



T.C.
KONYA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**GRAFEN OKSİT TEMELLİ SIVI
KROMATOGRAFİSİ (HPLC) SABİT
FAZLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE İLAÇ
MOLEKÜLLERİNİN ANALİZLERİNDE
KULLANIMI**

Naciye ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Haziran-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Naciye ÇINAR tarafından hazırlanan “Grafen Oksit Temelli Sıvı Kromatografisi (HPLC) Sabit Fazlarının Geliştirilmesi ve İlaç Moleküllerinin Analizlerinde Kullanımı” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Konya Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. İsmail TARHAN

Danışman

Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Fatma SARIİPEK

İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mevlüt UYAN
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 221022062 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Naciye ÇINAR

Tarih: 23.06.2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GRAFEN OKSİT TEMELLİ SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) SABİT FAZLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE İLAÇ MOLEKÜLLERİNİN ANALİZLERİNDE KULLANIMI

Naciye ÇINAR

Konya Teknik Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA

2023, 82 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA
Doç. Dr. İsmail TARHAN
Dr. Öğr. Üyesi Fatma SARIPEK

Bu tez çalışmasında; tıp, eczacılık, kimya, elektrik-elektronik, gıda, sensör gibi birçok alanda uygulamaları bulunan grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksitin HPLC sabit fazı olarak elde edilmesi, karakterizasyonu, ilaç etken maddesi olan parasetamol ve kafeinin ayrılması için metot parametrelerinin belirlenmesi ve geliştirilen metotların validasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

Sabit faz olarak kullanılacak olan grafen oksit modifiye hummers metodu ile sentezlenmiş, aminopropilsilika üzerine immobilize edilmiş, elde edilen grafen oksit silisyum (GO-Si) hidrazin ile indirgenmiştir. Elde edilen grafen oksit, GO-Si ve indirgenmiş grafen oksit silisyumun (rGO-Si) karakterizasyonu UV-vis, FTIR, XRD, TEM ve SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri sonunda grafen oksitin yüksek miktarda -OH, -COOH ve C-O-C fonksiyonel gruplarına sahip olduğu, GO-Si'nin amid bağıyla bağlandığı ve rGO-Si üzerinde kısmen oksijen gruplarının azaldığı tespit edilmiştir. XRD, TEM ve SEM analizlerinin FTIR analizini desteklediği görülmüştür.

Yüksek basınç altında boş kolonlara doldurulan GO-Si ve rGO-Si sabit fazları üzerinde parasetamol ve kafein için izokritik ve gradient şartlarda kromatografik ayırmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonunda GO-Si sabit fazında parasetamol ve kafein için en iyi ayırma gradient şartlarda geliştirilen Metot 9'da tespit edilmiştir. Geliştirilen Metot 9'un validasyon parametreleri; maksimum bağıl standart sapma 0,54, geri kazanım değerlerinin %98-%99 aralığında, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla parasetamol ve kafein için 6×10^{-3} - $6,5 \times 10^{-3}$ mg/L ve 2×10^{-2} - $2,2 \times 10^{-2}$ mg/L olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen metot için t testi yapılmış ve kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

rGO-Si sabit fazı için kemometrik dizayn ile 21 farklı metot geliştirilmiş ve bunlardan en uygun metot belirlenmiştir. Uygun metot şartları; mobil faz bileşimi %81,3 metanol-%18,7 asetonitril, akış hızı 1,2 mL/dak ve sıcaklık 23°C olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen metodun validasyon parametreleri; maksimum bağıl standart sapma 0,85, geri kazanım değerlerinin %90-%85 aralığında, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla parasetamol ve kafein için $4,5 \times 10^{-3}$ - $7,7 \times 10^{-3}$ mg/L ve $1,5 \times 10^{-2}$ - $2,6 \times 10^{-2}$ mg/L olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen metot için t testi yapılmış ve kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Grafen oksit, ilaç analizleri, indirgenmiş grafen oksit, kafein, kemometri, parasetamol, sıvı kromatografisi, validasyon.

ABSTRACT

MS THESIS

DEVELOPMENT OF GRAPHENE OXIDE-BASED LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) STATIONARY PHASES AND THEIR USE IN THE ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL MOLECULES

Naciye ÇINAR

Konya Technical University
Institute of Graduate Studies
Department of Chemical Engineering

Advisor: Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA

2023, 82 Pages

Jury

Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA
Assoc. Prof. Dr. İsmail TARHAN
Asst. Prof. Dr. Fatma SARIPEK

In this thesis, it is aimed to obtain graphene oxide and reduced graphene oxide, which have applications in many fields such as medicine, pharmacy, chemistry, electrical-electronics, food, sensors, as HPLC stationary phase, characterization, determination of method parameters for the separation of paracetamol and caffeine, which are active ingredients of drugs, and validation of the developed methods.

Graphene oxide to be used as stationary phase was synthesized by modified hummers method, immobilized on aminopropylsilica and the obtained graphene oxide silicon (GO-Si) was reduced with hydrazine. The obtained graphene oxide, GO-Si and reduced graphene oxide silicon (rGO-Si) were characterized by UV-vis, FTIR, XRD, TEM and SEM analyses. At the end of FTIR analyses, it was found that graphene oxide has a high amount of -OH, -COOH and C-O-C functional groups, GO-Si is connected by amide bonding and partially reduced oxygen groups on rGO-Si. XRD, TEM and SEM analyses supported the FTIR analysis.

Chromatographic separations for paracetamol and caffeine were carried out under isocritical and gradient conditions on GO-Si and rGO-Si stationary phases filled into empty columns under high pressure. At the end of the studies, the best separation for paracetamol and caffeine in GO-Si stationary phase was determined in Method 9 developed under gradient conditions. The validation parameters of the developed Method 9 were calculated as maximum relative standard deviation 0.54, recovery values in the range of 98%-99%, LOD and LOQ values 6×10^{-3} - 6.5×10^{-3} mg/L and 2×10^{-2} - 2.2×10^{-2} mg/L for paracetamol and caffeine, respectively. A t-test was performed for the developed method and its usability was proven.

For rGO-Si stationary phase, 21 different methods were developed by chemometric design and the most suitable method was determined. Suitable method conditions were determined as mobile phase composition 81.3% methanol 18.7% acetonitrile, flow rate 1.2 mL/min and temperature 23°C. The validation parameters of the developed method were calculated as maximum relative standard deviation 0.85, recovery values in the range of 90%-85%, LOD and LOQ values of 4.5×10^{-3} - 7.7×10^{-3} mg/L and 1.5×10^{-2} - 2.6×10^{-2} mg/L for paracetamol and caffeine, respectively. A t-test was performed for the developed method and its usability was proved.

Keywords: Graphene oxide, drug analysis, reduced graphene oxide, caffeine, chemometrics, paracetamol, liquid chromatography, validation.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Konya Teknik Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Kimya Teknolojisi Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA danışmanlığında tamamlanarak, Konya Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Çalışmamın her safhasında beni destekleyip yönlendiren, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bugüne kadar hiçbir fedakârlıktan kaçınmadan beni bugünlere getiren ve çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen canım babam Yıldırım ÇINAR ve canım annem Hacer ÇINAR'a, her zaman yanımda olan ve beni destekleyen kardeşlerim Fatma ÇETİN, Esra ÇINAR ve Halil İbrahim ÇINAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezini minik varlığıyla hayatımıza renk ve neşe katan biricik yeğenim Zeynep Liva ÇETİN'e atfediyorum.

Naciye ÇINAR
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Grafen ve Türevleri.....	2
1.1.1. Grafan	3
1.1.2. Grafon	4
1.1.3. Florografen.....	5
1.1.4. Grafen ve grafin.....	6
1.1.5. Doplanmış grafen.....	7
1.1.6. Grafen oksit.....	7
1.1.7. İndirgenmiş grafen oksit	10
1.2. Parasetamol	11
1.3. Kafein	12
1.4. Kromatografi	13
1.4.1. Kromatografinin sınıflandırılması	13
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	18
2.1. Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksit.....	18
2.2. Grafen Oksit ve Türevlerinin Kromatografi Uygulamaları	23
2.3. Parasetamol ve Kafein	25
2.4. Tezin Amacı.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
3.2. Kullanılan Cihazlar	29
3.3. Grafen Oksit Sentezi	29
3.4. Grafen Oksit-Silisyum (GO-Si) Eldesi	30
3.5. İndirgenmiş Grafen Oksit- Silisyum (rGO-Si) Eldesi	30
3.6. Karakterizasyon Çalışmaları.....	30
3.6.1. FTIR analizleri	30
3.6.2. Uv-Visible spektrofotometrik analizler	31
3.6.3. TEM analizleri	31
3.6.4. SEM analizleri	31
3.6.5. XRD analizleri	31
3.7. Kolon doldurma	31
3.8. HPLC Analizleri	32
3.8.1 Standartların hazırlanması	32

3.8.2. GO-Si kolonunda yapılan çalışmalar	33
3.8.3. rGO-Si kolonunda yapılan çalışmalar	34
3.8.4. İlaç molekülleri analizi	35
3.8.5. Validasyon çalışmaları	35
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	37
4.1.Karakterizasyon	37
4.1.1. GO karakterizasyonu	37
4.1.2. GO-Si karakterizasyonu	40
4.1.3. rGO-Si karakterizasyonu	43
4.2. GO-Si Sabit Faz Çalışmaları.....	46
4.2.1. İlaç analizleri.....	50
4.2.2. Validasyon	51
4.3. rGO-Si Sabit Faz Çalışmaları	53
4.3.1. İlaç analizleri.....	61
4.3.2. Validasyon	62
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	65
5.1 Sonuçlar	65
KAYNAKLAR	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μM	: Mikro molar
μm	: Mikrometre
Å	: Angstrom
cm^{-1}	: Dalga sayısı
D	: Arzu edilebilirlik fonksiyonu
g	: Gram
k'	: Kapasite faktörü
L	: Litre
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
N	: Tabaka sayısı
nm	: Nanometre
R^2	: Korelasyon katsayısı
R_s	: Ayırma gücü katsayısı
TF	: Tailing faktörü
β	: Beta
θ	: Temas açısı ($^\circ$)
λ_{max}	: Maksimum Dalga Boyu

Kısaltmalar

2D	: 2 boyutlu
3D	: 3 boyutlu
CCD	: Merkezi kompozit tasarım
CEC	: Kapiler elektrokromatografi
EOF	: Elektroendozmotik akış
FET	: Alan etkili transistör
FRET	: Floresan rezonans enerji transferi
FTIR	: Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
GC	: Gaz kromatografisi
GO	: Grafen oksit
GO-Si	: Grafen oksit silisyum
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KAF	: Kafein
LC	: Sıvı kromatografisi
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Tayin limiti
nGO	: nano-GO
PAR	: Parasetamol
PEG	: Polietilen glikol
ppm	: Milyonda bir
R^2	: Korelasyon katsayısı
rGO	: İndirgenmiş grafen oksit
rGO-Si	: İndirgenmiş grafen oksit silisyum
RSD	: Bağlı standart sapma
RSM	: Cevap yüzey modellemesi

SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SFC	: Süperkritik akışkan kromatografisi
ssDNA	: Floresan etkili tek sarmallı DNA
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
UV-Vis	: Ultra viyole ve görünür bölge
XRD	: X-ışınları kırınımı



1. GİRİŞ

İlaç, gıda, çevre gibi birçok sanayi dallarında ham madde kabulü, proses kontrolü ve son ürünün kalite kontrolü süreçlerinde farklı analizler gerçekleştirilmektedir. Bu analizlerde kullanılan yöntemler dikkate alındığında en sık başvurulan teknikler arasında sıvı kromatografisi yer almaktadır. Kimyasal özelliği birbirine çok yakın olan türlerin ayırımına yönelik yeni sıvı kromatografisi sabit fazları ve analiz yöntemlerinin validasyonu ile ilgili çalışmalar son yıllarda çok fazla ilgi görmektedir. Bu ilgiye bağlı olarak yeni tür nano-malzemelerinin kolon dolgu maddesi olarak kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle, ilaç dağıtımı, biyosensör, biyo görüntüleme, moleküler etiketleme, gıda teknolojisi, tekstil üretimi, antimikrobiyal kaplama, enerji ve çevre gibi geniş uygulama alanları olan grafen oksit ve türevlerinin sabit faz olarak kullanımı konusundaki çalışmalar dikkat çekmektedir. Ancak, belirtilen birçok alanda kullanımı olan, sabit faz olarak da geliştirilen grafen oksit ve türevlerinin ilaç analizlerinde kullanımları oldukça sınırlıdır. İnsan sağlığına faydaları ve zararları tartışılan ilaçların tanımlanması ve miktarının tespit edilmesinde, grafen oksit ve türevlerinin sabit faz olarak kullanımı çok yeni ve ileriye dönük gelecek vaat etmektedir.

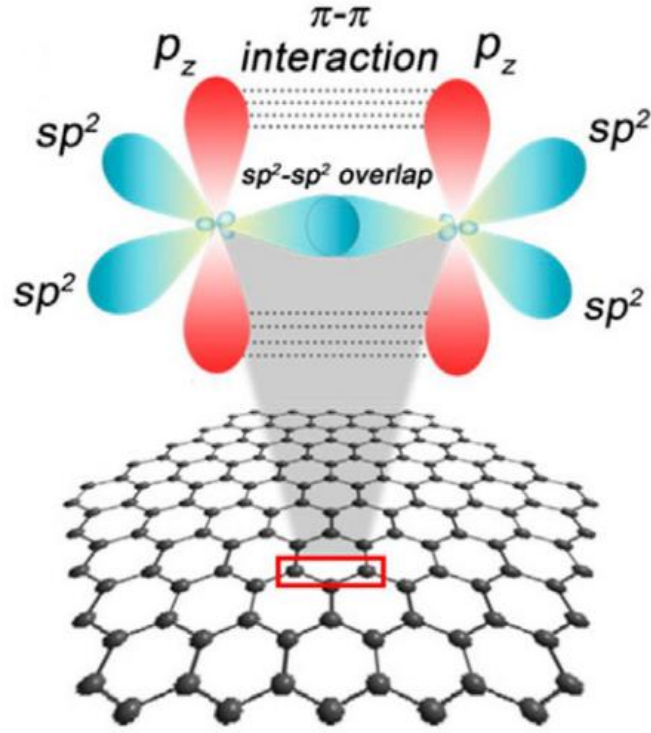
Kimyasal metotlar ile sentezlenen ve özellikle son yıllarda nanopartikül olarak pek çok çalışmada kullanılan grafen oksit ve türevleri; kimyasal türlerin ayrılması, saflaştırılması ve analizinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Özellikle birçok türün ayrılması ve saflaştırılması için katı faz ekstraksiyon sistemlerinde katı faz olarak ve monolitik, elektrokromatografi, kapiler kromatografi, gaz kromatografisi, sıvı kromatografi ve hidrofilik etkileşim kromatografisi gibi kromatografik yöntemlerde de sabit faz olarak grafen oksit ve türevi nanopartiküllerin kullanımı mevcuttur (Abdolmohammad-Zadeh ve ark, 2020; Arvand ve Masouleh, 2017; Hou ve ark, 2018; Liang ve ark, 2018; Liang ve ark, 2014; Song ve ark, 2019; Wang ve Chen, 2018; Wu ve ark, 2019; Zhang ve ark, 2017; Zhang ve ark, 2013; Zhang ve ark, 2017). Bununla birlikte grafen oksit ve türevlerinin katı faz ekstraksiyon ve kromatografik yöntemlerde kullanılmasının yanı sıra ilaç taşıma sistemlerinde de kullanımı bulunmaktadır (Hashemzadeh ve Raissi, 2020; Luo ve ark, 2013; Wang ve ark, 2018; Zhang ve ark, 2019). Hem kromatografik analiz yöntemlerinde hem de ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmasına rağmen yapılan araştırmalara göre kromatografik yöntemlerin sıklıkla kullanıldığı ilaç analizlerinde grafen oksit ve türevlerinin kullanımı mevcut değildir.

Bu tez çalışmasında; geliştirilen grafen oksit silika sabit fazları, kimyasal bir bağ ile grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) üzerine bağlanmış ve farklı fonksiyonel gruplara sahip moleküllerin ayrılması uygulamaları araştırılmıştır.

1.1. Grafen ve Türevleri

Andre Geim ve Konstantin Novoselov tarafından 2004 yılında grafenin keşfi, bilim camiasını bu malzemenin potansiyel uygulamalarını kapsamlı bir şekilde incelemeye motive etmiştir (Lee ve ark, 2018). Elektronik cihazlar (Hass ve ark, 2008), nanokompozit malzemeler (Ramanathan ve ark, 2008), sürdürülebilir enerji depolama ve dönüştürme (ultrakapasitörler (Wang ve ark, 2009), piller (Yoo ve ark, 2008), yakıt hücreleri (Seeger ve ark, 2009; Li ve ark, 2009), güneş pilleri (Wang ve ark, 2008; Wu ve ark, 2008)) ve biyobilim/biyoteknolojiler (Liu ve ark, 2008; Tang ve ark, 2009) gibi çeşitli alanlarda benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri (yüksek yüzey alanı (Geim ve Novoselov, 2007), mükemmel iletkenlik (Geim ve Novoselov, 2007) ve mekanik mukavemet (Lee ve ark, 2008)) nedeniyle grafen ve türevleri büyük uygulama potansiyeli göstermişlerdir (Shao ve ark, 2009).

Grafen genellikle altıgen veya bal peteği benzeri bir yapıda yapılandırılmış sp^2 hibridize karbon atomlarına sahip iki boyutlu (2D) tabaka benzeri bir malzeme olarak adlandırılır ve kalınlığı bir atom çapına eşittir (Geim ve ark, 2007). Ayrıca grafen, her bir karbon atomunun aynı düzlemde kovalent olarak birbirine bağlandığı ve tek katmanlı grafen tabakalarının Van der Waals kuvvetleri ile birbirine bağlandığı saf karbondan oluşur (Lee ve ark, 2018).



Şekil 1.1. Grafenin kimyasal yapısı (Arshad ve ark, 2019)

Grafenin türevlerinin son zamanlarda ortaya çıkışı, nanobiyoteknoloji dahil olmak üzere birçok alanda ilgi çekmektedir (Banerjee, 2018).

Grafen türevleri:

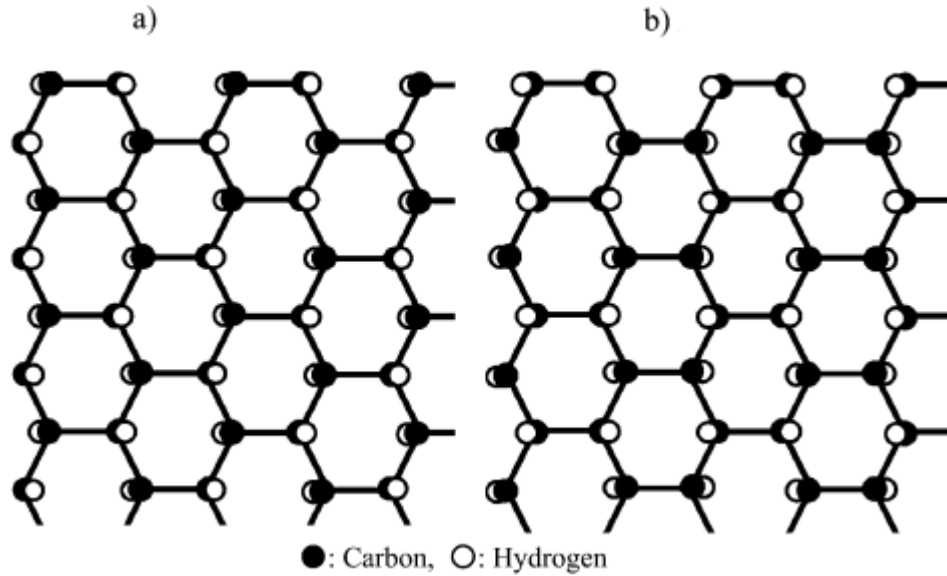
1. Grafan
2. Grafon
3. Florografen
4. Grafın ve grafđın
5. Doplanmış grafen
6. Grafen oksit
7. İndirgenmiş grafen oksit

1.1.1. Grafan

Grafan, CH bileşimine sahip grafenin tamamen hidrojenlenmiş turevidir. Grafene hidrojen eklenmesi, karbon atomlarının hibridizasyonunun düz sp^2 'den tetrahedral sp^3 'e dönüşmesine neden olur. Bu modifikasyon iletken grafeni dielektrik grafana dönüştürür, yani grafenin sıfır bant aralığı grafanda bir bant aralığı oluşturmak

için açılır, böylece grafan bazlı nanoelektronik ve hidrojen-yakıt teknolojilerinin beklentilerini artırır (Boukhvalov ve ark, 2008; Sofu ve ark, 2007; Banerjee, 2018).

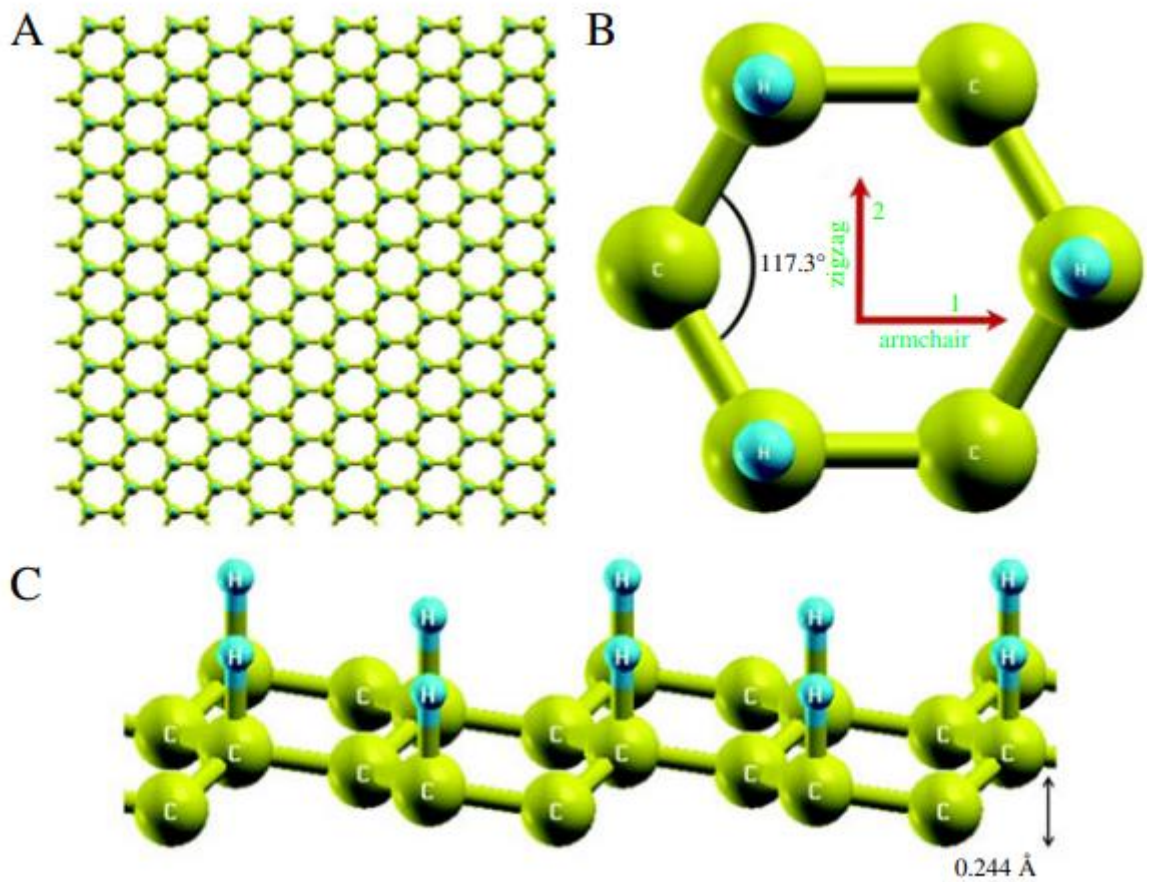
Grafan, Şekil 1.2'deki üst görünümünde şematik olarak gösterildiği gibi hidrojen atomlarının karbon atomu katmanının her iki tarafında dönüşümlü olduğu sandalye benzeri ve hidrojen atomlarının çiftler halinde dönüşümlü olduğu tekne benzeri olmak üzere iki konformasyona sahip olabilir (Inagaki ve Kang, 2014).



Şekil 1.2. Grafanın yapısı (üstten görünüm): (a) sandalye tipi ve (b) tekne tipi konformasyonlar (Inagaki ve Kang, 2014)

1.1.2. Grafon

Grafenin yarı hidrojenlenmiş türevidir grafon olarak adlandırılmaktadır (Zhou ve ark, 2009). Bu malzeme henüz deneyler yoluyla gerçekleştirilmemiş olsa da (Zhou, 2012), teorik hesaplamalar grafondaki hidrojenlenmemiş karbon atomlarının antiferromanyetik olarak çiftleştiğini (Feng ve Zhang, 2012) ve bu nedenle manyetizma, spintronix, organik ferroelektrikler, moleküler paketleme (Peng ve ark, 2015; Boukhvalov, 2010; Reddy ve ark, 2012) vb. alanlarda potansiyel uygulamalar bulunduğunu ortaya koymuştur. Bunlardan bazıları biyoteknoloji için yararlı olacaktır. Yapısal olarak grafon, hidrojen atomlarının karbon tabakasının sadece bir tarafına bağlandığı C_2H stokiyometrisine sahip %50 hidrojenlenmiş grafen tabakasıdır ve sp^2 ile sp^3 hibridize karbon atomlarının bir karışımı ile sonuçlanır (Peng ve ark, 2015; Pujari ve ark 2011; Banerjee, 2018).

