

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARE DALGA SIYIRMA VOLTAMETRİSİ
KULLANILARAK MELİTTİNİN TAYİNİ VE ARI
ZEHİRİNE UYGULANMASI**

**Tezi Hazırlayan
Tuğba MELEKOĞULLARI**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ**

**Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Aralık 2014
NEVŞEHİR**



**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARE DALGA SIYIRMA VOLTAMETRİSİ
KULLANILARAK MELİTTİNİN TAYİNİ VE ARI
ZEHİRİNE UYGULANMASI**

**Tezi Hazırlayan
Tuğba MELEKOĞULLARI**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ**

**Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Aralık 2013
NEVŞEHİR**

Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ danışmanlığında **Tuğba MELEKOĞULLARI** tarafından hazırlanan “ **Kare Dalga Sıyrma Voltametrisi Kullanılarak Melittinin Tayini ve Arı Zehirine Uygulanması**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

19/12/2014

JÜRİ

Başkan : Prof. Dr. Fatma KARİPCİN

Üye : Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Aysel KEKİLLİOĞU

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun...26.12.2014...tarih ve...2014 / 50-67... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

15/01/2015
Doç. Dr. Şahin ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Tuğba MELEKOĞULLARI



TEŞEKKÜR

Tanıştığımız andan itibaren her konuda bana destek olan, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın her aşamasında, değerli bilgi ve önerileri ile beni yönlendiren çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ' a çok teşekkür ederim.

Değerli bilgilerini benimle paylaşan ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Sayın Prof. Dr. Haşim YILMAZ' a teşekkürlerimi sunarım

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, Sayın Yrd. Doç. Dr. Aysel KEKİLLİOĞLU'na, deneysel çalışmalarımda bana destek olan Mehtap ÇALIŞKAN'a ve Zonguldak Ereğli aracılar birliği başkanı Selahattin GÜNEY'e teşekkürlerimi sunarım.

Ve her zaman yanımda olup benden güvenlerini ve desteklerini esirgemeyen, ideallerimin gerçekleşmesi için bana güç ve enerji veren canım annem Sakine MELEKOĞULLARI'na, canım babam Zeki MELEKOĞULLARI'na, canım ablam Sevil MELEKOĞULLARI'na, her zaman yüreklerinin sıcaklığını bana hissettirdikleri için çok teşekkür ederim.

**KARE DALGA SIYIRMA VOLTAMETRİSİ KULLANILARAK MELİTTİNİN
TAYİNİ VE ARI ZEHİRİNE UYGULANMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğba MELEKOĞULLARI

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2014

ÖZET

Arı zehirinin en büyük toksik bileşeni olan melittin, amfipatik bir türdür ve 26 aminoasit içeren suda çözünebilen bir peptittir. Melittin güçlü hemolitik ve antimikrobiyal aktivite sergiler. Bu nedenle eser miktardaki melittin tayini önemlidir. Bu çalışmada kare dalga sıyırma voltametri (KDSV) kullanılarak melittinin tayini çalışılmıştır. Sulu ortam çalışmalarında Britton-Robinson (BR) tamponu, asılı cıva elektrodu kullanılırken susuz ortam çalışmalarında 0.1 M tetrabutylamonyum tetrafloroborat içeren asetonitril çözeltisi altın elektrot kullanılmıştır.

KDSV ile 0.1 M TBATFB içeren asetonitril elektroliti ortamında +160 mV'daki ferrosen pikinden yararlanılarak yapılan ferrosenin pik akımındaki azalma ile melittinin derişimi arasında, doğrusal olarak çalışılabilen aralık 40 – 240 nM olarak tespit edilmiş olup tayin edebilme sınırı 40 nM'dır. Geliştirilen metot arı zehirindeki melittinin tayinine başarı ile uygulanmıştır. Bazı inorganik ve organik tuzların melittin tayinine etkisi incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Melittin, Tayin, Balarısı Zehri, Kare Dalga Sıyırma Voltametri

Tez Danışman: Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ

Sayfa Adeti: 48

DETERMINATION OF MELITTIN USING SQUARE WAVE STRIPPING

VOLTAMMETRY AND APPLICATION TO HONEYBEE VENOM

(M. Sc. Thesis)

Tuğba MELEKOĞULLARI

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2014

ABSTRACT

Melittin, as the major toxin of honeybee venom, is a kind of amphipathic, water-soluble peptide consisting of 26 amino acids. Melittin exhibits powerful hemolytic and antimicrobial activity. Therefore, determination of trace melittin is very important. In this work the determination of melittin was studied using the Square Wave Stripping Voltammetry (SWSV). Aqueous medium studies were performed in Britton-Robinson (BR) buffer, at hanging mercury electrode, while the non-aqueous studies were carried out in acetonitrile solutions containing 0,10 M tetrabutylammonium tetrafluoroborate (TBATFB), at gold electrode. For the analytical SWSV method running at acetonitrile solutions containing 0,10 M TBATFB (belong to ferrocene peak at +160 mV), the relationship between fall in the peak current of ferrocene and melittin concentration was linear in the range of 40 to 240nM with a quantification (LOQ) limit of 40 nM. The proposed method was successfully applied to the determination of melittin various honeybee venom samples. The influences of some other commonly found inorganic and organic salts on the determination were also examined.

Keywords: *Melittin, Determination, Honeybee Venom, Square Wave Stripping Voltammetry,*

Thesis Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Ümmihan T. YILMAZ

Page Number: 48

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
1. BÖLÜM	1
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM.....	4
ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLER.....	4
2.1.Voltametri.....	4
2.1.1. Polarografi.....	6
2.1.2. Voltametrیده uyarma sinyalleri	7
2.1.3. Dönüşümlü voltametri.....	8
2.1.4. Diferansiyel puls voltametrisi	8
2.1.5. Kare dalga voltametrisi	9
2.1.6. Sıyırma voltametrisi	10
3. BÖLÜM.....	11

DENEYSEL ÇALIŞMALAR	11
3.1.Polarografi Cihazı	11
3.2. Hücre ve Elektrotlar	11
3.2.1. Altın elektrot	12
3.2.2. Camsı karbon elektrot	12
3.2.3. Asılı cıva elektrodu	12
3.2.4. Ag/Ag ⁺ elektrodu	12
3.2.5. Karşıt elektrot.....	12
3.2.6. Azot gazı	13
3.3. pH Metre	13
3.4. Altın Elektrotun Temizlenmesi	13
3.5. Reaktifler ve Özellikleri	13
3.5.1. Çözeltilerin hazırlanması.....	14
4. BÖLÜM	17
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	17
4.1.Melittinin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi, Tayini ve Analitik Uygulamaları....	17
4.2. Destek Elektrolit ve Elektrot Seçimi	17
4.2.1. Sulu ortam elektrolitleri.....	17
4.2.2. Susuz ortam elektrolitleri	18
4.3. Melittinin Susuz Ortamda Dolaylı Tayini	18
4.3.1. Camsı karbon elektrotta yapılan çalışmalar	19

4.3.2. Altın elektrotta yapılan çalışmalar	21
4.4. Girişim Çalışmaları	24
4.5. Geliştirilen Metodun Arı Zehirindeki Melittinin Tayinine Uygulanması	25
5.BÖLÜM	28
SONUÇLAR	28
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	34

TABLolar LİSTESİ

- Tablo 4.1. 10 mL 0,1 M TBATFB (asetonitrilde) elektrolitinde 0,1mL 10^{-3} M ferrosen olan hücreye eklenen 0,4 mL 10^{-6} M melittinin % hata hesaplanması.....21
- Tablo 4.2. KDSV yöntemi ile 10 mL 0,1 M TBATFB (asetonitrilde) elektrolitinde 1×10^{-6} mol/L (hücre içindeki derişim) melittinin miktar tayini.....22
- Tablo 4.3. KDSV yöntemiyle 10mL 0,1M TBATFB elektroliti ortamındaki 0,1mL 10^{-3} M ferrosenin, üzerine ard arda 0,4 mL 10^{-6} M melittin ilaveleriyle ferrosenin pik yüksekliğindeki azalmalar.....24
- Tablo 4.4. 10 mL TBATFB elektrolitinde ve 0,1 mL 1×10^{-3} M ferrosen çözeltisinde 1×10^{-6} M melittine bazı iyonların girişim etkilerinin KDSV yöntemi kullanılarak incelenmesi.....25
- Tablo 4.5. Arı zehiri içinde melittinin KDSV yöntemi kullanılarak tayini(%90 güven aralığı).....27

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.1. Melittinin X-ray yapısı.....1
- Şekil 2.1. Sulu ve susuz ortamlarda platin, cıva ve karbon elektrotların farklı destek elektrolitlerdeki çalışma potansiyeli aralıkları.....5
- Şekil 2.2. Dönüşümlü voltametrizde uygulanan potansiyelin zamanla değişmesi.....8
- Şekil 2.3. DPV uygulanan potansiyelin zamanla değişimi.....8
- Şekil 2.4. Kare dalga voltametrisinde [a] potansiyel-zaman, [b] potansiyel-akım grafiği.....9
- Şekil 2.5. Tersinir bir reaksiyon için kare dalga voltamogramı.....9
- Şekil 4.1. KDSV yöntemi kullanılarak 10,0 mL asetonitril içindeki TBATFB (0.1M) destek elektrolitindeki ferrosen pikinin melittin ilaveleri ile azalışını gösteren voltamogram.....19
- Şekil 4.2. KDSV yöntemi ile 10,0 mL DMSO_LiClO₄ (50 mmolar LiClO₄) destek elektrolitindeki 0,1 mL 1×10^{-3} M ferrosen pikinin melittin ilaveleri ile azalışını gösteren voltamogram.....20
- Şekil4.3. KDSV yöntemi ile 10,0 mL TBATFB (0.1M asetonitril) destek elektrolitindeki ferrosen pikinin 0,4 mL 10^{-6} melittin ilaveleri ile azalışını gösteren voltamogram.....22
- Şekil4.4. KDS yöntemiyle 10 mL 0,1 M TBATFB elektroliti ortamındaki 0,1mL 10^{-3} M ferrosenin, ard arda melittin ilaveleri ile ferrosenin pik akımında gözlenen azalmalardan yararlanarak çizilen kalibrasyon grafiği.....23
- Şekil4.5. KDSV ile alınan 10mL 0,1M TBATFB elektroliti ortamındaki 0,1mL 10^{-3} M ferrosen voltamogramı üzerine arı zehirli ve melittin ilavelerini gösteren voltamogram.....26

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 2.1. Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan üç elektrotlu hücre sistemi...6
- Resim 3.1. BAS model elektrokimyasal analizör.....11

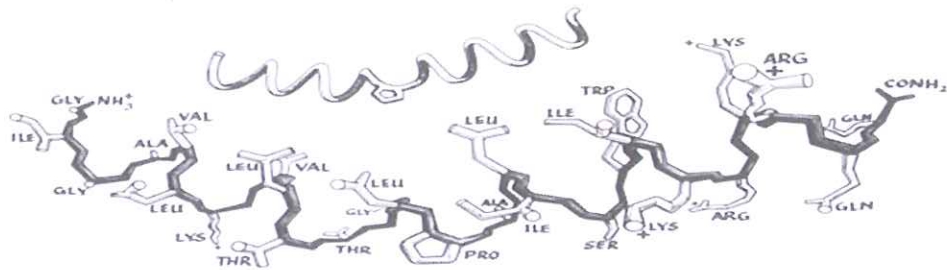
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

