



**VALPROAT-SEÇİCİ POTANSİYOMETRİK
BİYOSENSÖR: BİYOLOJİK VE FARMASÖTİK
ÖRNEKLERDEKİ UYGULAMALARI**

OĞUZ ÖZBEK

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Ömer İŞILDAK**

Ekim - 2021

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**VALPROAT-SEÇİCİ POTANSİYOMETRİK BİYSENSÖR: BİYOLOJİK VE
FARMASÖTİK ÖRNEKLERDEKİ UYGULAMALARI**

OĞUZ ÖZBEK

TOKAT
Ekim - 2021

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

Yükseköğretim Kurulu (YÖK) 100/2000 Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı,

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) tarafından 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ve

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2019/89 nolu proje ile desteklenmiştir.

Oğuz ÖZBEK tarafından hazırlanan “**Valproat–Seçici Potansiyometrik Biyosensör: Biyolojik ve Farmasötik Örneklerdeki Uygulamaları**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 8 Ekim 2021 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. Ömer İŞILDAK

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Meliha Burcu GÜRDERE

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Fatih ÇOLDUR

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

ONAY

.....

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

---/---/20--

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

OĞUZ ÖZBEK
8 Ekim 2021

ÖZET

DOKTORA TEZİ

VALPROAT-SEÇİCİ POTANSİYOMETRİK BİYOSENSÖR: BİYOLOJİK VE FARMASÖTİK ÖRNEKLERDEKİ UYGULAMALARI

OĞUZ ÖZBEK

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ÖMER İŞILDAK)

Epilepsi, tekrarlayan nöbetlerle karakterize kronik bir nörolojik bozukluktur ve bazı durumlarda ömür boyu anti-epileptik kullanımı gerektirir. Bu nedenle seçilen anti-epileptik tedavinin etkinliği ve kullanımı sırasında kandaki takibi oldukça önemlidir. Valproik asit, epilepsi tedavisinde yaygın olarak kullanılan en etkili ve geniş spektrumlu ilaçlardan biridir ve kandaki terapötik konsantrasyon aralığı 50–100 µg/mL'dir. Bu tez çalışmasında, γ-aminobütirik asit (GABA)'nın biyoaktif bileşen olarak kullanıldığı insan kan örneklerinde valproik asidin tayini için tümüyle katı hal kontak poli(vinil klorür) (PVC) membran potansiyometri temelli bir biyosensör geliştirildi. En uygun yüzde membran bileşimlerini tespit etmek için, GABA ile farklı oranlarda biyosensörler hazırlandı ve potansiyometrik performans özellikleri araştırıldı. Biyosensörün doğrusal çalışma aralığı ve tayin limiti gibi potansiyometrik performans özellikleri değerlendirildiğinde en uygun membran bileşimi oranı % 6.0 GABA, % 60.0 o-nitrofeniloktil eter (o-NFOE), % 32.0 PVC ve % 2.0 potasyum tetrakis (klorofenil)borat (KTPClPB) olarak belirlendi. Geliştirilen valproat-seçici biyosensör, 1.0×10^{-6} – 1.0×10^{-1} mol L⁻¹'lik geniş bir konsantrasyon aralığında 9.75×10^{-7} mol L⁻¹'lik düşük bir tayin limiti ve 59.0 ± 3.6 mV/on kat'lık Nernst davranış sergilemiştir. Ayrıca, hazırlanan valproat-seçici biyosensörün yüksek tekrarlanabilirlikte potansiyometrik davranış sergilediği, pH = 4.0–11.0 arasında değişen pH değerlerinde etkilenmeden çalışabildiği ve cevap zamanının 10 saniyeden daha kısa olduğu belirlendi. Son olarak, geliştirilen valproat-seçici biyosensör ile biyolojik ve farmasötik örneklerde valproat tayini oldukça yüksek geri kazanımlarla gerçekleştirildi.

2021, 106 SAYFA

ANAHTAR KELİMELE: Epilepsi, Anti-epileptik, Valproik Asit, Potansiyometri, Biyosensör

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

VALPROATE-SELECTIVE POTENTIOMETRIC BIOSENSOR: ITS APPLICATIONS IN BIOLOGICAL AND PHARMACEUTICAL SAMPLES

OĞUZ ÖZBEK

TOKAT GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

(SUPERVISOR:) PROF. DR. ÖMER İŞILDAK

Epilepsy is a chronic neurological disorder characterized by recurrent seizures, and requires lifelong anti-epileptic use in some cases. Therefore, the effectiveness of the selected anti-epileptic treatment and its monitoring in the blood during its use is highly important. Valproic acid is one of the most effective and broad-spectrum anti-epileptic drugs used in the epilepsy treatment, and its therapeutic concentration range in the blood is 50–100 µg/mL. In this thesis study, an all-solid-state contact poly(vinyl chloride) (PVC) membrane potentiometry-based biosensor was developed for the determination of valproic acid in human blood samples using γ -aminobutyric acid (GABA) as a bioactive component. In order to identify the optimal percentage of membrane components, biosensors with different ratios of GABA were prepared and their potentiometric performance characteristics were investigated. Based on potentiometric performance properties such as linear working range and limit of detection, the optimum membrane composition was determined as 6.0% GABA, 60.0% *o*-nitrophenyloctylether (*o*-NPOE), 32.0 % PVC and potassium tetrakis (*p*-chlorophenyl) borate (KTpClPB). The valproate-selective biosensor exhibits a Nernstian response for valproate ion over a wide concentration range of $1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ with the slope of $59.0 \pm 3.6 \text{ mV/decade}$, and a lower limit of detection of $9.75 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. In addition, it was determined that the prepared valproate-selective biosensor showed potentiometric behavior with high reproducibility and it could work unaffected by the changes in pH at pH values ranging from pH 4.0 to 11.0, and had a response time of less than 10 seconds. Finally, using the developed valproate-selective biosensor, valproate determination in biological and pharmaceutical samples was performed with very high recoveries.

2021, 106 PAGE

KEYWORDS: Epilepsy, Anti-epileptic, Valproic Acid, Potentiometry, Biosensor

ÖNSÖZ

Hayatımın en önemli dönüm noktalarından biri olan doktora eğitimimin yanı sıra tüm proje ve akademik çalışmalarım boyunca beni her alanda destekleyen her zaman yanımda olan, bilimsel katkılarının yanı sıra ahlaki ve insani özelliklerini de rehber edindiğim, hayatımın bundan sonraki her alanında da rehber olarak yanımda olmasından büyük mutluluk duyacağım çok kıymetli danışman hocam, Prof. Dr. Ömer IŞILDAK'a

Lisans eğitiminden başlayıp, yüksek lisans eğitimim de dahil olmak üzere oldukça uzun bir süre danışmanlığımı yürüten, bu süreçte her zaman her koşulda yanımda olan desteğini, bilgisini, tecrübesini yardımlarını hiçbir zaman üzerimden eksik etmeyen varlığıyla her daim güç veren çok değerli hocam, Doç. Dr. Meliha Burcu GÜRDERE'ye

Tez çalışmalarım sırasındaki destek ve yardımlarından dolayı, Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK'a, tez izleme komitemdeki yönlendirme ve desteklerinden dolayı, Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a, çalışmalarım sırasında yardıma ihtiyacım olduğu her an yardım ve desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Çağlar BERKEL'e, katkılarından dolayı, Doç. Dr. Derya KAHRAMAN DÖĞÜŞCÜ'ye, bu tez çalışmasının oluşmasında ilham kaynağı olan Uzm. Dr. Esra ÖZKAN'a, deneysel aşamalarındaki yardım ve katkılarından dolayı öğrencilerim; Alper ÇETİN ve Kamil Mert YİĞİT'e,

Her daim her koşulda beni destekleyen ve bugünlere gelmemdeki en büyük desteği sağlayan aileme,

Doktora eğitimim sırasında 2211–A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında burs desteği sağlayan, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'e

100/2000 Doktora burs programı kapsamında öncelikli alanlardan biri olan Biyosensörler programı ile burs desteği sağlayan Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK) başkanlığına ve 2019/89 nolu proje ile bu tez çalışmasını destekleyen Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım...

OĞUZ ÖZBEK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Epilepsi	5
2.2. Anti–epileptik İlaçlar	8
2.3. Valproik Asit.....	12
2.4. Biyosensörler	18
2.5. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	21
2.5.1. Enzim temelli biyosensörler	22
2.5.2. Antikor temelli biyosensörler	23
2.5.3. Hücre temelli biyosensörler	23
2.5.4. Mikroorganizma temelli biyosensörler	24
2.5.5. DNA temelli biyosensörler	24
2.6. Dönüştürücüler (Transduserler).....	25
2.7. Elektrokimyasal Biyosensörler	25
2.7.1. Potansiyometrik biyosensörler.....	26
2.7.2. Voltametrik biyosensörler.....	31
2.7.3. Amperometrik biyosensörler	32
2.7.4. Kondüktometrik biyosensörler	32
2.8. Optik Biyosensörler	33
2.9. Piezoelektrik Biyosensörler	34
2.10. Kalorimetrik Biyosensörler.....	35

2.11. İyon Seçici Elektrotlar	35
2.12. PVC Membran Potansiyometrik Biyosensörler.....	38
2.13. Potansiyometrik Biyosensörlerin Avantaj ve Dezavantajları	40
2.14. Biyosensörlerin Performansına Etki Eden Faktörler	41
2.14.1. Seçicilik	41
2.14.2. Cevap zamanı.....	44
2.14.3. pH çalışma aralığı	46
2.14.4. Tekrarlanabilirlik	46
2.14.5. Tayin limiti	47
2.14.6. Kullanım ömrü.....	48
2.15. PVC Membran Biyosensörlerin Analitik Uygulamaları.....	48
2.15.1. Doğrudan kalibrasyon.....	48
2.15.2. Standart ekleme yöntemi	48
3. MATERYAL ve YÖNTEM	50
3.1. Materyal.....	50
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	50
3.1.2. Kullanılan cihazlar	51
3.2. Metot.....	51
3.2.1. PVC–membran valproat–seçici biyosensörlerin hazırlanışı	51
3.2.2. Potansiyel ölçümleri	53
3.2.3. Standart valproat çözeltilerin hazırlanması.....	53
3.2.4. Diğer anti–epileptik ilaç ve iyon çözeltilerinin hazırlanması	54
3.2.5. Kan ve ilaç örneklerinin hazırlanması	54
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	56
4.1. Optimum Membran Bileşenine Sahip Elektrot’un Yüzey Analizi	57
4.2. Valproik Asit ile GABA’nın Etkileşim Mekanizması	60
4.3. Valproat–seçici Biyosensörlerin Potansiyometrik Davranışları	61
4.4. Valproat–seçici Biyosensörün Seçiciliği	69
4.5. Valproat–seçici Biyosensörün Tekrarlanabilirliği	71
4.6. Valproat–seçici Biyosensörün Cevap Zamanı	72
4.7. Valproat–seçici Biyosensörün pH Çalışma Aralığı	73
4.8. Valproat–Seçici Biyosensör’ün Analitik Uygulamaları	74

4.8.1. Valproat–seçici biyosensör ile kan örneklerinde valproik asit tayini	74
4.8.2. Valproat–seçici biyosensör ile epilepsi hastalarının kan örneklerinde valproik asit tayini.....	76
4.8.3. Valproat–seçici sensör ile ilaç örneğinde valproat tayini	77
4.9. Karşılaştıra alışması	78
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	79
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	89



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

a_A	Ana İyon Aktivitesi
a_B	Bozucu Türün Aktivitesi
C_s	Eklenen Standart Çözeltinin Konsantrasyonu
C_x	Analiz Edilen Çözeltinin Bilinmeyen Konsantrasyonu
E	İndikatör Elektrot Potansiyeli
E^0	Standart Elektrot Potansiyeli
E_A	Ana İyon Çözeltisinin Potansiyeli
E_B	Bozucu Türün Çözeltisinin Potansiyeli
F	Faraday Sabiti
$K_{A,B}^{pot}$	Seçicilik Katsayısı
n	Alınıp Verilen Elektron Sayısı
R	İdeal Gaz Sabiti
R^2	Belirleme Katsayısı
S	Elektrodun Doğrusal Potansiyometrik Cevabının Eğimi
T	Mutlak Sıcaklık
t_{95}	Denge Potansiyelinin %95'ine Ulaşılması İçin Geçen Süre
V_s	Eklenen Standart Çözeltinin Hacmi
V_x	Analiz Edilen Çözeltinin Hacmi
Z_A	Ana İyon Yüğü
Z_B	Bozucu Türün Yüğü
$\Delta E/\Delta t$	Birim Zamanda Elektrot Potansiyelinde Meydana Gelen Değişim

Kısaltmalar

Ag/AgCl	Gümüş/gümüş klorür
VPA	Valproik Asit
GABA	γ -aminobütirik Asit
AEİ	Anti-epileptik İlaç
EMF	Elektromotor kuvvet
SCE	Doygun Kalomel Elektrot
SEM	Taramalı Elektron Miskroskobu
$^1\text{H-NMR}$	^1H -Nükleer Manyetik Rezonans
DBP	Dibütilftalat
BEHS	Bis(2-etilhekzil)sebakat
DEHA	Bis(2-etilhekzil)adipat
<i>o</i> -NPOE	<i>o</i> -nitrofeniloktileter
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
İSE	İyon Seçici Elektrot
KTpClPB	Potasyum Tetrakis(4-klorofenil)borat
NaTPB	Sodyum Tetrafenilborat
PVC	Poli(vinil klorür)
THF	Tetrahidrofuran
DNA	Deoksiribonükleik asit

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Valproik asit ve Kedi otu (<i>valeriana officinalis</i>).....	2
Şekil 1.2. Valproik asidin keşfi ve kullanımının önemli kilometre taşları	2
Şekil 1.3. γ -aminobütirik asit (GABA)	3
Şekil 2.1. Ülkelere göre epilepsinin % prevelansı (Shakirullah ve ark., 2014)	5
Şekil 2.2. İdiyopatik epilepsi prevelans çalışmaları (GBD Epilepsi 2016)	6
Şekil 2.3. Biyosensörlerin çalışma mekanizmasının ve bileşenlerinin şematik gösterimi (Metkar ve Girigoswami, 2019).....	20
Şekil 2.4. Biyokatalitik esaslı biyosensörlerin algılama basamakları (Sanati ve ark., 2019).....	21
Şekil 2.5. Afinite esaslı biyosensörlerin algılama basamakları (Manickam ve ark., 2012).....	22
Şekil 2.6. Biyoaktif tabakada kullanılan biyobileşen türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması	22
Şekil 2.7. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Nguyen ve Kim, 2017)	23
Şekil 2.8. Bir DNA dizisinin biyosensör ile tanımlanma aşamaları (Sassolas ve ark., 2008).....	24
Şekil 2.9. Dönüştürücülerin sınıflandırılması	25
Şekil 2.10. Potansiyometrenin çalışma prensibi	26
Şekil 2.11. Bilgisayar kontrollü potansiyometrik sistem (Isildak ve ark., 2020)	27
Şekil 2.12. a-) Ag/AgCl referans elektrot b-) Kalomel referans elektrot (Anonim, 2021)	31
Şekil 2.13. Voltametrik ölçüm sistemi (Forrister, 2018)	32
Şekil 2.14. Optik temelli biyosensör elemanları (Dey ve Goswami, 2011)	33
Şekil 2.15. Piezoelektrik QCM biyosensörünün elemanları (Yuwono ve Lammers, 2004).....	35
Şekil 2.16. Yaygın olarak kullanılan plastikleştiriciler.....	38
Şekil 2.17. IUPAC'a göre cevap zamanı (t_{95}).....	44
Şekil 2.18. IUPAC'a göre cevap zamanı ($\Delta E/\Delta t$).....	45

Şekil 2.19. Potansiyometrik bir sensörün pH çalışma aralığı	46
Şekil 2.20. Potansiyometrik bir sensörün tekrarlanabilirliği (Isildak ve Özbek, 2020)..	47
Şekil 2.21. İyon seçici bir elektrodun tayin limiti belirleme yöntemi (Özbek ve Isildak, 2021).....	47
Şekil 3.1. Valproat–seçici biyosensörlerinin hazırlık aşamaları ve potansiyometrik ölçüm sistemi (Özbek ve ark., 2021).	52
Şekil 3.2. Valproat–tetrametilamonyum karışımına ait ^1H –NMR spektrumu.....	54
Şekil 4.1. Tümüyle katı–hal kontak elektrodun SEM görüntüleri.....	58
Şekil 4.2. Tümüyle katı–hal kontak elektrodun EDX analizi	59
Şekil 4.3. PVC membran biyosensörün yüzey SEM görüntüleri	59
Şekil 4.4. PVC membran biyosensörün EDX analizi	60
Şekil 4.5. Valproik asit ile GABA’nın etkileşim mekanizması.....	60
Şekil 4.6. Optimum membran bileşimine sahip biyosensörün potansiyometrik davranışı.....	62
Şekil 4.7. Valproat–seçici biyosensörün kalibrasyon grafiği	62
Şekil 4.8. Membran–1 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi	63
Şekil 4.9. Membran–2 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi	63
Şekil 4.10. Membran–3 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi	63
Şekil 4.11. Membran–4 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi	64
Şekil 4.12. Membran–5 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi	64
Şekil 4.13. Membran–6 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi	64
Şekil 4.14. Membran–7 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi	65
Şekil 4.15. Membran–8 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi	65

Şekil 4.16. Membran–9 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	65
Şekil 4.17. Membran–10 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	66
Şekil 4.18. Membran–11 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	66
Şekil 4.19. Membran–12 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	66
Şekil 4.20. Membran–13 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	67
Şekil 4.21. Membran–14 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	67
Şekil 4.22. Membran–16 bileşimine sahip biyosensörün potansiyometrik davranışı ve kalibrasyon eğrisi	67
Şekil 4.23. Membran–17 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	68
Şekil 4.24. Membran–18 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	68
Şekil 4.25. Membran–19 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	68
Şekil 4.26. Membran–20 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	69
Şekil 4.27. Membran–21 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı	
b-) kalibrasyon eğrisi	69
Şekil 4.28. Valproat–seçici biyosensörün seçiciliği	71
Şekil 4.29. Valproat–seçici biyosensörün tekrarlanabilirliği	72
Şekil 4.30. Valproat–seçici biyosensörün cevap zamanı	73
Şekil 4.31. Valproat–seçici biyosensörün pH çalışma aralığı	74
Şekil 4.32. İlaç analizinde kullanılan kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi	77

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. ILAE 2017 Epilepsi Sınıflandırması (Fisher ve ark., 2017).....	7
Çizelge 2.2. Anti–epileptiklerin ilaçların kimyasal yapıları	9
Çizelge 2.3. Anti–epileptik ilaçların piyasaya sürülüş tarihleri ve etki mekanizmaları .	10
Çizelge 2.4 Anti–epileptik ilaçların etkili oldukları nöbet tipleri	11
Çizelge 2.5. Anti–epileptik ilaçların kandaki terapötik düzeyleri	11
Çizelge 2.6. Biyosensörlerin geleneksel analitik teknikler ile karşılaştırılması	18
Çizelge 2.7. Biyosensörlerin önemli uygulama alanları	19
Çizelge 2.8. Referans elektrotlar ve yarı hücre şemaları	30
Çizelge 2.9. PVC membran potansiyometrik biyosensörler	39
Çizelge 2.10. Potansiyometrik biyosensörlerin avantajları	40
Çizelge 2.11. Potansiyometrik biyosensörlerin dezavantajları	40
Çizelge 4.1. Hazırlanan valproat–seçici PVC membran biyosensörlerin % bileşim oranları ve performans özellikleri.....	57
Çizelge 4.2. Valproat–seçici biyosensörün seçicilik katsayıları.....	70
Çizelge 4.3. Valproat–seçici biyosensörün tekrarlanabilirliğini gösteren ortalama ve standart sapma değerleri	72
Çizelge 4.4. Kan örneklerinde valproik asit tayini	75
Çizelge 4.5 Epilepsi hastalarının kan örneklerinde valproik asit tayini	76
Çizelge 4.6. Valproat–seçici biyosensör ile ilaç örneğinde valproat tayini.....	77
Çizelge 4.7. Valproat–seçici biyosensörün literatürde bildirilen diğer potansiyometrik sensör veya elektrotlarla karşılaştırılması.....	78

1. GİRİŞ

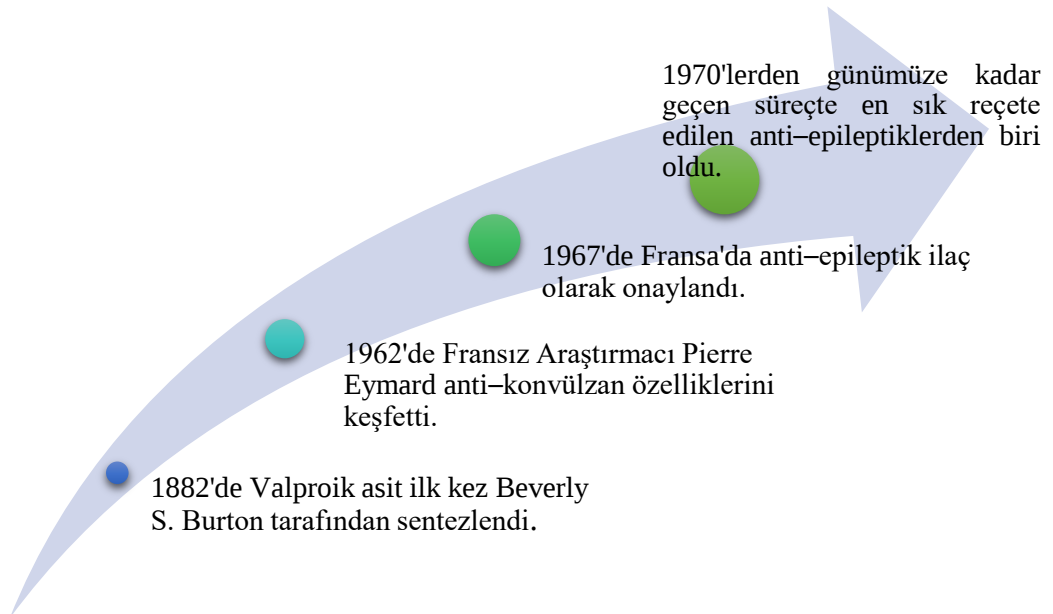
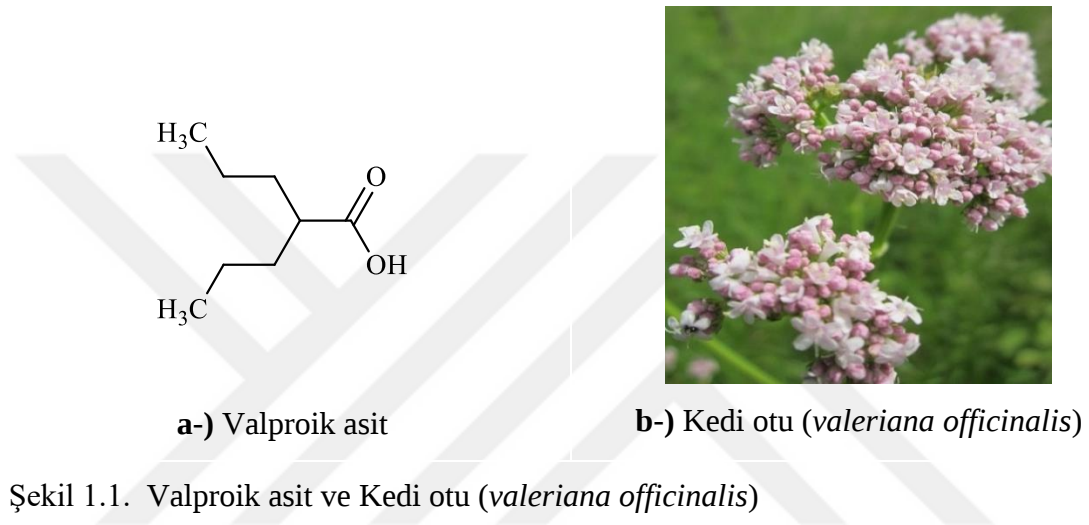
Epilepsi kelime anlamı olarak "tutmak", "ansızın yakalanmak" anlamlarına gelen ve geçmişi antik dönemlere kadar uzanan kronik nörolojik bir hastalıktır (Baykan ve ark., 2004). Epilepsi, çocukluk döneminde en fazla karşılaşılan, beyinde sinir hücrelerinin normal olmayan elektriksel deşarjı ile ortaya çıkan ve klinikte motor hareketler, bilinç değişikliği, duyu bozukluğu veya otomatizmalar şeklinde kendini gösteren, uzun vadeli veya ömür boyu anti-epileptik ilaç kullanımı gerektiren tekrarlayan nöbetlerle karakterize kronik bir tablodur (Johnston, 2004; Guberman ve Bruni, 1999).

Epilepsi toplumun %1 ile 3'ünü etkileyen yaygın görülen sonuçları ile insan hayatını ve yaşam kalitesini önemli derecede etkileyen bir hastalıktır (Bassel ve Nathan, 2003). Epilepsi nöbetlerinin tekrarlaması kişilerin yaşam kalitesini hem bireysel hem de toplumsal yaşantılarında oldukça önemli derecede etkilemektedir. Ayrıca epilepsi ciddi bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bu olumsuz sonuçların yaşanmaması için epilepsi mutlaka tedavi edilmeli veya hasta açısından kontrol edilmelidir.

Epilepsi tedavisinde anti-epileptik kullanımı, cerrahi uygulamalar veya ketojenik diyet başlıca tedavi seçeneklerini oluşturmaktadır. Bu tedavi seçenekleri arasında en çok başvurulan anti-epileptik kullanımıdır ve tedavide anti-epileptik kullanımına başlayan bir hasta bazı durumlarda ömür boyu anti-epileptik ilaç kullanabilir (Singh ve ark., 2012). Uzun süreli anti-epileptik kullanımı ciddi yan etkileri de beraberinde getirebilir. Bu nedenle seçilecek tedavide etkinliğin yanı sıra uzun ve kısa dönemde görülecek yan etkiler de göz önünde bulundurulmalı ve kullanım süresince takibi gerçekleştirilmelidir. Bu noktada seçilecek olan anti-epileptik ajanın vücuda en az zarar veren ve nöbet gelişimini en iyi engelleyen ajan olması oldukça önem arz etmektedir (Haznedar, 2017).

Valproik asit (VPA) kimyasal olarak, 2-propil pentanoik veya dipropil asetik asit (Şekil 1.1a) olarak da bilinmektedir. Valproik asit ilk olarak 1882'de Beverly S. Burton tarafından kedi otu (Şekil 1.1b) bitkisinde bulunan valerik asidin bir analogu olarak sentezlenmiştir (Burton, 1882). 1962'de ise Fransız araştırmacı Pierre Eymard valproik asidin anti-konvülzan etkilerini tesadüfen keşfetmiştir (Meunier ve ark., 1963). Bu

gelişmelerin ardından Valproik asit 1967’de Fransa’da antikonvülzan bir ilaç olarak onaylanmış ve dünya çapında en sık reçete edilen anti–epileptik ilaç haline gelmiştir (Löschner, 2002) (Şekil 1.2). Valproik asidin en önemli özelliği ve avantajı geniş spektrumlu olması ve tüm nöbet tiplerine karşı etkinliğinin oldukça yüksek olmasıdır. Valproik asit suda hafif derecede organik çözücülerde ise son derece iyi çözünen renksiz bir sıvıdır (Kusunoki ve ark., 1988; Kayaalp, 1998).

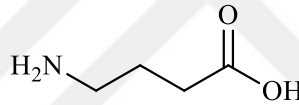


Şekil 1.2. Valproik asidin keşfi ve kullanımının önemli kilometre taşları

Valproik asit kimyasal yapısı bakımından merkezi sinir sisteminin ana inhibitör nörotransmitteri olan γ -aminobütirik asit (GABA) (Şekil 1.3)'e benzemektedir. İnsan beyinde valproik asit; GABA degradasyonunun inhibisyonu, GABA transaminaz inhibisyonu, GABA sentezini artırma ve devir hızını azaltma gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla merkezi sinir sisteminde inhibitör aktiviteye sahip olan GABA'nın potansiyelini yükselterek GABA aktivitesini değiştirmektedir (Mesdjian ve ark., 1982).

GABA prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunan, dört karbonlu ve molekül ağırlığı 103.10 g/mol olan (Bown ve Shelp, 1997), serbest amino asit havuzunun önemli bir bileşeni ve protein yapısında bulunmayan bir amino asit olduğu bilinmektedir (Akama ve Takaiwa, 2007).

GABA fizyolojik pH'larda 4.03 ve 10.56 pKa değerleri ile hem pozitif yük hem de negatif yük taşıyan yani zwitteriyon davranışı sergilemektedir (Yang ve ark., 2010).



Şekil 1.3. γ -aminobütirik asit (GABA)

Sensör teknolojisi, günümüzde üzerinde önemle durulan ve her geçen gün büyük ilgi ve gelişmelerin izlendiği bir alan olup çeşitli bilim dallarındaki araştırmacılar tarafından oldukça yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Topcu, 2009). Biyosensörler ise biyoloji, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim dalının bilgi birikiminden faydalanarak çeşitli biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesi sonucu geliştirilen biyoanalitik cihazlardır. Son yıllarda bilim ve teknolojiye hızlı gelişmeler biyosensör kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere ve gelişmelere yol açmıştır (Spichiger-Keller, 1998; Tüylek, 2017).

Bu tez çalışmasında, kronik bir hastalık olan ve hastaların yaşam kalitesini son derece olumsuz yönde etkileyebilen epilepsi hastalığının tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılan valproik aside duyarlı PVC membran potansiyometrik bir biyosensör

geliştirilmiştir. Geliştirilen valproat-seçici biyosensörün potansiyometrik performans özellikleri (doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti, cevap zamanı, pH çalışma aralığı, seçicilik, tekrarlanabilirlik vb.) araştırıldı. Ayrıca geliştirilen biyosensör normal ve epilepsili hastaların kan örneklerinde ve farmasötik numunelerde valproat tayininde başarılı bir şekilde kullanıldı.



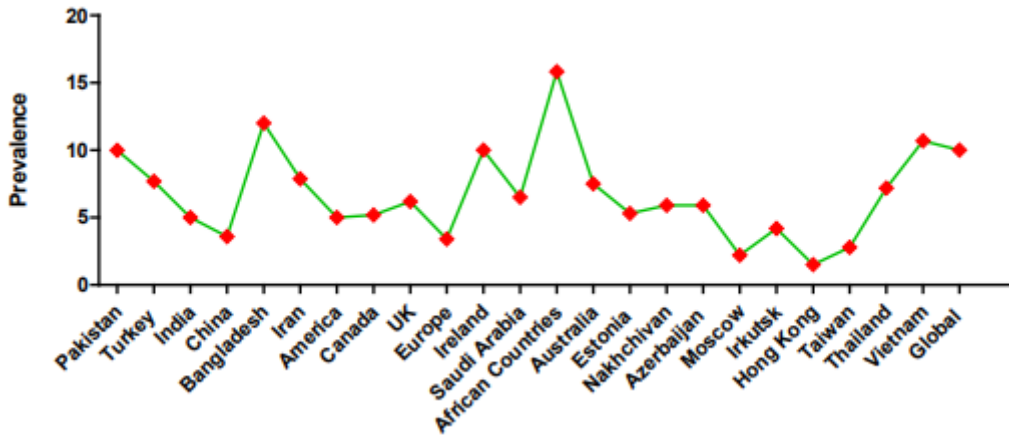
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Epilepsi dünya nüfusunun %1 ila 3'ünü etkileyen tekrarlayan nöbetlerle karakterize kronik nörolojik bir bozukluktur (Kumar ve ark., 2016; Kaindl ve ark., 2006; Cárdenas-Rodríguez ve ark., 2020). Yapılan son çalışmalara göre tüm dünyada yaklaşık 70 milyon epilepsi hastası bulunmaktadır ve bu hastaların büyük çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır (Benlier ve ark., 2020). Ayrıca yapılan çalışmalarda yine dünya genelinde yaklaşık 10 milyon çocuk epilepsi ile yaşamaktadır (Gadgil ve ark., 2019).

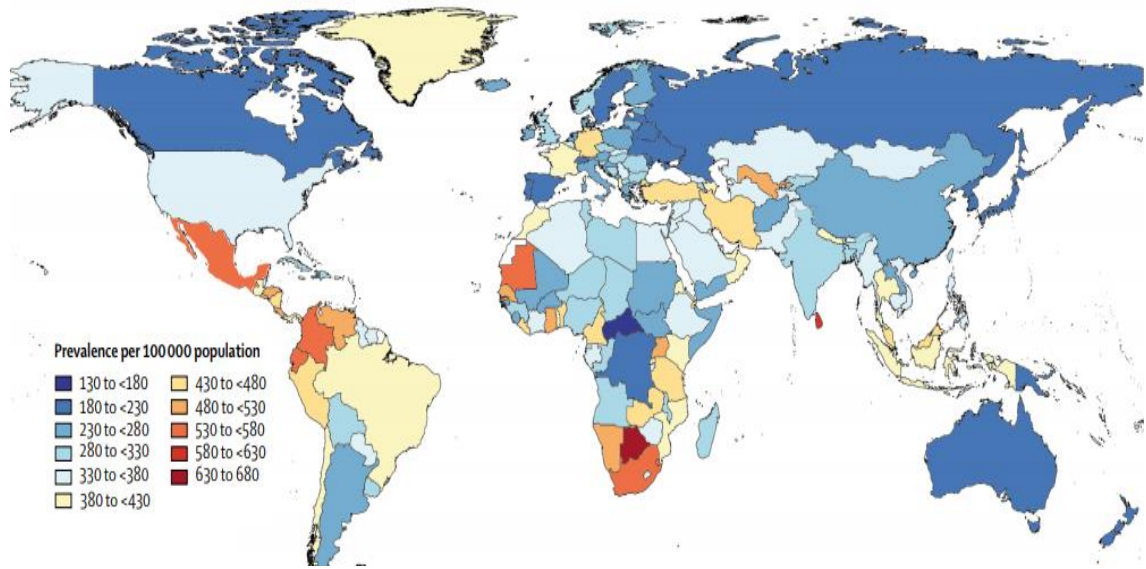
Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, epilepsinin ortaya çıkmasında cinsiyet, yaş, etnik köken vb. faktörlerin etkisinin olmadığı; ancak gelişmiş ülkeler ve gelişmekte olan ülkeler arasında insidans ve prevelans değerlerinde önemli farklılıklar olduğu görülmüştür (Yeni ve ark., 2008). Bu durumun temel nedeni gelişmekte olan ülkelerin tedavi seçeneklerine gelişmiş ülkelere oranla daha zor ulaşmasıdır. Doğum travması, kafa travması, enfeksiyon epilepsinin önlenebilecek nedenleri arasında başta gelir ve gelişmekte olan ülkelerde epilepsi insidansını artırır (De Bittencourt ve ark., 1996).

Shakirullah ve arkadaşlarının (2014), yapmış olduğu geniş çaplı epidemiyolojik çalışmaya göre, gelişmekte olan ülkeler ile gelişmiş ülkeler arasındaki epilepsi prevelans farkı oldukça açıktır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Ülkelere göre epilepsinin % prevelansı (Shakirullah ve ark., 2014)

Sebebi bilinmeyen epilepsi türüne idiyopatik epilepsi denir. Bu epilepsi türünde nörolojik belirti ve bulgular yoktur. Bulguların genetik olduğu öngörülür ve genellikle yaşa bağımlıdır (Engel, 2001). İdiyopatik epilepsilerin dünyadaki prevelansını gösteren çalışma 2016 yılında GBD Epilepsi çalışanları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu idiyopatik epilepsi prevelans çalışmasının sonuçları Şekil 2.2’de görülmektedir. Yapılan bu çalışmaya göre Türkiye’de idiyopatik epilepsi sendromu 100.000’de 430 ila 480 arasında değişmektedir.



