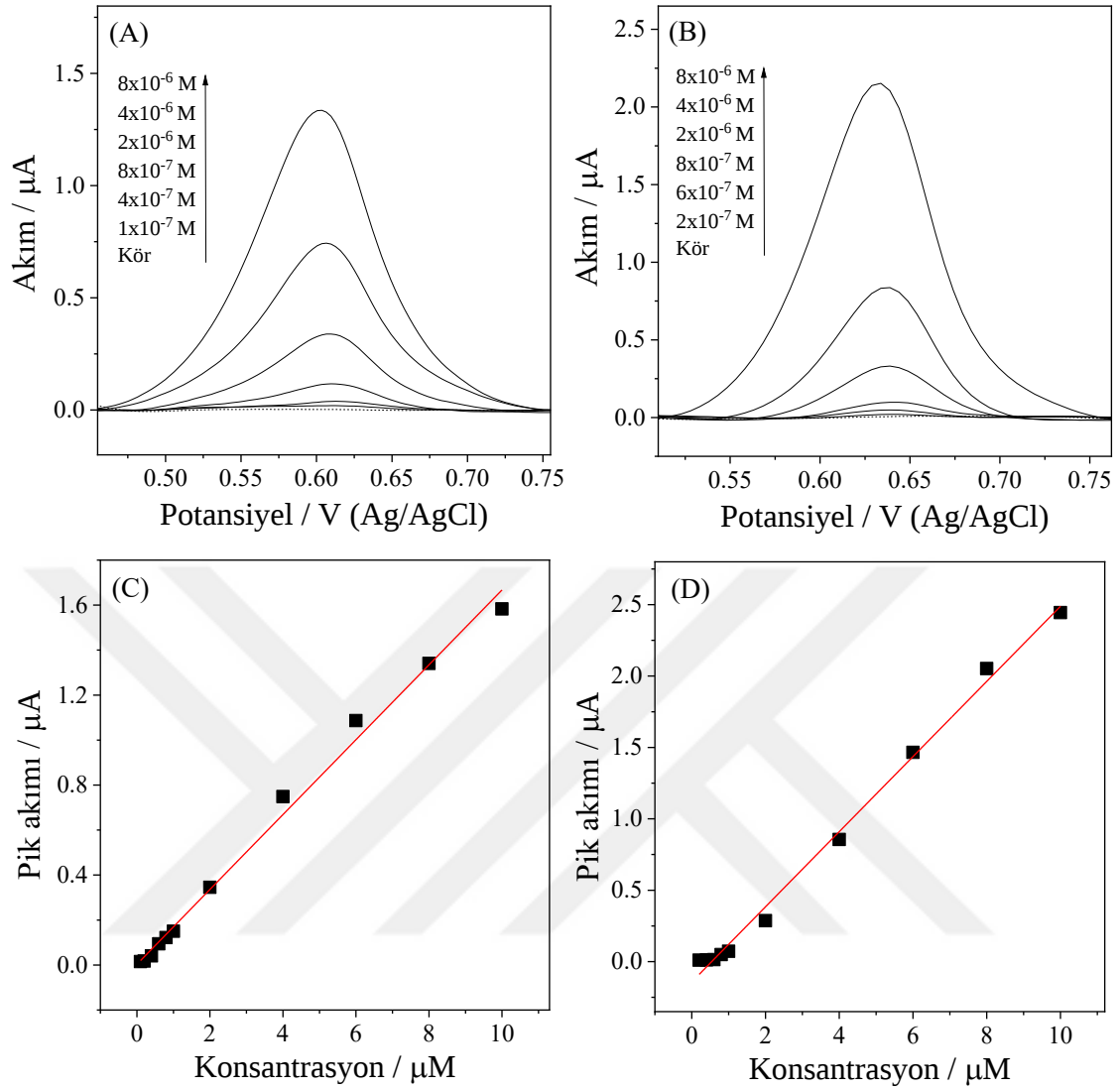
Tablo 18. PBPB/GCE kullanılarak DPV ve SWV ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen geri kazanım çalışması verileri

	DPV	SWV
İlave edilen melatonin konsantrasyonu (μM)	2.000	2.000
Bulunan melatonin konsantrasyonu (μM)	2.011	2.008
	2.002	2.016
	1.995	2.003
	1.995	2.016
	2.005	2.021
Bulunan ortalama melatonin konsantrasyonu (μM)	2.002	2.013
Ortalama geri kazanım (%)	100.08	100.65
s	0.34	0.36
%RSD	0.34	0.35
%Bağıl hata	0.08	0.65
t-testi		0.03
F-testi		0.93

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

4.2.3.5. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması

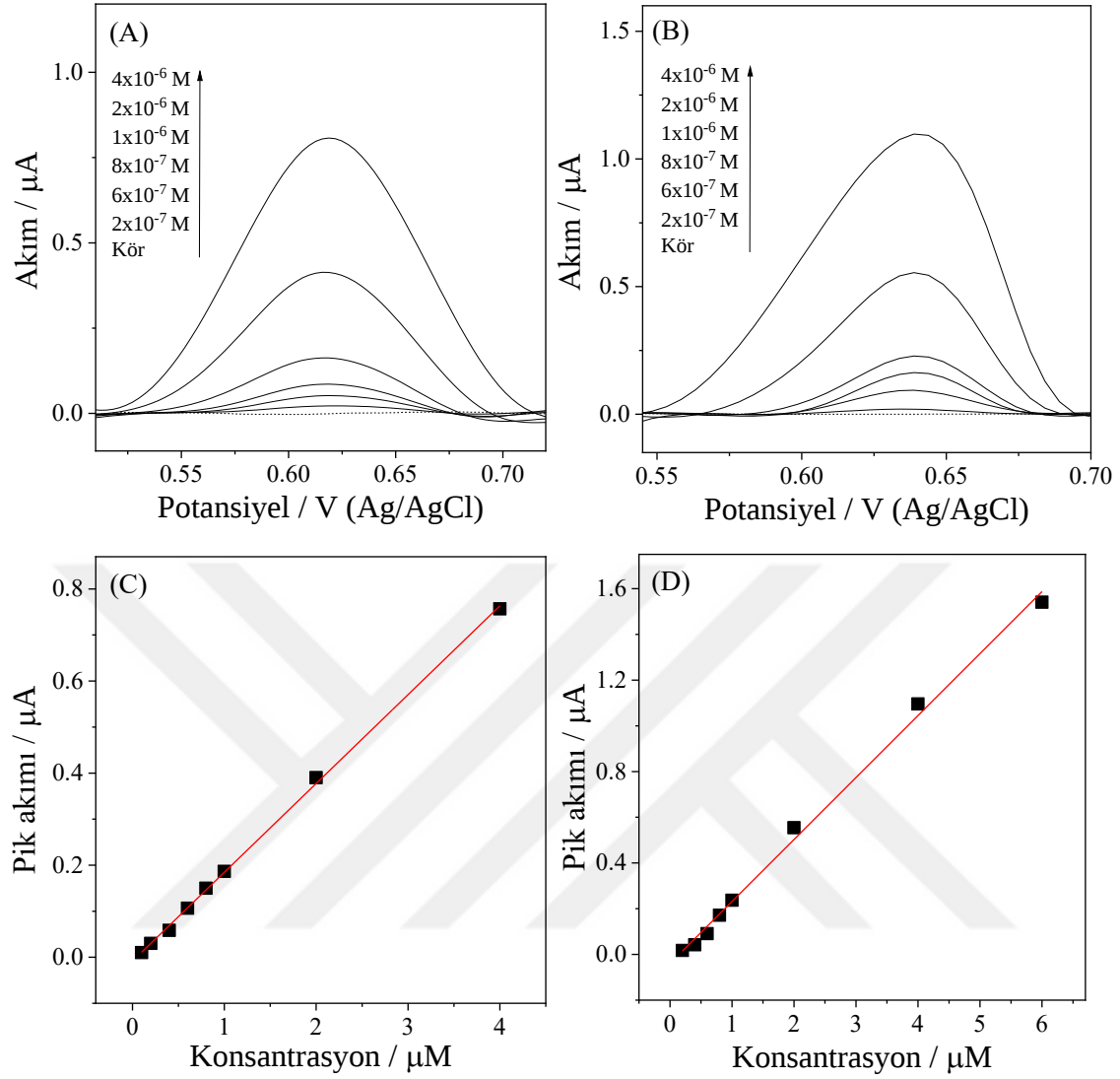
Geliştirilen yöntemlerle insan serumu ve yapay idrar çözeltisi örneklerinden melatonin tayini için çalışmalar gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak Bölüm 3.4.5'te açıklandığı şekilde serum ve yapay idrar çözeltileri hazırlandı. DPV ve SWV ile yapılan kalibrasyon çalışmalarından elde edilen doğrusal aralıklar göz önüne alınarak pH 8.0 BRT içerisinde melatonin içeren serum ve yapay idrar çözeltileri ile kalibrasyon çalışmaları yapıldı. Serum ve yapay idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlarda pik akımının okunabildiği en düşük konsantrasyonlar DPV için 1.0×10^{-7} M ve SWV için 2.0×10^{-7} M olarak bulundu. Şekil 39'da serum çözeltilerinden ve Şekil 40'ta yapay idrar çözeltilerinden DPV ve SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramlar ve melatonin konsantrasyonuna karşı pik akımı grafikleri verilmiştir. Ayrıca, serum ve yapay idrar çözeltilerinin kalibrasyon grafiklerinin regresyon analizi sonuçları da sırasıyla Tablo 19 ve 20'de verilmiştir.



Şekil 39. pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör

Tablo 19. PBPB/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV	SWV
Pik potansiyeli (mV)	603	634
Doğrusal aralık (μM)	0.1 – 10	0.2 – 10
Eğim ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.166 ± 0.005	0.263 ± 0.006
Kesim noktası (μA)	0.003 ± 0.020	0.142 ± 0.031
Korelasyon katsayısı, r	0.993	0.995
Teşhis sınırı, LOD (nM)	31.5	57.6
Tayin sınırı, LOQ (nM)	95.5	174.4



Şekil 40. pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden (A ve C) DPV ve (B ve D) SWV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör

Tablo 20. PBPB/GCE ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV	SWV
Pik potansiyeli (mV)	610	635
Doğrusal aralık (μM)	0.1 – 4	0.2 – 6
Eğim ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.193 ± 0.002	0.271 ± 0.007
Kesim noktası (μA)	-0.008 ± 0.004	-0.040 ± 0.019
Korelasyon katsayısı, r	0.999	0.996
Teşhis sınırı, LOD (nM)	34.2	54.3
Tayin sınırı, LOQ (nM)	103.6	164.7

Tekrar edilebilirlik çalışmasına, DPV için 6.0×10^{-6} M saf melatonin içeren serum ve 8.0×10^{-7} M saf melatonin içeren yapay idrar çalışma çözeltileri; SWV için ise 6.0×10^{-6} M saf melatonin içeren serum ve 1.0×10^{-6} M saf melatonin içeren yapay idrar çalışma çözeltileri hazırlanarak başlandı. Her bir yöntem için üçer adet çözeltiden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerleri kullanılarak gün içi ve günler arası %RSD oranları hesaplandı. Tablo 21 ve 22’de sırasıyla serum ve yapay idrar çözeltileri için elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Tablo 21. PBPB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPV</u>		<u>SWV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.603	0.603	0.634	0.634
		0.603	0.603	0.634	0.634
		0.603	0.607	0.634	0.634
		0.603	0.607	0.634	0.634
		0.603	0.607	0.634	0.639
	Ortalama (V)	0.603	0.605	0.634	0.635
	s	0.0001	0.0017	0.0001	0.0029
	%RSD	0.01	0.28	0.01	0.46
Pik akımı	Veriler (μ A)	1.1204	1.0986	1.6330	1.6352
		1.1203	1.1081	1.6300	1.6387
		1.1089	1.1088	1.6376	1.6583
		1.1077	1.1204	1.6417	1.6300
		1.1002	1.1203	1.6572	1.6376
	Ortalama (μ A)	1.1115	1.1112	1.6399	1.6420
	s	0.0087	0.0092	0.0106	0.0146
	%RSD	0.79	0.83	0.65	0.89

Tablo 22. PBPB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPV</u>		<u>SWV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.613	0.613	0.634	0.639
		0.610	0.613	0.639	0.639
		0.610	0.607	0.634	0.634
		0.610	0.610	0.634	0.634
		0.610	0.607	0.634	0.634
	Ortalama (V)	0.610	0.610	0.635	0.636
	s	0.0014	0.0031	0.0023	0.0028
	%RSD	0.22	0.50	0.36	0.43
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.1511	0.1517	0.3034	0.2996
		0.1502	0.1543	0.2989	0.3047
		0.1525	0.1544	0.3006	0.3002
		0.1538	0.1502	0.2984	0.2989
		0.1526	0.1511	0.3006	0.2984
	Ortalama (μ A)	0.1520	0.1523	0.3004	0.3004
	s	0.0014	0.0019	0.0019	0.0025
	%RSD	0.92	1.26	0.65	0.84

Serum örneklerinden yapılan geri kazanım çalışmalarında, DPV ve SWV için 6.0×10^{-6} M melatonin içeren serum çözeltisi üzerine son konsantrasyonu 8.0×10^{-6} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden eklenerek pH 8.0 BRT ile hacme tamamlandı. Yapay idrar örneklerinden geri kazanım çalışmalarında ise DPV için 8.0×10^{-7} M melatonin içeren yapay idrar çözeltisi üzerine son konsantrasyonu 1.0×10^{-6} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden ve SWV için 1.0×10^{-6} M melatonin içeren yapay idrar çözeltisi üzerine son konsantrasyonu 2.0×10^{-6} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden eklenerek pH 8.0 BRT ile hacme tamamlandı. Her bir yöntem için üçer adet hazırlanan serum ve yapay idrar çalışma çözeltilerinden elde edilen değerler sırasıyla Tablo 23 ve 24’te verildi.

Tablo 23. PBPB/GCE kullanılarak DPV ve SWV için 8.0×10^{-6} M melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

	DPV	SWV
İlave edilen saf melatonin konsantrasyonu (μM)	2.000	2.000
Bulunan saf melatonin konsantrasyonu (μM)	1.995	2.023
	1.986	2.023
	2.001	2.010
	2.002	2.014
	2.000	2.013
Geri kazanım		
Bulunan ortalama saf melatonin konsantrasyonu (μM)	1.997	2.017
Ortalama geri kazanım (%)	99.84	100.83
s	0.32	0.30
%RSD	0.32	0.30
%Bağıl hata	-0.16	0.83
t-testi		0.01
F-testi		0.92

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

Tablo 24. PBPB/GCE kullanılarak DPV için 1.0×10^{-6} M ve SWV için 2.0×10^{-6} M melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

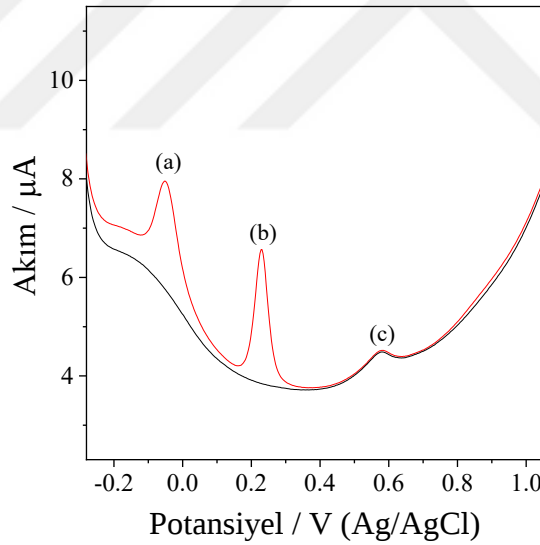
	DPV	SWV
İlave edilen saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.200	1.000
Bulunan saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.201	0.992
	0.202	0.997
	0.198	0.994
	0.201	1.006
	0.200	1.013
Geri kazanım		
Bulunan ortalama saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.200	1.001
Ortalama geri kazanım (%)	100.15	100.07
s	0.57	0.90
%RSD	0.57	0.90
%Bağıl hata	0.15	0.07
t-testi		0.86
F-testi		0.40

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

4.2.3.6. Girişim Çalışması

PBPB/GCE ile geliştirilen voltametrik yöntemlerin melatonine karşı seçiciliği, insan vücut sıvılarında bulunan askorbik asit ve ürik asit endojen maddelerin ve Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , NO_3^- ve SO_4^{2-} iyonlarının varlığında incelendi. Bunun için, 4.0×10^{-6} M melatonin içeren pH 8.0 BRT içerisine her biri 4.0×10^{-4} M olacak şekilde NaCl, KNO₃, CaCl₂ ve K₂SO₄ tuzları eklendi. Bu tuzların ilavesinden sonra melatonin pik akımındaki değişimin $\pm\%1.13$ 'ten az olduğu görüldü.

Vücut sıvılarında bulunan ve yaygın olarak girişim yapan türlerden askorbik asit ve ürik asit, çözeltideki konsantrasyonları sırasıyla 8.0×10^{-5} M ve 8.0×10^{-6} M olacak şekilde, 3.0×10^{-6} M melatonin içeren pH 8.0 BRT çözeltisine eklendi. Şekil 41'de görüldüğü gibi, -0.05 V'de askorbik asite, +0.23 V'de ürik asite ve +0.57 V'de melatonine ait iyi tanımlanmış üç anodik pik elde edildi. Bu maddelerin ilavesi ile melatonin pik akımındaki değişimin $\pm\%0.12$ 'den az olduğu görüldü.



Şekil 41. PBPB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki (siyah voltamogram) sadece melatonin içeren çözeltiden ve (kırmızı voltamogram) (a) 8.0×10^{-5} M askorbik asit, (b) 8.0×10^{-6} M ürik asit ve (c) 3.0×10^{-6} M melatonin içeren çözeltiden alınan diferansiyel puls voltamogramları

4.2.3.7. PBPB/GCE'nin Stabilité Çalışması

Hazırlanan PBPB/GCE'nin kararlılığını değerlendirmek amacıyla CV ve DPV yöntemleri kullanılarak hem operasyonel hem de zamana karşı stabilité çalışmaları

gerçekleştirildi. Modifiye elektrotun operasyonel stabilitesi için 1.0×10^{-5} M melatonin içeren pH 8.0 BRT çözeltisinde 100 döngülü CV alındı. Buna göre, 100. döngü sonunda elde edilen melatonin pik akımının, ilk döngüdeki değerini %98.9 oranında koruduğu görüldü.

PBPB/GCE'nin uzun süreli stabilitesi, 4.0×10^{-6} M melatonin içeren pH 8.0 BRT çözeltisinden DPV yöntemi ile gün aşırı ölçümler alınarak belirlendi. Hazırlanan PBPB/GCE, ortam koşullarından etkilenmemesi amacıyla, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklandı. Analiz sonuçlarına göre PBPB/GCE'nin 10. güne kadar stabilitesini %94.9 oranında koruduğu belirlendi.

4.2.3.8. PBPB/GCE'nin Yeniden Üretilirlik Çalışması

PBPB/GCE'nin yeniden üretilirliği, farklı günlerde birbirinden bağımsız olarak hazırlanan beş elektrot kullanılarak 6.0×10^{-6} M melatonin içeren pH 8.0 BRT çözeltisinden DPV ile elde edilen pik akım değerleri üzerinden belirlendi. Elde edilen beş adet pik akım değeri ile %RSD oranı 0.54 olarak hesaplandı.

4.3. PBTB/GCE ile Elde Edilen Bulgular

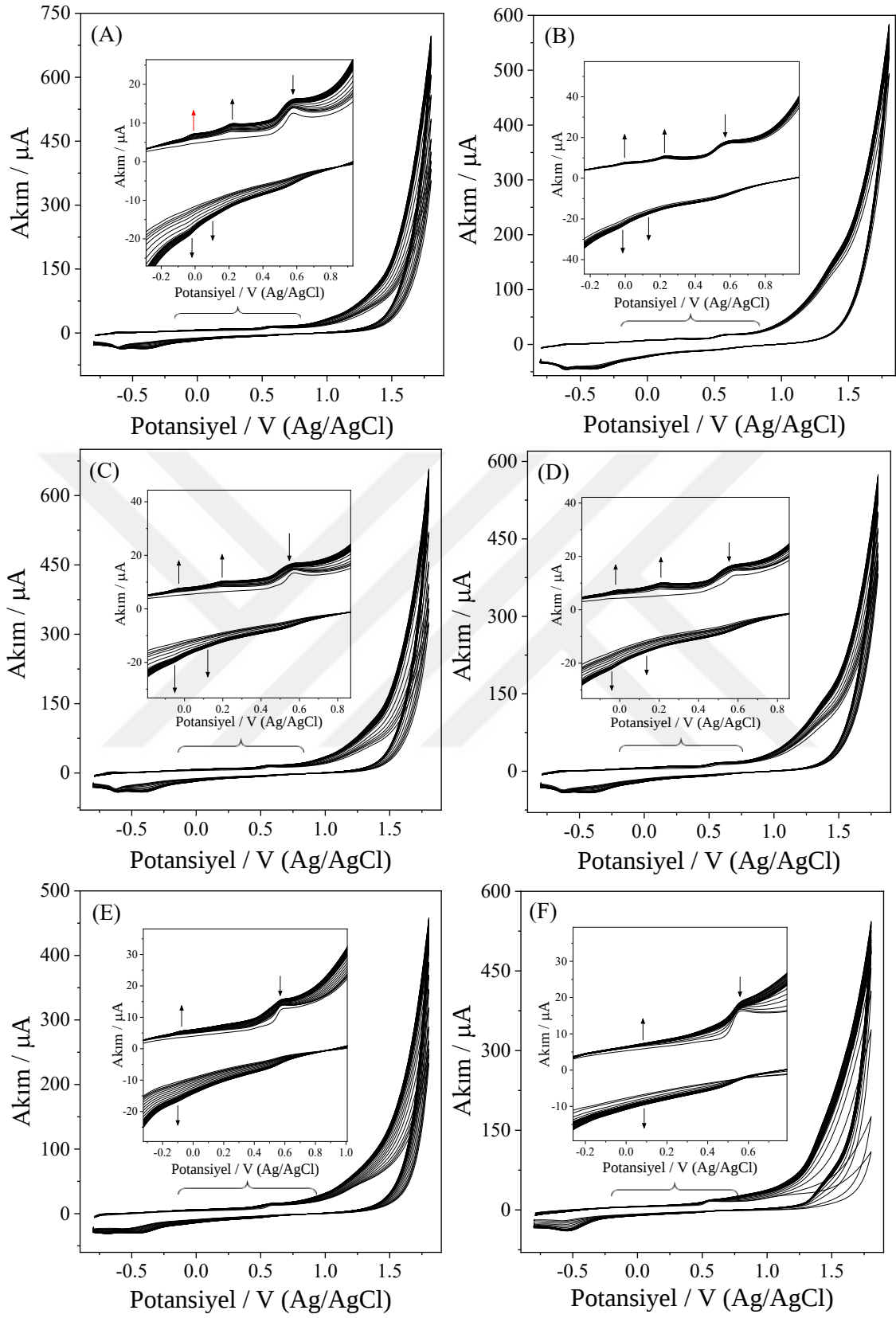
4.3.1. Poli(Bromtimol Mavisi) Filminin Sentezi

PBTB filmi GCE yüzeyi üzerine CV yöntemi ile elektrokimyasal olarak sentezlenerek PBTB/GCE hazırlandı. En hızlı ve kontrollü elektropolimerizasyon için öncelikle sentez sırasında kullanılan koşullar optimize edildi. Bu amaçla, destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen farklı iyonların etkisi, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı gibi çeşitli parametreler incelendi.