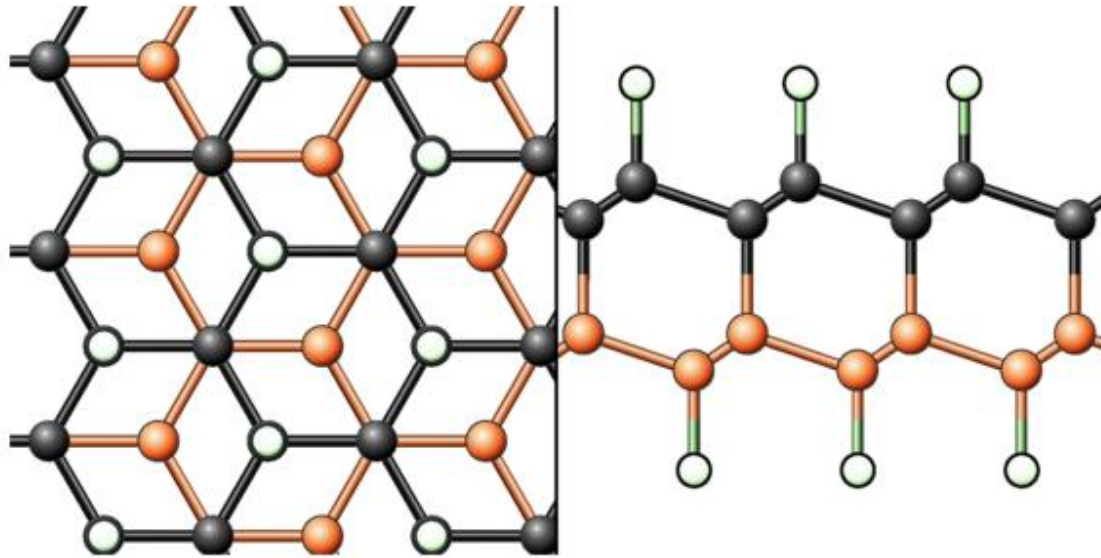


Şekil 1.3. Grafon tabakasının geometrisi (A) üstten görünüm, (B) hücre konfigürasyonu, (C) yandan görünüm (Peng ve ark, 2015)

1.1.3. Florografen

Florlanmış grafen türevi, grafit florürün tek tabakası olan florografen olarak adlandırılır (Inagaki and Kang, 2014, Chronopoulos ve ark, 2017) ve geniş bir elektronik bant aralığına sahip en ince yalıtkan olarak kabul edilir. Temelde perflorlu hidrokarbon olduğu için politetrafloroetilenin (Teflon) de muadilidir (Robinson ve ark, 2010; Nair ve ark, 2010). Florografen, keşfinden bu yana olağanüstü fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle bilim camiasının dikkatini çekmiştir. Çok sayıda çalışma florografenin kimyasal olarak inert olmadığını ve ortam koşulları altında çeşitli kimyasal reaksiyonlara girdiğini göstermektedir. Bu alışılmadık derecede yüksek reaktivite sayesinde florografen, grafen asit, siyanografen ve yüksek derecede işlevselleştirme ile alil-grafen gibi özel grafen türevlerinin sentezi için etkili bir strateji sağlar (Chronopoulos ve ark, 2017; Bakandritsos, 2017). Florografen, grafenin florlanması ve grafit florürün mekanik veya kimyasal eksfoliyasyonu ile hazırlanmıştır

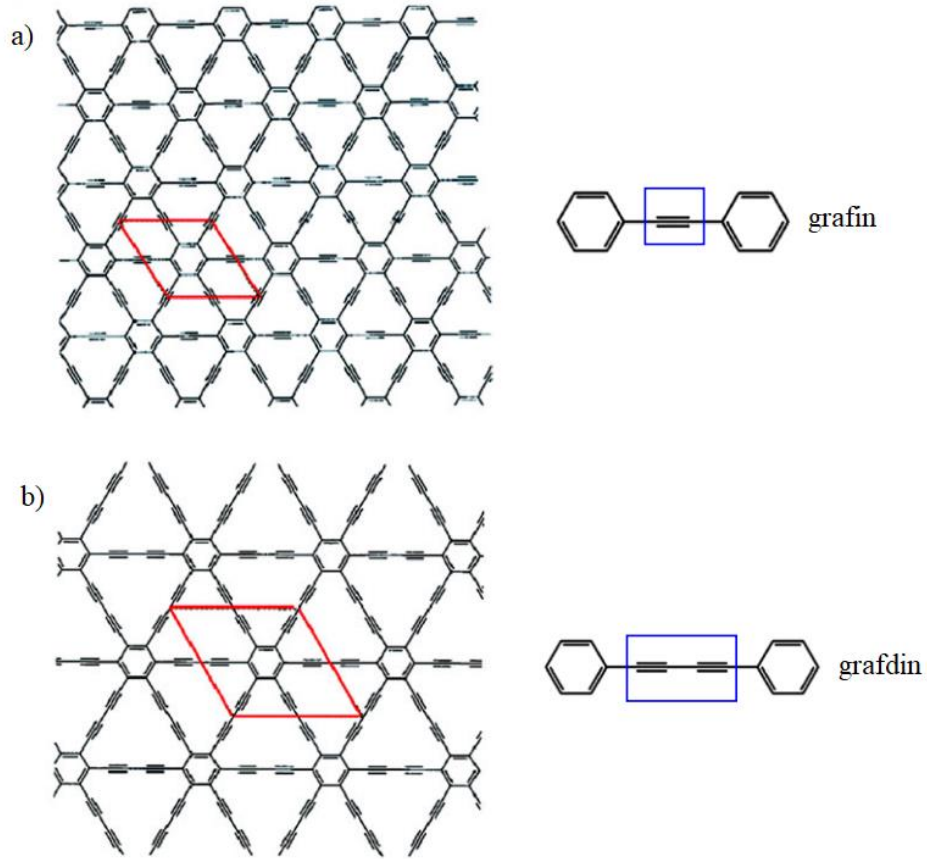
(Robinson ve ark, 2010; Nair ve ark, 2010). Florografenin ilginç özellikleri sayesinde, algılama ve biyo-görüntülemeye ayırma, elektronik ve enerji teknolojilerine kadar geniş bir alanda uygulama alanı bulmuştur (Chronopoulos ve ark, 2017; Banerjee, 2018).



Şekil 1.4. İki katmanlı florografenin üstten (sol) ve yandan (sağ) görünümü (Sivek ve ark, 2012)

1.1.4. Grafın ve grafdin

Grafın ve grafdin, bir kristal kafes içinde düzenlenmiş sp ve sp^2 bağlı karbon atomlarının bir atom kalınlığında 2D tabakaları olan ve grafenin altıgenlerini (sp^2 hibridizasyonlu benzen halkaları) birbirine bağlayan asetilenik bağlantılara (sp hibridizasyonu) sahip grafen türevleridir. Grafın yapısı karbon altıgenlerini birbirine bağlayan bir doğrusal asetilenik zincire sahipken, grafdin karbon altıgenleri arasında iki asetilenik (di-asetilenik) zincirden oluşur (Malko ve ark, 2012; Haley ve ark, 1997). Grafın, sıra dışı elektronik yapısı, mekanik mukavemeti ve optik özellikleri nedeniyle bilim camiasında büyük ilgi uyandırırken, grafdin çok ilginç elektronik özellikler göstermektedir (Inagaki ve Kang, 2014; Peng ve ark, 2014; Chen ve ark, 2015). Hem grafın hem de grafdin, modern asetilen kimyası ve dehidrobenzo annulen çerçevesine dayanan yeni organometalik sentetik metodolojileri içeren organik sentez prosedürleri ile sentezlenmiştir (Haley, 2008). Grafın ve grafdinin uygulamaları arasında nanoelektronik, desalinatör, inorganik ve organik sensörler ve diğer biyo-bağlantılı süreçler yer almaktadır (Inagaki ve Kang, 2014; Peng ve ark, 2014; Chen ve ark, 2015; Banerjee, 2018).



Şekil 1.5. Grafın (a) ve grafdin (b) yapısı (Inagaki and Kang, 2014)

1.1.5. Doplanmış grafen

Çeşitli grafen türevlerinin gerçekleştirilmesinin yanı sıra, grafenin kimyasal enerji, sensörler, fotovoltaik, süper kapasitörler, süper iletkenlik, nanoelektronik, manyetizma, kataliz ve biyotıp gibi farklı alanlarda çeşitli uygulamalar için uyarlanmış özelliklere sahip yeni malzemelerin geliştirilmesine izin veren ve grafenin fiziko-kimyasal özelliklerinin kolay manipülasyonunu sağlayan grafenin kimyasal dopingi ilginç bir hale gelmiştir. Metal olmayan (N, B, S, P, Se, O, Si, I vb.) ve metal (Mn, Fe, Co, Ni, Al, Ti, Pd, Ru, Rh, Pt gibi), Au, Ag, vb.) olan atomlar; süperiletkenlik, ferromanyetizma ve gelişmiş kimyasal/elektrokimyasal aktivite gibi farklı uygulamalar için dopantlar olarak grafen içine dahil edilmiştir (Wu ve ark, 2011, Giovanni ve ark, 2012; Banerjee, 2018).

1.1.6. Grafen oksit

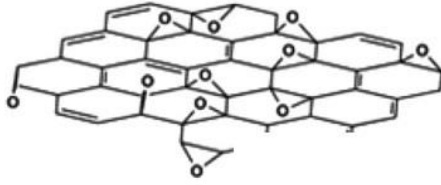
GO, küçük boyut, geniş yüzey alanı, 2D yapıda olağanüstü güç, ilginç optik ve elektronik özellikler gibi benzersiz fizikokimyasal özellikler ortaya koymaktadır

(Dreyer ve ark, 2010; Nanda ve Papaefthymiou, 2015; Banerjee, 2018). Grafen ile karşılaştırıldığında, GO düşük üretim maliyeti, büyük ölçekli üretim ve kolay işleme avantajlarına sahiptir. Genellikle rGO hazırlanması için bir öncü olarak kullanılır (Dreyer ve ark, 2009). Son yıllarda bilim adamları, GO'yu daha fazla inceleyerek zengin aktif oksijen içeren fonksiyonel gruplarla mükemmel özelliklere sahip olduğunu keşfettiler (Stankovich ve ark, 2007). Bu oksijen içeren gruplar veya indirgenmiş doping elementleri, belirli uygulama alanlarının gereksinimlerine göre kovalent/non-kovalent modifikasyon tasarımı için katalitik aktif merkezler olarak kullanılabilir. Ayrıca, oksijen içeren grupların varlığı GO'nun katmanlar arası boşluğunu da genişletmektedir. Küçük moleküller veya polimer interkalasyonları ile işlevselleştirilebilir. Günümüzde GO'nun işlevselleştirilmesinde büyük ilerleme kaydedilmiştir. GO, tuzdan arındırma (Nair ve Geim, 2012), ilaç dağıtımı (Liu ve ark, 2008), yağ-su ayrımı (Feng ve ark, 2018), immobilizasyon katalizi (Li ve ark, 2013), güneş pilleri (Liu ve ark, 2012), enerji depolama (Çakıcı ve ark, 2017), sağlık hizmetleri (Kumar ve ark, 2019; Shettia ve ark, 2019) vb. alanlarda uygulanmıştır (Yu ve ark, 2020).

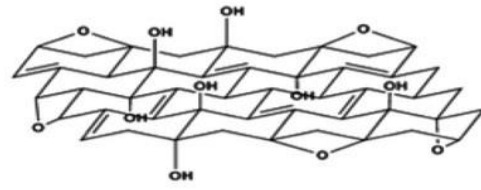
GO, grafitik omurga üzerinde epoksit, hidroksil ve karboksilik asit gibi bol miktarda reaktif oksijen fonksiyonel grupları içeren dev bir aromatik makromoleküldür (Compton ve Nguyen, 2010; Titelman ve ark, 2005). Diğer grafitik malzemelerle karşılaştırıldığında, grafen ve GO ilgi çekici elektronik, mekanik, termal ve optik özellikler sergiler (Zhu ve ark, 2010; Balandin ve ark, 2008), bu da çeşitlendirilmiş uygulamalardaki popülerliklerini yoğun bir şekilde teşvik eder (Yoo ve ark, 2008; Wang ve ark, 2009; Zhang ve ark, 2013).

Pul pul dökülmüş grafen (grafitten elde edilmiş) doğası gereği hidrofobik olduğundan, suda kolayca dağılamaz ve bu nedenle işlevselleştirme biraz zordur. Ancak grafitin oksidasyonu sonucu oluşturulan GO, hidrofildir ve suda çözünür hale gelir. Bu sayede GO, umut verici biyoteknolojik uygulamalar için mükemmel sulu işlenebilirlik, yüzey işlevselleştirme kabiliyeti, floresan söndürme gibi farklı yetenekler kazanmaktadır (Yang ve ark, 2013; Banerjee, 2018).

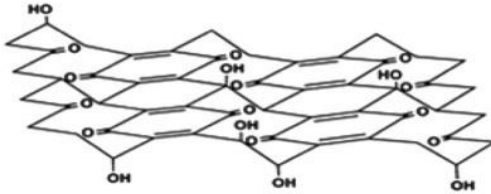
(a) Hofmann



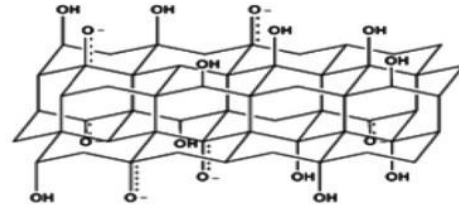
(b) Ruess



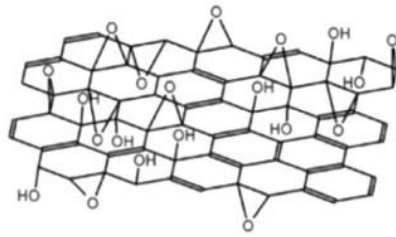
(c) Scholz-Boehm



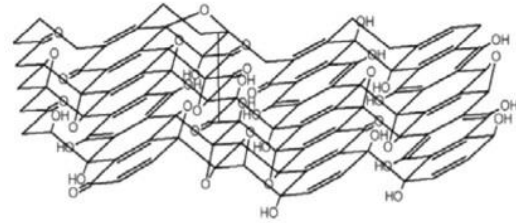
(d) Nakajima-Matsuo



(e) Lerf-Klinowski



(f) Szabo



Şekil 1.6. GO'nun kimyasal yapısının çeşitli modelleri (Wang ve ark, 2013)

Yapılan birçok çalışmada; grafitin oksidasyonu ile GO elde etmek için çeşitli yöntemler ortaya konmuştur (Briseboisa ve Siaj, 2020). Bu yöntemler arasında en sık kullanılan Hummers yöntemine göre; grafit, sülfürik asit içinde potasyum permanganat ve sodyum nitrat ile oksitlenir. Hummers-Offeman yöntemi olarak da bilinen Hummers yönteminin modifikasyonları, GO'nun daha hassas özelliklerini elde etmek için farklı yaklaşımlar kullanır. Yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem Tour tarafından önerilmiştir (Marcano ve ark, 2010). Tour yöntemi, grafitin 9:1 hacim oranında konsantre sülfürik ve fosforik asit karışımı içinde dağıtılmasına ve grafitin potasyum permanganat ile daha fazla oksidasyonuna dayanmaktadır (Dimiev ve ark, 2012). Staudenmeier ve Brodie tarafından önerilen yöntemler de iyi bilinen yöntemlerdir (Brodie, 1859; Staudenmaier, 1898; Bychko ve ark, 2022).

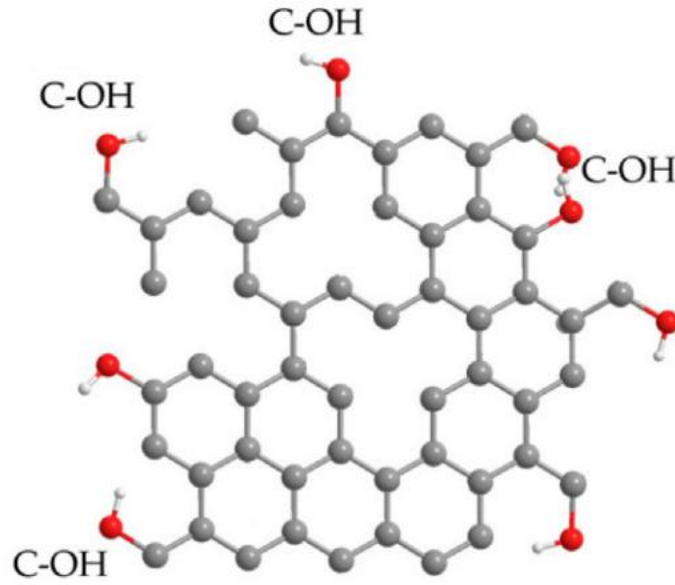
Hummers yöntemiyle üretilen GO'nun Brodie veya Staudenmeier tarafından üretilen GO'ya kıyasla daha yüksek miktarda asidik grup içerdiği iyi bilinmektedir (Briseboisa ve Siaj, 2020). Daha yüksek miktarda asidik grup, GO'nun sulu bir ortamda daha etkili bir şekilde pul pul dökülmesine ve indirgenmesine yol açar (Feicht ve ark, 2019). Bununla birlikte, bu yöntemlerin önemli bir sorunu nitrik asit veya nitratların

kullanımı ile ilgilidir. Bu da şiddetli bir reaksiyon ortamının oluşmasına yol açmaktadır. Tour'un prosedürüne göre GO sentezi, Hummers tarafından sentezlenen GO'ya kıyasla daha yüksek asidik grup içeriğine sahip GO elde edilmesini sağlar. Tour yöntemi, güvenlik, basitlik ve ortaya çıkan ürün yapısı özellikleri açısından belirgin avantajlar göstermektedir. Nitrik asit ve sodyum nitratın fosforik asit ile değiştirilmesi, karbon hekzagonal kafes hasarının azaltılmasını sağlar. Sonuç olarak, Tour yöntemi ile elde edilen GO, Hummers, Brodie veya Staudenmeier ile elde edilen GO'lara kıyasla daha düşük karbon kafesi kırılma derecesine ve daha yüksek sp^3/sp^2 hibridize karbon oranına sahiptir (Bychko ve ark, 2022).

GO'nun polimerler, altın ve çeşitli manyetik nanopartiküller ile nanokompozitleri; fototerapi, biyo-görüntüleme, ilaç ve gen iletimi, biyo-algılama ve antibakteriyel etki gibi alanlarda çok sayıda biyoteknolojik uygulamaları mevcuttur. Özellikle $\pi-\pi^*$ geçişi düşük enerjili elektron hareketine yol açarak GO'nun biyo-algılama ve biyo-görüntüleme yeteneklerini desteklemektedir. İyi biyomedikal uygulamalar elde etmek için GO'nun hazırlanması ve işlevselleştirilmesi uygun şekilde yapılmalıdır (Banerjee, 2018).

1.1.7. İndirgenmiş grafen oksit

Çok çeşitli karbon nanomalzemeleri arasında rGO, belirgin fizikokimyasal özellikleri, erişilebilirliği ve umut verici perspektifleri nedeniyle en ilgi çekici nanomalzeme olmaya devam etmektedir (Tarcan ve ark, 2020). Enerji depolama ve dönüştürme teknolojileri dışında, rGO; sorbentler, katalizörler gibi birçok kimyasal ve biyolojik uygulamada kullanılmaktadır (Rowley-Neale ve ark, 2018; Bychko ve ark, 2022).

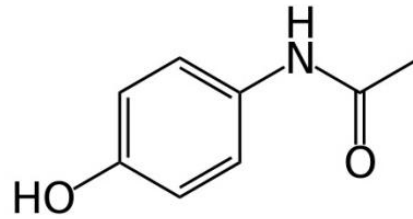


Şekil 1.7. rGO'nun kimyasal yapısı (Arshad ve ark, 2019)

rGO elde etmek için iyi bilinen yöntem, GO'nun indirgenmesine dayanmaktadır. rGO ayrıca GO'nun termal, mikrodalga, fotolitik veya radyasyon işlemiyle ve bu yöntemlerin bir kombinasyonu kullanılarak da elde edilebilir. Bazı durumlarda, bir sentez prosedürünü basitleştiren ultrason işlemi olmaksızın yüksek oranda pul pul dökülmüş bir rGO elde etmek mümkündür (Bychko ve ark, 2022).

1.2. Parasetamol

Parasetamol (PAR), (N-asetil-p-aminofenol, asetaminofen) ateş düşürücüdür ve birçok soğuk algınlığı ve grip ilacının ana bileşeni olarak ağrı ve ateş tedavisinde yaygın olarak kullanılan en popüler non-steroid anti-inflamatuar ilaçlardan biridir (Sjoukes ve ark, 2016; Fekry ve ark, 2022).



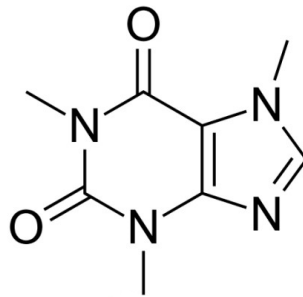
Şekil 1.8. Parasetamolün kimyasal yapısı (Alam ve ark, 2022)

Parasetamol dünyada en yaygın kullanılan ilaçlardan biridir. Prostaglandin miktarında azalmaya neden olarak baş ağrısı ve migren, kas ağrıları, nevralsi, sırt ağrısı, eklem ağrısı, romatizmal ağrı, genel ağrı, diş ağrısı, diş çıkarma ağrısı, regl ağrısı gibi diğer ağrıların önlenmesine yardımcı olur ve ayrıca bakteriyel veya viral kaynaklı ateşin düşürülmesinde kullanılır. Kullanımı yaşlılar ve küçük çocuklar da dahil olmak üzere çoğu insan için uygundur (Rodenas ve ark, 2000; Sharma ve ark, 2011).

Parasetamol, tabletler, kapsüller, damlalar, iksirler ve süspansiyonlar gibi farklı dozaj formlarında mevcuttur (Kartal, 2006). PAR'ın sınırlı kullanımı herhangi bir zararlı yan etkiye neden olmaz. Bununla birlikte, aşırı doz ve kronik PAR kullanımı böbrek ve karaciğer hasarına neden olacak toksik metabolit birikimi oluşturur (Goyal ve Singh, 2006; Li ve Jing, 2007; Thu ve ark, 2018)

1.3. Kafein

Kafein (KAF), (1,3,7-trimetil-1H-purin-2,6(3H,7H)-dion) merkezi sinir sistemindeki uyarıcı etkisi nedeniyle bir ilacın analjezik etkisini artıran ve ağrıya bağlı depresyonun giderilmesine yardımcı olan bir bileşen olarak kabul edilir (Nehlig ve ark, 1992; Jin ve ark, 2016; Fekry ve ark, 2022).



Şekil 1.9. Kafein kimyasal yapısı (Alam ve ark, 2022)

Kafein, birçok yiyecek, içecek ve ilaçta yaygın olarak kullanılan bir alkaloiddir. Psikoaktif bir madde olarak yaygın şekilde tüketilir ve kahve, çay, çikolata, kakao ve alkolsüz içeceklerde yaygın olarak bulunur. Dozaja bağlı olarak, kafeinin tüketici üzerinde olumlu veya zararlı etkileri olabilir (Mitchell ve ark, 2014; Silva ve ark, 2014). KAF, psikotropik madde olarak uygulanan psikoaktif bir ilaçtır. Aynı zamanda analjeziklerin ve soğuk algınlığı ilaçlarının bir bileşeni olarak kabul edilir. Merkezi sinir sistemini uyarma (Szczepanik ve ark, 2016), gastrik asit salgısını uyarma (Liszt ve ark, 2017), diürez (Marx ve ark, 2016) ve kan basıncını artırma (Teng ve ark, 2016) gibi

etkileri nedeniyle yaygın olarak anestezi olarak tüketilmektedir. Aşırı kafein tüketiminin insan sağlığı üzerinde dehidrasyon (Sheak ve ark, 2018), DNA onarımının engellenmesi (Abusnina ve ark, 2017; Ceja-Navarro ve ark, 2014), demir başta olmak üzere mineral emiliminin engellenmesi (Abbaspour ve ark, 2014), kanser (Hashibe ve ark, 2015), kalp hastalıkları (Mejia ve Ramirez-Mares, 2014), yaşlanma ve hamilelik sorunları (Fulay ve ark, 2018) gibi ciddi etkileri bulunmaktadır (Abd-Rabboh ve ark, 2022).

Parasetamol ve kafein kombinasyonu dünyada en yaygın kullanılan kombinasyondur (Rahimi ve ark, 2020; Alam ve ark, 2022).