C	Madde derişimi ,(mmol/L)
I	Damla ömrü sonundaki akım, (A)
A	Elektrodun yüzey alanı, cm ²
M	Mol kütlesi
Ag /AgCl	Gümüş / Gümüş Klorür
E _p	Pik potansiyeli, (V)
E _{1/2}	Yarı dalga potansiyeli, (V)
ΔE	Puls genliğı (V)
E ⁰	Standart potansiyel, (V)
E _{pa}	Anodik pik potansiyeli, (V)
E _{pk}	Katodik pik potansiyeli, (V)
DPV	Diferansiyel Puls Polarografisi
CV	Dönüşümlü Voltametre
TBATFB	Tetra Butilamonyum Floroborat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
KDSV	Kare Dalga Sıyırma Voltametrisi
HAc/NaAc	Asetik asit-Sodyum asetat

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Melittin arı zehirinin ana bileşenlerinden olan ve günümüzde antikanser terapisini mümkün kılacak olan bir maddedir [1]. Melittin bazı kanser hücrelerinin büyümesini engelleyici etkiye sahiptir [2]. Protein yapıdaki melittin bağışıklık sisteminin düzenlemesi, beyin sinir iletimini uyarması, böylece sinir sisteminin düzenli çalışmasını sağlar [3]. Bal arısı zehirinin ve bileşimindeki melittinin radyasyondan kaynaklanan hasarı azaltmada değerli olabildiği gibi radyo terapiyle ilişkili yan etkilere karşı da profilaktik (önleyici) tedavi seçeneği sunduğu gösterilmiştir. Arı zehiri bileşenlerinin radyoprotektif etkilerini hematopoetik (kan hücreleri yapıcı doku ve organların oluşturduğu sistem) sistemi uyararak suretiyle oluşturdukları düşünülmektedir [4]. Kuru arı zehrinin yaklaşık %50'sini oluşturan ve peptid yapısında olan melittin lokal ve genel olarak toksik etki gösteren bir maddedir [5]. Arı zehrinin asıl etkisini sağlayan toksinler, değişik sayıda aminoasit içeren peptidlerdir [6]. Melittin, bu etkisiyle fosfolipaz A2 adlı enzimin parçalayıcı etkisine de yardımcı olur [7]. Melittin, farmakolojik ve fizyolojik olarak; antibakteriyel, antifungal (mantar büyümesine karşı etkili), sinir sistemini düzenleyici, radyasyondan koruyucu etkiye sahiptir [8]. Ayrıca ağrı kesici özelliğe sahiptir [9]. Arı zehiri fosfolipazı, bilinen en güçlü fosfolipazdır. Yılan zehirinininkinden ve memelilerdeki pankreatik fosfolipaz'dan daha etkilidir. Bu nedenle arı zehiri hücre zarlarını delip geçme gücüne sahiptir. Fosfolipazın hücreleri parçalamadaki etkinliğini zehir içerisinde bulunan melittin artırmaktadır [10].



Şekil 1.1. Melittinin X-ray yapısı [11]

Melittinin kapalı formülü $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$, molekül kütlesi 2846.4 g/mol melittin Melittin integument (kabuk, deri) yüzeyindeki mumsu maddeleri eritmekte ve zehirin

böcek vücuduna girmesini kolaylaştırmaktadır. Gerek ülkemiz insanı, gerekse ülkelerde bal arısı zehiri romatizmal rahatsızlıklar, eklem ağrıları ve MS hastalığı diye bilinen Multiple Sclerosis başta olmak üzere bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [13]. Ancak, arı zehirinin insanları tedavi edici etkisi üzerinde şimdiye kadar ilmi çalışmaların yapılmadığı belirtilmekte, fakat hayvanlarda anti-artritik (eklem iltihabını önleyici) etkiye sahip olduğunun tespit edildiği belirtilmektedir [13,14].

Apis mellifera arısından elde edilen arı zehiri açık renkte, kokusuz, su gibi sıvı bir madde olup, keskin ve acı bir tadı bulunur [15]. İçinde bulunan alarm feromonları nedeniyle hoş kokulu özellik taşır [16]. Berrak, asidik yapıda (pH=5,0-5,5) olan arı zehri, normal sıcaklıkta yaklaşık 20 dakikada kurur ve ağırlığının %65-70' ini kaybeder [17]. 0,25 g arı zehirinden sıvı kısım buharlaştıktan sonra yaklaşık 0,1 mg saf, kuru arı zehri elde edilir [18]. Saf kuru arı zehrinin rengi sarımtırak kahverengidir [19]. Arı zehri soğuğa ve sıcağa dayanıklıdır. Kurutulmuş arı zehri rutubetten korunursa birkaç yıl süreyle özelliklerini kaybetmez [20]. Arı zehirinin tedavi amaçlı kullanımının önündeki en büyük engel, bileşenlerinin farmakolojik özelliklerinin henüz net bir şekilde tanımlanmamış olmasıdır [21].

Yapısındaki birçok farmakolojik etkili unsurlarıyla arı zehri doğal ilaç olarak görülmektedir [22]. Arı zehri kimyasal olarak çok karmaşık bir yapıya sahip olup içerisinde birçok proteinler, enzimler, peptidler, ve aktif aminler bulunmaktadır [23]. Arı zehri 18'in üzerinde farmakolojik aktiviteye sahip bileşikten oluşmaktadır. Bunlardan en önemlileri Histamin, Melittin, Apamin, MCD-peptidi, Fosfolipaz A1- A2, Dopamin ve Hyaluronidaz enzimleridir [24]. İnsanlar için bu denli yararlı olan bal arısı, bazı hallerde insanları sokarak şiddetli alerjik reaksiyonlar ve önemli sayıda ölümlere sebep olmaktadır [25].

Melittin tayini için yapılan literatür araştırmasında fazla sayıda çalışmaya rastlanmamıştır. Konu ile ilgili bulunan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Zhou ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi yöntemlerini kullanarak melittin ve apamin tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde lineer çalışma aralığı melittin için 1-100 µg/ mL; tayin edilebilme sınırı 1 µg/ mL olarak tespit edilmiştir [26].

Lam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ^{13}C -NMR spektroskopisi kullanılarak melittinin yapısında bulunan amino asitler belirlenmiştir [27]. Kapiler elektroforez yöntemi kullanılarak melittinin arı zehirinden alınması ve tayini için kolon koromatografisi kullanılarak hızlı bir yöntem geliştirilmiştir. Kapiler duvara analitin adsorpsiyonunu arttırmak için düşük pH' lı tamponda çalışılmıştır [28].

Bu çalışmada eser miktardaki melittinin tayini için yeni, hızlı, tekrarlanabilirliği yüksek ve ard arda fazla sayıda numuneye kısa sürede uygulanabilecek bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. BÖLÜM

ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLER

Elektrokimyasal yöntemler, maddenin indirgenme veya yükseltgenme olaylarını inceleyen yöntemlerdir. Diğer analitik yöntemlere göre bazı üstünlüklere sahiptirler. Birincisi, elektrokimyasal ölçümler çoğu kez bir elementin özel bir yükseltgenme veya indirgenme basamağına özgüdür. Örneğin; elektrokimyasal yöntemler bir seryum (III) ve seryum (IV) karışımında her bir türün derişiminin tayinini mümkün kılar, buna karşılık diğer analitik yöntemlerin çoğu, ayırma yapılmadığı sürece toplam seryum derişimini saptayabilirler. Yani elektroanalitik yöntemler ile türlendirme çalışmaları çok kolay bir şekilde yapılabilir. Elektrokimyasal yöntemlerin ikinci bir üstünlüğü ise kullanılan cihazların nispeten ucuz olmasıdır. Elektroanalitik teknikler çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler ve ara yüzeylerdeki yük aktarımının stokiyometrisi, elektrot tepkime hızı, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon, kemisorpsiyon ve denge sabitleri gibi bilgileri de içeren çok sayıda bilgi verirler [29].

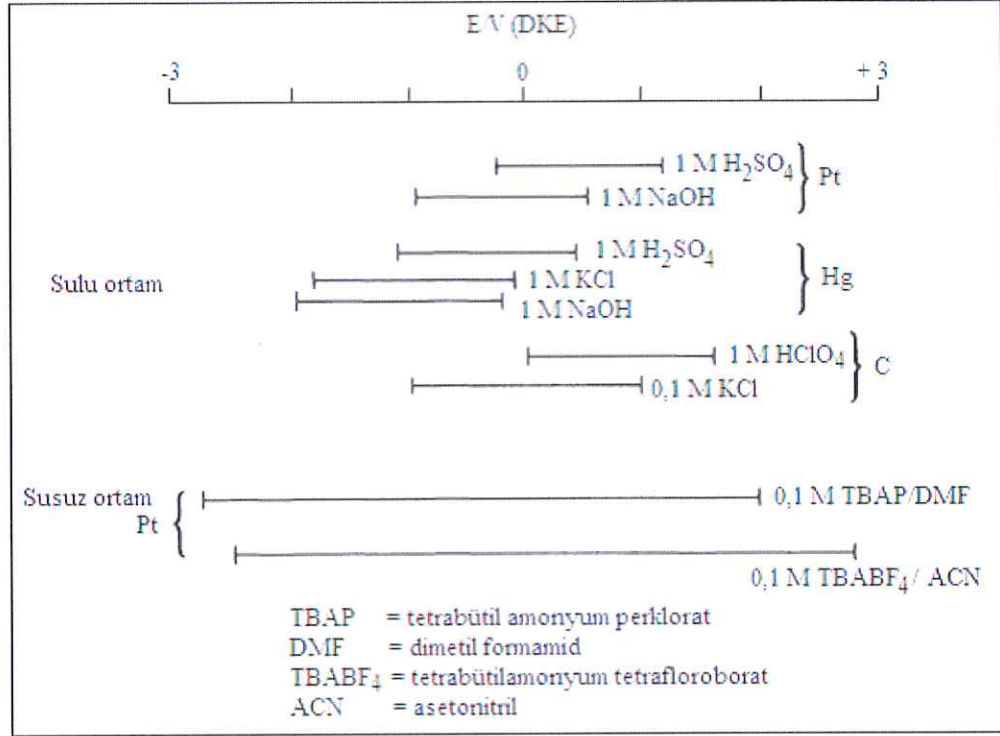
2.1. Voltametri

Voltametri Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından, 1920'lerin başında geliştirilmiştir [30].

Voltametri, çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesine dayanan elektroanalitik yöntemlere verilen isimdir. Genellikle polarizasyonu sağlamak için voltametricde kullanılan çalışma elektrotları yüzey alanı birkaç milimetre kare ve bazılarında ise birkaç mikrometre olan mikroelettrotlardır [31].