4.3.1.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi

Destek elektrolitin türü ve pH'sı polimer filmin sentezinde önemli bir etkiye sahip olduğundan öncelikle bu parametreler optimize edildi. Bunun için, pH 7.5–8.0 FT, pH 7.5–11.0 BRT ve pH 7.5–8.0 McT içerisinde 10 mL 0.50 mM BTB çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak, literatürde boyar maddelerin elektropolimerizasyonunda sıklıkla tercih edilen parametreler seçildi ve böylece, -0.8 ile +1.8 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s^{-1} tarama hızında 30 döngülü voltamogram alınarak GCE yüzeyinde PBTB filminin sentezi gerçekleştirildi. BTB'nin 7.5'in altındaki pH'larda çözünmemesi nedeniyle bu pH'dan daha düşük olan tampon çözeltiler kullanılmadı. Şekil 42'de farklı tamponlar içerisindeki 0.50 mM BTB içeren çözeltilerden elde edilen 30 döngülü elektropolimerizasyon voltamogramları verilmiştir. Buna göre, voltamogramlarda

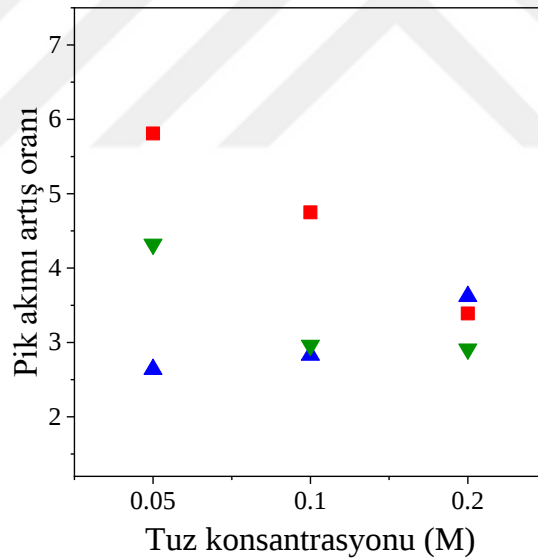
en pozitif potansiyelde bulunan ve her döngüde akım değeri azalan tersinmez yükseltgenme pikinin BTB monomerine ve monomere ait pikin solunda daha negatif potansiyelde bulunan ve her döngüde akım değeri artan yükseltgenme/indirgenme piklerinin ise PBTB'ye ait olduğuna karar verildi. Piklere karar verildikten sonra polimer pik akımlarının her bir döngüdeki artış oranları belirlenerek en yüksek artışın meydana geldiği ortam tespit edildi. Artış oranları, tüm polimer optimizasyonu çalışmaları için, polimere ait daha negatif potansiyeldeki yükseltgenme pikinin son döngüde ölçülen pik akımının, ikinci döngüde ölçülen pik akımına oranı alınarak hesaplandı. Örneğin pH 7.5 McT için bu hesaplama, -0.06 V'de görülen (Şekil 42A, kırmızı ok ile işaretlenmiş) polimere ait yükseltgenme piki üzerinden yapıldı. Bu değerlendirmelere göre, tüm tampon çözeltiler arasında, PBTB redoks piklerinin 30. döngüdeki artış oranının en yüksek olduğu en kontrollü ve en yüksek PBTB film oluşumu pH 7.5 McT içerisinde hazırlanmış olan polimerizasyon çözeltisi ile elde edildi.



Şekil 42. (A) pH 7.5 McT, (B) pH 7.5 FT, (C) pH 8.0 McT, (D) pH 8.0 FT, (E) pH 9.0 BRT ve (F) pH 11.0 BRT içerisindeki 0.50 mM BTB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1} , döngü sayısı 30

4.3.1.2. İyonların Etkisi

Elektropolimerizasyon çözeltisine ilave edilen iyonların bu çalışmadaki polimer filmlerin polimerizasyonu üzerinde herhangi bir elektrokatalitik etkiye sahip olup olmadığını araştırmak amacıyla, elektropolimerizasyon çözeltisi içerisine farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.1 ve 0.2 M) KCl, Na₂SO₄ ve NaNO₃ tuzları eklendi. CV ile -0.8 ile +1.8 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 30 döngülü voltamogram alındı. Buna göre, 0.05 M SO₄⁻² iyonları içeren polimerizasyon çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen elektropolimerizasyonda, polimer pik akımı artış oranının en yüksek olduğu ve SO₄⁻² iyonları eklendiğinde pik akımı artış oranının 1.47 kat arttığı gözlemlendi. İlave edilen diğer iyonların varlığında polimer pik akımı artış oranları SO₄⁻² ile elde edilene göre daha düşük kaldı (Şekil 43). Bu nedenle, BTB'nin elektropolimerizasyonunda destek elektrolit olarak 0.05 M Na₂SO₄ içeren pH 7.5 McT çözeltisinin kullanılmasına karar verildi.

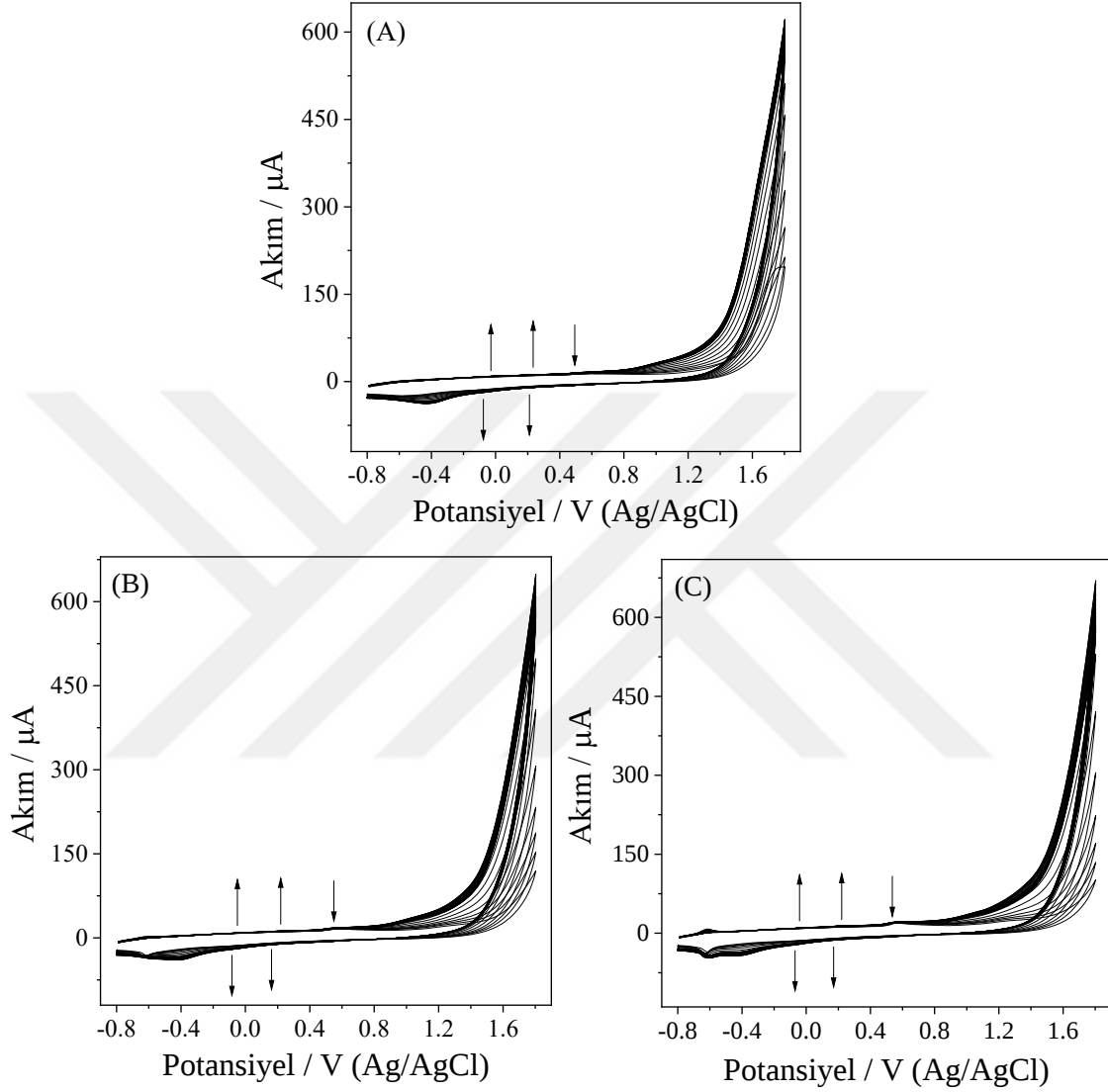


Şekil 43. pH 7.5 McT içerisine ilave edilen tuzların PBTB pik akımı artış oranına etkisi.
■: Na₂SO₄, ▼: NaNO₃, ▲: KCl

4.3.1.3. Monomer Derişimi

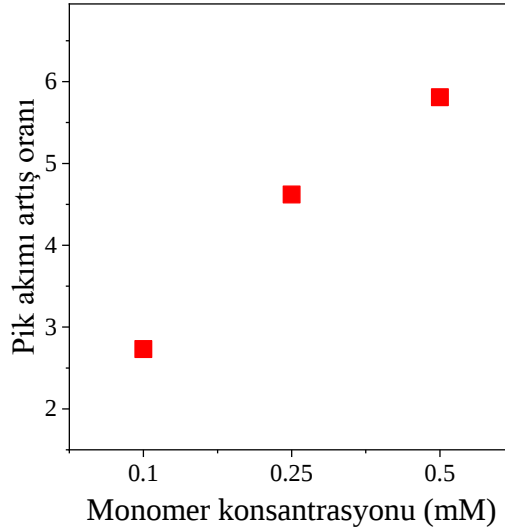
Monomer derişiminin elektropolimerizasyona etkisi de ayrıca incelendi. Bu amaçla 0.05 M Na₂SO₄ içeren pH 7.5 McT çözeltisi içerisine 0.10, 0.25 ve 0.50 mM konsantrasyonlarda BTB monomeri eklendi ve CV yöntemi ile -0.8 ile +1.8 V potansiyel aralığında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 100 mV s⁻¹ tarama hızında 30 döngülü

voltamogram alındı (Şekil 44). BTB'nin çözünme problemi nedeniyle 0.50 mM üzerindeki konsantrasyonlar çalışılmadı.



Şekil 44. 0.05 M Na₂SO₄ içeren pH 7.5 McT içerisindeki (A) 0.10 mM, (B) 0.25 mM ve (C) 0.50 mM BTB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s⁻¹, döngü sayısı 30

Elektropolimerizasyon sonucunda elde edilen verilerden, PBTB redoks piklerinin pik akımı artış oranları 0.10 mM için 2.73 kat, 0.25 mM için 4.62 kat ve 0.50 mM için 5.81 kat olarak hesaplandı (Şekil 45). Buna göre, en yüksek pik akımı artış oranına sahip, en kontrollü ve iyi tanımlanmış PBTB piklerinin 0.50 mM BTB monomeri içeren pH 7.5 McT + 0.05 M Na₂SO₄ çözeltisi içerisinde elde edildiği görüldü (Şekil 44C). Bu nedenle, polimerizasyon için optimum monomer derişiminin 0.50 mM olduğuna karar verildi.



Şekil 45. pH 7.5 McT + 0.05 M Na₂SO₄ içerisindeki elektropolimerizasyonda BTB monomer derişiminin PBTB pik akımı artış oranına etkisi

4.3.1.4. Tarama Hızı

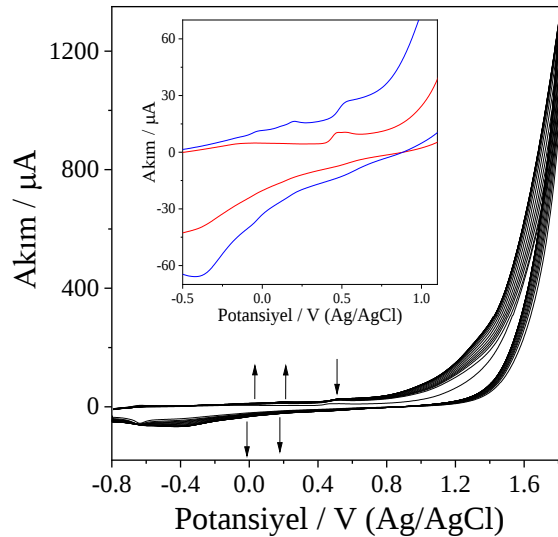
Tarama hızının elektropolimerizasyon sürecine olan etkisini incelemek için 0.50 mM BTB içeren pH 7.5 McT + 0.05 M Na₂SO₄ çözeltisinde CV yöntemi ile -0.8 ile +1.8 V potansiyel aralığında 50 mV s⁻¹ ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 30 döngülü voltamogram alındı. Buna göre, 50 ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında polimerin pik akımı artış oranları sırasıyla 3.78 kat ve 5.81 kat olarak belirlendi. Tarama hızı 50 mV s⁻¹ olarak tutulduğunda polimer pik akımının önemli ölçüde azalması nedeniyle elektropolimerizasyon için optimum tarama hızı 100 mV s⁻¹ olarak seçildi.

4.3.1.5. Döngü Sayısı

Polimerizasyonun sona erdiği döngü sayısını belirlemek için CV yöntemi ile 0.50 mM BTB içeren pH 7.5 McT + 0.05 M Na₂SO₄ çözeltisinde -0.8 ile +1.8 V potansiyel aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 30 döngülü voltamogram alındı ve polimer piklerinin akımındaki artış oranları her döngüden sonra hesaplandı. Buna göre, optimize edilen koşullar altında polimer pik akımındaki artış ve monomer pik akımındaki azalmanın 19. döngüye kadar düzenli olarak devam ettiği ve bundan sonraki döngülerde değişmediği görüldü. Bu nedenle, PBTB filminin GCE yüzeyi üzerine elektropolimerizasyon süreci 18. döngüde sonlandırıldı.

4.3.1.6. Optimize Edilmiş Koşullarda PBTB/GCE'nin Hazırlanması

Destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen iyon, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı optimize edildikten sonra BTB'nin GCE yüzeyi üzerine elektropolimerizasyonunun en kontrollü şekilde, 0.50 mM monomer içeren pH 7.5 McT + 0.05 M Na₂SO₄ çözeltisinde -0.8 ile +1.8 V potansiyel aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 18 döngülü CV ile elde edildiğine karar verildi. Şekil 46, bu koşullar altında yapılan BTB elektropolimerizasyonunun voltamogramını göstermektedir. Şekil 46'da ekli küçük şekilde görüldüğü gibi, elektrokimyasal polimerizasyon süreci monomerin +0.47 V'deki (Şekil 46-ekli şekil, kırmızı renkli 1. döngü) tersinmez yükseltgenme piki ile başladı. Bu döngüde herhangi bir polimer piki görülmeydi. Monomere ait olan bu anodik pikin akım değeri, artan döngü sayısı ile birlikte düzenli olarak azaldı. İkinci döngüden itibaren, monomer pikinin sol tarafında -0.06 V civarında bir yükseltgenme/indirgenme çifti ve +0.17 V civarında ise ikinci bir yükseltgenme/indirgenme çifti gözlemlendi (Şekil 46-ekli şekil, mavi renkli 18. döngü). Polimerin yükseltgenme/indirgenme sürecine karşılık gelen bu iki redoks çiftinin pik akımları 19. döngüye kadar her döngüde düzenli olarak arttı ve pik potansiyelleri daha pozitif yöne doğru kaydı.



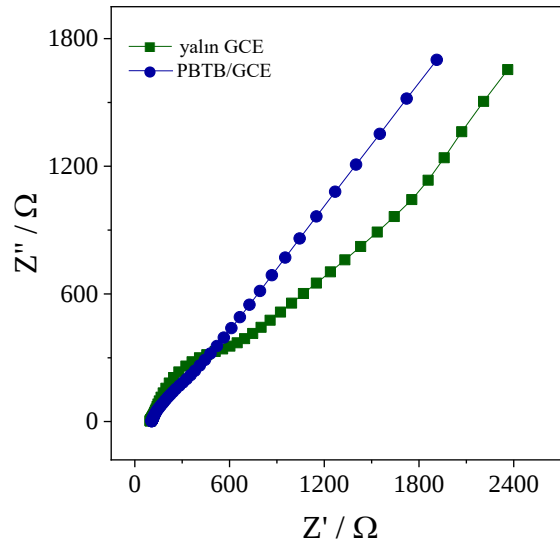
Şekil 46. PBTB/GCE hazırlamak için 0.05 M Na₂SO₄ içeren pH 7.5 McT içerisindeki 0.50 mM BTB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s⁻¹, döngü sayısı 18. Ekli şekil: 1. döngü (kırmızı) ve 18. döngü (mavi)

4.3.2. PBTB/GCE'nin Karakterizasyonu

Bölüm 4.3.1.6.'ya göre hazırlanan PBTB/GCE ve yalın GCE'nin karakterizasyonu CV ve EIS yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Yalın ve polimer film modifiyeli elektrotların elektroaktif yüzey alanları, 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ çözeltisinde, tarama hızı 10 ile 300 mV s^{-1} arasında değiştirilerek tek döngülü CV yöntemiyle incelendi. Hesaplamalar, Bölüm 2.9.1.'de verilen Eşitlik 3'teki Randles-Sevcik eşitliği kullanılarak yapıldı. Buna göre, yalın GCE ve PBTB/GCE'nin elektroaktif yüzey alanları sırasıyla 0.0705 cm^2 ve 0.1241 cm^2 olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuç PBTB filmi ile kaplanan GCE'nin elektroaktif yüzey alanının yalın GCE'ye göre 1.76 kat arttığını gösterdi.

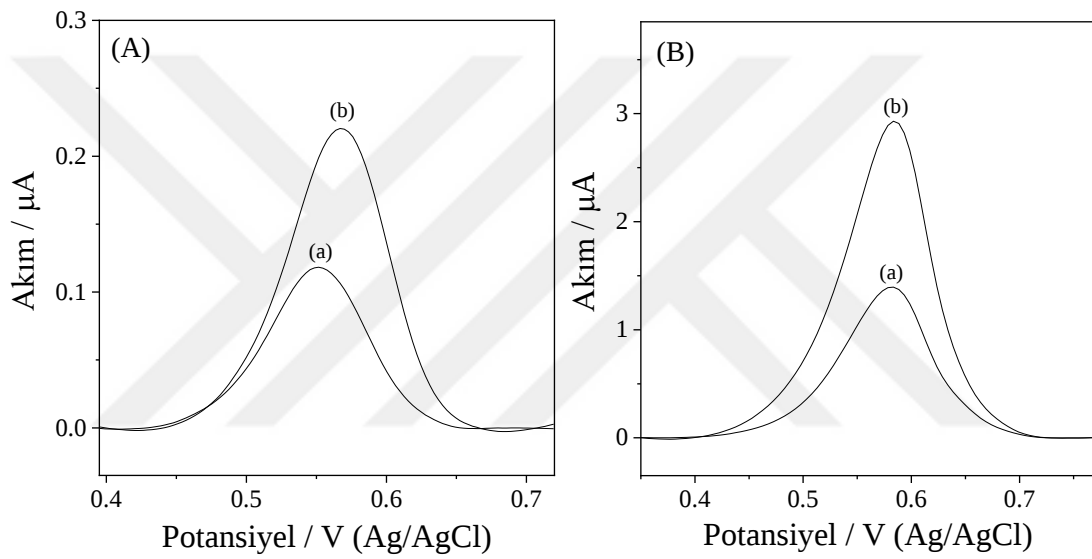
Yalın ve polimer modifiyeli elektrotların arayüzey özellikleri, 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ çözeltisinde EIS yöntemi ile incelendi ve Nyquist grafikleri elde edildi. Şekil 47'de hem PBTB/GCE hem de yalın GCE için +0.25 V potansiyelde elde edilen Nyquist grafikleri görülmektedir. Yalın GCE ve PBTB/GCE'nin +0.25 V'deki yarı dairelerinden elde edilen R_{ct} değerleri, Nyquist grafikleri uygun devre ile modellendikten sonra sırasıyla 894.1 Ω ve 339.7 Ω olarak bulundu.



Şekil 47. 0.1 M KCl içeren 1.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ çözeltisinde kaydedilen yalın GCE ve PBTB/GCE'nin Nyquist eğrileri. Frekans aralığı: 0.1–10⁵ Hz. Uygulanan potansiyel: +0.25 V. Genlik: 0.01 V

4.3.3. PBTB/GCE ile Melatoninin Elektrokimyasal Analizi

Melatoninin elektrokimyasal analiz çalışması için yalnız GCE ve PBTB/GCE kullanılarak DPSV ve SWSV yöntemleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Bu amaçla, pH 8.0 BRT içerisinde DPSV yöntemi için 4.0×10^{-7} M ve SWSV yöntemi için 4.0×10^{-6} M melatonin içeren çalışma çözeltileri kullanılarak diferansiyel puls sıyırma ve kare dalga sıyırma voltamogramları elde edildi (Şekil 48). PBTB/GCE ile elde edilen melatonin pik akım değeri, yalnız GCE'den DPSV için yaklaşık 1.98 kat, SWSV için ise yaklaşık 2.19 kat daha yüksekti.