Şekil 2.2. İdiyopatik epilepsi prevelans çalışmaları (GBD Epilepsi 2016)

Yapılan çalışmalarda, doğumdan 20 yaşına kadar olan zaman diliminde epilepsinin ortaya çıkma riski yaklaşık % 1 civarında iken, 75 yaşında % 3’e kadar çıkar. Epilepsi insidansının hayatın ilk 20 yılı içinde ve 65 yaşından sonra iki kez pik yaptığı bildirilmiştir (Walter ve ark., 2000).

Epilepsi nöbetleri bilinç kaybı, ağızdan köpük gelme veya tüm vücutta kasılmalar şeklinde kendini gösterebileceği gibi, hiç fark edilmeyecek kadar hafif nöbet çeşitleri de vardır. Epilepsi nöbetlerinin sınıflandırılması Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) tarafından yapılmaktadır. Bu sınıflandırma ilk kez 1960 yılında yapılmıştır. ILAE 2017 yılında yapmış olduğu sınıflandırmada epilepsi nöbetlerini kısmi ve jeneralize olmak üzere genel olarak iki ana gruba ayırmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. ILAE 2017 Epilepsi Sınıflandırması (Fisher ve ark., 2017)

		
Fokal (Kısmi) Başlangıçlı	Jenaralize Başlangıçlı	Bilinmeyen
Bilinç: Kapalı / Açık		
Motor	Motor	Motor
Otomatizmalar	Tonik–klonik	Tonik–klonik
Atonik	Klonik	Diğer motor nöbetler
Klonik	Tonik	
Epileptik spazmlar	Myoklonik	
Hipertonik	Myoklonik–tonik–klonik	
Myoklonik	Myoklonik–atonik	
Tonik	Atonik	
	Epileptik spazmlar	
Motor Dışı	Motor Dışı (Absans)	Motor Dışı
Otonom	Tipik	Donma
Donma	Atipik	
Kognitif	Myoklonik	
Duyusal	Göz Kapağı Myoklonisi	
Duyusal		
Fokal veya bilateral tonik–klonik		Sınıflandırılmayan

Epilepsi de doğru tanıyı koymak oldukça önemlidir ve tanı bir nöroloji uzmanı tarafından nöbetinlerin izlenmesi, Elektroensefalografi (EEG) bulguları, beyin görüntüleme (manyetik rezonans–MR) ve bazı kan analizlerinin değerlendirilmesi ile tanı konulmaktadır. Ayrıca, epilepsi tanısında Pozitron Emisyon tomografisi (PET), Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ve Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi (SPECT) gibi farklı teknikler de kullanılmaktadır.

2.2. Anti-epileptik İlaçlar

Epilepsi tedavisi büyük oranda anti-epileptik ilaçlar ile sağlanmaktadır. Epilepsi hastalarının anti-epileptikler ile tedavisindeki amaç, nöbetlerin kontrol altına alınması veya nöbet sayısının olabildiğince azaltılmasıdır. Dolayısıyla tedavi de hasta açısından mümkün olan en iyi yaşam kalitesi amaçlanmaktadır. Anti-epileptik tedavisi oldukça uzun süre devam ettiğinden dolayı, anti-epileptik seçimi nöbet tipi, ilaçların farmokinetik özellikleri, yan etkileri, doz aralıkları ve hastanın bireysel özellikleri göz önünde bulundurularak belirlenmektedir. Anti-epileptik tedavisi bireysel olarak değerlendirilmektedir ve her hastanın kullanacağı ilaç ve dozu nöbet tipine göre farklılık göstermektedir (Bölükbaşı, 2009).

Epilepsi tedavisinde son 20 yıllık süreçte yeni anti-epileptik ilaçların kullanıma girmesi veya daha önce kullanılmakta olan ilaçların formülasyonlarında yapılan bazı değişikliklerle birlikte yeni ilaçların keşfi konusunda da büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Yapı-aktivite araştırmacıları tarafından her geçen gün yeni anti-konvülzan ilaçlar keşfedilmekte ve epilepsi tedavisinde farklı nöbet türleri üzerindeki etkileri test edilerek literatüre kazandırılmaktadır (Özbek ve Gürdere, 2020).

Piyasada yaygın olarak kullanılan anti-epileptik ilaçların etki mekanizmaları genel olarak üç grupta toplanmaktadır (Davies, 1995). Bu mekanizmalar;

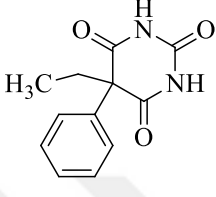
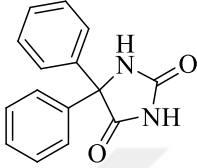
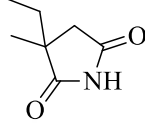
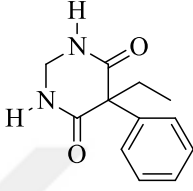
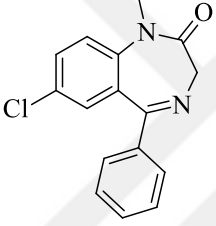
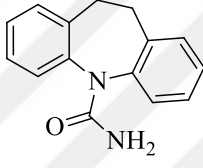
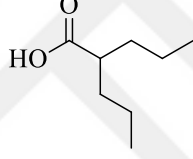
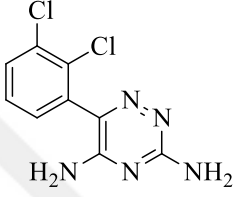
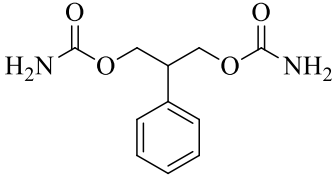
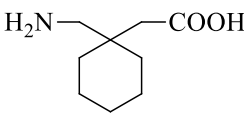
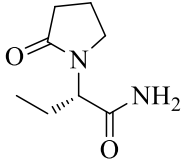
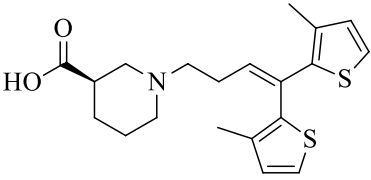
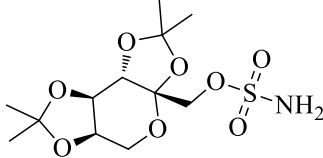
- I. Çeşitli mekanizmalarla γ -aminobütirik asit (GABA)'e etki ederek iletimini kolaylaştıranlar,
- II. Voltaja bağımlı iyon kanallarını (Na^+ ve Ca^{2+}) bloke ederek uyarıcı iletimi azaltanlar;
- III. Glutamat reseptörlerinin blokajını sağlayanlar olarak tanımlanmıştır.

Bilinen bu etki mekanizmalarının dışında etki mekanizması hala bilinmeyen ve tartışmaya açık olan anti-epileptik ilaçlarda mevcuttur.

Anti-epileptik ilaçlarda kan terapötik düzeyinin kontrolü ilaç etkinliğinin sağlanması ve istenmeyen yan etkilerin engellenmesi açısından önem arz etmektedir. Epilepsi tedavisinde çeşitli anti-epileptikleri kullanan hastaların takibi kanda bu ilaçların konsantrasyonunu belirleyen testlerle çeşitli analitik cihazlar kullanılarak yapılmaktadır.

Bazı anti-epileptiklerin ilaçların kimyasal yapıları Çizelge 2.2’de verilmiştir. Piyasaya sürülme tarihleri (Málaga ve ark., 2019) ve etki mekanizmaları (Cook ve Bensalem-Owen, 2011; Sills, 2011; Hanaya ve ark., 2016; Akdağ ve ark., 2016) ise Çizelge 2.3’de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Anti-epileptiklerin ilaçların kimyasal yapıları

			
Fenobarbital	Fenitoin	Etosüksimid	Primidon
			
Diazepam	Karbamazepin	Valproik asit	Lamotrijin
			
Felbamat	Gabapentin	Levetirasetam	
			
Tiagabin	Topiramamat		

Çizelge 2.3. Anti-epileptik ilaçların piyasaya sürülüş tarihleri ve etki mekanizmaları

Anti-epileptik ilaç	Piyasaya sürülüş tarihi	Etki Mekanizması			
		Na ⁺ kanalı blokajı	Ca ²⁺ kanalı blokajı	GABA transmisyonunun artırılması	Glutamat reseptörlerinin blokajı
Fenobarbital	1912			✓	
Fenitoin	1960	✓			
Etosüksimid	1960		✓ (T-tipi)		
Diazepam	1960			✓	
Karbamazepin	1965	✓			
Valproik asit	1970	✓	✓ (T-tipi)	✓	
Lamotrijin	1991	✓			
Felbamat	1994	✓	✓ (L-tipi)	✓	✓
Gabapentin	1994		✓ (α2δ)		
Topiramet	1995	✓	✓ (L-tipi)	✓	✓
Tiagabin	1996			✓	
Levetirasetam*	2000				

*Etki mekanizması: Beyindeki sinaptik vezikül proteini SV2A'ya bağlanarak gerçekleşir.

Anti-epileptik ilaçların etkili oldukları nöbet tipleri Çizelge 2.4'de sunulmuştur (Goldenberg, 2010; Gül ve Çokar, 2015; Saltık, 2014). Anti-epileptik ilaçların kandaki konsantrasyonu tedavinin etkili bir şekilde sağlanması için son derece önem arz etmektedir. Anti-epileptik ilaçların kan terapötik düzeyleri Çizelge 2.5'de verilmiştir (Hildenbrand, 2012).

Çizelge 2.4 Anti-epileptik ilaçların etkili oldukları nöbet tipleri

Anti-epileptik ilaç	Etkili olduğu nöbet tipi
Benzodiazepinler	Geniş spektrum
Fenobarbital	Fokal, Jenalarize tonik-klonik
Fenitoin	Fokal, Jenalarize tonik-klonik
Etosüksimid	Absans
Primidon	Fokal, Miyoklonik
Diazepam	Geniş spektrum
Karbamazepin	Fokal, Jenalarize tonik-klonik
Valproik asit	Geniş spektrum
Lamotrijin	Fokal, Jenalarize tonik-klonik, absans
Felbamat	Geniş spektrum
Gabapentin	Fokal, Jenalarize tonik-klonik
Topiramat	Geniş spektrum
Tiagabin	Fokal
Zonisamid	Fokal, Jenalarize tonik-klonik, Miyoklonik
Levetirasetam	Fokal, Jenalarize tonik-klonik, Miyoklonik

Çizelge 2.5. Anti-epileptik ilaçların kandaki terapötik düzeyleri

Anti-epileptik ilaç	Kan Terapötik Düzeyi (µg/mL)
Fenobarbital	10 – 40
Fenitoin	10 – 20
Etosüksimid	40 – 100
Primidon	5 – 12
Karbamazepin	4 – 12
Valproik asit	50 – 100
Lamotrijin	1 – 4
Felbamat	18 – 83
Gabapentin	≥ 2
Topiramat	10.5
Levetirasetam	7 – 40

2.3. Valproik Asit

Valproik asit 1882'de Burton tarafından, valerik asitin bir analogu olarak sentezlendi. Keşfinden seksen yıl sonra valproik asidin anti-epileptik özellikleri tanındı ve 1970'de anti-epileptik ilaç (AEİ) olarak onaylandı. Valproik asidin dünya genelinde bilinen ticari adı depakindir (Tolou-Ghamari ve Palizban, 2015). Valproik asit ve sodyum valproat aynı ilacın iki formudur (Fisher ve Broderick, 2003).

Valproik asit hızlı yükleme avantajı ile, 30 dakikadan uzun süren veya iki ya da daha fazla nöbetin peş peşe tekrarladığı epilepsi türü olan status epileptikus durumunda da tercih edilmektedir (Altındağ ve Baykan, 2015). Status epileptikus mortalite ve morbiditeye neden olan ve bu nedenle hızlı tanı ve tedavi gerektiren acil bir durumdur (Akpınar ve Cengiz, 2014). Valproik asit birçok nöbet tipinde etkin olarak kullanıldığı gibi bipolar bozukluk, migren ve baş ağrısı gibi durumlarda da kullanılmaktadır (Aslan Kara ve Bozdemir, 2019).

Dünya genelinde epilepsi tedavisinde en sık kullanılan anti-epileptiklerden biri olan valproik asit, jeneralize ve parsiyel epilepsi nöbetlerinin birçok tipinde etkin geniş spektrumlu bir ilaçtır. Dipropil asetik asit veya 2-propil pentanoik asitin sodyum tuzu olan valproik asit yapısal olarak beyindeki inhibitör nörotransmitterlerden GABA'ya benzemektedir. Valproik asidin etki mekanizması, beyinde GABA düzeyini arttırmakla birlikte voltaja bağımlı sodyum ve potasyum kanallarının bloke edilmesi olarak açıklanmıştır (Zawab ve Carmody, 2014).

Valproik asit oral olarak alındıktan sonra hızla ve tamamen absorbe olur (biyoyararlanım ~ %100). Absorbe edildikten sonra 1 ila 4 saat arasında kandaki en yüksek seviyesine ulaşır. Valproik asit plazma proteinlerine oldukça güçlü bir şekilde bağlanır (Doré ve ark., 2017; Dutta ve Reed, 2006).

Valproik asit anti-epileptik olarak kullanımında kandaki tedavi edici doz aralığı 50–100 µg/mL'dir (Zhang ve ark., 2014). Kandaki valproik asit düzeyi 50 µg/mL'nin altında düştüğünde etkili bir tedavi sağlanamazken, 100 µg/mL'i aştığında yan etkiler ve toksik

özellikler ortaya çıkmaktadır. Epilepsi hastası çocuklarda da oldukça yaygın olarak kullanılan valproik asidin terapötik aralığı dar olduğundan dolayı kolaylıkla zehirlenmelere neden olabilmektedir. Valproik asit zehirlenmesi hafif bilinç bozukluğundan koma ve ölüme kadar farklı klinik tablolara sebep olabilmektedir (Arslanköylü ve ark., 2017). Ayrıca, baş ağrısı, ataksi, baş dönmesi, tremor ve komaya kadar değişen merkezi sinir sistemi baskılanması, beyin ödemi ve paradoksal nöbetler nörotoksik etkileri arasında yer almaktadır (Sztajnkrzyer, 2002).

Valproik asidin gastrointestinal (bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal vb.), nörolojik (çoklu ilaç tedavisi alan hastalarda sedasyon, uyuşukluk ve ataksi), dermatolojik (saç dökülmesi ve hirsutizm), endokrin, hematolojik ve teratojenik yan etkileri olduğu bilinmektedir (Sztajnkrzyer, 2002). Ayrıca, valproik asit kullanan hastalarda kilo artışı da bildirilmiştir.

Literatürde valproik asidin farmasötik ve biyolojik örneklerdeki tayini için çeşitli analitik yöntemler bildirilmiştir. Bunlar, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS), sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (LC-MS/MS), kapiler elektroforez, florimetrik, piezoelektrik, potansiyometrik, voltametrik ve galvanostatik yöntemlerdir.

HPLC, farmasötik araştırmalarında oldukça yaygın olarak kullanılan analitik yöntemlerden biridir ve eşzamanlı analiz, yüksek çözünürlük, yüksek hassasiyet, iyi tekrarlanabilirlik ve saflaştırma kolaylığı gibi avantajlar sunar (Sonia ve ark., 2016). Kishore ve ark. (2002), HPLC yöntemini kullanarak valproik asit tayinini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 250 × 4.6 mm'lik C18 kolon tercih edilmiş, asetonitril ve 0.05 M fosfat tamponundan oluşan (45:55; pH 3.0) mobil faz kullanılmış ve akış hızı 1.2 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Yöntemin basit, hızlı, doğru ve duyarlı olduğunu rapor eden yazarlar geliştirdikleri bu yöntemi Hindistanda yaşayan epilepsi hastalarının kan örneklerinde valproik asit tayini için kullanmışlardır. HPLC yöntemini kullanarak insan plazmasındaki valproik asit tayinini Zhang ve ark. (2014) gerçekleştirmiştir. Geliştirilen bu yöntem, 0.05–200 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal cevap sergilerken, tayin limiti 0.01 µg/mL olarak rapor edilmiştir. Basit ve hızlı olan bu kromatografik yöntemin uygulaması jeneralize epilepsili hastalardan alınan plazma

örneklerinde valproik asit tayini ile gerçekleştirilmiş ve başarılı olduğu bildirilmiştir. Valproik asit ve klinik olarak ilgili metabolitlerinin (4-en-VPA, 2,4-dien-VPA ve 2-en-VPA) konsantrasyonlarının insan serumunda eş zamanlı olarak belirlenmesi için Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (UHPLC-MS/MS) yöntemini Zhao ve ark. (2017) önermiştir. Geliştirilen UHPLC-MS/MS yönteminin, terapötik ilaç izleme için iyi bir analitik performans gösterdiği rapor edilmiştir.

LC-MS/MS yöntemini kullanarak insan plazmasında valproik asit ve üç ana metabolitin (3-OH-valproik asit, 4-ene-valproik asit ve 5-OH-valproik asit) eşzamanlı kantitatif tayinini Gao ve ark. (2011) gerçekleştirmişlerdir. Yöntem, valproik asit ve tüm analitler için > 0.995 korelasyon katsayılarına sahip olup insan plazmasında valproik asit ve diğer analitlerin tayininde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Han ve ark. (2012) LC-MS/MS yöntemini kullanarak insan kırmızı kan hücrelerinde valproik asit tayinini gerçekleştirmiştir. Bu yöntemin $1.0\text{--}100\text{ }\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında doğrusal yanıt sergilemediğini rapor eden araştırmacılar hassas, seçici ve hızlı ekstraksiyon gibi önemli avantajlar sergilediğini de bildirmişlerdir. Önerilen bu yöntemin epilepsili hastalarda valproik asidin rutin olarak izlenmesinin yanı sıra, farmakokinetik çalışmalarda da faydalı olabileceği rapor edilmiştir.

Valproik asit ve 14 farklı metabolitin serum ve idrardaki tayini GC/MS yöntemi ile Fisher ve grubu (1992) tarafından araştırılmıştır. Önerilen metot ile karaciğer hasarının erken tespiti için olası tahmin değerinin yanı sıra epilepsi hastalarının serum ve idrar örneklerinde valproik asit tayini için uygun olduğunu bildirmişlerdir. GC metodu ile insan plazma örneklerinde valproik asidin tespiti Khaniha ve ark. (2007) tarafından bildirilmiştir. $0.45\text{--}100\text{ }\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında doğrusal cevap sergileyen yöntemin, hızlı, basit, tekrarlanabilir ve valproik asidin terapötik izlenmesi için uygun olduğu rapor edilmiştir.

Ölvecka ve ark. (2003), kapiler elektroforez yöntemi ile kapiler elektroforez-izotakoforez modifikasyonu ile poli (metil metakrilat) çip kullanarak serum örneklerinde valproat düzeyini basit, hızlı (10 saniyeden az) ve hassas bir şekilde gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir. Geliştirilen bu yöntem ile serum örneklerinde

valproik asidin tayininde % 90–94 oranında yüksek geri kazanımlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Kapiler elektroforez yöntemini kullanılarak plazma örneklerinde valproik asit tayini için bir başka çalışma Pucci ve ark. (2003) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğrusal çalışma aralığı 1.0–100 µg/mL ve tayin limiti 150 ng/mL olarak bildirilmiştir. Ayrıca önerilen bu yöntem ile valproik asit kullanan şizofreni hastalarından alınan plazma örneklerinin analizinden elde edilen sonuçların kesinlik, doğruluk ve duyarlılık açısından olumlu sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Aynı yöntemi kullanarak serum, plazma ve idrar numunelerinde valproik asit tayinini Belin ve ark. (2007) gerçekleştirmiştir. Bu yöntemin, doğrusal konsantrasyon aralığı 2–150 µg/mL olup, tayin limiti 24 ng/mL olarak rapor edilmiştir. Ayrıca yöntemin biyolojik örneklerdeki valproik asiti tayin edebilme süresinin 3 dakikanın altında olduğu bildirilmiştir.

Huang ve grubunun 2015 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, valproik asitin tayinine yönelik piezorezistif temelli bir biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör'ün tahmini tayin limiti 45 µg mL⁻¹ ve ilaç ile antikör arasındaki bağlanma afinitesi yaklaşık 90 ± 21 µg mL⁻¹ olarak bildirilmiştir. Önerilen biyosensör ile elde edilen sonuçların, valproik asit tayininde klinik olarak kullanılan floresans polarizasyon immünolojik yönteminden elde edilen sonuçlarla benzer olduğu rapor edilmiştir.

Roda ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada kan ve tükürük örneklerinde valproik asidin tayini için optimize edilmiş, kâğıt tabanlı bir format kullanan akıllı telefona dayalı bir immünosensör önermişlerdir. Önerilen biyosensörün, kan örneklerinde 4–300 µg mL⁻¹ lik derişim aralığında 4 µg mL⁻¹ lik tayin limitine, tükürük örneklerinde ise 0.05–20 µg mL⁻¹ lik derişim aralığında 0.05 µg mL⁻¹ lik tayin limitine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca geliştirilen kâğıt tabanlı biyosensör'ün basit, sağlam ve ekonomik sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Acar ve Onar (2016) voltametri tekniğini kullanarak farmasötik örneklerde valproik asit tayinini gerçekleştirdiler. Geliştirilen bu yöntemin doğrusal çalışma aralığı, 1.46×10⁻⁴ – 1.1×10⁻⁴ mol L⁻¹, tayin limiti ise, 1.09×10⁻⁴ mol L⁻¹ olarak ifade edilmiştir. Standart ekleme yöntemine göre gerçekleştirilen testlerde ilaç örneklerinde yüksek geri

kazanımlarla ($\%109.67 \pm 4.85$) valproik asit tayininin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Zabardasti ve ark. (2017) nanopartikül bazlı voltametrik temelli bir sensör ile insan plazma örneklerinde valproik asidin tayinini gerçekleştirmiştir. Geliştirilen sensör'ün konsantrasyon aralığı 1.0–100 ppm ve tayin limiti 0.4 ppm olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, sensör'ün basit, duyarlı, tekrarlanabilir sonuçlar sergilediği ve insan plazma örneklerinde valproik asit tayini için uygun olduğu bildirilmiştir.

Sorouraddin ve ark. (2014) florimetrik yöntem kullanarak tablet, insan serum ve idrar örneklerinde valproik asit tayini gerçekleştirmişlerdir. Önerilen yöntemin doğrusal çalışma aralığı 0.3–7.5 mg/L olup bu aralıktaki R^2 değeri 0.9980 olarak rapor edilmiştir. Çeşitli örneklerde başarılı bir şekilde uygulanan yöntemin tayin limiti $0.24 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir.

Sabah ve ark. (2006), galvanostatik yöntemi kullanarak farmasötik preparatlarda valproat tayinini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada valproat katkılı polipirrol (PPy–Val) ve PPy–Val–CTA (setil trimetil amonyum) bazlı katı hal elektrotlarını bir platin çubuk üzerinde elektropolimerize edilmiş bir polipirrol filmi kullanarak hazırlamışlardır. Hazırlanan katı hal valproat–seçici elektrotların $4.0 \times 10^{-5} - 4.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ aralığında $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ tayin limitine sahip olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda geliştirilen elektrot 20 saniyelik cevap zamanına sahiptir ve pH 4.0–7.5 aralığında pH değişimlerinden etkilenmeden çalışmaktadır.

Bir başka çalışmada Suzuki ve ark. (1991), ilaç örneklerinde valproat'ın tayini için n–dekanol ve PVC içerisinde metil tris(tetradesil) amonyum iyon çifti kompleksi kullanarak hızlı ve basit plastik sıvı membran elektrot kiti geliştirmişler ve potansiyometrik davranışını incelemişlerdir. Elektrot'un sodyum valproat'ın $1.0 \times 10^{-2} - 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ konsantrasyon aralığında Nernst davranışı sergilediğini ve en az bir aylık kullanım ömrüne sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Katsu ve grubunun (2000), yaptıkları çalışmada galyum(III)tetrafenilporfirin molekülünü iyonofor olarak kullanarak PVC membran sensör hazırlanmışlar ve sodyum valproat derişimini tayin etmişlerdir. Önerilen elektrodun $5.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$

konsantrasyon aralığında Nernst davranışına yakın (-55 mV) potansiyometrik davranış sergilediğini ve 20 μ M tayin limitine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Santos ve ark. (2006), iyonofor olarak mangan(III) tetrafenil porfirin [Mn(III)TPP-Cl] molekülünü iyonofor olarak kullanarak PVC ve seramik membran (sol-jel) potansiyometrik elektrotlar hazırlamışlardır. PVC membran elektrodun tayin limiti 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, eğim değeri her on katlık derişim değeri için 60.8 mV olarak rapor edilirken, seramik (sol-jel) membran elektrodun tayin limiti 1.0×10^{-4} mol L⁻¹ eğim değeri ise her on katlık derişim değeri için 60.3 mV olarak bildirilmiştir. Bu iki tip elektrot, farmasötik formülasyonlarda valproat'ın doğrudan tayini için sıralı enjeksiyon analiz (SIA) sistemi ile birleştirilmiştir.

Valproik asidin çeşitli biyolojik ve farmasötik numunelerdeki tayinine yönelik önerilen HPLC, LC-MS/MS ve GC gibi analitik yöntemler ilaç analizlerinde önemli avantajlar sunmasına rağmen özellikle laboratuvar ve deneyimli personel gerekliliği gibi dezavantajları da bulunmatadır. Elektrokimyasal analiz yöntemlerinden özellikle potansiyometri geniş doğrusal konsantrasyon aralığı, kısa cevap zamanı, yüksek seçicilik, düşük tayin limiti, kolay hazırlanma, taşınabilirlik, oldukça düşük maliyetli olması ve basit kullanım gibi avantajlara sahip olmasının yanı sıra, laboratuvar ve deneyimli personel gerektirmemesi bu yöntemleri kromatografik yöntemlere göre üstün kılmaktadır.

Bu tez projesi kapsamında valproat-seçici potansiyometri temelli biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör literatürde mevcut olan analitik yöntemlere ve alternatif sensör ve biyosensörlere göre hazırlama prosedürü ve yapı bakımından tamamen farklı ve özgündür. Özellikle potansiyometrik yöntemlerin bilinen analitik yöntemlere göre birçok avantajının olması geliştirilen biyosensöre önem katmaktadır. Ayrıca, literatürde yer alan biyosensör çalışmalarında valproik asit tayininde GABA'nın biyoaktif bileşen (iyonofor) olarak kullanıldığı başka bir çalışma bulunmamaktadır.

2.4. Biyosensörler

Sensörler, en genel tanımıyla fiziksel bir özelliği algılayan ve kayıt altına alan, veya gösteren cihazlardır. Biyosensörler ise "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından, "kimyasal bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı termal, elektriksel ya da optik sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmaktadır.

Biyosensörler üzerine çalışmalar 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından glukoz oksidaz enziminin O₂ elektrodu ile kombine edilerek kandaki glukoz düzeyinin ölçülmesi ile başlamaktadır (Clark ve Lyons, 1962). Biyosensörler tanımlandığı ilk günden itibaren gelişen teknoloji ile birlikte çevresel örnekler, gıda endüstrisi, eczacılık, biyomedikal uygulamalar, savunma sanayii ve biyoteknoloji gibi alanlarda araştırmacılar tarafından yoğun bir şekilde araştırılmış ve çok farklı yapılarda yeni biyosensörler tanımlanmıştır. Ayrıca, mikrosensör teknolojileri ve biyoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak araştırmacılar tarafından biyosensörler üzerine araştırma ve geliştirme çalışmaları hızlı bir şekilde devam etmektedir. Biyosensörler bilinen klasik analitik tekniklere göre avantajlara sahiptirler. Biyosensörlerin kullanım alanları ve bazı üstünlükleri Çizelge 2.6'da özetlenmiştir (Van Dorst ve ark., 2010).

Çizelge 2.6. Biyosensörlerin geleneksel analitik teknikler ile karşılaştırılması

Biyosensörler	Geleneksel Analitik Teknikler
Hızlı ve gerçek zamanlı tayin	Zaman alıcı
Düşük maliyet	Pahalı
Taşınabilir	Laboratuvarda görüntüleme
Basit kullanım	Eğitimli laboratuvar personeli
Basit dizayn	Yüksek teknolojiye sahip aletler
Kolay örnek hazırlama	Kapsamlı örnek hazırlama gerekliliği
Daha az organik çözücü tüketimi	Daha fazla organik çözücü tüketimi
Tek analit tespiti	Çoklu analit tespiti
Sınırlı ticari kullanım	Geniş ticari kullanım
Duyarlı	Duyarlı
Özgül	Özgül
Tekrarlanabilir	Tekrarlanabilir

Biyosensörlerin en önemli uygulama alanları Çizelge 2.7’de özetlenmiştir (McGrath ve Scanaill, 2013).

Çizelge 2.7. Biyosensörlerin önemli uygulama alanları

Kullanım Alanı	Uygulamaları
Sağlık	• Diyabette glukoz seviyesinin tayini gibi çeşitli kronik hastalıkların takibi • Hamilelik testi, • Helicobakter pylori ve mide ülseri gibi çeşitli hastalıkların teşhisi • Kolesterol ve vitamin testleri gibi çeşitli biyokimyasal testler • Çeşitli bakteriyel enfeksiyon testleri • Çeşitli kanser türlerinin tanı ve takibi
Biyoteknoloji	• Enzim üretimi • Biyofarmasötik üretim
Gıda Kontrol	• Antibiyotiklerle kontaminasyon gibi kimyasal kontaminant tespiti • Toksin tespiti • Patojen tespiti • Sütte olduğu gibi çeşitli hayvansal gıdalarda hormon tespiti • Çeşitli yiyecek ve içeceklerde kalite kontrol testleri
Kişisel güvenlik, Kanun yaptırımı	• Alkol testleri • İlaç testleri
Çevresel izleme	• Sulardaki kirleticilerin tespiti • Tarımsal uygulamalar • Organofosfatlar gibi sudaki pestisitlerin tayini • Ağır metallerin tayini
Güvenlik	• Kimyasal ve savaş ajanlarının tespiti

Bir biyosensörü oluşturan temel elemanlar aşağıdaki gibi sıralanabilir (Kazemi–Darsanaki ve ark., 2013).

Analit: Tespit edilmesi gereken biyolojik bileşendir.

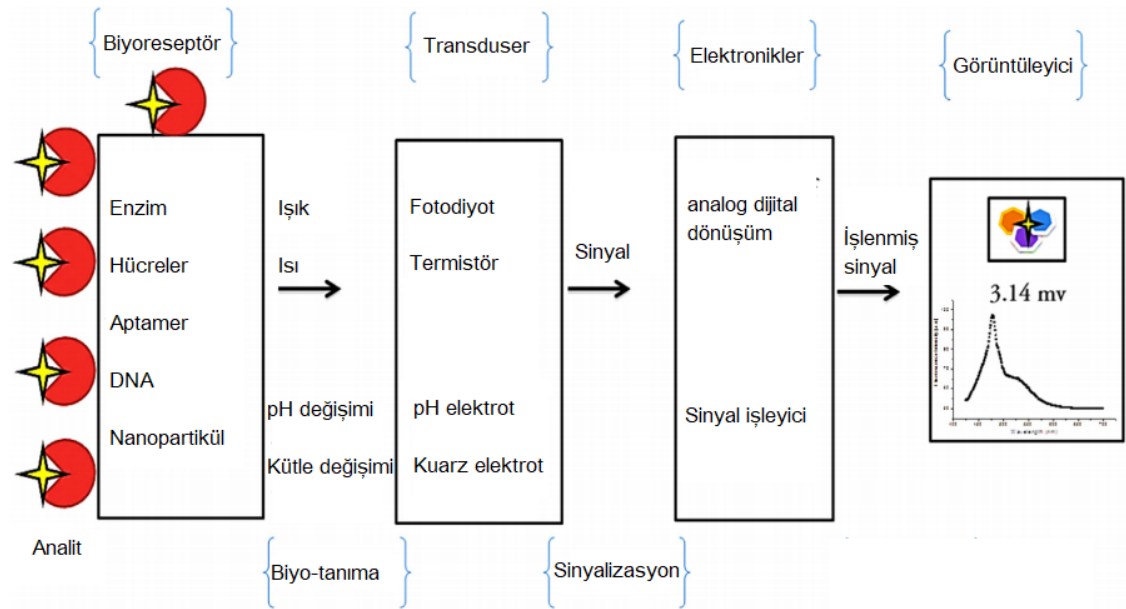
Biyoreseptör: Analiz edilecek madde ile seçimli olarak etkileşime giren biyolojik moleküllerdir. Biyoreseptör moleküllere örnek olarak enzimler, antikorlar, aptamerler, mikroorganizmalar verilebilir.

Dönüştürücü (Transduser): Genellikle biyotanıma olayını fiziksel veya kimyasal sinyal olarak ölçen sistem dönüştürücü (transduser) olarak adlandırılır.

Elektronikler: Genellikle iletilen sinyali görüntülemek için işlerler.

Görüntüleyici: İşlenen sinyali bilgisayar vasıtasıyla gösteren cihazlardır.

Biyosensörler analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin bu etkileşme sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bir ölçüm sistemiyle kombinasyonu ile oluşturulurlar (Şekil 2.3) (Metkar ve Girigoswami, 2019).



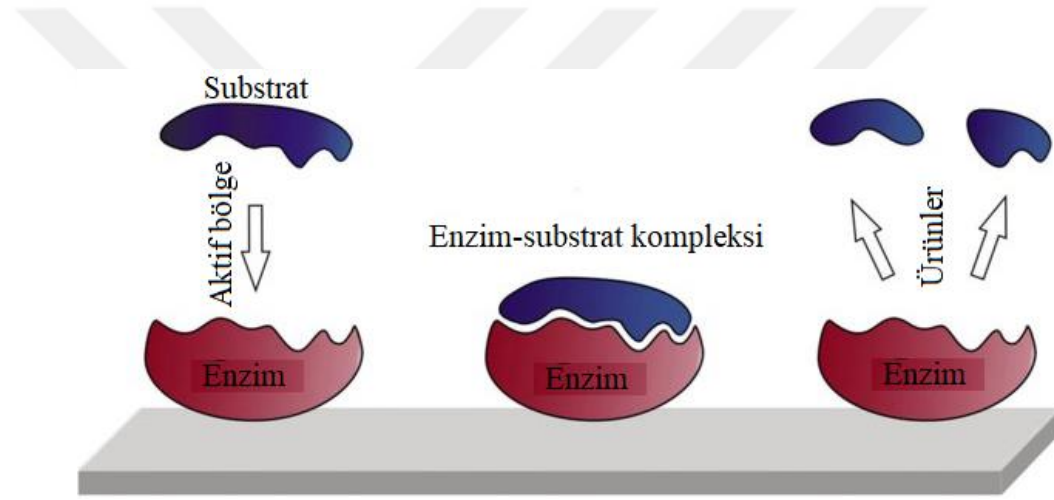
Şekil 2.3. Biyosensörlerin çalışma mekanizmasının ve bileşenlerinin şematik gösterimi (Metkar ve Girigoswami, 2019)

2.5. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Analit ile biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörler;

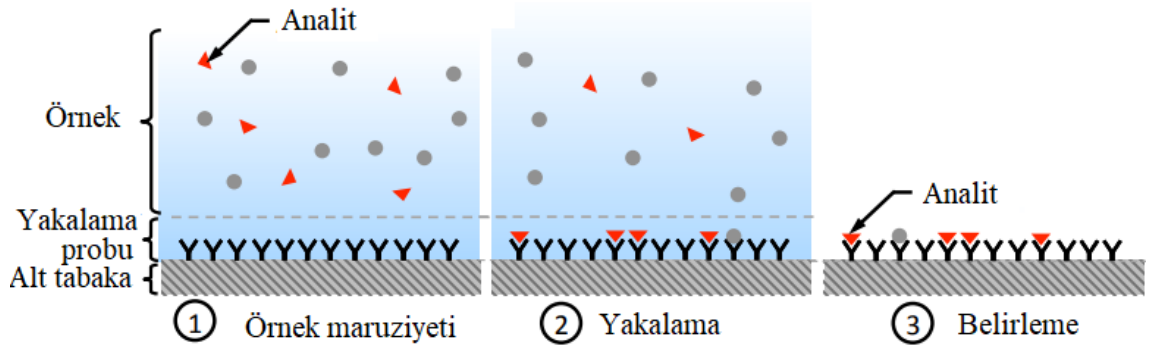
- I. Biyokatalitik esaslı biyosensörler (enzimlerin ve mikroorganizmaların kullanıldığı)
- II. Biyoafinite esaslı biyosensörler (antijen–antikor ve ligand–reseptör gibi etkileşimlerin kullanıldığı) (Kökbaş ve ark., 2013) olarak ikiye ayrılır.