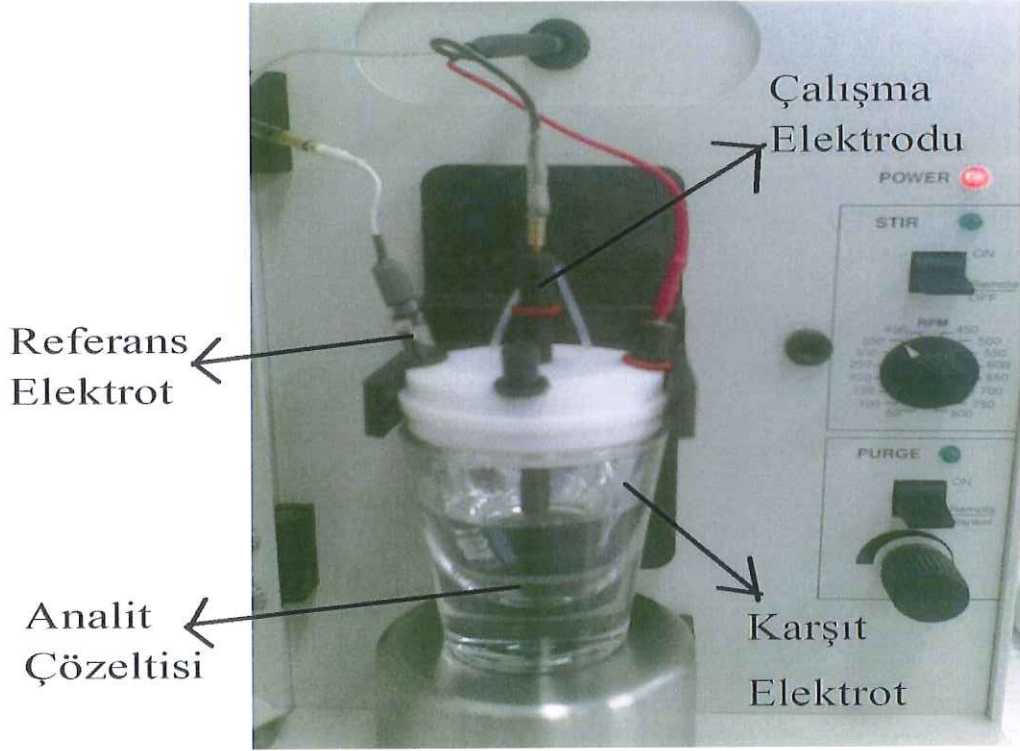
Voltametricde deneyler üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirilmektedir. Üç elektrottan birisi zamanla potansiyeli değiştirilen indikatör elektrot veya çalışma elektrodudur. Voltametricde indikatör elektrot olarak, cıva, platin, altın, paladyum, karbon elektrot (grafit, karbon pasta elektrot, camsı karbon, karbon cloth elektrot) gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Elektrot sistemindeki ikinci elektrot, potansiyeli deney süresince sabit kalan referans elektrottur. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrottur. Elektrot sistemindeki üçüncü elektrot ise karşıt veya

yardımcı elektrottur. Karşıt elektrot olarak ise genellikle Pt tel kullanılır [32]. Şekil 2.1'de sulu ve susuz ortamlarda çeşitli çalışma elektrotlarının kullanılabilir potansiyel aralıkları verilmiştir [33].



Şekil 2.1. Sulu ve susuz ortamlarda platin, cıva ve karbon elektrotlarının farklı destek elektrolitlerdeki çalışma potansiyeli aralıkları

Kullanılan elektrotların cinsine, uygulanan akım ve potansiyelin şiddetine ve denge nin bozulma hızına bağlı olarak çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Eğer çalışma elektrodu damlayan cıva elektrodu ise yöntem polarografi adını alır. Asılı duran cıva damlası veya bir katı elektrot kullanılırsa sabit elektrot voltametrisidir [30]. Voltametik hücrelerde kullanılan elektrotların gösterimi Şekil 2.2.'de gösterilmiştir [34].



Resim 2.1. Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan üç elektrotlu hücre sistemi

Voltametrik yöntemler analitik yönden önemli avantajlar sağlamaktadır. Bunlardan en önemlisi hem organik hem de inorganik türler için geniş çalışma aralığı (10^{-12} - 10^{-1} M) ile çok yüksek hassasiyette çalışılmasıdır. Yine voltametrik yöntemlerde çok sayıda çözücü, elektrolit ile geniş sıcaklık aralığında çalışılabilmekte ve birkaç analitin tayini hızlı bir şekilde aynı anda gerçekleştirilebilmektedir. Voltametrik yöntemler kinetik ve mekanik parametrelerin incelenmesine de olanak sağlamaktadır [33].

2.1.1. Polarografi

Polarografi, 1927 yılında Çek bilim adamı J. Heyrovsky tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. 30 yıl öncesine kadar doğru akım polarografisi ile sınırlı kalan bu yöntem son gelişmeler ile çok başvurulan duyarlı ve güvenilir bir duruma gelmiştir.

Polarografide akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir. Elektrot üzerinde henüz tepkime olmadığı zaman küçük olsa da bir akım gözlenir. Bu akıma artık akım denir.

Maddenin yükseltgenmesinden veya indirgenmesinden kaynaklanan bir akım artışı olur ve sonra akım sabit hale gelir. Bu akıma da sınır akımı denir. Sınır akım ile artık akım arasındaki yükseklik dalga yüksekliğidir. Dalga yüksekliği elektroaktif maddenin derişimi ile doğrusal olarak artar. Bu özellik nedeniyle polarografi nicel analizlerde kullanılır [30].

Polarografik deneyler oksijensiz ortamlarda gerçekleştirilir. Çünkü bütün çözücülerde oksijen az veya çok çözünür. Çözünmüş oksijen molekülü elektrot üzerinde indirgenir. Bu indirgenme iki basamaklıdır. Birincisi -0,05 voltta peroksida indirgenmesi, ikincisi ise -0,9 voltta gözlenen peroksidin suya indirgenmesi tepkimesidir. Bu potansiyeller ortamın pH'ına göre değişim gösterir. Bu tepkimelerin oluşumu ile polarografide 0,0 ve -1,0 volt arası gibi birçok indirgenme tepkimesinin gözleendiği bir bölge kapatılmış olur. Bunu önlemek için deney öncesinde çözülden azot veya argon gazı gibi inert bir gaz geçirilerek çözünmüş oksijen ortamdaki uzaklaştırılır [30].

Deney yapılan hücrede maddenin elektroda göçü üç şekilde gerçekleşir. Bunlar:

Konveksiyon: (Mekanik karıştırma ve ısısal karıştırma) Çözeltinin sabit hız ve sıcaklıkta homojen olarak karıştırılmasıyla gerçekleşir.

Elektrostatik çekim: (iyonik göç) Uygulanan potansiyelin elektrotları yüklemesi sonucu, elektrotların çözültideki iyonları elektrostatik kuvvet uygulayarak çekmesi veya itmesidir.

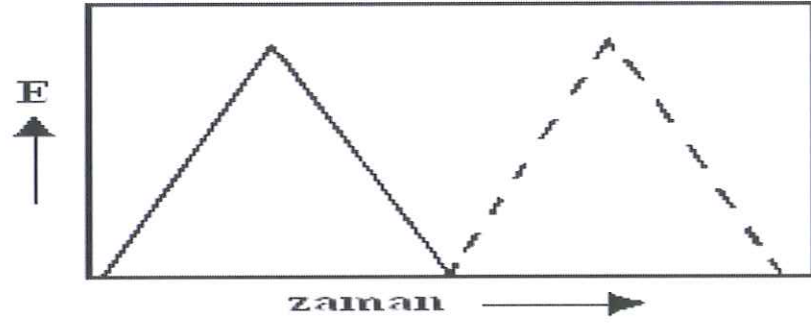
Difüzyon: Maddenin derişik olduğu bölgeden(ana çözültiden), seyreltik olduğu bölgeye (elektrot yüzeyine) hareketidir.

2.1.2. Voltametrizde uyarma sinyalleri

Voltametrizde bir mikroelektrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Metodun temelini teşkil eden bu uyarma sinyali karakteristik akımlar oluşturur. Dört çeşit uyarma sinyali vardır. Bunlarda bir tanesi doğrusal taramalı, iki tanesi puls tipi uyarma sinyali, kare dalga ve diferansiyel puls sonuncusu da dönüşümlü voltametridir [30].

2.1.3. Dönüşümlü voltametri

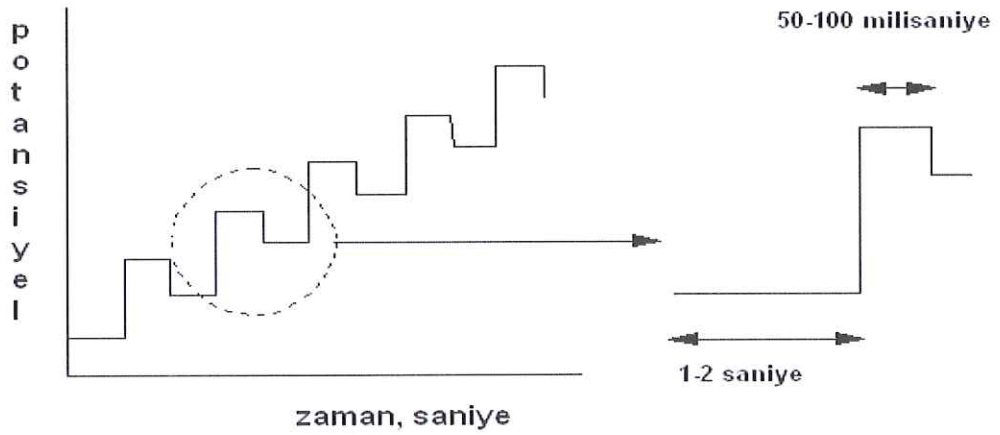
Tarama hızı bir damla ömrü için 100–200 mV/s civarında tutulursa ve belli bir potansiyelden sonra ilk tarama yönünde tarama yapılırsa bu voltametrik yöntem dönüşümlü voltametri (CV) adını alır. CV’ de uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği aşağıda verilmiştir. [30].



Şekil 2.2. Dönüşümlü voltametri uygulanan potansiyelin zamanla değişimi

2.1.4. Diferansiyel puls voltametri

Bu yöntemde normal polarografideki artan doğru akım potansiyeline, damlaya doğru, sabit genlikli pulsar bindirilir. Akım puls uygulamasından önce ve puls uygulamasının sonuna doğru ölçülür. Akım arasındaki fark potansiyele karşı grafiğe geçirildiği için polarogram pik şeklinde çıkar. Pikin tepe noktasındaki potansiyel pik potansiyelidir.