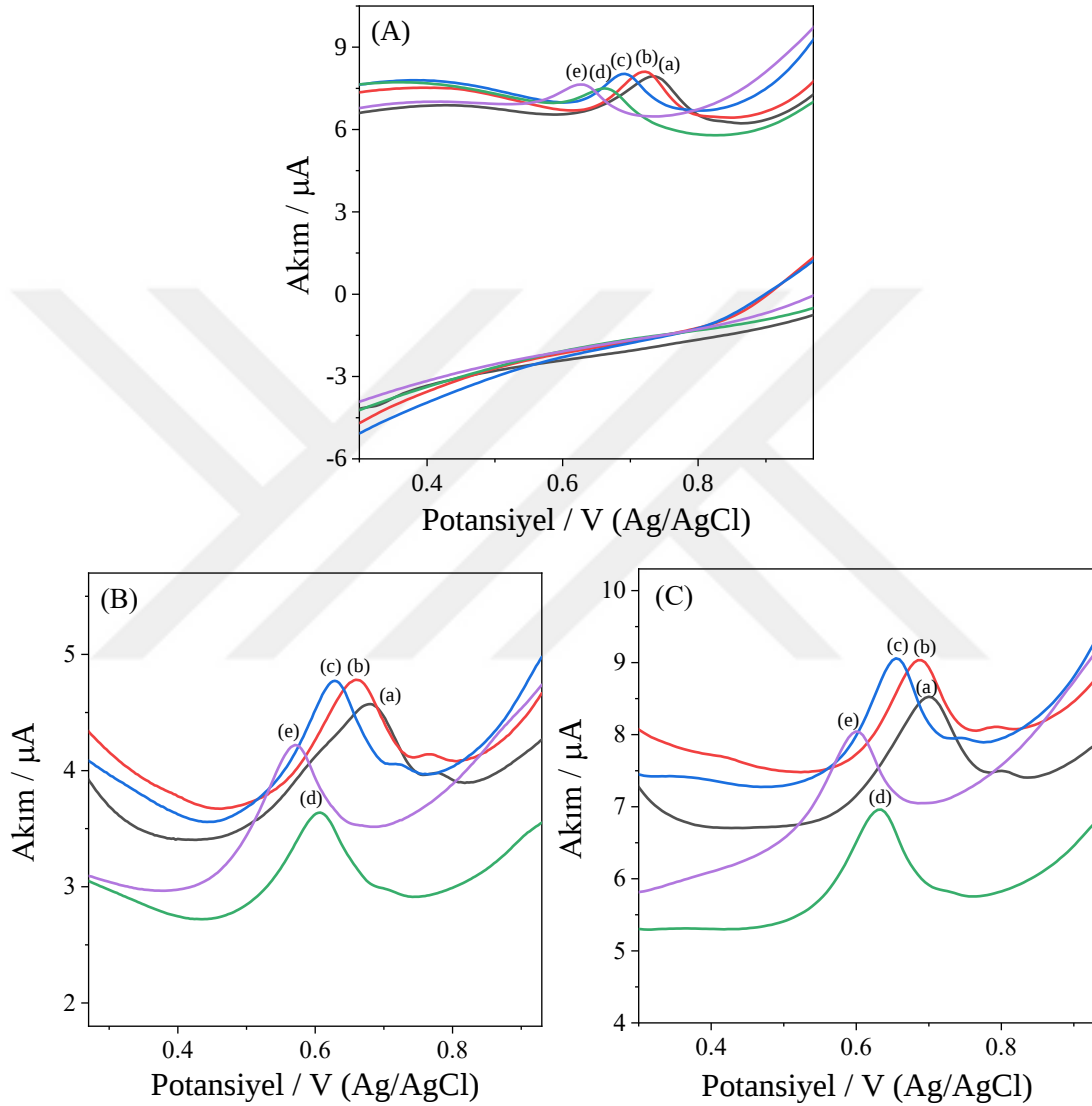


Şekil 48. pH 8.0 BRT içerisindeki (A) 4.0×10^{-7} M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltilmesi yapılmış diferansiyel puls sıyırma ve (B) 4.0×10^{-6} M melatonin çözeltisinden elde edilen temel çizgi düzeltilmesi yapılmış kare dalga sıyırma voltamogramları. (a) Yalnız GCE ve (b) PBTB/GCE

4.3.3.1. Destek Elektrolit ve pH Seçimi

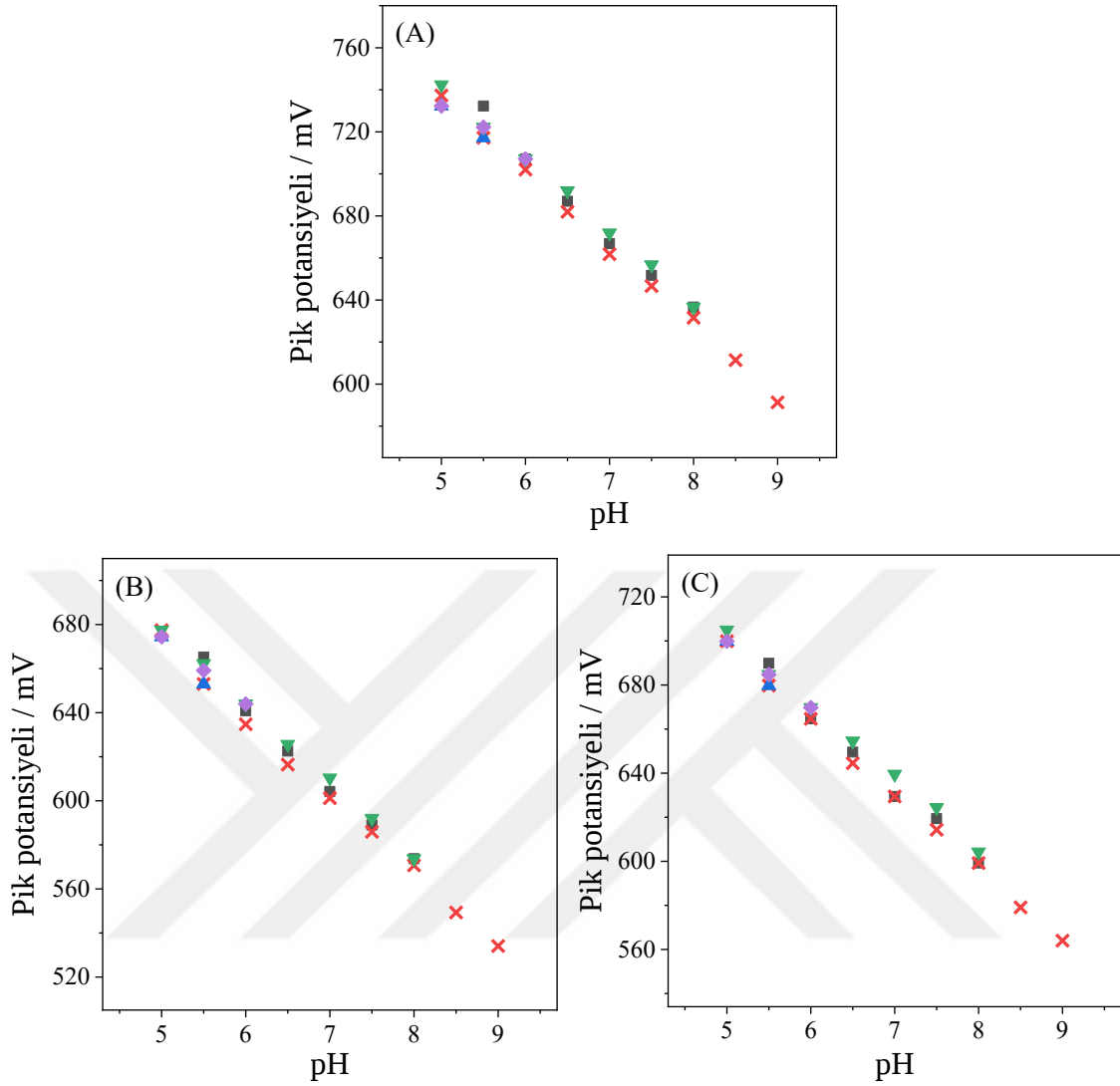
Melatoninin PBTB/GCE ile elektrokimyasal analizi için en uygun destek elektrolit türünün ve pH'nın belirlenebilmesi için pH taraması yapıldı. Bunun için, pH değerleri 5.0 ve 5.5 olan AT, pH'sı 5.5 ile 8.0 arasında yarım birimde bir değişen FT, pH'sı 5.0 ile 9.0 arasında yarım birimde bir değişen BRT, pH'sı 5.0 ile 6.0 arasında yarım birimde bir değişen ST ve pH'sı 5.0 ile 8.0 arasında yarım birimde bir değişen McT içerisinde 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çalışma çözeltileri hazırlanarak CV, DPV ve SWV yöntemleri ile voltamogramlar alındı. PBTB filmlerinin stabilitesini korumak amacıyla pH 5.0'dan daha

asidik ve pH 9.0'dan daha alkali tamponlar kullanılmadı. Şekil 49'da melatoninin farklı tampon çözeltiler içerisindeki döngülü, diferansiyel puls ve kare dalga voltamogramları verilmektedir. Şekil 49A'daki döngülü voltamogramlarda yükseltgenme yönünde melatoninin bir piki gözlenirken indirgenme yönünde herhangi bir pik gözlenmedi.



Şekil 49. (a) pH 5.0 AT, (b) pH 5.5 ST, (c) pH 6.5 McT, (d) pH 7.0 FT ve (e) pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramları

Destek elektrolitlerin melatoninin pik potansiyeli üzerindeki etkisi Şekil 50'de gösterildi. Şekil 50'ye göre, pH 5.0 ile 9.0 arasında pH arttıkça pik potansiyelinde daha negatif potansiyele doğru bir kayma gözlemlendi. Bu pH aralığında doğrusallıkta herhangi bir kırılma noktası gözlenmedi.



Şekil 50. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT ($\blacktriangle$), ST ($\blacklozenge$), FT ($\blacksquare$), McT ($\blacktriangledown$) ve BRT ($\times$) içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri

pH 5.0 ile 9.0 arasında melatonin pik potansiyelinin (E_p) pH'ya karşı doğrusallık grafiklerine ait denklemler Eşitlik 14–16'da verildi:

$$E_p \text{ (mV)} = 916.0 - 35.9 \text{ pH} \text{ (} r = 0.999, \text{ CV için)} \quad (14)$$

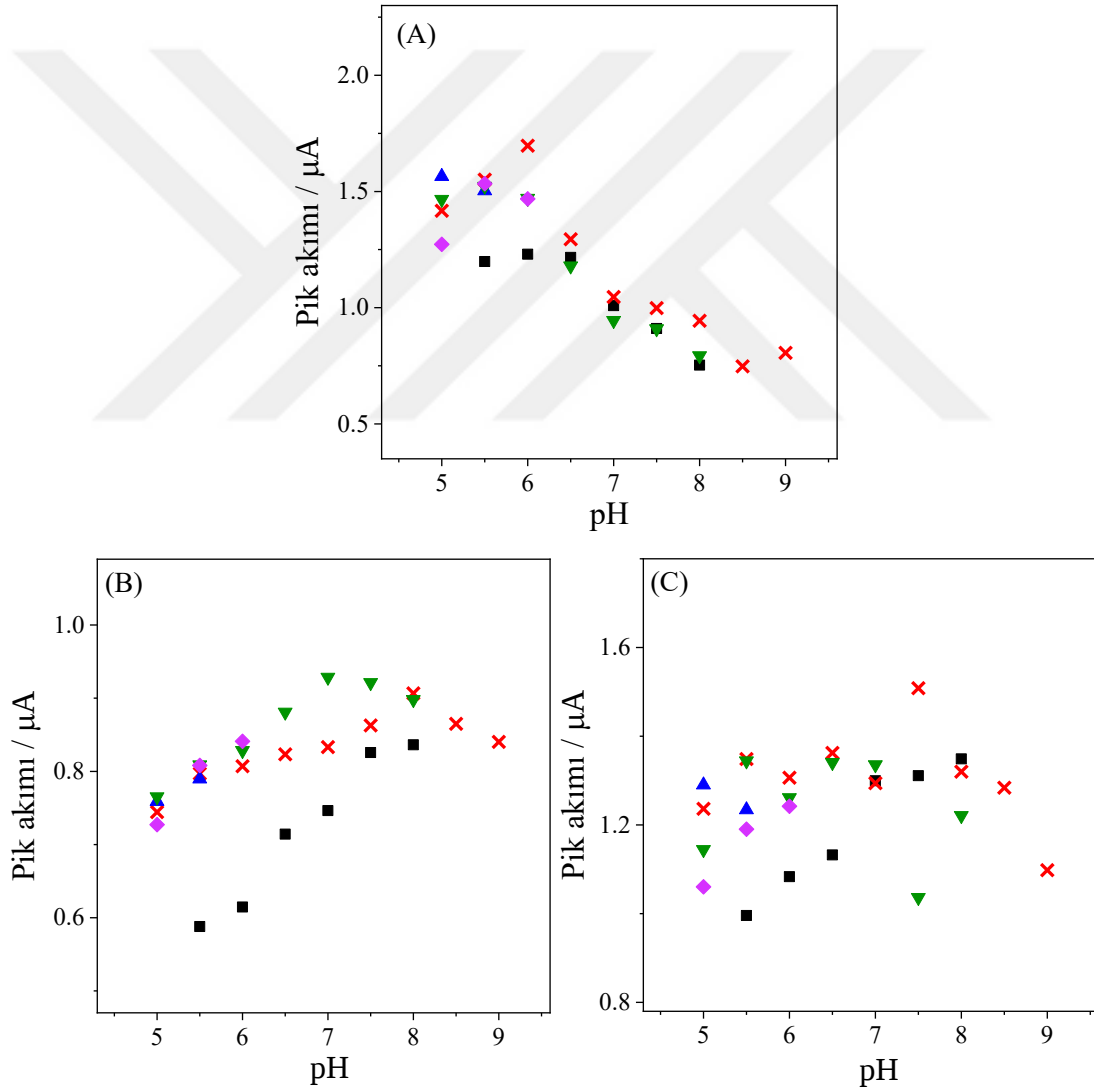
$$E_p \text{ (mV)} = 846.1 - 34.8 \text{ pH} \text{ (} r = 0.997, \text{ DPV için)} \quad (15)$$

$$E_p \text{ (mV)} = 865.5 - 33.6 \text{ pH} \text{ (} r = 0.999, \text{ SWV için)} \quad (16)$$

E_p – pH grafiklerinin pH 5.0 ile 9.0 aralığında elde edilen eğim değerleri, CV, DPV ve SWV yöntemleri için sırasıyla -35.9, -34.8 ve -33.6 mV pH^{-1} 'dir. Bu eğim değerleri

-59 mV pH⁻¹ olan teorik değerin yaklaşık yarısı kadardır ve bu da hız belirleme adımında iki elektron ve bir proton transferinin gerçekleştiğini işaret etmektedir (92, 201, 202).

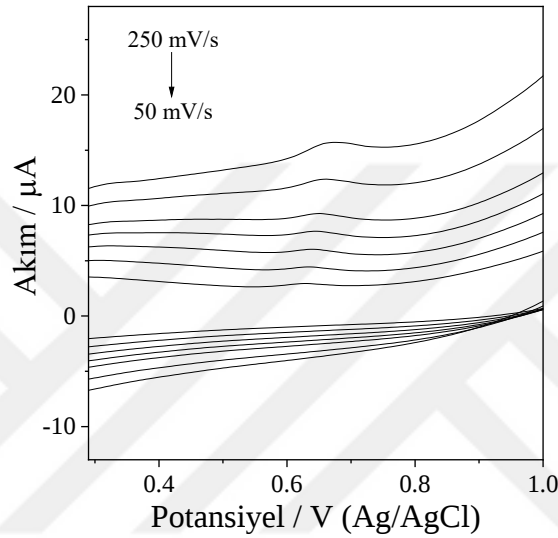
Melatoninin elektrokimyasal analizi için en uygun destek elektrolit türü ve pH'sına, CV, DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen pH taramasında elde edilen melatonin pik akım değerlerine ve piklerin simetrisine bakılarak karar verildi. Melatoninin pik akım değerleri her yöntem için ayrı ayrı pH'ya karşı grafiğe geçirildi (Şekil 51). Buna göre, en yüksek pik akımına sahip en simetrik melatonin piklerinin tüm yöntemlerde pH 8.0 BRT ortamında elde edildiği görüldü.



Şekil 51. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için AT ($\blacktriangle$), ST ($\blacklozenge$), FT ($\blacksquare$), McT ($\blacktriangledown$) ve BRT ($\times$) içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin pH'ya karşı pik akımı grafikleri

4.3.3.2. Tarama Hızı

Melatoninin PBTB/GCE yüzeyindeki yükseltgenme reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü mü difüzyon kontrollü mü olduğuna karar vermek amacıyla hız taraması çalışması gerçekleştirildi. Bunun için pH 8.0 BRT içerisinde 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çalışma çözeltisi hazırlanarak 250 mV s^{-1} 'den 50 mV s^{-1} 'e değişen tarama hızlarında CV yöntemi ile tek döngülü voltamogramlar alındı (Şekil 52).



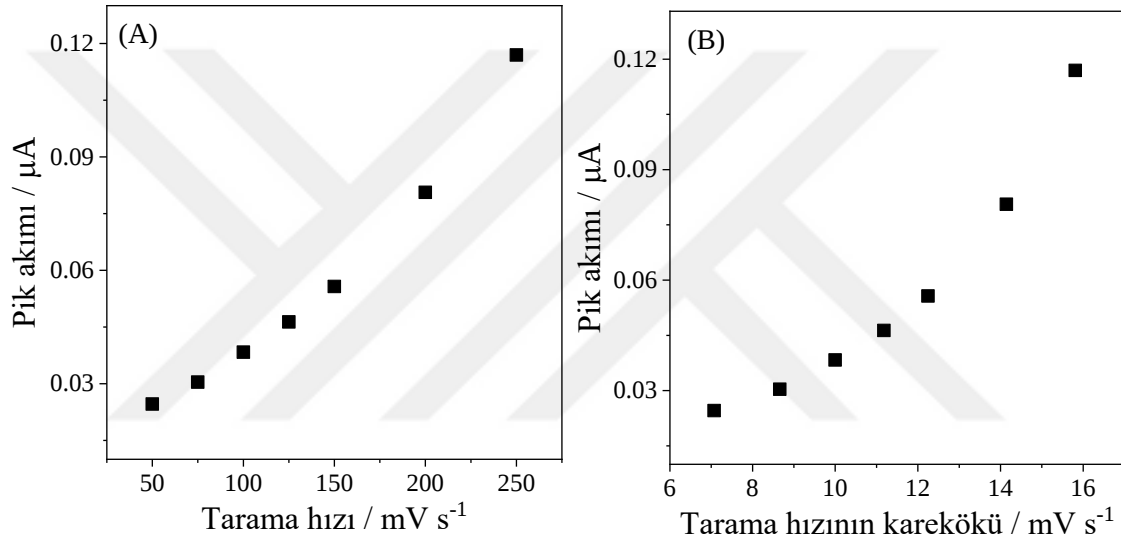
Şekil 52. pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatonin içeren çözeltiden CV yöntemi ile alınan tek döngülü voltamogramlar

Uygulanan tarama hızına (v) ve tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) karşı CV yöntemi ile elde edilen melatonin pik akımı (I_p) değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 53). Şekil 53A ve 53B’de görüldüğü gibi $I_p - v$ ve $I_p - v^{1/2}$ grafiklerinin ikisinde de net bir doğrusallığın elde edilemediği, fakat Şekil 53A’daki $I_p - v$ grafiğinde daha yüksek korelasyon katsayısının elde edildiği ve grafiğinin daha doğrusal olduğu görüldü. Bu, melatoninin PBTB/GCE yüzeyindeki yükseltgenme sürecinde adsorpsiyon etkisinin daha baskın olabileceğini gösterdi. Ancak $I_p - v$ ve $I_p - v^{1/2}$ grafiklerinin her ikisinde de tam doğrusallığın elde edilememesinden dolayı bu sürecin tam olarak anlaşılabilmesi için sıyırma parametrelerinin optimize edilmesine karar verildi. Daha doğrusal olan $I_p - v$ grafiğinin regresyon denklemi Eşitlik 17’de verilmiştir.

$$I_p (\mu\text{A}) = 0.0005 v (\text{m V s}^{-1}) - 0.0054 (r = 0.963) \quad (17)$$

Uygulanan tarama hızının logaritmasına ($\log v$) karşı melatoninin anodik pik potansiyeli (E_p) değerleri de ayrıca grafiğe geçirildi ve elde edilen grafikte bir doğrusallık olduğu görüldü. Elde edilen doğrusal grafiğin regresyon denklemi Eşitlik 18’de verilmiştir. Tersinmez bir sistem için Laviron teorisine (203) göre, α yük transfer katsayısı ve n elektron sayısı olmak üzere αn , $E_p - \log v$ grafiğinin eğiminden hesaplanmaktadır. Tersinmez bir sistem için α değerinin 0.5 olduğu varsayımıyla, melatonin için elektron sayısı 2.18 olarak hesaplandı (161, 170).

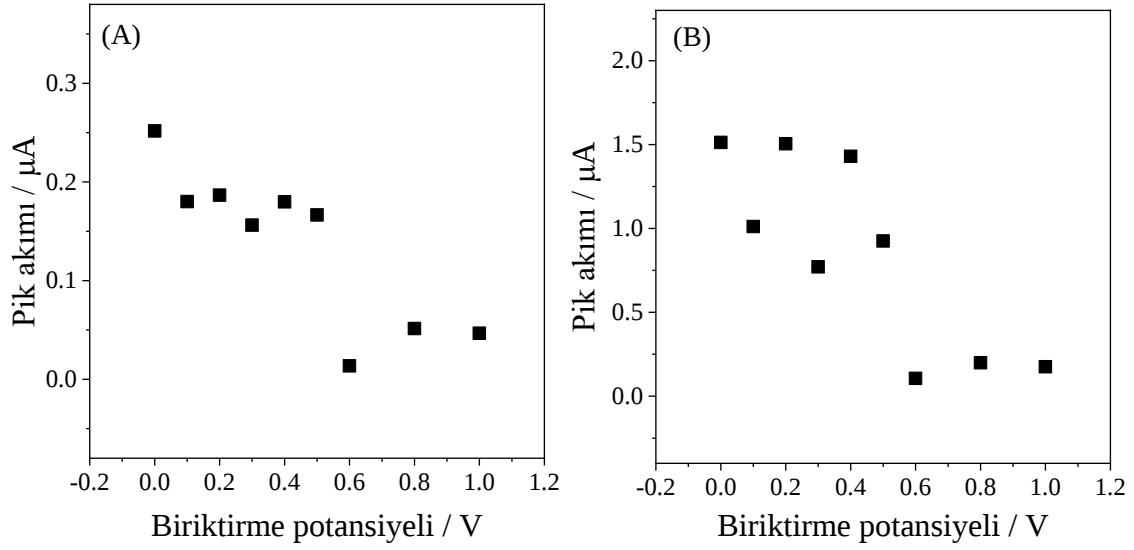
$$E_p \text{ (V)} = 0.0542 \log v \text{ (V s}^{-1}\text{)} + 0.5345 \text{ (r} = 0.986\text{)} \quad (18)$$



Şekil 53. pH 8.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M melatoninin CV yöntemi ile elde edilen (A) $I_p - v$ ve (B) $I_p - v^{1/2}$ grafikleri

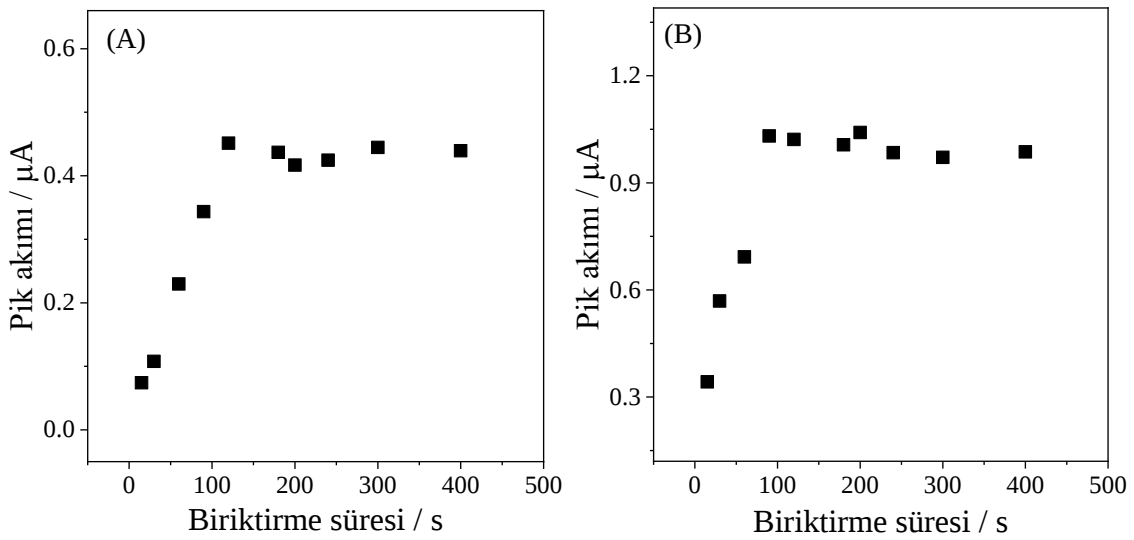
4.3.3.3. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu

Sıyırma parametrelerinin (biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi ve karıştırma hızı) optimizasyonu DPSV ve SWSV yöntemleri ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, pH 8.0 BRT içerisinde DPSV yöntemi için 1.0×10^{-6} M ve SWSV yöntemi için 2.0×10^{-6} M melatonin içeren çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çalışma çözeltileri kullanılarak öncelikle karıştırma hızı 100 rpm’de ve biriktirme süresi 60 s’de sabit tutuldu ve biriktirme potansiyeli değiştirildi, böylece en yüksek pik akımını veren potansiyeller DPSV ve SWSV yöntemleri için ayrı ayrı belirlendi. Şekil 54A’da DPSV için ve Şekil 54B’de SWSV için biriktirme potansiyeline karşı pik akım grafikleri verilmiştir.



Şekil 54. pH 8.0 BRT içerisindeki (A) 1.0×10^{-6} M melatoninin DPSV ve (B) 2.0×10^{-6} M melatoninin SWSV yöntemleri ile elde edilen biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri

Şekil 54'teki biriktirme potansiyeli grafiklerinden anlaşıldığı üzere, en yüksek melatonin pik akımının DPSV ve SWSV yöntemlerinin her ikisi için de 0.0 V'de elde edildiği görüldü. Daha sonra, DPSV ve SWSV yöntemleri için 100 rpm karıştırma hızı ve 0.0 V biriktirme potansiyeli sabit tutulup biriktirme süresi değiştirildi. Şekil 55'te DPSV SWSV için biriktirme süresine karşı pik akım grafikleri gösterilmiştir. Buna göre, ideal biriktirme süresi DPSV için 120 s ve SWSV için 90 s olarak belirlendi.