Parasetamol ve kafeinin eş zamanlı tayini için voltametrik, kromatografik (Deconinck ve ark, 2011; Franeta ve ark, 2002) ve spektrofotometrik teknikler (Dinc ve Baleanu 2022; Dervadiya ve ark, 2011) gibi çeşitli yöntemler literatürde rapor edilmiştir (Narayanan ve Austin, 2016).

1.4. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımı oluşturan bileşenlerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinden, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin farklılıklarından faydalanılarak değişik hızlarla hareket etmeleri esasına dayanan bir ayırma, saflaştırma ve tayin metodudur (Topkafa, 2022). Bu ayırma işleminde etkili olan faktörler arasında adsorpsiyon (sıvı-katı), dağılma (sıvı-sıvı) ve afinite ile ilgili molekül özellikleri veya molekül ağırlıkları arasındaki farklılıklar yer almaktadır (Cuatrecasas ve ark, 1968; Porath, 1997). Bu farklılıklar nedeniyle, karışımın bazı bileşenleri sabit fazda daha uzun süre kalır ve kromatografi sisteminde yavaş hareket ederken, diğerleri hızlı bir şekilde hareketli faza geçer ve sistemi daha hızlı terk eder (Harris, 2004; Coskun, 2016).

Bu yaklaşıma göre kromatografi tekniğinin temelini üç bileşen oluşturur.

- Sabit faz: Bu faz her zaman "katı" bir fazdan veya "katı bir desteğin yüzeyine adsorbe edilmiş bir sıvı tabakasından" oluşur.

- Hareketli faz: Bu faz her zaman "sıvı" veya "gaz bileşeninden" oluşur.

- Ayrılmış moleküller

Sabit faz, hareketli faz ve karışımda bulunan maddeler arasındaki etkileşimin türü, moleküllerin birbirinden ayrılmasında etkili olan temel bileşendir (Coskun, 2016).

1.4.1. Kromatografinin sınıflandırılması

Kromatografi 3 sınıfa ayrılır.

- Uygulanan metoda göre
 - ❖ Düzlem Kromatografisi
 - İnce Tabaka Kromatografisi
 - Kağıt Kromatografisi
 - ❖ Kolon Kromatografisi
- Sabit faza göre
 - ❖ Adsorpsiyon Kromatografisi
 - ❖ Dağılma Kromatografisi
 - ❖ İyon Değişirme Kromatografisi
 - ❖ Sterik Seçici (Boyut Eleme) Kromatografisi
 - ❖ Afinite Kromatografisi
- Hareketli faza göre
 - ❖ Sıvı Kromatografisi (LC)
 - ❖ Gaz Kromatografisi (GC)
 - ❖ Süperkritik Akışkan Kromatografisi (SFC) (Topkafa, 2022)

1.4.1.1. Uygulanan metoda göre

Düzlemsel kromatografide, sabit faz, düz bir plaka üzerine tutturulan kimyasal veya bir kağıdın gözenekleridir ve bu durumda hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder (Topkafa, 2022).

İnce tabaka kromatografisi bir "katı-sıvı adsorpsiyon" kromatografisidir. Bu yöntemde sabit faz, cam plakalar üzerine kaplanmış katı bir adsorban maddedir. Adsorban madde olarak kolon kromatografisinde kullanılan tüm katı maddeler (alümina, silika jel, selüloz) kullanılabilir. Bu yöntemde, hareketli faz sabit faz boyunca yukarı doğru hareket eder. Çözücü, kapiler hareket vasıtasıyla çözücü ile ıslatılmış ince plakayı yukarı doğru hareket ettirir. Bu işlem sırasında, önceden bir pipetle plakanın alt kısımlarına damlatılan karışımı da farklı akış hızlarıyla yukarı doğru hareket ettirir. Böylece analitlerin ayrılması sağlanır. Bu yukarı doğru hareket hızı materyalin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır (Sherman ve ark, 1991; Coskun, 2016).

Kâğıt kromatografisinde destek malzemesi su ile yüksek oranda doymuş bir selüloz tabakasından oluşur. Bu yöntemde kalın bir filtre kâğıdı desteği oluşturur ve gözeneklerine yerleşen su damlaları sabit "sıvı fazı" oluşturur. Mobil faz, bir geliştirme tankına yerleştirilen uygun bir sıvıdan oluşur. Kâğıt kromatografisi bir "sıvı-sıvı" kromatografisidir (Stoddard ve ark, 2007; Coskun, 2016).

Proteinler boyut, şekil, net yük, kullanılan sabit faz ve bağlanma kapasitesi gibi farklı karakteristik özelliklere sahip olduğundan, bu karakteristik bileşenlerin her biri kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırılabilir. Bu yöntemler arasında en sık kolon kromatografisi uygulanmaktadır. Bu teknik biyomoleküllerin saflaştırılması için kullanılır. Bir kolon (sabit faz) üzerine önce ayrıştırılacak örnek, ardından yıkama tamponu (mobil faz) uygulanır. Fiberglas bir destek üzerine yerleştirilen kolon malzemesinin içinden akışı sağlanır. Örnekler cihazın alt kısmında zamana ve hacme bağlı bir şekilde biriktirilir (Das ve Dasgupta, 1998; Coskun, 2016).

1.4.1.2. Sabit faza göre

Sabit faza göre;

1. Adsorpsiyon kromatografisi
 2. Dağılma kromatografisi
 3. İyon değiştirme kromatografisi
 4. Sterik seçici (boyut eleme) kromatografisi
 5. Afinite kromatografisi
- en çok kullanılan yöntemlerdir.

Adsorpsiyon kromatografisi Van der Waals kuvvetleri ile yüzey bağlanmasına dayanır. Ayırma özellikleri temel olarak adsorbanın, ürünün ve çözücünün polaritelerinin, dipol momentlerinin ve hidrojen bağlarının etkileşimi ile belirlenir. Adsorpsiyon kromatografisi genellikle hem lipofilik hem de hidrofilik fermantasyon ürünlerinin izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılır. Literatürde, çoğunlukla laboratuvar ölçeğinde olmak üzere sayısız uygulama örneği bulunabilir. Düşük ve yüksek molekül ağırlıklı ürünlere uygulanabilen adsorpsiyon kromatografisinin ölçek büyütme sorunu ve teknik yönleri özellikle dikkat gerektirmektedir (Voser, 1982).

Dağılma kromatografisinde iki sıvı faz arasındaki çözünen madde dağılımındaki farklılıklar sayesinde bir numune karışımının ayrılması sağlanır. Geleneksel kromatografi tekniklerinde olduğu gibi, çözünenler sabit faza olan farklı afinitelerinin bir sonucu olarak ayrılırlar: Düşük afiniteye sahip olanlar kolon boyunca daha hızlı hareket edecek ve çıkışa daha erken ulaşacaktır ve bunun tersi de geçerlidir (Morley ve Minceva, 2021).

İyon değişim kromatografisi, yüklü gruplar ile katı destek malzemesi (matris) arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanır. Matris, ayrıştırılacak analitin zıt bir iyon yüküne sahiptir ve analitin kolona afinitesi iyonik bağlarla sağlanır. Analitler pH, iyon

tuzlarının konsantrasyonu ya da tampon çözeltinin iyonik gücü değiştirilerek kolondan ayrılır (Karlsson ve ark,1998). Pozitif yüklü iyon değiştirici reçineler, anyon değiştirici matrisler olarak adlandırılır ve negatif yüklü analitleri adsorbe eder. Negatif yüklü gruplarla bağlanmış reçineler ise katyon değişim matrisleri olarak bilinir ve pozitif yüklü analitleri adsorbe eder (Biosciences, 2002; Coskun, 2016).

Boyut eleme kromatografisi isminden de anlaşılacağı gibi farklı boyutlardaki moleküllerin ayrılmasında kullanılır. Belirli bir gözenek çapına sahip olan analitik kolonda ayırmanın gerçekleşmesi sonucu moleküller farklı alıkonma zamanları ile kolonu terk ederler.

Afinite kromatografi tekniği enzimlerin, hormonların, antikorların, nükleik asitlerin ve spesifik proteinlerin saflaştırılması için kullanılır (Wilchek ve Chaiken, 2000). Spesifik protein ile kompleks oluşturabilen bir ligand (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb.) kolonun dolgu maddesini bağlar. Ligand ile kompleks oluşturan spesifik protein katı desteğe (matris) bağlanır ve kolonda tutulur, serbest proteinler ise kolonu terk eder. Daha sonra bağlı protein, pH'ın değiştirilmesi veya bir tuz çözeltisinin eklenmesi yoluyla iyonik gücünün değiştirilmesi yoluyla kolonu terk eder (Firer, 2001; Coskun, 2016).

1.4.1.2. Hareketli faza göre

Gaz kromatografi yönteminde sabit faz, cihazın içine yerleştirilen ve inert bir katının yüzeyine adsorbe edilen sıvı bir sabit faz içeren bir kolondur. Gaz kromatografisi bir "gaz-sıvı" kromatografisidir. Taşıyıcı fazı He veya N₂ gibi gazlardan oluşur. İnert bir gaz olan hareketli faz yüksek basınç altında bir kolondan geçirilir. Analiz edilecek numune buharlaştırılır ve gaz halindeki mobil fazın içine girer. Numunenin içerdiği bileşenler mobil faz ile katı destek üzerindeki sabit faz arasında dağılır. Gaz kromatografisi, çok küçük moleküllerin son derece mükemmel bir şekilde ayrılması için basit, çok yönlü, son derece hassas ve hızlı bir şekilde uygulanan bir tekniktir. Çok az miktardaki analitlerin ayrılmasında kullanılır (Coskun, 2016).

Sıvı kromatografi tekniği ile kısa sürede birçok molekülün yapısal, fonksiyonel analizi ve saflaştırılması mümkündür. Bu teknik amino asitlerin, karbonhidratların, lipidlerin, nükleik asitlerin, proteinlerin, steroidlerin ve diğer biyolojik olarak aktif moleküllerin ayrılması ve tanımlanmasında mükemmel sonuçlar verir (Coskun, 2016). HPLC tanımı, İngilizce "High liquid pressure chromatography" kelimelerinin baş harflerinin birleştirilmesi ile oluşan bir kısaltmadır. HPLC, Yüksek Performanslı Sıvı

Kromatografinin kısaltmasıdır (Topkafa, 2022). Temel bir HPLC sisteminin ana bileşenleri; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve veri sistemidir (Reuhs, 2017).



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksit

Başta GO ve rGO olmak üzere türevleriyle birlikte grafen malzemeler, aromatik halka, serbest π - π elektron ve reaktif fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle birçok alanlarda incelenme ve uygulama alanı bulmaktadır. Yapılan kapsamlı incelemelerde grafen malzemelerin dikkate değer performanslarının olduğu görülmüştür (Mensah ve ark, 2018; Dasari ve ark, 2017). Örneğin, Zhao ve arkadaşları (Zhaove ark, 2015); aktif karbondan 40 kat daha fazla adsorpsiyon kapasitesi ile Cu^{2+} 'nın uzaklaştırılması için S katkılı bir grafen sünger geliştirmiştir. Enerji depolama uygulamasında, Li ve diğer çalışanlar (Li ve ark, 2018) iyi kontrol edilen piren doplu grafen kompozitin üç elektrotlu bir sistemde 1.5 A/g akım yoğunluğunda 15,000 döngüden sonra 310.7 F/g spesifik kapasitans ve %99 kapasitans tutma ile mükemmel elektrokimyasal performans sergilediğini bildirmişlerdir (Lee ve ark, 2019).

GO hazırlanması için üç ana sentez yöntemi; Brodie (Brodie, 1860), Staudenmaier (Staudenmaier,1898) veya Hummers yöntemleri (Hummers, 1958) ve bunların varyasyonlarıdır. Tüm bunlar kimyasal oksidasyon yoluyla grafit oksit sentezini ve ardından üretilen grafit oksidin mekanik pul pul dökülmesini içerir. Brodie yöntemi, grafitin nitrik asit içinde çözündürülmüş potasyum klorür ile karıştırılmasını sağlar. Staudenmaier yöntemi, malzemenin kalitesini artırmak için Brodie'nin yönteminin bir modifikasyonudur ve bu yöntemde asitliği artırmak için karışıma sülfürik asit eklenir. En çok kullanılan yöntem, katalizör olarak sodyum nitrat ve sülfürik asit varlığında grafitte potasyum permanganatın eklendiği Hummers yöntemidir. Tüm yöntemler grafen yapısına oksijenli fonksiyonel gruplar olarak -O-, -OH, -COOH eklenmesini ve polar karakterleri GO'yu hidrofilik hale getirdiğinden özellikle su çözeltilerinde olmak üzere birçok çözücüde dağılma ve pul pul dökülmesine elverişli kılabilir (Paredes ve ark, 2008; Zhu ve ark, 2010; Rommozzi ve ark, 2018).

Shi ve ark. Fe_3O_4 nanopatiküllerinin büyümesini ve GO'ların indirgenmesini tek bir adımda birleştiren solvotermal bir işleme rGO tabakalarına bağlı Fe_3O_4 nanopatikülleri ile nanokompozitleri sentezlemek için kolay bir yaklaşım sunmuşlardır. Bu $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{rGO}$ nanokompozitleri ayrıca yalıtkan bağlayıcılar eklenmeden spreyle biriktirme tekniği kullanılarak ince film süper kapasitör elektrotları üretmek için kullanılmıştır. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{rGO}$ nanokompozitlerinin, saf rGO veya saf Fe_3O_4 nanopatiküllerden çok daha yüksek spesifik kapasitans gösterdiği bulunmuştur (Shi ve ark, 2011).

Wang ve ark. rGO filminin güneş pillerinde uygulamalarını göstermiştir. Katı hal boya duyarlı güneş pilleri için her yerde kullanılan metal oksit pencere elektrotlarına alternatif olarak şeffaf, iletken ve ultra ince grafen filmler gösterilmiştir. Bu grafen filmler, pul pul dökülmüş GO'dan ve ardından termal indirgmeden üretilmiştir. Elde edilen filmler 550 S/cm gibi yüksek bir iletkenlik ve 1000-3000 nm üzerinde %70'in üzerinde bir şeffaflık sergilemiştir. Ayrıca, yüksek kimyasal ve termal kararlılığın yanı sıra ayarlanabilir ıslanabilirliğe sahip ultra pürüzsüz bir yüzey göstermiştir (Wang ve ark, 2008).

Nanokompozitler veya hibrit malzemeler, yeni optik, elektronik, termal, mekanik ve katalitik özellikleri nedeniyle son yıllarda yoğun araştırmaları teşvik etmiştir (Stankovich ve ark, 2006; Balazs ve ark, 2006; Capadona ve ark, 2007). GO ve rGO uygulamalarının yanı sıra, GO veya rGO'yu polimerler, nanopartiküller ve hatta nanotüpler ve fullerenler ile entegre eden kompozitler veya hibrit malzemeler üretmek büyük ilgi görmektedir. Geniş yüzey alanı ve yukarıda belirtilen özellikleri ile GO, nanokompozitler için matris olarak cazip bir seçim olmuştur. Örneğin, Stankovich ve arkadaşları GO'yu destek olarak kullanarak grafen bazlı polimer kompozitleri rapor etmişlerdir ve GO indirgindikten sonra (yani rGO) gelişmiş elektronik ve termal iletkenlikler göstermiştir (Stankovich ve ark, 2006). Bu, yeni bir tür kompozit malzeme ortaya çıkaracak ve muhtemelen yeni işlevsellik ve özellikler getirecektir. Metal oksit nanopartiküller de kompozitler oluşturmak için GO'ya entegre edilmiştir. Örneğin, Co_3O_4 (Xu ve ark, 2008) ve TiO_2 (Williams, 2008) nanopartikülleri GO tabakaları üzerinde biriktirilmiştir. Yukarıda bahsedilen nanopartiküllerin katalitik aktiviteleri nedeniyle, elde edilen kompozit malzemeler kataliz uygulamalarında umut vaat etmiştir (Zhou ve ark, 2009).

Geniş alanlı rGO şeffaf elektrotlar, organik malzemelere dayalı düşük maliyetli esnek güneş pillerinin vazgeçilmez bileşeni haline gelebilir. Son zamanlarda GO ve kimyasal olarak modifiye edilmiş rGO, yoğun olarak gelişen yeni organik perovskit bazlı güneş pillerinde elektron taşıma katmanları için bileşen olarak kullanılmıştır (Assadi ve ark, 2018). GO ve rGO kullanımı, kuantum verimliliğinde ve dayanıklılıkta gözle görülür bir artışla sonuçlanmaktadır (Dobrzanski ve ark, 2017; Yoon ve ark, 2017). Kakavelakis ve arkadaşları (Kakavelakis ve ark, 2017), destek ve dağıtıcı olarak GO tabakaları kullanarak nanoyapılandırılmış TiO_2 (organik güneş pilleri ve foto kataliz sistemlerinin önemli bileşeni) sentezinin etkili yöntemini de göstermiştir. GO veya rGO

ayrıca sıvı elektrolit bazlı boya duyarlı ultra düşük maliyetli güneş pillerinde karşı elektrot için yararlı malzemelerdir (Williams ve ark, 2008; Dideikin ve Vul, 2019).

Kimya ve malzeme bilimindeki uygulamaların yanı sıra, rGO biyolojide de önemli rol oynamıştır. Yakın zamanda Chen ve arkadaşları, rGO filmlerinin hücre büyütmek için kullanılabileceğini ve mükemmel biyoyumluluk gösterdiğini bildirmiştir (Chen ve ark, 2008; Zhou ve ark, 2009).

Dai ve arkadaşları, suda çözünmeyen kanser ilaçlarının iletimi için PEG-ilave nanografen oksit rapor etmiş ve fonksiyonelleştirilmiş nanografen tabakaların belirgin toksisite olmaksızın biyoyumlu olduğunu ve aromatik bir antikanser ilacı olarak yüksek verimlilikle yükleyebildiğini bulmuşlardır (Liu ve ark, 2008). Ayrıca anti-kanser ilacı doksorubisinin, kanser hücrelerinin seçici olarak öldürülmesi için bir antikora işlevselleştirilmiş nanografen oksit üzerine yüklendiğini bildirmişlerdir (Sun ve ark, 2008; Yang ve ark, 2011).

Zhang ve arkadaşları, folik asit konjuge sülfonik nano ölçekli GO hazırlamış ve bunları, karışık antikanser ilaçların kontrollü yüklemesini ve hedefli dağıtımını gerçekleştirmek için iki karışık antikanser ilacın yüklenmesinde kullanmıştır (Zhang ve ark, 2010; Yang ve ark, 2011).

Düşük sitotoksitesisi (Zhang ve ark, 2014) ile birlikte kimyasal modifikasyon yetenekleri GO'ya biyolojik ve tıbbi uygulamalar için geniş fırsatlar sunmaktadır. Son yayınlar, kimyasal olarak modifiye edilmiş GO'nun kanser tedavisi için sürükleyici taşıyıcı olarak (Ma ve ark, 2017) ve ribonükleik asit (RNA) girişimine dayalı gen kanseri tedavisi için bir araç olarak kullanıldığını bildirmektedir (Ren ve ark, 2017). GO'nun AgInZnS kuantum noktaları ile kombinasyonu ayarlanabilir fotolüminesans üretir ve kanser hücrelerinin in vivo optik görüntülemesi ve fototerapi için kullanılabilir (Zang ve ark, 2017; Yang ve ark, 2011).

Bileşenlerden en az biri için başlangıç malzemesi olarak GO kullanılarak çeşitli elektronik cihazlar üretilmiştir. Bu cihazlardan biri grafen tabanlı bir alan etkili transistördür (FET) (Su ve ark, 2010; Wang ve ark., 2010). rGO kullanan FET'ler kimyasal sensörler (Lu ve ark, 2011; Chen ve ark, 2012; He ve ark, 2012) ve biyosensörler olarak kullanılmıştır. Yarı iletken olarak işlevselleştirilmiş rGO kullanan FET'ler hormonal katekolamin moleküllerini (He ve ark, 2010), avidini (He ve ark, 2011) ve DNA'yı (Cai ve ark, 2014) tespit etmek için biyosensör olarak kullanılmıştır. Liu ve arkadaşları (Liu ve ark, 2010) bir elektrot üzerinde biriktirildikten sonra glikoz oksidaz ile işlevselleştirilmiş GO kullanarak elektrokimyasal glikoz sensörü üzerinde

çalışmıştır. GO'nun kullanılması beklenebilecek başlıca alanlardan biri, herhangi bir alt tabaka üzerinde biriktirildikten sonra şeffaf iletken filmlerin üretilmesidir. Bu tür kaplamalar esnek elektroniklerde, güneş pillerinde, sıvı kristal cihazlarda, kimyasal sensörlerde ve dokunmatik ekran cihazlarında kullanılabilir. Cai ve diğerleri (Cai ve ark, 2014), Matyba ve diğerleri (Matyba ve ark, 2010) ve Becerril ve diğerleri (Becerril ve ark, 2008) GO/rGO'yu ışık yayan diyotlar (LED'ler) ve güneş pili cihazları için şeffaf bir elektrot olarak kullanmıştır. Şeffaf elektrot GO/rGO, polimer güneş pilleri ve LED'lerde delik taşıma katmanı olarak da kullanılmıştır (Saha ve ark, 2014; Li ve ark, 2010; Ray, 2015).

GO ve rGO son derece yüksek bir yüzey alanına sahiptir; bu nedenle bu malzemelerin bataryalarda ve çift katmanlı kapasitörlerde elektrot malzemesi olarak kullanılmasının yanı sıra yakıt hücreleri ve güneş pillerinde de kullanılması düşünülmektedir (Zhu ve ark, 2010a,b). GO'nun üretimi diğer grafen malzemelere kıyasla kolayca ölçeklendirilebilir ve bu nedenle yakında enerji ile ilgili amaçlar için kullanılabilir. Hidrojen depolama yeteneği, gelecekte hibrid arabalarda hidrojen yakıtının depolanması için çok faydalı olabilir. GO/rGO nanokompozitleri lityum iyon pillerde yüksek kapasiteli enerji depolama için de kullanılabilir. Bu durumda, elektriksel olarak yalıtkan metal oksit nanoparçacıkları rGO üzerine adsorbe edilerek bu malzemelerin pillerdeki performansı artırılmıştır (Wang ve ark, 2010; Yang ve ark, 2010; Lee ve ark, 2010; Zhou ve ark, 2010; Zhang ve ark, 2010). Zhou ve arkadaşları (Zhou ve ark, 2010) rGO ile sarılmış Fe_3O_4 anot malzemesi (yani rGO üzerinde Fe_3O_4) kullanarak Liion pil cihazı üretmiş ve saf Fe_3O_4 veya Fe_3O_4 ile karşılaştırıldığında enerji depolama kapasitesinin ve döngü kararlılığının arttığını bulmuştur. Zhu ve arkadaşları (Zhu ve ark, 2010a,b; Zhu ve ark, 2011) mikrodalga destekli eksfoliyasyon kullanarak yüksek yüzey alanlı rGO yapmış ve böylece enerji depolama cihazı olarak süper kapasitörlerin üretimi için GO'yu azaltmıştır. Bo ve arkadaşları (Bo ve ark, 2014) kafeik asit (CA)-rGO ile elektronik gaz sensörleri ve süper kapasitörler üretmiş ve potansiyel algılama ve enerji depolama uygulamaları için iyi performans bulmuşlardır (Ray, 2015).

GO/rGO, biyoalgılama uygulamaları, erken hastalık tespiti ve hatta kanser için tedavi bulmaya ve biyolojik olarak ilgili molekülleri tespit etmeye yardımcı olmak için kullanılacak floresan bir malzemedir. GO, daha iyi teşhis vaadiyle DNA ve proteinlerin tespiti için floresan bazlı biyosensörlerde başarıyla kullanılmıştır. GO, floresan rezonans enerji transferi (FRET) etkisini kullanan biyosensörlerde floresan

söndürme malzemesi olarak kullanılmıştır. Wang ve arkadaşları (Wang ve ark, 2010) 10 μM kadar düşük ATP'yi algılamak için floresein etiketli ATP aptamerinde FRET etkisini kullanmıştır. Lu ve arkadaşları (Lu ve ark, 2009) floresan etiketli tek sarmallı DNA (ssDNA) kullanmış ve bunun GO'ya kovalent olmayan bir şekilde bağlandığını ve ardından etiketin floresanının söndürüldüğünü bulmuştur. Tamamlayıcı bir ssDNA eklenmesi, etiketli DNA'yı GO yüzeyinden uzaklaştırmış ve floresanı geri kazandırmıştır. Song ve arkadaşları (Song ve ark, 2011) insan rahim ağzı kanseri ve insan meme kanseri hücrelerini tespit etmek için folik asitle işlevselleştirilmiş GO kullanmıştır (Ray, 2015).