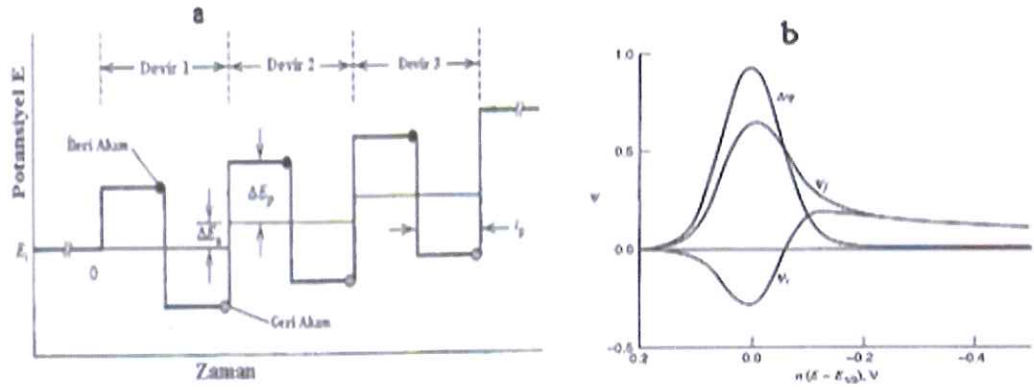


Şekil 2.3. DPV uygulanan potansiyelin zamanla değişimi

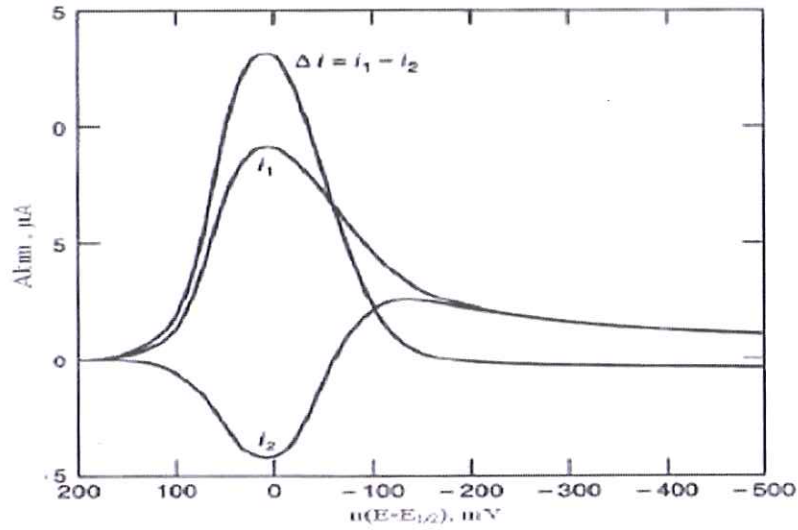
DPV'nin diğer polarografik yöntemlerden farkı, potansiyel zaman ayarlaması ve akım ölçme düzeneğinin kapasitif akımın etkisinin en aza indirilmesini sağlayacak bir şekilde olmasıdır [30].

2.1.5. Kare dalga voltametrisi

Bu yöntem son derece hızlı ve duyarlı olmasından dolayı diğer yöntemlere üstünlük sağlamıştır. Voltamogramın tamamı 10ms'den daha az sürede elde edilir [31].



Şekil 2.4. Kare dalga voltametrisinde [a] potansiyel-zaman, [b] potansiyel-akım grafiği
Şekilde kare dalga voltametrisinde elde edilen basamaklı sinyal görülmektedir. Basamaklı sinyalde her basamağın boy ve puls periyodu eşit olup bu yaklaşık 5ms civarındadır.



Şekil 2.5. Tersinir bir reaksiyon için kare dalga voltamogramı

Yukarıdaki şekilde tersinir bir reaksiyonun kare dalga voltamogramı görülmektedir. Kare dalganın anodik ve katodik bölgesindeki iki noktaya ait akım değerlerinin farkları alınarak akım hesaplanır. Yani elektrot tepkimelerinde yükseltgenme ve indirgenmede oluşan akım farkları alınır. Akımlardan birinin değeri negatif olduğu için fark akımların toplamını verir. Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} M olduğundan dolayı hem süresinin daha kısa olması hem de tayin sınırının düşük olmasından dolayı madde analizlerinde çok kullanılan bir yöntemdir [30].

2.1.6. Sıyırma voltametri

Eser elementlerin tayini için duyarlı metotlara duyulan ihtiyacı karşılamak için son 20 yılda sıyırma teknikleri geliştirilmiştir. Karışım analizlerine uygulanabilirliği, cihazların ucuzluğu ve ölçüm kolaylığı sebebiyle analizcilerin dikkatleri bu metot üzerinde yoğunlaşmaktadır. Elektroanalitik metotlar içerisinde en duyarlısı sıyırma metotlarıdır.

Bu yöntemle analizde, analizi yapılacak madde seyreltik çözeltilerden indirgenme veya yükseltgenme suretiyle alınarak elektrot yüzeyinde biriktirilir. Bu basamakta yapılan işlem bir elektrokimyasal ön deriştirme işlemidir. Daha sonra elektroda pozitif (anodik) veya negatif (katodik) yönde potansiyel taraması uygulanır. Bu tarama esnasında elektrot yüzeyinde yoğunlaşmış madde indirgenme veya yükseltgenme ile elektrot yüzeyinden sıyrılarak tekrar çözeltilere geri kazanılır. Metoda sıyırma voltametri adı verilmesinin sebebi iste bu basamak dolayısıyladır. Bu esnada oluşan akım ölçülerek madde miktarı tayin edilir. Bu yöntemle 10^{-6} ile 10^{-9} M aralığında çözeltilerin analizi yapılabilir [30].

3. BÖLÜM

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1.Polarografi Cihazı

Kare dalga sıyırma voltametrisinin (KDSV) yapıldığı çalışmalarda elektrokimyasal sistem: Bioanalytical Systems Electrochemical Analyzer BAS epsilon potentiostat/galvanostat cihazı ve BAS C3 elektrot hücre standı kullanıldı.

Cihazının ana kısımları Resim 3.1' de görülmektedir.



Resim 3.1. BAS model elektrokimyasal analizör[36]

3.2. Hücre ve Elektrotlar

Çalışmalarda üç elektrotlu sistem kullanılmıştır.

Sulu ortamda gerçekleştirilen elektrokimyasal çalışmalarda, Ag/AgCl referans elektrodu (BAS MF-2052), CGME hücre standında yer alan cıva kılcalındaki (BAS MF-2092, 100 μm) asılı cıva çalışma elektrot ve karşıt elektrot olarak Pt tel (BAS MW-1032) kullanılmıştır.

Susuz ortam çalışmalarında ise 0,10 M tetrabutilamonyum tetrafloroborat, dimetilsülfoksitteki (50mmol/L LiClO_4) çözeltileriyle temasta olan Ag tel (Ag/Ag^+)

(DMSO/LiClO₄) referans elektrodu hazırlandı ve çalışma elektrodu olarak altın, camsı karbon elektrotları, karşıt elektrot olarak Pt tel (BAS MW-1032) kullanıldı.

3.2.1. Altın elektrot

1,6 mm çapında teflona gömülmüş altın elektrot kullanılmıştır [36].

3.2.2. Camsı karbon elektrot

Camsı karbon, gaz geçirmeyen ve kimyasal etkilere dirençli izotropik bir madde olup elektrik iletkenliği oldukça iyidir. Teflon ile kaplanmış camsı karbonun ucu alüminyum ile parlatılmıştır.

3.2.3. Asılı cıva elektrodu

Kare dalga sıyırma voltametrisinde çalışma elektrodu olarak kullanılan asılı cıva damla elektrodunda kullanılan cıva, Merck'ten sağlanmıştır. Kare dalga sıyırma voltametrisinde eser düzeyde madde tayini yapıldığı için kullanılan cıvanın oldukça temiz olması gerekmektedir.

3.2.4. Ag/Ag⁺ elektrodu

Kare dalga sıyırma voltametrisinde (KDSV) referans elektrot olarak Ag/Ag⁺ (DMSO/LiClO₄) kullanılmıştır ve cam hücre içerisinde bulunan analit çözeltiliye temas edecek şekilde hücreye bağlanmıştır (0,00949 g AgNO₃ alınıp, 50 mmol / 100mL DMSO karışımından 5 mL alınıp çözeltisi hazırlanmıştır).

3.2.5. Karşıt elektrot

Platin tel (BAS MW-1032) karşıt elektrot olarak kullanılmış ve cam hücre içerisinde bulunan analit çözeltilisine temas edecek şekilde hücreye bağlanmıştır.

3.2.6. Azot gazı

Polarogramlarda oksijenin indirgenmesine ait dalgalar gözlenebilir. Bu nedenle bir maddenin voltamogramı alınmadan önce, ortamda çözünmüş olan oksijenin uzaklaştırılması gerekir. Bunun için maddenin çözeltisinden inert bir gaz olan azot gazı geçirilmiştir.

3.3. pH Metre

pH ölçümleri WTW pH/ION 735 (WTW Instruments, Germany) model dijital pH metre kullanılarak yapılmıştır.

3.4. Altın Elektrotun Temizlenmesi

Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan katı çalışma elektrotlarının yüzeylerinin son derece temiz olması gerekmektedir. Bu nedenle, her bir maddeyle ilgili yeni bir elektrokimyasal çalışmaya başlamadan önce kullanılacak elektrotlar özenle aşağıda belirtilen yöntemle temizlenmiştir. 1, 3 ve 15 µm boyutlarındaki alüminadan hazırlanmış yüzey temizleme süspansiyonları ve üzerinde dairesel hareketler çizilerek temizleme yapılmasını sağlayan yüzey temizleme petleri bulunmaktadır. Elektrotları temizlemeye başlamadan önce, uygun temizleme pedi seçilerek, kullanılacak kısmı az miktarda saf suyla ıslatıldı. Üzerine önce büyük boyutta alüminadan hazırlanan yüzey temizleme süspansiyonundan birkaç damla damlatılarak dairesel hareketlerle elektrot yüzeyi temizlendi. Daha sonra aynı işlemler, daha küçük boyutlardaki alüminadan hazırlanan yüzey temizleme süspansiyonlarıyla da tekrarlandı. Yüzeyi temizlenen elektrot son olarak önce asetona sonra destek elektrolit çözeltisine daldırılarak ultrasonik banyoda 5'er dakika tutuldu ve böylece kullanıma hazır hale getirildi [37].

3.5. Reaktifler ve Özellikleri

Deneylerde kullanılan bütün çözeltiler analitik saflıkta olup çözeltiler saf su ile hazırlanmıştır. Asılı cıva damla elektrodunda kullanılan cıva yüksek saflıktadır ve Merck'ten sağlanmıştır. Kullanılan reaktifler ve özellikleri aşağıda verilmiştir:

1) Melittin: (C₁₃₁H₂₂₉N₃₉O₃₁), 2846.4 g/mol Merck

- 2)Asetonitril: (C₂H₇N), d=0,78 kg/ L, 41,05 g/mol, Sigma-Aldrich
- 3)TBATFB: (CH₃CH₂CH₂CH₂)₄NBF₄, 467,515 g/mol, Merck
- 4)DMSO: (CH₃)₂SO, 78,13g/mol, Sigma-Aldrich
- 5)Ferrosen: 186,03 g/mol, Merck.
- 6)Gallik asit: (C₇H₆O₅), 170,12. g/mol, Merck.
- 7)Dopamin: (C₈H₁₁O₂N) 189,64 g/mol, Merck
- 8)Kadmiyum Nitrat tetrahidra: Cd(NO₃)₂ 4H₂O, 308,47 g/mol, Sigma-Aldrich
- 9)Selenyum dioksit: (SeO₂), 110,959 g/mol, Sigma
- 10)Sodyum sülfid: (Na₂SO₃), 126,04 g/mol, Sigma-Aldrich
- 11)Asetik asit: (CH₃COOH) , d=1,05 kg/L; %100' lük; 60,05 g/mol, Sigma-Aldrich
- 12)Fosforik asit: (H₃PO₄) , d= 1,71 kg/L; 98 g/mol, % 85, Riedel
- 13)Borik asit: (H₃BO₃), 61,83 g/mol, Sigma
- 14)Çinko nitrat heksahidrat: (Zn(NO₃)₂. 6 H₂O), 297,4 g/mol, Merck
- 15)Sodyum hidroksit: (NaOH), 40 g/mol, Sigma-Aldrich
- 16)Kurşun(II) nitrat: (Pb(NO₃)₂), 331,20 g/mol, Merck
- 17)Hidroklorik asit: (HCl) , d=1,19 kg/L; % 37; 36,46 g/mol, Sigma-Aldrich

3.5.1. Çözeltilerin hazırlanması

10⁻³ mol/L Melittin stok çözeltisinin hazırlanması:

0,01g melittin katısı tartıldıktan sonra 3,5 mL saf su ile çözüldü.