Biyokatalitik bazlı biyosensörler genellikle biyolojik hedeflerin tespiti için Şekil 2.4’deki gibi katalitik bir sürece dayanır (Sanati ve ark., 2019).



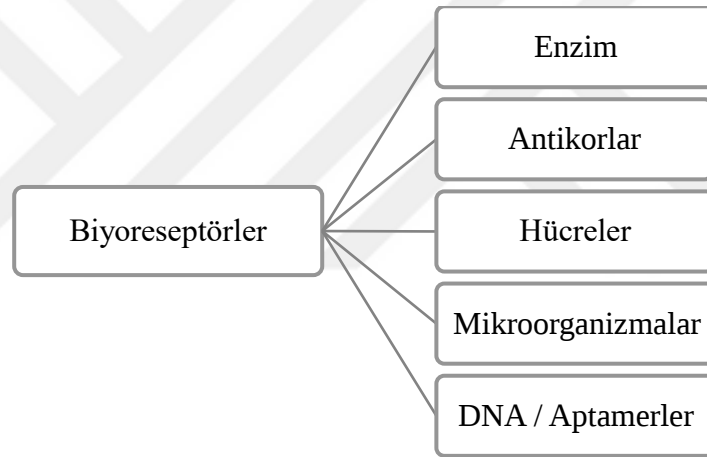
Şekil 2.4. Biyokatalitik esaslı biyosensörlerin algılama basamakları (Sanati ve ark., 2019)

Afinite bazlı biyosensörler, bir numunedeki analitin konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan yöntemdir ve analite seçici olarak bağlanabilen DNA oligonükleotidleri ve antikorları, protein reseptörleri ve biyomimetik malzemeler gibi biyolojik tanı elementleri kullanır (Manickam ve ark., 2012; Rogers, 2000). Başlangıçta, yakalama probu molekülleri katı bir yüzey üzerinde hareketsizleştirilir. Daha sonra proplar, serbestçe dağılan, propları vuran ve bunlara yapışabilen analitleri içeren numuneye maruz bırakılır. Son olarak, analit konsantrasyonunun bir tahminine ulaşmak için proplara bağlı yakalanan analitlerin sayısı belirlenir. Afinite esaslı biyosensörlerin yakalama basamakları Manickam ve arkadaşları (2012) tarafından Şekil 2.5’deki gibi özetlenmiştir.



Şekil 2.5. Afinite esaslı biyosensörlerin algılama basamakları (Manickam ve ark., 2012)

Biyosensörler, biyoaktif tabakada kullanılan biyobileşen türüne göre beşe ayrılırlar (Wu ve ark., 2019) (Şekil 2.6).

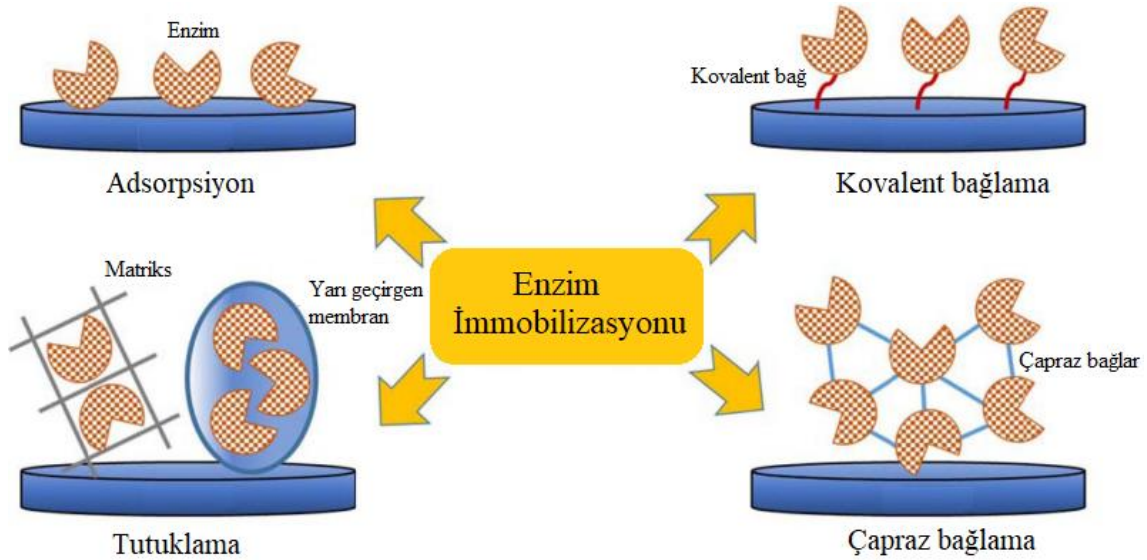


Şekil 2.6. Biyoaktif tabakada kullanılan biyobileşen türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması

2.5.1. Enzim temelli biyosensörler

Biyoaktif tabakada enzimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Enzim temelli biyosensörler, enzim katalizli reaksiyonların cevabını ölçer ve genellikle elektrokimyasal transduserler kullanılarak geliştirilmiştir (Bahadır ve Pagano, 2014). Enzim elektrotundaki biyoaktif tabaka, enzimi katalizleyip reaksiyona sokan uygun bir iletim ve ölçüm sistemi ile birleştirilmektedir (Tüylek, 2017). Analite uygun biyokomponent ve transduser seçildikten sonra biyokomponent transduser yüzeyine

immobilize edilmelidir. İmmobilizasyon için kullanılan temel yöntemler Şekil 2.7’de gösterilmiştir (Nguyen ve Kim, 2017).



Şekil 2.7. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Nguyen ve Kim, 2017)

2.5.2. Antikor temelli biyosensörler

Antikor temelli biyosensörlerde, bir antijen–antikor etkileşimi söz konusudur ve yüksek seçicilik elde etmek için analitin antijenik bölgeleriyle spesifik etkileşimlerden yararlanır (Pancrazio ve ark., 1999). Antikor temelli biyosensörler, bakteriyel patojenler, mantar patojenleri, virüsler, mikotoksinler, deniz toksinleri ve parazitlerin hızlı ve hassas analizine olanak sağlamaktadır (Byrne ve ark., 2009).

2.5.3. Hücre temelli biyosensörler

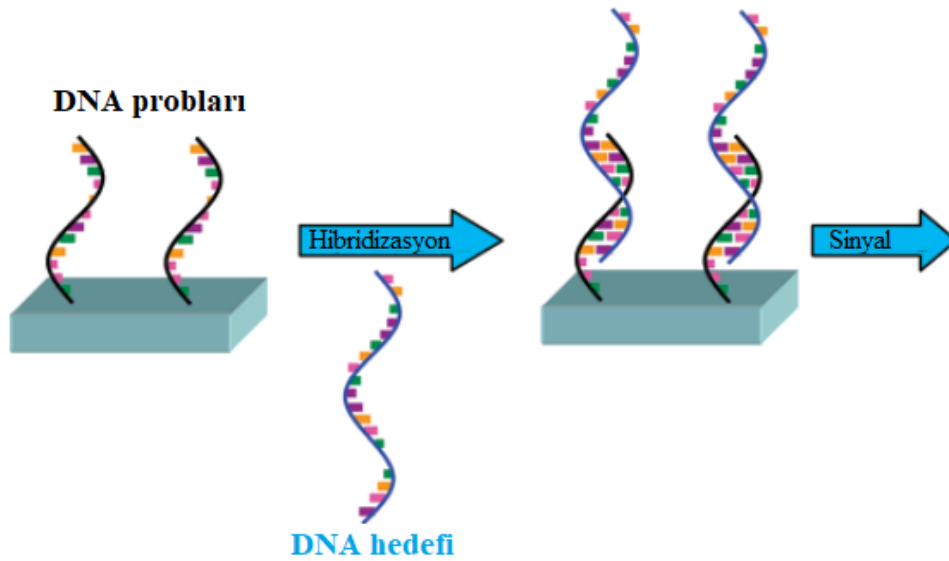
Hücre temelli biyosensörler, bakteriler, mayalar, mantarlar ve algler dahil olmak üzere farklı hücre tipleri kullanılarak geliştirilmiştir. Hücre temelli biyosensörler çevresel izlemeden farmasötik araştırmalara kadar çok çeşitli uygulamalarda önem kazanmıştır (Gupta ve ark., 2019).

2.5.4. Mikroorganizma temelli biyosensörler

Biyoaktif tabakada mikroorganizmaların kullanıldığı biyosensörlere mikrobiyal biyosensörler denir. Belirli moleküllerin tayini için sıklıkla bakteriler ve mantarlar kullanılmaktadır. Mikroorganizma temelli biyosensörler çevresel izleme, gıda ve çeşitli klinik araştırmalarda hızlı, hassas ve ekonomik olmalarından dolayı yoğun olarak kullanılmaktadır (Kıvrak, 2019).

2.5.5. DNA temelli biyosensörler

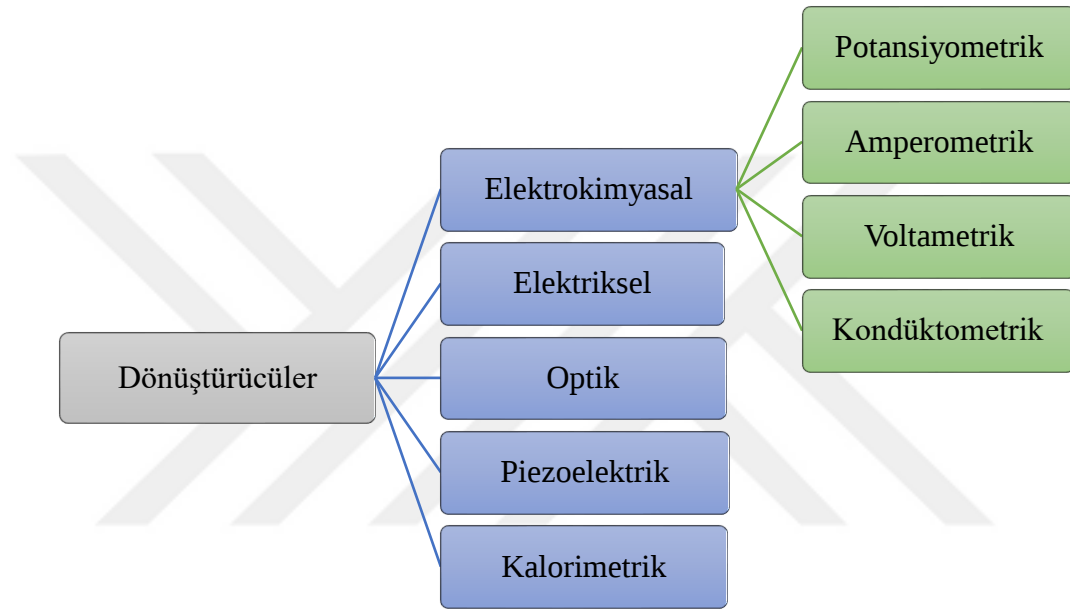
Deoksiribonükleik asitler (DNA) nitel veya nicel analizinin yapılmasına yönelik geliştirilen biyosensörlerde biyoaktif tabakada DNA kullanılır. DNA biyosensörlerinin temel prensibi nükleik asit hibridizasyonudur (Junhui ve ark., 1997). Bir DNA dizisinin saptanmasında yer alan adımlar Şekil 2.8’de görülmektedir (Sassolas ve ark., 2008). DNA biyosensörleri günümüzde mevcut olan analiz yöntemlerine yeni bir alternatif olup, biyolojik materyallerde genetik veya bulaşıcı hastalıkların hızlı, basit ve ekonomik olarak belirlenmesi, DNA hasar ve etkileşimlerinin tespit edilmesi gibi amaçlarla geliştirilme çalışmaları devam etmektedir (Muti Erdem, 2010). DNA biyosensörleri, klinik, veterinerlik, ilaç, çevre ve gıda endüstrisi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Junhui ve ark., 1997).



Şekil 2.8. Bir DNA dizisinin biyosensör ile tanımlanma aşamaları (Sassolas ve ark., 2008)

2.6. Dönüştürücüler (Transduserler)

Analit ile biyoreseptör arasında gerçekleşen kimyasal reaksiyon sonucunda gerçekleşen değişimleri (sıcaklık, pH, iletkenlik, ısı vb.) ölçülebilir bir sinyale dönüştüren cihazlara transduser (dönüştürücü) denir. Biyosensörler transduser özelliklerine göre Şekil 2.9'daki gibi sınıflandırılmaktadır (Velusamy ve ark., 2010).



Şekil 2.9. Dönüştürücülerin sınıflandırılması

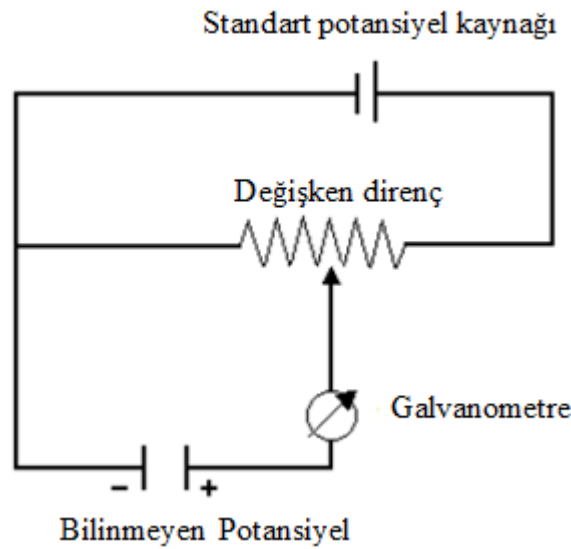
2.7. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektroanalitik teknikler, bir analitin konsantrasyonunu belirlemek için potansiyel, yük veya akım ölçümüne dayanan analitik tekniklerdir. İlk elektrokimyasal biyosensör Clark ve Lyson tarafından 1962 yılında glukoz molekülünün tayinine yönelik geliştirilmiştir (Clark ve Lyons, 1962). İlk ticari elektrokimyasal biyosensör ise Springs Instruments (Yellow Springs, OH, USA) tarafından 1975 yılında piyasaya sürülen yine glukoz biyosensörüdür (Gupta ve ark., 2018). Elektrokimyasal biyosensörler genellikle iki temel bileşenden oluşur. Bunlar biyosensörün en önemli parçası olan bir kimyasal (moleküler) tanıma sistemi ve kimyasal yanıtı modern elektrikli aletlerle tespit edilebilen bir sinyale dönüştüren fizikokimyasal bir dönüştürücüdür (Faridbod ve ark., 2011). Biyolojik veya kimyasal bir sinyalin, bir elektrik sinyaline çevirilmesi

potansiyometri, amperometri, voltametri veya kondüktometri elektrokimyasal yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilir.

2.7.1. Potansiyometrik biyosensörler

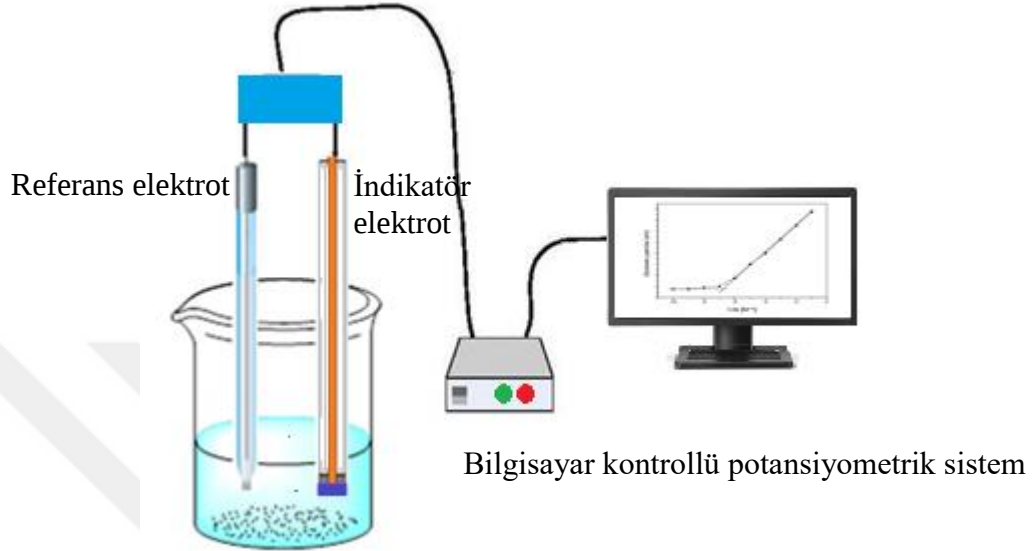
Potansiyel ölçümüne dayanan analitik metotlar “potansiyometrik metotlar” olarak adlandırılır. Potansiyometri en önemli elektrokimyasal analiz yöntemlerinden biridir ve sensör araştırmacıları tarafından oldukça yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Potansiyometre cihazının çalışma prensibi Şekil 2.10’daki elektriksel devre gibidir. Değişken direnç ayarlanarak, standart potansiyelin bilinen kısmı bilinmeyen potansiyele karşı işaretlenir. İki potansiyel eşit olduğu an, galvanometreden herhangi bir akım geçmez. Böylece bilinmeyen potansiyel, değişken direncin pozisyonundan okunabilir (Çoldur, 2010).



Şekil 2.10. Potansiyometrenin çalışma prensibi

Potansiyometri biri referans diğeri çalışma (indikatör) eletrodu olmak üzere akımın hiç geçmediği veya çok az geçtiği bir elektrot sisteminin potansiyelinin zamana karşı ölçüldüğü elektroanalitik bir yöntemdir (Isildak ve Özbek, 2021). Potansiyometrik tayinler; Şekil 2.11’deki gibi analizi yapılacak numune içerisine iyon seçici elektrotların daldırılmasıyla, numune çözeltisinin değişen derişimine bağlı olarak potansiyelde meydana gelen değişimin ölçülmesine dayanır (Topcu, 2009). Potansiyometrik ölçüm sistemi, analit çözeltisi, analit çözeltisine bağlı bir indikatör elektrot ve referans

elektrottan oluşur. Referans elektrot belirli bir sıcaklıkta sabit bir potansiyele sahipken, indikatör elektrot potansiyeli analit konsantrasyonuna göre değişim göstermektedir (Isildak ve Özbek, 2021).



Şekil 2.11. Bilgisayar kontrollü potansiyometrik sistem (Isildak ve ark., 2020)

Potansiyometrik sensörler ilk kez 1906 yılında Cremer tarafından tanımlanmış ve günümüze kadar gelişen teknolojik ilerlemelerle birlikte çevre, endüstri, tarım, tıp, rutin laboratuvar analizleri, tekstil, tıbbi ilaç analizi ve çeşitli inorganik ve organik iyonların tayininde ve birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Işıldak ve Özbek, 2021).

Potansiyometrik yöntemler, oldukça kısa cevap zamanı, geniş doğrusal çalışma aralığı, düşük enerji tüketimi, düşük maliyet, hazırlık kolaylığı, iyi hassasiyet ve çeşitli iyonik türlere karşı yüksek seçicilik sergilemesi dahil olmak üzere bilinen analitik tekniklere göre çok yönlü avantajlar sunar (Işıldak ve ark., 2019; Işıldak ve Özbek, 2021). Potansiyometrik yöntemler sundukları bu avantajlardan dolayı özellikle rutin analizlerde araştırmacılar tarafından ilgi odağı haline gelmiştir.

İyon seçici elektrotlarda, iyon seçici membran iç standart ve test çözeltisindeki iyonları birbirinden ayırır. Elektronlar, basit iyonlar veya test edilen iyonun yüklü ya da nötral kompleksleri, membranın iç kısımlarına doğru iç standart çözeltinin kompozisyonuyla

orantılı olarak taşınırlar. Böylece oluşan elektrostatik potansiyel, standart referans elektrot yarı hücresiyle membran elektrot yarı hücresi birleştirilerek ölçülür

$$E_{\text{hücre}} = E_{\text{indikatör elektrot(İSE)}} + E_{\text{Referans Elektrot}} + E_{\text{Sıvı Bağlantı Potansiyeli}} \quad (2.1)$$

Ölçülen hücre potansiyeli ile indikatör elektrodun potansiyeli arasında matematiksel bir ilişki oluşmaktadır. Derişim ile elektrot potansiyeli (E) arasındaki ilişki genel olarak aşağıdaki gibidir:



Eşitlik 2.2' deki reaksiyon denklemi Nernst Eşitliği ile aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (2.3)$$

Bu eşitlikte;

E = İndikatör elektrot potansiyeli

E^0 = Standart elektrot potansiyeli

R = Gaz sabiti, $8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$

T = Sıcaklık, kelvin (0°C için 273.15 K)

F = Faraday sabiti = $(96486 \text{ J.volt}^{-1})$

$[A]$, $[B]$, $[C]$ ve $[D]$ = Elektrotta hissedilen iyon aktiviteleri

a , b , c ve d = yarı reaksiyonda yer alan her bir türün mol sayısı

n = Alınır-verilen elektron sayısı veya membrandaki aktif iyon yüküdür.

a_i iyon aktivitesi olmak üzere, Eşitlik 2.3 tek bir iyon için yazılırsa, aşağıdaki şeklini alır.

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln a_i \quad (2.4)$$

Eşitlik 2.4'de $(\pm)$; anyonlar için $(-)$, katyonlar için $(+)$ olur.

Eğer iyon aktivitesi a_1 'den a_2 'ye değişirse potansiyel değişimi aşağıdaki gibi olur.

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_2}{a_1} \quad (2.5)$$

Eşitlik 2.5'e göre, çözeltide iyon aktivitesinin artması sonucu elektrodun potansiyometrik davranışı logaritmik olarak gözlenir.

$$E = E^0 \pm \frac{2.303RT}{nF} \log \frac{a_2}{a_1} \quad (2.6)$$

Eğer ölçümler 25 °C'de yapılırsa, sabit sayılar Eşitlik 2.6'da yerine yazıldığında Nernst Eşitliği aşağıdaki (2.7) gibi olur.

$$E = E^0 \pm \frac{0.0592}{n} \log \frac{a_2}{a_1} \quad (2.7)$$

Buna göre 25 °C'de E -log (a) ilişkisinin her on katlık aktivite farkındaki teorik potansiyel değişimi, n yüklü iyonlar için $59.2/n$ mV'tur. Bu değişim genellikle katyonlar için pozitif anyonlar için negatiftir. Bu ifadenin anlamı, Nernst eşitliğine göre tek yüklü, iki yüklü ve üç yüklü iyonlar için on katlık aktivite farkındaki teorik potansiyel değişimi sırasıyla 59.2; 29.6 ve 19.8 mV olarak hesaplanmaktadır (Skoog ve ark., 1996).

İyon seçici elektrot kullanılarak oluşturulan bir ölçüm hücresi şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir:

İç referans elektrot / İç referans çözelti / İyon-seçici membran / Test çözeltisi // Dış referans elektrot, veya;

İletken tel / Katı-hal kontakt / iyon-seçici membran / Test çözeltisi // Dış referans elektrot

Referans elektrotlar

Bir potansiyometrik hücrede kullanımı sırasında potansiyeli değişmeden kalabilen elektrotlara “referans elektrotlar” denir. Aynı zamanda bu elektrotlara “standart elektrotlar” da denir. Referans elektrot potansiyeli tam olarak bilinen bir yarı hücredir. Referans elektrotların potansiyeli, analit çözeltisinden bağımsızdır. Ancak meydana gelebilecek sıcaklık değişimlerinde referans elektrotların potansiyelleri bir miktar değişim gösterebilir. İdeal bir referans elektrotun potansiyel değeri tam olarak bilinmelidir ve analit çözeltisinin bileşiminden etkilenmemelidir. Ayrıca referans elektrotlar,

çözeltiden küçük akımlar geçse dahi hemen eski potansiyeline geri dönebilmeli ve tekrarlanabilen sonuçlar vermelidir (Skoog ve ark., 1996; Özbek ve Isildak, 2021). Potansiyometrik ölçümlerde yaygın olarak kullanılan referans elektrotlar Gümüş/Gümüş Klorür ve Kalomel elektrottur. Bu referans elektrotların şematik gösterimi ve hücre reaksiyonları Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8. Referans elektrotlar ve yarı hücre şemaları

Referans Elektrot	Hücrenin Şematik Gösterimi	Hücre Reaksiyonu
Gümüş, Gümüş Klorür	KCl (doygun), AgCl (doygun) / Ag	$\text{AgCl}_{(k)} + e^- \rightleftharpoons \text{Ag}_{(k)} + \text{Cl}^-$
Kalomel	KCl (doygun)/Hg ₂ Cl ₂ (doygun) / Hg	$\text{Hg}_2\text{Cl}_{2(k)} + 2e^- \rightleftharpoons 2\text{Hg}_{(k)} + 2\text{Cl}^-$

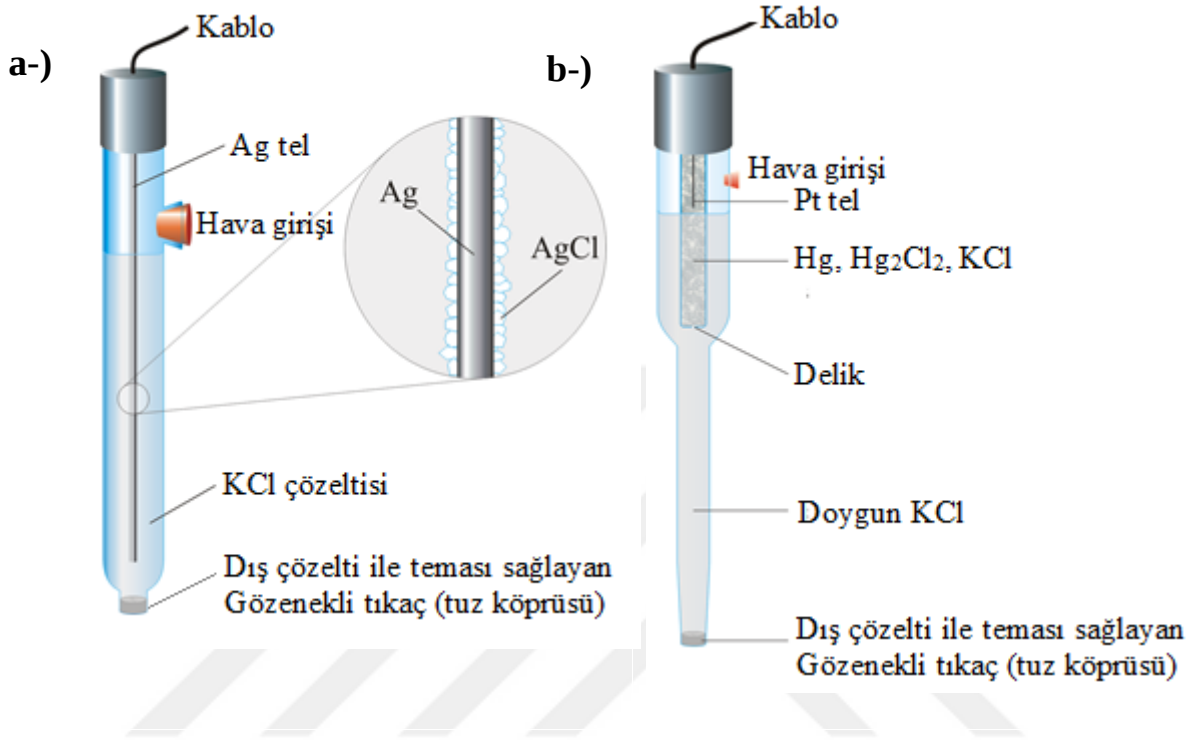
Gümüş/gümüş klorür referans elektrot

Gümüş/Gümüş klorür referans elektrotlar, bir gümüş telin yüzeyinin elektrokaplama yoluyla AgCl ile kaplanmasıyla üretilir. Elektrot derişik potasyum klorür (KCl) çözeltisine yerleştirildiğinde standart hidrojen elektroduna karşı 25 °C sıcaklıkta 198 mV’luk bir potansiyel üretmektedir. Ag/AgCl referans elektrotlarında elektrolit olarak genellikle KCl kullanılır. Potansiyometrik ölçümlerde Ag/AgCl referans elektrot basit, ucuz, kararlı, toksik etkisinin olmaması ve üretiminin kolaylığı gibi avantajlarından dolayı en yaygın kullanılan referans elektrottur (Çoldur, 2010). Ag/AgCl referans elektrot Şekil 2.12(a)’da görölmektedir.

Kalomel referans elektrot

Civa/civa(I) klorür yarı hücresi olan kalomel elektrot (SCE), standart hidrojen elektroduna karşı 25 °C sıcaklıkta yaklaşık 244 mV potansiyel oluşturur. KCl ile doymuş kalomel elektroda, “doymuş kalomel elektrot” denir. Kalomel referans elektrotların bazı dezavantajları vardır. Bunlar; Ag/AgCl referans elektrotuna göre sıcaklıktan etkilenme oranları daha fazladır. Dolayısıyla 50 °C üzerindeki sıcaklıklarda tercih edilmez. İkinci bir dezavantajı ise, içerdği civanın toksik olmasıdır. Civa/civa klorür ara yüzey bir tüpün içerisinde muhafaza edilir ve doğrudan elektrolitle temas

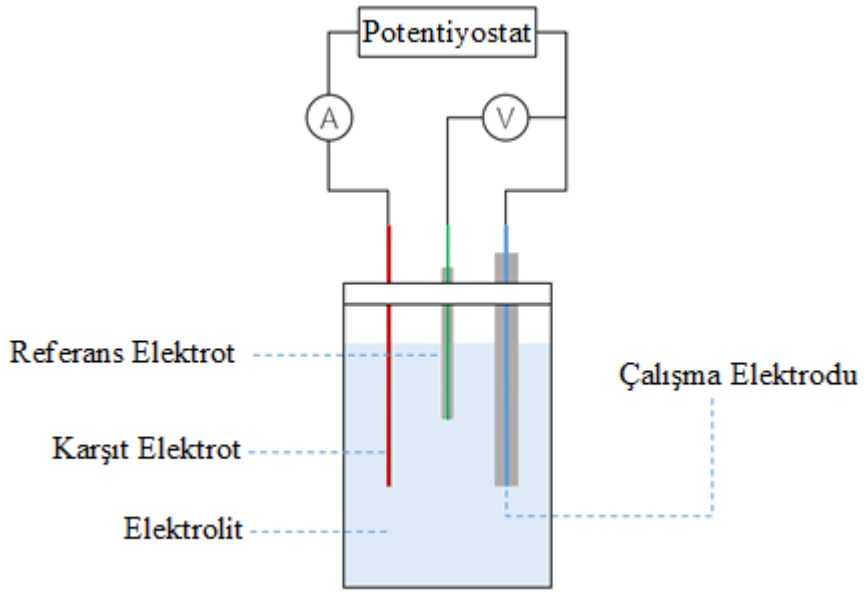
halinde değildir. Bu nedenle kalomel referans elektrot, Ag/AgCl referans elektrotuna göre daha az kirlenmektedir. Kalomel referans elektrot Şekil 2.12(b)'de görülmektedir.



Şekil 2.12. a-) Ag/AgCl referans elektrot b-) Kalomel referans elektrot (Anonim, 2021)

2.7.2. Voltametrik biyosensörler

Voltametri, elektroda uygulanan gerilimin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayanan elektrokimyasal yöntemdir. Uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğe "voltamogram" denir (Skoog ve ark., 1996). İlk voltametri tekniği 1922'de Çek kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından polarografinin keşfiyle geliştirildi ve bu keşfi ile 1959 Nobel Kimya Ödülü'nü aldı (Barek ve ark., 2001). Polarografi, sabit bir cıva damlası akışı olan damlayan cıva elektrodu kullanılarak elde edilen akım voltajı ölçümünü sağlayan özel bir voltametri konusudur (Farghaly ve ark., 2014). Voltametrik yöntemde kullanılan sistem; elektrokimyasal bir hücre içerisinde bulunan analit ve tampon çözeltiye daldırılmış referans elektrot, çalışma elektrodu ve karşıt (yardımcı) elektrottan oluşmaktadır. Voltametrik bir ölçüm sistemi Şekil 2.13'de verilmiştir (Forrister, 2018).



Şekil 2.13. Voltametrik ölçüm sistemi (Forrister, 2018)

2.7.3. Amperometrik biyosensörler

Amperometrik yöntemler, sabit bir potansiyelde elektrokimyasal yarı hücrede meydana gelen akım değişikliklerinin izlenmesine dayanır. Amperometrik yöntemlerde biri referans diğeri çalışma elektrodu (Pt, Au ve C) olmak üzere iki elektrot kullanılır. Amperometrik yöntemlerde akım şiddeti, çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektrokimyasal olarak aktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Amperometrik yöntemler diğerk elektroanalitik yöntemlerde olduğu gibi yüksek hassasiyet, hızlı cevap ve geniş doğrusal çalışma aralığı gibi bazı avantajlara sahiptirler (Wang, 1999).

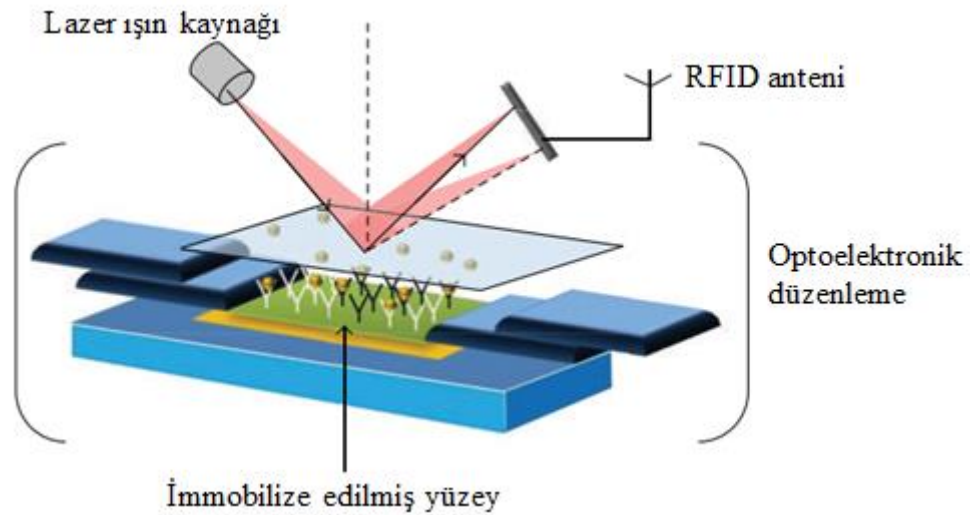
2.7.4. Kondüktometrik biyosensörler

Kondüktometrik yöntemler elektrolit çözeltilerin elektrik akımını iletmeleri üzerine kurulmuştur. Elektrolit çözeltilerin elektrik akımını iletme dereceleri, iyonların çapına, konstrasyonuna, sıcaklığa, çözücünün cinsine ve elektrotlar arasına uygulanan potansiyele göre değişim göstermektedir (Yolcu, 2008). Diğerk elektrokimyasal temelli

biyosensör tiplerine kıyasla, kondüktometrik biyosensörler hakkında çok fazla çalışma yapılmamıştır.

