

Original Article / Araştırma Makalesi

**PİROL VE ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜP MODİFİYE SENSÖR İLE
LEVODOPA VE BENSERAZİD'İN ELEKTROKİMYASAL OLARAK EŞZAMANLI
TAYİNİ**

**Electrochemical Simultaneous Determination of Levodopa and Benserazide with
Pyrrole and Multi-Walled Carbon Nanotube Modified Sensor**

Ebru KUYUMCU SAVAN¹  Gamze ERDOĞDU² 
¹İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Malatya
²İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Malatya

Geliş Tarihi / Received: 16.04.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 25.05.2020

Yayın Tarihi / Published: 21.06.2020

ÖZ

Bu çalışmada, susuz ortamda camsı karbon elektrot (CKE) üzerinde pirolün elektropolimerizasyonu ve çok duvarlı karbon nanotüpün (ÇDKN) modifikasyonu ile elektrokimyasal bir sensör geliştirilmiştir. Polipirol ve ÇDKN temelli elektrot, Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılan etken maddeler olan Levodopa ve Benserazid'in elektrokimyasal olarak kantitatif tayini için kullanılmıştır. Modifiye edilmiş sensör üzerindeki farklı parametrelerin etkisi test edilmiş ve optimize edilen yöntem yüksek seçicilik ve hassasiyet göstermiştir. Modifiye sensör, 10 - 50 µM Levodopa ve 100 - 500 µM Benserazid derişim aralıklarında doğrusal yanıtlar vermiştir. Levodopa ve Benserazid için sırasıyla 3.65 µM ve 1.99 µM'lık tayin sınırları elde edilmiştir. Sensörün aktivitesi, girişim yapan türlerden biri olan askorbik asit varlığında başarıyla test edildi. Geliştirilen yöntem, gerçek idrar numunelerinde ve farmasötik dozaj formundaki Levodopa ve Benserazid'in tayininde başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Benserazid, Çok duvarlı karbon nanotüp, Levodopa, Pirol

ABSTRACT

In this study, an electrochemical sensor has been developed by modification of the electropolymerized pyrrole and multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on the glassy carbon electrode in anhydrous environment. The polypyrrole and MWCNT based electrode have been used for the electrochemical quantitative determination of the active substances Levodopa and Benserazide which are used in the treatment of Parkinson's disease. The effect of different parameters on the modified sensor have been tested and the optimized method showed high selectivity and precision. The modified sensor gave linear responses in the concentration ranges of 10 - 50 µM Levodopa and 100 - 500 µM Benserazide. Determination limits of 3.65 µM and 1.99 µM have been obtained for Levodopa and Benserazide, respectively. The activity of the sensor was successfully tested in the presence of an interference species, ascorbic acid. The developed method has successfully been applied in the determination of Levodopa and Benserazide in real urine samples and pharmaceutical dosage form.

Keywords: Benserazide, Levodopa, Multi-walled carbon nanotube, Pyrrole

GİRİŞ

Beyinde sinir hücrelerinin uyarılabilme özelliğini arttıran asetilkolinle bunun aksini yapan dopamin arasında belli bir denge bulunmaktadır. Parkinson hastalığında bu denge asetilkolin lehine bozulmuş olup, tedavide dopamin açığının yerine konması gerekmektedir. Sentetik dopamin kan ile beyin arasındaki bariyeri aşamamaktadır. Bu problem kan beyin engelini aştıktan sonra dopamine dönüşen, Levodopa'nın bulunması ile çözümlenmiştir (Atta, Galal ve El-Gohary, 2020; Beitollahi, Safaei ve Tajik, 2020; Ghalehno, Mirzaei ve Torzkadeh-Mahani, 2019; Goodman, Rall, Nies ve Taylor, 1990; Li, Gao, Wu ve Zhao, 2020; Safaei, Beitollahi ve Shishehbore, 2020). Levodopa (L-Dopa) dopamine metabolize olan aromatik amindir. Levodopa, ticari ilaçlarda karbidopa veya Benserazid gibi aromatik amino asit dekarboksilaz inhibitörü bir ilaçla kombine preparatları şeklinde kullanılır. Genellikle, bu maddeler, sulu çözeltide yükseltgenmek suretiyle, kinon bileşiklerini oluşturmaktadır (Kuyumcu Savan ve Erdogdu, 2017; Miraki vd., 2019; Ommaty, 2009; Savan ve Erdogdu, 2019).

Levodopa ve Benserazid ikili ilaç karışımının saptanması için kromatografik (Pan, Guo ve Li, 2010), spektrofotometrik (Dinc ve Ustundag, 2002) ve kemilüminesans (Marques, Santos, Lopes ve Lima, 2008) yöntemler de kullanılmıştır. Bu maddelerin ortak özelliği, kromofor grup içermeyen monoamin bir nörotransmitter madde yapısına sahip olmalarıdır. Dolayısıyla spektrofotometrik metodlarla tayini sınırlı düzeydedir. Kromatografik metod diğer yöntemlerden popüler olmasına karşın, interferantların varlığı bu metot için önemli bir dezavantajdır. Ayrıca kromatografik metodla bu maddelerin tayini yine elektrokimyasal dedektörün kullanımı halinde mümkündür. Alternatif olarak, daha seçici, daha duyarlı, daha ucuz ve diğer yöntemlere kıyasla daha kısa sürede hazırlanabilir olma gibi avantajları sebebiyle, elektrokimyasal yöntem son zamanlarda daha fazla ilgi çekmektedir. Voltametrik yöntemler ile ilaç etken maddelerinin herhangi bir ayırma yöntemine gerek kalmadan farmasötik preparatlardan ve biyolojik sıvılardan analizinin hızlı, hassas ve ekonomik bir şekilde yapılması mümkündür (Aksoy, Pasahan, Gungor, Koytepe ve Seckin, 2017; Gungor, Pasahan, Cengiz, Koytepe ve Seckin, 2015; Özkan, Uslu ve Aboul-Enein, 2003; Pasahan, Koytepe, Cengiz ve Seckin, 2013; Savan vd., 2016). Voltametrinin üstün yanlarından biri de ilaç etken maddelerinin redoks reaksiyonlarındaki rolü ile moleküler biyoloji alanında ve dolayısıyla fizyolojik önem taşıyan pek çok bileşiğin farmakolojik etki mekanizmalarının açıklanmasında kullanılmasıdır.

Elektroanalitik uygulamalarda çalışma elektrotu olarak çıplak elektrot kullanıldığında, askorbik asit, ürik asit gibi elektroaktif interferanslar iletken elektrot yüzeyinde elektroaktivite göstererek sinyal alınması arzu edilen türe ait amperometrik yanıtta katkıda bulunmak suretiyle ilgili türün karakteristik pikini önemli ölçüde değiştirmekte ve sonuç olarak da analitlere ait pik ayırımında tatminkâr potansiyel farklarına ulaşamamaktadır. Çıplak elektrodun bu dezavantajı, modifiye elektrotların kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Ayrıca, elektrot modifikasyonu; aşırı potansiyelin düşürülmesi, reaksiyon hızının artırılması ve duyarlılığın iyileştirilmesi gibi daha pek çok avantaj sunmaktadır (Hu, Wang, Liao ve Wang, 2005).

Karbon nanotüpler benzersiz yapıları, mekanik kuvveti ve elektronik özelliklerinden dolayı elektroanalitik kimyada elektrot modifikasyonunda biyosensör dizaynında sıklıkla kullanılmaktadır (Ouveria-Caridade, Pauliukaite ve Brett, 2008). Bu şekilde, çalışılan potansiyel düşmekte ve birçok elektroaktif maddenin reaksiyon hızı artmaktadır. Böylece karbon nanotüp modifiyeli elektrotlar diğer bilindik karbon elektrotlardan daha iyi elektrokimyasal performans göstermektedir (Wang, Li, Shi, Li ve Gu, 2002). Hem karbon nanotüpün hem de iletken polimerlerin elektrokimyasal özellikleri, elde edilecek modifiye elektrodun yeni ve eşsiz özelliklere sahip olmasını sağlamaktadır.