0,01 mol/L TBATFB stok çözeltisinin hazırlanması:

3,2927 g TBATFB katısı tartılıp asetonitril ile çözüldükten sonra 100mL'lik balon jodede asetonitril ile 100mL'ye tamamlanmıştır.

10⁻³ mol/L ferrosen çözeltilerinin hazırlanması

0,186 g ferrosen katısı tartılıp 0,10 M LiClO₄ asetonitril ortamında çözümlenip 25mL'lik balon jodede 0,10 M LiClO₄ asetonitril ile 25mL'ye tamamlanmıştır.

Arı zehirinin çözeltisinin hazırlanması:

0,015g arı zehri katısı tartılıp kültür tüpünde 2mL'ye tamamlanmıştır.

0,1 mol/L Gallik asit stok çözeltisi

1,70 g.Gallik asit katısı tartılmış ve saf su ile çözüldükten sonra 100 mL' lik balon jodede saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır

0,1 mol/L HCl (%37 'lik d=1,19 g/mL)

HCl çözeltisinden 0,83 mL ölçülü balona alınarak saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır

0,1 M NaOH çözeltisi:

0,40 g NaOH katısı tartılmış ve saf su ile çözüldükten sonra 100 mL'lik balon jodede saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0,1 M H_2PO_4^- - HPO_4^{2-} tamponu:

9,08 g KH_2PO_4 ve 11,87 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ayrı ayrı tartılıp, saf su ile çözüldükten sonra 1,0 L' ye tamamlanmış ve uygun miktarlarda karıştırılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır.

1,0 M HAc/NaAc tampon çözeltisi:

57,2 mL derişik asetik asit çözeltisine, saf suyla yıkanmış 6,0 g katı NaOH eklenmiş ve saf su ile ölçülü balonda 1,0 L' ye tamamlanmıştır. pH-metre kullanılarak çözelti, çalışma ortamına uygun pH'lara ayarlanmıştır.

Britton-Robinson (B-R) tamponunun hazırlanması:

Britton-Robinson tampon çözeltisinin hazırlanması için 2,3 mL saf asetik asit; 2,7 mL %85' lik fosforik asit ve 2,5 g borik asit karıştırılıp saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan B-R tamponu 0,1 M NaOH veya 0,1 M HCl çözeltisinden damla damla ilave edilerek pH'sı istenilen değerlere ayarlanmıştır.

0,02 M H_2SO_4 çözeltisi:

0,279 mL % 95-97' lik H_2SO_4 çözeltisinden alınarak saf su ile 250 mL' ye tamamlanmıştır. pH'sı istenilen değerlere ayarlanmıştır.

Çeşitli iyonların stok çözeltilerinin hazırlanması:

Deneylerde kullanılan iyonların 0,01 M' lık stok çözeltileri hazırlanmıştır. Seyreltik çözeltilerin derişimleri zamanla değışebileceğinden, stok çözeltiler 1×10^{-3} M' lık çözeltilere seyreltilmesiyle günlük olarak hazırlanmıştır.

0,01 M Se(IV) çözeltisi: 0,055 g SeO_2 tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL'ye tamamlanmıştır.

0,01 M SO_3^{2-} çözeltisi: 0,126 g Na_2SO_3 tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0,01 M Zn^{2+} çözeltisi: 0,1487 g $Zn(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 50 mL'ye tamamlanmıştır.

0,01 M Cd^{2+} çözeltisi: 0,308 g $Cd(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 M Pb(II) çözeltisi: 0,331 g $Pb(NO_3)_2$ tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL'ye tamamlanmıştır.

10^{-3} M dopamin çözeltisi 0,0018 g dopamin tartılıp saf su ile çözülmüş ve ölçülü balona alınarak 100 mL'ye tamamlanmıştır.

4. BÖLÜM

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Melittinin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi, Tayini ve Analitik Uygulamaları

Kare dalga sıyırma voltametri (KDSV) ile yapılan çalışmalarda eser miktardaki melittinin tayini için yeni bir yöntem geliştirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla, destek elektrolit olarak asetonitril içindeki TBATFB (0.1M) (tetra bütil amonyum tetra fluoro borat) tamponun en uygun destek elektroliti olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir. Çalışma elektrodu altın elektrot olarak belirlenmiştir. Çalışma ortamı ve kullanılacak elektrot belirlendikten sonra, ferrosenin KDS voltamogramı alınan hücreye çeşitli derişimlerde melittin ilaveleri yapılmıştır. Yapılan melittin ilaveleri ile ferrosenin pik akımında azalmalar olduğu gözlenmiştir. Bu azalmaların eklenen melittin miktarı ile orantılı olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem arı zehirindeki melittin tayini için kullanılmıştır. Arı zehiri içindeki melittinin tayini için geliştirilen yöntemin seçiciliğini belirlemek amacıyla, çeşitli iyonların girişim etkileri incelenmiştir.

4.2. Destek Elektrolit ve Elektrot Seçimi

4.2.1. Sulu ortam elektrolitleri

Melittinin elektroaktif olduğu elektrot ve sulu ortam elektrolit çözeltisini belirlemek amacıyla asılı cıva elektrodu üzerinde (0 - -2200 mV aralığında) BRT, fosfat, sülfirik asit ve sülfat iyonları destek elektroliti kullanılarak çeşitli derişimlerdeki melittinin voltamogramları kare dalga sıyırma voltametri (KDSV) yöntemini kullanarak alınmıştır. 1×10^{-3} - 1×10^{-6} M melittin aralığında pH=2, pH=4, pH=6,5, pH=10 BRT, Fosfat pH=6,5 ve sülfirik asit pH=6,5 elektrolitleri ortamında voltamogramlar kaydedilmiştir.

Melittinin tayini için, yukarıda bahsedilen destek elektrolitten voltametri hücresine 10,0'ar mL alınmış ve çözelti içinde çözünmüş halde bulunan oksijeni uzaklaştırmak için içerisinde 5 dakika % 99,999 saflıkta azot gazı geçirilmiş KDSV yöntemi kullanılarak voltamogramları kaydedilmiştir.

Melittinin standart çözeltisinden hücreye ard arda yapılan her ilaveden sonra da hücreden azot gazı geçirilerek, voltamogramlar kaydedilmiştir.

Melittine ait herhangi bir indirgenme piki gözlenmemiştir. Bu nedenle melittinin doğrudan tayini yapılamamıştır.

Dolaylı tayininin yapılabilirliğini araştırmak için demir (III) iyonlarının bulunduğu ortama melittin ilaveleri yapılarak melittinin iyonla etkileşimi sonucu yeni bir pikin oluşup oluşmadığı araştırılmıştır [38]. Yapılan bu çalışmada da melittinin derişimi ile orantılı olarak artan bir indirgenme pikine rastlanamamıştır. Bu nedenle sulu ortamda melittinin dolaylı tayini gerçekleştirilememiştir.

4.2.2. Susuz ortam elektrolitleri

Melittinin pik akımından yararlanarak doğrudan tayini için, melittinin elektroaktif olduğu (yükseltgenme piki verdiği) elektrolit ortamı ve katı (camsı karbon, altın, Pt gibi) elektrotlar araştırılmıştır.

Bu amaçla susuz ortam elektrolitlerinden DMSO_LiClO₄ (50 mM LiClO₄ 50mL DMSO) ve asetonitril içindeki 0,1 M TBATFB destek elektrolitleri ile camsı karbon elektrodu veya altın elektrot kullanılarak melittinin voltamogramları alınmıştır. Ard arda standart melittin çözeltisi ilaveleri ile KDSV yöntemi kullanılarak 0-2000mV potansiyel arlığında alınan voltamogramlarda melittine ait herhangi bir yükseltgenme piki gözlenmemiştir.

Yukarda bahsedilen çalışmalar sonucunda melittine ait herhangi bir yükseltgenme piki gözlenemediği için, melittinin doğrudan tayininin yapılamayacağı anlaşılmıştır. Bunun üzerine susuz ortamda melittinin ferrosen anyonu yardımı ile dolaylı tayini araştırılmıştır.

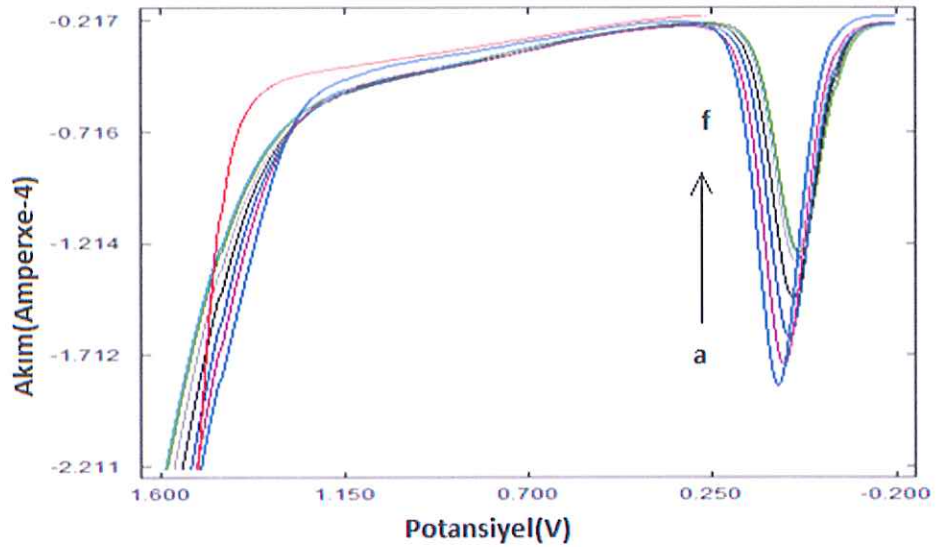
4.3. Melittinin Susuz Ortamda Dolaylı Tayini

Çalışılan ortamlarda melittinin kantitatif tayinine olanak sağlayan herhangi bir pike rastlanmamıştır. Melittinin çeşitli iyonlarla etkileşim oluşturup tayinini sağlayacak yeni bir pikin ortaya çıkması ve bu pikin akımından yararlanarak melittinin dolaylı tayini

amaçlanmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda susuz ortamda ferrosenin tayinine olanak sağlayacak yükseltgenme piki verdiği tespit edilmiştir [39]. Bunun üzerine melittin-ferrosen etkileşmesi olup olmadığı bu etkileşimden kaynaklanan yeni pikin gözlenip gözlenmediğinin araştırılması amaçlanmıştır. Altın ve camısı karbon elektrotlarında derişimi tam olarak bilinen ferrosenin voltamogramı KDSV yöntemi kullanılarak alınmış, ardından hücreye ard arda standart melittin eklemeleri yapılmıştır.