2.8. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler çeşitli optik teknikler kullanılarak, biyokimyasal bir reaksiyon sonucu absorplanan ya da yayılan ışının ölçümünü esas alırlar. Optik bir biyosensör Şekil 2.14'deki gibi ışın kaynağı, fiber gibi optik iletim elemanı, immobilize edilmiş biyolojik tanıma elemanı ve optik çevirici bileşenlerinden oluşmaktadır. Optik biyosensörler ile analitin belirlenmesinde absorbans, fosforesans, kemilüminesans, polarizasyon, yüzey plazmon rezonans ve toplam iç yansıma gibi teknikler kullanılabilir (Tunca 2020).



Şekil 2.14. Optik temelli biyosensör elemanları (Dey ve Goswami, 2011)

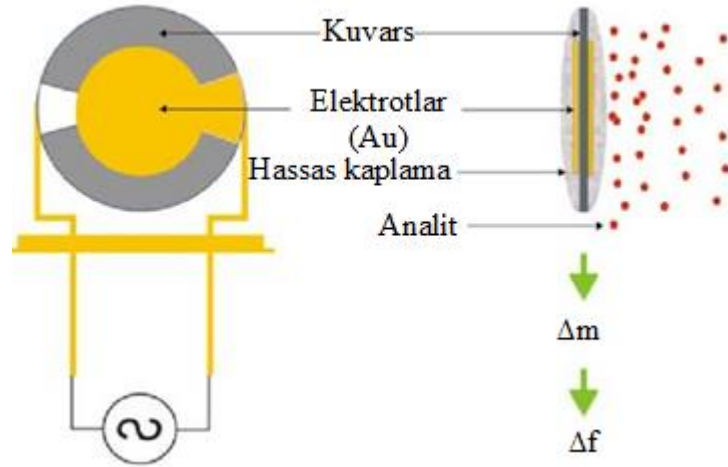
Son yıllarda, optik bazlı biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik oldukça hızlı ilerlemeler kaydedilmiş ve biyomedikal araştırmalar, ilaç, gıda güvenliği, çevresel izlemeler ve tıbbi teşhisler gibi çeşitli alanlarda uygulanmıştır (Fan ve ark., 2008). Optik biyosensörler, özellikle yüksek seçicilikleri, duyarlılıkları, küçük boyutları ve uygun ekonomik maliyetleri gibi avantajları ile geleneksel analitik tekniklere göre güçlü bir alternatiftir. Fakat optik biyosensörlerin umut verici gelişmeleri rapor edilmesine rağmen, pratikte optik biyosensörlerin uygulamaları hakkında çok fazla çalışma bulunmamaktadır (Dey ve Goswami, 2011).

Genel olarak, optik biyosensörlerde uygulanabilen algılama protokolü floresan bazlı algılama ve etiketsiz algılamadır. Flüoresan bazlı saptamada, hedef moleküller veya biyo tanıma molekülleri, boyalar gibi flüoresan özellikteki maddelerle etiketlenir; ölçülen floresan yoğunluğu, hedef moleküllerin doğrudan varlığını ve hedef ile tanıma elemanı arasındaki etkileşimin yoğunluğunu göstermektedir. Etiketsiz tespit ise, hedef moleküller etiketlenmez veya değiştirilmez doğrudan doğal formlarında tespit edilirler (Fan ve ark., 2008). Etiketsiz tespit nispeten daha ucuz ve basit bir uygulama imkânı sunmaktadır.

2.9. Piezoelektrik Biyosensörler

Piezoelektriklik veya piezoelektrik etki, Jacques Curie ve Pierre Curie tarafından 1880’de keşfedildi. Aslında o yıllardan beri bilinmesine rağmen 20. yüzyılın başlarından itibaren teknolojik ilerlemelemlerle birlikte araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Pohanka, 2017). Piezoelektrik esaslı biyosensörler piezoelektrik yapıdaki kristal yüzeyinde kütle değişiminden etkilenme özelliklerinden yararlanılarak geliştirilmiştir. Piezoelektrik biyosensörler, virüslerin, bakterilerin, proteinlerin, nükleik asitlerin, ilaçların, hormon ve pestisitlerin tayininde hızlı ve basit bir şekilde kullanım imkanı sağlarlar (Skládal, 2016).

Kuvars Kristal Mikrobals (QCM, Quarz Crystal Microbalance) tabanlı biyosensörler, piezoelektrik biyosensör türlerinden en çok kullanılanıdır ve gerçek zamanlı izleme, kullanım kolaylığı, etiketsiz algılama ve ligand immobilizasyonu için biyoyumlu elektrotlar gibi avantajlara sahiptir. QCM yöntemi biyosensör yüzeylerine immobilize edilen biyoreseptörlerin analit ile etkileşime geçmesinin ardından kütle değişimine bağlı meydana gelen rezonans frekansındaki (Δf) değişimlerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Biyoreseptör ile analit arasında bu şekilde bir etkileşim gerçekleşmesi durumunda kristal üzerindeki kütle artış gösterecek ve kristalin osilasyon frekansı azalacaktır (Kıvrak, 2019). Piezoelektrik tabanlı bir biyosensörünün elemanları Şekil 2.15’de verilmiştir (Yuwono ve Lammers, 2004).



Şekil 2.15. Piezoelektrik QCM biyosensörünün elemanları (Yuwono ve Lammers, 2004)

2.10. Kalorimetrik Biyosensörler

Çoğu biyokimyasal reaksiyonda olduğu gibi enzim katalizli gerçekleşen reaksiyonlarında büyük çoğunluğu ekzotermik olarak gerçekleşir ve dolayısıyla ısı üretimi söz konusudur. Biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda meydana gelen ısı değişimleri kalorimetrik biyosensörlerde bulunan hassas termistörler kullanılarak belirlenir. Kalorimetrik biyosensörler biyokimyasal reaksiyonlarda meydana gelen ısı değişimlerinden yararlanarak analit derişimin tayin edilmesi esasına dayanır. Literatürlerde kalorimetrik biyosensörlerde en çok kullanılan biyolojik ajan enzimlerdir. Kalorimetri temelli biyosensörlerde genellikle karşılaşılan sorun, ortam sıcaklığının değişmesidir bu nedenle sistem oldukça iyi yalıtılmalıdır (Erdoğan, 2014). Kalorimetrik biyosensörlerin büyük çoğunluğu enzim esaslı olmakla birlikte, gıda, çevre gibi alanlarda da kullanım alanı bulmuştur (Kirchner ve ark., 2012).

2.11. İyon Seçici Elektrotlar

Farklı iyonların bulunduğu bir ortamda sadece tek bir iyonduyarlı olan ve bu iyondu karşı seçici cevap sergileyen elektrotlar “İyon Seçici Elektrotlar (İSE)” olarak adlandırılmaktadır. İyon seçici elektrotların farklı yüklü türlere karşı cevabı; cam, katı kristal, seramik veya polimer gibi farklı maddelerden hazırlanan membranlar ile gerçekleştirilmektedir (Johnson ve Bachas, 2003). İyon seçici elektrotlar çözelti içerisindeki, serbest halde bulunan iyonun aktifliğine duyarlıdır. İyonik şiddetin sabit

tutulması durumunda, derişim aktiflikle doğru orantılı olduğundan dolayı iyon seçici elektrotlar kullanılarak çözelti içerisindeki iyon derişimleri belirlenebilir. İyon seçici elektrotlar birden fazla iyonla cevap verebilir, fakat belirli bir iyonla karşı özel bir davranış sergilerler (Skoog ve ark., 1996). İyon seçici elektrotlar genel olarak aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır:

- Cam iyon seçici elektrotlar
- Kaplama tel elektrotlar
- Katı hal iyon seçici membran elektrotlar
- Gaz ve enzim elektrotlar
- Alan etkili transistörler
- Sıvı membran iyon seçici elektrotlar (polimer-membran elektrotlar)
- Kompozit elektrotlar

2.11.1. Sıvı membran iyon seçici elektrotlar (polimer–membran elektrotlar)

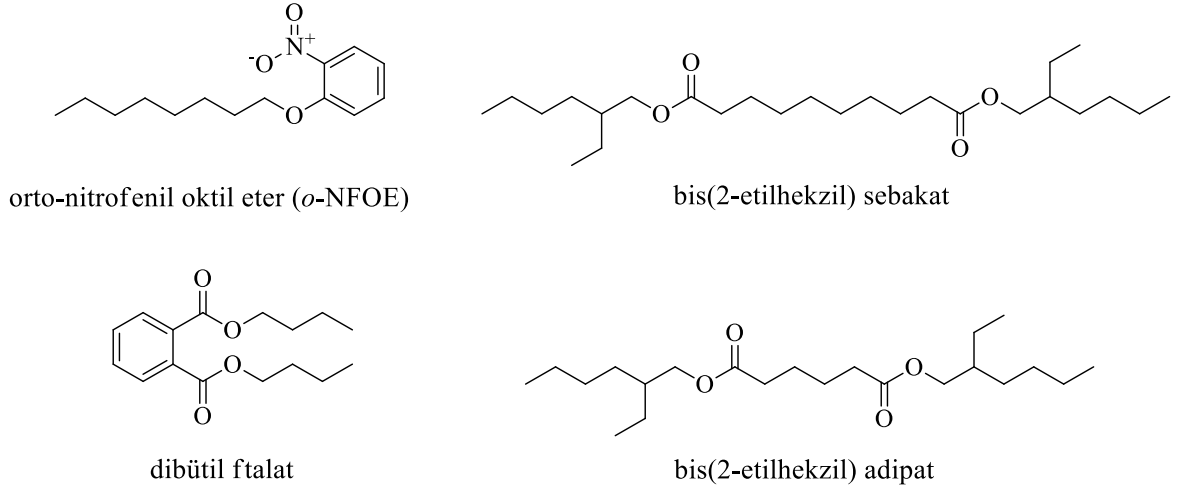
Sıvı membran esaslı iyon seçici elektrotlar polimer membran elektrotlar olarak da bilinmektedirler. İyona bağlı membran potansiyelinin oluşabilmesi için, membranın her iki yüzeyinde bir iyon değişim dengesinin olması gerekir. Bunun yanı sıra, potansiyelin ölçülebilmesi için membrandan çok küçük bir elektrik akımının herhangi bir şekilde geçebilmesi gerekmektedir. Sıvı membranlar farklı bileşenlerin uygun oranlarda bir araya getirilmesiyle oluşturulmaktadır. Bu bileşenlerin tamamı sıvı membranın yapısında aktif olarak bulunurken, literatürlerde bazı membran yapılarında bileşenlerden birkaç tanesinin kullanılmadığı durumlara da rastlamak mümkündür.

Polimer membran elektrotlar içerisinde genellikle iyon değişimini meydana getiren aktif maddeler; organik iyon–değiştiriciler, şelat halkalı yapılar ve iyonofor özelliği gösterebilecek moleküllerdir (Özbek ve Isildak, 2021). Pozitif yüklü iyon değiştiriciler, anyon duyarlı maddelerdir bu tarz maddelere örnek olarak *o*-fenantrolin tuzları verilebilir. Negatif yüklü iyon–değiştiriciler ise, kation duyarlı maddelerdir. Potasyum tetrakis (*p*-klorofenil) borat (KTPCIPB) tuzu negatif yüklü iyon değiştirici olarak kullanılmaktadır (Wang, 2006).

İyonoforlar ise, membran yapının herhangi bir türe karşı seçiciliğini belirleyen anahtar bileşendir. İyonoforlar hedef iyonik türle geri dönüşümlü ve kısmen güçlü kompleksler oluştururken, diğer iyonlarla herhangi bir kompleks oluşturmazlar (Özbek ve Isildak, 2021). Membran bileşimini sabit tutmak için, iyonofor madde membranın içerisinde tutuklanmalıdır. Bunun için iyonofor madde bağlanma merkezleri haricinde çok sayıda lipofilik gruplar da bulundurulmalıdır.

Polimer Matriks; Polimer matriksler, içerisine iyonofor özelliği taşıyan maddelerin ilave edilmesiyle birçok farklı anyonik ve katyonik türe karşı seçici elektrotların oluşturulmasında kullanılmaktadırlar. Polimer yapı membrana mekanik kararlılık, biyolojik uyumluluk, tutunma gibi önemli özellikler kazandırır (Çoldur, 2010). İyon seçici elektrotların hazırlamasında kullanılan en yaygın polimer PVC'dir. PVC kullanılarak hazırlanan membranlarda ilaveten farklı plastikleştiricilerde kullanılmaktadır. PVC membran iyon seçici elektrotları hazırlamak için bileşenlere ait en ideal oranlar; 30–35 mg PVC, 60–65 mg plastikleştirici, 1–10 mg iyonofor, 1–5 mg anyonik katkı maddesi olarak tarif edilmiştir. Membran yapıyı oluşturan bu bileşenleri çözmek ve karışımı sağlamak için yaklaşık 5 mL tetrahidrofur (THF) eklenir (Mishra 2013; Özbek ve Isildak, 2021).

Plastikleştiriciler polimer matriksin vizkozitesini azaltarak membran yapıda yer alan bileşenlerin hareketliliğini sağlarlar. PVC membran yapılara ağırlıklı oranlarda ilave edilen plastikleştiricilerin tipi, iyonların iyonofor tarafından koordinasyonunda büyük öneme sahiptir (İşildak, 2000). Bunun anlamı, aynı iyonofor kullanılarak yapılan farklı çalışmalarda tercih edilen plastikleştiricilerin farklı olması nedeniyle iyonofor yapı aynı olsa bile plastikleştirici farklılığından dolayı çalışmalarda farklı iyonlara seçici sensörler elde edilmiştir. (İşildak ve ark., 2019; Gupta ve ark., 2006). Membran yapı içerisinde iyonofor ile koordinasyonu sağlayan plastikleştiriciler bir nevi çözücü görevi üstlenirler dolayısıyla, kullanılan bu plastikleştiriciler membran yapıda tüm bileşenleri içerisinde çözebilmelidir. İyon seçici elektrotların membranlarının yapılarında orto–nitrofenil oktil eter (o–NFOE), bis(2–etilhekzil) sebekat (BEHS), dibütil ftalat (DBF) ve bis(2–etilhekzil) adipat (DEHA) en yaygın kullanılan plastikleştiricilerdir (Özbek ve İşildak 2021) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Yaygın olarak kullanılan plastikleştiriciler

Lipofilik iyonik katkı maddesi; lipofilik iyonik katkı maddeleri, iyon değişimine katılmayan lipofilik anyon/katyon ve iyon değişimine katılan karşıt iyonlardan oluşan tuzlardır ve başlangıçta membranın elektriksel direncini düşürmek için önerilmiştir (Ammann ve ark., 1985). Fakat daha sonra membrana tetradodesilamonyum tetrakis(4–klorofenil)borat (ETH 500) gibi lipofilik iyonik katkı maddelerinin ilavesi, eğer membran düşük polarlığa sahip ve düşük miktarda aktif bölge içeriyorsa, çift yüklü iyonların seçiciliklerini tek yüklü iyonlara karşı artırdığı bildirilmiştir (Nagele ve ark., 1998). Ayrıca, lipofilik iyonik katkı maddeleri, özellikle mikro boyutlarda hazırlanan elektrotlar için önemli bir özellik olan, membranın elektriksel direncini azaltmakta önemli rol oynarlar (Çoldur, 2010).

2.12. PVC Membran Potansiyometrik Biyosensörler

PVC membran potansiyometrik biyosensörler, membran yapıda genellikle iyonofor olarak biyo–reseptörlerin (enzim, antikor, nükleik asit veya aptamer) kullanıldığı ve analit ortamında bulunan biyolojik numunelere karşı seçicilik gösteren ve bu numunelerden tayin yapabilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilir. Literatürde çeşitli biyolojik örneklerdeki türlerin tayinine yönelik geliştirilmiş birçok PVC membran biyosensör çalışması bulunmaktadır.

Çubuk ve ark. (2013) insan serum örneklerinde kreatinin tayini için PVC–NH₂ temelli potansiyometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen PVC membran biyosensörün hızlı cevap zamanına, kolay hazırlama protokolüne ve düşük maliyete sahip olduğu bildirilmiştir. Karakuş ve ark. (2005) palmitik aside dayalı bir PVC membran potansiyometrik üre biyosensörü önerdiler. Önerilen bu biyosensörün yüksek hassasiyet, hızlı cevap zamanı ve kararlı bir yapı sergilediğini rapor ettiler. Ayrıca, bu üre biyosensörünü insan serum örneklerinde üre tayini için başarıyla kullandıklarını bildirmişlerdir. Datta ve grubu (2009) *Pseudomonas striata*'nın analizi için bir PVC membran potansiyometrik biyosensör önerdiler. Önerilen biyosensör, geniş bir lineer konsantrasyon aralığında çalışmakta ve hızlı cevap zamanına sahiptir. Bhambi ve ark. (2006) serum örneklerinde trigliseritlerin potansiyometrik olarak tayinini bildirmiştir. Önerilen PVC membran biyosensörün taşınabilir olduğunu ve laboratuvar dışında da kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Literatürde mevcut olan bazı PVC membran potansiyometri temelli glukoz, üre, kreatinin biyosensörleri ve bu biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti, eğim, cevap zamanı gibi potansiyometrik karakterizasyon özellikleri Çizelge 2.9'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.9. PVC membran potansiyometrik biyosensörler

Biyosensör	Doğrusal Çalışma Aralığı	Tayin Limiti (mol L ⁻¹)	Eğim (mV/derişim)	Cevap Zamanı (s)	Referans
Glukoz	5.0×10 ⁻² – 1.0×10 ⁻⁴	2.0×10 ⁻⁵	38.0 ± 5.0	5	Tinkilic ve ark., 2002
Üre	5.0×10 ⁻² – 5.0×10 ⁻⁴	3.0×10 ⁻⁵	48.0 ± 5.0	10	Tinkilic ve ark., 2002
Trigliserid	0.56 – 2.25 mM	0.11 mM	-	30	Narang ve ark., 2009
Üre	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	-	54.3 ± 0.4	60–120	Karakuş ve ark., 2005
Üre	0.026 – 10 mM	5 mM	55.56 ± 3.15	-	Chou ve ark., 2006
Glukoz	1.0×10 ⁻¹ – 5.0×10 ⁻⁵	2.0×10 ⁻⁵	25.0	10	Altuntaş ve Tavukçuoğlu, 2018
Glukoz	5.0×10 ⁻³ – 2.0×10 ⁻⁴	5.0×10 ⁻⁵	-	-	Ping-Li ve ark., 2011
<i>Pseudomonas striata</i>	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁴	5.0×10 ⁻⁴	22.0	6	Datta ve ark., 2009
Kreatinin	1.0×10 ⁻¹ – 8.0×10 ⁻⁵	6.0×10 ⁻⁵	27.5 ± 15	< 10	Cubuk ve ark., 2013

2.13. Potansiyometrik Biyosensörlerin Avantaj ve Dezavantajları

Tüm analitik yöntemlerde olduğu gibi potansiyometri bazlı biyosensörler de bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Bu avantaj ve dezavantajlar Çizelge 2.10 ve Çizelge 2.11’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.10. Potansiyometrik biyosensörlerin avantajları

-
- ✓ Çok sayıda biyolojik tür için geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusal cevap sergilerler.
 - ✓ Bilinmeyen numunenin bozunmasına neden olmazlar. Sadece numuneyi ihmal edilebilir derecede kirletirler.
 - ✓ Cevap süreleri genellikle saniye ve dakika gibi kısa sürmektedir. Bu nedenle klinik ve endüstriyel numunelerin tayininde kullanılabilirler.
 - ✓ Özel olarak hazırlanan bazı potansiyometrik biyosensörler ile farklı metotlarla ulaşılamayan canlı hücrelerin içi gibi, farklı biyolojik ortamlarda ölçüm yapılabilir.
 - ✓ Potansiyometrik biyosensörler, kromatografik ve akış enjeksiyon gibi analiz sistemlerinde dedektör olarak kullanılabilirler.
 - ✓ Potansiyometrik biyosensörlerin hazırlanması, kullanımı kolay ve ekonomiktir. Ayrıca, tümüyle katı hal kontakt ve jel dolgulu modelleri sağlam ve kararlıdır.
-

Çizelge 2.11. Potansiyometrik biyosensörlerin dezavantajları

-
- ✗ Potansiyometrik biyosensörlerle çalışılırken olumlu sonuçlar elde edebilmek için çok dikkatli olmak gerekir.
 - ✗ Membran biyosensörler ile yapılan ölçümlerin kesinliği nadiren % 1’den daha iyi olmakla birlikte daha düşük seviyelerdedir.
 - ✗ Biyosensör membran potansiyellerin kararsız olmasına yol açacak şekilde, proteinler ve diğer organik maddeler vasıtasıyla kirlenebilirler.
 - ✗ Bazı farklı iyonik türler girişim yapar veya elektrotların zehirlenmesine sebep olabilirler.
 - ✗ Biyosensörler kompleks halde olmayan serbest haldeki türlere cevap verirler. Bu nedenle biyosensörlerle yapılan ölçümlerde ortamda girişimci türlerin bulunmaması, eğer bu türler varsa, var olan bu türlerin maskelenmesini gerektirir.
-

2.14. Biyosensörlerin Performansına Etki Eden Faktörler

2.14.1. Seçicilik

Biyosensörler çözelti ortamında bulunan tüm iyonik türlere ve ajanlara cevap verebilir. Ancak bu iyonik türlerden yalnızca birine özel bir potansiyometrik davranış sergilerler. Potansiyometrik seçicilik katsayıları ($K_{A,B}^{pot}$), karışık çözelti yöntemleri ve ayrı çözelti yöntemleri olmak üzere iki ana gruba ayrılan farklı yöntemlerle ölçülebilir. En yaygın kullanılan yaklaşım, 1975 yılında IUPAC tarafından önerilen karışık çözelti yöntemidir. Potansiyometrik seçicilik katsayıları, Nicolsky–Eisenman denklemine göre Eşitlik 2.8’deki gibi ifade edilir (Umezawa ve ark., 2000):

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_A F} \ln[a_A + \sum K_{A,B}^{pot} (a_B)^{z_A/z_B}] \quad (2.8)$$

Bu eşitlikte;

a_A = Ölçülecek türün aktivitesi

a_B = Girişim yapan türün aktivitesi

z_A, z_B = Ölçülen ve girişim yapan türe ait yük

$K_{A,B}^{pot}$ = Potansiyometrik seçicilik katsayısı

Bu denkleme göre $K_{A,B}^{pot} > 1$ ise, biyosensör girişim yapan türlere ölçülecek ana türden daha seçici olarak cevap verir. Eğer, $K_{A,B}^{pot} < 1$ ise, tayin edilmek istenen ana türe karşı girişim yapan türlerden daha seçici tepki vermektedir.

Nikolsky–Eisenman eşitliği, ana tür ve farklı iyon veya türlerin potansiyele önemli derecede katkıda bulunduğu konsantrasyon aralıklarında, potansiyometrik cevabı doğru olarak tanımlayamaz. Bu şekildeki iyon karışım çözeltilerinde biyosensörün ana türe cevabını doğru olarak tanımlamak için daha karmaşık eşitlikler kullanılmalıdır. Karışık çözelti yöntemleri ve ayrı çözelti yöntemleri kendi içlerinde farklı hesaplama şekilleri içerir.

Karıştırılmış çözelti metotları

Sabit bozucu metodu

Sabit bozucu metot kullanılarak yapılan seçicilik katsayısı hesaplamalarında, biyosensör ve referans elektrottan oluşan bir hücrenin potansiyeli, girişim yapan türün aktivitesi (a_B) sabit tutulurken, ana iyon aktivitesinin (a_A) değiştirildiği çözeltilerde alınan ölçümler kullanılarak yapılır. Bu ölçümlerde elde edilen potansiyel değerler, $\log a_A$ 'ya karşı grafiğe geçirilir. Grafiğin iki doğrusal bölümünün ekstrapolasyonu ile doğruların kesiştiği nokta belirlenir. Bu noktaya karşılık gelen ana türün aktivitesi, Eşitlik 2.9'de yerine yazılarak, seçicilik katsayıları hesaplanır (Umezawa ve ark., 2000).

$$K_{A,B}^{\text{pot}} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.9)$$

Sabit ana tür metodu

Sabit bozucu metot kullanılarak yapılan seçicilik katsayısı hesaplamalarında ise, biyosensör ve referans elektrottan oluşan hücrenin potansiyeli, ana türün aktivitesinin (a_A) sabit tutulduğu fakat bozucu türün aktivitesinin (a_B) değiştirildiği çözeltiler kullanılarak ölçülür. Sabit bozucu tür metodunda olduğu gibi, elde edilen potansiyel değerler $\log a_B$ 'ye karşı grafiğe geçirilir. Grafiğin iki doğrusal bölümünün ekstrapolasyonu ile doğruların kesiştiği nokta belirlenerek bu noktaya karşılık gelen girişim yapan türün aktivitesi, Eşitlik 2.10'da yerine konularak seçicilik katsayıları hesaplanır (Umezawa ve ark., 2000).

$$K_{A,B}^{\text{pot}} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.10)$$

İki çözelti metodu

İki çözelti metodu ile yapılan seçicilik katsayısı hesabı, ana türün çözeltisinin potansiyeli (E_A) ile ana tür ve girişim yapan türün karışımından oluşan çözeltinin potansiyelinin (E_{A+B}) ölçümünü kapsar. Seçicilik katsayısı, iki çözeltide ölçülen potansiyel değerlerinin farkı ($\Delta E = E_{A+B} - E_A$) Eşitlik 2.11'de yerine yazılarak hesaplanır (Umezawa ve ark., 2000).

$$K_{A,B}^{pot} = a_A \cdot [e^{\Delta E \cdot Z_A \cdot F / (R \cdot T)} - 1] / a_B^{Z_A/Z_B} \quad (2.11)$$

Karşılaştırmalı potansiyel metodu

Karşılaştırmalı potansiyel metodu Nikolsky–Eisenman eşitliğine bağlı değildir. Bu metotta, potansiyometrik seçicilik katsayıları aynı koşullar altında aynı potansiyel değişikliği veren ana tür ve girişim yapan türün aktivitelerinin oranı olarak tanımlanır. İlk olarak, ana türün bilinen aktivitedeki (a_A) bir çözeltisi ana türün aktivitesinin (a_A) önceden ayarlanmış olduğu bir referans çözeltiye ilave edilir ve karşılık potansiyel değişimi (ΔE) kaydedilir. Daha sonra, girişim yapan türün çözeltisi (a_B) aynı potansiyel değişim (ΔE) kaydedilene kadar referans çözeltisine ilave edilir. a_B 'ye karşılık gelen potansiyel fark ölçümü süresince çözeltide a_A hiç değişmeden kalmalıdır. Dolayısıyla girişim yapan türün ilave edilen çözeltisi, a_A aktivitede ana türde içerecek şekilde hazırlanmalıdır. Bu metot ile yapılan seçicilik katsayıları Eşitlik 2.12'e göre hesaplanır (Umezawa ve ark., 2000).

$$K_{A,B}^{pot} = (a'_A - a_A) / a_B \quad (2.12)$$

Ayrı çözelti metotları

Ayrı çözelti metot'una göre seçicilik katsayıları iki farklı şekilde gerçekleştirilir. Birinci yöntem de, biyosensör ve referans elektrottan oluşan hücrenin potansiyeli iki ayrı çözeltiyle ölçülür. Bu çözeltilerin birincisinde a_A aktivitede A türü bulunurken, B türü hiç bulunmaz. Bu çözeltinin ölçülen potansiyeli E_A 'dır. İkinci çözeltide ise, ilk çözeltideki ana türün aktivitesine eşit aktivitede B türü (a_B) bulunurken, A türü hiç bulunmaz. Bu çözeltinin ölçülen potansiyeli ise E_B 'dir. Bu yöntemle göre seçicilik katsayıları, okunan potansiyel değerleri kullanılarak Eşitlik 2.13'e göre hesaplanır. Bu yöntemde $a_A = a_B$ dikkate alınır (Umezawa ve ark., 2000).

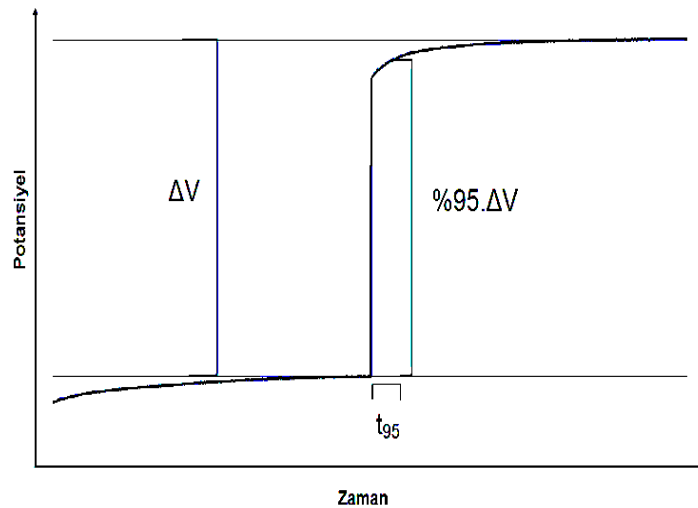
$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A) \cdot Z_A \cdot F}{R \cdot T \cdot \ln 10} + (1 - Z_A/Z_B) \cdot \log a_A \quad (2.13)$$

İkinci yöntem ise, $\log a$ ve E arasındaki ilişki ana tür ve girişim yapan tür için elde edilir. Bu ilişki yardımıyla aynı potansiyel değerine karşılık gelen aktiviteler, Eşitlik 2.14 kullanılarak seçicilik katsayıları hesaplanır. Bu yöntemde ise, $E_A = E_B$ dikkate alınır (Umezawa ve ark., 2000).

$$K_{A,B}^{\text{pot}} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.14)$$

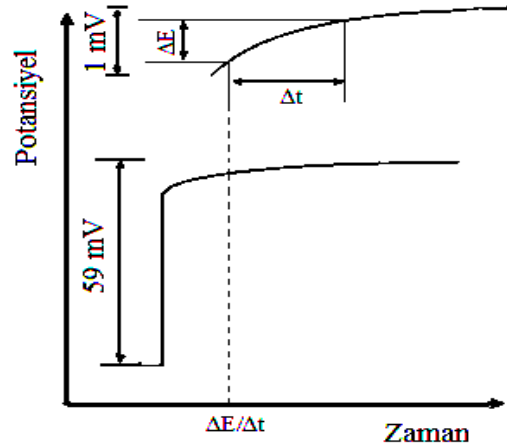
2.14.2. Cevap zamanı

IUPAC bir biyosensörün cevap zamanını, referans elektrot ile biyosensörün analit içeren bir çözeltiye daldırıldıktan sonra potansiyelinin kararlı hal değerine ulaşması için geçen süre olarak tanımlamıştır. Cevap zamanı, genel olarak biyosensörlerin fiziksel yapısı ile ilgilidir ve membran yapıların aktif kısımları ile çözeltide bulunan türler arasında dengenin kurulabilmesi için geçen süre olarakta tanımlanmaktadır (Işıldak ve Özbek, 2021). Cevap zamanını belirlemek için, IUPAC tarafından farklı hesaplama yöntemleri önerilmiştir. Bu yöntemlerden birisi denge halinde gözlenen potansiyel değişiminin % 95'inin gerçekleşmesi için geçen süre olarak ifade edilir ve t_{95} şeklinde ifade edilir (Buck ve Lindner, 1994). IUPAC'a göre cevap zamanı (t_{95}) grafiksel olarak Şekil 2.17'de gösterilmiştir.



Şekil 2.17. IUPAC'a göre cevap zamanı (t_{95})

IUPAC tarafından önerilen farklı bir cevap zamanı belirleme yöntemi ise birim zamandaki potansiyel değişimi için $\Delta E/\Delta t < 1 \text{ mV}$ gibi bir kriter belirlenir. Bu kriterin sağlanması için geçen süre, cevap zamanı olarak değerlendirilir (Lindner ve ark., 1986). Şekil 2.18 bu yönteme ait cevap zamanı grafiğini göstermektedir. Bu kriter, farklı deney koşullarına göre değişim gösterebilmektedir.



Şekil 2.18. IUPAC'a göre cevap zamanı ($\Delta E/\Delta t$)

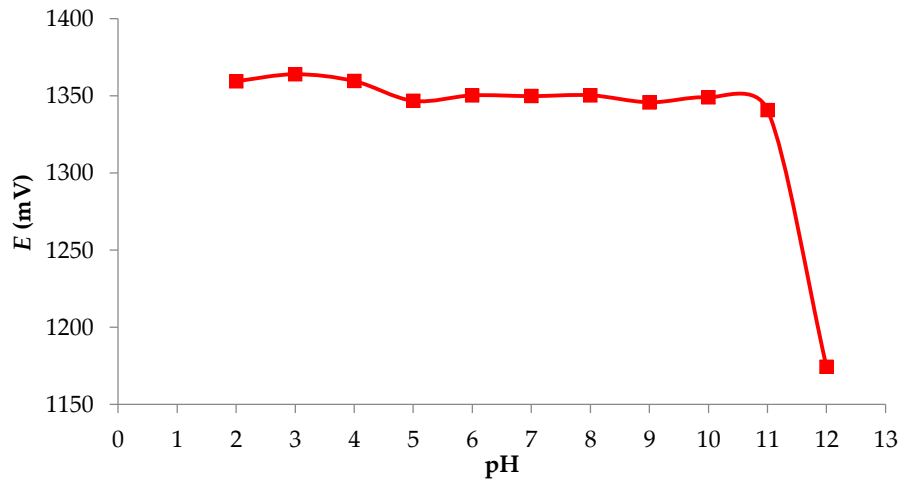
Bazı durumlar cevap zamanını geciktirici yönde etkiler yapmaktadır. Özellikle girişim yapan türler, ana türlerin hızlı dengeye gelmesini geciktirir ve cevap zamanını önemli derecede etkiler. Biyosensörlerin cevap süreleri aşağıdaki uygulamalar ile kısaltılabilir;

- ✓ Etkili karıştırma (veya akış hızının artırılması).
- ✓ Membran yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması veya çok küçük membran yüzeyli mikroelettrotların kullanılması.
- ✓ Ölçümlerin düşük derişimli çözeltilerden yüksek derişimli çözeltilere doğru yapılması (Topcu, 2013; Çoldur, 2010)

Cevap zamanını etkileyen en önemli faktör nötral taşıyıcı membranlarda, çözeltideki türün iyonofor özelliğe sahip ligant veya kompleks türü bir maddeye tutunma hızıdır. Ekstraksiyon kapasitesi, difüzyona karşı direnç, membran kalınlığı ve membrandaki çözücünün polaritesi de cevap zamanını etkileyen diğer önemli faktörler olarak belirtilmiştir (Buck ve Lindner, 1994).