GO biyomedikal alanda, özellikle de ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmaktadır. GO, sağlıklı hücreleri değil sadece tümörleri hedef aldığı ve düşük toksisiteye sahip olduğu için muhtemelen diğer birçok antikanser ilaçtan daha üstündür (Yang ve ark, 2011). Fonksiyonelleştirilmiş nano-GO (nGO), antikanser ilaçların hedefli dağıtımını üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Polietilen glikol (PEG) ile fonksiyonlandırılmış nGO'nun yüzeyine adsorbe edilmiş bir kampotesin türeviden olan SN38 (nGOPEGSN38) ilacın suda ve serumda çözünür kaynağı olarak kullanılmıştır (Liu ve ark, 2008). Farelerdeki melanom cilt kanseri, yakın kızılötesi lazer ve PEG ve hyaluronik asit ile işlevselleştirilen ve transdermal olarak verilen nGO ile fototermal ablasyon tedavisi kullanılarak tedavi edilmiştir (Jung ve ark, 2014). Başka bir çalışmada, manyetit, antikanser ilaç doksorubisin hidroklorür ile yüklü GO üzerine adsorbe edilerek ilacın miktatıslar kullanılarak belirli bölgelere hedefli olarak iletilmesi sağlanmıştır (Yang ve ark, 2009). Shen ve arkadaşları (Shen ve ark, 2012) GO/rGO kullanarak özellikle ilaç dağıtımını, kanser tedavisi ve biyolojik görüntüleme çeşitli biyomedikal uygulamaları incelemiştir (Ray, 2015).

Fotokataliz, özellikle çevre koruma için yoğun bir şekilde gelişen ve talep edilen teknolojilerden biridir (Ong ve ark, 2018). Foto katalizör fikri, organik güneş pilleri konseptinin evrimi olarak düşünülebilir. Güneş enerjisi dönüşümünü ve hedeflenen elektrokimyasal reaksiyonu gerçekleştirmeyi birleştirir. Fotokatalizörler, güneş ışığı emilimi için TiO_2 veya ZnO gibi geniş bant aralıklı yarı iletkenlerin aynı nanoparçacıklarını kullanır ve uyarılmış elektron deliği çiftlerinin yük ayrımı için sulu elektrolit ile arayüzü kullanır. Bir dizi tehlikeli kirliliğin elektrokimyasal oksidasyonunun gerçekleştirilmesini mümkün kılar (Ong ve ark, 2018; Deng ve ark, 2017). Yarı iletken nanokristallerin kimyasal olarak modifiye edilmiş GO ve rGO ile nanokompozitlerin yapısına dahil edilmesi, mevcut reaksiyonların aralığını

genişletmeye izin verir (Li ve ark, 2016). Nanodotlar ve geçiş metali nanoparçacıkları içeren son zamanlarda geliştirilen nanokompozit fotokatalizörler H₂O ve CO₂'yi bile ayrıştırmanın yolunu açmaktadır (Li ve ark, 2016; Lin ve ark, 2017). Fotokatalizörün nanokompozit yapısındaki GO ve rGO, hedeflenen reaksiyonları sürdürmek için bağlayıcı, elektrot ve harici kimyasal katalizör için destek görevi görür (Sudha ve Sivakumar, 2015). Son yayınlar ayrıca GO ve rGO kompozitlerinin metal nanoparçacıkları ve diğer işlevselleştirme ile biyoyakıt sentezi de dahil olmak üzere çeşitli reaksiyonlar (Chen ve ark, 2017; Zarrinjahan ve ark, 2017) için etkili geleneksel kimyasal katalizör olarak kullanıldığını bildirmektedir (Zheng ve ark, 2017; Dideikin ve Vul', 2019).

Gözenekli yapı GO membran filtreleri için de aynı öneme sahiptir. Günümüzde ağır metallerin ve CO₂'nin ayrıştırılması için atık su ve gazların filtrelenmesine yönelik membran teknolojileri, çevrenin korunmasında giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Yeni sonuçlar, CO₂/CH₄ ve CO₂/N₂ gaz karışımlarının etkili bir şekilde ayrılması için polimerlerle işlevselleştirilmiş GO kompozitlerine dayanan membranların başarılı bir şekilde uygulandığını göstermektedir (Vinoba ve ark, 2017). GO membranlarının iyonik ve moleküler eleme yeteneği, radyokimyasal atıkların ayrıştırılmasının yolunu açmaktadır (Ma ve ark, 2017). Grafen bazlı malzemeler arasında GO'nun en iyi antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği de rapor edilmiştir (Meng ve ark, 2017). GO bazlı filtreleme membranlarının ara katman aralığının katyonlar tarafından interkalasyon yoluyla ayarlanabileceği de gösterilmiştir (Chen ve ark, 2017; Dideikin ve Vul', 2019).

Membranların yanı sıra kimyasal olarak modifiye edilmiş GO ve GO bazlı kompozitler, ağır metal iyonları (Peng ve ark, 2017; Yu ve ark, 2017) dahil olmak üzere atık sulardan (Wang ve ark, 2018) çeşitli kirliliklerin giderilmesinde etkili adsorbanlardır. Ayrıca GO bazlı sorbentler daha sonra kullanılmak üzere başarılı bir şekilde rejenere edilebilmektedir (Wang ve ark, 2017; Qi ve ark, 2017; Dideikin ve Vul', 2019).

2.2. Grafen Oksit ve Türevlerinin Kromatografi Uygulamaları

Wang ve Yan kapiler elektrokromatografi ayırma işlemi için GO içeren monolitik kolon kullanıldığını bildirmiştir. GO, benzersiz özellikleri ve potansiyel farklı uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Burada, kapiler elektrokromatografi (CEC) için tek adımlı oda sıcaklığı polimerizasyonu yoluyla GO nanosheets dahil

monolitik kolon üretimi gösterilmiştir. GO, elektroendozmotik akışı (EOF) değiştirmek için iyonize oksijen içeren fonksiyonel grupların yanı sıra hidrofobiklik ve $\pi-\pi^*$ elektrostatik istifleme özelliği vermek için aromatik makromolekül sağladığından, CEC için durağan faz olarak çekicidir. GO'nun monolitik kolona dahil edilmesi, test edilen nötr analitler (alkil benzenler ve polisiklik aromatikler) ile sabit faz arasındaki etkileşimleri büyük ölçüde artırmış ve CEC ayrımlarını önemli ölçüde iyileştirmiştir. GO içeren monolitik kolonda test edilen nötr analitlerin temel ayrımı, tipik ters faz ayırma mekanizması temelinde gerçekleştirilmiştir. EOF'nin hassasiyeti (bağıl standart sapma (RSD), n = 3) %0,3 iken, test edilen nötr analitler için alıkonma süresi, pik alanı ve pik yüksekliğinin hassasiyeti sırasıyla %0,4-3,0, %0,8-4,0 ve %0,8-4,9 aralığında bulunmuştur. Buna ek olarak, bir dizi anilin, GO katkılı monolit üzerinde iyi bir şekilde ayrılmıştır. GO katkılı monolitik kolonlar CEC ayrımı için umut vericidir (Wang ve Yan, 2012).

Qu ve ark. GO fazı hazırlamış ve gaz kromatografik ayırma için kullanmıştır. GO nano tabakaları, çapraz bağlama maddesi olarak 3-aminopropildietoksimetil silan kullanılarak erimiş silika kapiler kolonun iç yüzeyine kovalent olarak bağlanmıştır. Hazırlanan GO nano tabakaları TEM ile karakterize edilmiş ve GO kaplaması SEM ile karakterize edilmiştir. Yüksek performanslı bir sabit faz olarak GO, faz oranını artırmak için sadece yüksek bir yüzey alanı sağlamakla kalmaz, aynı zamanda uçucu aromatik veya doymamış organik bileşiklerle hidrofobiklik, hidrojen bağı ve $\pi-\pi^*$ elektrostatik istifleme etkileşimlerinin oluşumu için zengin fonksiyonel gruplar sağlar. Böylece, alkoller ve aromatik bileşikler dahil olmak üzere çok çeşitli organik bileşiklerin karışımları iyi bir şekilde ayrılmış ve GO kaplı 1.0 m \times 200 μ m i.d. erimiş silika kapiler kolonda anizol için metre başına 1990 teorik plaka verimliliği elde edilmiştir. Deneysel sonuçlar GO kaplı kapiler kolonların gaz kromatografik ayırma için umut verici olduğunu göstermektedir (Qu ve ark, 2012).

Gonzalez- Alvarez ve arkadaşları, fosforyum iyonik sıvıların kapiler iç duvarına polimerizasyonundan önce CH_2Cl_2 içinde GO tabakalarının bir dispersiyonu ile kapiler işlemini göstermiştir. GO dispersiyonunun eklenmesi, özellikle bir pestisit karışımını ayırırken kromatografik profili iyileştirir. Elüsyon sırası tüm pestisitler için aynı kalmaktadır, bu da GO ilavesinin sabit fazın doğasını değiştirmedeğini göstermektedir. GO'nun yaptığı şey, yüzey alanını artırarak ve kılcal duvar boyunca daha homojen bir polimer iyonik sıvı filmi sağlayarak ayırmayı iyileştirmektir (Gonzalez- Alvarez ve ark, 2013; Liang ve ark, 2018).

Li ve arkadaşları, izokratik modda küçük moleküllerin ayrılmasını artırmak için yeni bir HPLC sabit fazı geliştirmek üzere GO'yu gözenekli bir polimer monolit ile birleştiren bir yöntem bildirmiştir. Bu raporda, 3-(trimetoksisilil) propilmetakrilat (TMSPMA) modifiye GO hazırlanmış ve poli (glisidil metakrilat-ko-etilen dimetakrilat) (poli(GMA-ko-EDMA)) polimerizasyonunda fonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. TMSPMA ile modifiye edilmiş GO konsantrasyonunun artması sadece alıkoyma faktörünü ve çözünürlüğü arttırmakla kalmamış aynı zamanda steroidlerin pik genişliğini de arttırmıştır. Mobil fazdaki asetonitril içeriğinin steroidlerin alıkonma faktörleri üzerindeki etkisi, steroidlerin ayırma mekanizmasının ters faz kromatografisi olduğunu göstermektedir (Li ve ark, 2013; Liang ve ark, 2018).

Lin ve arkadaşları, homojen bir çözelti oluşturmak için GO nano tabakalarını doğrudan polimer öncü çözeltisine dağıtmış, ardından CEC için GO içeren bir poli(3 akrilamidofenil boronik asit-ko-pentaeritritol triakrilat) monolitik kolon hazırlamak için bir kılcal damar içine sokmuştur (Lin ve ark, 2015). GO'nun monolite dahil edilmesinden sonra, daha yüksek elektro ozmotik akış hareketliliği ve GO çözünen etkileşimi nedeniyle, yüksek ayırma verimliliği ve tüm analitlerin (nötr, polar ve peptit bileşikleri) iyi çözünürlükleri elde edilmiştir (Liang ve ark, 2018).

Gao ve arkadaşları, GO'yu öncelikle kılcal kolonun iç duvarına aşılınmış amino gruplarına sahip dokunaç tipi bir polimer kaplama üzerine immobilize ederek OT-CEC için hazırlanan yeni bir sabit faz bildirmiştir (Gao ve ark, 2015). İç yüzeyden uzanan dokunaçlar nedeniyle, GO'nun birden fazla katman halinde bağlanmasına izin vermek için yeterli bir mesafe sağlayabilir. Önerilen kapiler (GO-GMA@kapiler), nötr küçük moleküllere, amino asitlere ve efedrin psödoefedrin izomerlerine karşı, sadece dokunaç tipi polimer veya GO kaplı kapiler ile karşılaştırıldığında daha yüksek çözünürlüklü kolon verimliliği ile mükemmel ayırma kabiliyeti göstermiştir (Liang ve ark, 2018).

2.3. Parasetamol ve Kafein

Parasetamol antipiretik aktiviteye sahip nonopioid bir analjeziktir ve düşük yan etki insidansı ile ağrının giderilmesinde etkilidir (Moore ve ark, 1998). En yaygın kullanılan analjeziklerden biridir ve dünya çapında reçetesiz olarak yaygın bir şekilde temin edilebilir (Weil ve ark, 2007).

Yakın zamanda yapılan bir sistematik inceleme (Barden ve ark, 2004), ameliyat sonrası ağrı yönetimi için parasetamolün etkinliğini ve güvenliğini incelemiş ve jinekoloji cerrahisi, karın cerrahisi, ortopedik cerrahi gibi çok çeşitli cerrahi türlerini

içeren çalışmaların bulgularını, yirmi yaş dişlerinin çekilmesi de dahil olmak üzere diğerlerinin arasına dahil etmiştir (Moore ve McQuay, 1997; Weil ve ark, 2007).

Kafein dünyada en yaygın tüketilen uyarıcıdır ve bazı tıbbi kullanımları da vardır (Clark ve ark,1992), alternansı iyileştirir, yorgunluğu ve uykululuğu azaltır (Wyatt ve ark, 2004; Moreno ve ark, 2009), düşük dozları loktomotor uyarımı artırır (Hsu ve ark, 2010). Kafein, düz kas gevşemesi, iskelet kası uyarımı ve serebral damar daralması (Goodman ve Gilman, 1996) dahil olmak üzere daha fazla fonksiyonu etkilemekte, sitokrom oksidazı artırarak kalp fonksiyonunu artırmaktadır (Verma ve ark, 2009; Ibrahim,2011).

Griffiths ve Woodson kafeinin davranışsal uyarıcının yanı sıra kalp ve solunum sistemini aktive ettiğini, asit, pepsin ve gastrinin gastrik salgılanmasını uyardığını göstermiştir (Griffiths ve Woodson, 1988; Clark ve ark, 1992). Bazı çalışmalar kafeinin fare ve sıçanda meme tümörlerini azalttığını (Vanderploeg ve welsch, 1991; Rogers ve ark., 1998), diğer yandan sıçan ve farede meme bezlerini uyardığını göstermiştir (Vanderploeg ve ark, 1992). Kafein fare ve sıçanlarda akciğer tümör oluşumuna karşı koruma sağlamıştır (Chung, 1999; Ibrahim,2011).

Svensson ve arkadaşları, 100 mg kafeinin 23 gönüllünün ruh hali üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bulmuşlardır (Svensson ve ark, 1980). Benzer şekilde, Swift ve Tiplady 200 mg kafeinin yaşlı gönüllülerin ruh hali üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bulmuştur (Swift ve Tiplady, 1988). Bu etki eksikliği muhtemelen örneklem büyüklüğünü veya metodolojinin diğer ayrıntılarını yansıtıyor olabilir. Lieberman, kafeinin uyanıklık üzerindeki faydalı etkilerinin en kolay sirkadiyen uyanıklık düşük olduğunda ve ruh hali zorlu performans görevleri bağlamında ölçüldüğünde ortaya çıktığını öne sürmektedir (Lieberman, 1992). Rusted, ayrıca ruh hali etkilerinin performanstaki değişikliklerden sonra ortaya çıktığını ve bunun bazı çalışmalarda etkilerin olmamasını açıklayabileceğini öne sürmektedir (Rusted,1999; Smith, 2002).

Lieberman, tipik bir kafein içeren içeceğin tek bir porsiyonunda bulunan miktardan çok daha fazla olan 300 mg veya daha yüksek tek bolus dozlarda uygulandığında anksiyeteyi artırabileceğini öne sürmüştür. Bununla birlikte, daha düşük dozlarda bu ruh hali üzerinde çok az etkisi olduğu veya belirli koşullar altında anksiyete seviyelerini azaltabileceği görülmektedir. Ayrıca, kafeinin orta dozlarda uygulandığında kişinin kendi depresyonunu azalttığı da gözlemlenmiştir (Lieberman, 1988; Smith, 2002).

2.4. Tezin Amacı

Yapılan bu tez çalışmasında; modifiye edilmiş Hummers metodu kullanılarak GO sentezlenmesi ve sabit faz destek malzemesi olan silika üzerine GO'nun immobilizasyonunun yapılarak GO-Si ve hidrazin ile indirgenmesi ile rGO-Si sabit fazlarının elde edilmesi, elde edilen sabit fazların fiziksel ve kimyasal yapı karakterizasyonlarının yapılması, karakterizasyonu yapılmış sabit fazlar üzerinde; ağrı kesici/ateş düşürücü etkiye sahip olan parasetamol ve kafeinin ayrılması için uygun hareketli faz, sıcaklık ve akış hızı parametreleri belirlenmesi, kromatografik yöntemlerin kapasite faktörleri (k'), ayırma gücü (R_s), tabaka sayısı (N) değerlerinin hesaplanması ve nihai metotların validasyon çalışmalarının yapılarak, bu etken maddeleri içeren ilaçların HPLC analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler, kullanım özelliklerine göre kromatografik veya analitik saflıkta olup, Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, Supelco ve Labsan firmalarından temin edilmiştir. (Çizelge 3.1.) Kromatografik ayırmalarda kullanılan kolonlar ve özellikleri ise Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Yapılan kromatografik analizlerde kullanılan standartlar Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Grafen Oksit Sentezi	İndirgenmiş Grafen Oksit -Silisyum (rGO-Si) Eldesi
Grafit tozu	GO-Si
H ₂ SO ₄	Metanol
H ₃ PO ₄	Saf su
H ₂ O ₂	Dimetilformamid
KMnO ₄	Asetil Klorür
HCl	Aseton
Saf su	Hidrazin
Metanol	
Grafen Oksit -Silisyum (GO-Si) Eldesi	İlaç Molekülleri Analizi
GO	Metanol
Saf Su	Ultra saf su
Metanol	Acetonitril
Aminopropil Silika (~9nm)	Parasetamol
NHS (N-hidroksisüksinimid)	Kafein
EDC (1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) karbodiimid hidroklorid)	

Çizelge 3.2. Kromatografik Ayırmalarda Kullanılan Kolonlar

İlaç Molekülleri Analizi (HPLC)
GO-Si Kolonu (250x4.6mm)
rGO-Si Kolonu (250x4.6mm)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Parasetamol ve kafein üzerinde gerçekleştirilen ilaç molekülleri analizi; HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. GO ve rGO eldesinde; analitik terazi, manyetik karıştırıcı, ultrasonik banyo, santrifüj cihazı, pH metre ve etüv kullanılmıştır. Fiziksel ve kimyasal karakterizasyon analizleri Uv-Vis, FTIR, XRD, TEM, SEM cihazlarında gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların marka ve modelleri **Çizelge 3.3.**'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	Agilent 1220 Infinity II
UV-Vis Spektrofotometre	Shimadzu UV-1280
FTIR	Bruker Vertex 70
TEM	Jeol Jem 2100
SEM	ZEISS EVO LS10
XRD	EUROPE Masüstü XRD
Etüv	Nüve FN 4000
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex
pH metre	Hanna HI 2211
Dijital Manyetik karıştırıcı	Isotex
Analitik terazi	Radwag
Santrifüj Cihazı	Elektro-mag M815 M

3.3. Grafen Oksit Sentezi

GO, modifiye edilmiş Hummers'ın yöntemiyle saflaştırılmış doğal grafitten hazırlanmıştır (Hummers ve Offeman, 1958). 500 ml'lik bir behere 360:40ml H₂SO₄:o-H₃PO₄ alınmış, üzerine 3g grafit tozu eklenmiş ve 1 saat karıştırılmıştır. Daha sonra soğuk buz altında 20 g KMnO₄ yavaş yavaş ilave edilmiştir (Bu süre zarfında sıcaklık 27°C'yi geçmemiştir). Çözelti 50°C'de manyetik karıştırıcıda 1 gün boyunca karıştırma işlemine bırakılmıştır. Diğer yandan %30'luk H₂O₂'den 5 ml alınmış, 500 ml saf su ile karıştırılmış ve donması için buzluga konulmuştur. Ertesi gün, %30 H₂O₂-Saf su karışımının buzlu hali üzerine çözelti yavaş yavaş (damla damla) ilave edilmiştir. Tüm çözelti ilave edildikten sonra karışıma 2 ml % 30'luk H₂O₂ eklenmiştir. Karışım 20 dk 4000 devirde santrifüjlenmiştir. Katı kısım 500 ml su ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra 300 ml 1:10 oranında seyreltilmiş HCl ile yıkama yapılmıştır. Karışımın pH'ı saf su ile aynı pH değerine gelene kadar saf su ile yıkama işlemine devam edilmiştir. Son olarak 300 ml metanol ile 1 kez yıkama yapıldıktan sonra çöken kısım petri kabına aktarılarak 110°C'de etüvde kurutmaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin sonunda elde edilen GO amberli bir şişeye alınmıştır (Kang ve Shin, 2012; Yu ve ark., 2013).

3.4. Grafen Oksit-Silisyum (GO-Si) Eldesi

200 ml'lik bir behere 400 mg GO alınmış, üzerine 100 ml saf su eklenmiştir. Karışım ultrasonik banyoda 3 saat ultrasonikasyona tabii tutulmuş ve üzerine EDC-NHS (0,1M EDC-0,1M NHS) çözeltisinden 15 ml eklenmiştir. 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışımın üzerine 10 g Aminopropil silika eklenmiş ve 24 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma süresi tamamlandıktan sonra 15 dk 4000 devirde santrifüjlenmiştir. Çöken kısım alınarak 3 kez su ile yıkama, ardından 3 kez metanol ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra katı kısım alınarak 105°C' de etüvde kurutulmuştur.

3.5. İndirgenmiş Grafen Oksit- Silisyum (rGO-Si) Eldesi

2,5 g GO-Si balona tartılarak üzerine 100 ml su ve 5 ml Hidrazin eklenmiş ve 90°C'de 2 saat geri soğutucuda karıştırma işlemi yapılmıştır. Karışım geri soğutucudan alınarak 15 dk 4000 devirde santrifüjlenmiş ve su ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemine yıkama suyunun pH'ı ile atılan sıvı kısmın pH'ı aynı olana kadar devam edilmiştir. Daha sonra 1 kez metanol ile yıkama yapıldıktan sonra 105°C etüvde kurutmaya bırakılmıştır. Kuruyan katı üzerine 100 ml Dimetilformamid eklenmiş ve 5 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışım üzerine 10 ml Asetil klorür eklenmiş ve 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 15 dk 4000 devirde santrifüjlenmiş ve çöken kısma 2 kez Dimetilformamid ile yıkama işlemi yapılmıştır (Yıkama sonrası üstte kalan sıvı kısmın renksiz olması gerekmektedir). 1 kez de asetonla yıkama işlemi yapıldıktan sonra 105°C etüvde kurutulmuştur.

3.6. Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1. FTIR analizleri

Her bir sentez ürününün fonksiyonel gruplarını tayinini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen FTIR taramaları, Bruker Vertex 70 FTIR-ATR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

FTIR cihazındaki ATR prop üzerine herhangi bir çözücü veya numune ilave edilmeden önce cihazın background ayarı yapılarak cihaz sıfırlanmıştır. Daha sonra, her bir katı numuneden ATR prop üzerine belli miktarda ilave edilmiş ve 4000-650 cm^{-1} arasında spektrum taramaları gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Uv-Visible spektrofotometrik analizler

GO sentez ürününün fonksiyonel gruplarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen Uv-Visible spektrofotometrik analizleri, Shimadzu UV-1280 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. %0,1'lik GO sulu çözeltisinin 200-800 nm aralığında spektrum taraması yapılmıştır.

3.6.3. TEM analizleri

Optik mikroskoba kıyasla çok daha küçük ayrıntıları görmeye imkân tanıyan ve cismin içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanan Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizi ile numunelerin görüntüleri alınmıştır. TEM analizleri Jeol Jem 2100 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.4. SEM analizleri

GO-Si ve rGO-Si'nin partikül büyüklüğü ve partikül boyutlarındaki dağılımlar hakkında fikir edinebilmek için Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri yapılmış ve her bir katı için SEM görüntüleri değerlendirilmiştir. SEM görüntüleri ZEISS marka (EVO LS 10 model) cihaz ile gerçekleştirilmiştir.

3.6.5. XRD analizleri

Her bir numunenin kristalografik yapısını incelemek ve tabakalar arası uzaklığını ölçmek için XRD analizi uygulanmıştır. Analizler EUROPE Masaüstü XRD cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.7. Kolon doldurma

Sentezlenen GO-Si ve rGO-Si sabit fazları 250x4,6 mm ebatlarda olan paslanmaz çelik boş HPLC kolonlarına sıvı doldurma tekniği kullanılarak yüksek basınç altında doldurulmuştur. Sıvı doldurma tekniğinde; 2 g sabit faz metanol ile karıştırılarak bulamaç haline getirilmiş ve LabAlliance- Model CP cihazında 5000 psi'a kadar ulaşan basınçlarda kolonlar doldurulmuştur. Kolonlar doldurulduktan sonra kolondan metanol, su ve asetonitril çözücüleri geçirilmiş ve şartlandırılmıştır. Çalışmalar yapılana kadar kolon içi metanol ortamında saklanmıştır.

3.8. HPLC Analizleri

3.8.1 Standartların hazırlanması

İlaç molekülleri analizi için hazırlanan stok standart çözeltilerden gerekli seyreltme işlemleri yapılarak farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler kullanılmıştır.

100 ppm PAR stok çözeltisi: 10000 ppm (10mg/ml) parasetamolden 0,1 ml alınıp üzerine 9,9 ml metanol eklenerek 100 ppm parasetamol çözeltisi elde edilmiştir.

1000 ppm KAF stok çözeltisi: 100 mg kafein bir miktar metanol ile çözüldükten sonra metanol ile balon jodede 100 ml'ye tamamlanmıştır.

100 ppm mix (PAR-KAF) çözeltisi: 10000 ppm parasetamolden 0,1 ml, 1000 ppm kafein çözeltisinden 1 ml alınıp üzerine 8,9 ml metanol eklenerek 100 ppm mix çözeltisi elde edilmiştir.

50 ppm mix (PAR-KAF) çözeltisi: 100 ppm mix çözeltisinden 1 ml alınıp üzerine 1 ml metanol eklenerek 2 ml'lik 50 ppm mix çözeltisi elde edilmiştir.