4.3.1. Camısı karbon elektrotta yapılan çalışmalar

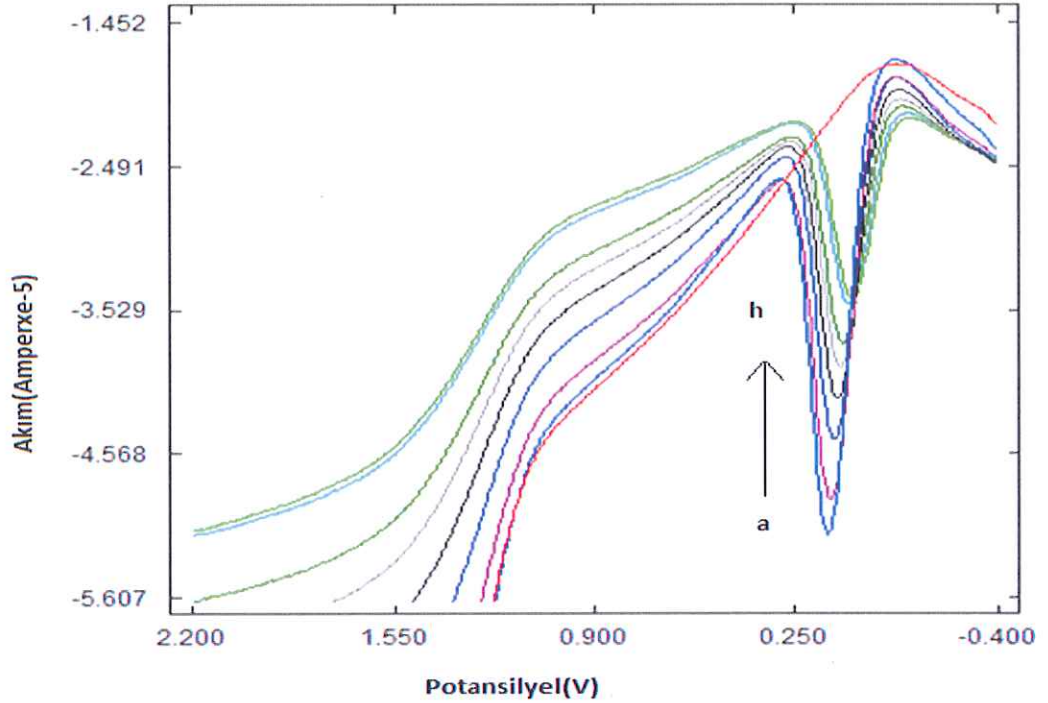
Çalışma elektrotu camısı karbon olan hücreye 10 mL TBATFB (0.1M) alınmış ve çözelti içinde çözülmüş halde bulunan oksijeni uzaklaştırmak için içerisinde 5 dakika % 99,999 saflıkta azot gazı geçirilerek destek elektrolitlere ait voltamogramlar KDSV yöntemiyle 0-2000 mV aralığında tarama yapılmıştır. Ardından 10^{-3} M 0.1 mL ferrosen eklemesi yapılarak çözülmüş oksijeni uzaklaştırmak için çözülden azot gazı geçirilmiştir. Alınan voltamogramda ferrosenin yükseltgenmesine ait +89 mV'ta keskin bir pik kaydedilmiştir. Daha sonra ard arda hücreye 10^{-6} M 0.4 mL melittin ilaveleri yapılmıştır. Standart Melittin ilaveleri ile ferrosenin pik akımında azalmalar gözlenmiştir. Ferrosen piki akımındaki azalmaların, eklenen melittin derişimi ile orantılı olmadığı için melittinin tayini bu ortamda gerçekleştirilememiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. KDSV yöntemi kullanılarak 10,0 mL asetonitril içindeki TBATFB (0.1M) destek elektrolitindeki ferrosen pikinin melittin ilaveleri ile azalışını gösteren voltamogram

- a) 10,0 mL TBATFB (0.1M) + 0,1 mL 1×10^{-3} M ferrosen
- b) a + 0,4 mL 1×10^{-6} M melittin
- c) b + 0,8 mL 1×10^{-6} M melittin
- d) c + 1,2 mL 1×10^{-6} M melittin
- e) d + 1,6 mL 1×10^{-6} M melittin
- f) e + 2,0 mL 1×10^{-6} M melittin

Yine çalışma elektrodu camsı karbon elektrot olan hücreye DMSO_LiClO₄ (50 mmolar LiClO₄ 50mL DMSO) çözeltisinden 10 mL alındı ve her çekimin ardından oksijeni uzaklaştırmak için azot gazı geçirildi. KDSV yöntemi kullanılarak voltamogramı alınıp kaydedildi. Daha sonra 10^{-3} M 0.1 mL ferrosen hücreye eklenip voltamogramı +147 mV'ta kaydedildi. Hücreye standart 0,1 mL 10^{-4} M melittin ilaveleri yapıldı. Standart melittin ilaveleri ile ferrosenin pik akımında azalmalar gözlemlendi. Bu çalışma 10^{-5} - 10^{-6} M melittin ile tekrar edildi. Ferrosen pikindeki azalmalar melittin derişimi ile orantılı olmadığı için melittin tayini yapılamadı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. KDSV yöntemi ile 10,0 mL DMSO_LiClO₄ (50 mmolar LiClO₄) destek elektrolitindeki 0,1 mL 1×10^{-3} M ferrosen pikinin melittin ilaveleri ile azalışını gösteren voltamogram

- a) 10,0 DMSO_LiClO₄ + 0,1 mL 1×10^{-3} M ferrosen

- b) a + 0,4 mL 1×10^{-6} M melittin
- c) b + 0,8 mL 1×10^{-6} M melittin
- d) c + 1,2 mL 1×10^{-6} M melittin
- e) d + 1,6 mL 1×10^{-6} M melittin
- f) e + 2,0 mL 1×10^{-6} M melittin
- g) f + 2,4 mL 1×10^{-6} M melittin
- h) g + 2,8 mL 1×10^{-6} M melittin

4.3.2. Altın elektrotta yapılan çalışmalar

Çalışma elektrodu altın elektrot olan hücreye 10 mL asetonitril içindeki TBATFB (0.1 M) alınarak azot gazı geçirilerek çözeltide çözülmüş olan oksijen uzaklaştırıldıktan sonra voltamogram KDSV yöntemi ile kaydedilmiştir. 10^{-3} M 0.1 mL ferrosen ilave edilerek voltamogramda ferrosen çözeltisine ait yükseltgenme piki +110 mV'ta gözlenmiştir. Ardından hücreye 10^{-6} M 0.4 mL melittin ilaveleri yapıldı. Standart melittin ilaveleri ile ferrosen pikinde azalmalar gözlendi (Şekil 4.3). Ferrosen pikindeki azalmaların standart melittin miktarıyla orantılı olduğu anlaşıldı (Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.) .

Tablo 4.1. 10 mL 0,1 M TBATFB (asetonitrilde) elektrolitinde 0,1mL 10^{-3} M ferrosen olan hücreye eklenen 0,4 mL 10^{-6} M melittinin % hata hesaplanması

$X_{\text{eklenen(melittin)(M)}}$	$X_{\text{bulunan(melittin)(M)}}$	% Hata
4×10^{-6}	$4,01 \times 10^{-6}$	+0,2
	$4,10 \times 10^{-6}$	+2,5
	$3,91 \times 10^{-6}$	-2,1
	$4,06 \times 10^{-6}$	+1,6
	$4,14 \times 10^{-6}$	+3,7

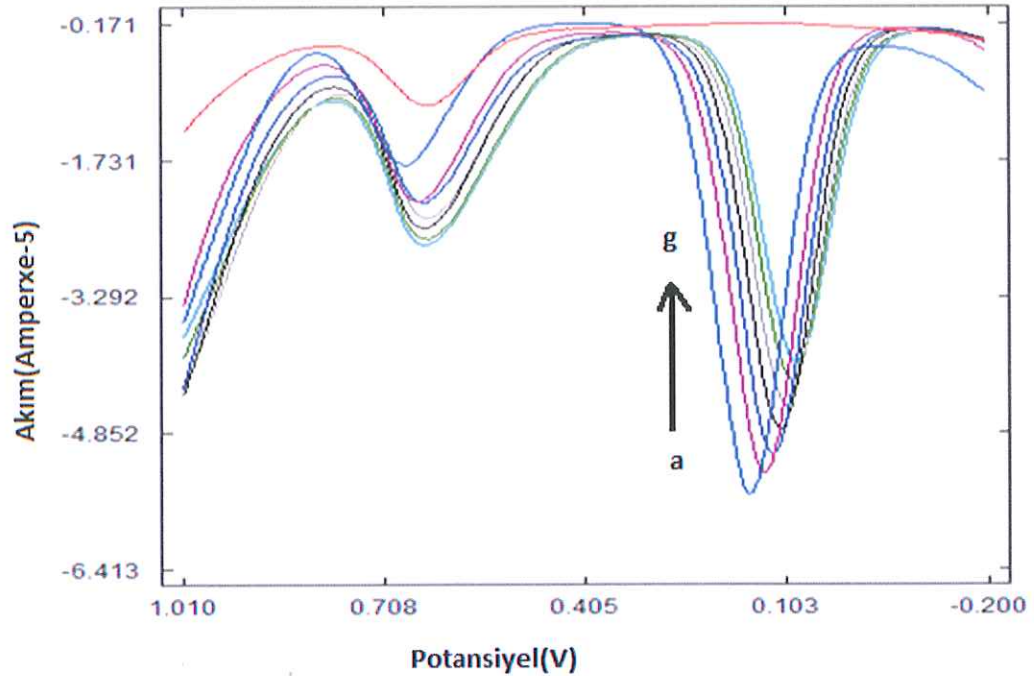
(%90 Güven Aralığında) N=5

Tablo 4.2. KDSV yöntemi ile 10 mL 0,1 M TBATFB (asetonitrilde) elektrolitinde 1×10^{-6} mol/L (hücre içindeki derişim) melittinin miktar tayini

melittin (M)	S	melittin $\pm ts/N^{1/2}$	% BSS
$4,06 \times 10^{-8}$	$0,34 \times 10^{-8}$	$(4,06 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	8,5

(%90 Güven Aralığında) N=5

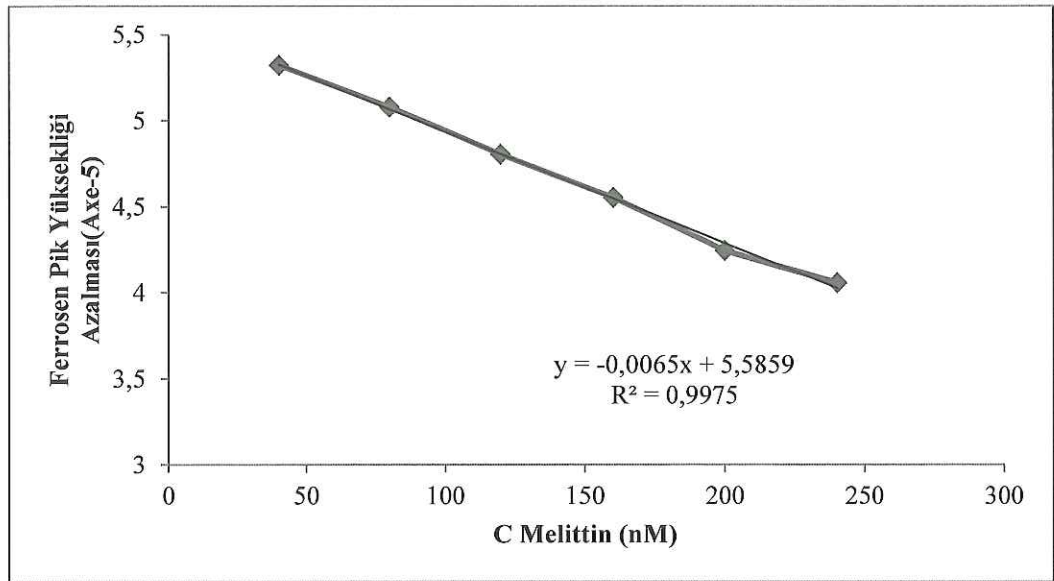
Eser miktardaki melittin tayini için alınan en iyi sonuç çalışma elektrodu olarak altın elektrotun kullanıldığı TBATFB (0.1M asetonitril ile hazırlanan) destek elektroliti ortamında kare dalga sıyırma voltametrisi yöntemi ile elde edilmiştir. Melittinin miktar tayini ferrosen-melittin etkileşimi sonucunda, ferrosenin pik akımındaki azalmadan yararlanarak gerçekleştirilmiştir. Ferrosenin pik yüksekliğindeki azalma, standart melittin ilaveleriyle orantılı olduğu ve melittin tayini için kullanılabilceği anlaşılmıştır. Geliştirilen bu ortamda standart ekleme yöntemi ile melittinin tayini gerçekleştirilmiştir.