Elektrokimyasal yöntemlerle Levodopa ve Benserazid tayininde karşılaşılan en önemli problemlerden birisi elektroaktif askorbik asidin varlığıdır. Bazı hastalıkların teşhis ve tedavisinde, askorbik asit ve katekolaminlerin biyolojik sıvılardaki tayini önemlidir. Biyolojik sıvılardaki askorbik asit, kanser, şeker ve karaciğer hastalıkları ile bağlantılı olan, insan metabolizmasındaki oksidasyon stres miktarına ulaşmak için kullanılabilir (Wu vd., 2010). Zira askorbik asit, beyin omurilik sıvısında bu tür katekolaminlerle birlikte bulunur ve pik potansiyelleri birbirine yakın olduğundan, bu maddelerin ölçümü için ciddi bir problem oluşturur (Liu, Honma ve Zhou, 2005; Wu vd., 2010). Bu problemin yenilebilmesi için, ya Levodopa, Benserazid ve askorbik asit için pik potansiyellerinin ayrılabilirdiği elektrokatalitik özellikteki yapılara ya da elektroaktif askorbik asiti bloke ederken Levodopa, Benserazid geçişine izin veren permselektif kaplama materyallerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, piról (PR) monomerinin karbon nanotüpler ile beraber modifiye elektrot yapımında kullanımı, elde edilecek bu elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve Levodopa, Benserazid ilaç etken maddelerinin tayin edilmesi amaçlanmıştır. Bu modifiye elektrot ile askorbik asit ve ürik asit gibi girişim yapan türler varlığında ilaç etken maddelerinin tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, ilaç numunesi, kan serumu ve idrar gibi

biyolojik sıvılardaki pek çok girişim yapan maddeler varlığında, bu tür maddelerin seçimli olarak tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasal Maddeler: Bu çalışmamızda kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta olup; Levodopa standardı Alfa Aesar (A Johnson Matthey Company), Benserazid standardı Sigma, çok duvarlı karbon nanotüp (ÇDKN) (*ortalama çap: 3-10 nm, uzunluk: 10-30 µm, saflık: >%95, yüzey alanı: >500 m²/g*) Grafen Inc., piról, tetrabütülamonyumtetrafloroborat ve L-(+)-askorbik asit Merck firmalarından temin edilmiştir. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında analitik saflıktaki kimyasallar; Na₂HPO₄ (Merck), KH₂PO₄ (Carlo Erba), KCl (Merck), NaCl (Merck), H₃PO₄ (Merck), H₃BO₃ (Merck) ve CH₃COOH (Merck) kullanılmıştır. Bütün sulu çözeltilerin hazırlanmasında, Milli-Q sistemden (Millipore, Milford, USA) elde edilen yüksek saflıktaki ultra saf su kullanılmıştır. Ayrıca, elektrokimyasal ölçümlerde etken madde olarak kullanılan Levodopa ve Benserazid, 10⁻² M'lık derişimlerde stok çözeltileri saf su ile hazırlanmıştır. Bütün çözeltiler analiz esnasında hazırlanmış ve ışıktan korunmuştur.

Cihazlar ve gereçler: Bütün elektrokimyasal işlemler, üçlü-elektrot hücresinde BAS (Bioanalytical Systems, Inc.) 100W elektrokimyasal analizör tarafından gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal hücre olarak, aynı firmanın C2 Faraday hücre kafesi kullanılmıştır. Çözeltilerin pH'ı Hanna Instruments pH 211 Microprocessor pH metresi ile ölçülmüştür.

Yardımcı elektrot olarak spiral disk şeklinde hazırlanmış platin elektrot, sulu ortamlar için referans elektrot olarak 3 M KCl içindeki Ag/AgCl elektrotu (CHI111), susuz ortamlar için Ag/Ag⁺ referans elektrotu (CHI112) ve çalışma elektrotu olarak ise camsı karbon elektrot (CHI104) kullanılmıştır. Camsı karbon elektrotlar (CKE), deneysel çalışmalar yapılmadan önce alümina tozu ve distile sulu kadife disk (BAS, MF-1040) temizleme pedlerinin üzerinde temizlenmiştir. Daha sonra CKE, 100 mV / sn tarama hızında 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi içinde – 0.5 ile 2.0 V aralığında 20 döngü ile çevrimli voltametri (ÇV) tekniği uygulanarak aktive edildi. Tüm deneyler, argon gazı atmosferi altında gerçekleştirildi.

Tampon çözeltilerinin hazırlanışı: Fosfat tampon çözeltilerini (PBS) hazırlamak için, 1.9052 g KH₂PO₄, 1.9579 g Na₂HPO₄, 36.5250 g NaCl ve 1.0066 g KCl tartılıp çözünürleştirildikten sonra 500 mL ye balonjojede deiyonize su ile tamamlanmıştır. Bu çözeltinin pH'ı yaklaşık olarak 6.3 civarında ölçülmüştür. 0.2 M'lık NaOH, 0.1 M'lık H₃PO₄ ilavesiyle pH'ları 2.0, 3.0, 4.0; 5.0, 7.0, 9.0 ve 11.0 olan PBS tamponları hazırlanmıştır. Britton-Robinson (BR) tampon çözeltileri hazırlamak için, 2.4700 g H₃BO₃, 2.7 mL H₃PO₄ ve

2.3 mL CH₃COOH karıştırılıp çözünürleştirildikten sonra 1000 mL ye balonjojede deiyonize su ile tamamlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin pH'ı yaklaşık 2.02 civarında ölçülmüştür. 0.2 M'lık NaOH ve 0.1 M lık H₃PO₄ yardımıyla hazırlanan tampon çözeltilerinin pH'ları 2.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 ve 11.0' ayarlanmıştır. Asetat tampon (AT) çözeltilerini hazırlamak için, 0.1 M'lık 500 mL'lik CH₃COOH çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin pH'ı yaklaşık 2.7 olarak ölçülmüştür. 0.1 M'lık CH₃COOH çözeltisinden yararlanarak 5.0 M NaOH ve derişik CH₃COOH çözeltileri yardımıyla pH'ları 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 olan tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

ÇDKN'ün işlevselleştirilmesi: Karbon nanotüplerin düzgün dispersiyonlarını elde etmek ve kuvvetli etkileşimini sağlamak için çok duvarlı karbon nano tüplerin yüzeyine karboksilik asit grupları bağlanmıştır. Öncelikle, çok duvarlı karbon nano tüpün (ÇDKN) oksidasyonu 3:1 oranında sülfirik asit ve nitrik asit karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir böylece ham materyal, katalizörün yüzeyine karboksilik grupları absorplamaktadır. Bu amaçla, 100 mg ÇDKN, 12 mL H₂SO₄:HNO₃ (1:1) karışımına eklenmiş, 70 °C'de silikon yağ banyosunda 12 saat karıştırarak ısıtılmış, ürün 0.22 µm gözenekli teflon membrandan süzölmüş ve pH'ı nötral değere ulaşınca kadar saf su ile yıkanmıştır. Karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (ÇDKN-COOH) vakum etüvünde 48 saat oda sıcaklığında kurutulmuştur (Tsang, Chen, Harris ve Green, 1994).

Camsı karbon elektrotların ÇDKN ve polipirol ile kaplanması: Çalışmada kullanılan polipirol polimer elektrotlarını elektrokimyasal olarak elde etmek için, 50 mM pirol 0.1 M KCl içerisindeki çözeltisi hazırlanmıştır. Pirolün yükseltgenme potansiyeline karar vermek için, CKE'da (-200) ile (+1800) mV'da 50 mV/s tarama hızında ÇV tekniği uygulanmıştır. Şekil 1'deki voltamogramlarda görüldüğü gibi ilk yükseltgenme piki 1178 mV'da elde edilmiştir. Bu nedenle, 1200 mV'da 10 saniyelik süre ile yığın elektroliz (YE) yöntemi uygulanarak çıplak CKE yüzeyi pirolün elektropolimerizasyonu ile kaplanmıştır. Elektrot yüzeyinde oluşan polimerin renginin parlak mavi renkte olduğu gözlemlenmiştir.

% 0.2 - % 0.5 - % 1.0 (mg/µL) derişimlerindeki ÇDKN çözeltileri hazırlanmıştır. ÇDKN-COOH'i işlevsel hale getirmek için N,N-dimethylformamide (DMF) içerisinde homojen bir karışım elde edilinceye kadar 4 saat ultrasonik banyoda tutulmuştur. Modifiye elektrotlar, iki farklı uygulama ile modifiye edildi. Birinci modifikasyon prosedüründe, polipirol CKE yüzeyine 1200 mV'da 10 saniyelik süre ile YE tekniği ile elektrokimyasal olarak kaplandı. Üzerine 10 µL veya 20 µL ÇDKN-COOH dispersiyonlarından damlatıldı. İkinci modifikasyon prosedüründe, CKE yüzeyine 10 µL veya 20 µL ÇDKN-COOH dispersiyonlarından damlatılıp 1 gün oda sıcaklığında kurutuldu. Sonra bu elektrotların yüzeyi

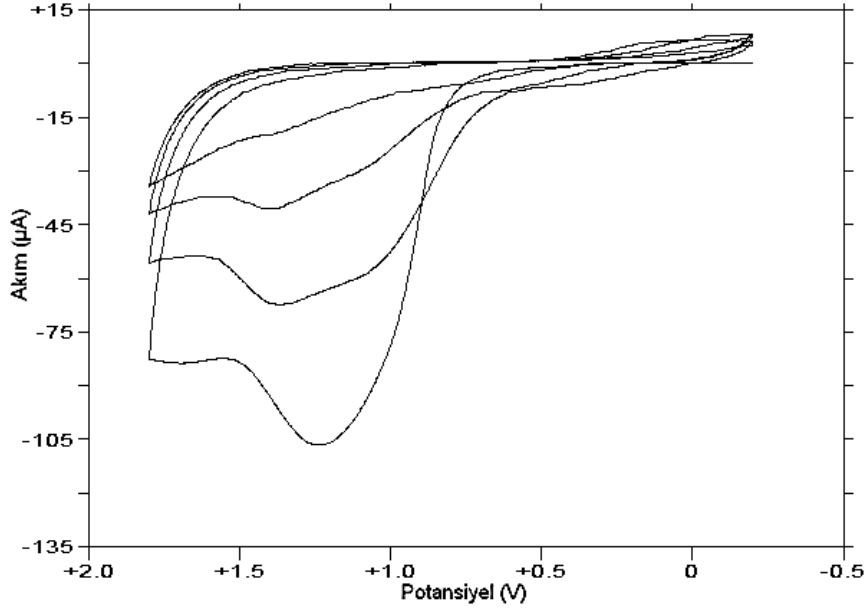
polipirol ile elektrokimyasal olarak kaplandı. Böylece on iki tane farklı elektrot oluşturuldu. Modifiye edilen elektrotlar daha sonra deiyonize su ile yıkandı. Oluşturulan bu elektrotlar çalışma elektrotu olarak kullanıldı.