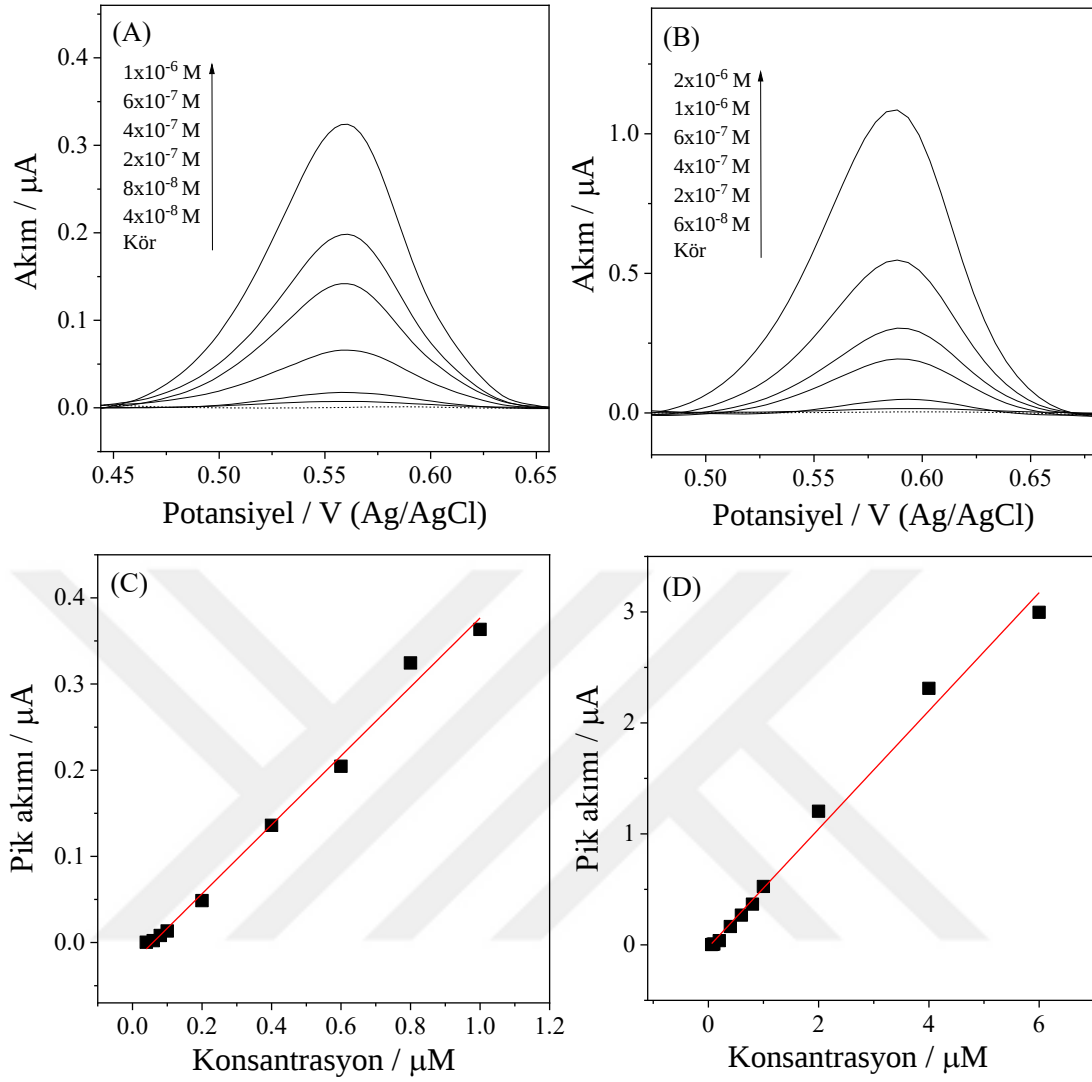


Şekil 55. pH 8.0 BRT içerisindeki (A) 1.0×10^{-6} M melatoninin DPSV ve (B) 2.0×10^{-6} M melatoninin SWSV yöntemleri ile elde edilen biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri

Son olarak, seçilen biriktirme potansiyelleri ve sürelerinde karıştırma hızları 100 ile 750 rpm arasında değiştirilerek pik akımlarındaki değişimler incelendi. Ancak, 100 rpm haricindeki karıştırma hızlarında tutarlı sonuçlar elde edilemedi. Bu nedenle sıyırma çalışmalarında karıştırma hızları 100 rpm olarak belirlendi.

4.3.3.4. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları

Melatoninin kantitatif analizi için DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak kalibrasyon çalışması gerçekleştirildi. Bu amaçla hem DPSV hem de SWSV yöntemleri için pH 8.0 BRT içerisinde 1.0×10^{-8} ile 1.0×10^{-4} M aralığındaki 21 farklı konsantrasyon için saf melatonin çalışma çözeltileri hazırlandı. Alınan ölçümler sonucunda, pik akım değeri okunabilen ilk melatonin derişimi DPSV yöntemi için 4.0×10^{-8} M ve SWSV yöntemi için 6.0×10^{-8} M oldu. DPSV ve SWSV yöntemleri için melatonin konsantrasyonundaki artış ile pik akımının doğrusal değişimi Şekil 56'da ve bu derişim aralıklarındaki kalibrasyon grafiklerinin regresyon analizi verileri Tablo 25'te verilmiştir.



Şekil 56. PBTB/GCE ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren çalışma çözeltilerinden (A ve C) DPSV ve (B ve D) SWSV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör

Tablo 25. Melatoninin PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri

	DPSV	SWSV
Pik potansiyeli (mV)	556	586
Doğrusal aralık (μM)	0.04 – 1	0.06 – 6
Eğim ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.400 ± 0.013	0.533 ± 0.018
Kesim noktası (μA)	-0.024 ± 0.006	-0.021 ± 0.041
Korelasyon katsayısı, r	0.993	0.990
Teşhis sınırı, LOD (nM)	8.28	17.3
Tayin sınırı, LOQ (nM)	25.1	52.4

Geliştirilen yöntemlerin kesinliğini değerlendirmek amacıyla tekrar edilebilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için pH 8.0 BRT içerisinde DPSV için 6.0×10^{-7} M ve SWSV için 2.0×10^{-6} M melatonin çalışma çözeltileri hazırlanarak gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. Her bir yöntem için aynı konsantrasyonda üçer adet farklı melatonin çözeltilerinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %RSD oranları hesaplandı. Veriler ve sonuçlar Tablo 26’da verildi.

Tablo 26. Melatoninin PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPSV</u>		<u>SWSV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.555	0.558	0.583	0.588
		0.558	0.561	0.583	0.588
		0.555	0.555	0.588	0.588
		0.558	0.555	0.588	0.583
		0.558	0.555	0.588	0.583
	Ortalama (V)	0.556	0.556	0.586	0.586
	s	0.0017	0.0027	0.0028	0.0028
	%RSD	0.30	0.49	0.47	0.47
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.1989	0.2043	1.3118	1.2898
		0.2031	0.2007	1.2876	1.2910
		0.1996	0.1997	1.2989	1.2709
		0.2017	0.2017	1.3032	1.3118
		0.2017	0.1996	1.3131	1.3131
	Ortalama (μ A)	0.2010	0.2012	1.3029	1.2953
	s	0.0017	0.0019	0.0104	0.0176
	%RSD	0.85	0.96	0.80	1.36

4.3.3.5. Farmasötik Dozaj Formundan Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğunu değerlendirebilmek amacıyla melatoninin farmasötik preparatlardan tayini ve geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi. Farmasötik preparatlardan tayin çalışması için, tablet dozaj formundan hazırlanan pH 8.0 BRT içerisindeki melatoninin DPSV için 6.0×10^{-7} M ve SWSV için 2.0×10^{-6} M’lık çalışma çözeltileri hazırlandı. Her bir yöntem için aynı konsantrasyonda üçer adet farklı melatonin çözeltilerinden beş adet pik akımı değeri elde edildi. Pik akımı değerleri üzerinden melatonin

miktarı hesaplandı ve tablet dozaj formunda beyan edilen miktar ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 27’de verilmiştir.

Tablo 27. PBTB/GCE kullanılarak DPSV ve SWSV ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri

		DPSV	SWSV
Farmasötik preparatlardan tayin	Tablette beyan edilen melatonin miktarı (mg)	3.000	3.000
	Bulunan melatonin miktarları (mg)	2.987	3.079
		3.092	3.081
		2.950	2.970
		3.082	2.991
		2.930	2.986
	Bulunan ortalama melatonin miktarı (mg)	3.008	3.021
	s	0.0671	0.0484
	%RSD	2.23	1.60
	%Bağıl hata	0.27	0.71

Geri kazanım çalışmasında DPSV yöntemi için melatonin tablet dozaj formundan hazırlanan 6.0×10^{-7} M melatonin çözeltisi üzerine toplam melatonin konsantrasyonu 8.0×10^{-7} M olacak şekilde ve SWSV yöntemi için ise için melatonin tablet dozaj formundan hazırlanan 2.0×10^{-6} M melatonin çözeltisi üzerine toplam melatonin konsantrasyonu 4.0×10^{-6} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden ilave edildi. Son konsantrasyonları DPSV için 8.0×10^{-7} M ve SWSV için 2.0×10^{-6} M olan çözeltilerden üçer adet hazırlanarak voltamogramlar alındı. Beşer adet pik akımı değerleri üzerinden hesaplanan %RSD ve %geri kazanım verileri Tablo 28’de verilmiştir.

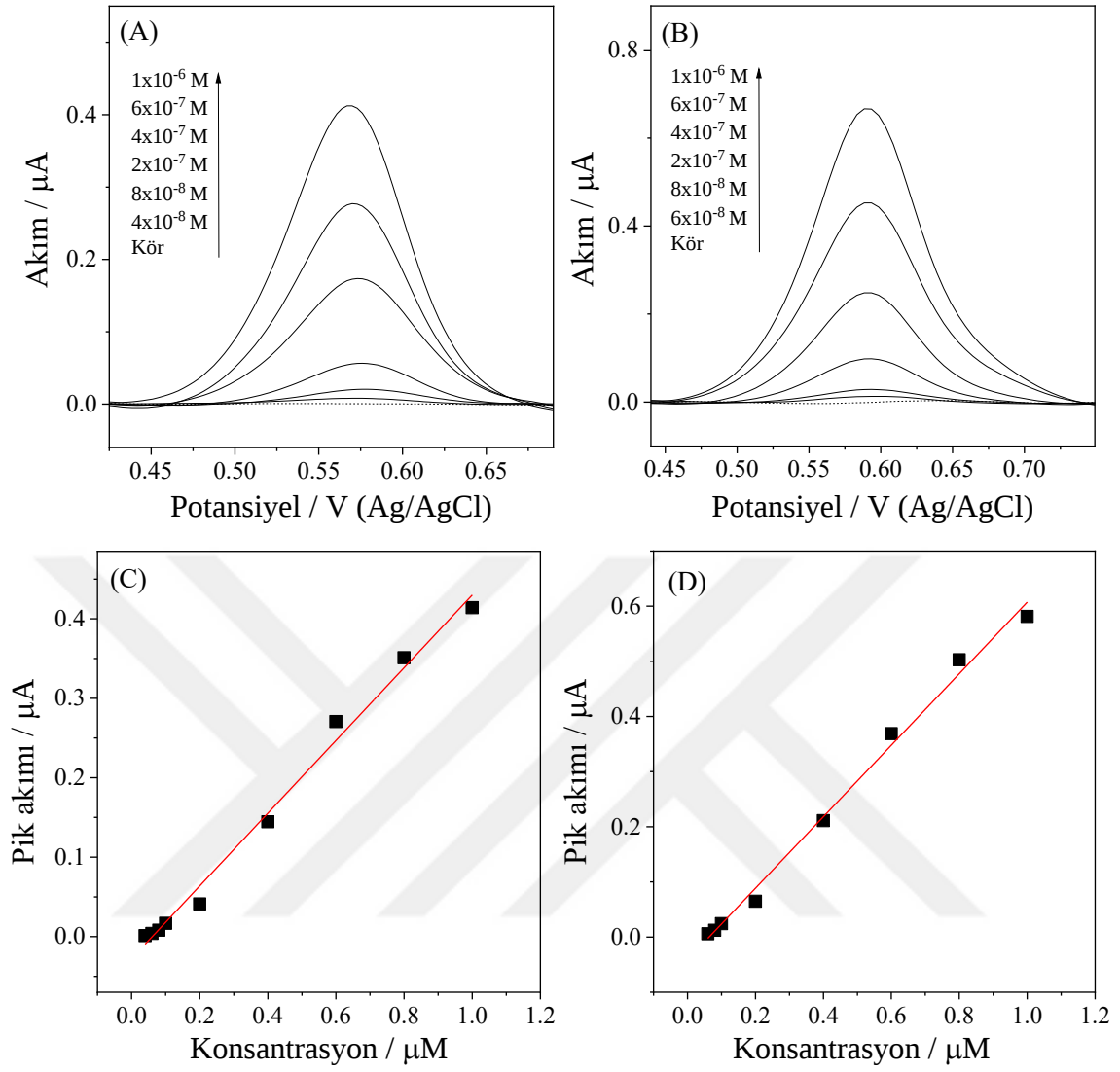
Tablo 28. PBTB/GCE kullanılarak DPSV ve SWSV ile pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin çözeltilerinden elde edilen geri kazanım çalışması verileri

	DPSV	SWSV
İlave edilen melatonin konsantrasyonu (μM)	0.200	2.000
Bulunan melatonin konsantrasyonu (μM)	0.204	2.012
	0.201	1.997
	0.201	2.051
	0.206	1.989
	0.194	2.006
Bulunan ortalama melatonin konsantrasyonu (μM)	0.201	2.011
Ortalama geri kazanım (%)	100.46	100.56
s	2.26	1.20
%RSD	2.25	1.19
%Bağıl hata	0.46	0.56
t-testi		0.78
F-testi		0.01

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

4.3.3.6. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması

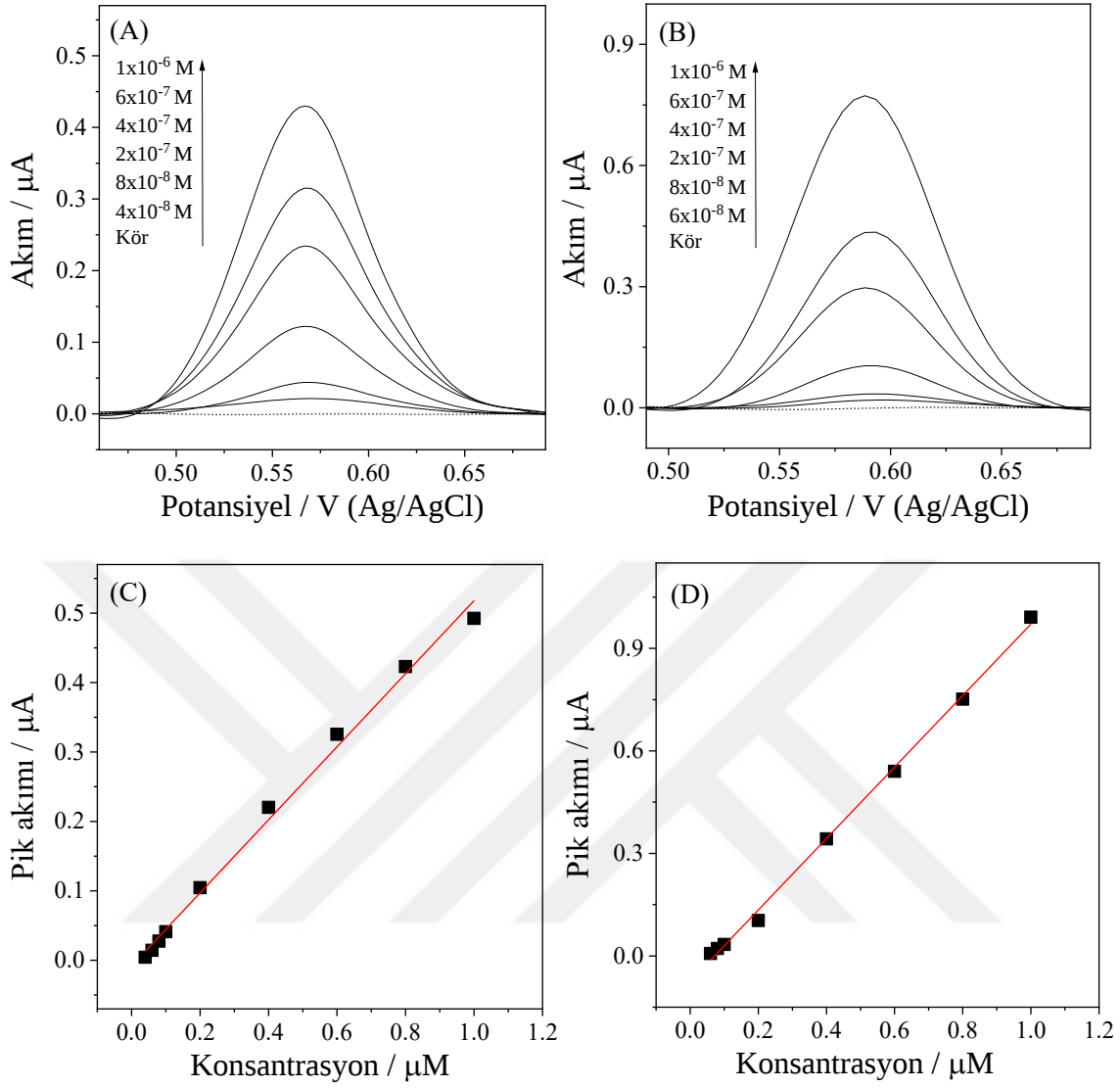
Geliştirilen yöntemlerle insan serumu ve yapay idrar çözeltisi örneklerinden melatonin tayini için çalışmalar gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak Bölüm 3.4.5'te açıklandığı şekilde serum ve yapay idrar çözeltileri hazırlandı. DPSV ve SWSV ile yapılan kalibrasyon çalışmalarından elde edilen doğrusal aralıklar göz önüne alınarak pH 8.0 BRT içerisinde melatonin içeren serum ve yapay idrar çözeltileri ile kalibrasyon çalışmaları yapıldı. Serum ve yapay idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlarda pik akımının okunabildiği en düşük konsantrasyonlar DPSV için 4.0×10^{-8} M ve SWSV için 6.0×10^{-8} M olarak bulundu. Şekil 57'de serum çözeltilerinden ve Şekil 58'de yapay idrar çözeltilerinden DPSV ve SWSV yöntemleri ile elde edilen voltamogramlar ve melatonin konsantrasyonuna karşı pik akımı grafikleri verilmiştir. Ayrıca, serum ve yapay idrar çözeltilerinin kalibrasyon grafiklerinin regresyon analizi sonuçları da sırasıyla Tablo 29 ve 30'da verilmiştir.



Şekil 57. pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden (A ve C) DPSV ve (B ve D) SWSV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltilmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör

Tablo 29. PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	DPSV	SWSV
Pik potansiyeli (mV)	571	597
Doğrusal aralık (μM)	0.04 – 1	0.06 – 1
Eğim (μA μM ⁻¹)	0.458 ± 0.016	0.648 ± 0.021
Kesim noktası (μA)	-0.028 ± 0.008	-0.041 ± 0.011
Korelasyon katsayısı, r	0.992	0.994
Teşhis sınırı, LOD (nM)	10.1	18.4
Tayin sınırı, LOQ (nM)	30.5	55.6



Şekil 58. pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden (A ve C) DPSV ve (B ve D) SWSV ile elde edilen (A ve B) temel çizgi düzeltilmesi yapılmış voltamogramlar ve (C ve D) kalibrasyon eğrileri. Kesikli voltamogramlar: Kör

Tablo 30. PBTB/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	DPSV	SWSV
Pik potansiyeli (mV)	572	597
Doğrusal aralık (μM)	0.04 – 1	0.06 – 1
Eğim ($\mu A \mu M^{-1}$)	0.526 ± 0.015	1.046 ± 0.020
Kesim noktası (μA)	-0.008 ± 0.008	-0.075 ± 0.010
Korelasyon katsayısı, r	0.994	0.998
Teşhis sınırı, LOD (nM)	12.5	17.9
Tayin sınırı, LOQ (nM)	38.0	54.3

Tekrar edilebilirlik çalışmasına, DPSV ve SWSV için 2.0×10^{-7} M saf melatonin içeren serum ve yapay idrar çalışma çözeltileri hazırlanarak başlandı. Her bir yöntem için üçer adet çözeltiden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerleri kullanılarak gün içi ve günler arası %RSD oranları hesaplandı. Tablo 31 ve 32’de sırasıyla serum ve yapay idrar çözeltileri için elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Tablo 31. PBTB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren serum çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPSV</u>		<u>SWSV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.570	0.579	0.599	0.599
		0.573	0.573	0.599	0.599
		0.567	0.570	0.599	0.588
		0.567	0.567	0.593	0.599
		0.576	0.567	0.593	0.599
	Ortalama (V)	0.571	0.571	0.597	0.597
	s	0.0040	0.0051	0.0028	0.0045
	%RSD	0.70	0.89	0.46	0.75
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.0358	0.0357	0.0553	0.0565
		0.0355	0.0344	0.0557	0.0558
		0.0344	0.0350	0.0560	0.0558
		0.0353	0.0358	0.0561	0.0560
		0.0362	0.0362	0.0564	0.0553
	Ortalama (μ A)	0.0354	0.0354	0.0559	0.0559
	s	0.0007	0.0007	0.0004	0.0005
	%RSD	1.88	1.98	0.73	0.75

Tablo 32. PBTB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPSV</u>		<u>SWSV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.573	0.570	0.593	0.599
		0.573	0.570	0.593	0.593
		0.567	0.570	0.599	0.593
		0.573	0.576	0.599	0.599
		0.573	0.576	0.599	0.599
	Ortalama (V)	0.572	0.572	0.597	0.597
	s	0.0027	0.0033	0.0028	0.0028
	%RSD	0.48	0.58	0.46	0.46
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.0864	0.0835	0.1312	0.1266
		0.0845	0.0837	0.1307	0.1319
		0.0835	0.0870	0.1285	0.1312
		0.0864	0.0849	0.1257	0.1285
		0.0849	0.0864	0.1267	0.1267
	Ortalama (μ A)	0.0851	0.0851	0.1286	0.1290
	s	0.0013	0.0016	0.0024	0.0025
	%RSD	1.49	1.84	1.87	1.91

Serum örneklerinden yapılan geri kazanım çalışmalarında, DPSV ve SWSV için 2.0×10^{-7} M melatonin içeren serum çözeltisi üzerine son konsantrasyonu 4.0×10^{-7} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden eklenerek pH 8.0 BRT ile hacme tamamlandı. Yapay idrar örneklerinden geri kazanım çalışmalarında ise DPSV ve SWSV için 2.0×10^{-7} M melatonin içeren yapay idrar çözeltisi üzerine son konsantrasyonu 4.0×10^{-7} M olacak şekilde saf melatonin çözeltisinden eklenerek pH 8.0 BRT ile hacme tamamlandı. Her bir yöntem için üç adet hazırlanan serum ve yapay idrar çalışma çözeltilerinden elde edilen değerler sırasıyla Tablo 33 ve 34’te verildi.