2.14.3. pH çalışma aralığı

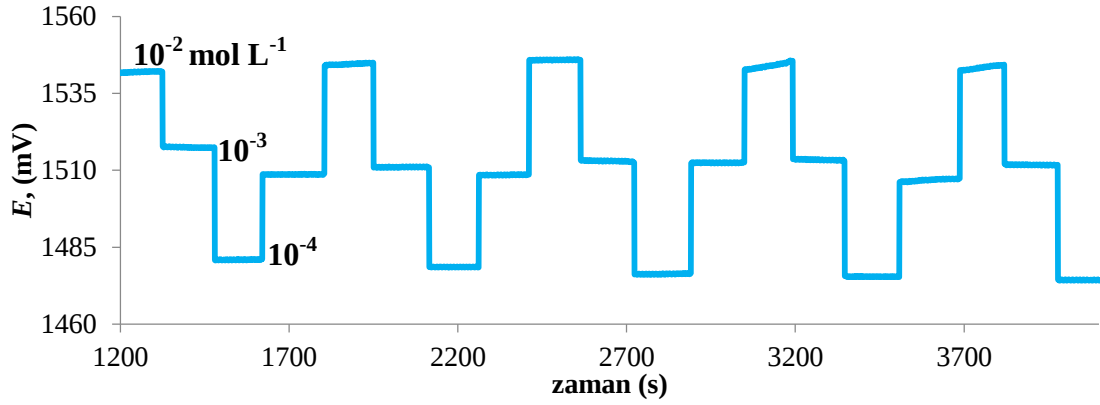
Biyosensörlerin pH çalışma aralığı genellikle, pH 2.0–12.0 arasındaki ana türün bilinen derişimdeki tampon çözeltiler hazırlanarak belirlenir (Işıldak ve Özbek, 2021). Bu çözeltilerin referans elektroda karşı sergilediği potansiyeller ölçülür ve potansiyel (mV)–pH grafiğı çizilir. Potansiyel olarak önemli bir değışikliğı meydana gelmediğı aralık, biyosensörün pH çalışma aralığı olarak ifade edilir (Buck ve Lindner, 1994; Umezawa ve ark., 2000). Şekil 2.19’da Işıldak ve ark. (2019) tarafından önerilen potansiyometrik bir sensörün 1.0×10^{-2} mol L⁻¹ tampon çözeltideki pH çalışma aralığı görölmektedir. Şekil 2.19 incelendiğinde geliştirilen sensörün pH 2.0–11.0 aralığında pH değışimlerinden etkilenmeden çalıştığı görölmektedir.



Şekil 2.19. Potansiyometrik bir sensörün pH çalışma aralığı

2.14.4. Tekrarlanabilirlik

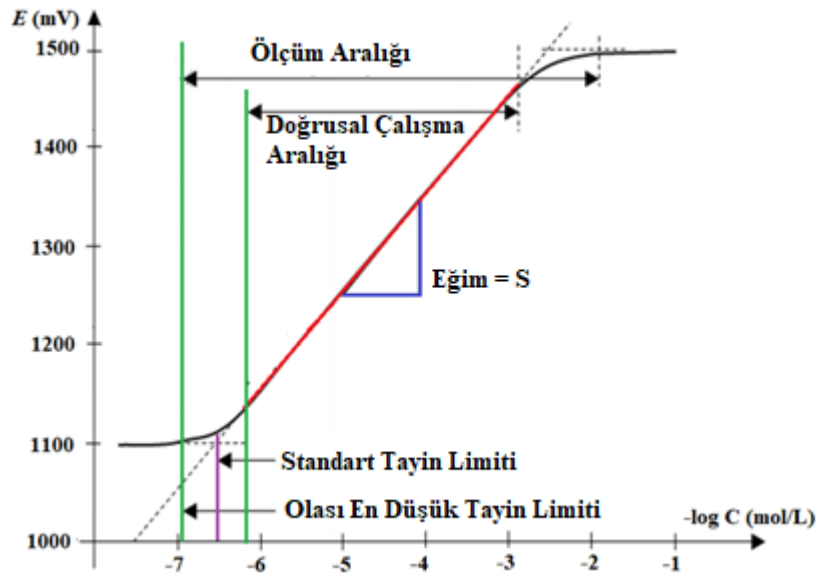
Tekrarlanabilirlik, biyosensörlerin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilere tekrar tekrar daldırılması ile ölçülen potansiyel değerler serisinin standart sapması olarak verilebilir (Coldur ve ark, 2008; Işıldak ve Özbek 2021). Biyosensörlerle yapılan analizlerde hataların en aza indirilmesi ve yüksek güvenilirlik sağlamak amacıyla tekrarlanabilir ölçümler oldukça önem arz etmektedir. Işıldak ve Özbek (2020) tarafından önerilen potansiyometrik bir gümüş sensörüne ait üç farklı konsantrasyon değerlerinde (10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} mol L⁻¹) tekrarlanabilirlik sonuçları Şekil 2.20’de görölmektedir. Şekil 2.20 geliştirilen sensörün oldukça tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermektedir.



Şekil 2.20. Potansiyometrik bir sensörün tekrarlanabilirliği (Isildak ve Özbek, 2020)

2.14.5. Tayin limiti

Biyosensörlerin tayin limiti, membran ara fazında ölçülebilir bir potansiyel fark oluşturan en düşük iyon konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (Isildak ve Özbek, 2021). Potansiyometrik bir biyosensörün kalibrasyon grafiği Şekil 2.21’de görülmektedir. Kalibrasyon grafiği iki doğrusal kısımdan oluşmaktadır ve biyosensörlerin tayin limitleri bu iki doğrusal bölgenin ekstrapolasyonlarının kesiştiği noktaya karşılık gelen aktivite değeri olarak belirlenmektedir (Buck ve Lindner, 1994; Özbek ve Isildak 2021).



Şekil 2.21. İyon seçici bir elektrodun tayin limiti belirleme yöntemi (Özbek ve Isildak, 2021)

2.14.6. Kullanım ömrü

Biyosensörlerin kullanım ömrü, potansiyometrik davranışlarında zaman içerisinde önemli bir değişiklik olup olmadığını göstermesinin yanı sıra biyosensörün kararlılığını gösteren bir parametredir. Biyosensörlerin kullanım ömürleri, membran yapısı, membranın sağlamlığı, kullanım sıklığı ve saklanma koşullarına göre farklılıklar gösterebilir. Biyosensörlerin kullanım ömrü, kullanım sayısına bağlı olarak, duyarlılığı ve doğrusal çalışma aralığındaki potansiyometrik değişimi belirlemektedir. PVC membran biyosensörlerin kullanım ömrüne etki eden en önemli faktör membran bileşenlerinin çözelti ortamına sızmasıdır (Buck ve Lindner, 1994).

2.15. PVC Membran Biyosensörlerin Analitik Uygulamaları

2.15.1. Doğrudan kalibrasyon

Doğrudan kalibrasyon yöntemini ile yapılan tayinlerde kantitatif sonuçlar elde edilebilir. Derişik bir iyon çözeltisinin seyreltilmesiyle elde edilen standart iyon çözeltileri kullanılarak kalibrasyon doğrusu elde edilir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu, bilinmeyen numuneden okunan potansiyele karşılık gelen derişim değeri örnekteki tayin edilecek türün konsantrasyon değerinin belirlenmesinde kullanılır. Bu yöntem derişimi geniş bir aralıkta değişen numunelerin hızlı bir şekilde tayinlerinin gerçekleştirilebilmesi açısından diğer yöntemlere göre avantaja sahiptir.

2.15.2. Standart ekleme yöntemi

Standart ekleme yönteminde, tayini gerçekleştirilecek olan bilinmeyen çözeltinin bilinen bir hacmi alınır ve potansiyeli ölçülür. Daha sonra derişimi bilinen bir standart çözeltiden belirli bir hacimde alınır, derişimi ölçülecek olan çözeltinin ilk hacmine eklenir ve elde edilen çözeltinin potansiyeli tekrar ölçülür. İlk çözelti ile standart çözelti eklenmiş olan ikinci çözeltinin potansiyel farkları (ΔE) belirlenir. Eşitlik 2.15 yardımıyla bilinmeyen çözeltideki analizi yapılan türün derişimi belirlenir.

$$C_x = C_s \frac{V_s}{V_x + V_s} \left(10^{\Delta E/S} - \frac{V_x}{V_x + V_s} \right)^{-1} \quad (2.15)$$

Bu eşitlikte;

C_x : bilinmeyen çözeltinin derişimi.

C_s : standart çözeltinin derişimi.

V_s : standart çözeltinin hacmi.

V_x : bilinmeyen çözeltinin hacmi.

ΔE : standart eklenmemiş çözelti ile standart eklenmiş çözeltinin potansiyelleri arasındaki fark.

S : mV cinsinden eğimdir.

Standart ekleme yönteminin diğer yöntemlere göre avantajı matriks etkisinden kaynaklanabilecek hataların en aza indirgenmiş olmasıdır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

1. γ -aminobütirik asit (GABA) ($\geq$ %99)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
2. Valproik asit sodyum tuzu (%98)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
3. Karbamazepin	Across	(Analitik saflıkta)
4. Levetirasetam	Across	(Analitik saflıkta)
5. Fenitoin	Across	(Analitik saflıkta)
6. Dibutilftalat (%99)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
7. Bis(2-etilhekzil) sebakat ($\geq$ %97)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
8. o-nitrofeniloktileter ($\geq$ %99)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
9. Bis(2-etilhekzil) adipat %99	Acros	
10. Potasyum tetrakis (klorofenil)borat	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
11. Sodyum terafenil borat	Merck	
12. Polivinil klorür (Yüksek molekül ağırlıklı)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
13. Tetrahidrofuran (THF) ($\geq$ %99)	Merck	(Kromatografik saflıkta)
14. Nitrik Asit (HNO ₃)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
15. Sodyum Hidroksit	Merck	
16. Sodyum Nitrat	Merck	
17. Potasyum Nitrat	Merck	
18. Çinko(II)nitrat hekzahidrat	Sigma Aldrich	
19. Sodyum Asetat	Merck	
20. Sodyum Nitrat	Merck	
21. Sodyum Nitrit	Merck	
22. Sodyum Fosfat	Merck	
23. Sodyum Sülfat	Merck	
24. Sodyum Klorür	Merck	
25. Kalsiyum Nitrat	Merck	
26. Magnezyum Nitrat	Merck	

27. Diklormetan	Sigma Aldrich
28. Tetrametilamonyum klorür	Sigma Aldrich
29. Epoksi	Macroplast Su 2227
30. Grafit	Sigma Aldrich
31. Sertleştirici	Desmodur RFE

3.1.2. Kullanılan cihazlar

1. Bilgisayar kontrollü potansiyometre (İSEDO Medikal Enstruman),
2. Bilgisayar ve potansiyometre ölçüm programı
3. Ag/AgCl referans elektrot (Thermo–Orion)
4. Terazi [WA304 Model, 300g x 0.0001g] (Avery Berkel)
5. pH metre (Mettler Toledo, Model S220–K)
6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (QUANTA 450 FEG)
7. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) Bruker Avance DPX–400
8. Analizör (Roche Cobas C501)

3.2. Metot

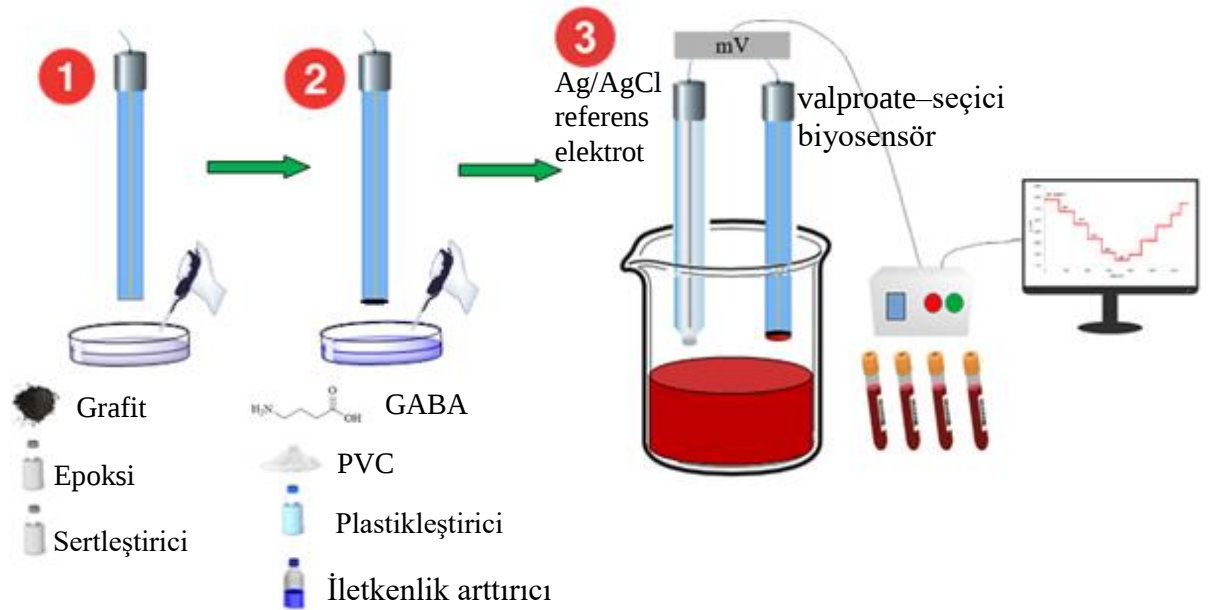
3.2.1. PVC–membran valproat–seçici biyosensörlerin hazırlanışı

Çalışmada kullanılan PVC membran valproat–seçici biyosensörlerin hazırlanması Şekil 3.1’de görüldüğü gibi üç basamaktan oluşmaktadır. Çalışmanın ilk basamağında tümüyle katı kontak elektrotlar hazırlandı. Çalışmanın ikinci basamağında ise, PVC membran valproat–seçici biyosensörler hazırlandı. Çalışmanın son basamağında, Ag/AgCl referans elektrotun yer aldığı ölçüm sistemi oluşturularak potansiyometrik performans özellikleri test edildi.

Katı kontakların hazırlanışı: %50 (w/w) grafit, % 35 (w/w) epoksi ve % 15 (w/w) sertleştiriciden oluşan karışıma yaklaşık 3 mL THF ilave edilerek homojen olacak şekilde iyice karıştırıldı. Çapı 1.0 mm olan bakır tellerin yüzeyi, uygun viskoziteye ulaşan katı–kontak karışımına 3–4 kez daldırılarak kaplandı. Yüzeyi katı–kontakt

karışımı ile kaplanan bakır teller, 24 saat süreyle karanlık ortamda bekletilerek kullanıldı (Işıldak ve Özbek, 2020; Işıldak ve ark., 2019).

PVC membran valproat-seçici biyosensörlerin hazırlanışı: PVC membran biyosensörlerin bileşimi 100 mg olacak şekilde Çizelge 4.1’de verilen oranlar kullanılarak hazırlandı. Toplamda 21 farklı membran kompozisyonuna sahip membran karışımı hazırlandı ve her birinin doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti ve belirleme katsayısı (R^2) değerleri belirlenerek optimum membran bileşenine sahip biyosensör tespit edildi. Hazırlanan tüm biyosensörler, PVC, çeşitli plastikleştiriciler (o-NFOE, BEHS, DBF ve DEHA), biyoaktif bileşen (GABA) ve iletkenlik arttırıcı özelliğe sahip bileşenler (KTPClPB veya NaTPB)’in farklı oranlarda kullanılmasıyla elde edildi. Çizelge 4.1’deki oranlarda membran bileşenleri üzerine yaklaşık 3 mL THF eklendi ve homojen bir karışım olana kadar karıştırıldı. Uygun viskozite sağlandıktan sonra karışıma bir gece önceden hazırlanan katı kontak elektrotların karışıma daldırılmasıyla PVC membran valproat-seçici biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörler yaklaşık 12–15 saat aralığında karanlık bir ortamda kurumaya bırakıldı. Potansiyometrik ölçüme hazır hale gelen biyosensörler ile doğrudan valporat çözeltileri kullanılarak ölçüm alındı.



Şekil 3.1. Valproat-seçici biyosensörlerinin hazırlık aşamaları ve potansiyometrik ölçüm sistemi (Özbek ve ark., 2021).

3.2.2. Potansiyel ölçümleri

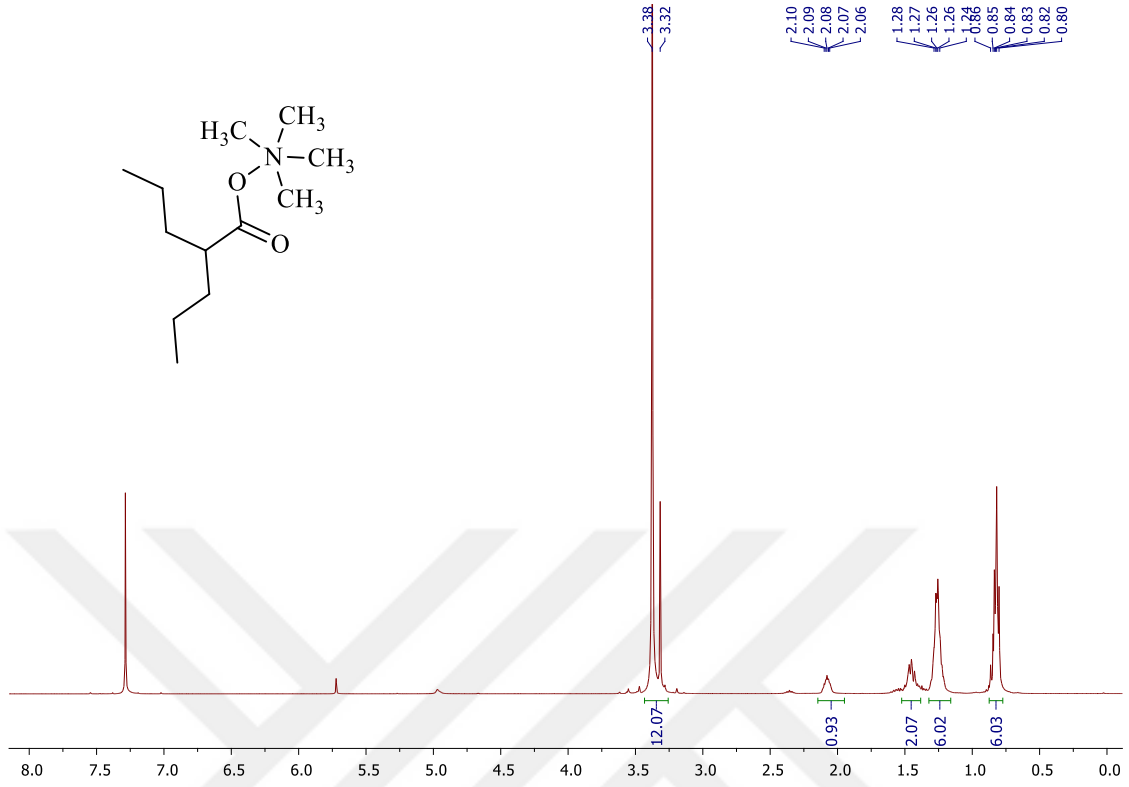
Potansiyometrik ölçümler, bilgisayar kontrollü yüksek giriş empedansına sahip dört kanallı bir potansiyometrik ölçüm sistemi ile yapıldı. Potansiyel ölçümlerinde referans elektrot olarak, Ag/AgCl elektrodu kullanıldı. Tüm potansiyel ölçümler, aşağıdaki hücre düzeneği kullanılarak 25 ± 1.0 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir:

Ag/AgCl; KCl (doygun) || valproat çözeltisi (10^{-2} mol L⁻¹) | valproat-seçici biyosensör

Valproat-seçici biyosensör ile Ag/AgCl referans elektrotuna ait potansiyometrik ölçüm sistemi Şekil 3.1'de verilmiştir.

3.2.3. Standart valproat çözeltilerin hazırlanması

Çalışmada sodyum valproat kullanıldı ve çözelti ortamında sodyum iyonunun girişim yapıp yapmadığını tespit etmek ve hazırlanan biyosensörlerin doğrudan valproat ile etkileşimini sağlamak için standart valproat çözeltileri iki aşamada hazırlandı. Öncelikle sodyum valproat (1.0 mol) ve tetrametilamonyum klorür (1.0 mol) metanol ile 24 saat reflüks edildi. Reflüks'ün ardından evaporatör ile çözücüsü uzaklaştırılan karışıma diklormetan ilave edildi. Çözünen kısım süzgeç kağıdı ile süzülerek balona alındı ve tekrar evaporatörde çözücüsü uzaklaştırıldı. Böylece, süzgeç kağıdında kalan sodyum klorür atılarak sodyum ortamdan uzaklaştırıldı. Balonda kalan karışımından ¹H-NMR (Şekil 3.2) alınarak karışımın valproat-tetrametilamonyum karışımı olduğu doğrulandıktan sonra, 1.0×10^{-1} mol L⁻¹'lik standart çözelti hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltilerden seyreltme yöntemiyle $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹'lik çözeltileri hazırlanarak potansiyel ölçümleri alındı.



Şekil 3.2. Valproat–tetrametilamonyum karışımına ait ^1H -NMR spektrumu

3.2.4. Diğer anti–epileptik ilaç ve iyon çözeltilerinin hazırlanması

Ölçümlerde kullanılan standart ilaç ve iyon çözeltileri analitik saflıktaki numuneler kullanılarak hazırlandı. İlk olarak, her bir türün 1.0×10^{-1} mol L^{-1} derişimdeki standart çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu türlerin $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} derişimlerdeki standart çözeltileri başlangıçta hazırlanan 1.0×10^{-1} mol L^{-1} derişimdeki standart çözeltilerinin deiyonize su ile seyreltilmesi ile hazırlandı.

3.2.5. Kan ve ilaç örneklerinin hazırlanması

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınan ve içeriğinde valproat bulunmayan 20 farklı insan kan örneğinde ve 7 farklı sodyum valproat kullanan epilepsi hastasının kan örneklerinde valproik asit tayini geliştirilen valproat–seçici biyosensör ile gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan kan örnekleri için etik kurul onayı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı.

Valproik asit içermeyen kan örneklerine valproat çözeltileri bilinen derişimlerde (1.0×10^{-2} ve 1.0×10^{-3} mol L⁻¹) ilave edildi. Kan örnekleri analiz öncesinde herhangi bir işlem uygulanmadan doğrudan kullanıldı. Kan numunelerin hazırlanmasının ardından, geliştirilen valproat-seçici biyosensör kan örneklerine direk daldırılarak potansiyometrik ölçümler alındı. Epilepsi tedavisinde sodyum valproat kullanan hastaların kan örneklerinde de herhangi bir işlem uygulanmadan doğrudan potansiyometrik ölçümler alındı.

Valproat-seçici biyosensörün ilaç örneklerindeki uygulamaları piyasada epilepsi ilacı olarak kullanılan valproat içerikli ilaç örneği kullanılarak belirlendi. Yerel bir eczaneden tedarik edilen ilacın bir tableti havanda iyice dövüldü. Behere alınarak bir miktar saf suda çözüldü. İlaç örneği süzgeç kağıdı ile süzöldükten sonra süzöntünün hacmi 50 mL'ye tamamlandı. İlaç numunelerin hazırlanmasının ardından, doğrudan potansiyometrik ölçümler gerçekleştirildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, tümüyle katı-hal kontak PVC membran valproat-seçici biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı, seçicilik, cevap zamanı, tekrarlanabilirlik, tayin limiti, pH çalışma aralığı gibi potansiyometrik performans özellikleri laboratuvar koşullarında incelendi. Geliştirilen valproat-seçici biyosensör ile kan örneklerinde valproik asit tayini gerçekleştirildi. Ayrıca, bir ilaç numunesindeki valproat miktarı da geliştirilen biyosensör ile test edildi.

Tümüyle katı-hal kontak PVC membran biyosensörlerin hazırlanması literatürdeki mevcut çalışmalar göz önünde bulundurularak farklı oranlarda biyoaktif bileşen (GABA), lipofilik tuz (potasyum tetrakis(4-klorofenil) borat (KTPClPB) veya sodyum tetrafenil borat (NaTFB)), çeşitli plastikleştiriciler (*o*-nitrofeniloktil eter (*o*-NFOE), bis(2-etilhekzil) sebakat (BEHS), dibutil ftalat (DBF) veya bis(2-etilhekzil) adipat ve PVC maddelerinin değişik oranlarda kullanılmasıyla gerçekleştirildi.

Katı-hal kontak PVC membran biyosensörlerin, optimum membran bileşim oranlarını belirlemek için her bir bileşenin membran karışımındaki oranı değiştirilerek biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti, belirleme katsayısı (R^2) gibi bazı özellikleri test edildi. Hazırlanan biyosensörlerin performans özellikleri Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Çizelge 4.1'e göre; optimum özelliklere sahip biyosensör'ün % 6.0 GABA, % 32.0 PVC, % 60.0 *o*-NFOE ve % 2.0 KTPClPB oranına sahip Membran-15 karışımı olduğu görülmektedir. Membran-15 karışımı $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ konsantrasyon aralığında en yüksek R^2 (0.9990) ve en düşük tayin limiti (9.75×10^{-7}) değerine sahiptir.

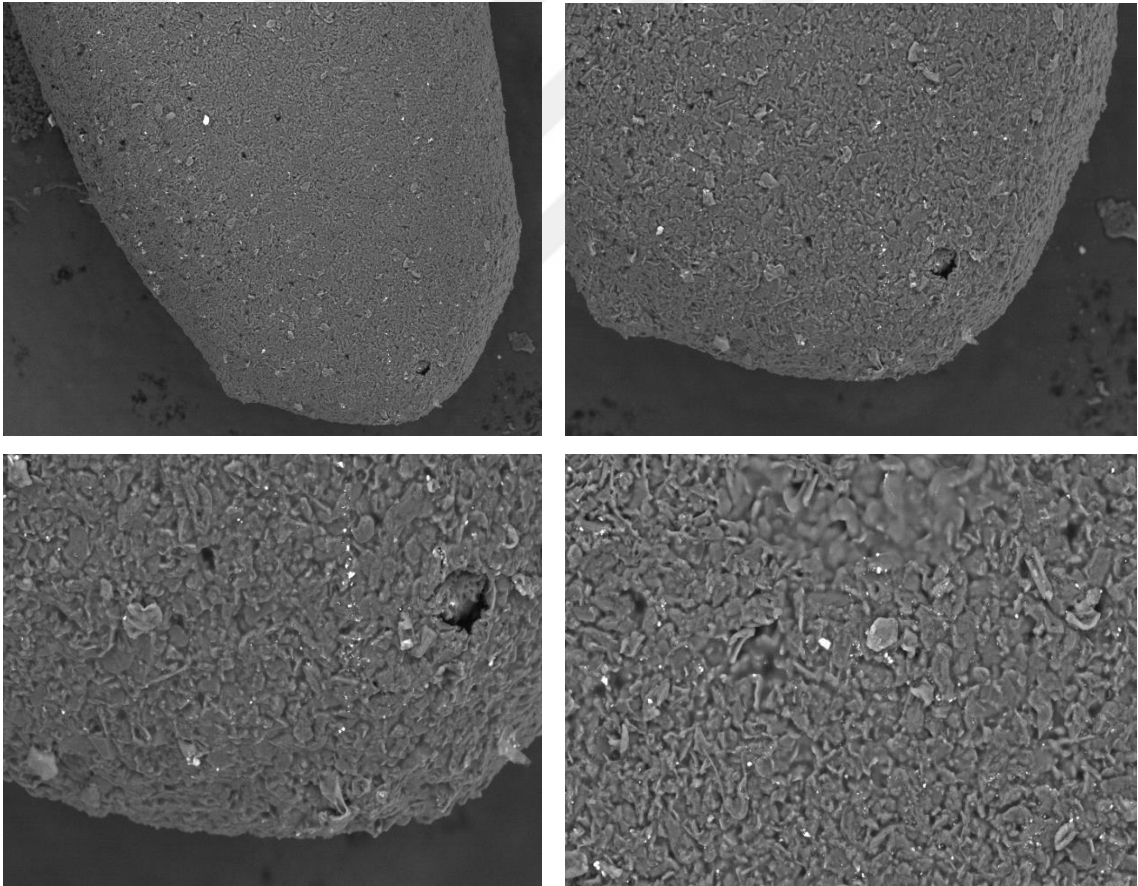
Çizelge 4.1. Hazırlanan valproat-seçici PVC membran biyosensörlerin % bileşim oranları ve performans özellikleri

Bileşim (% w/w)											
No	GABA	NaTPB	KTpClPB	PVC	o-NFOE	DEHA	BEHS	DBF	Çalışma Aralığı (mol L ⁻¹)	Tayin Limiti (mol L ⁻¹)	R ²
1	6.0	-	1.0	31.0	-	62.0	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	7.96×10 ⁻⁶	0.9881
2	5.0	-	1.0	32.0	-	-	62.0	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	4.56×10 ⁻⁶	0.9972
3	4.0	-	1.0	32.0	63.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	2.95×10 ⁻⁶	0.9952
4	5.0	1.0	-	32.0	-	-	-	64.0	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	8.81×10 ⁻⁶	0.9970
5	5.0	1.5	-	30.5	63.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	4.21×10 ⁻⁶	0.9938
6	5.0	2.0	-	33.0	-	60.0	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	8.91×10 ⁻⁶	0.9846
7	6.0	-	2.0	29.0	-	-	-	63.0	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁴	1.96×10 ⁻⁵	0.9731
8	5.5	-	1.5	33.0	-	60.0	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	2.13×10 ⁻⁵	0.9687
9	6.0	1.0	-	30.0	-	-	63.0	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	1.65×10 ⁻⁵	0.9735
10	7.0	-	1.0	29.0	-	63.0	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	1.48×10 ⁻⁵	0.9816
11	3.0	3.0	-	30.0	-	-	64.0	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	1.79×10 ⁻⁵	0.9786
12	3.5	2.0	-	29.5	-	65.0	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	7.36×10 ⁻⁶	0.9792
13	6.5	1.5	-	30.0	62.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	5.01×10 ⁻⁶	0.9982
14	7.0	2.0	-	29.0	62.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	7.48×10 ⁻⁶	0.9986
15	6.0	-	2.0	32.0	60.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	9.75×10 ⁻⁷	0.9990
16	8.0	3.0	-	28.0	61.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	6.60×10 ⁻⁶	0.9987
17	6.5	-	1.5	30.5	-	-	61.5	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	9.77×10 ⁻⁶	0.9787
18	10.0	2.0	-	30.0	58.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	6.91×10 ⁻⁶	0.9941
19	7.0	3.0	-	32.0	58.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	1.74×10 ⁻⁶	0.9984
20	6.0	3.0	-	33.0	58.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁵	4.78×10 ⁻⁶	0.9987
21	7.0	-	2.0	32.0	59.0	-	-	-	1.0×10 ⁻¹ – 1.0×10 ⁻⁶	2.82×10 ⁻⁶	0.9918

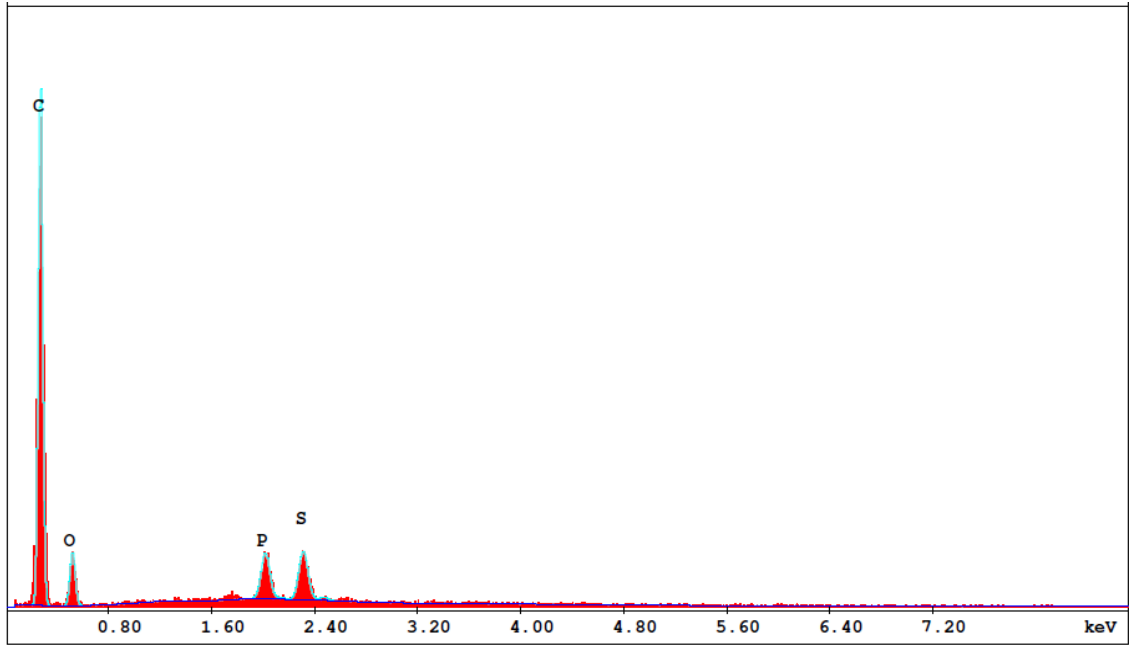
4.1. Optimum Membran Bileşenine Sahip Elektrot'un Yüzey Analizi

PVC membran yapıda hazırlanan bir biyosensörün en önemli özelliklerinden biri hazırlanan membran yapının pürüzsüz mikro özellikte olmasıdır. Geliştirilen valproat–

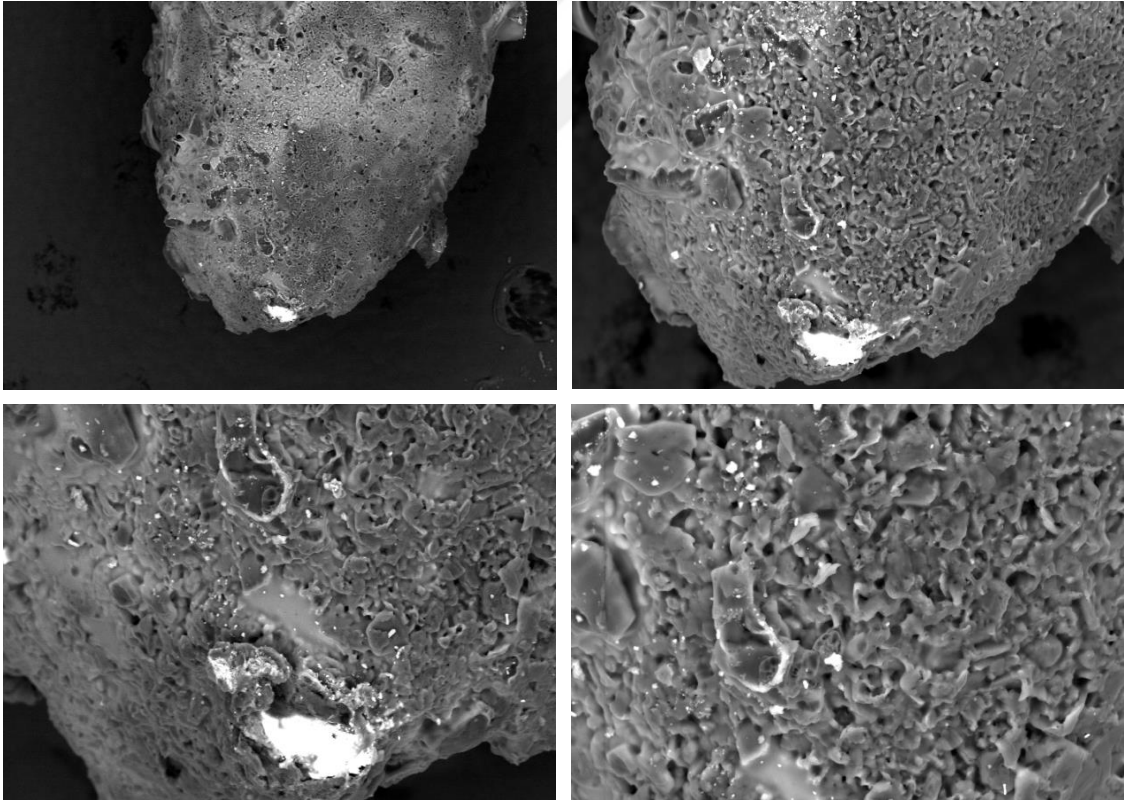
seçici biyosensörün yüzey karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniğı kullanılarak incelendi. Hazırlanan elektrotların yüzeylerinden farklı büyütmelerde görüntüler alındı. Şekil 4.1 tümüyle katı–hal kontak yapının yüzeyinden elde edilen SEM görüntülerini, Şekil 4.2 ise katı–hal kontak yapının EDX analizini göstermektedir. Şekil 4.2 değerlendirildiğinde, tamamen katı–hal kontak yapıda yalnızca karbon ve oksijen atomlarının yer aldığını görölmektedir. Şekil 4.3 ise PVC membran yapısının yüzey görüntülerini, Şekil 4.4 EDX analizini göstermektedir. Şekil 4.3’deki SEM görüntüleri hazırlanan PVC membran yapının yüksek oranda gözenekli polimer matris ve fiziksel olarak sıkı bir yapı sergilediğini göstermektedir. Ayrıca, Şekil 4.4’deki EDX analizinde görölen klor atomlarının membran yapısında yer alan PVC’den geldiğı açıkça görölmektedir.