Numune Uygulaması: Levodopa ve Benserazid ikili karışımın numune uygulamasında, Madopar (bir tablet 100 mg Levodopa ve 50 mg Benserazid içerir, Deva) ilaç formu kullanıldı. Bu ilaç formundan 10 adet tablet hassas olarak tartıldı ve bir havanda ince toz haline getirildi. Çalışılan standart maddenin istenilen miktarına eşdeğer miktarda tartılıp saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra ultrasonik banyoda bir saat karıştırıldı. Bu karıştırma süresi sonunda, karışım 0.45 µm'lık membran filtreden süzüldü. Bu çözeltilen uygun miktarda alınıp pH'ı 7.0 olan 0.1 M PBS elektroliti ile 10 mL'ye tamamlanarak 5 tekrar numunesi hazırlandı.

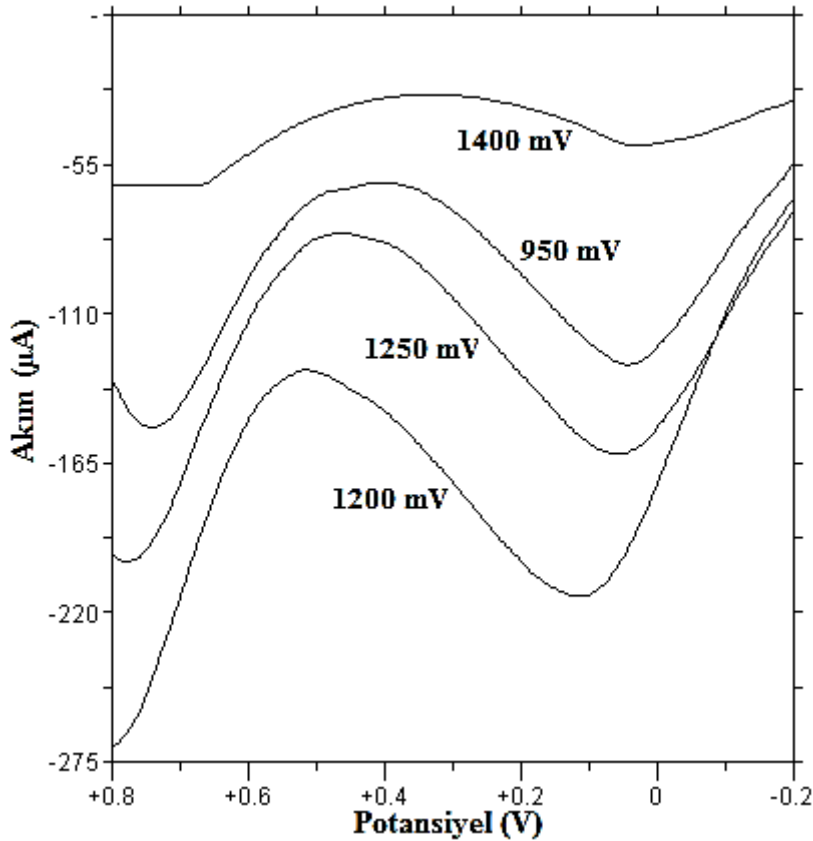
Çalışmada kullanılan tabletler içerisinde yer alan katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını tespit etmek amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla belirli miktarlarda hazırlanan tablet çözeltilerine diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği uygulanarak, uygun kalibrasyon grafiğinden içerisindeki madde miktarı hesaplanıp geri kazanım değerleri bulunmuştur. Ayrıca, bu tablet numunelerine ve idrar numunelerine saf etken maddelerden oluşan karışımdan istenen miktarlarda ilave edilip, eklenen miktarların geri kazanılabilirliği araştırılmıştır. Bu ölçümlerde beş tablet numunesi ve idrar numunesi hazırlanmıştır. İdrar numunesi hazırlanırken, idrardan 1.0 mL alınıp pH'ı 7.0 olan 0.1 M PBS elektroliti ile 10 mL'ye seyreltildi. Her bir numune çözeltisinin üç tekrar DPV ölçümleri alınmış ve bu tekrarların ortalaması alınarak geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Film Kalınlığı Etkisi: Pirol monomeri, CKE yüzeyinde ÇV yöntemiyle büyütülmüş ancak etken maddelerin bu film yüzeylerinde yanıtları alınamamıştır. Bu nedenle BE yöntemi denenmiştir. Pirolün Şekil 1'deki çevrimli voltamogramları alındıktan sonra yükseltgenme pikinin gözlemlendiği 900-1400 mV aralığında 10 saniyelik filmleri oluşturulmuş ve bunların etken maddelere karşı yanıtları incelenmiştir. Şekil 2'de Benserazid'e karşı olan yanıtları görülmektedir. Bu voltamogramlar incelendiğinde, en yüksek pik akımı 1200 mV'da büyütülen film yüzeyi ile elde edildiğinden bu potansiyelde filmlerin büyütülmesine karar verilmiştir.



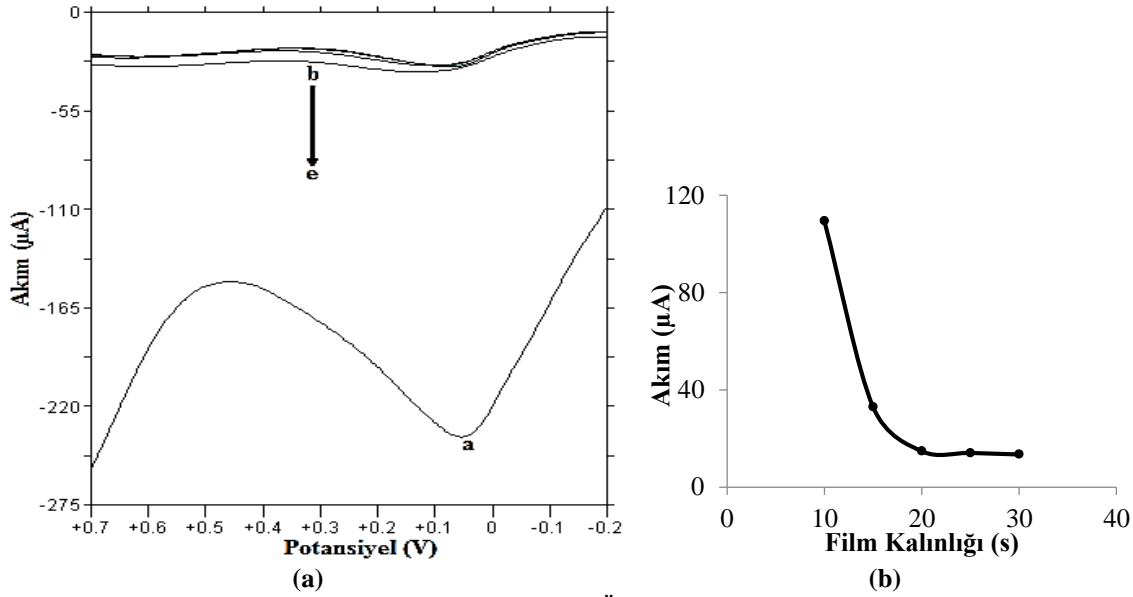
Şekil 1. 50 mM Pirólün, CKE'da Ag/AgCl Referans Elektroda Karşı Alınan ÇV Yanıtı, Tarama Hızı: 50 mV/s, 8 Çevrim



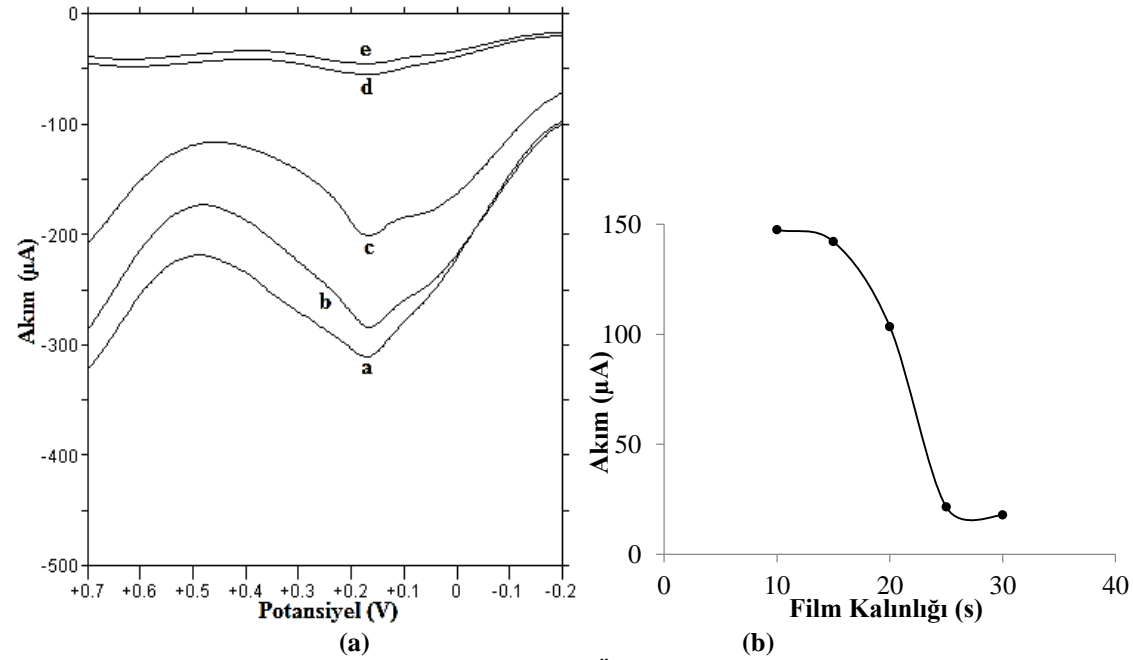
Şekil 2. YE Yöntemiyle Çeşitli Potansiyelerde, 10 Saniyelik Süre ile Büyütülmüş *Polipirol* Elektrotların 1.0 mM Benserazid için DPV Yanıtları.