Tablo 33. PBTB/GCE kullanılarak DPSV ve SWSV için 4.0×10^{-7} M melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

	DPSV	SWSV
İlave edilen saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.200	0.200
Bulunan saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.193	0.202
	0.203	0.194
	0.193	0.199
	0.198	0.204
	0.198	0.201
Bulunan ortalama saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.197	0.200
Ortalama geri kazanım (%)	98.46	100.04
s	2.02	1.79
%RSD	2.06	1.79
%Bağıl hata	-1.54	0.04
t-testi		0.23
F-testi		0.82

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

Tablo 34. PBTB/GCE kullanılarak DPSV ve SWSV için 4.0×10^{-7} M melatonin içeren yapay idrar çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

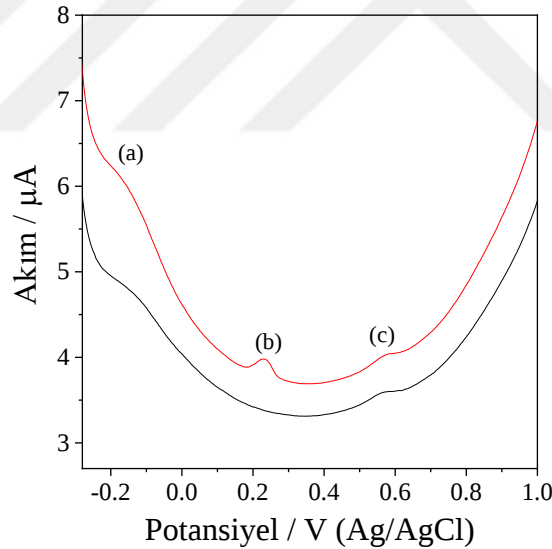
	DPV	SWV
İlave edilen saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.200	0.200
Bulunan saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.202	0.207
	0.203	0.196
	0.208	0.206
	0.198	0.196
	0.196	0.199
Bulunan ortalama saf melatonin konsantrasyonu (μM)	0.201	0.201
Ortalama geri kazanım (%)	100.55	100.41
s	2.35	2.59
%RSD	2.34	2.58
%Bağıl hata	0.55	0.41
t-testi		0.93
F-testi		0.85

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

4.3.3.7. Girişim Çalışması

PBTB/GCE ile geliştirilen voltametrik yöntemlerin melatonine karşı seçiciliği, insan vücut sıvılarında bulunan askorbik asit ve ürik asit endojen maddelerin ve Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , NO_3^- ve SO_4^{2-} iyonlarının varlığında incelendi. Bunun için, 4.0×10^{-7} M melatonin içeren pH 8.0 BRT içerisine her biri 4.0×10^{-5} M olacak şekilde NaCl, KNO₃, CaCl₂ ve K₂SO₄ tuzları eklendi. Bu tuzların ilavesinden sonra melatonin pik akımındaki değişimin $\pm 3.16\%$ 'dan az olduğu görüldü.

Vücut sıvılarında bulunan ve yaygın olarak girişim yapan türlerden askorbik asit ve ürik asit, çözeltideki konsantrasyonları sırasıyla 8.0×10^{-5} M ve 8.0×10^{-6} M olacak şekilde 3.0×10^{-7} M melatonin içeren pH 8.0 BRT içerisine eklendi. Şekil 59'da görüldüğü gibi, -0.14 V'de askorbik asite, +0.23 V'de ürik asite ve +0.56 V'de melatonine ait iyi tanımlanmış üç anodik pik elde edildi. Bu maddelerin ilavesi ile melatonin pik akımındaki değişimin $\pm 4.06\%$ 'dan az olduğu görüldü.



Şekil 59. PBTB/GCE kullanılarak pH 8.0 BRT içerisindeki (siyah voltamogram) sadece melatonin içeren çözeltiden ve (kırmızı voltamogram) (a) 8.0×10^{-5} M askorbik asit, (b) 8.0×10^{-6} M ürik asit ve (c) 3.0×10^{-7} M melatonin içeren çözeltiden alınan diferansiyel puls voltamogramları

4.3.3.8. PBTB/GCE'nin Stabilité Çalışması

Hazırlanan PBTB/GCE'nin kararlılığını değerlendirmek amacıyla CV ve DPSV yöntemleri kullanılarak hem operasyonel hem de zamana karşı stabilité çalışmaları

gerçekleştirildi. Modifiye elektrotun operasyonel stabilitesi için 1.0×10^{-5} M melatonin içeren pH 8.0 BRT çözeltisinde 100 döngülü CV alındı. Buna göre, 50. döngü sonunda elde edilen melatonin pik akımının, ilk döngüdeki değerini %98.2 oranında koruduğu görüldü.

PBTB/GCE'nin uzun süreli stabilitesi, 4.0×10^{-7} M melatonin içeren pH 8.0 BRT çözeltisinden DPSV yöntemi ile gün aşırı ölçümler alınarak belirlendi. Hazırlanan PBTB/GCE, ortam koşullarından etkilenmemesi amacıyla, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklandı. Analiz sonuçlarına göre PBTB/GCE'nin 8. güne kadar stabilitesini %96.9 oranında koruduğu belirlendi.

4.3.3.9. PBTB/GCE'nin Yeniden Üretilirlik Çalışması

PBTB/GCE'nin yeniden üretilebilirliği, farklı günlerde birbirinden bağımsız olarak hazırlanan beş elektrot kullanılarak 4.0×10^{-7} M melatonin içeren pH 8.0 BRT çözeltilerinden DPSV ile elde edilen pik akım değerleri üzerinden belirlendi. Elde edilen beş adet pik akım değeri ile %RSD oranı 1.63 olarak hesaplandı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE'lerin Hazırlanması

PBCP, PBPB ve PBTB polimer filmlerini GCE yüzeyi üzerine CV yöntemi ile elektrokimyasal olarak sentezleyerek modifiye elektrotları hazırlamak amacıyla, en hızlı ve kontrollü elektropolimerizasyon için ilk olarak sentez sırasında kullanılan koşullar optimize edildi. Bu amaçla, her bir polimer için destek elektrolitin türü ve pH'sı, destek elektrolite ilave edilen farklı iyonların etkisi, monomer derişimi, tarama hızı ve döngü sayısı gibi çeşitli parametreler incelendi. Destek elektrolitin türü ve pH'sı polimer filmin sentezinde önemli bir etkiye sahip olduğundan, öncelikle bu parametreler optimize edildi. Buna göre, tüm tampon çözeltiler arasında, polimer redoks pik akımlarının son döngüdeki artış oranının en yüksek olduğu en kontrollü film oluşumları, PBCP için pH 5.6 FT içerisinde (Şekil 10C), PBPB için pH 5.9 FT içerisinde (Şekil 26C) ve PBTB için pH 7.5 McT içerisinde (Şekil 42A) hazırlanmış olan polimerizasyon çözeltileri ile elde edildi.

Bazı anyonların, nötral kırmızı ve metilen mavisi gibi bazı boyar maddelerin polimerizasyonunu katalizlediği ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur (124, 204, 205). Bu nedenle, elektropolimerizasyon çözeltisi içerisine farklı konsantrasyonlarda KCl, Na₂SO₄ ve NaNO₃ tuzları eklenerek bu iyonların polimer filmlerin polimerizasyonu üzerinde herhangi bir elektrokatalitik etkiye sahip olup olmadığı araştırıldı. Buna göre PBCP için, 0.1 M NO₃⁻ iyonu içeren pH 5.6 FT çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen elektropolimerizasyonla elde edilen polimer pik akımı artış oranının, iyon içermeyen çözeltide gerçekleşen elektropolimerizasyona kıyasla 1.51 kat arttığı ve bu artışın diğer iyonlara göre en yüksek olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, BCP'nin elektropolimerizasyonunda destek elektrolit olarak 0.1 M NaNO₃ içeren pH 5.6 FT çözeltisinin kullanılmasına karar verildi. PBPB için, 0.05 M NO₃⁻ iyonu içeren pH 5.9 FT çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen elektropolimerizasyonla elde edilen polimer pik akımı artış oranının, iyon içermeyen çözeltide gerçekleşen elektropolimerizasyona kıyasla 1.32 kat arttığı ve bu artışın diğer iyonlara göre en yüksek olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, BPB'nin elektropolimerizasyonunda destek elektrolit olarak 0.05 M NaNO₃ içeren pH 5.9 FT çözeltisinin kullanılmasına karar verildi. Son olarak PBTB için, tüm iyonlar arasında 0.05 M SO₄⁻² iyonu içeren polimerizasyon çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen elektropolimerizasyonla elde edilen polimer pik akımı artış oranının iyon içermeyen çözeltide gerçekleşen elektropolimerizasyona kıyasla 1.47 kat arttığı ve bu artışın diğer iyonlara göre en yüksek

olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, BTB'nin elektropolimerizasyonunda destek elektrolit olarak 0.05 M Na₂SO₄ içeren pH 7.5 McT çözeltisinin kullanılmasına karar verildi.

Daha sonraki aşamada monomer derişiminin elektropolimerizasyon üzerindeki etkisi incelendi. Bu amaçla, PBCP için, 0.1 M NaNO₃ içeren pH 5.6 FT çözeltisi içerisinde 0.25 ile 1.0 mM arasında değişen konsantrasyonlarda BCP monomeri eklendi. Buna göre, en yüksek pik akımı artış oranına sahip, en kontrollü ve iyi tanımlanmış PBCP piklerinin 0.50 mM BCP monomeri içeren pH 5.6 FT + 0.1 M NaNO₃ çözeltisi içerisinde elde edildiği görüldü (Şekil 12B). Bu nedenle, BCP polimerizasyonu için optimum monomer derişiminin 0.50 mM olduğuna karar verildi. PBPB için yapılan çalışmada, 0.05 M NaNO₃ içeren pH 5.9 FT çözeltisi içerisinde 0.25 ile 2.0 mM arasında değişen konsantrasyonlarda BPB monomeri eklendi. Buna göre, en yüksek pik akımı artış oranına sahip, en kontrollü ve iyi tanımlanmış PBPB piklerinin 1.75 mM BPB monomeri içeren pH 5.9 FT + 0.05 M NaNO₃ çözeltisi içerisinde elde edildiği görüldü (Şekil 28F). Bu nedenle, BPB polimerizasyonu için optimum monomer derişiminin 1.75 mM olduğuna karar verildi. Son olarak, PBTB için, 0.05 M Na₂SO₄ içeren pH 7.5 McT çözeltisi içerisinde 0.1 ile 0.50 mM arasında değişen konsantrasyonlarda BTB monomeri eklendi ve 0.50 mM üzerindeki BTB konsantrasyonlarında görülen çözünme problemi nedeniyle daha yüksek konsantrasyonlarda çalışılmadı. Buna göre, çalışılan konsantrasyonlarda her bir monomer derişimi için PBTB redoks piklerinin pik akımı artış oranları hesaplandı ve en yüksek pik akımı artış oranına sahip, en kontrollü ve iyi tanımlanmış PBTB piklerinin 0.50 mM BTB monomeri içeren pH 7.5 McT + 0.05 M Na₂SO₄ çözeltisi içerisinde elde edildiği görüldü (Şekil 44C). Bu nedenle, BTB polimerizasyonu için optimum monomer derişiminin 0.50 mM olduğuna karar verildi. Seçilen monomer derişimleri dışındaki konsantrasyonlarda polimerizasyon veriminin düşmesinin nedeni, düşük monomer konsantrasyonlarında polimerizasyon hızının yetersiz kalması, yüksek konsantrasyonlarda ise uzun zincirli polimer oluşumunun engellenmesi sonucu kısa zincirli polimerlerin elektrot yüzeyine düşük adsorpsiyon eğilimi göstermesi olabilir.

Tarama hızının elektropolimerizasyon sürecine olan etkisini incelemek amacıyla PBCP için 0.50 mM monomer içeren pH 5.6 FT + 0.1 M NaNO₃ çözeltisinde ve PBPB için 1.75 mM monomer içeren pH 5.9 FT + 0.05 M NaNO₃ çözeltisinde CV yöntemi ile 50 mV s⁻¹ ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında 50 döngülü voltamogramlar alındı. PBTB için ise 0.50 mM monomer içeren pH 7.5 McT + 0.05 M Na₂SO₄ çözeltisinde CV yöntemi ile

50 mV s⁻¹ ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında 30 döngülü voltamogramlar alındı. Buna göre, 50 mV s⁻¹ ve 100 mV s⁻¹ tarama hızlarında elde edilen polimer pik akımı artış oranları PBCEP için sırasıyla 4.14 ve 8.42 kat, PBPB için sırasıyla 3.80 ve 10.5 kat ve PBTB için sırasıyla 3.78 ve 5.81 kat olarak bulundu. Tarama hızları 50 mV s⁻¹ olarak tutulduğunda polimer pik akımlarının tüm polimerler için önemli ölçüde azalması nedeniyle elektropolimerizasyonlardaki optimum tarama hızları 100 mV s⁻¹ olarak seçildi. Son olarak, polimerizasyonun sona erdiği döngü sayılarını belirlemek için CV yöntemi ile her bir polimer için seçilen elektropolimerizasyon çözeltisi ortamında ve potansiyel tarama aralığında (PBCEP için -0.4 ile +1.6 V arasında, PBPB için -0.4 ile +1.4 V arasında ve PBTB için -0.8 ile +1.8 V arasında) 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı PBCEP ve PBPB için 50 döngülü, PBTB için ise 30 döngülü voltamogramlar alınarak polimer pik akımındaki artış oranları her döngüden sonra hesaplandı. Buna göre, optimize edilen koşullar altında polimer pik akımındaki artışın ve monomer pik akımındaki azalışın, PBCEP için 35 döngü boyunca, PBPB için 50 döngü boyunca ve PBTB için 18 döngü boyunca düzenli olarak devam ettiği ve bu döngülerden sonra kayda değer bir değişimin olmadığı görüldü. Değişimin olmaması polimerizasyonun sona erdiğini gösterdiğinden, her bir polimer filminin GCE yüzeyi üzerindeki elektropolimerizasyon süreci, belirlenen bu döngü sayılarında sonlandırıldı. Ayrıca, tüm polimerler için monomer ve polimerlere ait pik potansiyellerinin her döngüde daha pozitif yöne doğru kaydığı görüldü. Hem monomer hem de polimer piklerinin pik akımlarındaki değişim ve pik potansiyellerindeki kaymalar, GCE yüzeyinde polimer filmlerinin oluşumunu ve her döngüde artan polimer film kalınlığı nedeniyle elektrot yüzeyinin değiştiğini göstermektedir.

Yapılan tüm polimer optimizasyonu çalışmaları sonucunda, BCP'nin GCE yüzeyi üzerine elektropolimerizasyonunun en kontrollü şekilde, 0.50 mM monomer içeren pH 5.6 FT + 0.1 M NaNO₃ çözeltisinde -0.4 ile +1.6 V potansiyel aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 35 döngülü CV ile elde edildiğine karar verildi (Şekil 14) ve melatoninin analizinde kullanılacak PBCEP/GCE'ler bu prosedüre uyularak hazırlandı. BPB'nin GCE yüzeyi üzerine elektropolimerizasyonunun ise en kontrollü şekilde, 1.75 mM monomer içeren pH 5.9 FT + 0.05 M NaNO₃ çözeltisinde -0.4 ile +1.4 V potansiyel aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 50 döngülü CV ile elde edildiğine karar verildi (Şekil 30) ve melatoninin analizinde kullanılacak PBPB/GCE'ler de bu prosedüre uyularak hazırlandı. Son olarak, BTB'nin GCE yüzeyi üzerine elektropolimerizasyonunun ise en kontrollü şekilde, 0.50 mM monomer

içeren pH 7.5 McT + 0.05 M Na₂SO₄ çözeltisinde -0.8 ile +1.8 V potansiyel aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında Ag/AgCl referans elektrotuna karşı 18 döngülü CV ile elde edildiğine karar verildi (Şekil 46) ve melatoninin analizinde kullanılacak PBTB/GCE'ler bu prosedüre göre hazırlandı.

5.2. PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE'lerin Karakterizasyonu

Hazırlanan polimer modifiyeli GCE'lerin karakterizasyonu CV ve EIS yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. İlk olarak, yalın ve polimer film modifiyeli elektrotların elektroaktif yüzey alanları Bölüm 2.9.1'de verilen Eşitlik 3'teki Randles-Sevcik eşitliği kullanılarak hesaplandı. Buna göre, yalın GCE'nin elektroaktif yüzey alanı 0.0705 cm² iken, PBCP ile kaplandıktan sonra 1.99 kat artarak 0.1402 cm²'ye, PBPB ile kaplandıktan sonra 1.95 kat artarak 0.1375 cm²'ye ve PBTB ile kaplandıktan sonra 1.76 kat artarak 0.1241 cm²'ye yükseldi. Elde edilen bu sonuçlar tüm polimer filmlerinin, üzerine kaplandıkları GCE yüzey alanını artırarak elektron transfer kapasitesini geliştirdiğini gösterdi.

Yalın ve polimer modifiyeli elektrotların arayüzey özellikleri EIS yöntemi ile incelendi. Tüm polimerler için elde edilen Nyquist grafiklerinde yüksek frekans bölgesinde farklı çaplara sahip yarı dairesel cevaplar alındığı görüldü. Çaplardaki bu farklılık muhtemelen elektrot arayüzlerindeki R_{ct} değişikliklerine işaret etmektedir. Grafiklerde düşük frekans bölgesindeki doğrusal davranış gösteren kısım ise elektrotun difüzyon sürecini göstermektedir. Nyquist grafikleri incelendiğinde, PBCP/GCE (Şekil 15), PBPB/GCE (Şekil 31) ve PBTB/GCE (Şekil 47)'nin, yalın GCE'ye kıyasla belirgin şekilde daha küçük çaplı yarı daireler oluşturduğu görüldü. Bu daha küçük yarı daireler, polimer filmlerin yüzeyi ile elektrot-çözelti arayüzünde R_{ct}'nin azaldığını ve elektron transfer sürecinin daha hızlı olduğunu, yani polimer filmlerin elektriksel iletkenliği artırdığını göstermektedir. Yalın GCE ve polimer film kaplı elektrotlar için +0.25 V'de çizilen Nyquist grafikleri uygun devre ile modellendikten sonra yarı dairelerden elde edilen R_{ct} değerleri hesaplandı. Buna göre, R_{ct} değeri yalın GCE için 894.1 Ω iken, hazırlanan PBCP/GCE için 189.9 Ω, PBPB/GCE için 551.8 Ω ve PBTB/GCE için 339.7 Ω olarak bulundu. Polimer modifikasyonları ile R_{ct}'lerin azalması, modifiye edilmiş elektrotların yüzeyinde yük transfer direncinin düşmesi ile birlikte artan yük transfer hızını ve dolayısıyla daha verimli bir elektron transferini işaret etmektedir.

5.3. PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE ile Melatonin Analizi

Melatoninin elektrokimyasal analiz çalışması için yalın GCE ve hazırlanan modifiye elektrotlar kullanılarak PBCP/GCE ve PBPB/GCE için DPV ve SWV yöntemleri ile, PBTB/GCE için DPSV ve SWSV yöntemleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Buna göre, PBCP/GCE ile elde edilen melatonin pik akım değerinin yalın GCE'den DPV için yaklaşık 1.52 kat ve SWV için ise yaklaşık 1.55 kat daha yüksek olduğu bulundu. PBPB/GCE ile elde edilen melatonin pik akım değerinin ise yalın GCE'den DPV için yaklaşık 1.59 kat ve SWV için ise yaklaşık 1.54 kat daha yüksek olduğu bulundu. Son olarak, PBTB/GCE ile elde edilen melatonin pik akım değeri, yalın GCE'den DPSV için yaklaşık 1.98 kat ve SWSV için ise yaklaşık 2.19 kat daha yüksek bulundu. Melatonin piklerinin, tüm modifiye elektrotlar ve kullanılan yöntemler için 1.5 kattan daha fazla artmış olması, yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonucunda elde edilen daha geniş elektroaktif yüzey alanı ve daha etkin elektron transfer hızı sonuçları ile uyumludur.

Elektrotların karşılaştırılmasının ardından, melatoninin voltametrik yöntemler ile yapılan analiz çalışmaları için en uygun destek elektrolit ve pH'lar tüm modifiye elektrotlar için belirlendi. Bunun için, pH'sı 5.0 ile 9.0 arasında değişen tampon çözeltiler içerisindeki melatonin çözeltilerinden CV, DPV ve SWV yöntemleri ile voltamogramlar alındı. Polimer filmlerinin GCE yüzeyindeki stabilitesini korumak amacıyla pH 5.0'dan daha asidik ve pH 9.0'dan daha alkali tamponlar kullanılmadı. PBCP/GCE için Şekil 17A'da, PBPB/GCE için Şekil 33A'da ve PBTB/GCE için Şekil 49A'da verilen döngülü voltamogramlarda görüldüğü üzere, melatoninin yükseltgenme yönünde bir piki gözlenirken indirgenme yönünde herhangi bir pik gözlenmedi. Bu durum, melatoninin hazırlanan üç modifiye elektrot yüzeyinde de tersinmez bir prosese sahip olduğunu gösterdi.

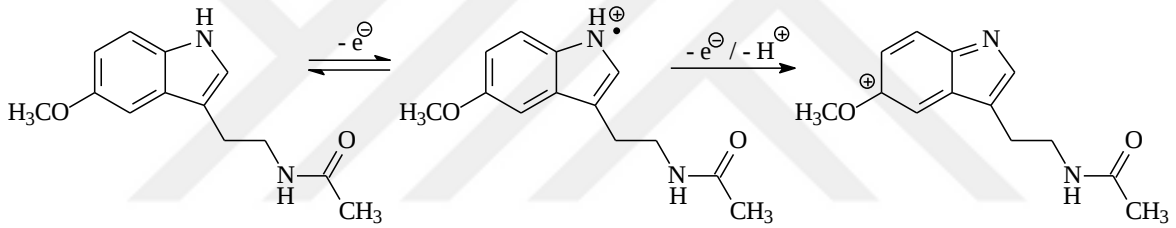
Destek elektrolitlerin melatoninin pik potansiyeli ve pik akımı üzerindeki etkisi araştırılarak iyi tanımlanmış, simetrik ve en yüksek pik akımına sahip melatonin piklerinin hangi tampon ortamında elde edildiği her bir elektrot için tespit edildi. Melatoninin pik potansiyelleri değerlendirildiğinde, PBCP/GCE için Şekil 18'de, PBPB/GCE için Şekil 34'te ve PBTB/GCE için Şekil 50'de görüldüğü gibi, pH 5.0 ile 9.0 arasında pH arttıkça pik potansiyelinde daha negatif potansiyele doğru bir kayma gözlemlendi. Pik potansiyellerindeki bu kaymalar, pH arttıkça melatoninin daha kolay yükseltgendüğünü göstermektedir. Çalışılan pH aralığında tüm modifiye elektrotlar için doğrusallıkta herhangi bir kırılma noktası gözlenmedi. Bu durum, Bölüm 2.3.1'de de bahsedildiği üzere literatürde

melatoninin pK_a değerinin 12.3 olarak verilmesi ile uyumlu olarak, bu çalışmada pH 9.0'dan yukarı çıkılmaması dolayısıyla kırılma noktasının yakalanamaması ile açıklanabilir (65). pH 5.0 ile 9.0 arasındaki E_p – pH grafiklerinin eğim değerleri, CV, DPV ve SWV yöntemleri için sırasıyla PBCP/GCE için -36.1, -34.7 ve -35.9 mV pH⁻¹; PBPB/GCE için sırasıyla -35.1, -33.5 ve -34.2 mV pH⁻¹; PBTB/GCE için sırasıyla -35.9, -34.8 ve -33.6 mV pH⁻¹ olarak hesaplandı. Bu eğim değerleri -59 mV pH⁻¹ olan teorik değerin yaklaşık yarısı kadardır ve bu da hız belirleme adımında iki elektron ve bir proton transferinin gerçekleştiğini işaret etmektedir (92, 201, 202). CV, DPV ve SWV ile elde edilen pH'ya karşı pik akımı grafikleri dikkate alındığında, özellikle kantitatif analizin yapılacağı puls yöntemleri için en yüksek pik akımına sahip en simetrik melatonin pikinin PBCP/GCE için pH 8.0 FT ortamında, PBPB/GCE ve PBTB/GCE için ise pH 8.0 BRT ortamında elde edildiği görüldü ve sonraki tüm çalışmalar seçilen bu destek elektrolitler içerisinde gerçekleştirildi.