25 ppm mix (PAR-KAF) çözeltisi: 100 ppm mix çözeltisinden 0,5 ml alınıp üzerine 1,5 ml metanol eklenerek 2 ml'lik 25 ppm mix çözeltisi elde edilmiştir.

5 ppm mix (PAR-KAF) çözeltisi: 100 ppm mix çözeltisinden 0,1 ml alınıp üzerine 1,9 ml metanol eklenerek 2 ml'lik 5 ppm mix çözeltisi elde edilmiştir.

3 ppm mix (PAR-KAF) çözeltisi: 100 ppm mix çözeltisinden 0,06 ml alınıp üzerine 1,94 ml metanol eklenerek 2 ml'lik 3 ppm mix çözeltisi elde edilmiştir.

1 ppm mix (PAR-KAF) çözeltisi: 100 ppm mix çözeltisinden 0,02 ml alınıp üzerine 1,98 ml metanol eklenerek 2 ml'lik 1 ppm mix çözeltisi elde edilmiştir.

100 ppm Panadol çözeltisi: 1 tablet panadol (500 mg parasetamol + 65 mg kafein) 500 ml suda çözülmüştür. 1 ml alınıp üzerine 9 ml metanol eklenerek 100 ppm panadol çözeltisi elde edilmiştir.

50 ppm Panadol çözeltisi: 100 ppm panadol çözeltisinden 1 ml alınıp üzerine 1 ml metanol eklenerek 50 ppm panadol çözeltisi elde edilmiştir.

3.8.2. GO-Si kolonunda yapılan çalışmalar

3.8.2.1. Kromatografik şartların belirlenmesi

İlaç molekülleri analizleri, hazırlanan çözeltiler kullanılarak, Agilent 1220 Infinity II HPLC cihazında, GO-Si kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Analizlerde öncelikle önce %100 saf su, %100 metanol, %100 asetonitril içeren hareketli fazlar daha sonra bu çözücüleri içeren karışımlar kullanılmıştır. Çözücü karışımları kullanılarak yapılan analizlerde tarafımızdan geliştirilen 14 farklı metot kullanılmış, parasetamol ve kafeinin kromatografik ayrımları için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Kromatografik tayinlerde standart olarak; parasetamol ve kafein standartları kullanılmıştır. Gerçekleştirilen izokritik tayin metotlarına ait parametre değerleri **Çizelge 3.4.**'de ve gradient tayin metotlarına ait parametre değerleri **Çizelge 3.5.**'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. GO-Si kolonu izokritik şartlarda metot parametreleri

	Metanol (%)	Ultra saf su (%)	Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)
Metot 1	30	70	1	275
Metot 2	20	80	1.5	275
Metot 3	30	70	1.5	275
Metot 4	50	50	1	254
	Acetonitril (%)	Ultra saf su (%)		
Metot 5	50	50	1	254

Çizelge 3.5. GO-Si kolonu gradient şartlarda metot parametreleri

Metot	Gradient çalışma			Akış hızı (ml/min)	Dalga boyu (nm)
	min	Metanol (%)	Ultra saf su (%)		
Metot 6	0	20	80	1.5	275
	30	100	0		
Metot 7	0	40	60	1.5	275
	20	100	0		
Metot 8	0	50	50	1.5	275
	15	100	0		
Metot 9	0	30	70	1.5	275
	25	100	0		
Metot 10	0	60	40	1.5	275
	3	65	35		
	5	80	20		
	10	100	0		
Metot 11	0	60	40	1.5	275
	3	65	35		
	4	80	20		
Metot 12	0	70	30	1.5	275
	2	85	15		
	4	100	0		
Metot 13	0	70	30	1.5	275
	2	95	5		
	3	100	0		
Metot 14	0	80	20	1.5	275
	2	100	0		

3.8.3. rGO-Si kolonunda yapılan çalışmalar

3.8.3.1. Kromatografik şartların belirlenmesi

Agilent 1220 Infinity II HPLC cihazında, rGO-Si kolonu üzerinde gerçekleştirilen analizlerde ön deneme olarak 5 farklı metot kullanılmış ve ardından bu ön denemelerden elde edilen veriler kullanılarak kemometrik dizayn yapılmış ve parasetamol ve kafeinin kromatografik ayrımları için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Kromatografik tayinlerde standart olarak; parasetamol ve kafein standartları kullanılmıştır. Gerçekleştirilen ön denemelere ait metot parametreleri Çizelge 3.6.'da ve kemometrik dizayn parametreleri Çizelge 3.7.'de verilmiştir. Kemometrik dizayn programı olarak Design Expert 12 kullanılmıştır. Çalışmalarda

hareketli faz olarak metanol ile asetonitril kullanılmış ve tabloda metanol yüzdesi verilmiştir.

Çizelge 3.6. rGO-Si kolonu ön deneme parametreleri

	Metanol (%)	Asetonitril (%)	Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)
Metot 1	100	0	1.5	275
Metot 2	90	10	1.5	275
Metot 3	80	20	1.5	275
Metot 4	70	30	1.5	275
Metot 5	0	100	1.5	275

Çizelge 3.7. rGO-Si kolonu design expert tasarım

Run	Metanol (%)	Akış Hızı (mL/min)	Sıcaklık (°C)
1	85	1,5	26,5
2	85	1,5	26,5
3	85	1,5	20,6137
4	85	1,5	26,5
5	76	1,2	30
6	85	1,5	26,5
7	85	0,995462	26,5
8	94	1,8	30
9	76	1,8	23
10	94	1,2	23
11	85	1,5	26,5
12	85	1,5	26,5
13	76	1,8	30
14	94	1,2	30
15	85	1,5	32,3863
16	85	2,00454	26,5
17	76	1,2	23
18	85	1,5	26,5
19	94	1,8	23
20	100,136	1,5	26,5
21	69,8639	1,5	26,5

3.8.4. İlaç molekülleri analizi

Gerçek numune analizleri için 500 mg parasetamol ve 65 mg kafein içeren Panadol ekstra kullanılmıştır. Hem GO-Si hem de rGO-Si kolonlarında ayrı ayrı miktar tayinleri yapılmıştır. Parasetamol ve kafein tayinleri ticari C18 kolonda da yapılmış ve elde edilen sonuçları karşılaştırılmak için t testi gerçekleştirilmiştir.

3.8.5. Validasyon çalışmaları

Parasetamol ve kafeinin ayrılması için geliştirilen HPLC yöntemlerinin validasyonu yapılmıştır. Validasyon parametreleri olarak kesinlik, doğruluk, doğrusallık, aralık, tespit limiti (LOD) ve miktar tayini limiti (LOQ) seçilmiştir.

Kesinlik testi için HPLC sistemine 6 kez mix parasetamol ve kafein standartı (5 mg/L) enjekte edilmiş ve elde edilen pik alanları kullanılarak bağıl standart sapma (% RSD) değerleri hesaplanmıştır. Yöntemin doğruluğunu belirlemek için bir geri kazanım testi, miktarı bilinen gerçek bir numuneye bilinen miktarlarda parasetamol ve kafein standartları eklenerek gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık için korelasyon katsayıları (R^2) hesaplanmıştır. Yöntemin hassasiyetini gösteren LOD ve LOQ, sinyalin gürültüye oranlanmasıyla bulunmuştur ve bu oran sırasıyla en az 3 ve 10 olmalıdır.



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

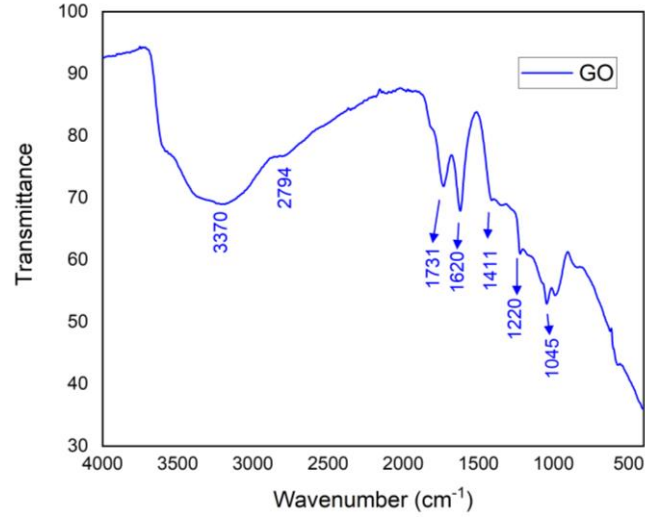
Günümüzde, ilaçların ve biyolojik olarak önemli bileşiklerin analizi için, kullanımı kolay, ucuz, seçici ve daha hassas sıvı kromatografisi kolonlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda GO ve türevleri kullanılarak hazırlanan sabit fazlar; farklı moleküllerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır (Liu ve ark., 2017; Li ve ark., 2018). Ayrıca bu nanopartiküller kromatografik ayırma işlemleri için de sabit faz olarak kullanılmaktadır. Ancak yapılan araştırmalarda bu sabit fazların ilaç moleküllerinin ayrılmasında hiç kullanılmadığı görülmüştür. Bu nedenle; gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, HPLC`de sabit faz olarak kullanılmak üzere GO ve rGO nanopartikülleri kimyasal bir bağ ile aminopropilsilika üzerine bağlanmış, farklı fonksiyonel gruplara sahip ve ilaç etken maddesi olan parasetamol ve kafein moleküllerinin ayrılmasında kullanılmış ve ticari C18 kolon ile karşılaştırılması ilk defa yapılmıştır.

4.1.Karakterizasyon

4.1.1. GO karakterizasyonu

4.1.1.1. FTIR analizleri

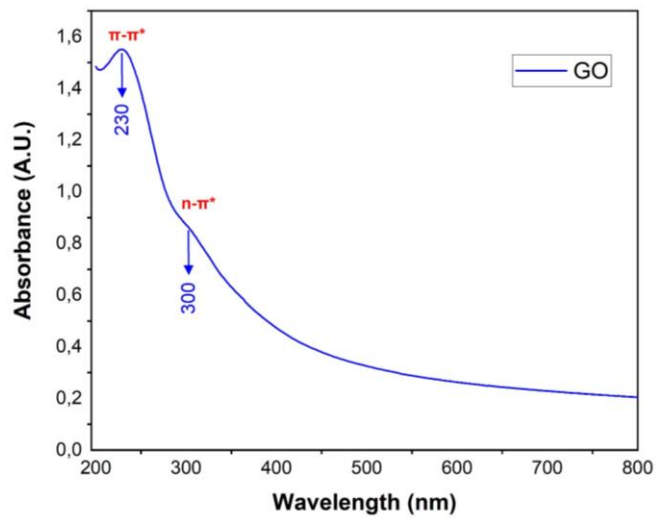
Gerçekleştirilen FTIR analizine ait spektrum **Şekil 4.1.**'de verilmiştir. FTIR spektrumu incelendiğinde; -OH gruplarının titreşimlerine karşılık gelen 3700-3000 cm^{-1} arasında geniş bir pik göstermektedir. Bu nedenle, numunenin güçlü bir hidrofilikliğe sahip olduğu sonucuna varılabilir. 2930 cm^{-1} ve 2794 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleri -CH₂'nin simetrik ve anti-simetrik gerilme titreşimlerini temsil eder. Orta frekans alanında 1620 cm^{-1} ve 1045 cm^{-1} 'de gözlenen iki absorpsiyon pikinin varlığı, C=C ve C=O gerilme titreşimlerine atfedilebilir (Guo ve ark, 2009). Karbonil veya karboksil gruplarının gerilme titreşimi 1731 cm^{-1} 'de bir bant olarak gözlenmiştir. Son olarak, 1411 cm^{-1} ve 1220 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleri sırasıyla karboksilik asidin C-O ve alkolün C-OH gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Bu oksijen içeren grupların varlığı grafitin oksitlendiğini ortaya koymaktadır. Polar gruplar, özellikle yüzey hidroksil grupları, grafit ve su molekülleri arasında hidrojen bağlarının oluşmasına neden olur; bu da GO'nun hidrofilik doğasını açıklar. (Ramezanzadeh ve ark,2016; Shahriary ve Athawale, 2014).



Şekil 4.1. GO FTIR spektrumu

4.1.1.2. Uv-Visible spektrofotometrik analizler

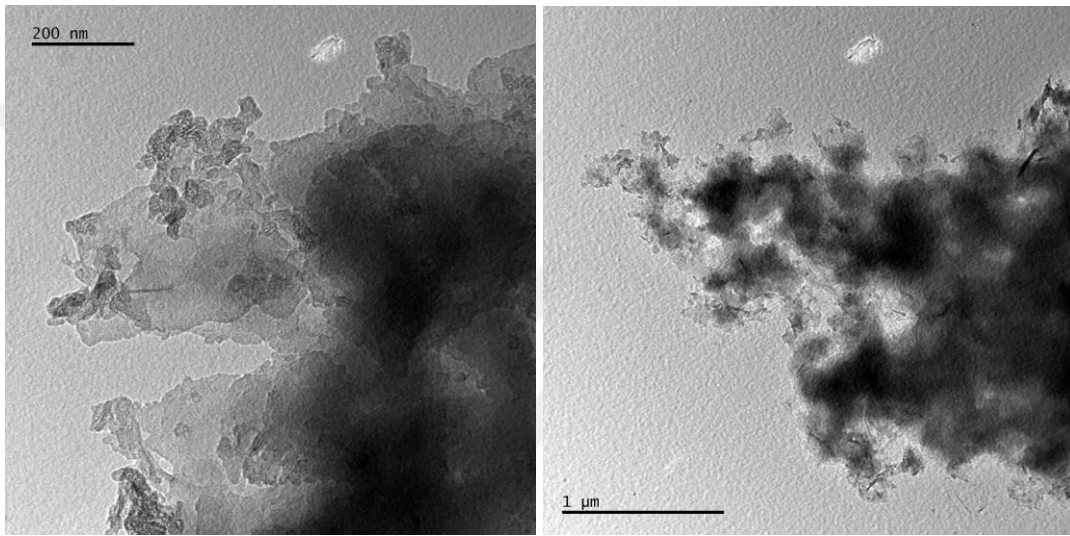
Gerçekleştirilen Uv-Visible spektrofotometrik analizine ait spektrum Şekil 4.2.'de verilmiştir. UV/vis spektrumu, GO'nun düzenli yapısının, bazal düzlemlerde karbon halkalarının daha fazla tutulmasından kaynaklandığını göstermektedir. Molekülde bulunan konjugasyon UV/vis spektrumunda açık bir şekilde görülmektedir. 230 nm'de $\pi-\pi^*$ geçişi (konjugasyon) görülürken, ~300 nm civarında benzer bir omuz karbonil gruplarının $n\rightarrow\pi^*$ geçişlerinde de görülmektedir. Ayrıca elde edilen GO'nun UV absorpsiyonu fazla miktarda aromatik halkaya veya izole aromatik alana sahip olduğunu göstermektedir (Marcano ve ark, 2010; Shahriary ve Athawale, 2014).



Şekil 4.2. GO Uv-Visible spektrumu

4.1.1.3. TEM analizleri

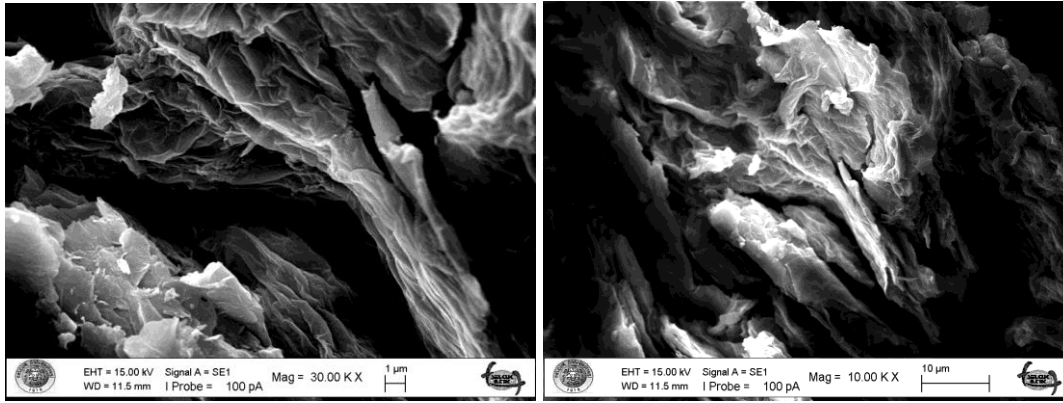
Gerçekleştirilen TEM analizine ait görüntüler **Şekil 4.3.**'de verilmiştir. TEM görüntüleri, elde edilen GO'nun düzenli bir yapıya sahip olduğunu ve birkaç katman kalınlığında büyük GO pulları ürettiğini göstermektedir. Karanlık alanlar, birkaç GO ve/veya grafen katmanının bir miktar oksijen fonksiyonel grubu içeren kalın yığın halindeki nanoyapısını göstermektedir. Daha yüksek şeffaflık alanları, birkaç katmanlı GO ve/veya istiflenmiş nanoyapı pul pul dökülmesinden kaynaklanan çok daha ince filmleri gösterir.



Şekil 4.3. GO TEM görüntüleri

4.1.1.4. SEM analizleri

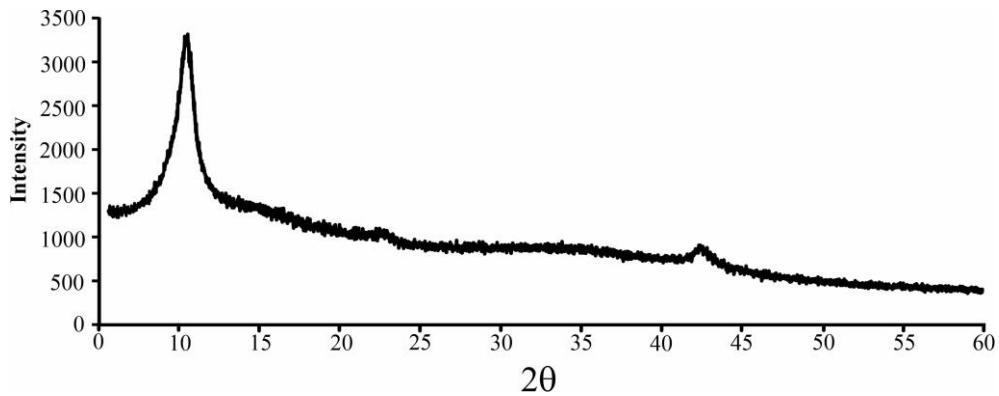
Sentezlenen GO'nun farklı ölçek çubuklarıyla SEM görüntüleri **Şekil 4.4.**'de verilmiştir. Şekilden, GO'nun ultra ince ve homojen grafen filmleri sağlayan katmanlı bir yapıya sahip olduğu gözlemlenebilir. Bu tür filmler zaman zaman katlanmış veya süreklidir ve bükülmüş ve kırışmış alanlar da dahil olmak üzere bireysel tabakaların kenarlarını ayırt etmek mümkündür (Shahriary ve Athawale, 2014). GO'ya ait SEM görüntülerinin TEM analizini desteklediği görülmektedir.



Şekil 4.4. GO SEM görüntüleri

4.1.1.5. XRD analizleri

Gerçekleştirilen XRD analizine ait görüntüler Şekil 4.5.'de verilmiştir. X ışını kırınımı (XRD) spektrumu aynı genel oksidasyon fikrini desteklemekte ve malzemelerin katmanlar arası aralığı oksidasyon derecesi ile orantılıdır. GO'nun $2\theta = 10,8^\circ$ 'de benzersiz bir yoğun kırınım zirvesi mevcuttur. Bu, oksijen fonksiyonel gruplarının dahil edilmesi nedeniyle saf GO için $8,06 \text{ \AA}$ 'lik bir ara katman aralığını gösterir. $2\theta = 45^\circ$ 'de küçük pik sentez sırasında az miktarda kalan grafitin oksijen atomlarıyla tam olarak bağlanmadığını göstermektedir.



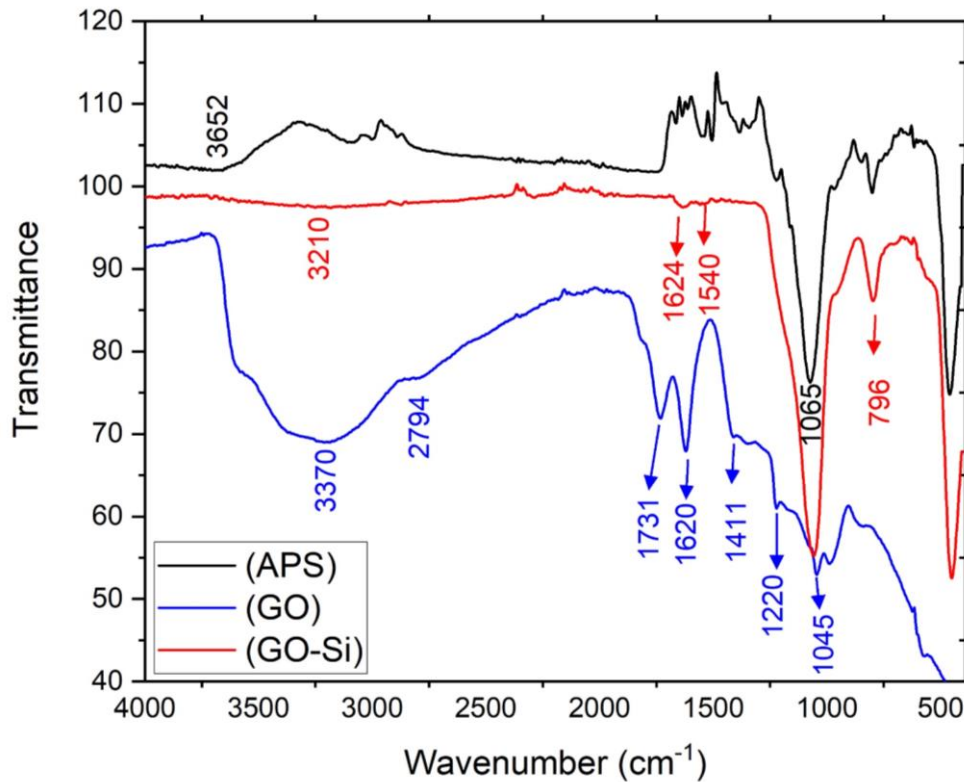
Şekil 4.5. GO XRD görüntüleri

4.1.2. GO-Si karakterizasyonu

4.1.2.1. FTIR analizleri

Gerçekleştirilen FTIR analizine ait görüntüler Şekil 4.6.'da verilmiştir. GO'nun FTIR spektrumunda incelendiğinde GO yüzeyinde sırasıyla hidroksil, karboksil ve

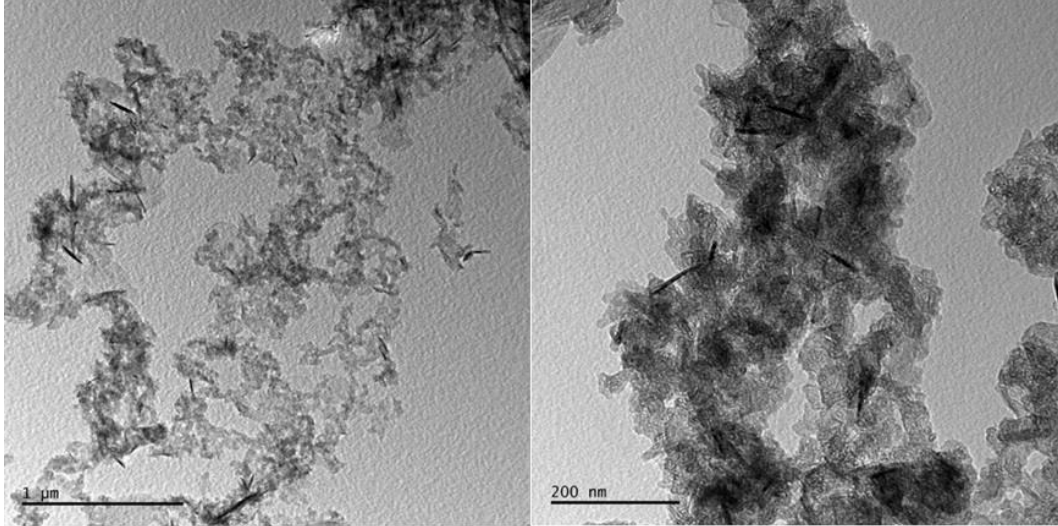
epoksit gruplarının varlığını gösteren çeşitli pikler vardır. İmmobilizasyon sonunda silika matrisi içinde dağılmış GO nano tabakalarının FTIR spektrumunda bazı pikler kaybolurken yeni ürünlerin fonksiyonel grup piklerinin ortaya çıktığı görülmüştür. Bunlar 1124 cm^{-1} 'te asimetrik titreşim Si-OC oluşumu ve 1731 cm^{-1} 'deki tipik karbonil grubu bandı ile 3652 cm^{-1} 'te NH_2 kaybolmuştur. 1540 cm^{-1} merkezli bant, GO bünyesinde bulunan $-\text{COOH}$ ve APS silika üzerinde bulunan $-\text{NH}_2$ grubunun reaksiyonu sonucu oluşan amid bağına ait olduğu düşünülmektedir (Ramezanzadeh ve ark, 2016).