Yığın elektroliz yöntemiyle 1200 mV'da büyütülmüş *polipirol* elektrotların çeşitli film kalınlıkları (10, 15, 20, 25, 30 saniye) çalışılmış ve bu elektrotların 1.0 mM Benserazid ve 1.0 mM Levodopa içeren PBS pH 7.0 ortamında alınan diferansiyel puls voltamogramlarında

sırasıyla yaklaşık 80 ve 184 mV potansiyelde yükseltgenme piki verdikleri görülmüştür (Şekil 3, Şekil 4).



Şekil 3. (a) 1.0 mM Benserazid'in *Polipirol* Elektrot Üzerinde, a) 10, b) 15, c) 20 d) 25 e) 30 Saniyelik Film Kalınlıklarındaki Verdiği DPV Yanıtları (b) 1.0 mM Benserazid'in *Polipirol* Elektrottaki Akım-film Kalınlığı İlişkisi.

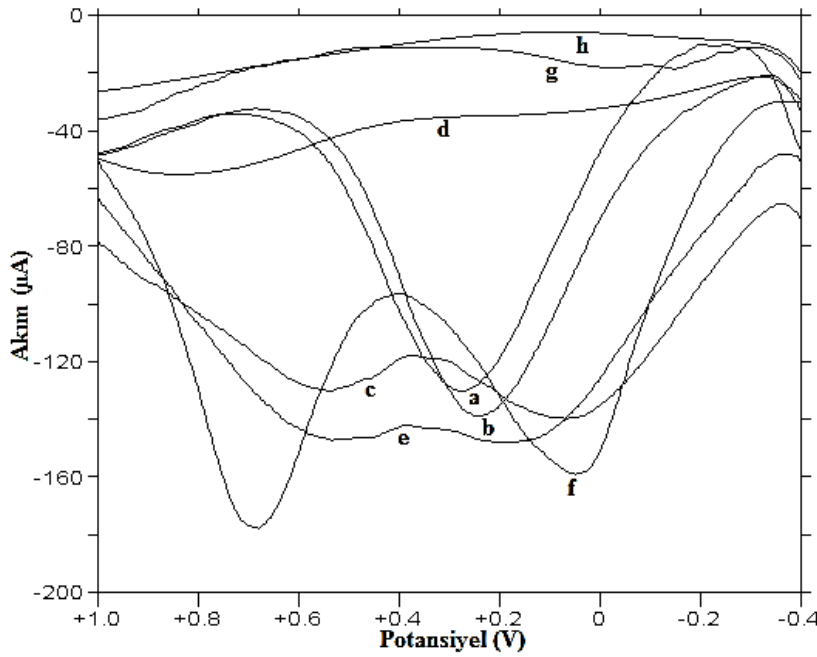


Şekil 4. (a) 1.0 mM Levodopa'nın *Polipirol* Elektrot Üzerinde, a) 10, b) 15, c) 20, d) 25, e) 30 Saniyelik Film Kalınlıklarındaki Verdiği DPV Yanıtları (b) 1.0 mM Levodopa'nın *Polipirol* Elektrottaki Akım-film Kalınlığı İlişkisi.

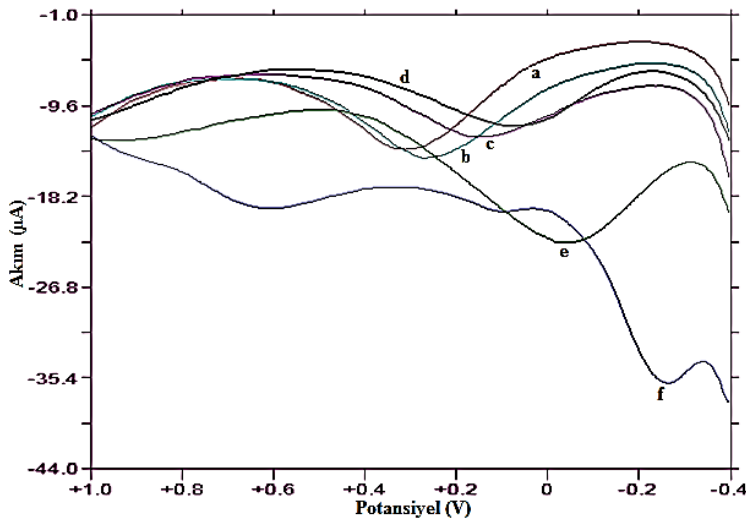
Bu film kalınlıklarındaki voltamogramlar incelenmiş, film kalınlığı artarken etken maddelerin pikindeki değişimler dikkate alındığında 10 s'lik film kalınlığında en yüksek pik akımları gözlenmiştir. Filmin kalınlığının artmasıyla büyük moleküler hacme sahip etken maddelerin geçişine engel olduğu yani permselektif bir davranış sergilediği düşünülmektedir.

Destek Elektrolit ve pH Etkisi: Etken maddelerin *polipirol* modifiye elektrottaki yanıtını arttıracak en uygun destek elektrolit çözelti ortamı araştırılmıştır. Bu amaçla, fosfat tamponu, britton-robinson tamponu ve asetat tamponu elektrolit çözeltisi olarak kullanılmıştır.

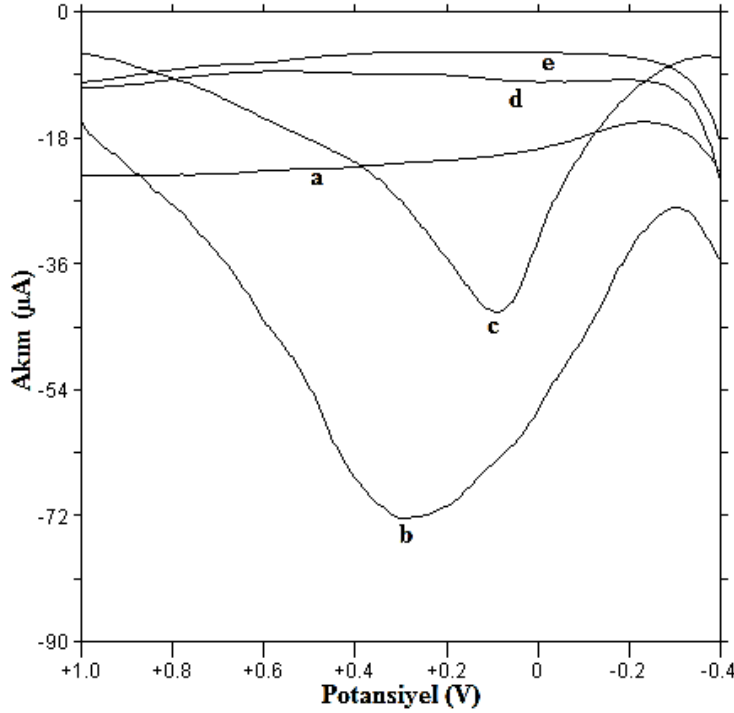
Etken maddelerin, Fosfat tamponu ve BR tamponu için pH 2-11, AT için pH 3.0-7.0 aralığındaki çözeltilerinin, modifiye elektrot üzerindeki DPV yanıtları incelenmiştir. Şekil 5, Şekil 6 ve Şekil 7 incelendiğinde en uygun pH'ın 7.0 olduğu, ikili karışımın en iyi bu ortamda ayrılabilirdiği anlaşılmaktadır. Bu yüzden sonraki deneyler bu elektrolit ortamı içerisinde yapılmıştır.



Şekil 5. 1.0 mM Levodopa ve 1.0 mM Benserazid Karışımının PBS'nun Farklı pH'larında a) 2.0, b) 3.0, c) 5.0, d) 7.0, e) 9.0, f) 11.0 *Polipirol* Elektrot Üzerindeki Yanıtları.

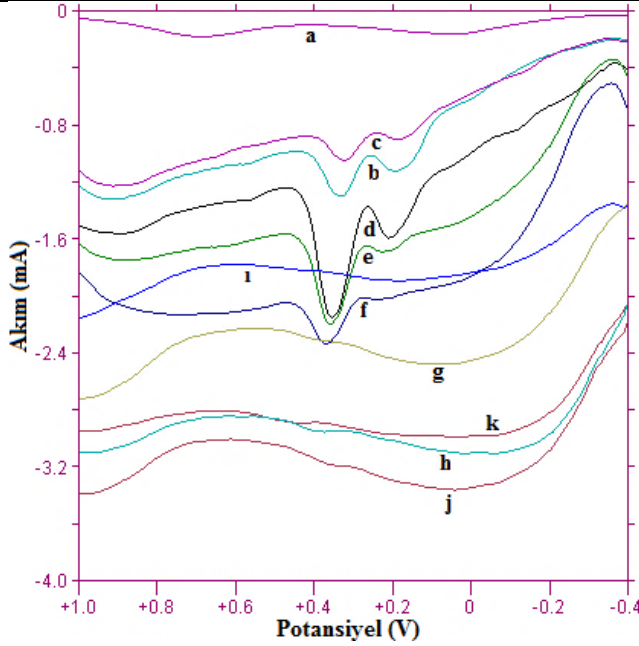


Şekil 6. 1.0 mM Levodopa ve 1.0 mM Benserazid Karışımının BR Tamponunun Farklı pH'larında a) 2.0, b) 3.0, c) 5.0, d) 7.0, e) 9.0, f) 11.0 *Polipirol* Elektrot Üzerindeki Yanıtları.