Melatoninin modifiye elektrot yüzeylerindeki yükseltgenme reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü mü difüzyon kontrollü mü olduğuna karar vermek amacıyla hız taraması çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için melatonin içeren çalışma çözeltisi ile 250 mV s⁻¹'den 50 mV s⁻¹'e değişen tarama hızlarında CV yöntemi ile tek döngülü voltamogramlar alındı (Şekil 20, Şekil 36 ve Şekil 52). Uygulanan tarama hızına (v) ve tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) karşı CV yöntemi ile elde edilen melatonin pik akımı (I_p) değerleri grafiğe geçirildi. PBCP/GCE için Şekil 21A'da görüldüğü gibi I_p – v grafiğinde bir doğrusallığın elde edilemediği, fakat Şekil 21B'deki I_p – $v^{1/2}$ grafiğinde yüksek korelasyon katsayısı ile birlikte doğrusallık olduğu görüldü. Benzer şekilde PBPB/GCE için de Şekil 37A'da görüldüğü gibi I_p – v grafiğinde bir doğrusallığın elde edilemediği, ancak Şekil 37B'deki I_p – $v^{1/2}$ grafiğinde iyi bir doğrusallık olduğu görüldü. Bu sonuçlar, melatoninin PBCP/GCE ve PBPB/GCE yüzeylerindeki yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü olduğunu gösterdi. PBTB/GCE için ise farklı bir sonuç elde edildi. Şekil 53A ve 53B'de görüldüğü gibi hem I_p – v hem de I_p – $v^{1/2}$ grafiklerinde tam bir doğrusallık elde edilemedi. Ancak, Şekil 53A'daki I_p – v grafiğinin daha yüksek korelasyon katsayısına sahip olduğu görüldü. Bu nedenle, PBTB/GCE yüzeyinde adsorpsiyon etkisinin daha baskın olabileceği düşünüldü ve melatoninin bu elektrot yüzeyindeki yükseltgenme reaksiyonunun karakterinin tam olarak anlaşılabilmesi için sıyırma parametrelerinin optimize edilmesine karar verildi. Tarama hızı çalışmalarının son aşamasında, uygulanan tarama hızının logaritmasına karşı melatoninin anodik pik potansiyeli değerleri de grafiğe geçirildi ve tüm modifiye elektrotlar için elde edilen grafiklerde bir doğrusallık olduğu

görüldü. Tersinmez bir sistem için Laviron teorisine (203) göre, α yük transfer katsayısı (tersinmez bir sistem için $\alpha=0.5$ olduğu varsayılır) ve n elektron sayısı olmak üzere an , $E_p - \log v$ grafiğinin eğiminden hesaplandı (161, 170). Buna göre, PBCP/GCE için Eşitlik 8'den elektron sayısı 2.08 olarak, PBPB/GCE için Eşitlik 13'ten elektron sayısı 2.21 olarak ve PBTB/GCE için Eşitlik 18'den elektron sayısı 2.18 olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlar, tüm modifiye elektrotlar için elde edilen $E_p - pH$ grafiklerinin eğim değerlerinden bulunan elektron sayısı sonuçları ile uyumludur.

$E_p - pH$ ve $E_p - \log v$ grafiklerinden elde edilen elektron ve proton sayıları göz önüne alınarak melatoninin muhtemel yükseltgenme mekanizması literatürdeki çalışmalarla da uyumlu olarak Şekil 60'ta verilmiştir (161, 170, 184, 188). Buna göre, melatoninin önce bir elektron kaybederek radikal katyon oluşturduğu ve daha sonra bir elektron ile birlikte bir proton kaybederek tersinmez olarak yükseltgendiği önerilmektedir.



Şekil 60. Melatoninin muhtemel yükseltgenme mekanizması

PBTB/GCE yüzeyinde gerçekleşen melatoninin yükseltgenme reaksiyonu üzerinde adsorpsiyon etkisinin yüksek olması nedeni ile sürecin net olarak anlaşılabilmesi için öncelikle sıyırma parametreleri optimize edildi. Sıyırma parametrelerinin (biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi ve karıştırma hızı) optimizasyonu DPSV ve SWSV yöntemleri ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, pH 8.0 BRT içerisinde melatonin içeren çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çalışma çözeltileri kullanılarak öncelikle karıştırma hızı ve biriktirme süresi sabit tutularak biriktirme potansiyeli değiştirildi. Böylece en yüksek pik akımını veren potansiyeller DPSV ve SWSV yöntemlerinin her ikisi için de 0.0 V olarak belirlendi (Şekil 54). Daha sonra, her iki yöntem için karıştırma hızı ve belirlenen 0.0 V biriktirme potansiyeli sabit tutularak biriktirme süresi değiştirildi. Pik akımında DPSV için 120 s'ye kadar doğrusal bir artış görülürken sonrasında sabit kaldı (Şekil 55A). SWSV için ise pik akımındaki artış 90 s'e kadar devam etti ve ardından sabit kaldı (Şekil 55B). Son olarak, farklı karıştırma hızları denendi ve 100 rpm karıştırma hızının en tutarlı sonuçları

verdiği görüldü. Sonuç olarak, ideal biriktirme koşulları 100 rpm karıştırma hızı ile DPSV için 0.0 V biriktirme potansiyeli ve 120 s biriktirme süresi olarak ve SWSV için 0.0 V biriktirme potansiyeli ve 90 s biriktirme süresi olarak belirlendi.

Melatoninin kantitatif analizi, PBCP/GCE ve PBPB/GCE için DPV ve SWV yöntemleri, PBTB/GCE için ise DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. PBCP/GCE için, pH 8.0 FT içerisinde hazırlanan çalışma çözeltileri ile alınan ölçümler sonucunda, pik akım değeri okunabilen ilk melatonin derişimi DPV yöntemi için 8.0×10^{-8} M ve SWV yöntemi için 2.0×10^{-7} M oldu. Ayrıca, DPV ile tek kalibrasyon grafiğı elde edilirken, SWV ile farklı regresyon denklemine sahip iki kısım kalibrasyon grafiğı elde edildi. DPV için doğrusal aralık $8.0 \times 10^{-8} - 6.0 \times 10^{-5}$ M olarak 2.44×10^{-8} M teşhis sınırı ile ve SWV için doğrusal aralıklar $2.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$ M ve $2.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-4}$ M olarak 5.18×10^{-8} M teşhis sınırı ile elde edildi (Tablo 5). Geliştirilen yöntemlerin kesinliğini değerlendirebilmek amacıyla tekrar edilebilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için, pH 8.0 FT içerisinde melatonin çalışma çözeltileri hazırlanarak gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. Her bir yöntem için doğrusal aralık içinde kalan birer konsantrasyon seçildi ve bu konsantrasyonda hazırlanan üçer adet melatonin çözeltisinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %RSD'leri hesaplandı. Tablo 6'da her iki yöntem için verilen RSD değerleri pik potansiyeli için %0.22 ile %0.41 arasında ve pik akımı için %0.27 ile %0.61 arasında değişti. Elde edilen %1'den daha düşük RSD değerleri, DPV ve SWV yöntemlerinin kesinliğinin oldukça iyi olduğunu gösterdi.

PBPB/GCE için, pH 8.0 BRT içerisinde hazırlanan çalışma çözeltileri ile alınan ölçümler sonucunda, pik akım değeri okunabilen ilk melatonin derişimi DPV yöntemi için 6.0×10^{-8} M ve SWV yöntemi için 1.0×10^{-7} M oldu. DPV için doğrusal aralık $6.0 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-5}$ M olarak 1.70×10^{-8} M teşhis sınırı ile ve SWV için doğrusal aralık $1.0 \times 10^{-7} - 4.0 \times 10^{-5}$ M olarak 2.99×10^{-8} M teşhis sınırı ile elde edildi (Tablo 15). Geliştirilen yöntemlerin kesinliğini değerlendirebilmek amacıyla tekrar edilebilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için pH 8.0 BRT içerisinde melatonin çalışma çözeltileri hazırlanarak gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. Her iki yöntem için de doğrusal aralık içerisinde kalan bir konsantrasyon seçildi ve bu konsantrasyonda hazırlanan üç adet melatonin çözeltisinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %RSD'leri hesaplandı. Tablo 16'da her iki yöntem için verilen RSD değerleri pik potansiyeli için %0.29 ile %1.04 arasında ve pik akımı için %0.35 ile %1.00 arasında değişti. Elde edilen

%2'den daha düşük RSD değerleri, DPV ve SWV yöntemlerinin kesinliğinin oldukça iyi olduğunu gösterdi.

PBTB/GCE için, pH 8.0 BRT içerisinde hazırlanan çalışma çözeltileri ile alınan ölçümler sonucunda, pik akım değeri okunabilen ilk melatonin derişimi DPSV yöntemi için 4.0×10^{-8} M ve SWSV yöntemi için 6.0×10^{-8} M oldu. DPSV için doğrusal aralık 4.0×10^{-8} – 1.0×10^{-6} M olarak 8.28×10^{-9} M teşhis sınırı ile ve SWSV için doğrusal aralık 6.0×10^{-8} – 6.0×10^{-6} M olarak 1.73×10^{-8} M teşhis sınırı ile elde edildi (Tablo 25). Geliştirilen yöntemlerin kesinliğini değerlendirebilmek amacıyla tekrar edilebilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için pH 8.0 BRT içerisinde melatonin çalışma çözeltileri hazırlanarak gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. Her iki yöntem için de doğrusal aralık içerisinde kalan bir konsantrasyon seçildi ve bu konsantrasyonda hazırlanan üç adet melatonin çözeltisinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %RSD'leri hesaplandı. Tablo 26'da her iki yöntem için verilen RSD değerleri pik potansiyeli için %0.30 ile %0.49 arasında ve pik akımı için %0.80 ile %1.36 arasında değişti. Böylece, DPSV ve SWSV yöntemlerinin kesinliğinin %2'nin altındaki RSD değerleri ile oldukça iyi olduğu sonucuna varıldı.

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğunu değerlendirebilmek amacıyla melatoninin farmasötik preparatlardan tayini ve geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi. Seçilen tablet formunda melatonin miktarı 3.000 mg olarak beyan edilmişti. Bu miktar, farmasötik preparatlardan tayin çalışması sonucunda PBGP/GCE için DPV ile 3.018 mg ve SWV ile 3.078 mg olarak sırasıyla %0.87 ve %0.89 RSD değerleri ile bulundu (Tablo 7). Sonrasında melatonin tablet çözeltisi üzerine saf melatonin çözeltisinin eklenmesi ile yapılan geri kazanım çalışmasında, eklenen miktarlar DPV için %99.98 ve SWV için %99.67 ortalama geri kazanımlar ile elde edildi (Tablo 8). Aynı çalışma PBPB/GCE için de yapıldı ve beyan edilen miktar, DPV ile 3.094 mg ve SWV ile 3.084 mg olarak sırasıyla %0.30 ve %0.21 RSD değerleri ile bulundu (Tablo 17). Melatonin tablet çözeltisi üzerine saf melatonin çözeltisinin eklenmesi ile yapılan geri kazanım çalışmasında ise eklenen miktarlar DPV için %100.08 ve SWV için %100.65 ortalama geri kazanımlar ile elde edildi (Tablo 18). Son olarak, PBTB/GCE için beyan edilen melatonin miktarı DPSV ile 3.008 mg ve SWSV ile 3.021 mg olarak sırasıyla %2.23 ve %1.60 RSD değerleri ile bulundu (Tablo 27). Melatonin tablet çözeltisi üzerine saf melatonin çözeltisinden eklenmesi ile yapılan geri kazanım çalışmasında da eklenen miktarlar DPSV için %100.46 ve SWSV için %100.56 ortalama

geri kazanımlar ile elde edildi (Tablo 28). Tüm modifiye elektrotlar ile farmasötik preparatlardan yapılan tayin çalışmalarında melatonin miktarlarının beyan edilen miktara oldukça yakın çıkması ve geri kazanım çalışmalarında %100'e yakın ortalama geri kazanımlar elde edilmesi, tablette bulunan etkin madde dışındaki diğer bileşenlerin bu çalışma kapsamında geliştirilen yöntemlere bir etkisinin olmadığını ortaya koydu.

DPV/DPSV ve SWV/SWSV her ne kadar birbirine benzer puls yöntemleri olarak bilinse de hız ve hassasiyet açısından farklılıklar gösterir ve farklı avantajlara sahiptirler. Dolayısıyla analiz edilecek numuneye göre farklı sonuçlar verebilirler. Buna göre, her bir modifiye elektrot ile melatonin tayini için geliştirilen puls yöntemlerinin istatistiksel karşılaştırması, geri kazanım çalışmasından elde edilen melatonin pik akımları üzerinden yapılan hesaplamalar ile değerlendirildi. Bu çalışmalar için hesaplanan *t*-testi ve *F*-testi sonuçlarının %95 güven seviyesindeki teorik değerlerden (Tablo 8, Tablo 18 ve Tablo 28) düşük olması, her bir modifiye elektrot için geliştirilen yöntemler arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmadığını gösterdi.

Geliştirilen yöntemler sonraki aşamada melatonin içeren serum ve yapay idrar çözeltilerine de uygulandı. Buna göre, her bir modifiye elektrot için seçilen destek elektrolit ortamında melatonin içeren serum ve yapay idrar çözeltileri hazırlandı. Buna göre, PBCP/GCE için pH 8.0 FT ortamında serum çözeltilerinden elde edilen voltamogramlarda pik akımının okunabildiği en düşük konsantrasyon DPV için 1.0×10^{-7} M ve SWV için 2.0×10^{-7} M iken, yapay idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlarda ise pik akımının okunabildiği en düşük konsantrasyon DPV için 1.0×10^{-7} M ve SWV için 4.0×10^{-7} M olarak bulundu. DPV ve SWV kullanılarak melatonin içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırları sırasıyla 2.71×10^{-8} M ve 3.91×10^{-8} M olarak ve yapay idrar çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırları sırasıyla 2.84×10^{-8} M ve 6.67×10^{-8} M olarak hesaplandı (Tablo 9 ve 10). Tablo 11'de verilen, serum çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verilerine göre, RSD değerleri pik potansiyeli için %0.01 ile %0.55 arasında ve pik akımı için %0.46 ile %1.50 arasında değişti. Tablo 12'de verilen, yapay idrar çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verilerine göre ise, RSD değerleri pik potansiyeli için %0.01 ile %0.54 arasında ve pik akımı için %0.29 ile %0.83 arasında değişti. %2'nin altında elde edilen RSD'ler geliştirilen yöntemlerin kesinliğinin, içerisinde girişim yapabilecek çok sayıda bileşen bulunan serum ve yapay idrar çözeltilerinde de iyi olduğunu gösterdi.

Aynı çalışma PBPB/GCE için pH 8.0 BRT ortamında melatonin içeren serum ve yapay idrar çözeltileri hazırlanarak yapıldı. Serum ve yapay idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlarda pik akımının okunabildiği en düşük konsantrasyonlar DPV için 1.0×10^{-7} M ve SWV için 2.0×10^{-7} M olarak bulundu. DPV ve SWV kullanılarak melatonin içeren serum çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırları sırasıyla 3.15×10^{-8} M ve 5.76×10^{-8} M olarak ve yapay idrar çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırları sırasıyla 3.42×10^{-8} M ve 5.43×10^{-8} M olarak hesaplandı (Tablo 19 ve 20). Tablo 21’de verilen, serum çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verilerine göre, RSD değerleri pik potansiyeli için %0.01 ile %0.46 arasında ve pik akımı için %0.65 ile %0.89 arasında değişti. Tablo 22’de verilen, yapay idrar çözeltilerinden DPV ve SWV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verilerine göre ise, RSD değerleri pik potansiyeli için %0.22 ile %0.50 arasında ve pik akımı için %0.65 ile %1.26 arasında değişti. %2’nin altında elde edilen RSD’ler geliştirilen yöntemlerin kesinliğinin, içerisinde girişim yapabilecek çok sayıda bileşen bulunan serum ve yapay idrar çözeltilerinde de iyi olduğunu gösterdi.

Son olarak, iki polimer için yapılan deneyler PBTB/GCE için de pH 8.0 BRT ortamında melatonin içeren serum ve yapay idrar çözeltileri ile yürütüldü. Serum ve yapay idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlarda pik akımının okunabildiği en düşük konsantrasyonlar DPSV için 4.0×10^{-8} M ve SWSV için 6.0×10^{-8} M olarak bulundu. DPSV ve SWSV kullanılarak melatonin içeren serum çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırları sırasıyla 1.01×10^{-8} M ve 1.84×10^{-8} M olarak ve yapay idrar çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırları sırasıyla 1.25×10^{-8} M ve 1.79×10^{-8} M olarak hesaplandı (Tablo 29 ve 30). Tablo 31’de verilen, serum çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verilerine göre, RSD değerleri pik potansiyeli için %0.46 ile %0.89 arasında ve pik akımı için %0.73 ile %1.98 arasında değişti. Tablo 32’de verilen, yapay idrar çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verilerine göre ise, RSD değerleri pik potansiyeli için %0.46 ile %0.58 arasında ve pik akımı için %1.49 ile %1.91 arasında değişti. Bu sonuçlar ışığında, PBTB/GCE için de geliştirilen yöntemlerin serum ve yapay idrar çözeltilerindeki kesinliğinin iyi olduğuna karar verildi.

Geliştirilen yöntemlerin serum ve yapay idrar içerisindeki melatonin için doğruluğu yapılan geri kazanım çalışmaları ile tespit edildi. Buna göre, PBCP/GCE için, serum

çözeltilerine eklenen saf melatonin miktarı DPV ve SWV için sırasıyla %101.06 ve %100.32 ortalama geri kazanımlar ile elde edilirken (Tablo 13), yapay idrar çözeltilerine eklenen saf melatonin miktarı DPV ve SWV için sırasıyla %99.36 ve %99.90 ortalama geri kazanımlar ile elde edildi (Tablo 14). PBPB/GCE için, serum çözeltilerine eklenen saf melatonin miktarı DPV ve SWV için sırasıyla %99.84 ve %100.83 ortalama geri kazanımlar ile elde edilirken (Tablo 23), yapay idrar çözeltilerine eklenen saf melatonin miktarı DPV ve SWV için sırasıyla %100.15 ve %100.07 ortalama geri kazanımlar ile elde edildi (Tablo 24). Son olarak PBTB/GCE için, serum çözeltilerine eklenen saf melatonin miktarı DPSV ve SWSV için sırasıyla %98.46 ve %100.04 ortalama geri kazanımlar ile elde edilirken (Tablo 33), yapay idrar çözeltilerine eklenen saf melatonin miktarı DPSV ve SWSV için sırasıyla %100.55 ve %100.41 ortalama geri kazanımlar ile elde edildi (Tablo 34). Yapılan doğruluk çalışmaları sonucunda %100'e oldukça yakın geri kazanımlar elde edilmesi, serumda ve yapay idrarda bulunan girişim yapabilecek türlerin tüm modifiye elektrotlar için geliştirilen yöntemlerle gerçekleştirilen melatoninin analizini etkilemediği sonucuna varıldı. Doğruluk çalışmalarında son olarak, her bir modifiye elektrot için kullanılan her iki yöntemin istatistiksel karşılaştırması, melatonin içeren serum ve yapay idrar çözeltileri ile gerçekleştirilen geri kazanım çalışmasından elde edilen melatonin pik akımları üzerinden yapılan hesaplamalar ile değerlendirildi. Hem serum hem de yapay idrar çözeltileri için hesaplanan *t*- ve *F*-testi sonuçları %95 güven seviyesindeki teorik değerlerden (PBCP/GCE için Tablo 13 ve 14; PBPB/GCE için Tablo 23 ve 24; PBTB/GCE için Tablo 33 ve 34) daha düşük olduğu için geliştirilen yöntemler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadığı sonucuna varıldı.

Geliştirilen voltametrik yöntemlerin melatonine karşı seçiciliği, insan vücut sıvılarında bulunan askorbik asit ve ürik asit endojen maddeleri ve Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , NO_3^- ve SO_4^{-2} iyonları varlığında incelendi. Bunun için, melatonin içeren çözeltiler içerisine melatonin konsantrasyonunun 100 katı konsantrasyondaki NaCl , KNO_3 , CaCl_2 ve K_2SO_4 tuzları eklendi. Bu tuzların ilavesinden sonra melatonin pik akımındaki değişim PBCP/GCE için ± 2.0 'den, PBPB/GCE için ± 1.13 'ten ve PBTB/GCE için ± 3.16 'dan daha azdı. Ayrıca, vücut sıvılarında bulunan ve yaygın olarak girişim yapan türlerden askorbik asit (80 μM) ve ürik asit (8 μM), melatonin (PBCP ve PBPB için 3 μM , PBTB için 0.3 μM) içeren tampon çözelti içerisine eklendi ve voltamogramlar alındı. PBCP/GCE için Şekil 25'te, PBPB/GCE için Şekil 41'de ve PBTB/GCE için Şekil 59'da görüldüğü gibi, her bir modifiye elektrot ile bu üç maddeye ait yükseltgenme pikleri birbirinden farklı

potansiyellerde ayrı birer pik şeklinde herhangi bir girişim olmadan elde edildi. Ayrıca, bu maddelerin ilavesi ile melatonin pik akımındaki değişimin de PBCP/GCE için $\pm\%3.9$ 'dan, PBPB/GCE için $\pm\%0.12$ 'den ve PBTB/GCE için $\pm\%4.06$ 'dan daha az olduğu görüldü. Melatonin pik akımındaki değişimlerin oldukça düşük olması ve ayrıca pik potansiyelinde ve simetrisinde herhangi bir değişikliğin bulunmaması, geliştirilen tüm yöntemlerin bu maddeler varlığında melatonine karşı seçiciliğinin oldukça iyi olduğunu gösterdi.

Hazırlanan modifiye elektrotların kararlılığını değerlendirmek amacıyla, PBCP/GCE ve PBPB/GCE için CV ve DPV yöntemleri ile, PBTB/GCE için ise CV ve DPSV yöntemleri ile hem operasyonel hem de zamana karşı stabilite çalışmaları gerçekleştirildi. Modifiye elektrotun operasyonel stabilitesi için 100 döngülü CV alındı ve ölçüm sonucunda elektrot yüzeyindeki değişim incelendi. Buna göre, 100. döngü sonunda elde edilen melatonin pik akımının, ilk döngüdeki değerini PBCP/GCE için %99.4 oranında, PBPB/GCE için %98.9 oranında koruduğu görülürken, PBTB/GCE için ise 50. döngü sonunda elde edilen melatonin pik akımının, ilk döngüdeki değerini %98.2 oranında koruduğu görüldü. Modifiye elektrotların zamana karşı stabilitesi için ise PBCP/GCE ve PBPB/GCE için DPV yöntemi ve PBTB/GCE için DPSV yöntemi ile gün aşırı ölçümler alındı. Analiz sonuçlarına göre, PBCP/GCE'nin stabilitesini 14. güne kadar %95.9 oranında, PBPB/GCE'nin stabilitesini 10. güne kadar %94.9 oranında ve PBTB/GCE'nin de stabilitesini 8. güne kadar %96.9 oranında koruduğu belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda, hazırlanan polimer modifiye elektrotların kararlılığının iyi olduğu anlaşıldı.

Modifiye elektrotların yeniden üretilebilirliği, farklı günlerde birbirinden bağımsız olarak hazırlanan beş elektrot ile aynı konsantrasyondaki melatonin çözeltisinin PBCP/GCE ve PBPB/GCE için DPV yöntemi ve PBTB/GCE için DPSV yöntemi ile elde edilen pik akım değerleri üzerinden belirlendi. Buna göre, elde edilen beş adet melatonin pik akım değerinin %RSD'leri PBCP/GCE için %0.38, PBPB/GCE için %0.54 ve PBTB/GCE için %1.63 olarak hesaplandı. Elde edilen bu düşük RSD değerleri bu tez çalışmasında geliştirilen modifiye elektrotların yeniden üretilebilirliğinin iyi olduğunu gösterdi. Bu da, elektrotların stabil olarak kaldıkları süreler aşıldığında veya hazırlanan modifiye elektrot yüzeylerinin herhangi bir nedenle deforme olması durumunda, hazırlanacak yeni elektrot ile çalışmaların kaldığı yerden devam ettirilebilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir.

5.4. PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE'lerin Karşılaştırılması

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen polimer film modifiye elektrotlarla elde edilen bazı sonuçlar birbiri ile karşılaştırılarak elektrotlar arasındaki üstünlükler ortaya konuldu. Buna göre, polimerlerin GCE yüzeyine elektropolimerizasyon reaksiyonu en kontrollü şekilde PBPB/GCE için 50 döngü ile elde edilirken ikinci en kontrollü polimerizasyon ise PBCP/GCE için 35 döngü ile elde edildi.