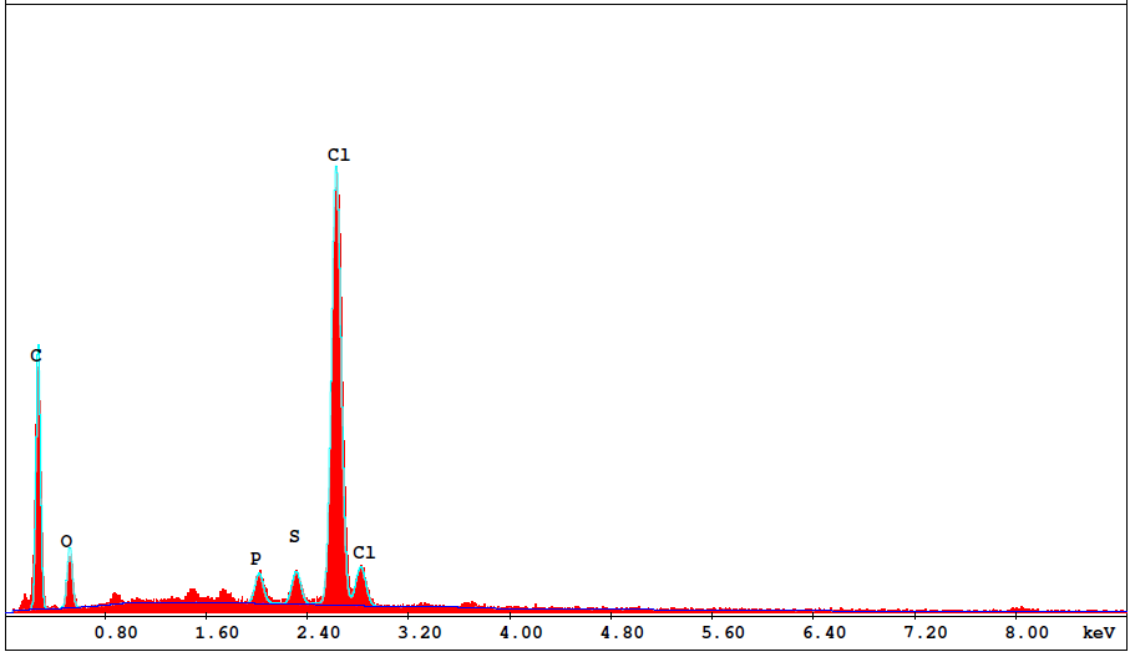
Şekil 4.1. Tümüyle katı–hal kontak elektrodun SEM görüntüleri



Şekil 4.2. Tümüyle katı-hal kontak elektrodun EDX analizi



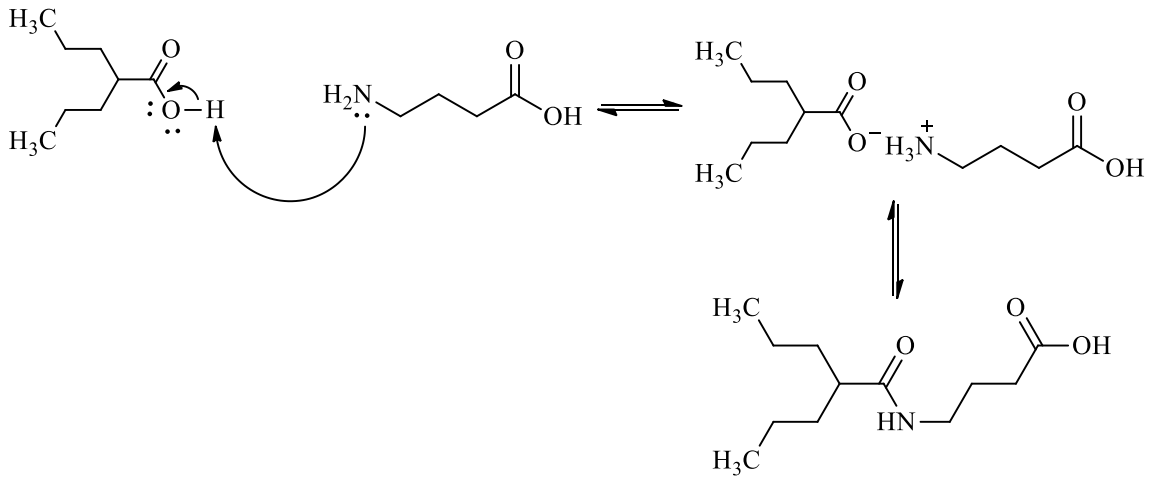
Şekil 4.3. PVC membran biyosensörün yüzey SEM görüntüleri



Şekil 4.4. PVC membran biyosensörün EDX analizi

4.2. Valproik Asit ile GABA'nın Etkileşim Mekanizması

Valproik asit ile GABA'nın etkileşim mekanizması aşağıdaki (Şekil 4.5) gibi önerilmektedir.



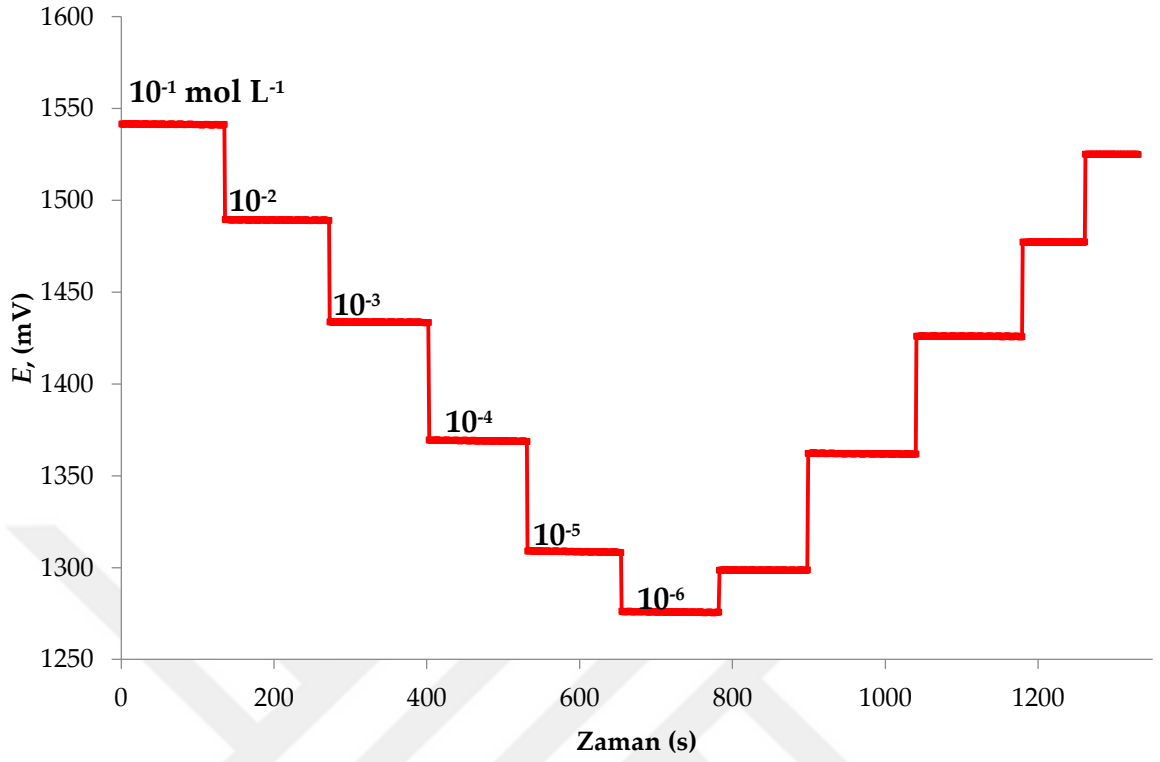
Şekil 4.5. Valproik asit ile GABA'nın etkileşim mekanizması

Şekil 4.5'de önerilen etkileşim mekanizması incelendiğinde, mekanizmanın birinci basamağında, valproik asidin karboksilik asit ucu ile GABA'nın birincil amin ucu reaksiyona girerek bir amonyum tuzu oluşturmaktadır. Ardından ortamdan bir su çıkışı

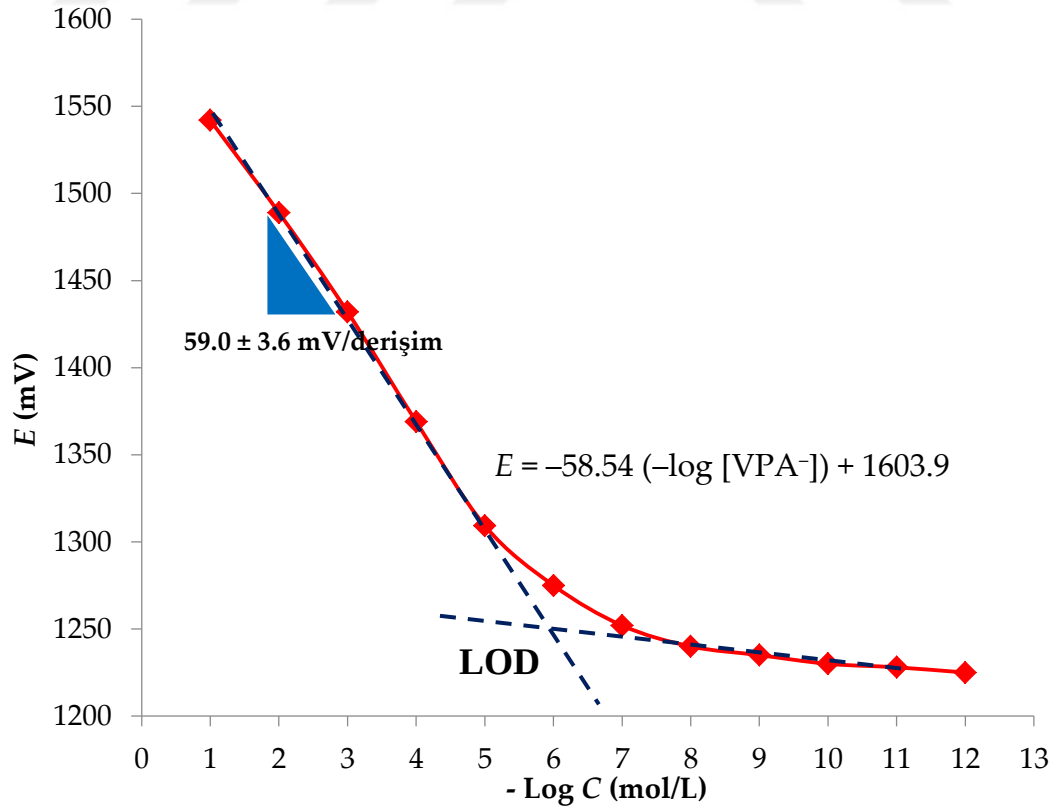
ile amid türevi bir molekül elde edilmektedir. Valproik asit ile GABA'nın bu etkileşim mekanizmasından yola çıkılarak GABA'nın valproat biyosensörünün membran yapısında biyoaktif bileşen olarak kullanılabileceği düşünüldü. Bu tez çalışması bu prensip üzerine kurularak gerçekleştirildi.

4.3. Valproat–seçici Biyosensörlerin Potansiyometrik Davranışları

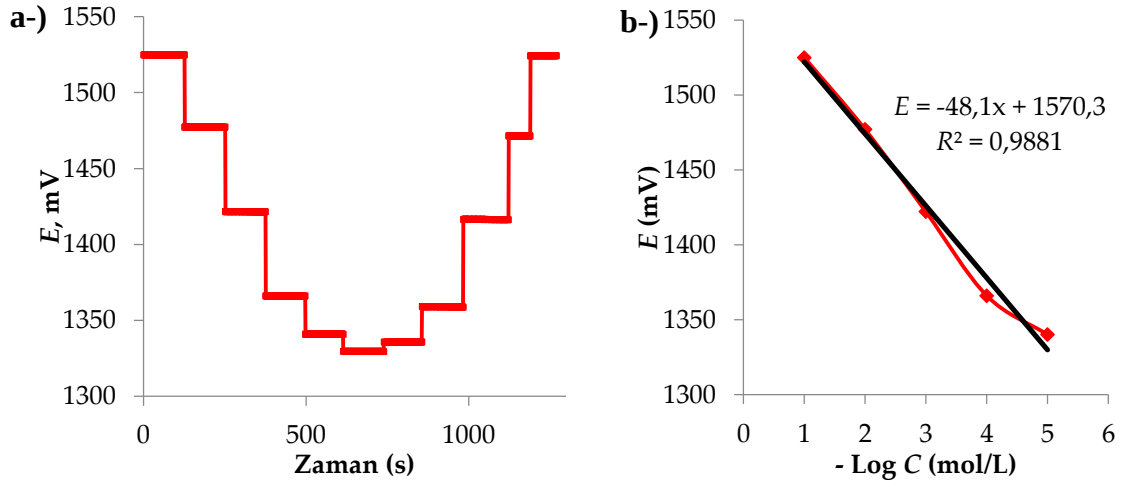
Hazırlanan tümüyle katı–hal valproat–seçici biyosensörlerin potansiyometrik özellikleri araştırıldı. Valproat konsantrasyonunun değişimine karşı ölçülen potansiyel değişimlerini incelendiğinde Membran–15 bileşimine sahip biyosensörün hazırlanan diğer biyosensörlere göre hem belirleme katsayısı (R^2) hemde tayin limiti değerlerine göre daha iyi bir değişim sergilediği açıkça görülmektedir. Çalışmamızın devam eden tüm aşamalarında membran–15 bileşimine sahip biyosensör kullanılarak potansiyometrik ölçümler alındı. Optimum membran bileşimi belirlenen valproat–seçici biyosensör ile derişimi $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ arasında değişen standart valproat çözeltileri kullanılarak kalibrasyon çalışması yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak potansiyel (mV) – zaman (s) grafiği oluşturuldu. Oluşturulan bu grafikten yararlanarak valproat–seçici biyosensörün doğrusal çalışma aralığı ve tayin limiti gibi önemli potansiyometrik performans özellikleri test edildi. Valproat–seçici biyosensörün tayin limiti, grafikteki iki doğrusal bölgenin ekstrapolasyonlarının kesiştiği noktaya karşılık gelen potansiyel değerin doğru denkleminde yerine yazılması ile hesaplandı. Belirlenen doğrusal çalışma aralığında doğru denklemi, $E = -58.54 (-\log[VPA^-]) + 1603.9$ ve R^2 değeri ise 0.9990 olarak elde edildi. Yapılan çalışmalar sonucunda biyosensörün $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ arasında her on katlık derişim değişiminde 59.0 ± 3.6 mV/luk Nernst davranış sergilediği ve tayin limitinin 9.75×10^{-7} mol L⁻¹ olduğu belirlendi. Şekil 4.6'da valproat–seçici biyosensörün $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ konsantrasyon aralığındaki potansiyometrik davranışı, Şekil 4.7 ise, kalibrasyon eğrisini göstermektedir. Çizelge 4.1'deki farklı kompozisyonlarda hazırlanan valproat–seçici diğer biyosensörlerin $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ valproat konsantrasyon değişimine karşı potansiyometrik davranışları Şekil 4.8–4.27'de görülmektedir.



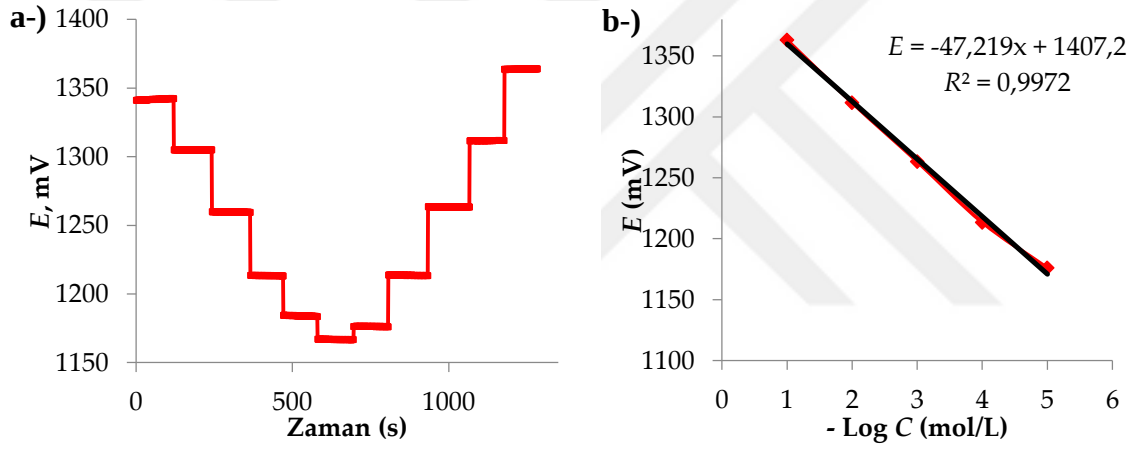
Şekil 4.6. Optimum membran bileşimine sahip biyosensörün potansiyometrik davranışı



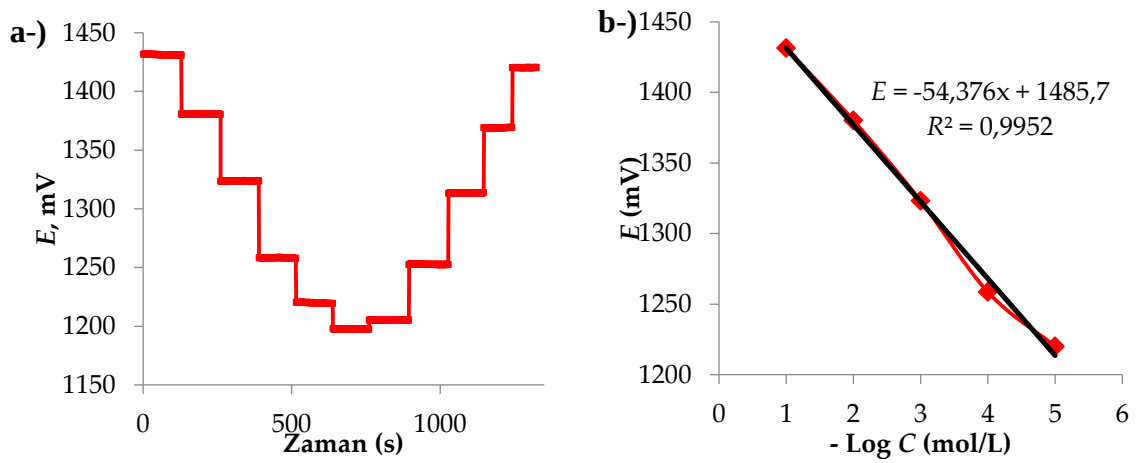
Şekil 4.7. Valproat-seçici biyosensörün kalibrasyon grafiğı



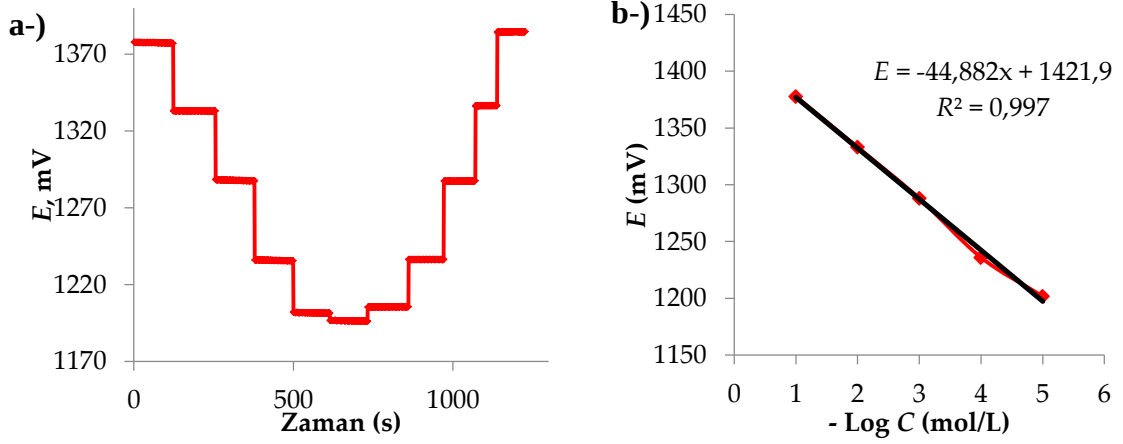
Şekil 4.8. Membran-1 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



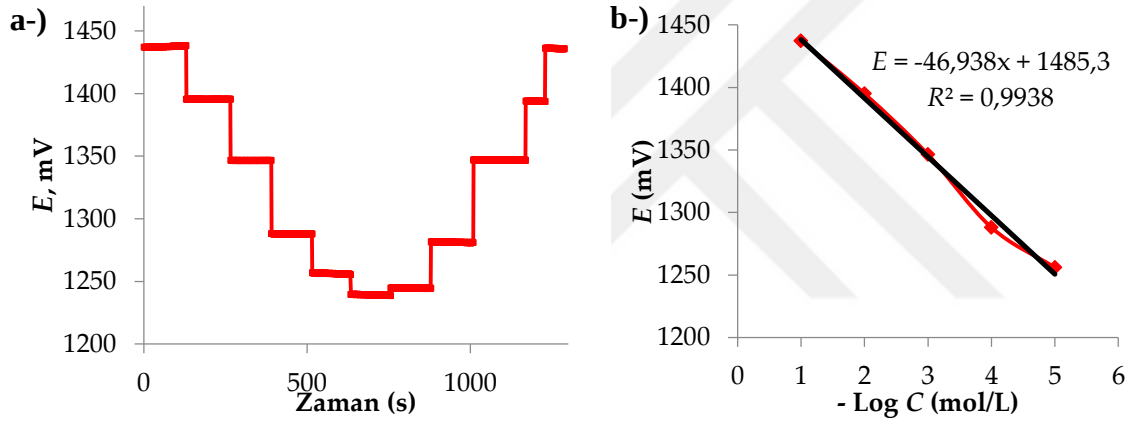
Şekil 4.9. Membran-2 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



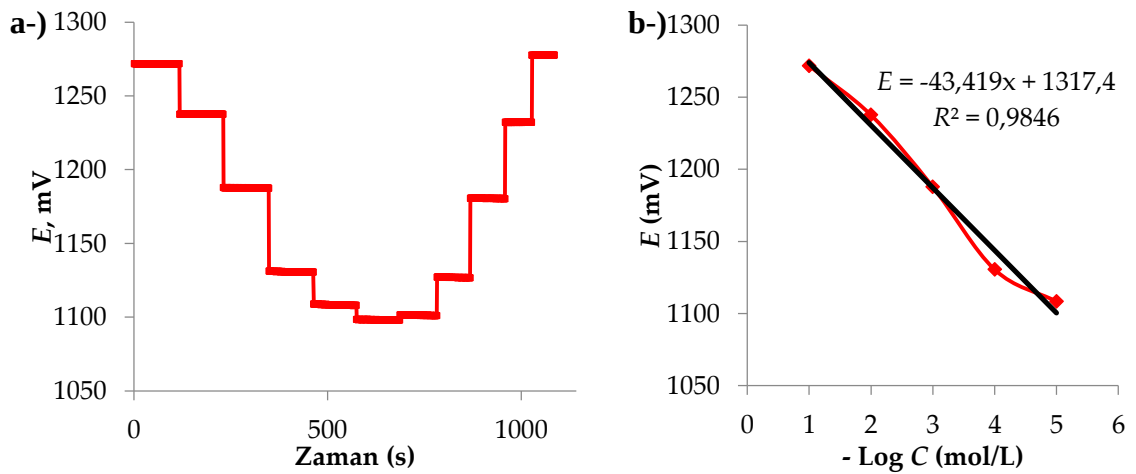
Şekil 4.10. Membran-3 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



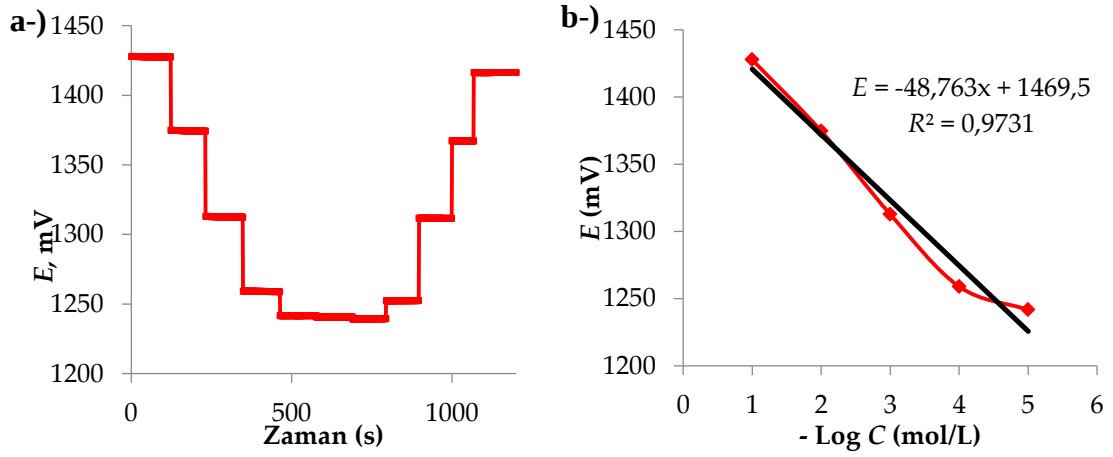
Şekil 4.11. Membran-4 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



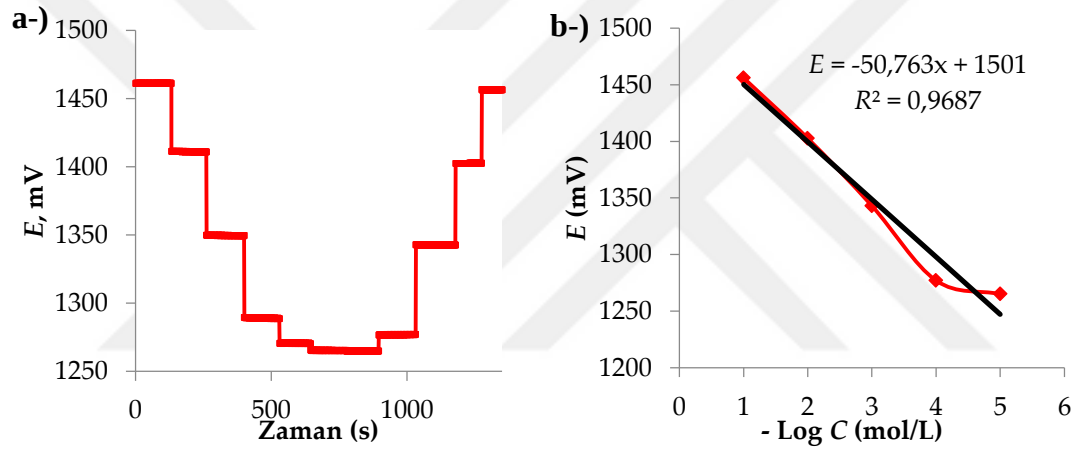
Şekil 4.12. Membran-5 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



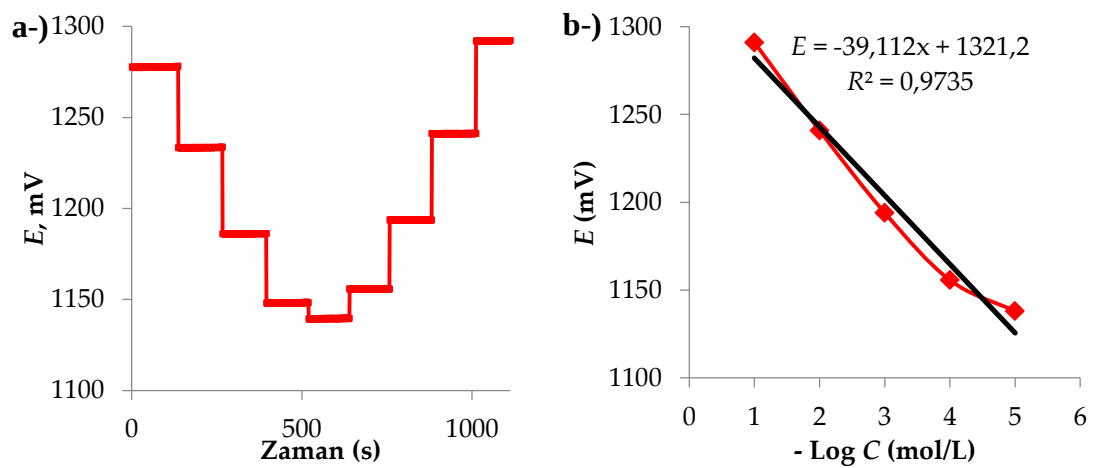
Şekil 4.13. Membran-6 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



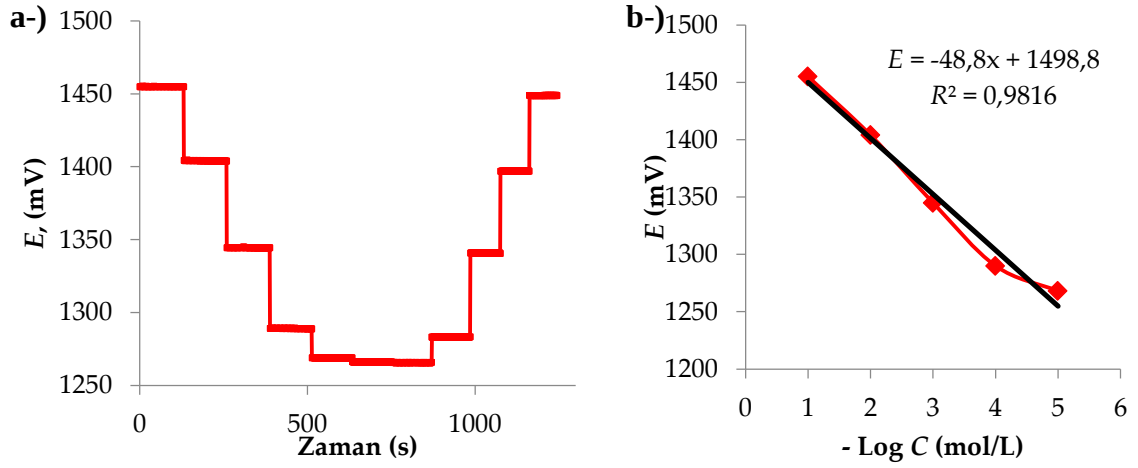
Şekil 4.14. Membran-7 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



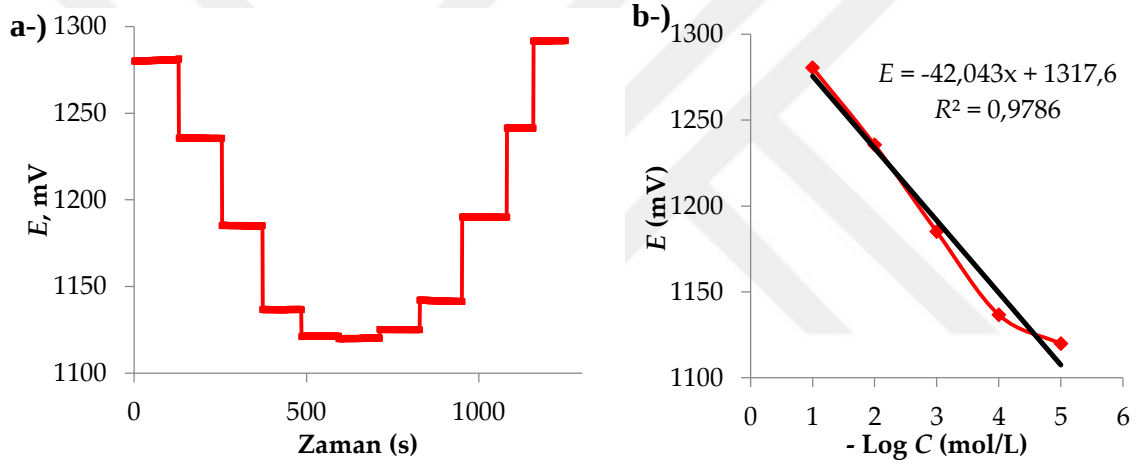
Şekil 4.15. Membran-8 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



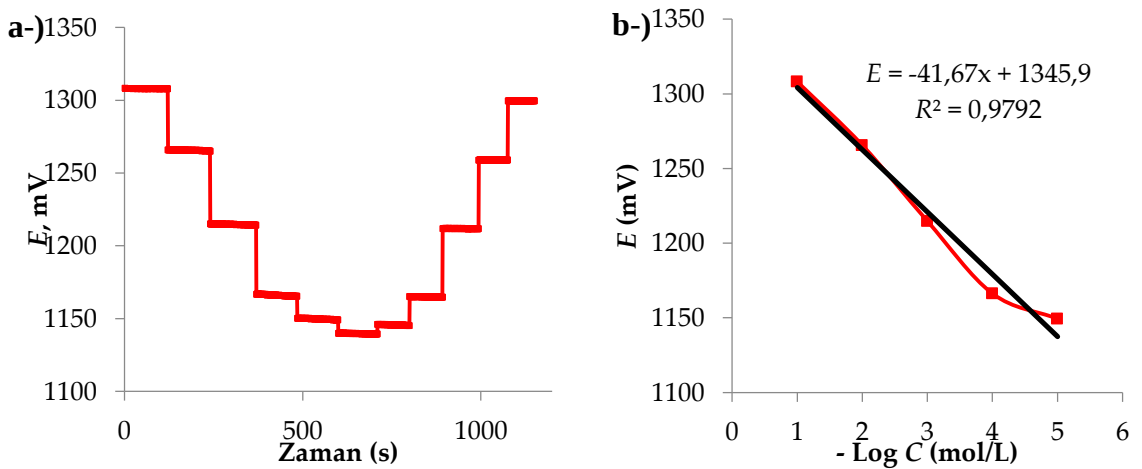
Şekil 4.16. Membran-9 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