Şekil 7. 1.0 mM Levodopa ve 1.0 mM Benserazid Karışımının AT'nun Farklı pH'larında a) 3.0, b) 5.0, c) 7.0, d) 9.0, e) 11.0 Polipirol Elektrot Üzerindeki Yanıtları.

Benserazid ve Levodopa'nın Modifiye Elektrotlar ile Tayini: 1.0 mM Benserazid ve 1.0 mM Levodopa'nın PBS pH 7.0 tamponundaki çözeltileri hazırlanmış ve hazırlanan modifiye elektrotlardaki DPV yanıtları araştırılmıştır. 1.0 mM Benserazid'in PR-ÇDKN modifiye elektrotlar ile alınan DPV yanıtlarının karşılaştırılması sonucu Şekil 8'deki voltamogramlar elde edilmiştir. Difereansiyel puls voltamogramları incelendiğinde, CKE üzerine *polipirol* kaplanıp üzerine 20 µL % 0.5'lik ÇDKN damlatılmasıyla elde edilen modifiye elektrotla (CKE/PR/ÇDKN) en iyi ayrılma sağlanmıştır. Elde edilen akım değerleri de daha tatmin edicidir. Benserazid için 200 mV'da 2.775×10^{-4} A'lik pik akımı, Levodopa için 352 mV'da 8.355×10^{-4} A'lik pik akımı elde edilmiştir. Ayrıca, modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrot, CKE'un *polipirol* ile kaplanmasıyla elde edilen polimer elektrottan da daha iyi yanıt göstermiş ve bu modifikasyonla yanıtların iyileştiği gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalar için modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrot kullanılmıştır.



Şekil 8. 1.0 mM Levodopa ve 1.0 mM Benserazid Karışımının Modifiye Elektrotlar Üzerindeki DPV Yanıtları CKE Yüzeyine **a)** polipirol kaplanmış, **b)** polipirol kaplandıktan sonra 20 µL % 0.2 ÇDKN'ten damlatılmış, **c)** polipirol kaplandıktan sonra 10 µL % 0.5 ÇDKN'ten damlatılmış, **d)** polipirol kaplandıktan sonra 20 µL % 0.5 ÇDKN'ten damlatılmış, **e)** polipirol kaplandıktan sonra 10 µL % 1.0 ÇDKN'ten damlatılmış, **f)** polipirol kaplandıktan sonra 20 µL % 1.0 ÇDKN'ten damlatılmış, **g)** 20 µL % 0.2 ÇDKN'ten damlatıldıktan sonra polipirol ile kaplanan, **h)** 10 µL % 0.5 ÇDKN'ten damlatıldıktan sonra polipirol ile kaplanan, **ı)** 20 µL % 0.5 ÇDKN'ten damlatıldıktan sonra polipirol ile kaplanan, **j)** 10 µL % 1.0 ÇDKN'ten damlatıldıktan sonra polipirol ile kaplanan, **k)** 20 µL % 1.0 ÇDKN'ten damlatıldıktan sonra polipirol ile kaplanan elektrotlar.

Analitik Metodun Validasyonu: DPV, düşük tayin limitlerinde organik ilaç bileşiklerinin tayini için etkin, seçimli ve duyarlı bir yöntemdir. Bu yüzden DPV, Benserazid ve Levodopa'nın kantitatif değerlendirmesinde kullanılmıştır. Çalışılan metodun validasyonu, kesinlik ve doğruluk dikkate alınarak standart çözeltilerin elektrolit çözeltisinde tekrar analizlerinin gerçekleştirilmesiyle değerlendirilmiştir. En iyi yanıtta, pik şekline, pik akım duyarlılığına ve tekrarlanabilirliğine bakılarak karar verilmiştir. Analitik deneylerde kullanılan bütün çözeltiler, çözeltideki analitin kararlılığını sağlayabilmek için taze hazırlanmıştır. Metod validasyonu kapsamında, DPV tekniği ile pik akımının Benserazid ve Levodopa'nın derişimlerine karşı çizilen kalibrasyon grafiklerinden regresyon denklemleri elde edilmiş, tayin sınırları bulunmuş, tablet dozaj formlarında ve idrar örneklerinde geri kazanım çalışmaları yapılmış, Askorbik Asit (AA) yanında girişim etkileri araştırılmıştır.

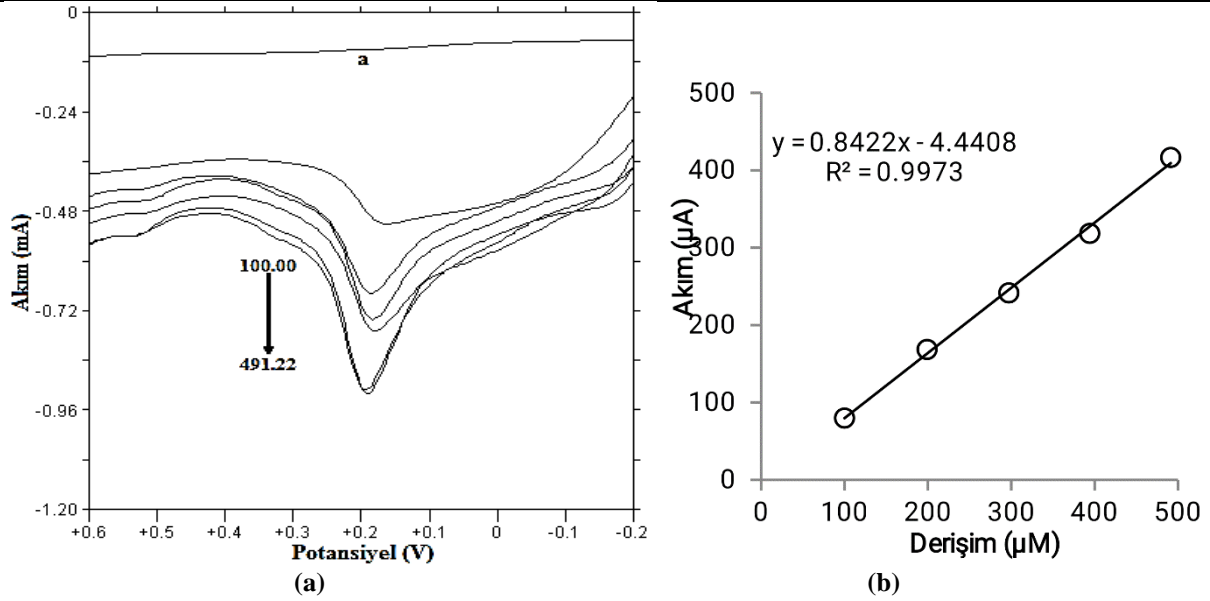
Kalibrasyon eğrisi çalışmaları, anodik yükseltgenme pik akımları ve konsantrasyon arasında gerçekleşen lineer korelasyona dayanmaktadır. Kalibrasyon eşitliği $I_{pa} (\mu A) = XC (\mu M) + Y$ olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi en küçük kareler yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm limitleri, tayin sınırı (LOD) = $3 \times s/m$ ve tayin alt sınırı (LOQ) = $10 \times s/m$ formüllerinden hesaplanmıştır. Bu formüllerde s, kalibrasyon

aralığında belli bir derişimde tekrarlanan pik akımlarının (10 tekrar ile) standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir (Ermer ve Miller, 2005).

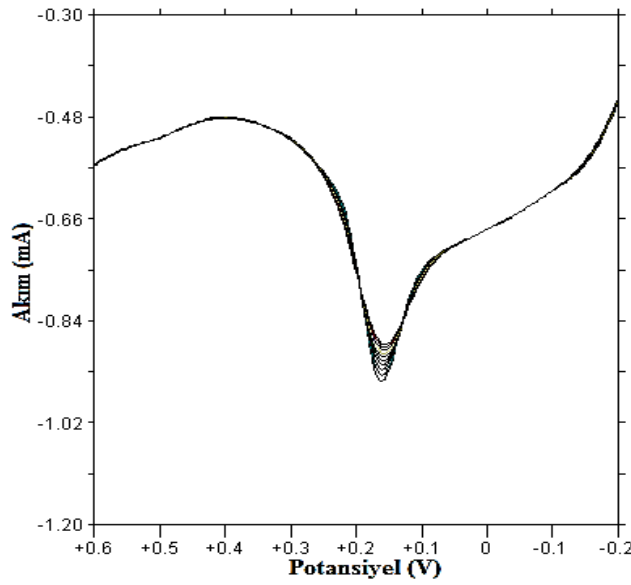
Metodun kesinliği, DPV tekniği ile aynı gün içerisinde 1.0 mM BS ve 1.0 mM Levodopa (LD) çözeltilerinin birbirinden bağımsız 10 tekrarından (gün içi tekrarlanabilirlik) ve arka arkaya 5 gün süresince ölçümler alınarak (günler arası tekrarlanabilirlik) hesaplanmıştır. Günler arası ölçümlerde 3 tekrar yapıp ortalaması alınarak hesaba katılmıştır. Bağıl standart sapma (% RSD) olarak değerlendirilen kesinlik ve doğruluk, gün içi ve günler arası standart sapmanın, ölçüm değerlerinin ortalamasına bölünüp 100 ile çarpılması sonucu hesaplanmıştır.