Şekil 4.6. GO-Si FTIR spektrumu

4.1.2.2. TEM analizleri

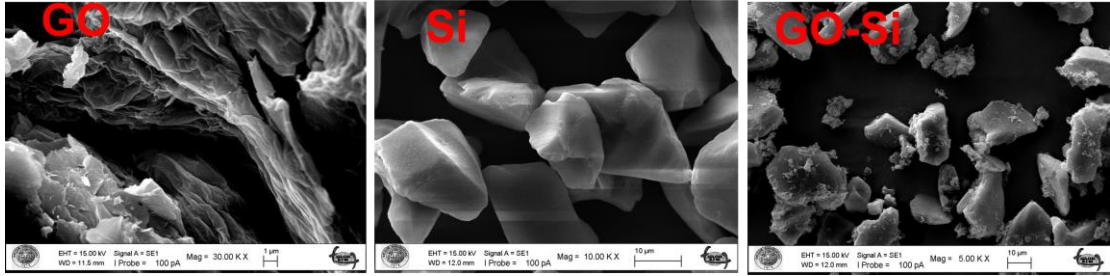
Gerçekleştirilen TEM analizine ait görüntüler Şekil 4.7.'de verilmiştir. GO-Si'nin TEM görüntüsünden görülebileceği gibi silika katmanlarının GO'nun 2D yapısını da koruyan GO levhaları ile pürüzlü ve buruşuk bir şekilde kaplandığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.7. GO-Si TEM görüntüleri

4.1.2.3. SEM analizleri

Gerçekleştirilen SEM analizine ait görüntüler Şekil 4.8.'de verilmiştir. SiO₂ partiküllerinin GO'larla birleştirilmeden önceki ve sonraki morfolojileri karşılaştırıldığında, GO parçacıklarının SiO₂ üzerine bağlandığı görülmektedir. SEM sonuçlarının TEM analizini desteklediği görülmektedir.

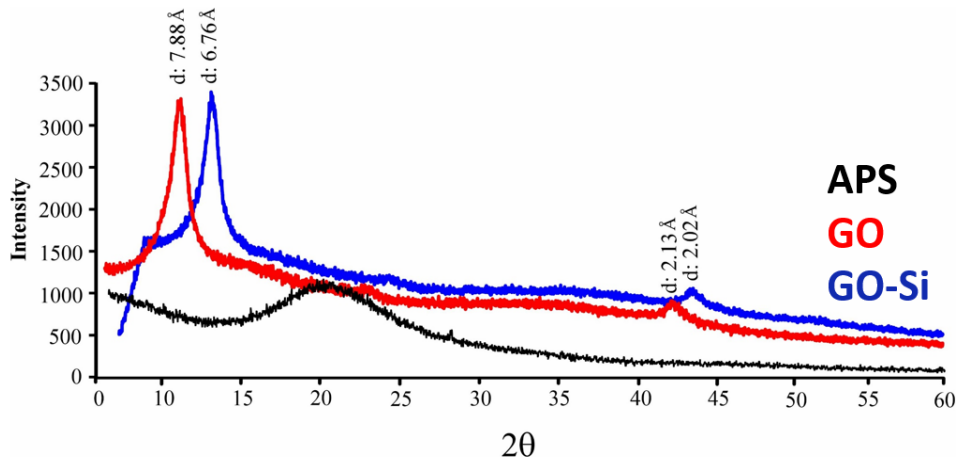


Şekil 4.8. GO-Si SEM görüntüleri

4.1.2.4. XRD analizleri

Gerçekleştirilen XRD analizine ait görüntüler Şekil 4.9.'da verilmiştir. Saf silika partikülleri için, amorf yapılarından dolayı yalnızca geniş bir dağınık saçılma varlığı görülmektedir ve maksimum $2\theta = 22.4^\circ$ 'te yer almıştır. GO/SiO₂ kompozitleri için düzlemler arasındaki boşluk 6.76 Å ile $2\theta = 13^\circ$ 'de olan geniş bir kırınım tepe noktası gösterir. GO'da alanlar arasındaki mesafenin artması, karbon tabakası yapısında oksijen

fonksiyonel grupların ve su moleküllerinin bulunmasından kaynaklanmaktadır (Yang ve ark, 2016).

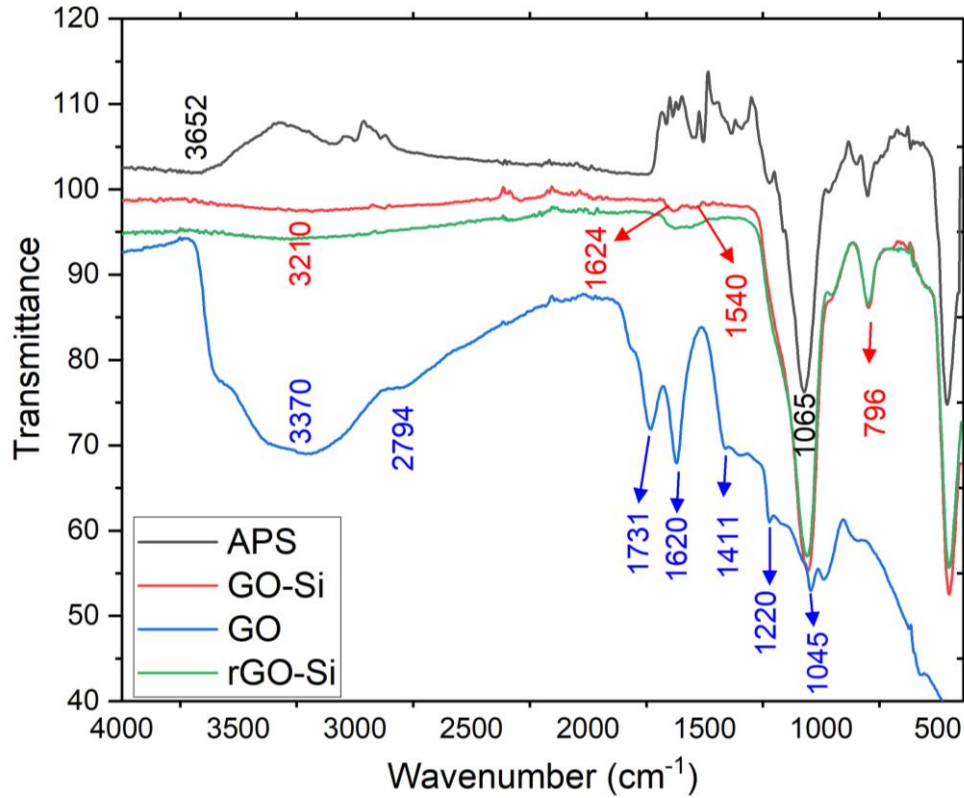


Şekil 4.9. GO-Si XRD görüntüleri

4.1.3. rGO-Si karakterizasyonu

4.1.3.1. FTIR analizleri

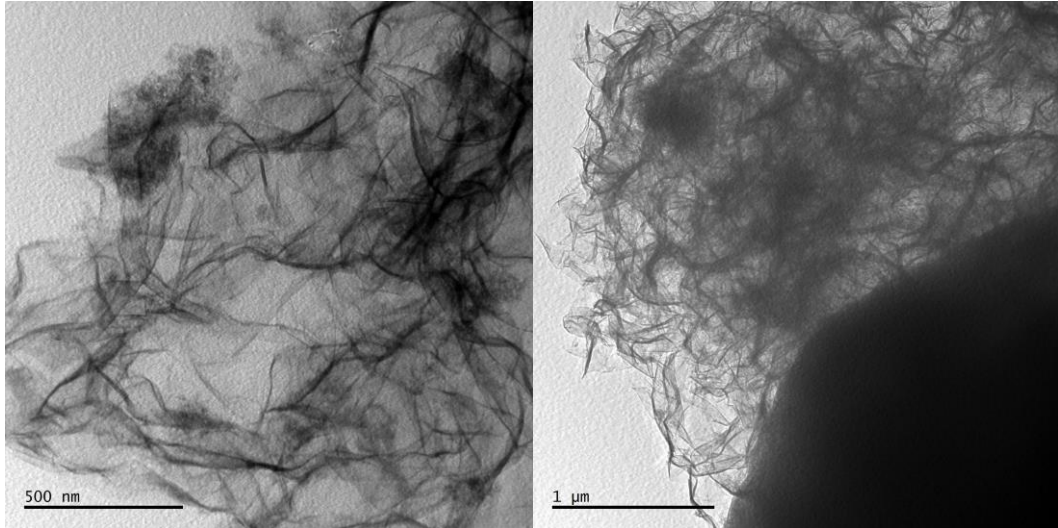
Gerçekleştirilen FTIR analizine ait görüntüler Şekil 4.10.'da verilmiştir. rGO spektrumu, GO ile ilişkili olarak bantların yoğunluğunda önemli bir azalma gösterir. Bunun nedeni indirgemenin oksijenli grupları kısmen ortadan kaldırmasıdır (Pei ve Cheng, 2012). -OH asimetrik gerilmesi (3210 cm^{-1}) ve C-O-C gerilmesi (796 cm^{-1}) geçirgenlikte bir azalmaya neden olur. Bu nedenle, sonuçlar GO'nun indirgenmesinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir (Oliveria ve ark, 2018).



Şekil 4.10. rGO-Si FTIR spektrumu

4.1.3.2. TEM analizleri

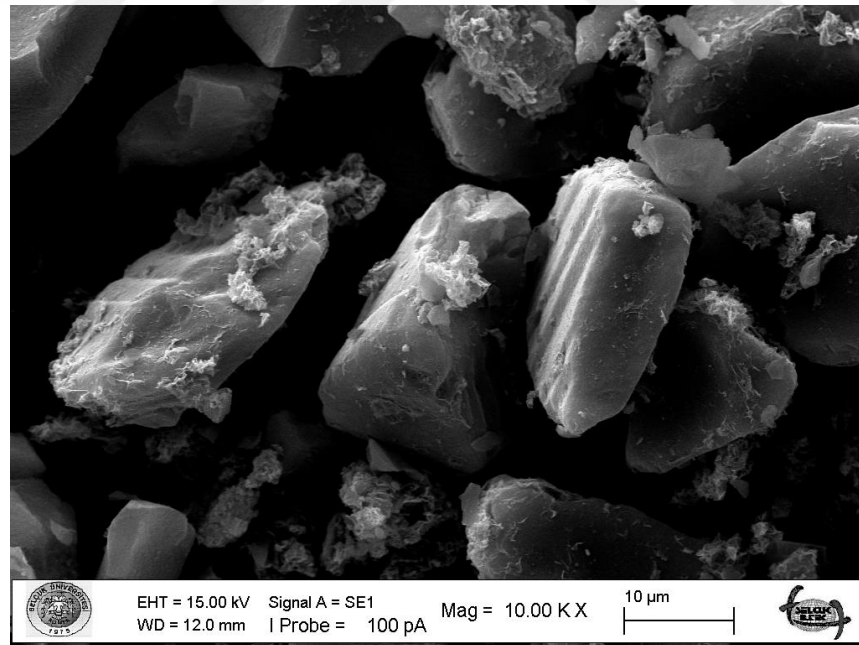
Gerçekleştirilen TEM analizine ait görüntüler Şekil 4.11.'de verilmiştir. Bir miktar oksijen fonksiyonel grubu içeren birkaç GO ve/veya grafen katmanının kalın istifleme nano yapısını görülmektedir. Daha yüksek şeffaflık alanları, istifleme nano yapısının pul pul dökülmesinden kaynaklanan birkaç katman GO ve/veya rGO'dan oluşan çok daha ince filmleri göstermektedir. GO örneğinin aksine rGO örneği tarafından gösterilen delamine grafen katmanlarının (yaklaşık bir ila birkaç katman kalınlığında) yüksek şeffaflığının önemli ölçüde daha büyük yüzey alanı, indirgeme nedeniyle katman ayrılmasını göstermektedir (Stobinski ve ark, 2014).



Şekil 4.11. rGO-Si TEM görüntüleri

4.1.3.3. SEM analizleri

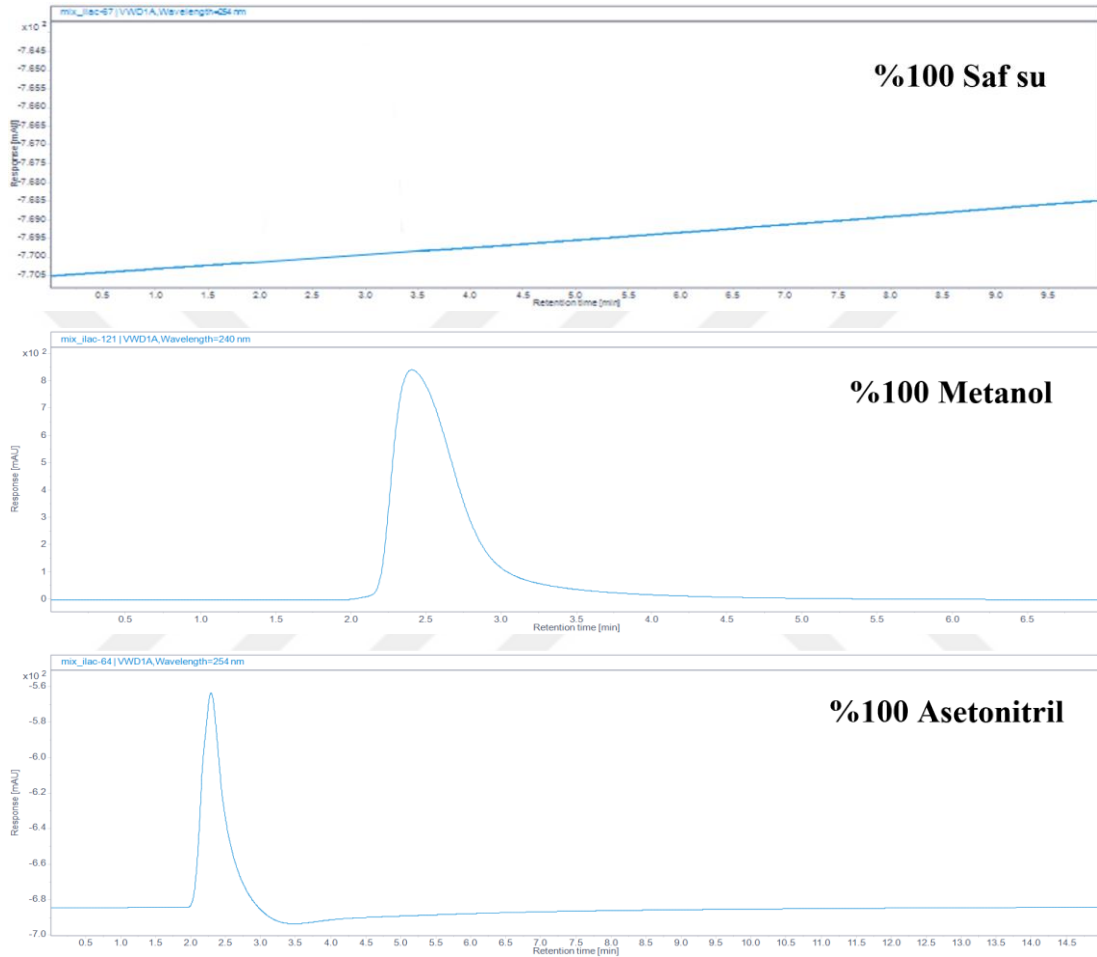
SiO₂ partiküllerinin yüzeyine immobilize edilmiş GO'ların indirgenmesi sonucu elde edilen rGO-Si sabit fazına ait SEM analizine ait görüntüler Şekil 4.12.'de verilmiştir. SEM sonuçlarının TEM analizini desteklediği görülmektedir.



Şekil 4.12. rGO-Si SEM görüntüleri

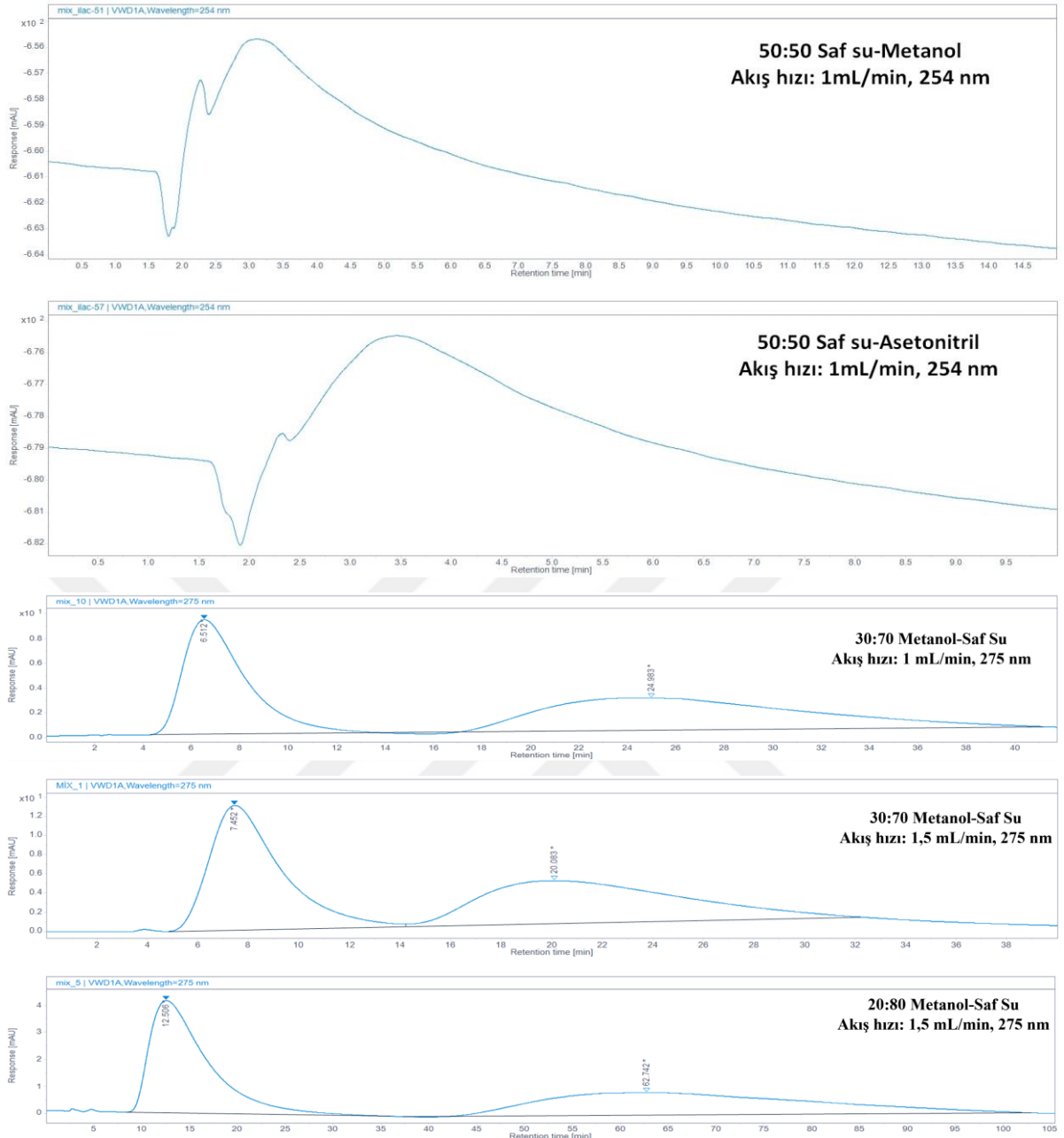
4.2. GO-Si Sabit Faz Çalışmaları

Metot belirleme çalışmalarında 50 ppm'lik mix parasetamol ve kafein standartları kullanılmıştır. %100 saf su, %100 metanol, %100 asetonitril ile ilgili yapılan çalışmaların kromatogramları **Şekil 4.13.**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Saf su, metanol ve asetonitrilin mobil faz olarak kullanıldığı çalışmalara ait kromatogramlar

Yapılan çalışmalarda saf su mobil faz olarak kullanıldığında her iki ilaç etken maddesinin de kolon tarafından tutulduğu ve kolondan sıyrılmadığı görülmüştür. Daha sonra %100 metanol ve %100 asetonitril kullanılmıştır. %100 metanol ve %100 asetonitril kullanıldığında ise kolonda herhangi bir ilaç etken maddesinin tutulmadığı, tamamının direkt olarak kolondan sıyrıldığı görülmüştür. Bu yüzden karışımların kullanılması daha uygun görülerek izokritik şartlarda **Çizelge 3.4.**'de verilen metot parametreleri denenmeye başlanmıştır. Bunlarla ilgili kromatogramlarda **Şekil 4.14.**'de verilmiştir.

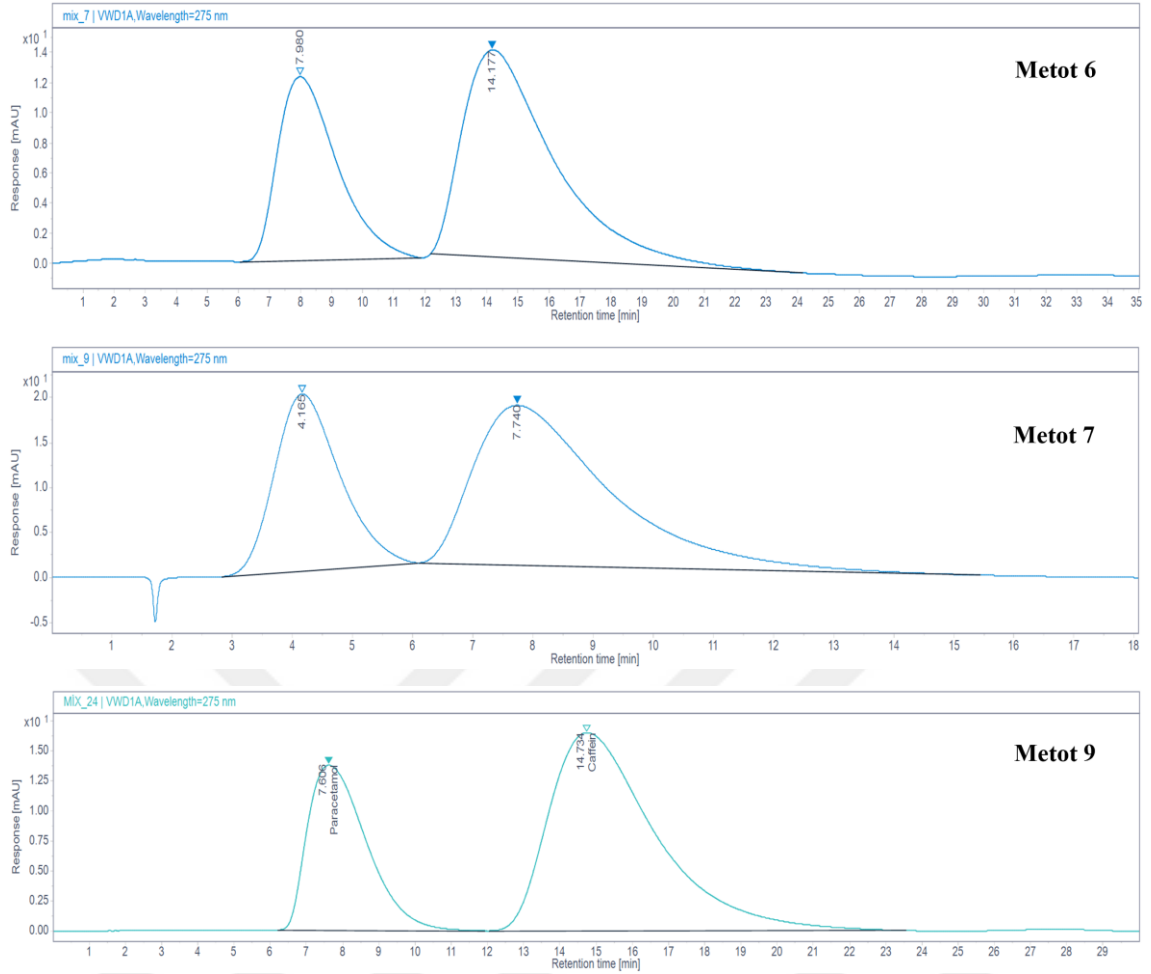


Şekil 4.14. GO-Si kolonu izokritik çalışma metodlarına ait kromatogramlar

İzokritik çalışmalarda ilaç etken maddelerinin tam olarak ayrılmadığı görüldüğü için gradient ayırmalara geçilmiştir. Toplamda 9 farklı gradient metot oluşturularak ayırmalar gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Analiz sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak k' , N , TF ve Rs değerleri hesaplanmış ve kromatografik analizlerin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Hesaplamaya ait veriler Çizelge 4.1.'de ve bazı gradient ayırmalarla ilgili kromatogramlar Şekil 4.15.'de verilmiştir.