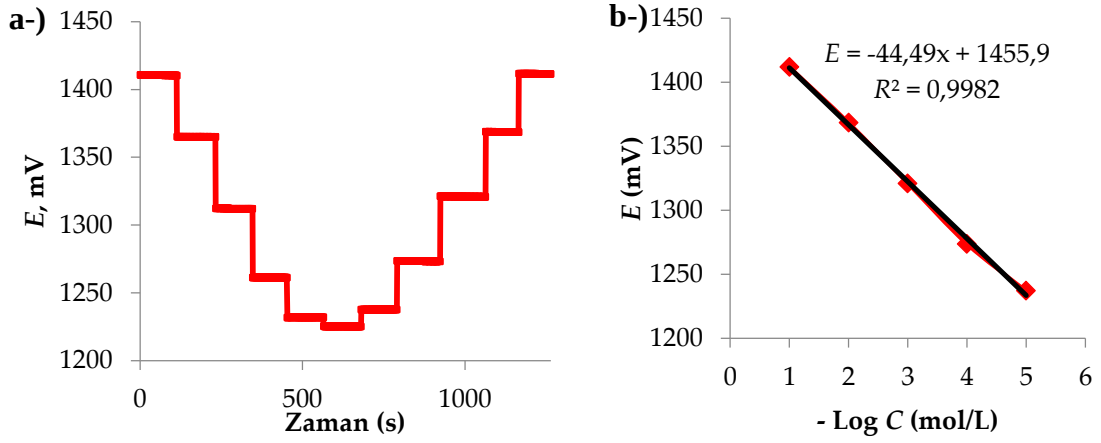
Şekil 4.17. Membran-10 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



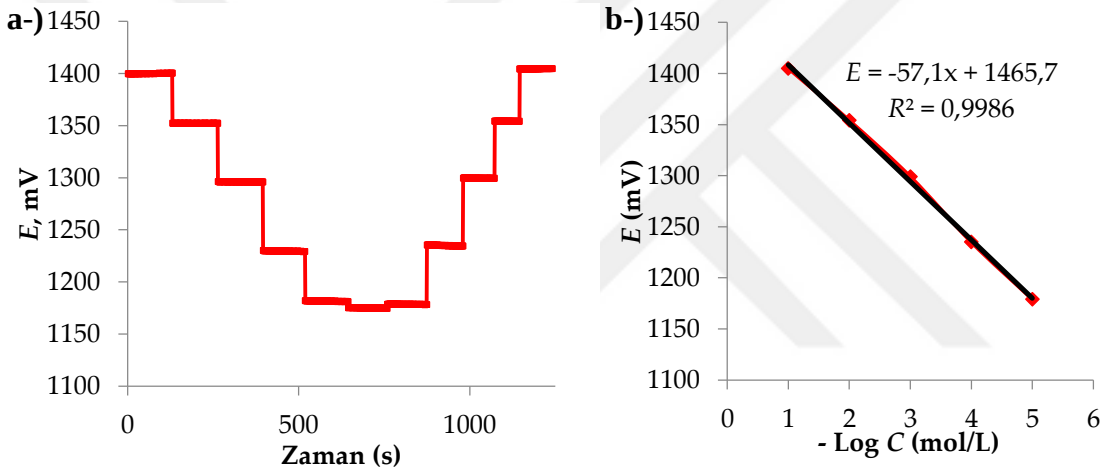
Şekil 4.18. Membran-11 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



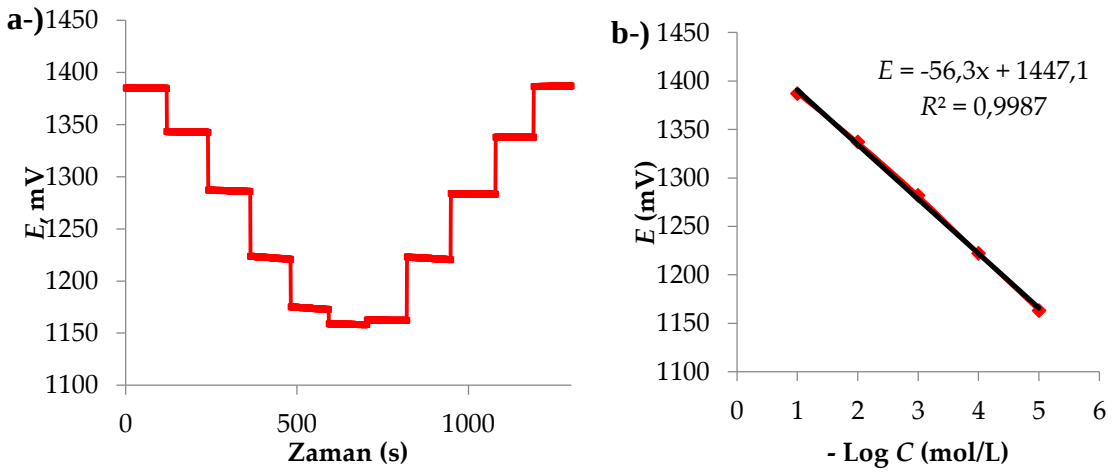
Şekil 4.19. Membran-12 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



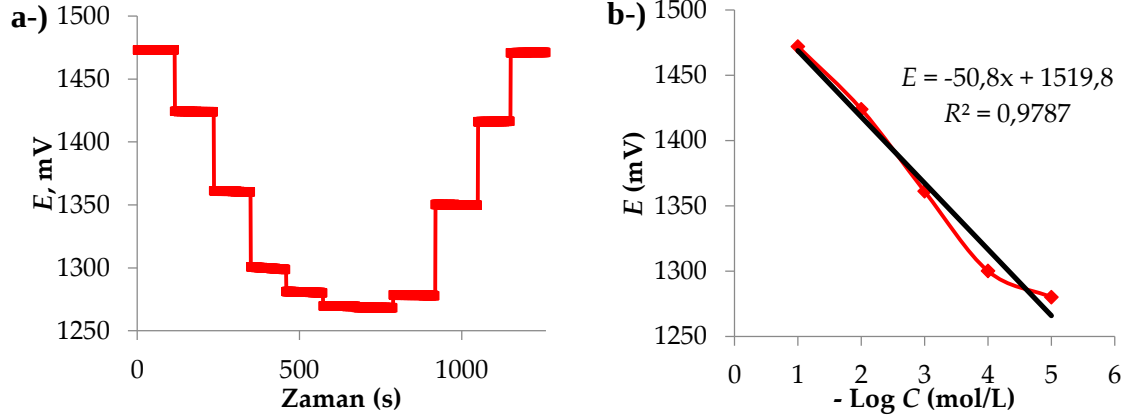
Şekil 4.20. Membran-13 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



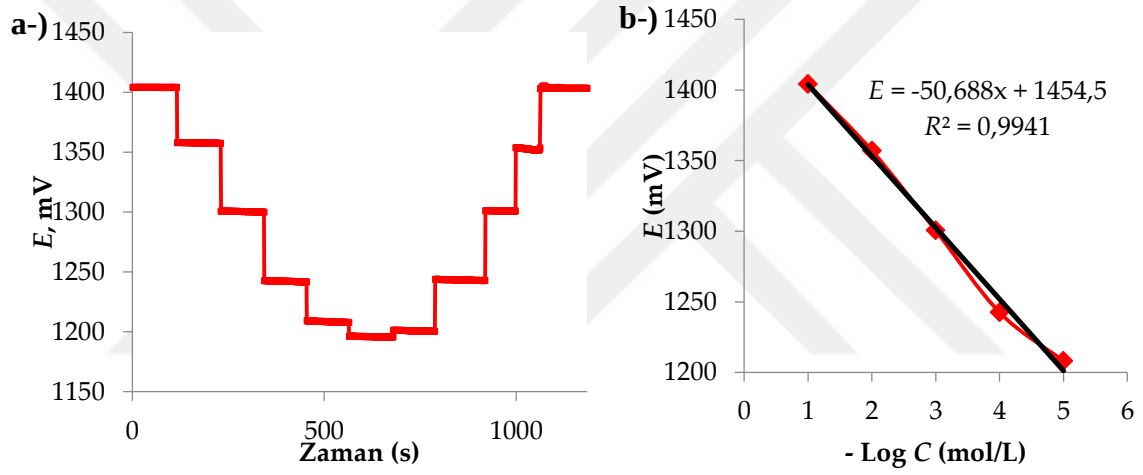
Şekil 4.21. Membran-14 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



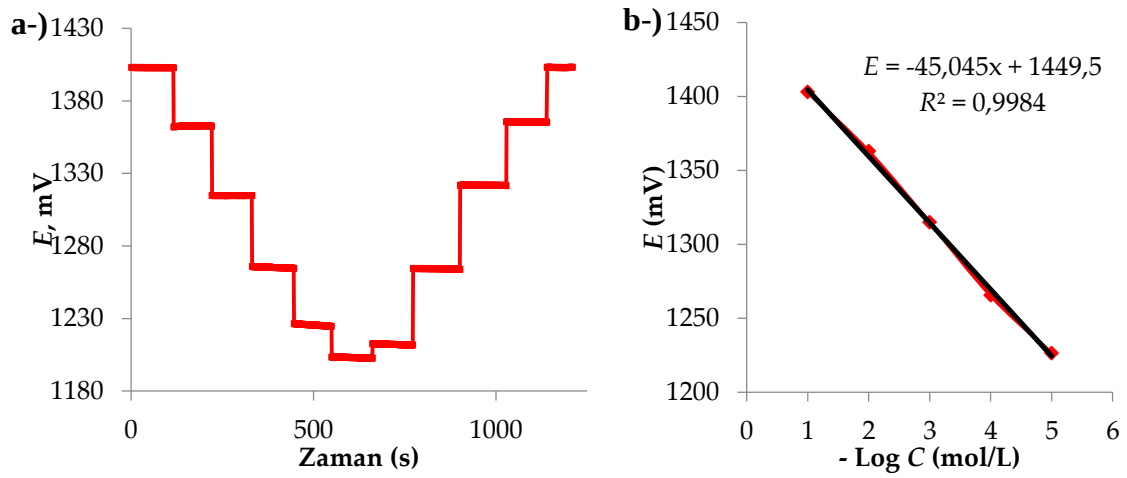
Şekil 4.22. Membran-16 bileşimine sahip biyosensörün potansiyometrik davranışı ve kalibrasyon eğrisi



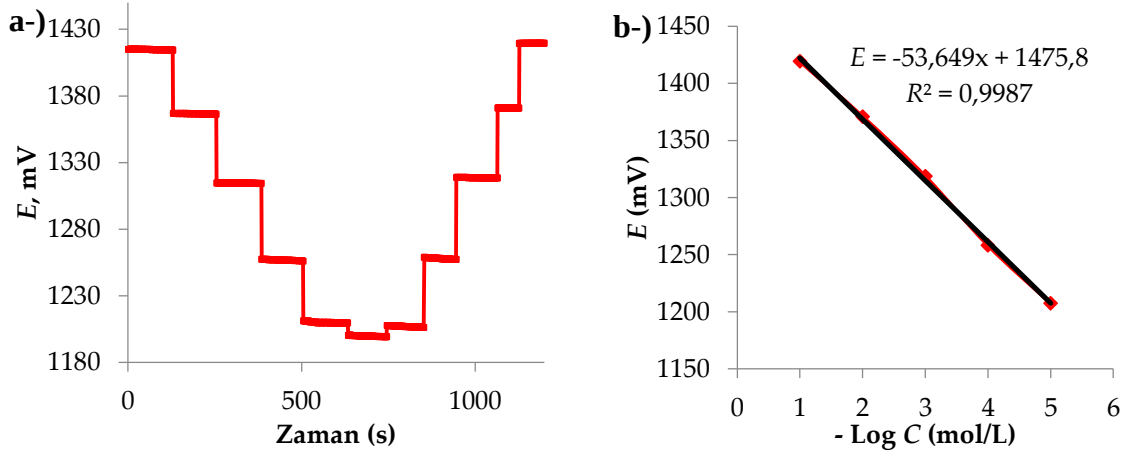
Şekil 4.23. Membran-17 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



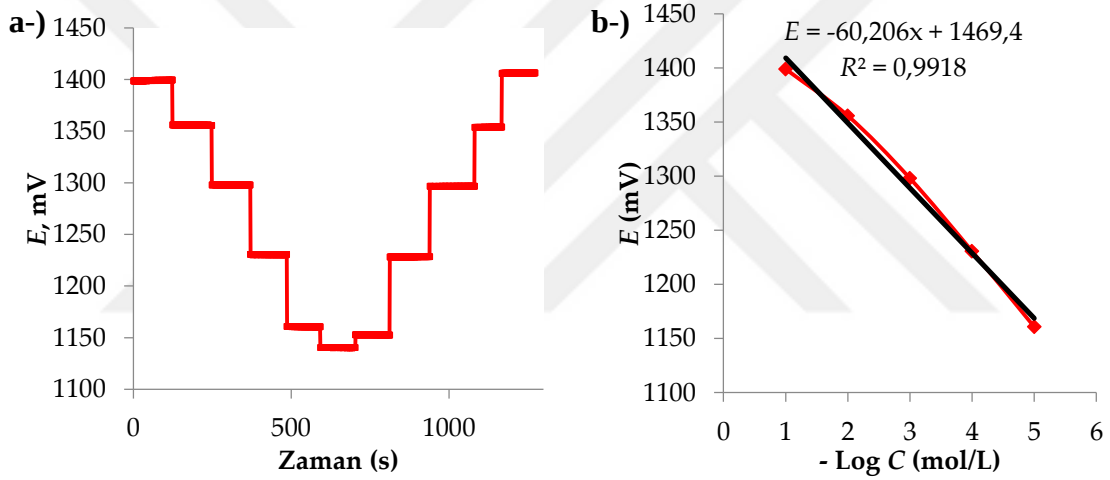
Şekil 4.24. Membran-18 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.25. Membran-19 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.26. Membran-20 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.27. Membran-21 bileşimine sahip biyosensörün a-) potansiyometrik davranışı b-) kalibrasyon eğrisi

4.4. Valproat-seçici Biyosensörün Seçiciliği

Doğrusal çalışma aralığı ve tayin limiti belirlenen optimum bileşenlere sahip valproat-seçici biyosensörün kanda girişim yapabilecek iyonlar ve farklı epilepsi ilaçları kullanılarak potansiyometrik seçicilik çalışmaları gerçekleştirildi. Belirtilen iyonlar ve epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçların seçicilik çalışması için $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} derişim aralığındaki çözeltileri kullanıldı. Elde edilen potansiyel-zaman(s) grafiği Şekil 4.28'deki gibidir. Biyosensörün seçicilik katsayılarının belirlenmesinde ise, literatürde en fazla tercih edilen hesaplama yöntemlerinden biri olan ayrı çözelti yöntemi (Buck ve Lindner, 1994) kullanıldı. Ölçümlerden elde edilen veriler ile her

iyonun 1.0×10^{-2} mol L⁻¹ derişimindeki potansiyel değeri aŗağıdaki eşitlikte yerine yazılarak seçicilik katsayıları ($K_{A,B}^{pot}$) hesaplandı.

$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A)Z_A F}{RT \ln 10} + (1 - \frac{Z_A}{Z_B}) \log a_A$$

a_A = Valproat iyonunun aktivitesi

a_B = Girişim yapan türün aktivitesi

z_A = Valproat iyonunun yükü

z_B = Girişim yapan türün yükü

$K_{A,B}^{pot}$ = Seçicilik katsayısı

F = Faraday sabiti

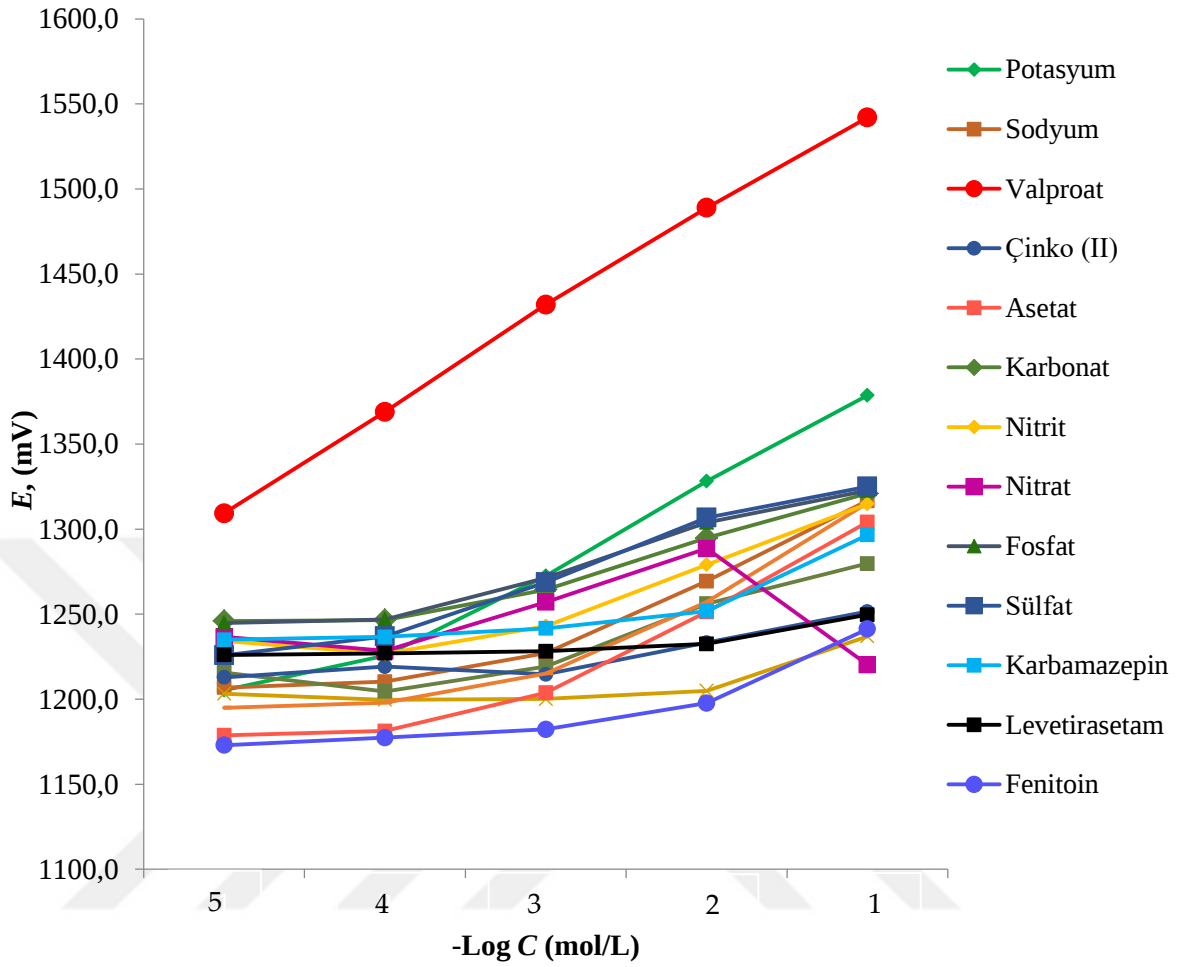
R = İdeal Gaz Sabiti

T = Mutlak sıcaklık (K)

Elde edilen seçicilik katsayıları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Şekil 4.28 ve Çizelge 4.2 değerlendirildiğinde valproat–seçici biyosensörün kanda girişim yapabilecek diğer iyonlara ve farklı epilepsi ilaçlarına göre valproat iyonuna seçici davrandığı açıkça görölmektedir.

Çizelge 4.2. Valproat–seçici biyosensörün seçicilik katsayıları

Girişim Yapan Tür	Seçicilik Katsayısı, $\log K_{VPA, j}^{pot}$	Girişim Yapan Tür	Seçicilik Katsayısı, $\log K_{VPA, j}^{pot}$
K ⁺	–2.72	Ca ²⁺	–3.94
SO ₄ ²⁻	–3.08	Karbamazepin	–4.01
PO ₄ ³⁻	–3.13	CH ₃ COO ⁻	–4.02
CO ₃ ²⁻	–3.28	Zn ²⁺	–4.32
NO ₃ ⁻	–3.39	Levetirasetam	–4.34
NO ₂ ⁻	–3.55	Mg ²⁺	–4.80
Na ⁺	–3.57	Fenitoin	–4.93
Cl ⁻	–3.92		



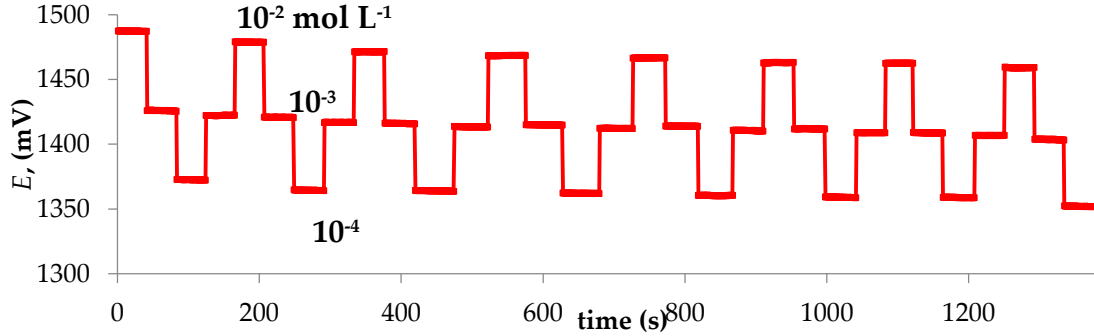
Şekil 4.28. Valproat–seçici biyosensörün seçiciliği

Çizelge 4.2 incelendiğinde geliştirilen biyosensörün potansiyometrik davranışına -2.72 değeri ile potasyum iyonlarının en yüksek girişi yapıldığı görülmektedir. Şekil 4.28 ve Çizelge 4.2’deki verilere göre valproat–seçici biyosensörün en çok girişim yapan potasyum iyonlarının varlığında dahi valproat iyonlarına karşı oldukça seçici davranış sergilediği açıkça görülmektedir.

4.5. Valproat–seçici Biyosensörün Tekrarlanabilirliği

Valproat–seçici biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışması 1.0×10^{-2} , 1.0×10^{-3} ve 1.0×10^{-4} mol L⁻¹ standart valproat çözeltileri kullanılarak gerçekleştirildi. Tekrarlanabilirlik çalışması için standart valproat çözeltileri yeniden hazırlanarak kullanıldı. Tekrarlanabilirlik ölçümleri oda sıcaklığında, her ölçüm sonrası biyosensörler

temizlenerek yapıldı. Elde edilen veriler ile potansiyel–zaman grafiği oluşturuldu. Valproat–seçici biyosensörün tekrarlanabilirlik grafiği Şekil 4.29’da görülmektedir.



Şekil 4.29. Valproat–seçici biyosensörün tekrarlanabilirliği

Çizelge 4.3. Valproat–seçici biyosensörün tekrarlanabilirliğini gösteren ortalama ve standart sapma değerleri

VPA (mol L ⁻¹)	Ölçümler					$\bar{X} \pm S^*$
	1	2	3	4	5	
1.0×10^{-2}	1468	1467	1463	1463	1460	1464.2 ± 2.95
1.0×10^{-3}	1413	1412	1410	1409	1407	1410.6 ± 1.62
1.0×10^{-4}	1363	1362	1361	1360	1359	1361.0 ± 1.41

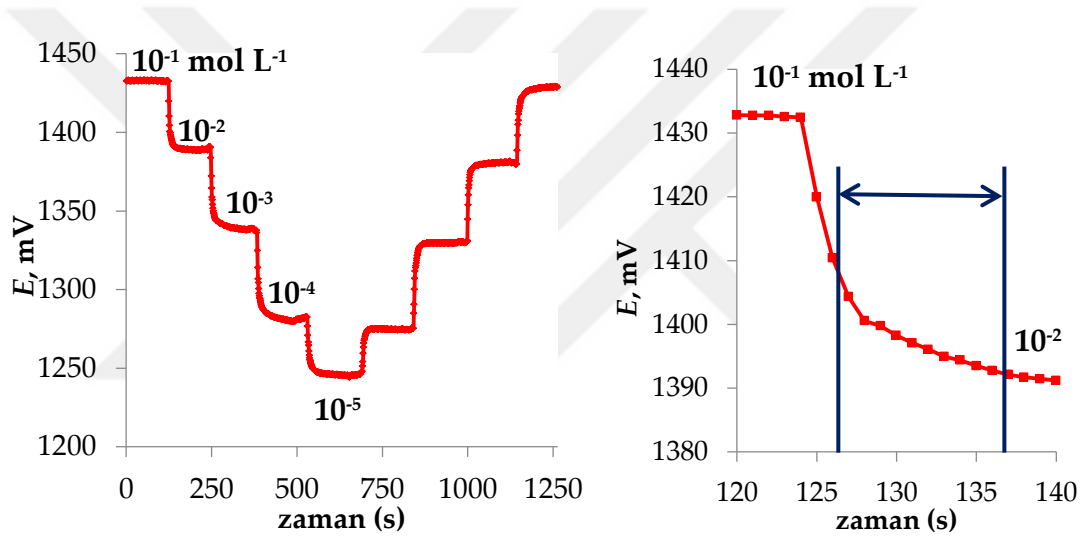
*Ortalama ve standart sapma değerleri belirli bir aralıkta n = 5 için verilmiştir.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen verilerle, ortalama standart sapma değerleri hesaplanarak Çizelge 4.3’de sunulmuştur. Şekil 4.29 ve Çizelge 4.3’de verilen değerler incelendiğinde düşük derişimlerde yüksek derişimlere göre tekrarlanabilirlik standart sapma değerlerinin daha az olduğu görülmektedir. Genel olarak, elde edilen veriler valproat–seçici biyosensörün yüksek tekrarlanabilirlikte potansiyometrik davranış sergilediğini göstermektedir.

4.6. Valproat–seçici Biyosensörün Cevap Zamanı

IUPAC, potansiyometri temelli çalışmalar için cevap zamanını, elektrodun her on katlık derişim değışiminde bir çözeltiden diğeri bir çözeltiliye daldırıldığında denge

potansiyelinin %95'inin oluşması için geçen süre olarak tanımlamaktadır (IUPAC, 1994). Çalışmamızda valproat–seçici biyosensörün cevap zamanını belirleyebilmek için $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ aralığındaki standart valproat çözeltileri kullanıldı. Böylece, bu derişim aralıklarında bir çözeltiden diğer çözeltiye daldırılan biyosensörün denge potansiyelinin oluşması için geçen süre incelendi. Elde edilen veriler ile Şekil 4.30'daki potansiyel–zaman grafiğı oluşturuldu. Şekil 4.30'da valproat–seçici biyosensörün her on katlık derişim değışiminde çok hızlı bir şekilde dengeye ulaştığı ve bir çözeltiden diğer çözeltiye geğış esnasında denge potansiyelinin oluşması için geçen sürenin 10 saniyeden daha az olduğı görölmektedir.

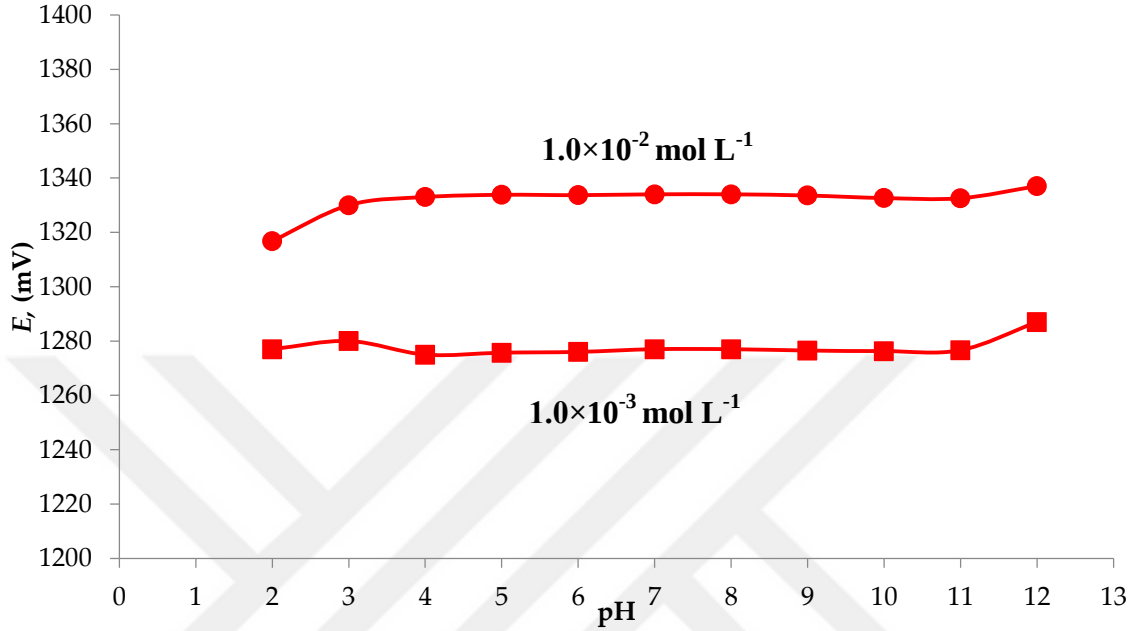


Şekil 4.30. Valproat–seçici biyosensörün cevap zamanı

4.7. Valproat–seçici Biyosensörün pH Çalışma Aralığı

pH çalışmaları 1.0×10^{-2} mol L⁻¹, 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ HNO₃ ve 1.0×10^{-2} mol L⁻¹, 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ NaOH çözeltileri hazırlanarak gerçekleştirildi. Çözeltiler pH 2.0–7.0 aralığı HNO₃ ile pH 8.0–12.0 aralığı NaOH kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler üzerine 1.0×10^{-2} mol L⁻¹ valproat çözeltisi eklendi. pH 2.0–12.0 aralığında iki farklı derişim için potansiyel değışimler incelendi. Elde edilen veriler ile potansiyel–pH grafiğı oluşturularak biyosensörün pH çalışma aralığı belirlendi. Biyosensörün pH çalışma aralığı Şekil 4.31'de görölmektedir. Şekil 4.31'e göre valproat–seçici

biyosensör her iki derişim değeri için uyumlu olup oldukça geniş bir pH (4.0–11.0) aralığında pH değışimlerinden etkilenmeden çalışmaktadır.



Şekil 4.31. Valproat–seçici biyosensörün pH çalışma aralığı

4.8. Valproat–Seçici Biyosensör’ün Analitik Uygulamaları

4.8.1. Valproat–seçici biyosensör ile kan örneklerinde valproik asit tayini

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesinden 20 farklı hastaya ait kan örneklerinde valproik asit tayini standart ekleme yöntemine göre gerçekleştirildi. İçerisinde valproat bulunmayan kan örneklerine 1.0×10^{-2} ve $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ valproat çözeltileri ilave edildi. $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ valproat çözeltileri kullanılarak potansiyometrik ölçüm alındı ve bu derişim aralığında kalibrasyon grafiğı çizilerek, doğru denklemi oluşturuldu. Daha sonra valproat ilavesi yapılmış her bir numunenin potansiyel değeri ölçüldü. Elde edilen veriler kalibrasyon grafiğı yardımıyla oluşturulan doğru denkleminde yerine yazılarak her bir numunenin içerdığı valproat miktarı hesaplandı. Elde edilen veriler ve yüzde geri kazanım değeri Çizelge 4.4’de görülmektedir.

Çizelge 4.4. Kan örneklerinde valproik asit tayini

Kan Örnek No	Eklenen valproat (mol L ⁻¹)	Biyosensör ile okunan (mol L ⁻¹) (± SD)	% Geri Kazanım
1	1.0×10 ⁻²	0.992 (±0.429)×10 ⁻³	99.2
2	1.0×10 ⁻²	0.999 (±0.286)×10 ⁻³	99.9
3	1.0×10 ⁻²	0.955 (±0.261)×10 ⁻³	95.5
4	1.0×10 ⁻²	0.989 (±0.353)×10 ⁻³	98.9
5	1.0×10 ⁻²	0.995 (±0.721)×10 ⁻³	99.5
6	1.0×10 ⁻²	0.982 (±0.423)×10 ⁻³	98.2
7	1.0×10 ⁻²	0.978 (±0.878)×10 ⁻³	97.8
8	1.0×10 ⁻²	0.975 (±0.360)×10 ⁻³	97.5
9	1.0×10 ⁻³	0.955 (±0.266)×10 ⁻⁴	95.5
10	1.0×10 ⁻³	0.912 (±0.289)×10 ⁻⁴	91.2
11	1.0×10 ⁻³	0.902 (±0.276)×10 ⁻⁴	90.2
12	1.0×10 ⁻³	0.904 (±0.447)×10 ⁻⁴	90.4
13	1.0×10 ⁻³	0.909 (±0.199)×10 ⁻⁴	90.9
14	1.0×10 ⁻³	0.906 (±0.180)×10 ⁻⁴	90.6
15	1.0×10 ⁻³	0.904 (±0.174)×10 ⁻⁴	90.4
16	1.0×10 ⁻³	0.923 (±0.223)×10 ⁻⁴	92.3
17	1.0×10 ⁻³	0.953 (±0.380)×10 ⁻⁴	95.3
18	1.0×10 ⁻³	0.903 (±0.139)×10 ⁻⁴	90.3
19	1.0×10 ⁻³	0.900 (±0.334)×10 ⁻⁴	90.0
20	1.0×10 ⁻³	0.922 (±0.456)×10 ⁻⁴	92.2

* Üç ayrı deneysel ölçüm için ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir (n = 3)

Kandaki valproik asidin terapötik konsantrasyon aralığı 50–100 µg/mL'dir. Geliştirilen valproat-seçici biyosensör, 1.0×10⁻⁶ – 1.0×10⁻¹ mol L⁻¹'lik geniş bir konsantrasyon aralığı ve 9.75×10⁻⁷ mol L⁻¹'lik tayin limiti sergilemektedir. Molar konsantrasyon birimi µg/mL (ppm) konsantrasyon birimine dönüştürülürse tayin limitinin 0.162 µg/mL olduğu görülmektedir. Bu sonuç, geliştirilen valproat-seçici biyosensörün kanda bulunan çok küçük konsantrasyonlardaki valproik asidi bile tayin edebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.4'deki standart olarak eklenen iki konsantrasyon (1.0×10^{-2} ve 1.0×10^{-3} mol L⁻¹) değeri incelendiğinde, 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ konsantrasyon değerinde geri kazanım yüzdelerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun nedeni, valproik asidin kandaki plazma proteinlerine oldukça güçlü bağlanması nedeniyle olabilir. Bunun anlamı, daha yüksek valproik asit konsantrasyonlarında valproik asitin kandaki plazma proteinlerine daha güçlü bağlanmasıdır. Dolayısıyla konsantrasyondaki bu 10 katlık düşüş nedeniyle geri kazanım değerlerinde küçük kayıpların meydana geldiği görülmektedir. Sonuç olarak çalışılan 20 farklı kan örneğinde geri kazanım oranlarının yüzde 90'ın üzerinde olduğu görülmektedir. Bu verilerden yola çıkarak geliştirilen valproat-seçici biyosensörün insan kan örneklerinde valproik asit tayinini başarıyla gerçekleştirebildiği açıkça görülmektedir.

4.8.2. Valproat-seçici biyosensör ile epilepsi hastalarının kan örneklerinde valproik asit tayini

Epilepsi tedavisinde sodyum valproat kullanan 7 farklı epilepsi hastasının kan örneklerini ve analizör kullanılarak elde edilen test sonuçları hastane laboratuvarından temin edildi. Geliştirdiğimiz biyosensör ile bu kan örneklerinde üç tekrarlı valproik asit tayini gerçekleştirildi ve sonuçları hastane verileri ile kıyaslandı. Elde edilen veriler kalibrasyon grafiği yardımıyla oluşturulan doğru denkleminde yerine yazılarak her bir numunenin içerdiği valproik asit miktarı hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'de görülmektedir.