Etken maddelerin 1.0 mM'lık stok çözeltileri ultra saf su içerisinde hazırlanmış ve kalibrasyon çalışmaları için gerekli derişimler bu stok çözeltilerden seyreltilerek kullanılmıştır. Tayin sınırı çalışmalarında, en düşük 1.0 µM derişiminde standart çözeltiler kullanılmış ve 1.0 mM'lık stok çözeltisinden belirli miktarlardaki hacimler, pH 7.0 PBS elektrolit ortamına eklenmiştir. Seyrelme göz önüne alınarak derişimler yeniden hesaplanmıştır. Her derişim için üç tekrar yapılmış ve alınan sonuçların ortalaması alınmıştır.

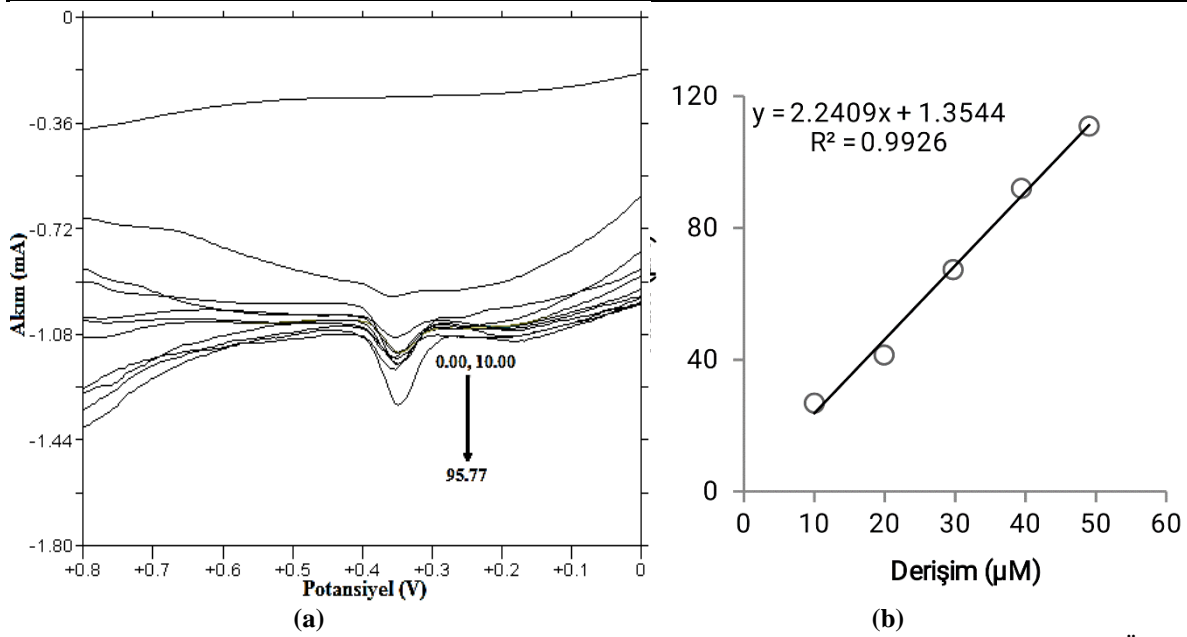
Benserazid'in artan derişimlerinin (100.00, 199.01, 297.05, 394.14, 491.22 µM) pH'ı 7.0 olan 0.1 M PBS'da, modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrot üzerindeki diferansiyel puls voltamogramları ve kalibrasyon grafiği Şekil 9'da gösterilmiştir. Ayrıca, modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrodunun kararlılık testi için yapılan 394.14 µM'lık Benserazid'in ardışık on DPV yanıtı Şekil 10'da gösterilmiştir. Levodopa'nın pH'ı 7.0 olan 0.1 M PBS'daki artan derişimlerinin (10.00, 19.98, 29.70, 39.41, 49.03, 58.55, 67.99, 77.33, 86.59, 95.77 µM) modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrot üzerindeki diferansiyel puls voltamogramları ve 10-50 µM derişim aralığında alınan yanıtların kalibrasyon grafiği Şekil 11'de gösterilmiştir. Modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrodun kararlılık testi için yapılan 39.41 µM'lık Levodopa'nın ardışık on DPV yanıtı Şekil 12'de gösterilmiştir. Benserazid ve Levodopa'nın, modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrotta DPV tekniği ile elde edilen verileri kullanılarak kalibrasyon eğrilerinin karakteristiği ve ilgili validasyon parametreleri Tablo 1'de özetlenmiştir.



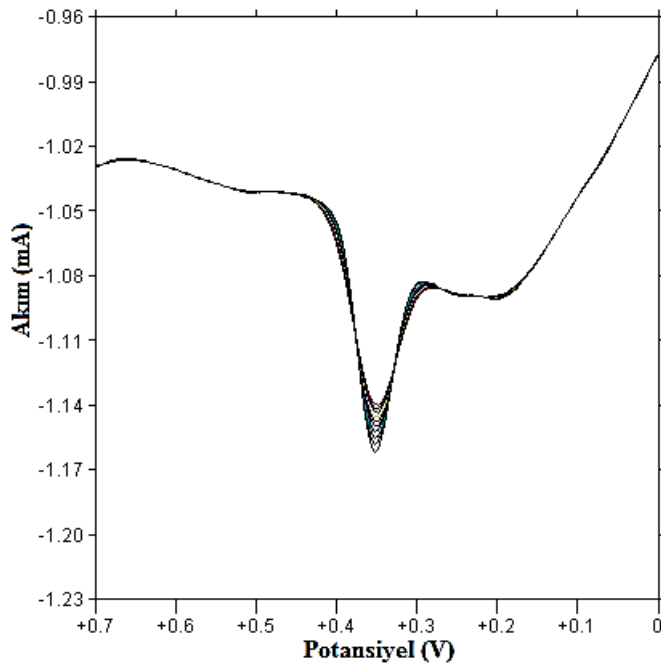
Şekil 9. (a) 100.0 - 491.22 μM Derişim Aralığındaki Benserazid'in, (a: Köreait Voltammogram) Modifiye CKE/PR/ÇDKN Elektrot Üzerinde Alınan DPV Yanıtları. (b) 100.00 - 491.22 μM Derişim Aralığında Benserazid'in Kalibrasyon Grafiği.



Şekil 10. 394.14 μM Derişimindeki Benserazid'in Modifiye CKE/PR/ÇDKN Elektrot Üzerinde Alınan Tekrarlı DPV Yanıtları



Şekil 11. (a) 10.00 - 95.77 μM Derişim Aralığındaki Levodopa'nın Modifiye CKE/PR/ÇDKN Elektrot Üzerinde Alınan DPV Yanıtları. (b) 10.00 - 49.03 μM Derişim Aralığında Levodopa'nın Kalibrasyon Grafiği.



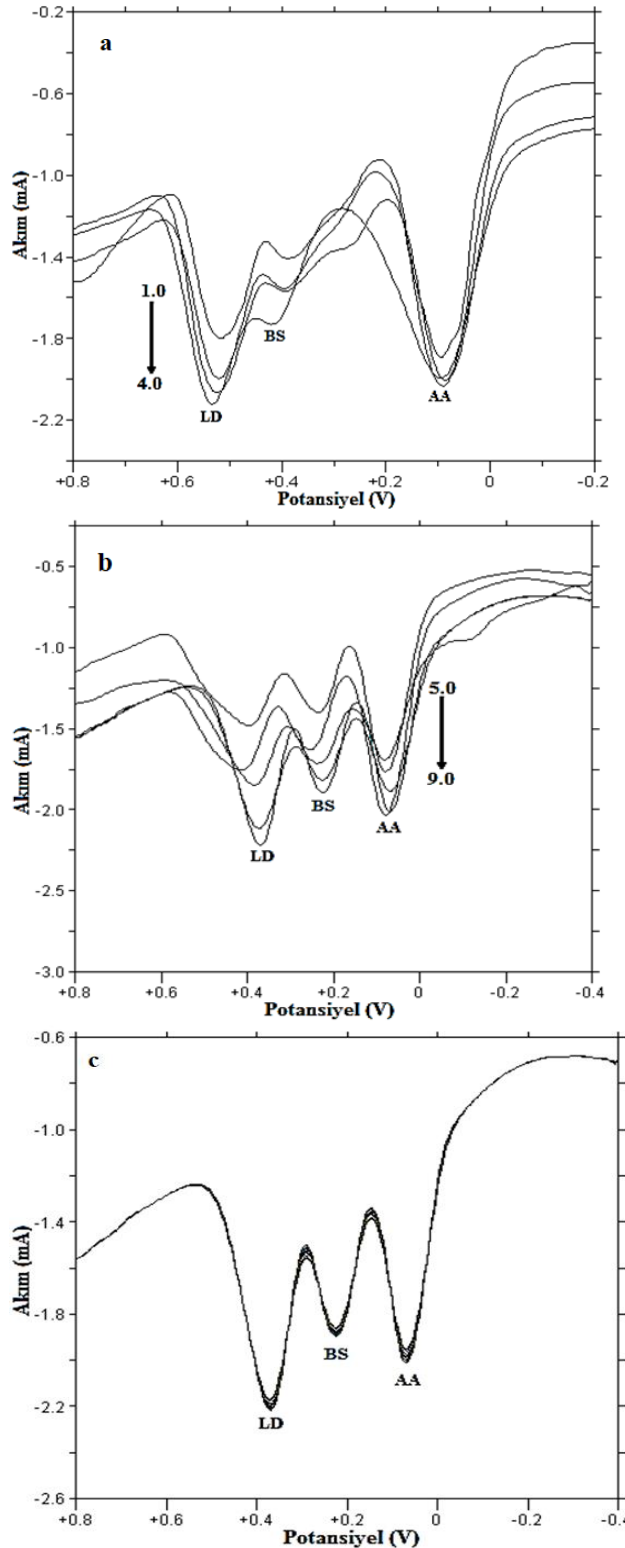
Şekil 12. 39.41 μM Derişimindeki Levodopa'nın Modifiye CKE/PR/ÇDKN Elektrot Üzerinde Alınan Tekrarlı DPV Yanıtları.