Elde edilen PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE'lerin hesaplanan elektroaktif yüzey alanları karşılaştırıldığında, 0.1402 cm^2 ile en geniş elektroaktif yüzey alanının PBCP/GCE'de elde edildiği, sonraki en geniş yüzey alanına ise PBPB/GCE'nin sahip olduğu belirlendi. EIS çalışmaları sonucunda hesaplanan R_{ct} değerleri karşılaştırıldığında ise, en düşük yük transfer direncinin, yani daha yüksek elektriksel iletkenliğin PBCP/GCE ile elde edildiği belirlendi.

PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE kullanılarak geliştirilen yöntemlerle yapılan melatonin analizinin sonuçları değerlendirildiğinde, üç elektrot yüzeyinde de melatonin tersinmez anodik davranış gösterdi. Hız taraması çalışmalarında, melatoninin PBCP/GCE ve PBPB/GCE üzerinde difüzyon kontrollü olarak yükseltildiği, ancak PBTB/GCE yüzeyinde adsorpsiyon etkisinin baskın olduğu tespit edildi. Bu nedenle PBTB/GCE için sıyırma parametreleri optimize edildi. Kalibrasyon çalışmaları PBCP/GCE ve PBPB/GCE için sıyırmaz puls yöntemleriyle gerçekleştirilirken, PBTB/GCE için sıyırma yöntemleriyle gerçekleştirildi. Kalibrasyon çalışması sonuçlarına göre, en geniş doğrusal aralık PBCP/GCE kullanılarak DPV yöntemi ile elde edilirken, en düşük LOD değeri PBTB/GCE kullanılarak DPSV yöntemi ile elde edildi (Tablo 5, 15 ve 25). En düşük LOD'nin PBTB/GCE ile elde edilmesi, bu elektrot için daha hassas sıyırmalı yöntemlerin kullanılması ile açıklanabilir. Kesinliğin değerlendirilmesinde PBCP/GCE ve PBPB/GCE'nin her ikisi için de çok düşük %RSD değerleri elde edilirken, PBTB/GCE için diğerlerine kıyasla daha yüksek %RSD'ler elde edildi. Hazırlanan üç elektrotun ve geliştirilen tüm yöntemlerin kesinliği tatmin edici olmakla birlikte (Tablo 6, 16 ve 26), diğer iki elektrotla kıyaslandığında PBTB/GCE ile daha yüksek RSD değerlerinin elde edilmesinin, bu elektrot yüzeyinde gerçekleşen melatonin yükseltgenme reaksiyonunda adsorpsiyon etkisinin yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Her bir elektrot ile geliştirilen yöntemler kullanılarak melatonin, farmasötik dozaj formlarından, insan serumundan ve yapay idrar örneklerinden tayin edildi. Buna göre,

melatonin için hazırlanan üç elektrotun ve geliştirilen her bir yöntemin hem farmasötik dozaj formlarına hem de biyolojik numunelere başarıyla uygulanabildiği görüldü. Hazırlanan üç farklı elektrot kullanılarak geliştirilen yöntemlerle melatoninin farmasötik dozaj formu ile yapılan doğruluk çalışmalarında elde edilen geri kazanım değerleri birbirine oldukça yakın olup %99.67 ile %100.65 arasında bulundu (Tablo 8, 18 ve 28). İnsan serumu ve yapay idrar çözeltisi ile yapılan çalışmaların sonuçlarına bakıldığında, her bir elektrotla gerçekleştirilen tüm yöntemler için Tablo 9,10, 19, 20, 29 ve 30’da verilen doğrusal aralıklar, Tablo 5, 15 ve 25’te verilen saf melatonin için elde edilen sonuçlara benzerdi. İnsan serumundan melatonin tayininde en düşük LOD değerleri PBTB/GCE kullanılarak DPSV yöntemiyle elde edildi (Tablo 9, 19 ve 29). Serum çözeltisinden elde edilen %RSD değerleri saf melatonin çözeltisinden elde edilenlere benzer şekilde düşüktü ve her bir yöntemle elde edilen geri kazanım değerleri de %98.46 ile %101.06 arasındaydı (Tablo 13, 23 ve 33). Yapay idrar çözeltisinden melatoninin tayininde en düşük LOD değerleri ise yine PBTB/GCE kullanılarak DPSV yöntemiyle elde edildi (Tablo 10, 20 ve 30). Yapay idrar çözeltisinden elde edilen %RSD değerleri yine saf melatonin çözeltisinden elde edilenlere benzer şekilde düşüktü ve her bir yöntemle elde edilen geri kazanım değerleri %99.36 ile %100.55 arasındaydı (Tablo 14, 24 ve 34). Serum ve yapay idrardan yapılan melatonin analizi sonuçlarının saf melatonin çözeltileri ile elde edilen sonuçlarla uyumlu çıkması, geliştirilen yöntemlerin serum ve yapay idrardaki girişim yapan maddelerin varlığından etkilenmediğini gösterdi.

Askorbik asit ve ürik asit ile Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , NO_3^- ve SO_4^{-2} iyonlarının varlığında gerçekleştirilen melatonin tayininde, PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE ile geliştirilen voltametrik yöntemlerle melatonin pik akımındaki değişimin $\pm\%4.06$ ’dan az olduğu görüldü. Bu sonuçlar, PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE ile geliştirilen voltametrik yöntemlerin hepsinin melatonine karşı seçiciliğinin oldukça yüksek olduğunu gösterdi.

Hazırlanan PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE’lerin hem zamana hem de tekrarlı analize karşı stabiliteleri karşılaştırıldığında, stabilitesi en iyi olan elektrotun yaklaşık iki hafta ile PBCP/GCE olduğu belirlendi. Polimerler arasında en düşük stabilite ise PBTB/GCE için elde edildi. Benzer eğilimle, yeniden üretilebilirliği en iyi olan elektrotun PBCP/GCE ve en düşük olan elektrotun ise PBTB/GCE olduğu belirlendi.

5.5. Melatoninin Kalibrasyon Çalışması Sonuçlarının Literatürdeki Çalışmalar ile Karşılaştırılması

Tez çalışması kapsamında geliştirilen PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE kullanılarak yapılan melatoninin kantitatif analiz çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile Bölüm 2.13'te verilen literatür çalışmalarının sonuçları (Tablo 1) doğrusal aralıklar ve LOD değerleri üzerinden karşılaştırıldı.

Tablo 1'de, melatoninin analizine dair literatürde bulunan çalışmalar özetlenmiş ve bu tez çalışması kapsamında hazırlanan elektrotlarla elde edilen melatonin analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Yapılan incelemede, PBCP/GCE ve PBPB/GCE ile yapılan karşılaştırmaların aynı sonuca ulaştığı görüldü. Buna göre, hem doğrusal aralıkları bu iki polimer modifiye elektrottan daha geniş olan hem de teşhis sınırları daha düşük olan çalışmalar sadece (164), (187), (191), (194), (195) ve (196) numaralı çalışmalardı. Bunun dışındaki çalışmalarda her iki parametre açısından PBCP/GCE ve PBPB/GCE ile elde edilenlerden daha iyi sonuçlar elde edilememiştir. Literatürdeki bu çalışmalar incelendiğinde, (164) numaralı çalışmada sıyırma yöntemi (DPSV) kullanılarak bu çalışmadakine göre daha zaman alıcı bir prosedür uygulanmıştır. Ayrıca, (164) numaralı çalışmada herhangi bir geri kazanım çalışması yapılmamış olup, yöntemin doğruluğuna dair bir veri de sunulmamıştır. Tablo 1'deki (187), (191), (194), (195) ve (196) numaralı çalışmalarda kullanılan elektrotların ise PBCP/GCE ve PBPB/GCE'ye kıyasla, daha karmaşık ve zaman alıcı bir modifikasyon prosedürüne sahip oldukları ve haliyle hazırlanan elektrotların daha maliyetli olabileceği değerlendirildi. Bu tez çalışmasında geliştirilen PBCP/GCE ve PBPB/GCE'ler, tek adımda kolayca hazırlanabilmeleri ve oldukça ekonomik olmaları açısından bu çalışmalara göre üstünlük taşımaktadır.

Son olarak, PBTB/GCE ile elde edilen melatonin analiz sonuçları literatürde yer alan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldı. Buna göre, hem doğrusal aralıkları daha geniş hem de teşhis sınırları daha düşük olan verilerin sadece (164), (187), (192), (194) ve (195) numaralı çalışmalarla elde edildiği, bunun dışındaki diğer çalışmaların her iki parametre açısından PBTB/GCE ile elde edilenden daha iyi sonuçlar vermediği belirlendi. Bu çalışmalar incelendiğinde, (164) numaralı çalışmada da bu çalışmadaki gibi sıyırma yönteminin kullanıldığı görülmüş, ancak çalışmada herhangi bir geri kazanım çalışması yapılmadığından yöntemin doğruluğu belirlenmemiştir. Tablodaki (187), (192) ve (195) numaralı çalışmalarda kullanılan elektrotların ise PBTB/GCE'ye kıyasla, daha karmaşık ve

zaman alıcı bir modifikasyona sahip oldukları ve bu nedenle daha maliyetli olabileceği değerlendirildi. Bu çalışmada geliştirilen PBTB/GCE ise tek adımda ekonomik şekilde kolayca hazırlandı.

Özetle, bu tez kapsamında geliştirilen polimer film modifiye elektrotlar; doğrusal aralık, LOD, elektrotlarla yapılan çalışmalardaki çeşitlilik, elektrotların modifikasyonu için kullanılan maddelerin ulaşılabilirliği ve modifikasyon prosedürünün kolaylığı açısından bir bütün olarak değerlendirildiğinde, Tablo 1’de listelenen 38 çalışmaya kıyasla daha avantajlıdır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında geliştirilen PBCP/GCE, PBPB/GCE ve PBTB/GCE’ler kullanılarak melatonin hormonunun, uyku bozukluğu olan hastaların kan ve idrar örneklerinden hızlı ve hassas bir şekilde tayininin yapılabilmesi mümkündür. Dolayısıyla, geliştirilen bu elektrotlar, klinikte uyku bozukluğu hastalığının teşhisi ve devamında melatonin tedavisi altındaki hastaların izlemi için kullanılabilir. Ayrıca, geliştirilen bu elektrotlar, farklı maddelerin analizi için sensör uygulamaları alanında yapılacak çalışmalara katkı sağlama potansiyeline de sahiptir.

6. KAYNAKLAR

1. Řemínek R, Foret F (2021). Capillary electrophoretic methods for quality control analyses of pharmaceuticals: A review. *Electrophoresis* 42: 19–37.
2. Kelíšková P, Matvieiev O, Janíková L, Šelešovská R (2023). Recent advances in the use of screen-printed electrodes in drug analysis: A review. *Current Opinion in Electrochemistry* 42: 101408.
3. Mahaffey AL (2021). Prominence of analytical chemistry in modern-day healthcare: Current medical discoveries, student perspectives, and systems thinking. *Analytical Chemistry* 93: 4775–4781.
4. Carskadon MA, Dement WC (2005). Normal human sleep: An overview. *Principles and Practice of Sleep Medicine* 4: 13–23.
5. Buysse DJ (2014). Sleep health: Can we define it? Does it matter?. *Sleep* 37: 9–17.
6. Doğan O, Ertekin Ş, Doğan S (2005). Sleep quality in hospitalized patients. *Journal of Clinical Nursing* 14: 107–113.
7. Holka-Pokorska J, Wichniak A, Lew-Starowicz M (2021). Sleep disorders. Lew-Starowicz M, Giraldi A, Krüger T (Eds.), *Psychiatry and Sexual Medicine: A Comprehensive Guide for Clinical Practitioners*, 291–307. https://doi.org/10.1007/978-3-030-52298-8_20.
8. Şahin L, Aşçıoğlu M (2013). Sleep and regulation of sleep. *Journal of Health Science* 22: 93–98.
9. Avidan AY (2003). Insomnia in the geriatric patient. *Clinical Cornerstone* 5: 51–60.
10. Tobler I (1995). Is sleep fundamentally different between mammalian species?. *Behavioural Brain Research* 69: 35–41.
11. Al Lihabi A (2023). A literature review of sleep problems and neurodevelopment disorders. *Frontiers in Psychiatry* 14: 1122344.
12. Cho JW, Duffy JF (2019). Sleep, sleep disorders, and sexual dysfunction. *World Journal of Men's Health* 37: 261–275.
13. Blunden S, Yiallourou S, Fatima Y (2022). Sleep health and its implications in First Nation Australians: A systematic review. *The Lancet Regional Health - Western Pacific* 21: 100386.
14. Tümer A, İlhan B, Kartal A (2017). Gençlerde insomni görülme sıklığı. *OPUS Uluslararası Toplum Araştırmaları Dergisi* 7: 426–439.

15. The Sleep Disorders Classification Committee (1979). Diagnostic Classification of Sleep and Arousal Disorders. Roffwarg HP (Ed.), Sleep, 1st ed., Raven Press, New York, 1–137.
16. American Academy of Sleep Medicine (2005). The International Classification of Sleep Disorders: Diagnostic & Coding Manual, 2nd ed., Westchester.
17. Sateia MJ (2014). International classification of sleep disorders-Third edition: Highlights and modifications. Chest 146: 1387–1394.
18. Watson NF, Badr MS, Belenky G, Bliwise DL, Buxton OM, Buysse D, Dinges DF, Gangwisch J, Grandner MA, Kushida C, et al. (2015). Recommended amount of sleep for a healthy adult: A joint consensus statement of the American Academy of Sleep Medicine and Sleep Research Society. Journal of Clinical Sleep Medicine 11: 591–592.
19. Hirshkowitz M, Whiton K, Albert SM, Alessi C, Bruni O, DonCarlos L, Hazen N, Herman J, Adams Hillard PJ, Katz ES, et al. (2015). National Sleep Foundation’s updated sleep duration recommendations: Final report. Sleep Health 1: 233–243.
20. Paruthi S, Brooks LJ, D’Ambrosio C, Hall WA, Kotagal S, Lloyd RM, Malow BA, Maski K, Nichols C, Quan SF, et al. (2016). Consensus statement of the American Academy of Sleep Medicine on the recommended amount of sleep for healthy children: Methodology and discussion. Journal of Clinical Sleep Medicine 12: 1549–1561.
21. Bassetti CLA, Randerath W, Vignatelli L, Ferini-Strambi L, Brill AK, Bonsignore MR, Grote L, Jennum P, Leys D, Minnerup J, et al. (2020). EAN/ERS/ESO/ESRS statement on the impact of sleep disorders on risk and outcome of stroke. European Journal of Neurology 27: 1117–1136.
22. Lim DC, Najafi A, Afifi L, Bassetti C LA, Buysse DJ, Han F, Högl B, Melaku YA, Morin CM, Pack AI, et al. (2023). The need to promote sleep health in public health agendas across the globe. The Lancet Public Health 8: e820–e826.
23. Robbins R, Quan SF, Weaver MD, Bormes G, Barger LK, Czeisler CA (2021). Examining sleep deficiency and disturbance and their risk for incident dementia and all-cause mortality in older adults across 5 years in the United States. Aging 13: 3254–3268.
24. Luyster FS, Strollo PJ, Zee PC, Walsh JK (2012). Sleep: A health imperative. Sleep 35: 727–734.

25. Ram S, Seirawan H, Kumar SKS, Clark GT (2010). Prevalence and impact of sleep disorders and sleep habits in the United States. *Sleep and Breathing* 14: 63–70.
26. Ohayon MM (2011). Epidemiological overview of sleep disorders in the general population. *Sleep Medicine Research* 2: 1–9.
27. Holbrook AM, Crowther R, Lotter A, Cheng C, King D (2000). Meta-analysis of benzodiazepine use in the treatment of insomnia. *CMAJ* 162: 225–233.
28. Huedo-Medina TB, Kirsch I, Middlemass J, Klonizakis M, Siriwardena AN (2012). Effectiveness of non-benzodiazepine hypnotics in treatment of adult insomnia: Meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration. *BMJ* 345: e8343.
29. Pagel JF, Farnes BL (2001). Medications for the treatment of sleep disorders: An overview. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry* 3: 118–125.
30. Karacan I, Orr W, Roth T, Kramer M, Thornby J, Bingham S, Kay D (1981). Dose-related effects of phenobarbitone on human sleep-waking patterns. *British Journal of Clinical Pharmacology* 12: 303–313.
31. Ozdemir PG, Karadag AS, Selvi Y, Boysan M, Bilgili SG, Aydin A, Onder S (2014). Assessment of the effects of antihistamine drugs on mood, sleep quality, sleepiness, and dream anxiety. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice* 18: 161–168.
32. Lie JD, Tu KN, Shen DD, Wong BM (2015). Pharmacological treatment of insomnia. *Pharmacy and Therapeutics* 40: 759–771.
33. Rios P, Cardoso R, Morra D, Nincic V, Goodarzi Z, Farah B, Harricharan S, Morin CM, Leech J, Straus SE, et al. (2019). Comparative effectiveness and safety of pharmacological and non-pharmacological interventions for insomnia: An overview of reviews. *Systematic Reviews* 8: 1–16.
34. Jafari-Koulaee A, Bagheri-Nesami M (2021). The effect of melatonin on sleep quality and insomnia in patients with cancer: A systematic review study. *Sleep Medicine* 82: 96–103.
35. Andersen LPH, Gögenur I, Rosenberg J, Reiter RJ (2016). The safety of melatonin in humans. *Clinical Drug Investigation* 36: 169–175.
36. Ferracioli-Oda E, Qawasmi A, Bloch MH (2013). Meta-analysis: Melatonin for the treatment of primary sleep disorders. *PLOS ONE* 8: e63773.

37. Buscemi N, Vandermeer B, Hooton N, Pandya R, Tjosvold L, Hartling L, Vohra S, Klassen TP, Baker G (2006). Efficacy and safety of exogenous melatonin for secondary sleep disorders and sleep disorders accompanying sleep restriction: Meta-analysis. *BMJ* 332: 385–393.
38. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society* 80: 2587.
39. Hardeland R (1996). Ubiquitous melatonin-Presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology* 2: 25–45.
40. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Poeggeler B (2007). Melatonin in plants–Focus on a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Functional Plant Science and Biotechnology* 1: 32–45.
41. Tan DX, Zheng X, Kong J, Manchester LC, Hardel R, Kim SJ, Xu X, Reiter RJ (2014). Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: Relation to their biological functions. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 15858–15890.
42. Hardeland R (2015). Melatonin in plants and other phototrophs: Advances and gaps concerning the diversity of functions. *Journal of Experimental Botany* 66: 627–646.
43. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ (2003). Melatonin: A hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *Journal of Pineal Research* 34: 75–78.
44. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA (2007). Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *Journal of Physiology and Pharmacology* 58: 23–52.
45. Zawilska JB, Nowak JZ (1992). Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochemistry International* 20: 23–36.
46. Launay JM, Lemaitre BJ, Husson HP, Dreux C, Hartmann L, Da Prada M (1982). Melatonin synthesis by rabbit platelets. *Life Sciences* 31: 1487–1494.
47. Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R (2008). Melatonin in the skin: Synthesis, metabolism and functions. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 19: 17–24.
48. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ (2015). Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and metabolism. *Molecules* 20: 18886–18906.

49. Di W-L, Kadva A, Johnston A, Silman R (1997). Variable bioavailability of oral melatonin. *New England Journal of Medicine* 336: 1028–1029.
50. Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ (1972). Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 91: 1213–1218.
51. Mallo C, Zaidan R, Galy G, Vermeulen E, Brun J, Chazot G, Claustrat B (1990). Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *European Journal of Clinical Pharmacology* 38: 297–301.
52. Macchi MM, Bruce JN (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology* 25: 177–195.
53. Koçak A, Çolak A (1996). Melatonin ve santral sinir sistemi. *Journal of Turgut Ozal Medical Center* 3(3): 237–244.
54. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougere C (2017). Melatonin: Pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Current Neuropharmacology* 15: 434–443.
55. Iguchi H, Kato KI, Ibayashi H (1982). Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cirrhosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 54: 1025–1027.
56. Viljoen M, Steyn ME, Van Rensburg BWJ, Reinach SG (1992). Melatonin in chronic renal failure. *Nephron* 60: 138–143.
57. Givler D, Givler A, Luther PM, Wenger DM, Ahmadzadeh S, Shekoohi S, Edinoff AN, Dorius BK, Jean Baptiste C, Cornett EM, et al. (2023). Chronic administration of melatonin: Physiological and clinical considerations. *Neurology International* 15: 518–533.
58. Avery D, Lenz M, Landis C (1998). Guidelines for prescribing melatonin. *Annals of Medicine* 30: 122–130.
59. Kumar V (1996). Melatonin: A master hormone and a candidate for universal panacea. *Indian Journal of Experimental Biology* 34: 391–402.
60. Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Esquifino AI, Pandi Perumal SR, Miller SC (2005). Melatonin, immune function and aging. *Immunity and Ageing* 2: 1–10.
61. Claustrat B, Brun J, Chazot G (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews* 9: 11–24.

62. Weissová K, Škrabalová J, Skálová K, Červená K, Bendová Z, Miletínová E, Kopřivová J, Šonka K, Dudysová D, Bartoš A, et al. (2018). Circadian rhythms of melatonin and peripheral clock gene expression in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Sleep Medicine* 52: 1–6.
63. Kikwai L, Kanikkannan N, Babu RJ, Singh M (2002). Effect of vehicles on the transdermal delivery of melatonin across porcine skin in vitro. *Journal of Controlled Release* 83: 307–311.
64. Mannino G, Pernici C, Serio G, Gentile C, Berteà CM (2021). Melatonin and phytemelatonin: Chemistry, biosynthesis, metabolism, distribution and bioactivity in plants and animals—An overview. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 9996.
65. Mahal HS, Sharma HS, Mukherjee T (1999). Antioxidant properties of melatonin: A pulse radiolysis study. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 557–565.
66. O'Mullane AP (2013). Electrochemistry. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.05344-0>.
67. Lefrou C, Fabry P, Poignet JC (2012). *Electrochemistry: The basics, with Examples*, Springer Science & Business Media, Germany. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30250-3>.
68. Brett CMA (2014). Electrochemistry. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.10742-5>.
69. Salah R (2020). All about the electrochemical cell and its different types. *Electrochemical Cells, Galvanic Cell, and Fuel Cells* 1–25.
70. Wang J (2006). *Electroanalytical Chemistry*, 3rd ed., Wiley-VCH Pub., New Jersey.
71. Newman J (1967). The effect of migration in laminar diffusion layers. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 10: 983–997.
72. Grinberg N, Rodriguez S (2019). *Ewing's Analytical Instrumentation Handbook*. 4th ed. CRC Press, United States.
73. Gündüz T (2007). *İnstrümental Analiz*. Onuncu baskı. Gazi Kitabevi Tic. Ltd. Şti, Ankara.
74. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (2007). *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed. David Harris, Belmont.

75. Wang J (2000). Analytical Electrochemistry, 2nd ed., Wiley-VCH Pub., New York.
76. Scholz F (2010). Electroanalytical methods, 2nd ed., Springer, Berlin.
77. Harris DC (2015). Quantitative Chemical Analysis. Nicel Kimyasal Analiz. 8th ed. Çeviren: Türker AR, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti., Ankara, 279–385.
78. Record TC (2012). Reproduction of: J. Heyrovský, Chemické Listy 1922, 16 , 256–264 . The Chemical Record 12: 17–25.
79. Protti P (2001). Introduction to modern voltammetric and polarographic analysis techniques. AMEL S.r.l, p10.
80. Kounaves SP (1997). Voltammetric techniques. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, 709–726.
81. Sharma S, Mehtab S, Zaidi MG (2020). Voltammetry: An electrochemical analytical method. Chemical Sciences 1: 129–140.
82. Kahlert H (2010). Reference electrodes. Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications 291–308.
83. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2004). Fundamentals of Analytical Chemistry. Analitik Kimya Temel İlkeler. 8th ed. Çeviren: Kılıç E, Yılmaz H, Bilim Kitap Kırtasiye Ltd. Şti., Ankara, 633–664.
84. Chauhan C (2020). Contemporary voltammetric techniques and its application to pesticide analysis: A review. Materials Today: Proceedings 37: 3231–3240.
85. Sharma S, Mehtab S, Zaidi MG. (2020). Voltammetry : An electrochemical analytical method. Voltammetry 127–140.
86. Veszteg S (2018). Rotating disk and ring-disk electrodes. Klaus W (Ed.), Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry, 421–444. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13563-2>.
87. Lee S, Pyun S, Lee S, Kang SL (2008). Fundamentals of rotating disc and ring–disc electrode techniques and their applications to study of the oxygen reduction mechanism at Pt/C electrode for fuel cells. Israel Journal of Chemistry 48: 215–228.
88. Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL (2018). A practical beginner’s guide to cyclic voltammetry. Journal of Chemical Education 95: 197–206.