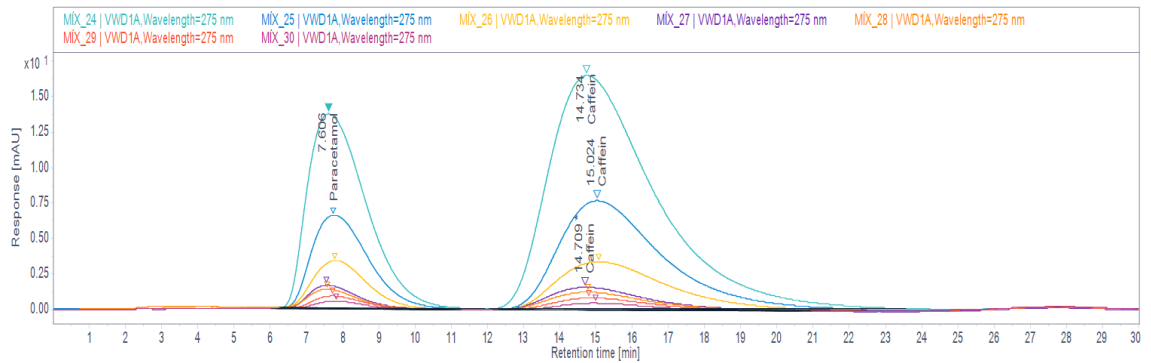
Çizelge 4.1. GO-Si kolonu analiz metotları kromatografik verim sonuçları

Metot	Kromatografik Verim						
	k'	Rs	N	TF-PAR	TF- KAF	Süre	
İzokritik çalışma	Metot1	0,52	1,18	30,325	2,06	1,71	40
	Metot 2	0,91	1,49	21,475	2,29	1,59	105
	Metot 3	1,03	1,41	27,33	2	1,62	41
	Metot 4	0	0,3	104,35	0,65	6,43	15
	Metot 5	0	0,36	146,21	0,59	3,57	15
Gradient çalışma	Metot 6	5,10	1,44	103,55	1,65	1,80	35
	Metot 7	2,89	1,22	66,46	1,48	1,84	18
	Metot 8	2,18	1,1	69,455	1,36	1,71	15
	Metot 9	1,81	1,64	103,82	1,80	1,95	30
	Metot 10	2,61	1,58	75,54	1,85	1,68	12
	Metot11	0,52	1,67	83,32	1,82	1,89	14
	Metot12	0,37	1,2	75,6	1,77	2,13	13
	Metot 13	0,37	1,04	73,275	1,82	2,27	11
	Metot 14	0,30	1,01	77,7	1,90	2,38	11



Şekil 4.15. GO-Si kolonu gradient çalışma metodlarına ait bazı kromatogramlar

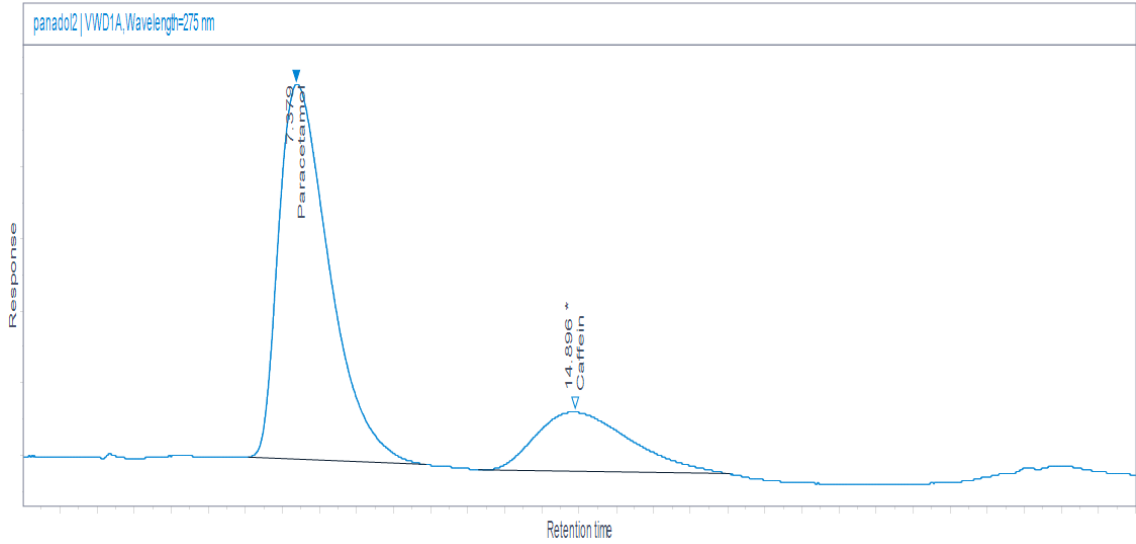
Paracetamol ve *kafein* türlerinin ayrımı için 14 analiz metodu denenmiş ve yapılan analizler sonucunda tam olarak ayrımın Metot 9 ile gerçekleştiği görülmüştür. Metot 9 için farklı konsantrasyonlarda (1-100 mg/L) standart enjeksiyonları yapılmış ve elde edilen kromatogramlar Şekil 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.16. Metot 9 için mix standartlara ait kromatogram

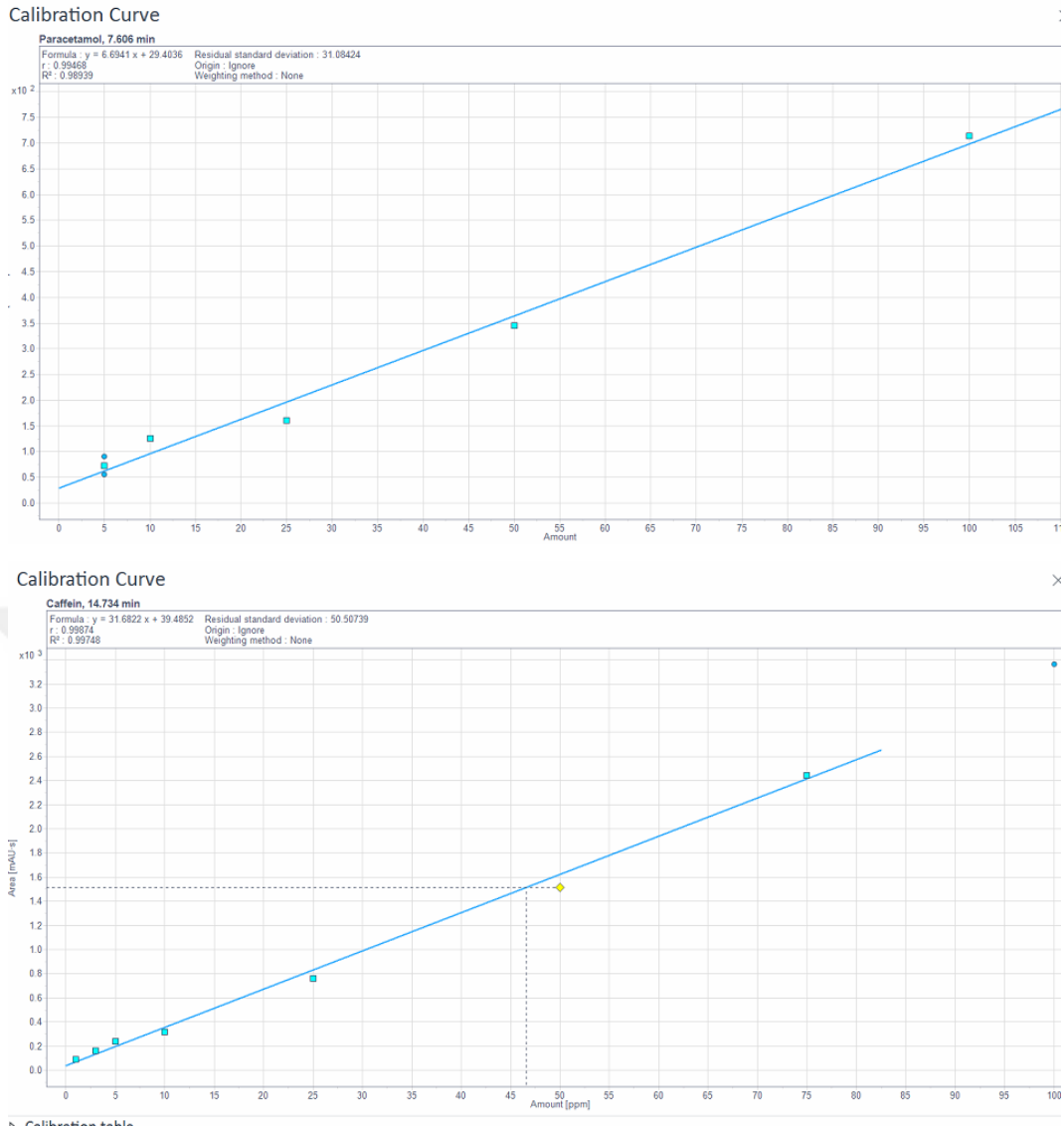
4.2.1. İlaç analizleri

Parasetamol ve kafein ayrımı için çalışmalar tamamlandıktan sonra ilaç analizi için panadol ekstra kullanılmıştır. Panadol ekstra 500 mg parasetamol ve 65 mg kafein içermektedir. Metot 9 parametreleri kullanılarak yapılan panadol ekstra analizinden elde edilen kromatogram **Şekil 4.17.**'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Panadol extra'ya ait kromatogram

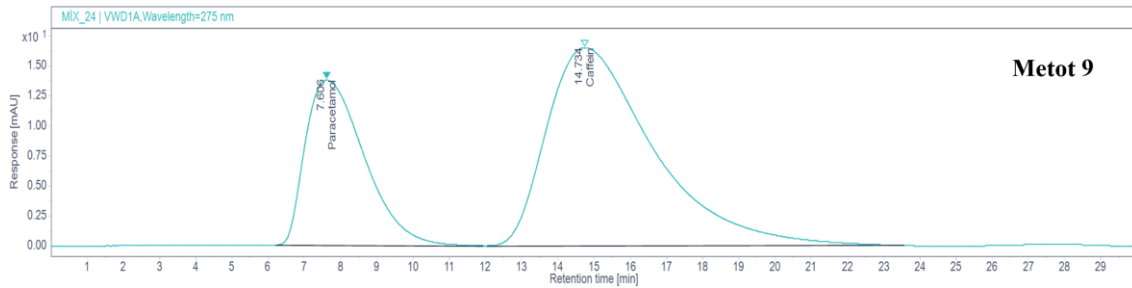
Geliştirilen metot için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan mix standartlar ile kalibrasyon grafiği çizilmiştir (**Şekil 4.18.**). Elde edilen grafik yardımıyla Panadol Ekstra içinde bulunan parasetamol ve kafein miktarları bulunmuştur. Yapılan analizler sonucunda Panadol Ekstra içinde 495 ± 10 mg parasetamol ve 63 ± 5 mg kafeinin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. Mix standartlar için kalibrasyon grafikleri

4.2.2. Validasyon

Parasetamol ve kafein ilaç moleküllerinin ayrılması için kullanılan HPLC yöntemi uygunluk, doğrusallık, doğruluk ve hassasiyet açısından valide edilmiştir. GO-Si kolonda gerçekleştirilen analiz 30 dakikada gerçekleştirilmiş ve elde edilen 50 ppm konsantrasyonlu mix parasetamol ve kafein standardının kromatogramı Şekil 4.19.'da verilmiştir.



Şekil 4.19. GO-Si kolonunda yapılan 50 ppm mix standardının kromatogramı

Elde edilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak yöntemin doğrusalığı ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak R^2 hesaplanmıştır. Çizelge 4.2.'de görülebileceği gibi, korelasyon katsayıları 0.989-0.997 aralığındadır. Yöntemin hassasiyeti için 5 mg/L konsantrasyona sahip mix parasetamol ve kafein standardı HPLC sistemine 6 kez enjekte edilmiş ve her bir standardın yarı pik yüksekliğindeki pik alanları kullanılarak bağıl standart sapma (% RSD) değerleri hesaplanmıştır. Maksimum bağıl standart sapma 0,54 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin doğruluğunu belirlemek için geri kazanım testleri gerçekleştirilmiştir. İlaç moleküllerinin geri kazanım değerlerinin %98-%99 aralığında olduğu bulunmuştur. Yöntemin hassasiyeti, LOD ve LOQ hesaplanarak belirlenmiştir. İlaç molekülleri için LOD ve LOQ sırasıyla 6×10^{-3} - $6,5 \times 10^{-3}$ mg/L ve 2×10^{-2} - $2,2 \times 10^{-2}$ mg/L olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Validasyon değerleri

	Parasetamol	Kafein
%RSD	0,54	0,36
% Geri Kazanım	98	99
LOD(mg/L)	6×10^{-3}	$6,5 \times 10^{-3}$
LOQ (mg/L)	2×10^{-2}	$2,2 \times 10^{-2}$
R^2	0,989	0,997
Lineer aralık (mg/L)	1-100	1-100

Sentezlenen GO-Si kolonunun ticari kolon yerine kullanılıp kullanılmayacağını tespit etmek amacıyla parasetamol ve kafein tayinleri ticari C18 kolonda da yapılmıştır. C18 kolonda yapılan tayine ait kromatogram Şekil 4.20.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçları karşılaştırılmak için t testi gerçekleştirilmiştir. Parasetamol ve kafein tayinleri için Metot 9 ve literatürde yer alan bir metot karşılaştırması yapılırken, t testi dikkate alınmış ve t değeri hesaplanmıştır. 3 tekrarlı sonuçlar dikkate alınmıştır.

$$t = \frac{\bar{X}_d - \mu_0}{S_d / \sqrt{N}}$$

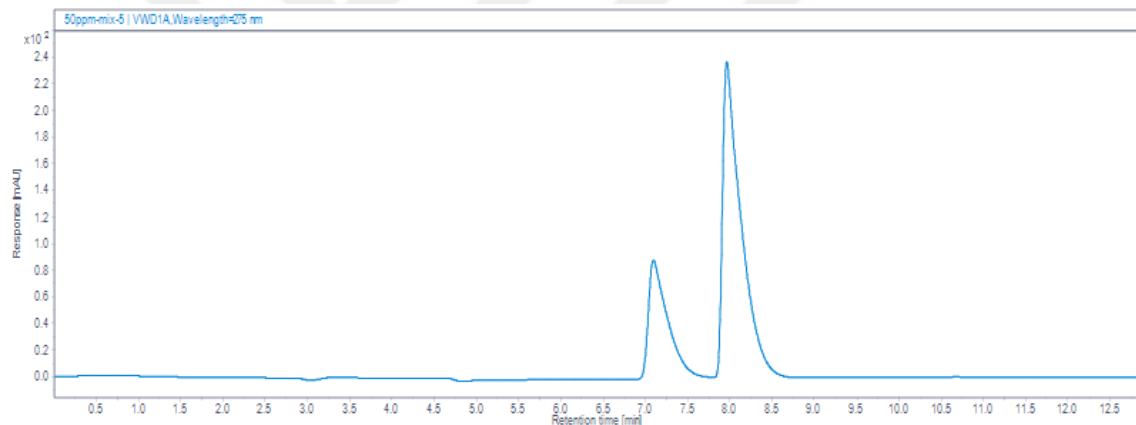
t : t testi

\bar{X}_d : Ortalamaların Farkları

S_d : Farkların Standart Sapması

N : Farkların Sayısı

İki metottan elde edilen verilerle hesaplanan t değerleri kritik t değerlerinden küçük hesaplanmıştır (p=0.05). Bu bilgiler ışığında iki metottan elde edilen verilerin birbirinden anlamlı olarak farklı olmadığı görülmüş ve valide edilen metodun parasetamol ve kafein analizlerinde kullanılabileceği tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. C18 kolonu parasetamol ve kafein tayinine ait kromatogram

Çizelge 4.3. t testi

ppm	Literatür	Metot 9	\bar{X}_d	Sd	t testi	t kritik: 4,303
Parasetamol	501	495	-6	13	-0,799	
Kafein	65	63	-2	7	-0,495	

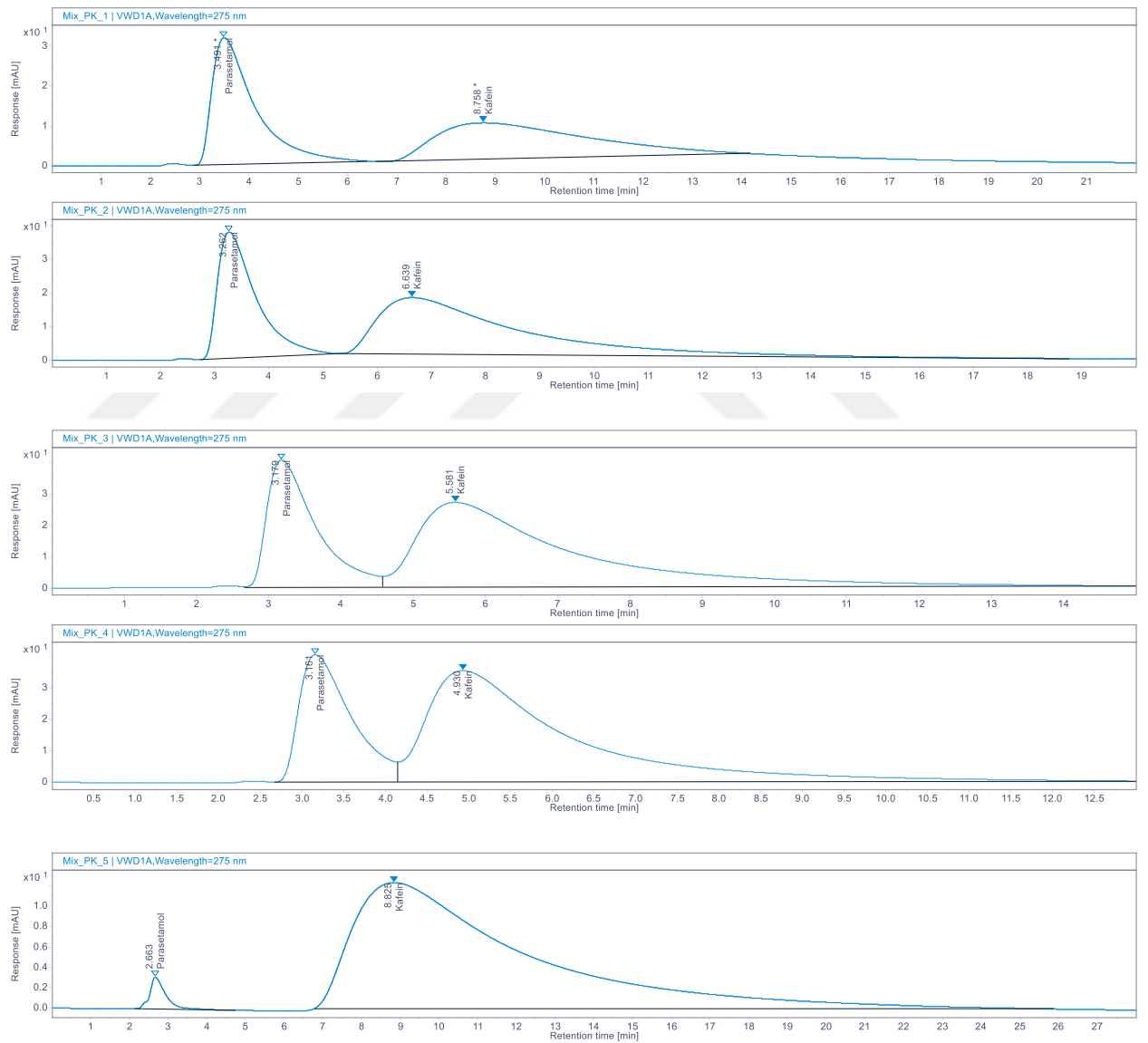
4.3. rGO-Si Sabit Faz Çalışmaları

rGO-Si kolonu üzerinde gerçekleştirilen analizlerde ön deneme olarak 5 farklı metot kullanılmıştır. Bu metotlara ait parametreler Çizelge 4.4.'de ve kromatogramlar Şekil 4.21.'de verilmiştir. Kromatografik verim hesaplarından ve kromatogramlardan

da görüldüğü gibi mevcut metotların ayırım için uygun olmadığı görülmüş ve kemometrik dizayn yapılmıştır.

Çizelge 4.4. rGO-Si kolonu analiz metotları kromatografik verim sonuçları

	Rs	N	TF-PAR	TF- KAF	Süre
Metot 1	1,35	61,96	2,99	2,17	22
Metot 2	1,27	77,18	2,73	2,79	20
Metot 3	1,09	83,52	2,33	3,48	15
Metot 4	0,95	92,4	1,82	3,41	13
Metot 5	1,60	145,69	1,41	3,47	28

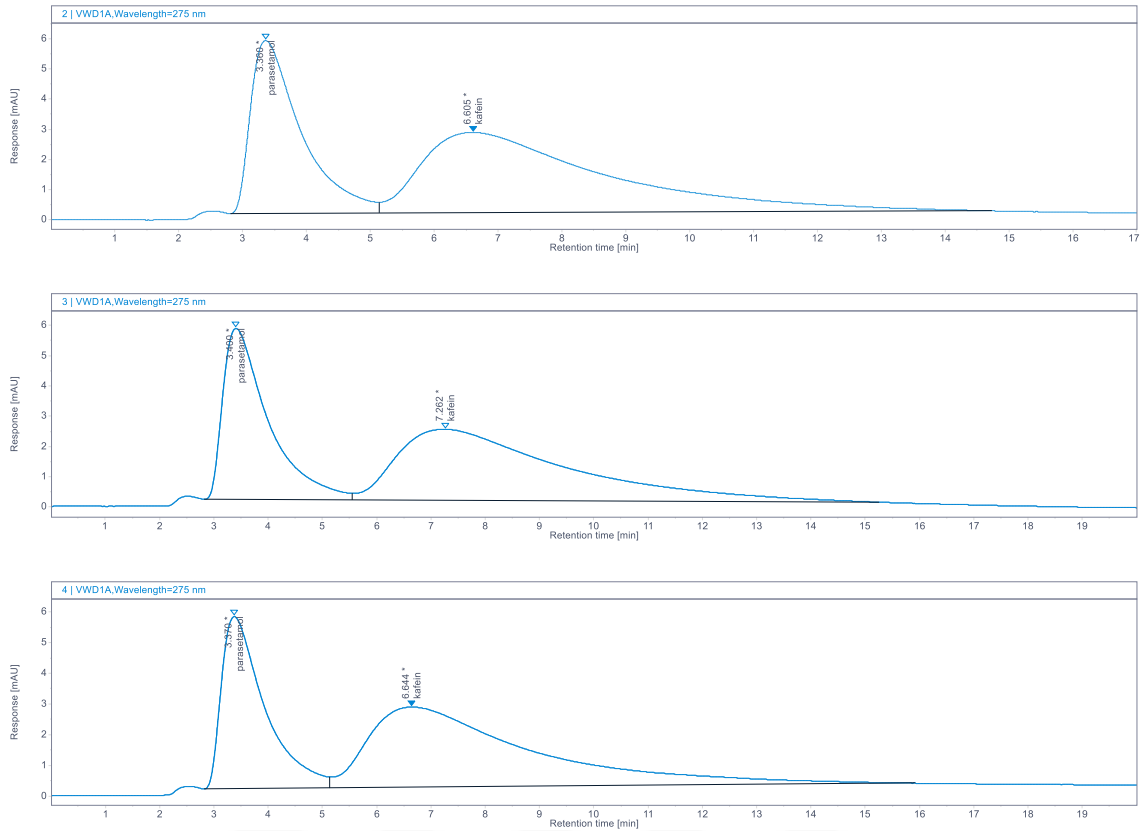


Şekil 4.21. rGO-Si kolonu izokritik çalışma metotlarına ait kromatogramlar

Kemometrik dizaynda kullanılan metot parametreleri ile analiz sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan N ve Rs değerleri **Çizelge 4.5.**'de ve bazı metotlara ait kromatogramlar **Şekil 4.22.**'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. rGO-Si kolonu kemometrik dizayn kromatografik verim sonuçları

Run	Metanol (%)	Akış Hızı (mL/min)	Sıcaklık (°C)	Rs	N
1	85	1,5	26,5	1,05	65,405
2	85	1,5	26,5	1,05	64,525
3	85	1,5	20,6137	1,17	62,72
4	85	1,5	26,5	1,04	63,885
5	76	1,2	30	0,88	74,015
6	85	1,5	26,5	1,03	63,685
7	85	0,995462	26,5	1,15	67,02
8	94	1,8	30	1,12	53,31
9	76	1,8	23	0,96	69,9625
10	94	1,2	23	1,18	49,205
11	85	1,5	26,5	1,03	63,15
12	85	1,5	26,5	1,02	65,935
13	76	1,8	30	0,84	74,295
14	94	1,2	30	1,19	55,57
15	85	1,5	32,3863	0,97	67,61
16	85	2,00454	26,5	1,01	66,345
17	76	1,2	23	1,03	73,17
18	85	1,5	26,5	1,02	65,5
19	94	1,8	23	1,19	52,32
20	100,136	1,5	26,5	1,18	40,34
21	69,8639	1,5	26,5	0,78	75,56



Şekil 4.22. Merkezi kompozit tasarım (CCD) ile yapılan bazı metotlara ait kromatogramlar