Şekil4.3. KDSV yöntemi ile 10,0 mL TBATFB (0.1M asetonitril) destek elektrolitindeki ferrosen pikinin 0,4 mL 10^{-6} melittin ilaveleri ile azalışını gösteren voltamogram

- a) 10,0 TBATFB (0.1M)+ 0,1 mL 1×10^{-3} M ferrosen
- b) a + 0,4 mL 1×10^{-6} M melittin
- c) b + 0,8 mL 1×10^{-6} M melittin
- d) c+ 1,2 mL 1×10^{-6} M melittin
- e) d+ 1,6 mL 1×10^{-6} M melittin
- f) e+ 2,0 mL 1×10^{-6} M melittin
- g) f+ 2,4 mL 1×10^{-6} M melittin

Melittinin tayin edilebilir aralığını belirlemek için kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. Melittinin 1×10^{-8} , 1×10^{-7} ve 1×10^{-6} mol/L'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Melittinin tayin sınırını belirlemek için ilk olarak hücreye 10,0 mL asetonitril içinde 0,1 M TBATFB bulunan elektrolit içine 0,1 mL 10^{-3} M ferrosen ilave edilip voltamogramı alınmıştır. Ardından ard arda hücreye 0,4 mL 1×10^{-6} mol/L'lik melittin çözeltilerinden ilaveler edilerek voltamogramlar kaydedilmiştir ve ferrosenin pik akımındaki azalmalardan yararlanılarak melittinin tayini için kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.4, Tablo 4.3.). 10,0 mL asetonitril içindeki 0,1 M TBATFB elektroliti ve 0,1 mL 10^{-3} M ferrosen, ortamında hücreye farklı derişimlerdeki melittin çözeltilerinin standart eklemeleriyle 40 nM – 240 nM aralığında ferrosenin pik akımındaki azalma ile eklenen melittin derişimi arasında doğrusal bir ilişki belirlenmiştir.



Şekil 4.4. KDS yöntemiyle 10 mL 0,1 M TBATFB elektroliti ortamındaki 0,1mL 10^{-3} M ferrosenin, ard arda melittin ilaveleri ile ferrosenin pik akımında gözlenen azalmalardan yararlanarak çizilen kalibrasyon grafiği

Tablo 4.3. KDSV yöntemiyle 10mL 0,1M TBATFB elektroliti ortamındaki 0,1mL 10^{-3} M ferrosenin, üzerine ard arda 0,4 mL 10^{-6} M melittin ilaveleriyle ferrosenin pik yüksekliğindeki azalmalar

Hücredeki Melittinin C(nM)	Ferrosenin Pik yüksekliği (10^{-3} A)
40	5,323
80	5,08
120	4,805
160	4,552
200	4,244
240	4,057

Bu çalışma melittin derişimleri 1×10^{-8} ve 1×10^{-7} M melittin olan çözeltilerle de tekrar edilmiş ancak bu çalışmalarda melittin eklemeleri ile ferrosenin pik akımındaki azalmaların orantılı olmalığı tespit edilmiştir.

Melittinin tayini için geliştirilen dolaylı yöntem kullanılarak ve kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak tayin alt sınırı 40 nM olarak belirlenmiştir (genel olarak tayin alt sınırı için Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınmıştır).

4.4. Girişim Çalışmaları

Çalıştığımız yöntemle melittinin seçiciliğini belirlemek için arı zehrinde bulunabilecek bazı iyonların ve organik maddelerin girişim etkileri incelenmiştir. Bu iyonlar ve organik maddeler Cd^{+2} , gallik asit, Na^+ , NO_3^- , Se^{+4} , SO_3^{-2} , Pb^{+2} , Zn^{2+} , dopamin, şeklinde sıralanır.

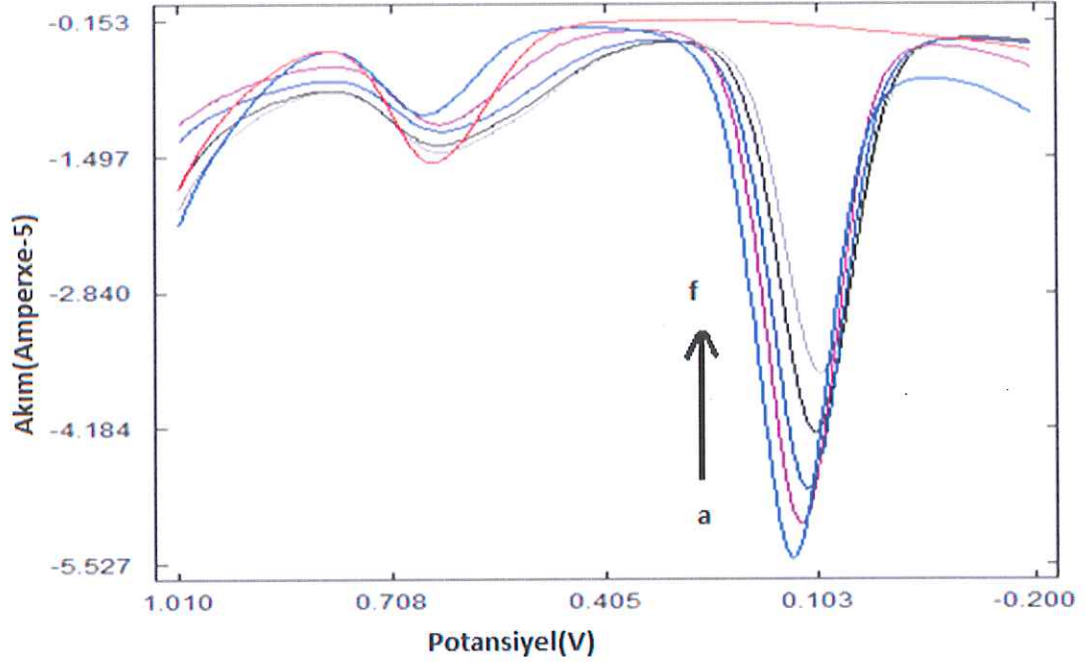
Girişim etkilerini incelemek için 10 mL TBATFB (0,1 M) elektrolit bulunan hücreye 0,1 mL 10^{-3} M ferrosenin çözeltisi ilavesi yapıldı ve kare dalga sıyırma voltametri yöntemiyle voltamogramı kaydedildi. Ardından 0,4 mL 1×10^{-6} M melittin ilavesi yapıldı. Daha sonra girişimi incelenmek istenen madde 0,1 mL 10^{-3} M olarak ayrı ayrı hücrelere ilave edildi. Ölçümler kaydedilip geri kazanım hesaplamaları yapıldı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. 10 mL TBATFB elektrolitinde ve 0,1 mL 1×10^{-3} M ferrosen çözeltisinde 1×10^{-6} M melittine bazı iyonların girişim etkilerinin KDSV yöntemi kullanılarak incelenmesi

Girişim Etkisi İncelenen İyonlar 0,1 mL 1×10^{-3} M	Melittinin % geri kazanımı
Cd^{2+}	115
Zn^{2+}	115
Na^+	92,5
NO_3^-	102,5
Se^{4+}	110
SO_3^{2-}	92,5
Pb^{2+}	102,5
Dopamin	82,5
Gallik asit	117

4.5. Geliştirilen Metodun Arı Zehirindeki Melittinin Tayinine Uygulanması

Arı zehirinin en aktif komponenti, melittindir. Melittin arı zehirindeki enzimlerden çok daha küçük olan bir proteindir. Arı zehrinin etkin mekanizmalarından biri de yapısındaki pek çok aktif aminoasit, mikro elementler ve protein yapısındaki melittin sayesinde bağışıklık sisteminin düzenlemesi, beyin sinir iletimini uyarması, böylece sinir sisteminin düzenli çalışmasını sağlamasıdır. Arı zehri karadeniz arıcalar birliğinden temin edilmiştir. 0,015g arı zehri tartılarak, numuneye 2 mL saf su ilave edilmiş oluşan bu çözelti ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilerek oluşan çözeltinin homojenize olması sağlanmıştır. Çözelti kullanıma hazır hale getirilmiştir. 10 mL 0,1 M TBATFB elektroliti bulunan çözeltinin voltamogramı KDSV ile alınıp kaydedildikten sonra 0,1 mL 10^{-3} M ferrosen çözeltisi eklenmiş ve voltamogramı kaydedilmiştir. Daha sonra hazırlanan arı zehri çözeltisinden 0,3 mL hücreye ard arda iki defa eklenip ayrı ayrı KDSV ile voltamogramları kaydedilmiştir. Ardından hücreye 0,4 mL 10^{-6} M melittin ilaveleri yapıp voltamogramları alınmıştır. Bu azalmalardan yararlanarak arı zehirindeki melittin miktarı tespit edilmiştir. Geliştirilen metot ile arı zehirindeki melittinin tayini gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5'de arı zehri çözeltisindeki melittin tayini için yapılan çalışmadan elde edilen voltamogramlar gösterilmiştir.



Şekil4.5. KDSV ile alınan 10mL 0,1M TBATFB elektroliti ortamındaki 0,1mL 10^{-3} M ferrosen voltamogramı üzerine arı zehiri ve melittin ilavelerini gösteren voltamogram

- a) 10 mL 10^{-6} M TBATFB
- b) a+0.1 mL 0.0399M ferrosen
- c) b+0.3 mL arı zehri
- d) c+0.6 mL arı zehri
- e) d+0.4mL melittin 10^{-6} M
- f) e+0.8 mL melittin 10^{-6} M

Bu çalışma 3 kez tekrarlanmıştır. Deneyle sonuçunda arı zehri çözeltisindeki melittinin miktarı tespit edilmiştir. Arı zehrinde bulunan melittin değerlerinin ortalamaları alınarak Q testi, güven aralığı 95 olmak üzere uygulanmış ve arı zehrinde bulunan melittin miktarları içerisinde çok farklı değerlerde olanların ortalamaya katılıp katılmayacağı belirlenmiştir. Bu sonuca göre hesaplanan melittinin miktarlarının hepsinin ortalamaya katılacağına karar verilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Arı zehiri içinde melittinin KDSV yöntemi kullanılarak tayini(%90 güven aralığı)

$\bar{X}_{\text{melittin}}$ (mg melittin/100 g arı zehirinde)	S	$\bar{X}_{\text{melittin}} \pm ts/N^{1/2}$	N	% BSS
423	30	423±29	3	14

5.BÖLÜM

SONUÇLAR

Melittin ile ilgili yapılan çalışmalar özet halinde sırasıyla aşağıda verilmiştir.