Çizelge 4.5 Epilepsi hastalarının kan örneklerinde valproik asit tayini

Hasta No	Analizör (µg/mL)	Biyosensör ile okunan (µg/mL) (± SD)*
1	106.70	103.90 (0.705)
2	106.60	102.10 (0.642)
3	50.40	47.88 (0.963)
4	54.60	52.90 (0.828)
5	51.70	48.92 (0.916)
6	50.50	46.63 (0.907)
7	54.50	51.40 (0.816)

* Üç ayrı deneysel ölçüm için ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir (n = 3)

Çizelge 4.5 incelendiğinde tedavisinde sodyum valproat kullanan epilepsi hastalarının hastane ortamında analizör kullanılarak tayin edilen valproik asit düzeylerinin, çalışmamızda geliştirdiğimiz biyosensör ile belirlenen valproik asit düzeyleri ile uyumlu olduğu görülmektedir.

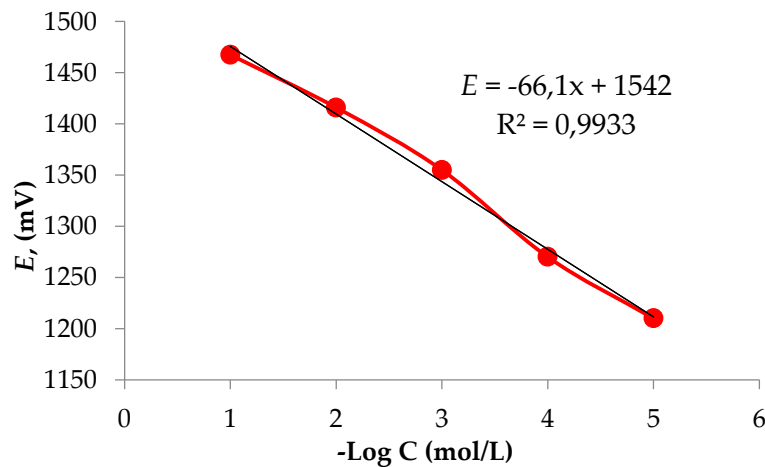
4.8.3. Valproat-seçici sensör ile ilaç örneğinde valproat tayini

Valproat-seçici biyosensörün farmasötik numunelerdeki kullanılabilirliği piyasada epilepsi ilacı olarak kullanılan sodyum valproat (depakin) tablet örneklerinde test edildi. İlaç örneğinin ölçüme hazır hale getirilmesinden sonra valproat-seçici biyosensör kullanılarak derişimi $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ arasında değişen standart valproat çözeltileri ile kalibrasyon yapıldı ve doğru denklemi elde edildi. Elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.32'deki gibidir. İlaç örneğinden doğrudan ölçüm alınarak ilaç numunesindeki valproat miktarı belirlendi. Elde edilen veriler ile ilaç örneğinde bulunan valproat miktarı kıyaslandı. Çizelge 4.6 geliştirilen biyosensör'ün ilaç numunelerinde valproat tayininde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.6. Valproat-seçici biyosensör ile ilaç örneğinde valproat tayini

İlaç	Teorik (mg)	Deneysel (mg)*	Geri Kazanım (%)
Depakin	333.0	322.7 (± 0.899)	96.91

* Üç ayrı deneysel ölçüm için ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir (n = 3)



Şekil 4.32. İlaç analizinde kullanılan kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

4.9. Karşılaştırma Çalışması

Geliştirdiğimiz valproat-seçici biyosensör, literatürde bulunan diğer potansiyometri temelli valproat-seçici sensör veya elektrotlar ile doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti, eğim, cevap zamanı ve gerçek örneklerdeki kullanılabilirliği açısından karşılaştırıldı (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Valproat-seçici biyosensörün literatürde bildirilen diğer potansiyometrik sensör veya elektrotlarla karşılaştırılması

Referans	Konsantrasyon Aralığı (mol L ⁻¹)	Tayin Limiti (mol L ⁻¹)	Eğim (mV/on katlık)	Cevap Zamanı (s)	Gerçek Numuneler
Sabah ve ark., 2006	4.0×10 ⁻⁵ – 4.0×10 ⁻²	1.0×10 ⁻⁵	-47.7	20	Farmasötik preparatlar
Suzuki ve ark., 1991	2.0×10 ⁻⁴ – 1.0×10 ⁻²	2.0×10 ⁻⁴	-58.26 ± 0.02	–	Farmasötik preparatlar
Katsu ve ark., 2000	5.0×10 ⁻⁵ – 1.0×10 ⁻²	2.0×10 ⁻⁵	-55.0	–	Serum Örnekleri
Santos ve ark., 2006	2.0×10 ⁻⁴ – 1.0×10 ⁻¹	1.0×10 ⁻⁴	-60.3 ± 1.0	10	Farmasötik preparatlar
Bu çalışma	1.0×10 ⁻⁶ – 1.0×10 ⁻¹	9.75×10 ⁻⁷	59.0 ± 3.6	< 10	Biyolojik ve farmasötik örnekler

Yeni geliştirilen valproat-seçici biyosensörün karşılaştırma yapılan tüm parametrelerde diğer potansiyometrik yöntemlere göre üstün olduğu kanıtlanmıştır. Literatürdeki potansiyometri temelli çalışmalar büyük oranda farmasötik preparatlarda uygulanmıştır. Bu çalışmada geliştirilen biyosensör ise, farmasötik preparatların yanı sıra insan kan örneklerinde valproik asit analizinde oldukça başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ayrıca, valproat-seçici biyosensörün hazırlanışı değerlendirildiğinde, literatürdeki diğer valproat-seçici sensörler veya elektrotlardan yapısındaki aktif bileşenin (GABA) farklılığı nedeniyle tamamen özgündür.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Epilepsi, bazı durumlarda ömür boyu anti-epileptik kullanımı gerektiren kronik bir hastalıktır. Bu nedenle kısa veya uzun süreli tedavi boyunca kullanılan ilacın yan etkileri de dikkate alınmalıdır. Epilepsi nöbetlerinin önlenmesinde kullanılan anti-epileptik ajanın etkinliği nöbetlerin önlenmesinde son derece önemlidir. Valproik asit dünya genelinde anti-epileptik olarak keşfedildiği günden itibaren oldukça sık reçete edilen bir anti-epileptik ilaçtır. Valproik asidin kandaki konsantrasyonu hastalarda meydana gelebilecek nöbetlerin kontrolü ve etkili tedavisi açısından son derece önem arz etmektedir. Bu nedenle de kandaki miktarının sürekli takibi gerekmektedir.

Bu çalışmada, insan kan örneklerinde valproik asit tayini için potansiyometri temelli tümüyle katı kontak PVC membran valproat-seçici biyosensör geliştirildi. Geliştirilen valproat-seçici biyosensör ile elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Geliştirilen valproat-seçici biyosensör PVC membran yapıdadır ve biyoaktif bileşen olarak valproik asidin etki mekanizmasında açıklanan ve beyinde bir nörotransmitter olan γ -aminobütirik asit kullanılmıştır. Dolayısıyla günümüze kadar geçen süreçte valproat tayini için önerilen çalışmalarda bu şekilde hazırlanan başka bir sensör veya elektrot literatürde mevcut değildir. Bu yönüyle hazırlanan PVC membran biyosensör bu çalışmanın özgünlüğünü arttırmaktadır.
- Geliştirilen PVC membran valproat-seçici biyosensör geniş bir konsantrasyon aralığında ($1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) çalışmakta, düşük bir tayin limiti ($9.75 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) ve Nernst ($59.0 \pm 3.6 \text{ mV/on katlık}$) davranış sergilemektedir. Bu sonuçlar literatürdeki potansiyometri temelli çalışmalar değerlendirildiğinde oldukça idealdir.
- Seçicilik çalışmalarında, valproat-seçici biyosensörün kanda bulunan çeşitli iyonlar ve piyasadaki mevcut anti-epileptiklere göre valproat iyonlarına karşı oldukça seçici olduğu gözlemlendi. Bu durum rutin analizlerde farklı iyon ve ilaç etken maddelerinin girişim yapamayacağını açıkça göstermektedir.

- Geliştirilen biyosensör; 10 saniyeden daha kısa cevap zamanına sahip olmasının yanı sıra, oldukça tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir. Yapılan pH çalışma aralığı testlerinde iki farklı derişim değeriinde ($1.0 \times 10^{-2} - 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) oldukça geniş bir aralıkta (4.0–11.0) pH değışimlerinden etkilenmeden çalışmaktadır. Bu durum biyosensörün asidik ve bazik ortamlarda çalışma şartlarını etkilemediğini göstermektedir.
- Geliştirilen biyosensör 20 farklı insan kan örneğinde standart ekleme metoduna göre valproik asit analizinde kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda %90 üzeri geri kazanım sağlanmıştır. Ayrıca, geliştirilen biyosensör tedavisinde sodyum valproat kullanan 7 farklı hastadan elde edilen kan örneklerinde de uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar ile hastanede analizör kullanılarak gerçekleştirilen valproik asit testlerin sonuçları kıyaslanmış ve birbirleriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu testler, valproat–seçici biyosensörün kanda valproik asit tayininde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Sonuçlar, geliştirilen biyosensörün belirli aralıklarla valproik asit testini gerçekleştiren analitik yöntemlere yeni bir alternatif olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.
- Ayrıca biyosensör piyasada mevcut ilacın tablet formunda da valproat analizinde uygulanmıştır. Geliştirilen biyosensörün ilaç içerik analizinde de oldukça yüksek bir geri kazanım ile valproat tayini sağlaması, bu biyosensörün farmasötik numunelerde de valproat tayininde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini açıkça göstermektedir.

Sonuç olarak, geliştirilen valproat–seçici biyosensör oldukça kolay hazırlanabilmesinin yanı sıra, ekonomik, hızlı, seçici ve tekrarlanabilir sonuçlar sergilemektedir. Valproat–seçici biyosensör geniş bir konsantrasyon aralığında çalışır ve oldukça düşük tayin limitine sahiptir. Böylece daha pahalı, daha fazla zaman, deneyimli personel ve laboratuvar koşulları gerektiren karmaşık ölçüm tekniklerine göre alternatif olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu açıkça görülmektedir. Çalışmada elde edilen sonuçların literatüre önemli bir katkı sağlayacağı açıktır.

KAYNAKLAR

- Acar, E.T., Onar, A.N., 2016. Square wave voltammetric determination of valproic acid in pharmaceutical preparations. *Turkish Journal of Chemistry*, 40(1), 106–116.
- Ahmad, K.R., Rastkari N., Kobarfardi F., Ahmad, K.O., Kebriaeizadeh, A., Pakdaman, H. 2007. An improved GC method for rapid analysis of valproic acid in human plasma without derivatization. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 37–42.
- Akama, K., Takaiwa, F., 2007. C-terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2699–2707.
- Akdağ, G., Algin, D.İ., Erdiñ, O.O., 2016. Epilepsi. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 38 (1), 35–41.
- Akpınar, Ç.K., Cengiz, N., 2014. Status epileptikus'un güncel tanı, tedavi ve etiyolojisi. *Epilepsi*, 20(1), 1–10.
- Altındağ, E., Baykan, B., 2015. Status epileptikusta tedavi yaklaşımları konvülsif status epileptikus ve nonkonvülsif status epileptikus tedavisi. *Epilepsi Çalışma Grubu Tanı ve Tedavi Rehberi*, 74–81.
- Altuntaş, D.B., Tavukçuoğlu, Ö., 2018. Micro-sized glucose biosensor based on composite pH sensor. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 24(7), 1355–1359.
- Ammann, D., Pretsch, E., Simon, W., Lindner, E., Bezegh, A., Pungor, E., 1985. Lipophilic salts as membrane additives and their influence on the properties of macro- and microelectrodes based on neutral carriers. *Analytica Chimica Acta*, 171, 119–129.
- Anonim, 2021. "Silver/silver-chloride electrode." *Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary*. <https://glossary.periodni.com> (10.08.2021).
- Arsıranköylü, A.E., Alakaya, M., Akylmaz, E., Çelik, Y., Delibaş, A., 2017. Hemodiyalize yanıt veren ağır valproik asit zehirlenmesi. *Journal of Pediatric Emergency and Intensive Care Medicine*, 4, 77–79.
- Aslan Kara K., Bozdemir, H., 2019. Kadınlarda valproik asit kullanımında güncel gelişmeler. *Epilepsi*, 25(2), 45–50.
- Bahadır, E.B., Pagano, S.M., 2014. Pestisit analizlerinde elektrokimyasal biyosensörlerin kullanımı. *Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3 (2), 8–28.
- Barek, J., Fogg, A.G., Merck, A., Zima, J., 2001. Polarography and voltammetry at mercury electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31, 291–309.
- Bassel, F.S.MD, Nathan, B.F.MD., 2003. Epilepsy. *Disease-a-Month*, 49 (7), 426-478.
- Baykan, B., Gürses, C., Gökyiğit, A., 2004. Epilepsi. *Nobel Tıp Kitabevleri*, 834s İstanbul.
- Belin, G.K., Krähenbühl, S., Hauser, P.C. 2007. Direct determination of valproic acid in biological fluids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Chromatography B*, 847(2), 205–209.
- Benlier, N., Özer, G., Orhan, N., 2020. Relation between serum amylin level and epilepsy. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 56, 34.

- Bhambi, M., Pundir, C.S., 2006. Preparation of oxygen meter based biosensor for determination of triglyceride in serum. *Sensors & Transducers Journal*, 67, 561–567.
- Bown, A.W., Shelp, B.J. 1997. The metabolism and functions of gaminobutyric acid. *Plant Physiology*, 115, 1–5.
- Bölükbaşı, N., 2009. Antiepileptik İlaçların Tiroid Hormon düzeyleri ve Serum Biyokimyasına etkileri. (Doktora Tezi), Adnan Menderes Üniversitesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Aydın.
- Burton, B., 1882. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *American Chemical Journal*, 3, 385–395.
- Buck, R.P., Lindner, E., 1994. Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes. *Pure and Applied Chemistry*, 66 (12), 2527–2536.
- Byrne, B., Stack, E., Gilmartin, N., O’Kennedy, R., 2009. Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors*, 9, 4407–4445.
- Cárdenas-Rodríguez, N., Carmona-Apa, L., Pérez-Loza, D.L., Ortega-Cuellar, D., Gómez-Manzo, S., Ignacio-Mejía, I. 2020. Genetic variations associated with pharmacoresistant epilepsy (Review). *Molecular Medicine Reports*, 21, 1685–1701.
- Clark Jr L.C., Lyons, C., 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102 (1), 29–45.
- Chou, N.H., Chou, J.C., Sun, T.P., Hsiung, S.K., 2006. Study on the disposable urea biosensors based on PVC-COOH membrane ammonium ion-selective electrodes. *IEEE Sensors Journal*, 6(2), 262–268.
- Coldur F., Andac M., Isildak I., Saka T.A., 2008. Micro-sized PVC membrane Li⁺-selective electrode without internal filling solution and its medical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 626, 30–35.
- Cook, A.M., Bensalem-Owen, M.K., 2011. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Therapy*, 8 (3), 307–313.
- Çoldur, F., 2010. Potansiyometrik Çoklu Mikro-Sensör Sisteminin Tasarımı ve Uygulamaları. (Doktora Tezi), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Kimya Bölümü, Samsun.
- Cubuk, O., Altıkatoglu, M., Erci, V., Isildak, I., Tinkilic, N., 2013. An all solid-state creatinine biosensor based on ammonium-selective PVC-NH₂ membrane electrode. *Sensor Letters*, 11(3), 585–590.
- Datta, M., Mittal, S., Goyal, D., 2009. Potentiometric Zn²⁺ biosensor based on bacterial cells. *Asian Journal of Biotechnology*, 1(2), 67–73.
- Davies, J.A., 1995. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Seizure*, 4, 267–272.
- De Bittencourt, P.R.M., Adamolekun, B., Bharucha, N., Carpio, A., Cossio, A.H., Danesi, M.A., Dumas, M., Meinardi, H., Ordinario, A., Senanayake, N., Shakir, R., Sotelo, J., 1996. Epilepsy in the tropics: I. Epidemiology, socioeconomic risk factors, and etiology. *Epilepsia*, 37 (11), 1121–1127.
- Dey, D., Goswami, T., 2011. Optical biosensors: a revolution towards quantum nanoscale electronics device fabrication. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1–7.
- Doré, M., San Juan, A.E., Frenette, A.J., Williamson, D. 2017. Clinical importance of monitoring unbound valproic acid concentration in patients with

- hypoalbuminemia. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 37(8), 900–907.
- Dutta, S., Reed, R.C. 2006. Functional half-life is a meaningful descriptor of steady-state pharmacokinetics of an extended-release formulation of a rapidly cleared drug. *Clinical Drug Investigation*, 26(12), 681–690.
- Engel J.J.R, 2001. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia*, 42, 796–803.
- Erdogan, A., 2014. Nitrit ve Nitrat Tayinine Yönelik Polimer Membran Temelli Tek Elektrotlu Biyosensör Sisteminin Hazırlanması ve Uygulamaları. (Doktora Tezi) İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü, Malatya.
- Fan, X., White, I.M., Shopova, S.I., Zhu, H., Suter, J.D., Sun, Y., 2008. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Analytica Chimica Acta*, 620, 8–26.
- Farghaly, O.A., Abdel Hameed, R.S., Abu-Nawwas, A.H., 2014. analytical application using modern electrochemical techniques. *International Journal of Electrochemical Science*, 9, 3287–3318.
- Faridbod, F., Gupta, V.K., Zamani, H.A., 2011. Electrochemical sensors and biosensors. *International Journal of Electrochemistry*, 2011, 1–2.
- Fisher, E., Wittfoht, W., Nau, H. 1992. Quantitative determination of valproic acid and 14 metabolites in serum and urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 6(1), 24–29.
- Fisher, C., Broderick, W., 2003. Sodium valproate or valproate semisodium: is there a difference in the treatment of bipolar disorder?. *Psychological Bulletin*, 27, 446–448.
- Fisher, R.S., Cross, J.H., D'souza, C., French, J.A., Haut, S.R., Higurashi, N., et al. 2017. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, 58(4), 531–542.
- Forrister, T., 2018. Analyzing cyclic voltammetry at a microdisk electrode with simulation. <https://www.comsol.com/blogs/analyzing-cyclic-voltammetry-at-a-microdisk-electrode-with-simulation/> (09.06.2020).
- Gadgil, N., LoPresti, M.A., Muir, M., Treiber, J.M., Prablek, M., Karas, P.J., Lam, S.K., 2019. An update on pediatric surgical epilepsy: Part I. *Surgical Neurology International*, 10, 257.
- Gao, S., Miao, H., Tao, X., Jiang, B., Xiao, Y., Cai, F., Yun, Y., Li, J., Chen, W., 2011. LC–MS/MS method for simultaneous determination of valproic acid and major metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 879(21), 1939–1944.
- GBD 2016 Epilepsy Collaborators, 2019. Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18, 357–75.
- Goldenberg, M.M., 2010. Overview of drugs used for epilepsy and seizures. *Pharmacy and Therapeutics*, 35 (7), 392–415.
- Guberman, A., Bruni, J., 1999. *Essentials of clinical epilepsy* (2nd ed), 207 p, Wildwood Avenue: Butterworth-Heinemann.
- Gupta, N., Renugopalakrishnan, V., Liepmann, D., Paulmurugan, R., Malhotra, B.D., 2019. Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 141(15), 111435.

- Gupta, B.D., Shrivastav, A.M., Usha, S.P., 2018. Optical sensors for biomedical diagnostics and environmental monitoring (1th ed),. 236 p, Florida, USA.
- Gupta, V.K., Jain, A.K., Kumar, P., 2006. PVC-based membranes of *N,N'*-dibenzyl-1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane as Pb(II)-selective sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 120 (1), 259–265.
- Gül, G., Çokar, Ö., 2015. Epilepsi tanısı almış hastada tedavi yaklaşımı. epilepsi çalışma grubu tanı ve tedavi rehberi, 27–33.
- Han, S.H., Kim, Y.J., Jeon, J.Y., Hwang, M.H., Im, Y.J., Jeong, J.A., Chae, S.W., Kim, M.G. 2012. Rapid and sensitive analysis of valproic acid in human red blood cell by LC–MS/MS. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(5): 1681–1685.
- Hanaya, R., Arita, K., 2016. The new antiepileptic drugs: their neuropharmacology and clinical indications. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 56, 205–220.
- Haznedar, P., 2017. Çocukluk Çağı Epilepsilerinde Levetirasetam ve Valproik Asit Tedavisinin Karaciğer Fonksiyonları, Plazma Serbest Karnitin ve Lipid Peroksidasyonu İle Oksidatif Dna Hasarı Üzerine Etkileri. (Tıpta Uzmanlık Tezi), Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
- Hildenbrand, S. 2012. Levetiracetam and Brivaracetam: Synthesis of Radioligands as Pharmacological Tools for Studying Their Interactions with Target Proteins. (PhD Thesis), Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany.
- Huang, L-S., Gunawan, C., Yen, Y-K., Chang, K-F., 2015. Direct determination of a small-molecule drug, valproic acid, by an electrically-detected microcantilever biosensor for personalized diagnostics. *Biosensors*, 5, 37–50.
- Işıldak, İ., 2000. All solid-state contact lead(II) ion-selective PVC membrane electrode using dimethylene bis(4-methylpiperidinedithiocarbamate) neutral ionophore. *Turkish Journal of Chemistry*, 24, 389–394.
- Işıldak, Ö., Deligönül N., Özbek, O., 2019. A novel silver(I)-selective PVC membrane sensor and its potentiometric applications. *Turkish Journal of Chemistry*, 43 (4), 1149–1158.
- Işıldak, Ö., Özbek, O., Yiğit, K.M., 2019. Zinc(II)-selective PVC membrane potentiometric sensor for analysis of Zn^{2+} in drug sample and different environmental samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1–11.
- Işıldak, Ö., Özbek, O., 2020. Application of potentiometric sensors in real samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 51(3), 518–531.
- Işıldak, Ö., Özbek, O., 2020. Silver(I)-selective PVC membrane potentiometric sensor based on 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine and potentiometric applications. *Journal of Chemical Science*, 132, 29.
- Johnson, R.D., Bachas, L.G., 2003. Ionophore-based ion-selective potentiometric and optical sensors. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 376, 328–341.
- Johnston, M.V., 2004. Seizures in Childhood. *Nelson Nextbook of Pediatrics* (17th ed), 1993-2009 p, New York, USA.
- Junhui, Z., Hong, C., Ruifu, Y., 1999. DNA based biosensors. *Biotechnology Advances*, 15 (1), 43-58.
- Kaindl, A.M., Asimiadou, S., Manthey, D., Hagen, M., Turski, L., Ikonomidou, C., 2006. Antiepileptic drugs and the developing brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 399–413.

- Karakuş, E., Pekyardımcı, Ş., Kılıç, E., 2005) Urea biosensors based on PVC membrane containing palmitic acid. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 33(3), 329–341.
- Katsu, T., Ido, K., Moriya, A., Nakae, Y., Skata, I. 2000. Valproate selective membrane electrode based on gallium(III) tetraphenylporphyrin. *Electroanalysis*, 12, 1282–1285.
- Kayaalp, S.O., 1998. Antiepileptik ilaçlar. *Tıbbi Farmakoloji* (4. baskı) Cilt 2, 2004–2034 s, Feryal Matbaası, Ankara.
- Kazemi-Darsanaki, R., Azizzadeh, A., Nourbakhsh, M., Raeisi, G., AzizollahiAliabadi, M. (2012). Biosensors: functions and applications. *Journal of Biology and Today's World*, 2, 20–23.
- Kıvrak, E., 2019. Klinik Analizlere Yönelik Aptamer Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensör Tasarımı. (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi, Kimya Bölümü, İzmir.
- Kirchner, P., Oberländer, J., Friedrich, P., Berger, J., Rysstad, G., Keusgen, M. and Schöning, M. J., 2012. Realisation of a calorimetric gas sensor on polyimide foil for applications in aseptic food industry. *Sensors and Actuators B: Chemistry*, 170, 60–66.
- Kishore, P., Rajani Kumar, V., Satyanarayana, V., Krishna, D.R., 2003. HPLC determination of valproic acid in human serum. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(6), 378–380.
- Kökbaş, U., Kayrın, L., Tuli, A., 2013. Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22 (4), 499–513.
- Kumar, V., Sharma, S.K., Nagarajan, K., Dixit, P.K., 2016. Effects of lycopene and sodium valproate on pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 41 (5), 430–436.
- Kusunoki, M., Yamamura, T., Ichii, S., Fujita, S., Nakai, T., Utsunomiya, J., 1988. The effects of sodium valproate on plasma somatostatin and insulin in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 67 (5), 1060–1063.
- Lindner, E., Toth, K., Pungor, E., 1986. Definition and determination of response time of ion-selective electrodes. *Pure and Applied Chemistry*, 58 (3), 469–479.
- Löscher, W., 2002. Basic pharmacology of valproate, CNS drugs, 16 (10), 669–694.
- Málaga, I., Sánchez-Carpintero, R., Roldán, S., Ramos-Lizana, J., García-Peñas, J.J. 2019. New anti-epileptic drugs in paediatrics. *Anales de Pediatría*, 91(6), 415e1–10.
- Manickam, A., Johnson, C.A., Kavusi, S., Hassibi, A., 2012. Interface design for cmos-integrated electrochemical impedance spectroscopy (EIS) biosensors. *Sensors*, 12, 14467–14488.
- McGrath, M.J., Scanail, C.N., 2013. Sensing and sensor fundamentals. In *Sensor Technologies* (pp. 15–50). Apress, Berkeley, CA.
- Meunier, H., Carraz, G., Neunier, Y., Eymard, P., Aimard, M., 1963. Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. *Therapie*, 18, 435–438.
- Mesdjian, E., Ciesielski, L., Valli, M., 1982. Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 6 (3), 223–233.
- Metkar, S.K., Girigoswami, K., 2019. Diagnostic biosensors in medicine - A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 271–283.
- Mishra, A.K., 2013. *Nanomedicine for drug delivery and therapeutics*. 536 p, Canada.

- Muti Erdem, M., 2010. Elektrokimyasal DNA Sensörü İçin Nanomalzemelere Dayalı Elektrot Materyallerinin Geliştirilmesi ve Uygulamaları. (Doktora Tezi), Adnan Menderes Üniversitesi, Kimya Bölümü, Aydın.
- Nagele, M., Mi, Y., Bakker, E., Pretsch, E., 1998. Influence of lipophilic inert electrolyte on the selectivity of polymer membrane electrodes. *Analytical Chemistry*, 70, 1686–1691.
- Narang, J., Minakshi, Bhambi, M., Pundir, C.S., 2009. Fabrication of an amperometric triglyceride biosensor based on PVC membrane. *Analytical Letters*, 43(1), 1–11.
- Nguyena, H.H., Kim M., 2017. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157–163.
- Ölvecka, E., Konikova, M., Grobuschek, N., Kaniansky, D., Stanislawski, B., 2003. Direct determination of valproate in serum by zone electrophoresis–isotachophoresis on a columncoupling chip. *Journal of Separation Science*, 26, 693–700.
- Özbek, O., Isildak, O., 2021. Polymer-based cadmium(II)-selective potentiometric sensors for the analysis of Cd^{2+} in different environmental samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1–14.
- Özbek, O., Gürdere, M.B. 2020. A review on the synthesis and applications of molecules as anticonvulsant drug agent candidates. *Medicinal Chemistry Research*, 29(9) 1553–1578.
- Özbek, O., Isildak, O., Isildak, I., 2021. A potentiometric biosensor for the determination of valproic acid: Human blood-based study of an anti-epileptic drug. *Biochemical Engineering Journal*, 176, 108181.
- Pancrazio, J.J., Whelan, J.P., Borkholder, D.A., Ma, W., Stenger, D.A., 1999. Development and application of cell-based biosensors. *Annals of Biomedical Engineering*, 27, 697–711.
- Pingli, K., Xiaoyan, M., Mi, L., Xinfei, L., Jianguo, W., 2011. Development of a potentiometric glucose biosensor based on a PVC membrane electrode. *Acta Chimica Sinica*, 69(24), 3002–3006.
- Pohanka, M., 2018. Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. *Materials*, 11 (3), 448.
- Pucci, V., Mandrioli, R., & Raggi, M. A. (2003). Determination of valproic acid (2-propylpentanoic acid) in human plasma by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Electrophoresis*, 24(12-13), 2076–2083.
- Roda, A., Zangheri, M., Calabria, D., Mirasolia, M., Calicetia, C., Quintavalla, A., Lombardo, M., Trombini, C., Simoni, P., 2019. A simple smartphone-based thermochemiluminescent immunosensor for valproic acid detection using 1,2-dioxetane analogue-doped nanoparticles as a label. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 279, 327–333.
- Rogers, K.R., 2000. Principles of affinity-based biosensors. *Molecular Biotechnology*, 14, 109–129.
- Sabah, S., Aghamohammadi, M., Alizadeh, N. 2006. Solid-state valproate ion selective sensor based on conducting polypyrrole films for determination of valproate in pharmaceutical preparations. *Sensors and Actuators B*, 114, 489–496.
- Santos, E. M. G., Araújo, A. N., Couto, C. M. C. M., Montenegro, M. C. B. S. M. 2006. Construction and evaluation of PVC and sol–gel sensor membranes based on Mn(III)TPP-Cl . Application to valproate determination in pharmaceutical preparations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 867–875.

- Sassolas, A., Leca-Bouvier, B.D., Blum, L.J. 2008. DNA biosensors and microarrays. *Chemical reviews*, 108(1), 109-139.
- Saltık, S., 2014. Çocukluk Epilepsilerinde Tıbbi Tedavi. *Epilepsi*, 20 (1), 50–55.
- Sanati, A., Jalali, M., Raeissi, K., Karimzadeh, F., Kharaziha, M., Mahshid, S.S., Mahshid, S., 2019. A review on recent advancements in electrochemical biosensing using carbonaceous nanomaterials. *Microchimica Acta*, 186, 773.
- Skládal P., 2016. Piezoelectric biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 79, 127–133.
- Skoog, D.A., West, D.A., Holler, F.J., 1996. *Analitik Kimyanın Temelleri* (7. Baskı), 303–495 s, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Shakirullah, Ali, N., Khan A., Nabi, M., 2014. The prevalence, incidence and etiology of epilepsy. *International Journal of Clinical and Experimental Neurology*, 2 (2), 29–39.
- Sills, G.J. 2011. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *A Practical Guide to Epilepsy*, Chapter 25, London, UK.
- Singh, G., Bell, G.S., Hernáiz-Driever, P., Sander, J.W. 2012. Cancer risk in people with epilepsy using valproate-sodium. *Acta Neurologica Scandinavica*, 125, 234–240.
- Sonia, K., Nappinnai, M. 2016. Development and validation of HPLC and UV-visible spectrophotometric method for the pharmaceutical dosage form and biological fluid-review. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3, 382–391.
- Sorouraddin, M.H., Imani-Nabiyyi, A., Najibi-Gehraz, S.A., Rashidi, M.R., 2014. A new fluorimetric method for determination of valproic acid using TGA-capped CdTe quantum dots as proton sensor. *Journal of luminescence*, 145, 253–258.
- Spichiger-Keller, U.E., 1998. *Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications*. 425 p, Weinheim, Germany.
- Suzuki, H., Akimoto, K., Nakagawa, H. 1991. Quantitative analysis of sodium valproate in pharmaceutical preparations by a valproate-selective electrode. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39 (1), 133–136.
- Sztajnkrzyer, M.D., 2002. Valproic acid toxicity: overview and management. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 40 (6), 789–801.
- Tinkilic, N., Cubuk, O., Isildak, I. 2002. Glucose and urea biosensors based on all solid-state PVC–NH₂ membrane electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 452(1), 29–34.
- Tolou-Ghamari, Z., Palizban, A.A., 2015. Review of sodium valproate clinical and biochemical properties. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17 (8), e2207.
- Topcu, C., 2009. Yeni Sentezlenen Schiff Bazlarının Kimyasal Sensörlerde Aktif Bileşenler Olarak Kullanımının Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Kimya Bölümü, Samsun.
- Topcu, C., 2013. Bor Seçici Elektrot Geliştirilmesi, Toprak ve Su Numunelerinde Bor Ölçümü İçin Uygulanması. (Doktora Tezi), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Kimya Bölümü, Samsun.
- Tunca, K., 2020. H₂O₂ Tayini İçin Nanopartiküllere Dayanan Amperometrik Sensör ve Biyosensör Geliştirilmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Kimya Bölümü, Tekirdağ.

- Tüylek, Z., 2017. Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 6 (2), 71–80.
- Umezawa, Y., Bühlmann, P., Umezawa, K., Tohda, K., Amemiya, A.S., 2000. Potentiometric selectivity coefficient of ion-selective electrodes, Part I. inorganic cations. Pure and Applied Chemistry, 72 (10), 1851–2082.
- Van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., Robbens, J., 2010. Recent advances in recognition elements of the food and environmental biosensors: A review, Biosensors and Bioelectronics, 26, 1178–1194.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C., 2010. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. Biotechnology Advances, 28, 232–254.
- Walter, G., B., Robert, B. D., Gerald, M., Fenichel, C., David M., 2000. Neurology in clinical practice. The Epilepsies, 71, 1745.
- Wang, J., 1999. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 19, 47–53.
- Wang J., 2006. Analytical Electrochemistry, (3 Ed). New Jersey, USA.
- Wu, Q., Zhang, Y., Yang, Q., Yuan, N., Zhang, W., 2019. Review of electrochemical dna biosensors for detecting food borne pathogens. Sensors, 19, 4916.
- Yang, W., Lei, Z., Hu, Y., Chen, X., Fu, S., 2010. Investigations of the thermal properties, nucleation kinetics, and growth of γ -aminobutyric acid in aqueous ethanol solution. Industrial & Engineering Chemistry Research, 49, 11170–11175.
- Yeni, S., Bora, İ., Yeni, S., Gürses, C., 2008. Epilepsi insidansı, prevalansı ve risk faktörleri. Epilepsi 65–73 s, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Yolcu, M., 2008. Seçici Kondüktometrik ve Potansiyometrik Mikrosensörlerin ve Hareketli Ölçüm Sistemlerinin Çevre Örneklerine Uygulanması. (Doktora Tezi), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Kimya Bölümü, Samsun.
- Yuwono, A.S., Lammers, P.S., 2004. Odor pollution in the environment and the detection instrumentation. International Commission of Agricultural Engineering, 6, 1–33.
- Zabardasti, A., Afrouzi, H., Talemi, R.P. 2017. A simple and sensitive methodology for voltammetric determination of valproic acid in human blood plasma samples using 3-aminopropyletriethoxy silane coated magnetic nanoparticles modified pencil graphite electrode. Material Science Engineering C, 76, 425–430.
- Zhao, M., Zhang, T., Li, G., Qiu, F., Sun, Y., Zhao, L. 2017. Simultaneous determination of valproic acid and its major metabolites by UHPLC-MS/MS in Chinese patients: Application to therapeutic drug monitoring. Journal of Chromatographic Science, 55(4), 436–444.
- Zhang, H., Li, Y., Li, X., Liu, G., Wang, B., Li, C., 2014. Effect of sodium valproate on the sleep structures of epileptic patients. Experimental and Therapeutic Medicine, 7, 1227–1232.
- Zhang, J.F., Zhang, Z.Q., Dong, W.C., Jiang, Y., 2014. A new derivatization method to enhance sensitivity for the determination of low levels of valproic acid in human plasma. Journal of Chromatographic Science, 52(10), 1173–1180.
- Zawab, A., Carmody, J., 2014. Safe use of sodium valproate. Australian Prescriber, 37 (4), 124–127.

ÖZGEÇMİŞ