89. Uslu B, Ozkan S (2007). Solid electrodes in electroanalytical chemistry: Present applications and prospects for high throughput screening of drug compounds. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 10: 495–513.
90. Ranganathan S, Kuo TC, McCreery RL (1999). Facile preparation of active glassy carbon electrodes with activated carbon and organic solvents. *Analytical Chemistry* 71: 3574–3580.
91. McCarthy BD, Martin DJ, Rountree ES, Ullman AC, Dempsey JL (2014). Electrochemical reduction of brønsted acids by glassy carbon in acetonitrile-implications for electrocatalytic hydrogen evolution. *Inorganic Chemistry* 53: 8350–8361.
92. Kissinger P, Heineman WR (2018). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Revised and Expanded, 2nd ed., CRC Press.
93. Harris PJF (2005). New perspectives on the structure of graphitic carbons. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* 30: 235–253.
94. Kinoshita K (1988). *Carbon: Electrochemical and Physicochemical Properties*, John Wiley & Sons, New York.
95. Murray RW (1980). Chemically modified electrodes. *Accounts of Chemical Research* 13: 135–141.
96. Stradiotto NR, Yamanaka H, Zaroni MVB (2003). Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14: 159–173.
97. Zen JM, Kumar AS, Tsai DM (2003). Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry. *Electroanalysis* 15: 1073–1087.
98. Yamada H, Yoshii K, Asahi M, Chiku M, Kitazumi Y (2022). Cyclic voltammetry part 1: Fundamentals. *Electrochemistry* 90: 102005.
99. Gulaboski R (2022). The future of voltammetry. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 41: 1–12.
100. Osteryoung J (1983). Pulse voltammetry. *Journal of Chemical Education* 60(4): 296.
101. Stojek Z (2010). Pulse Voltammetry. Scholz F (Ed.), *Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications* Second, Revised and Extended Edition, 2nd ed., Springer-Verlag, Heidelberg.
102. Compton RG, Banks CE (2018). *Understanding Voltammetry*, 3rd ed., World Scientific Publishing Company, Singapur.

103. Mirceski V, Komorsky-Lovric S, Lovric M (2007). Square-Wave Voltammetry: Theory and Application. Scholz F (Ed.), Monographs in Electrochemistry, Springer-Verlag, Berlin.
104. Molina A, González J (2016). Pulse Voltammetry in Physical Electrochemistry and Electroanalysis. Scholz F (Ed.), Monographs in Electrochemistry, Springer Cham, Switzerland.
105. Osteryoung J, O'Dea JJ (1986). Square-wave Voltammetry. Bard AJ (Ed.), Electroanalytical Chemistry, Marcel Dekker, New York.
106. Bard AJ, Faulkner LR (1980). Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications, John Wiley and Sons, New York.
107. Brett CMA, Brett AMO (1993). Electrochemistry: Principles, Methods and Applications, Oxford University Press, Germany.
108. Christensen PA, Hammett A (2007). Techniques and Mechanisms in Electrochemistry, Springer Netherlands, Holland.
109. O'Dea JJ, Osteryoung J, Osteryoung RA (1981). Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. *Analytical Chemistry* 53: 695–701.
110. Kalousek M (1948). A study of reversibility of processes at the dropping mercury electrode by changing discontinually the polarising voltage. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 13: 105–115.
111. Osteryoung JG, Osteryoung RA (1985). Square wave voltammetry. *Analytical chemistry* 57: 101–110.
112. Dogan-Topal B, Ozkan SA, Uslu B (2010). The analytical applications of square wave voltammetry on pharmaceutical analysis. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal* 3: 56–73.
113. Daniele S (2005). VOLTAMMETRY | Anodic Stripping. Worsfold P, Townshend A, Poole C (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition), 197–203. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00648-8>.
114. Adeloju SB (2007). Electrochemical Stripping Analysis of Trace and Ultra-Trace Concentrations of Toxic Metals and Metalloids in Foods and Beverages. Picó Y (Ed.), *Food Toxicants Analysis*, 667–696. <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50019-5>.

115. Lasia A (2002). Electrochemical Impedance Spectroscopy and Its Applications. Conway BE, Bockris JO, White RE (Eds.), *Modern Aspects of Electrochemistry*, 32: 143–248. https://doi.org/10.1007/0-306-46916-2_2.
116. Ariyoshi K, Siroma Z, Mineshige A, Takeno M, Fukutsuka T, Abe T, Uchida S (2022). Electrochemical impedance spectroscopy part 1: Fundamentals. *Electrochemistry* 90: 102007.
117. Wang S, Zhang J, Gharbi O, Vivier V, Gao M, Orazem ME (2021). Electrochemical impedance spectroscopy. *Nature Reviews Methods Primers* 1: 41.
118. Liu X, Duckworth PA, Wong DKY (2010). Square wave voltammetry versus electrochemical impedance spectroscopy as a rapid detection technique at electrochemical immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 25: 1467–1473.
119. Shirakawa H, Louis EJ, MacDiarmid AG, Chiang CK, Heeger AJ (1977). Synthesis of electrically conducting organic polymers: Halogen derivatives of polyacetylene, $(CH)_x$. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (16): 578–580.
120. Lyons MEG (1994). Electrocatalysis Using Electroactive Polymer Films. Lyons MEG (Ed.), *Electroactive Polymer Electrochemistry*, 237–374. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5070-6_2.
121. Yang N, Wang X (2007). Adsorption efficiency of poly (malachite green) films towards oxidation of ascorbic acid. *Electrochimica Acta* 52: 6962–6968.
122. Romeiro A, Gouveia-Caridade C, Brett CMA (2013). Polyphenazine films as inhibitors of copper corrosion. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 688: 282–288.
123. Boguslavsky L, Kalash H, Xu Z, Beckles D, Geng L, Skotheim T, Laurinavicius V, Lee HS (1995). Thin film bienzyme amperometric biosensors based on polymeric redox mediators with electrostatic bipolar protecting layer. *Analytica Chimica Acta* 311: 15–21.
124. Pauliukaite R, Ghica ME, Barsan MM, Brett CMA (2010). Phenazines and polyphenazines in electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Letters* 43: 1588–1608.
125. Palma-Cando A, Rendón-Enríquez I, Tausch M, Scherf U (2019). Thin functional polymer films by electropolymerization. *Nanomaterials* 9: 1–13.

126. Abdel-Aziz AM, Hassan HH, Badr IHA (2020). Glassy carbon electrode electromodification in the presence of organic monomers: Electropolymerization versus activation. *Analytical Chemistry* 92: 7947–7954.
127. Barsan MM, Ghica ME, Brett CMA (2015). Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review. *Analytica Chimica Acta* 881: 1–23.
128. Kul, D, Uslu, B, Özkan SA (2022). Modification of Solid Electrodes by Electrochemical Polymerization and Their Use as (Bio)Sensors. Wythers MC (Ed.), *Advances in Materials Science Research*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 1–100.
129. Badran HA, Abbas ATY, Alfahed RKF (2021). Study the effect of concentration on the evolution of far-field diffraction patterns of bromocresol purple and congo red solution. *Journal of Physics: Conference Series* 1963: 012013.
130. Milintha TPM, Kumaravel B, Nagamaniammai G, Karishma S, Essa MM, Qoronfleh MW, Chacko L (2023). Biosensors as freshness indicator for packed animal and marine products: A review. *International Food Research Journal* 30: 848–854.
131. van Schrojenstein Lantman M, van de Logt AE, Thelen M, Wetzels JF, van Berkel M (2022). Serum albumin measurement in nephrology: Room for improvement. *Nephrology Dialysis Transplantation* 37: 1792–1799.
132. Wang Y, Tong LL (2010). Electrochemical sensor for simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly (bromocresol purple) modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* 150: 43–49.
133. Zhang R, Liu S, Wang L, Yang G (2013). Electroanalysis of ascorbic acid using poly(bromocresol purple) film modified glassy carbon electrode. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation* 46: 1089–1093.
134. Yang G, Yan J, Qi F, Sun C (2010). High sensitivity and reproducibility of a bismuth/poly(bromocresol purple) film modified glassy carbon electrode for determination of trace amount of cadmium by differential pulse anodic stripping voltammetry. *Electroanalysis* 22: 2729–2738.
135. Ağin F (2020). Voltammetric determination of guaifenesin in pharmaceuticals and urine samples based on poly (bromocresol purple) modified glassy carbon electrode. *Current Pharmaceutical Analysis* 16: 633–639.

136. Banu R, Kumara Swamy BE (2022). Poly (bromocresol purple) incorporated pencil graphite electrode for concurrent determination of serotonin and levodopa in presence of L-Tryptophan: A voltammetric study. *Inorganic Chemistry Communications* 141: 109495.
137. Shrestha S, Mascarenhas RJ, D'Souza OJ, Satpati AK, Mekhalif Z, Dhason A, Martis P (2016). Amperometric sensor based on multi-walled carbon nanotube and poly (bromocresol purple) modified carbon paste electrode for the sensitive determination of L-tyrosine in food and biological samples. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 778: 32–40.
138. Saritha D, Reddy AVB, Venu M, Madhuri C, Kiranmai S, Anitha K, Madhavi G (2019). Fabrication, characterization and development of a modified poly (bromocresol purple/multiwalled carbon nanotubes) carbon paste electrode for the determination of sulfanilic acid. *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry* 11: 123–136.
139. Akpomie KG, Adegoke KA, Oyedotun KO, Ighalo JO, Amaku JF, Olisah C, Adeola AO, Iwuozor KO, Conradie J (2024). Removal of bromophenol blue dye from water onto biomass, activated carbon, biochar, polymer, nanoparticle, and composite adsorbents. *Biomass Conversion and Biorefinery* 14: 13629–13657.
140. Al-shehri MA, Al-Doaiss AA (2021). A morphological, histological and histochemical study of the sexual segment of the kidney of the male *Chamaeleo calyptratus* (veiled chameleon). *International Journal of Morphology* 39(4): 1200–1211.
141. Zou YS, Xu WX, He Y, Sun ZD, Xue XL (2002). Preparation of polyacrylamide gel electrophoresis for human chorionic gonadotropin chimeric peptide 12 expressed in *E. coli*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 34: 671–674.
142. Siva R, Mathew GJ, Venkat A, Dhawan C (2008). An alternative tracking dye for gel electrophoresis. *Current Science* 94(6): 765–767.
143. Yang GJ, Qu XL, Zhu AP, Wang CY, Qu QS, Hu XY (2007). Characterization, growth mechanism and application of network poly(bromophenol blue). *Journal of Electroanalytical Chemistry* 604: 48–56.
144. Yang G, Wang Y, Qi F (2012). Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of traces of tin using a glassy carbon electrode modified with bismuth and a film of poly(bromophenol blue). *Microchimica Acta* 177: 365–372.

145. Sivasankaran U, Thomas A, Jose AR, Kumar KG (2017). Poly (bromophenol blue)-gold nanoparticle composite: An efficient electrochemical sensing platform for uric acid. *Journal of The Electrochemical Society* 164: B292–B297.
146. Yang P, Wei W, Tao C, Zeng J (2007). Simultaneous voltammetry determination of dihydroxybenzene isomers by poly-bromophenol blue/carbon nanotubes composite modified electrode. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79: 5–10.
147. Sajin KA, Anoobkumar KI, Rasa OK (2020). pH indicators: A valuable gift for analytical chemistry. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences* 06: 393–400.
148. El-dars FMSE, Ibrahim HM, Farag HAB, Abdelwahhab MZ, Shalabi MEH (2016). Preparation , characterization of bentonite carbon composite and design application in adsorption of bromothymol blue dye. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology* 3: 3758–3765.
149. Dean VS, Dingley J, Vaughan RS (1996). The use of bromothymol blue and sodium thiopentone to confirm tracheal intubation. *Anaesthesia* 51: 29–32.
150. Jo EY, Lee JH (2020). Polyaniline-nanofiber-modified screen-printed electrode with intermediate dye amplification for detection of endocrine disruptor bisphenol A. *Microchemical Journal* 155: 104693.
151. Xu Q, Chen LL, Lu GJ, Hu XY, Li HB, Ding LL, Wang Y (2011). Electrochemical preparation of poly(bromothymol blue) film and its analytical application. *Journal of Applied Electrochemistry* 41: 143–149.
152. Xu X, Lin Q, Liu A, Chen W, Weng X, Wang C, Lin X (2010). Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polybromothymol blue film-modified glassy carbon electrode. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58: 788–793.
153. Hua X, Hou X, Gong X, Shen G (2013). Electrochemical behavior of 5-fluorouracil on a glassy carbon electrode modified with bromothymol blue and multi-walled carbon nanotubes. *Analytical Methods* 5: 2470–2476.
154. Taylor JK (1983). Validation of analytical methods. *Analytical Chemistry* 55: 600A–608A.
155. Breaux J, Jones K, Boulas P (2003). Analytical methods development and validation. *Pharmaceutical Technology* 1: 6–13.

156. Ravisankar P, Navya CN, Pravallika D, Sri DN (2015). A review on step-by-step analytical method validation. *IOSR Journal Pharmacy* 5: 7–19.
157. Sharma S, Goyal S, Chauhan K (2018). A review on analytical method development and validation. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 10: 8–15.
158. Bruce P, Minkinen P, Riekkola ML (1998). Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. *Microchimica Acta* 128: 93–106.
159. Daksh S, Goyal A, Pandiya CK (2015). Validation of analytical methods-Strategies & Singficance. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences* 4: 489–1497.
160. Kirthi A, Shanmugam R, Prathyusha MS, Basha DJ (2014). A review on bioanalytical method development and validation by RP-HPLC. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences* 5: 2265–2271.
161. Radi A, Bekhiet GE (1998). Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45: 275–279.
162. Radi A (1999). Electroanalysis of melatonin using castor oil-graphite paste electrode. *Analytical Communications* 36: 43–44.
163. Bekheit GE (2000). Determination of melatonin by differential pulse voltammetry at modified carbon paste electrode. *Asian Journal of Chemistry* 12: 541.
164. Wang SF, Peng TZ (2000). Adsorptive/extractive behavior of melatonin at carbon paste electrodes and its electrochemical determination. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 28: 1350–1354.
165. Xiao-Ping W, Lan Z, Wen-Rong L, Jian-Ping D, Hong-Qing C, Guo-Nan C (2002). Study on the electrochemical behavior of melatonin with an activated electrode. *Electroanalysis* 14: 1654–1660.
166. Raggi MA, Bugamelli F, Pucci V (2002). Determination of melatonin in galenic preparations by LC and voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29: 283–289.
167. Corujo-Antuña JL, Abad-Villar EM, Fernández-Abedul MT, Costa-García A (2003). Voltammetric and flow amperometric methods for the determination of melatonin in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31: 421–429.
168. Corujo-Antuña JL, Martínez-Montequín S, Fernández-Abedul MT, Costa-García A (2003). Sensitive adsorptive stripping voltammetric methodologies for the determination of melatonin in biological fluids. *Electroanalysis* 15: 773–778.

169. Beltagi AM, Khashaba PY, Ghoneim MM (2003). Determination of melatonin hormone in bulk form, tablets and human serum by square-wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. *Electroanalysis* 15: 1121–1128.
170. Qu W, Wang F, Hu S, Cui D (2005). Electrocatalytic properties and voltammetric determination of melatonin at a nanostructured film electrode. *Microchimica Acta* 150: 109–114.
171. Matemadombo F, Sehlotho N, Nyokong T (2009). Effects of the number of ring substituents of cobalt carboxyphthalocyanines on the electrocatalytic detection of nitrite, cysteine and melatonin. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 13: 986–997.
172. El-Sayed GO, Amin AS (2010). Voltammetric determination of melatonin in tablet dosage forms and human serum. *Latin American Journal of Pharmacy* 29: 1235–1241.
173. Tsai TH, Huang YC, Chen SM (2011). Manganese hexacyanoferrate with poly(3,4-ethylenedioxythiophene) hybrid film modified electrode for the determination of catechin and melatonin. *International Journal of Electrochemical Science* 6: 3238–3253.
174. Ball AT, Patel BA (2012). Rapid voltammetric monitoring of melatonin in the presence of tablet excipients. *Electrochimica Acta* 83: 196–201.
175. Levent A (2012). Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials* 21: 114–119.
176. Apetrei IM, Apetrei C (2016). Voltammetric determination of melatonin using a graphene-based sensor in pharmaceutical products. *International Journal of Nanomedicine* 11: 1859–1866.
177. Kumar N, Rosy, Goyal RN (2016). Nanopalladium grained polymer nanocomposite based sensor for the sensitive determination of melatonin. *Electrochimica Acta* 211: 18–26.
178. Kumar N, Goyal RN (2017). Electrochemical behavior of melatonin and its sensing in pharmaceutical formulations and in human urine. *Current Pharmaceutical Analysis* 13: 85–90.
179. Smajdor J, Piech R, Pięk M, Paczosa-Bator B (2017). Carbon black as a glassy carbon electrode modifier for high sensitive melatonin determination. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 799: 278–284.

180. Sunon P, Wongkaew P, Johns J, Johns N (2018). Characterization of cerium oxide-chitosan nanocomposite-modified screen printed carbon electrode and application in melatonin determination. *International Journal of Geomate* 14(42): 151–157.
181. Miccoli A, Restani P, Floroian L, Taus N, Badea M, Cioca G, Bungau S (2018). Sensitive electrochemical detection method of melatonin in food supplements. *Revista de Chimie* 69: 854–859.
182. Hensley AL, Colley AR, Ross AE (2018). Real-time detection of melatonin using fast-scan cyclic voltammetry. *Analytical Chemistry* 90: 8642–8650.
183. Camargo JR, Andreotti IAA, Kalinke C, Henrique JM, Bonacin JA, Janegitz BC (2020). Waterproof paper as a new substrate to construct a disposable sensor for the electrochemical determination of paracetamol and melatonin. *Talanta* 208: 120458.
184. Mohammed GI, Saber AL (2020). Study of the electrochemical behavior of melatonin on different electrodes in aqueous solution. *International Journal of Electrochemical Science* 15: 5895–5907.
185. Castagnola E, Woepfel K, Golabchi A, McGuier M, Chodapaneedi N, Metro J, Taylor IM, Cui XT (2020). Electrochemical detection of exogenously administered melatonin in the brain. *Analyst* 145: 2612–2620.
186. Castagnola E, Robbins EM, Woepfel KM, McGuier M, Golabchi A, Taylor IM, Michael AC, Cui XT (2020). Real-time fast scan cyclic voltammetry detection and quantification of exogenously administered melatonin in mice brain. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8: 1–13.
187. Rahmati R, Hemmati A, Mohammadi R, Hatamie A, Tamjid E, Simchi A (2020). Sensitive Voltammetric Detection of Melatonin in Pharmaceutical Products by Highly Conductive Porous Graphene-Gold Composites. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 8: 18224–18236.
188. Freitas RC, Orzari LO, Ferreira LMC, Paixão TRLC, Coltro WKT, Vicentini FC, Janegitz BC (2021). Electrochemical determination of melatonin using disposable self-adhesive inked paper electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 897: 115550.
189. Gevaerd A, Watanabe EY, Janegitz BC, Bergamini MF, Marcolino-Junior LH (2022). Simple melatonin determination using disposable and low-cost lab-made screen-printed carbon electrode. *Journal of the Electrochemical Society* 169: 37503.

190. Vanoni CR, Winiarski JP, Bassani JC, Santos ARS, Mezalira DZ, Jost CL (2022). Determination of melatonin using a new integrated electrochemical platform of functionalized multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles for clinical applications. *Journal of the Electrochemical Society* 169: 36502.
191. Santhan A, Hwa KY (2022). Rational design of nanostructured copper phosphate nanoflakes supported niobium carbide for the selective electrochemical detection of melatonin. *ACS Applied Nano Materials* 5: 18256–18269.
192. Alizadeh T, Amjadi S, Akhoundian M (2022). Melatonin determination at trace levels by $\text{ErO}_2/\text{MnO}_2$ nanocomposite modified carbon paste electrode. *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry* 14(12): 1126–1137.
193. Martínez-Moro R, del Pozo M, Vázquez L, Martín-Gago JA, Petit-Domínguez MD, Casero E, Quintana C (2023). Electrochemical sensor based on the synergy between Cucurbit[8]uril and 2D- MoS_2 for enhanced melatonin quantification. *Scientific Reports* 13: 1–10.
194. Thenrajan T, Girija S, Sangeetha S, Alwarappan S, Wilson J (2023). Electrochemical detection of melatonin at tungsten oxide nanospheres decorated chitosan electrode. *Journal of the Electrochemical Society* 170: 77510.
195. Sebastian N, Yu WC, Balram D, Chen Q, Shiue A, Noman MT, Amor N (2023). Porous hematite embedded C and Fe codoped graphitic carbon nitride for electrochemical detection of pineal gland hormone melatonin. *Materials Today Chemistry* 29: 101406.
196. Kumar N, Weerawarna N, Alvarez N (2024). Carbon-nanotube microelectrodes for electrochemical determination of melatonin. *Electroanalysis*. 32(12): e202400191.
197. Gabriela Pianaro Valenga M, Gustavo Barankiewicz Martins L, Valle de Almeida S, Lurdes Felsner M, Galli A (2024). Environmentally friendly voltammetric determination of melatonin in river water: Development and validation studies. *Electroanalysis* 36: 1–9.
198. Satianram W, Sunon P, Ngokpho B, Nijpanich S, Chanlek N, Khotavivattana T, Batchelor-McAuley C, Ngamchuea K (2024). Electrochemical detection of melatonin at nano-sized highly boron-doped diamond electrode. *Journal of the Electrochemical Society* 171: 087504.

199. Parra KN, Gul S, Aquino JM, Miwa DW, Motheo AJ (2016). Electrochemical degradation of tetracycline in artificial urine medium. *Journal of Solid State Electrochemistry* 20: 1001–1009.
200. Ulusoy Hİ, Yılmaz E, Soylak M (2019). Magnetic solid phase extraction of trace paracetamol and caffeine in synthetic urine and wastewater samples by a using core shell hybrid material consisting of graphene oxide/multiwalled carbon nanotube/Fe₃O₄/SiO₂. *Microchemical Journal* 145: 843–851.
201. Abbar JC, Meti MD, Nandibewoor ST (2020). Sensitive and selective voltammetric oxidation and determination of an antiemetic drug using gold electrode and its biomedical applications. *Surfaces and Interfaces* 19: 100484.
202. Dogan-Topal B, Bozal B, Tolga Demircigil B, Uslu B, Ozkan SA (2009). Electroanalytical studies and simultaneous determination of amlodipine besylate and atorvastatine calcium in binary mixtures using first derivative of the ratio-voltammetric methods. *Electroanalysis* 21: 2427–2439.
203. Laviron E (1979). The use of linear potential sweep voltammetry and of ac voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly adsorbed systems and of redox modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 100: 263–270.
204. Karyakin AA, Karyakina EE, Schmidt H (1999). Electropolymerized azines: A new group of electroactive polymers. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis* 11: 149–155.
205. Karyakin AA, Karyakina EE, Schuhmann W, Schmidt H (1999). Electropolymerized azines: Part II. In a search of the best electrocatalyst of NADH oxidation. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis* 11(8): 553–557.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ümran SOFU
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2018
Lise	Samsun Vezirköprü Anadolu Öğretmen Lisesi	2013

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
1. Mesul Müdür Eczacı	Özel Medical Park Karadeniz Hastanesi	2018-2020
2. Sahip ve Mesul Müdür Eczacı	Güven Eczanesi	2020-2022
3. Araştırma Görevlisi	Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2023-Devam Ediyor

YABANCI DİL

İngilizce