Asılı cıva elektrodu üzerinde KDSV kullanılarak yapılan çalışmalarda, pH=6,5 Sülfürik Asit, pH=6,5 Fosfat tamponu, BRT(pH=10-2) elektrolitleri kullanılarak, hücreye ard arda melittin ilaveleri ile melittinin her hangi bir pikine rastlanmamıştır.

Camsı karbon elektrot üzerinde KDSV kullanılarak yapılan çalışmalarda DMSO_LiClO₄(50 mM LiClO₄ / 50mL DMSO), asetonitril içindeki 0,1 M TBATFB elektrolitleri kullanılmış, melittinin elektroaktif olmadığı tespit edilmiştir.

Altın elektrot üzerinde KDSV kullanılarak yapılan çalışmada asetonitril içindeki 0,1 M TBATFB elektroliti kullanılmış melittinin elektroaktif olmadığı tespit edilmiştir.

En uygun çalışma ortamının altın elektrot ile asetonitril içindeki 0,1 M TBATFB elektrolit ortamında 0,1 mL 10⁻³ M ferrosenin voltamogramı alınarak hücreye ard arda standart melittin çözeltisi eklenmesi ile ferrosenin pik akımında azalma olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmada 10 mL 0,1 M TBATFB elektroliti içine 0,1 mL 10⁻³ M ferrosen çözeltisi ilavesi ile alınan voltamogramda +160 mV da yükseltgenme piki gözlenmiştir. Ardından standart melittin ilavelerinin derişimleri ile ferrosenin yükseltgenme pik şiddetindeki azalmaların orantılı olduğu tespit edilmiş ve dolaylı tayin amaçlı kullanılmıştır. Standart melittin eklemeleri ile gözlenen ferrosen pik akımındaki azalmalardan yararlanarak melittinin destek elektrolitteki tayini için kalibrasyon grafiği çizilmiş ve doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Melittinin tayin edilebilme sınırı sinyal/gürültünün 10 katı alınarak 40 nM olarak tespit edilmiştir.

Melittinin tayini için geliştirilen yöntemin seçiciliğini belirlemek amacıyla Cd²⁺, Na⁺, NO₃⁻, Se⁴⁺, SO₃²⁻, Pb²⁺, Zn²⁺, Gallik asit, Dopamin gibi organik ve inorganik maddelerin melittinin tayinine girişim etkileri incelenmiştir (Tablo 4.4). İncelenen organik ve inorganik maddelerin varlığında melittinin geri kazanımının %82,5-%117 aralığında olduğu belirlenmiştir. Melittin için yüksek geri kazanım değerleri elde

edilmiştir. Bu da melittinin tayini için geliştirilen yöntemin seçiciliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

KDSV ile geliştirilen yöntemin gerçek numunelere uygulamasını kontrol etmek amacıyla, önerilen metot arı zehiri numunesine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Bu uygulamalar sonucunda arı zehiri içindeki melittin miktarı (423±29) melittin / g arı zehiri; olarak bulunmuştur (N=3 %90 güven aralığı).

Melittinin tayini için KDSV ile geliştirilen yöntem basit, hızlı ve ucuz olduğundan arı zehiri numunesindeki melittinin hızlı tayini için mükemmel alternatif bir yöntem olarak önerilebilir.

Literatürde melittin tayini için çok az sayıda makale bulunmaktadır. Elektrokimyasal yöntemle yapılmış herhangi bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu çalışma ile literatürdeki bu eksiklik kısmen giderilmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Son D.J. , Lee J.W. ,Lee Y.H. ,Song H.S. , Lee C. K. , Hong J.T. ,“Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti cancer effects of bee venom and its constituent compounds”*Cncal. Prlogy. & Thpecs.*, 115, 246–270, 2007.
2. Gajski G., Vera Garaj-Vrhovac, “Melittin: A lytic peptide with anticancer properties”, *Envitl Toxicity and Pharogy* 3-6, 697-705, 2013.
3. Domitas, E.M., R.C.Hider, *Honeybee Venom, Bee World*, 68(2), 51-70, 1987.
4. Kelle İ, *Dicle Tip Dergisi*, 35(1), 69-76, 2008.
5. Yang D, Oppenheim JJ. “Multiple functions of antimicrobial peptides in host immunity”, Hancock RDD, editor. Mammalian host defence peptides. NY: *Cambridge Üniv.*, 39–68. 2004
6. Asthana N., Yadav S.P., Ghosh J.K. “Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity.” *J Biol Chem*;279(53), 50, 2004.
7. Bomalaski, J. S., Baker, D., Resurreccion, N. V., & Clark, M. A. “Rheumatoid arthritis synovial fluid phospholipase A2 activating protein (PLAP) stimulates human neutrophil degranulation and superoxide ion production.” *Agents Actions* 27(3-4), 425–427, 1989.
8. Yan H., Li S., Sun X., Mi H., He B. “Individual substitution analogs of Mel, melittin’s C-terminal 15 residue peptide: their antimicrobial and hemolytic actions.” *FEBS Lett*; 554, 100–4, 2003.
9. Lariviere, W.R. ,Melzack, R., “The beevenom test: a new tonic-pain test.” *MCGill Üniv, Kanada*, 66, 271–277, 1996.
10. Peiren N., Graaf D.C., Evans J.D., Jacobs F.J. “Genomic and transcriptional analysis of protein heterogeneity of the honeybee venom allergen Api m 6.” *Insect Mol Biol*, 15, 577–81, 2006.
11. Terwilleger ve Eisenberg, June 10, *The Journal Of Biological Chemistry*, 257, 602-622, 1982.
12. Billingham, M. E. J., Morley, J., Hanson, J. M., Shipolini, E. A., & Vernon, C. A. “An anti-inflammatory peptide from bee venom.” *Letters To Nature* 245(5421), 163–164, 1973.

13. Park H. J., Lee S. H., Son, D. J., Oh, K. W., Kim K. H., Song H. S., “Anti-arthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit.” *Arthritis Rheum* 50(11), 3504–3515, 2004.
14. Son D.J., Lee J.W, Lee Y.H, Song H.S, Lee C.K., Hong J.T., “Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds” *Pharmacol. Ther.* 115, 246–270, 2007.
15. Habermann E., “Bee and wasp venoms, Neurotoicity of apamin and MCD peptide upon central application. ” *Naunyn-Schmiedeberg's*, 177, 314–322, 1972.
16. Dempsey C.E., “The actions of melittin on membranes, Biochim.” *Biophys. Acta* 1031, s. 143– 161, 1990.
17. Francese S., Lambardi D., Mastrobuoni G., Marca G., Moneti G., Turillazzi S. “Detection of honeybee venom in envenomed tissues by direct MALDI MSI. J Am Soc Mass Spectrom”, *Elsevier*; 20, 112–23, 2009.
18. Kreil G., Bachmayer H. “Biosynthesis of melittin, a toxic peptide from bee venom. Detection of a possible precursor.” *Eur J Biochem*;20, 344–50, 1971.
19. Chen, Y.N., Li, K.C., Li, Z., Shang, G.W., Liu, D.N., Lu, Z.M., Zhang, J.W., Ji, Y.H., Gao, G.D., Chen, J.“ Effects of bee venom peptidergic components on rat pain-related behaviors and inflammation.” *Neuroscience* 138, 631–640, 2006.
20. Wang, C., Chen, T., Zhang, N., Yang, M., Li, B., Lü, X., Cao, X., Ling, C. “Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosisinducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating.” *J. Biol. Chem.* 284, 3804–3813, 2009.
21. Patrik N. J. May. 22, *Journal of Psychology and Behavioral Sciences*, 17, 18-33, 2003.
22. Yu Y. Q., Chen J.“Activation of spinal extracellular signaling-kinases by intraplantar melittin injection.” *Neuroscience Letters*, ,17-10, 77–110, 2005.
23. Wiedman G., Herman K., Searson P., Wimley W.C., Hristova K. , “The electrical response of bilayers to the bee venom toxin melittin: evidence for transient bilayer permeabilization”, *Biochimica et Biophysica Acta* 1828, 1357–1364, 2013.

24. Hinch D.K., Crowe J.H., "The lytic activity of the bee venom peptide melittin is strongly reduced by the presence of negatively charged phospholipids or chloroplast galactolipids in the membranes of phosphatidylcholine large unilamellar vesicles", *Biochimica et Biophysica Acta* 1284, 162–170, 1996.
25. Surendra N. S., Jayaram G. N., *African Journal of Microbiology Research* .5(18), 2765-2772, September 2011.
26. Zhou J., Zhao J., Zhang Z., Shen J., Yitao Q., Xiaofeng X., Yi L., Liming W., Jinzhen Z., Fang C., Chen L., "Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry" *Analytical Biochemistry* 404, 171–178, 2010.
27. Lam Y.-H., Wassall S. R., Morton C. J. , Smith R., "Separovic Solid-State NMR Structure Determination of Melittin in a Lipid" *Environment Biophysical Journal*, 81, 2752–2761, 2001.
28. Shize Q., Zhu T., Zhao T., Fang X., Sun Y., "Purity control of different beevenom melittin preparations by capillary zone electrophoresis" *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications* 658(2), 397–403, 1994.
29. Erik, E.Z., "Tifensülfüron – Metil Herbisitinin Diferansiyel Puls Polarografisiyle Tayini" *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 34-56, Ankara, 2007.
30. Skoog, D.,A., Holler, F., J., West, D., M., Crouch, R., S., "Analytical Chemistry first ed.", Kılıç E., Yılmaz H., *Bilim Yayıncılık*, s. 665-704, Ankara, 2004.
31. Taşkoparan Yılmaz, Ü., "Bazı iyonların çeşitli ortamlarda diferansiyel puls polarografisi ile tayini için yöntem geliştirilmesi", *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, s. 8-9, Ankara, 2008.
32. Yılmaz G " ferrosenilfosfazen türevlerinin elektrokimyasal davranışları ve yüzey adsorpsiyonlarının incelenmesi", *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 8-10, Konya, 2008.
33. Mercan H. "Triazin Grubu Pestisitlerin Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi Ve Tayinleri" *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 9-10, Ankara, 2010.

34. akmak Z “aklonifen pestisitinin elektrokimyasal tekniklerle incelenmesi ve tayini” *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 9-11 Ankara, 2013.
35. Ergün, F., “Karminik Asidin Diferansiyel Puls Polarografisi İle Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi Ve Uygulanması”, *Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 10-11, Nevşehir, 2013.
36. Keremoğlu S. “Altın elektrot üzerinde borhidrürün elektrokimyasal yükseltgenmesi ve kinetik parametrelerin belirlenmesi” *Yüzüncü Yıl Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 11-13 Van, 2009.
37. Öztürk Ö. F. “Bazı Benzo[C]Sinnolin Türevlerinin Spektroskopik Ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi”, *Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 10-11, Ankara, 2008.
38. İnan D. “Histaminin Kare Dalga Sıyırma Voltametri İle Tayini Ve Uygulanması ”, *Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 8-9, Nevşehir, 2013.
39. Yılmaz G. “Ferrosenilfosfazen Türevlerinin Elektrokimyasal Davranışları Ve Yüzey Adsorpsiyonlarının İncelenmesi”, *Selçuk Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 10-11, Konya, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

Tuğba MELEKOĞULLARI 1988 yılında Tokat'ta doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Alanya'da tamamladı. 2008 yılında Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı ve 2012 yılında bu bölümden mezun oldu. 2012 yılında Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nden Pedagojik Formasyon sertifikası aldı.

Adres: Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

e-posta: tugbamelekokullar@gmail.com