Tablo 1. Benserazid ve Levodopa'nın kantitatif tayininde modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrot ile elde edilen validasyon verileri

	Benserazid	Levodopa
Kalibrasyon eğrisinin denklemi	$I (\mu\text{A}) = 0.8422C(\mu\text{M}) - 4.4408$	$I (\mu\text{A}) = 2.2409C(\mu\text{M}) + 1.3544$
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	160	352
Doğrusallık Aralığı (M)	$1.0 \times 10^{-4} - 5.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-5} - 5.0 \times 10^{-5}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)	0.8422	2.2409
Kesişim (μA)	-4.4408	1.3544
Korelasyon Katsayısı	0.99732	0.99258
Eğimin Standart Sapması	0.0252	0.112

Kesişimin Standart Sapması	8.24	3.56
Tayin Sınırı (μM) (LOD)	1.99	3.65
Tayin Alt Sınırı (μM) (LOQ)	6.63	12.16
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%RSD)	8.80	4.46
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%RSD)	10.2	7.85
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%RSD)	39.04	35.91
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%RSD)	58.54	85.16

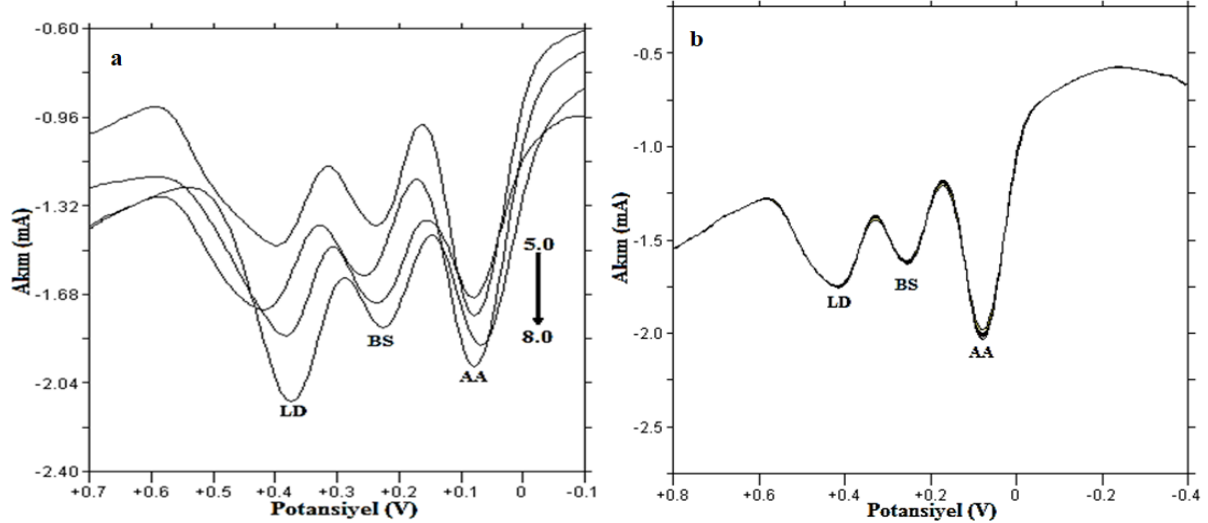
Levodopa ve Benserazid ikili karışım analizine girişimin etkisi: Levodopa ve Benserazid ikili karışımının, pH'ı 7.0 olan 0.1 M PBS elektrolit ortamında askorbik asit girişim etkisi çalışılmıştır. Bu amaçla, askorbik asit ve Benserazid derişimi sabit tutulup Levodopa derişimi arttırılmıştır. Şekil 13a incelendiğinde askorbik asit ve Benserazid pikleri aynı kalırken Levodopa pikleri lineer olarak artmaktadır. Ayrıca, Levodopa ve Benserazid ikili karışımının derişimi sabit tutulmuş ve askorbik asit derişimi arttırılmıştır (Şekil 13b). Levodopa ve Benserazid için pik akım yükseklikleri sabit kalırken, askorbik asit derişiminin artmasıyla orantılı olarak pik akım yükseklikleri artmıştır. İkili karışımın askorbik asit varlığında tayininde, ölçümün kararlılığını görebilmek için beş saniye aralıklarla arka arkaya on ölçüm alınmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 13c'de gösterilmiştir. Tüm analitlere ait pik potansiyellerinde herhangi bir kayma gözlenmezken, pik akım yükseklikleri de sabit kalmıştır. İkili karışımın fizyolojik pH değeri olan pH 7.0'de askorbik asit varlığında bu sonucu veriyor olması gerçek örneklerde, ikili karışımın bu yöntem ile doğrudan tayin edilebileceği konusunda umut vericidir.



Şekil 13. (a) 5 mM askorbik asit (AA) ve 0.1mM Benserazid (BS) varlığında Levodopa'nın (LD) (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mM), (b) 0.1mM LD, 0.1mM BS ve AA'in (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 mM), (c) 7.0 mM AA yanında 0.1mM BS ve 1.0 mM LD'nin PBS tamponunda modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrot üzerindeki DPV yanıtları.

Levodopa-Benserazid ikili karışımının, idrar örnekleri içerisindeki askorbik asit girişim etkisi çalışılmış ve numuneler hazırlanırken 1 mL idrar örneği alınıp 9 mL tampon ilave edilmiştir. Bu amaçla, Levodopa ve Benserazid derişimi sabit tutulup, askorbik asit derişimi

arttırılmıştır (Şekil 14a). Ayrıca, ikili karışımın idrar ortamında askorbik asit varlığında tayininde, ölçümün kararlılığını görebilmek için 5 s aralıklarla arka arkaya 10 ölçüm alınmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 14b'de gösterilmiştir. İdrar örneklerinde girişim etkisi çalışmaları, gerçek örneklerde de bu üç türün seçici bir şekilde çok iyi ayrılabilmesini ve tayin edildiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 14. a) 0.1mM LD, 0.1mM BS ve AA'in (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 mM), b) 0.1mM LD, 0.1mM BS ve AA (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 mM) İdrar Numunesinde Modifiye CKE/PR/ÇDKN Elektrot Üzerindeki DPV Yanıtları.

Gerçek numune uygulamaları ve geri kazanım çalışmaları: Levodopa-Benserazid (Madopar) ikili karışımlarını içeren tablet uygulamalarının uygun derişimde etken madde içerecek şekilde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 1.0 mL alınarak pH'ı 7.0 olan 0.1 M PBS elektroliti ile 10 mL'ye tamamlanarak 5 tekrar numunesi hazırlanmıştır. Bu numunelerin analizi modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrot ile DPV tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygun kalibrasyon grafiklerinden karışımdaki karşılık gelen etken madde miktarları bulunmuş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca aynı işlemler, idrar numunelerine standart madde eklenerek hazırlanan çözeltilere de uygulanmış, karışımdaki her bir etken maddenin miktarı ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

İdrar numunesinde yapılan uygulamada ise idrar 1:10 oranında 0,1 M PBS tamponu (pH 7,0) ile seyreltilerek etken maddelerin istenen derişim olacak şekilde belirli bir hacimde ilaç örneklerinden ilave edilmiştir. Madopar (100 mg Levodopa / 50 mg Benserazid) tablet numunesinin modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrot ile yapılan geri kazanım çalışmaları Tablo 2'de özetlenmiştir. Madopar tablet numunesine ve idrar numunesine Levodopa ve Benserazid standart maddelerinin eklenmesi sonucu modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrot üzerinde alınan yanıtların geri kazanım çalışmaları Tablo 3'te özetlenmiştir. Analitik çalışmalar ve elde edilen

geri kazanım değerleri uygulanan yöntemin, modifiye CE/PR/ÇDKN elektrotta, ikili karışımların tayininin yapılabilir olması yönünde olumlu sonuçlar göstermiştir.

Tablo 2. Madopar tablet numunesi için DPV yanıtlarından yararlanılarak hesaplanan sonuçlar

Numune	Tablette bulunan miktar (mg)		Ölçülen Miktar (mg)		% Geri Kazanım	
	LD	BS	LD	BS	LD	BS
1	1.972	0.986	1.9828	0.9675	100.55	98.13
2	1.972	0.986	1.9494	0.9039	98.86	91.68
3	1.972	0.986	1.9888	0.9186	100.86	93.17
4	1.972	0.986	1.9295	0.9191	97.85	93.22
5	1.972	0.986	1.9464	0.9597	98.71	97.34
				Xort^a	99.36	94.71
				SS^b	1.1508	2.5449
				%RSD^c	1.1582	2.6872
				%BH^d	0.6353	5.2928

^a Xort; bulunan sonuçların ortalamasını,

^b SS; standart sapmayı,

^c %RSD; değişkenlik katsayısını,

^d %BH; yüzde bağıl hatayı ifade etmektedir.

Tablo 3. Madopar tablet numunesine ve idrar numunesine standart etken maddelerin eklenmesiyle DPV yanıtlarından hesaplanan sonuçlar

Numune	Ölçülen Miktar (mg)						% Geri Kazanım				
	Eklenen miktar (mg)		Tablette		İdrarda		Tablette		İdrarda		
	LD	BS	LD	BS	LD	BS	LD	BS	LD	BS	
1	0.197	0.294	0.197	0.299	0.184	0.271	99.92	101.7	93.12	92.22	
2	0.197	0.294	0.189	0.271	0.185	0.277	96.07	92.22	93.74	94.48	
3	0.197	0.294	0.193	0.293	0.183	0.281	97.65	99.83	92.57	95.64	
4	0.197	0.294	0.201	0.281	0.182	0.279	101.9	95.64	92.16	95.10	
5	0.197	0.294	0.197	0.277	0.175	0.269	99.82	94.48	88.66	91.49	
							Xort	99.07	96.77	92.05	93.79
							SS	2.020	3.478	1.776	1.635
							% RSD	2.039	3.595	1.930	1.744
							% BH	0.928	3.232	7.951	6.214

SONUÇ VE ÖNERİLER

Pirólün elektropolimerizasyonu ve çok duvarlı karbon nanotüpler ile modifikasyonu ile elde edilen elektrotlar ile Levodopa ve Benserazid için en iyi yanıt araştırılmıştır. En iyi kararlılık, rezolüsyon ve en yüksek pik akımları, pH'ı 7.0 olan PBS ortamında CE üzerine polipirol kaplanıp üzerine 20 µL % 0.5'lik ÇDKN damlatılmasıyla elde edilen modifiye elektrotla gerçekleştirilmiştir. Metot validasyonu kapsamında, DPV tekniği ile pik akımının Levodopa ve Benserazid derişimlerine karşı çizilen kalibrasyon grafiklerinden, 10.00 - 49.03 µM Levodopa'nın derişim aralığında $I_{pa} (\mu A) = 2.2409C (\mu M) + 1.3544$ ve 100.00 - 491.22 µM Benserazidin derişim aralığında $I_{pa} (\mu A) = 0.8422C (\mu M) - 4.4408$ eşitlikleri elde edilmiştir. Tayin sınırları LD için 3.65 µM ve BS için 1.99 µM hesaplanmıştır. Tablet dozaj formunda ve idrar örneğinde geri kazanım çalışmalarında yüksek geri kazanımlar elde

edilmiştir. Girişim yapan askorbik asit varlığında etken maddelerin tayinleri eş zamanlı olarak seçici ve duyarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerin tablet matriksinden etkilenmeden geri kazanılabileceği yaptığımız çalışmalar ile önerilebilmektedir.

Sonuç olarak, yapılan bütün elektroanalitik çalışmalar sonucunda, Levodopa ve Benserazid karışımlarının hızlı, kolay, doğru, duyarlı, kesin, seçici ve herhangi bir ayırma işlemine ihtiyaç duyulmayan eş zamanlı voltammetrik tayininde, modifiye CKE/PR/ÇDKN elektrodun kullanılabileceği önerilebilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2013-54 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Aksoy, B., Pasahan, A., Gungor, O., Koytepe, S., Seckin, T. (2017). A novel electrochemical biosensor based on polyimide- boron nitride composite membranes. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66(4), 203-212.
- Atta, N. F., Galal, A., El-Gohary, A. R. (2020). Crown ether modified poly(hydroquinone)/carbon nanotubes based electrochemical sensor for simultaneous determination of levodopa, uric acid, tyrosine and ascorbic acid in biological fluids. *Journal Of Electroanalytical Chemistry*, 863, 114032.
- Beitollahi, H., Safaei, M., Tajik, S. (2020). Electrochemical deduction of levodopa by utilizing modified electrodes: A review. *Microchemical Journal*, 152, 104287.
- Dinc, E., Ustundag, O. (2002). Chemometric resolution of a mixture containing hydrochlorothiazide and amiloride by absorption and derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(1-2), 371-379.
- Ermer, J., Miller, J. H. (2005). *Method validation in pharmaceutical analysis*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Ghalehno, M. H., Mirzaei, M., Torkzadeh-Mahani, M. (2019). Electrochemical Determination of Levodopa on Carbon Paste Electrode Modified with Salmon Sperm DNA and Reduced Graphene Oxide-Fe₃O₄ Nanocomposite. *Russian Journal Of Electrochemistry*, 55(10), 933-942.
- Goodman, G., Rall, T. W., Nies, A.S., Taylor, P. (1990). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 18th Ed, New York: Pergamon Pres.
- Gungor, O., Pasahan, A., Cengiz, M. A., Koytepe, S., Seckin, T. (2015). Fructose-Based Polyurethane Membranes: Synthesis, Characterization, and Their Use as Voltammetric pH Electrode. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64(11), 563-569.
- Hu, C. G., Wang, W. L., Liao, K. J., Wang, Y. T. (2005). Simultaneous measurement of epinephrine and ascorbic acid at the carbon nanotube electrode. *Journal of Metastable and Nanocrystalline Materials*, 23, 305-308.
- Kuyumcu Savan, E., Erdogdu, G. (2017). Simultaneous determination of levodopa and benserazide using poly(3-methylthiophene) and a multi-walled carbon nanotube sensor. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 21(8), 2209-2217.
- Li, Z. Y., Gao, D. Y., Wu, Z. Y., Zhao, S. (2020). Simultaneous electrochemical detection of levodopa, paracetamol and l-tyrosine based on multi-walled carbon nanotubes. *RSC Advances*, 10(4), 14218-14224.

- Liu, A., Honma, I., Zhou, H. (2005). *Amperometric biosensor based on tyrosinase-conjugated polysacchride hybrid film: Selective determination of nanomolar neurotransmitters metabolite of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in biological fluid. Biosensors and Bioelectronics, 21, 809–816.*
- Marques, K. L., Santos, J. L., Lopes, J. A., Lima, J. L. (2008). *Simultaneous chemiluminometric determination of levodopa and benserazide in a multi-pumping flow system with multivariate calibration. Analytical Sciences, 24(8), 985-991.*
- Miraki, M., Karimi-Maleh, H., Taher, M. A., Cheraghi, S., Karimi, F., Agarwal, S., Gupta, V. K. (2019). *Voltammetric amplified platform based on ionic liquid/NiO nanocomposite for determination of benserazide and levodopa. Journal of Molecular Liquids, 278, 672-676.*
- Ommaty, R. (2009). *Vademecum Modern İlaç Rehberi. Ankara: 32ed PelikanYayınlari.*
- Ouveria-Caridade, C., Pauliukaite, R., Brett, C. M. A. (2008). *Development of electrochemical oxidase biosensors based on carbon nanotube-modified carbon film electrodes for glucose and ethanol. Electrochimica Acta, 5, 6732-6739.*
- Özkan, S. A., Uslu, B., Aboul-Enein, H. Y. (2003). *Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids Using Modern Electroanalytical Techniques. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 33, 155-181.*
- Pan, L., Guo, Y., Li, Z. (2010). *Simultaneous Determination of Levodopa, Benserazide and 3-O-Methylidopa in Human Serum by LC–MS–MS. Chromatographia, 72(7-8), 627-633.*
- Pasahan, A., Koytepe, S., Cengiz, M. A., Seckin, T. (2013). *Synthesis and characterization of polyurethanes containing glucose for selective determination of epinephrine in the presence of a high concentration of ascorbic acid. Polymer International, 62(2), 246-250.*
- Safaei, M., Beitollahi, H., Shishehbore, M. R. (2020). *Electrochemical Sensing of Levodopa in Presence of Tryptophan Using Modified Graphite Screen Printed Electrode with Magnetic Core-Shell Fe₃O₄@SiO₂/GR Nanocomposite. Surface Engineering and Applied Electrochemistry, 56(2), 184-191.*
- Savan, E. K., Erdogdu, G. (2019). *Application of Single-Walled Carbon Nanotube and Poly (3-Methylthiophene) Modified Sensors for Electrochemical Determination of Levodopa and Benserazide. Analytical & Bioanalytical Electrochemistry, 11(5), 585-597.*
- Savan, E. K., Pasahan, A., Aksoy, B., Gungor, O., Koytepe, S., Seckin, T. (2016). *Preparation and properties of selective polyurethane films and their use for the development of biomedical dopamine sensor. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 65(8), 402-408.*
- Tsang, S. C., Chen, Y. K., Harris, P. J. F., Green, M. L. H. (1994). *A simple chemical method of opening and filling carbon nanotubes. Nature, 372, 159-162.*
- Wang, J. X., Li, M. X., Shi, Z. J., Li, N. Q., Gu, Z. N. (2002). *Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes. Analytical Chemistry, 74, 1993-1997.*
- Wu, Z., Zhao, H., Xue, Y., He, Y., Li, X., Yuan, Z. (2010). *Poly (pyridine-3-boronic acid)/Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrodes for Simultaneous. Electroanalysis, 22(19), 2196-2201.*