Merkezi kompozit tasarım (CCD) metodolojisi hızlı metot geliştirmeye, çeşitli kromatografik faktörlerin birbirleriyle etkileşimini anlamaya ve kromatografik verilerin daha iyi kullanılmasına olanak tanır ve merkez, aksenel ve faktöriyel olmak üzere üç uzay tipinden oluşur (Sivakumar ve ark, 2007; Topkafa ve ark, 2016). Bu tasarımda 7 merkez, 6 aksenel ve 8 faktöriyel olmak üzere 21 deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kromatografik koşulların optimizasyonunda mobil faz bileşimi (% metanol), akış hızı (mL/dak) ve sıcaklık (°C) önemli kromatografik faktörler seçilmiş ve sırasıyla 69,9-100, 1-2,00 ve 20,6-32,4 olarak belirlenmiştir. Ayırma gücü (R_s) ve ortalama tabaka sayısı (N'), yanıt değerleri olarak seçilmiştir. Tüm deneylerin tamamlanmasının ardından Design Expert yazılım programı aracılığıyla en uygun modelin aşağıdaki denklemde kuadratik model olduğu belirlenmiştir.

$$Y: \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{13}X_1X_3 \quad (1)$$

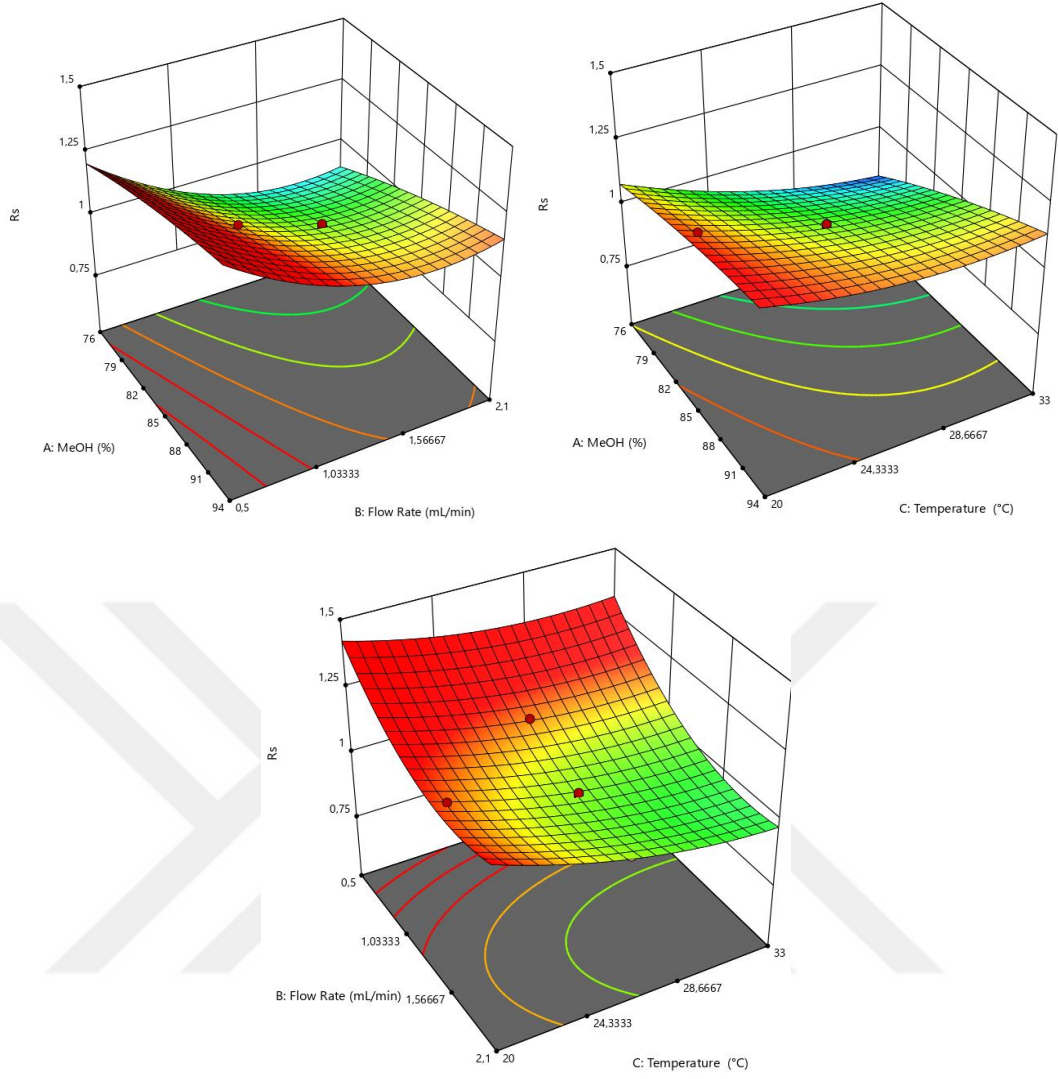
ANOVA'dan elde edilen istatistiksel sonuçlar Çizelge 4.6.'da verilmiştir. R_s ve N' için kabul edilebilir R^2 değerleri hesaplanmıştır (Sivakumar ve ark, 2007). Hesaplanan

düzeltilmiş R^2 sonuçları, deneysel veriler ile uygun model arasında iyi ilişkiler olduğunu göstermiştir (Khodadoust ve Ghaedi, 2013). Null hipotezinin olasılığını gösteren P değerleri 0.05'ten küçük elde edildiğinden, üç faktörün (% metanol, akış hızı ve sıcaklık) yanıtlar (Rs ve N) üzerinde önemli etkileri olduğu görülmüştür (Li ve ark, 2011; Topkafa ve ark, 2016). Bu nedenle, % metanol, akış hızı ve sıcaklık PAR ve KAF ayırma işlemini etkilemiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.6. ANOVA istatistiksel sonuçları

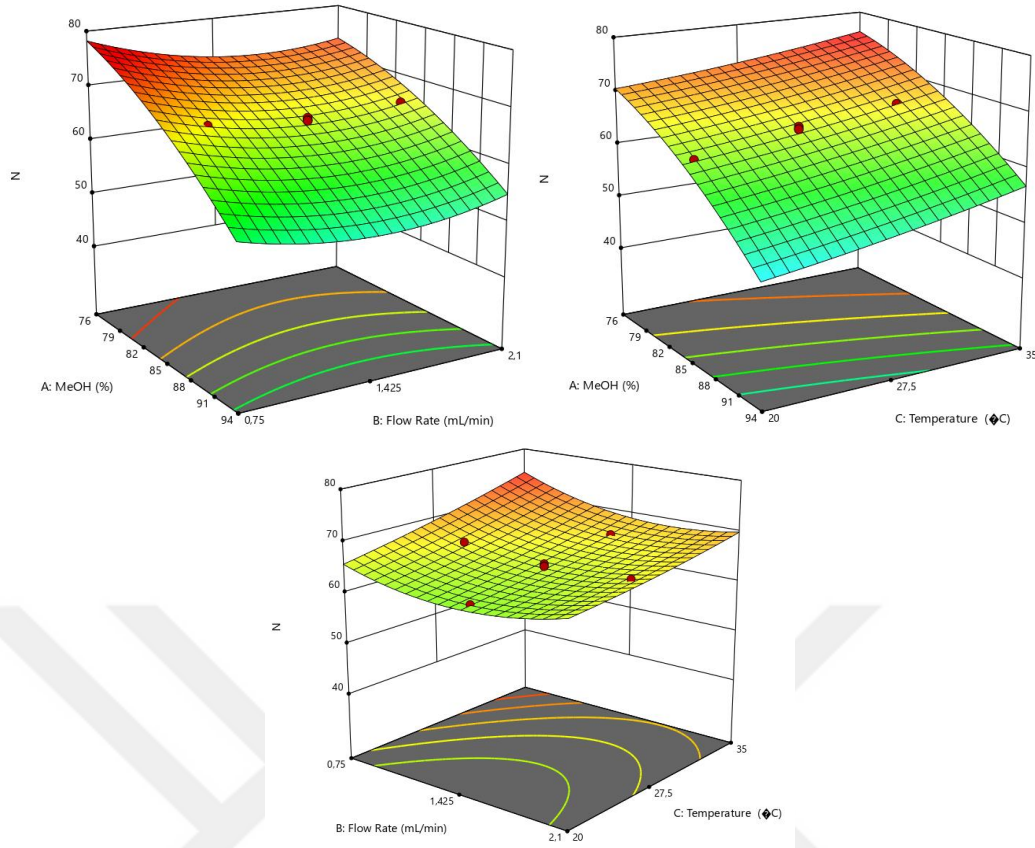
Cevap	Regresyon Modeli	R^2	Düzeltilmiş R^2	Model P değeri	% C.V.
Rs	$+1.03+0.12*A-0.029*B-0.049*C+0.06*AB+0.026*AC-0.006*BC-0.018*A^2+0.017*B^2+0.014*C^2$	0.9810	0,9655	< 0.0001	2,06
N	$+64.59-10.27*A-0.23*B+1.52*C+0.47*AB+0.27*AC-0.24*BC-2.44*A^2-0.65*B^2-0.11*C^2$	0.9889	0,9799	< 0.0001	1,99

Regresyon modelleriyle, Rs ve N için üç boyutlu grafikler (3D) çizilmiş ve cevap yüzey modellemesi (RSM) yapılmıştır. 3D grafikleri faktörler ve yanıt arasındaki etkileşimi göstermektedir. 3D grafikte, iki faktör eşzamanlı olarak değiştirilirken, üçüncü faktör merkez nokta olarak tutulmaktadır. Metanol % (A), akış hızının (B) ve sıcaklığın (C), Rs (Y) üzerindeki etkisi **Şekil 4.23.**'de gösterilmektedir. Rs değerinin değişimine metanol %, akış hızı ve sıcaklığının çok fazla etkilediği 3D grafiklerde görülmektedir.



Şekil 4.23. Üç boyutlu yanıt yüzeyi grafikleri

Şekil 4.24.'de; Metanol % (A), akış hızının (B) ve sıcaklığın (C), tabaka sayısı (Y) üzerindeki etkisi gösterilmektedir. R_s değerinin aksine; tabaka sayısına, akış hızı ve metanol %'sinin çok fazla etkilediği ancak sıcaklığı çok fazla etkilemediği 3D grafiklerde görülmektedir.



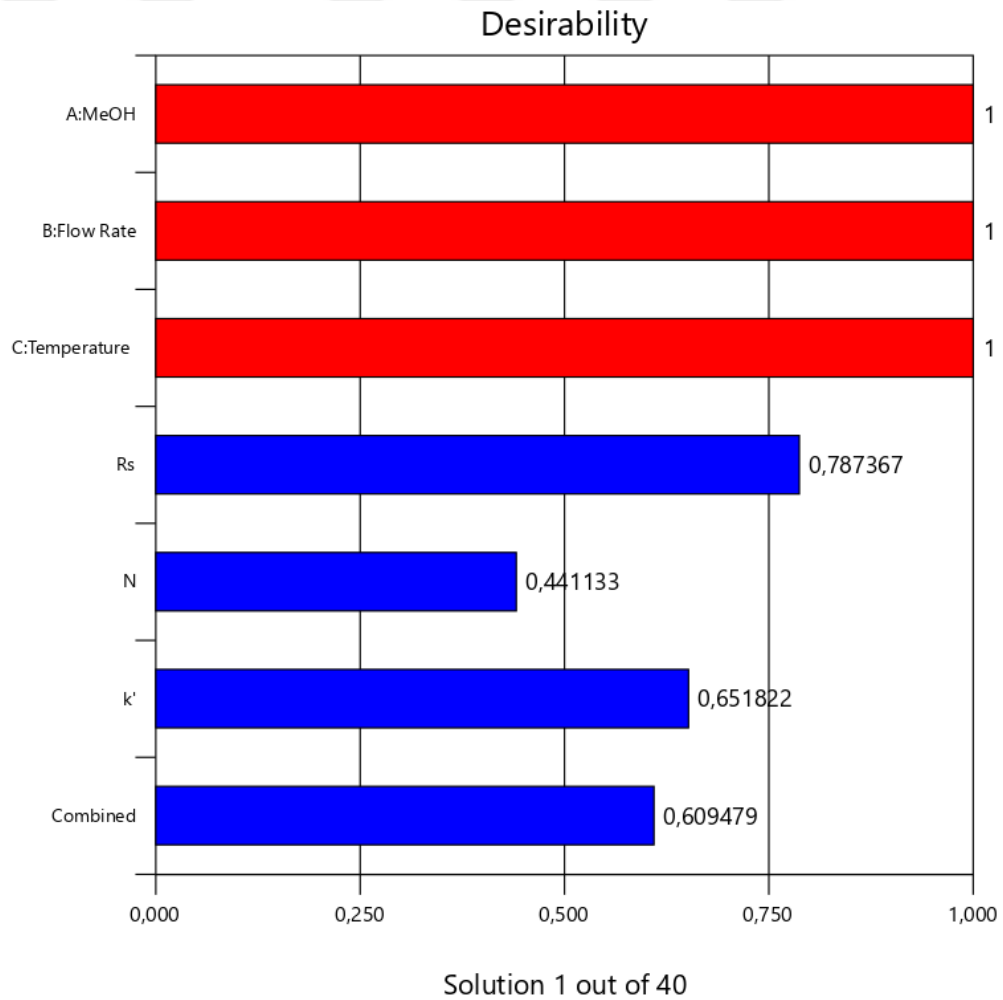
Şekil 4.24. Üç boyutlu yanıt yüzeyi grafikleri

HPLC yöntem optimizasyon süreci, optimum deneysel koşulları ve en iyi ayırmayı mümkün olan en kısa sürede bulmayı amaçlar (Li ve ark, 2011). Bu amaçla HPLC metot optimizasyonunda arzu edilebilirlik fonksiyonu (D) kemometrik tasarımlarda sıklıkla başvurulan önemli bir yöntemdir. Arzu edilebilirlik fonksiyonu güçlü bir yöntemdir ve çoklu yanıt problemlerinin optimizasyonu ile başa çıkmak için kullanılmaktadır (Wu, 2004). Çoklu yanıt problemleri, toplam arzu edilebilirlik maksimize edilerek tek bir yanıt problemine dönüştürülür (Wu, 2004; Derringer, 1980; Topkafa ve ark, 2016). D, 0 ile 1 arasında bir değerdir. Bu değerler kabul edilemez sınır (0) ve hedef değer (1) olarak tanımlanır. Bu çalışmada hedef değerler tüm yanıtlar için 1 olarak belirlenmiştir. Optimum proses parametreleri için arzu edilebilirlik fonksiyonu yaklaşımında D değerinin en yakın 1 olması beklenmektedir. Optimum deneysel koşullar için optimizasyon kriterleri **Çizelge 4.7.**'de verilmiştir. PAR ve KAF'ın çözünürlüğü (Rs) en iyi ayırma için 1,19 olarak hedeflenirken, terik tabaka sayısı (N) mümkün olan en yüksek sayıda seçilmiştir. CCD kullanılarak arzu edilebilirlik çubuk grafiği **Şekil 4.25.**'de gösterilmiştir. Arzu edilebilirlik fonksiyonuna

göre, optimum deneysel koşullar metanolün mobil faz bileşimi %81,3, akış hızı 1,2 mL/dak ve sıcaklık 23°C olarak optimize edilmiştir. Sonraki çalışmalarda bu parametreler kullanılmıştır.

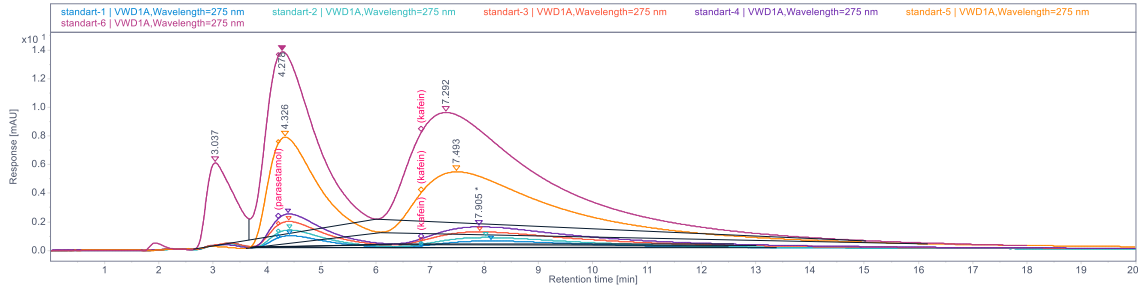
Çizelge 4.7. Optimum deneysel koşullar için optimizasyon kriterleri

	Hedef	Alt Limit	Üst Limit
A:Metanol %		69,9	100
B:Akış hızı		1	2
C:Sıcaklık		20,6	32,4
Rs	Maksimum	0,78	1,19
N	Maksimum	40	76



Şekil 4.25. Arzu edilebilirlik çubuk grafiği

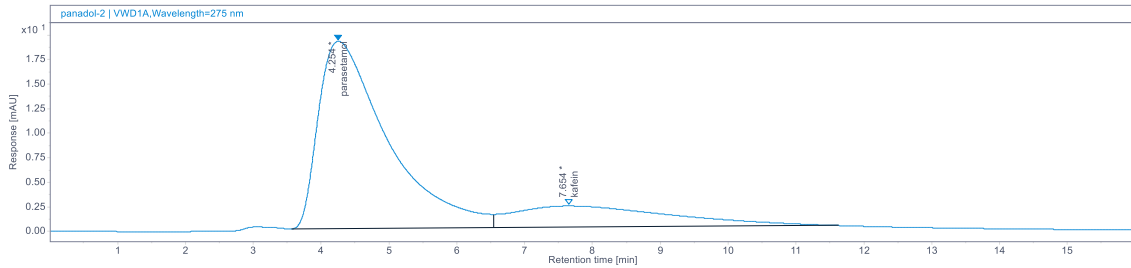
Parasetamol ve *kafein* türlerinin ayrımı için belirlenen şartlarda çalışmalar devam edilmiş ve yapılan analizler sonucunda tam olarak ayrımının gerçekleştiği görülmüştür. Bu şartlarda yapılan farklı konsantrasyonlardaki (1-100 mg/L) standart enjeksiyonları elde edilen kromatogramlar **Şekil 4.26.**'da verilmiştir.



Şekil 4.26. Geliştirilen metot için mix standartlara ait kromatogram

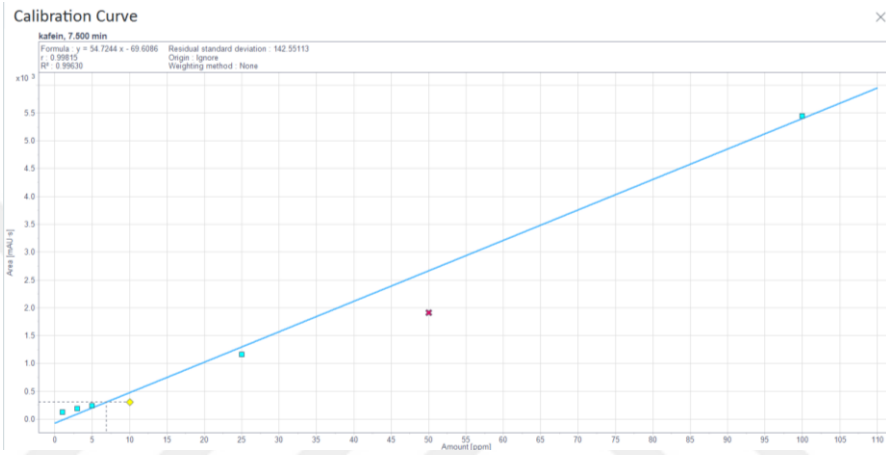
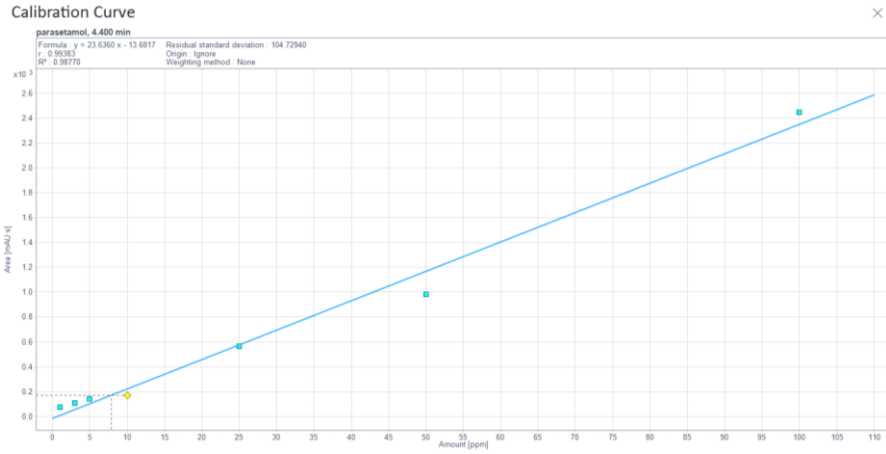
4.3.1. İlaç analizleri

Parasetamol ve kafein ayrımı için çalışmalar tamamlanıp metot belirlendikten sonra ilaç analizi için panadol ekstra kullanılmıştır. Panadol ekstra 500 mg parasetamol ve 65 mg kafein içermektedir. CCD parametreleri ile geliştirilen metot kullanılarak yapılan panadol ekstra analizinden elde edilen kromatogram **Şekil 4.27.**'de verilmiştir.



Şekil 4.27. Panadol extraya ait kromatogram

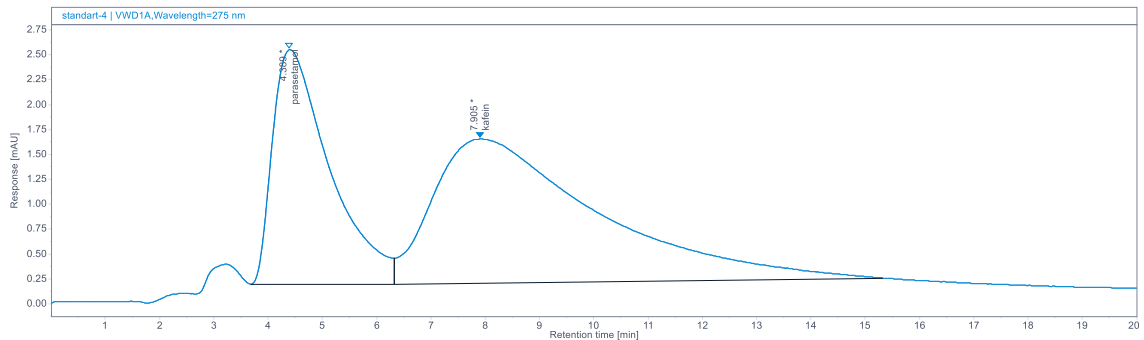
Geliştirilen metot için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan mix standartlar ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir (**Şekil 4.28.**). Elde edilen grafikler yardımıyla Panadol Ekstra içinde bulunan parasetamol ve kafein miktarları bulunmuştur. Yapılan analizler sonucunda Panadol Ekstra içinde 515 ± 14 mg parasetamol ve 75 ± 21 mg kafeinin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.28. Mix standartlar için kalibrasyon grafikleri

4.3.2. Validasyon

Parasetamol ve kafein ilaç moleküllerinin ayrılması için kullanılan HPLC yöntemi uygunluk, doğrusallık, doğruluk ve hassasiyet açısından valide edilmiştir. rGO-Si kolonda gerçekleştirilen analiz 20 dakikada gerçekleştirilmiş ve elde edilen 10 ppm konsantrasyonlu mix parasetamol ve kafein standardının kromatogramı Şekil 4.29.'da verilmiştir.



Şekil 4.29. rGO-Si kolonunda yapılan 10 ppm mix standardının kromatogramı

Elde edilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak yöntemin doğrusalılığı ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak R^2 hesaplanmıştır. **Çizelge 4.8.**'de görülebileceği gibi, korelasyon katsayıları 0.993-0.998 aralığındadır. Yöntemin hassasiyeti için 25 mg/L konsantrasyona sahip mix parasetamol ve kafein standardı HPLC sistemine 6 kez enjekte edilmiş ve her bir standardın yarı pik yüksekliğindeki pik alanları kullanılarak bağıl standart sapma (% RSD) değerleri hesaplanmıştır. Maksimum bağıl standart sapma 0,85 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin doğruluğunu belirlemek için geri kazanım testleri gerçekleştirilmiştir. İlaç moleküllerinin geri kazanım değerlerinin %90-%85 aralığında olduğu bulunmuştur. Yöntemin hassasiyeti, LOD ve LOQ hesaplanarak belirlenmiştir. İlaç molekülleri için LOD ve LOQ sırasıyla $4,5 \times 10^{-3}$ - $7,7 \times 10^{-3}$ mg/L ve $1,5 \times 10^{-2}$ - $2,6 \times 10^{-2}$ mg/L olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8. Validasyon değerleri

	Parasetamol	Kafein
%RSD	0,29	0,85
% Geri Kazanım	90	85
LOD (mg/L)	$4,5 \times 10^{-3}$	$7,7 \times 10^{-3}$
LOQ (mg/L)	$1,5 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-2}$
R^2	0,993	0,998
Lineer aralık (mg/L)	1-100	1-100

Sentezlenen rGO-Si kolonunun ticari kolon yerine kullanılıp kullanılmayacağını tespit etmek amacıyla parasetamol ve kafein tayinleri ticari C18 kolonda da yapılmıştır. C18 kolonda yapılan tayine ait kromatogram **Şekil 4.30.**'da verilmiştir. Elde edilen sonuçları karşılaştırılmak için t testi gerçekleştirilmiştir. Parasetamol ve kafein tayinleri için belirlenen metot ve literatürde (Franeta ve ark, 2002) yer alan bir metot karşılaştırması yapılırken, t testi dikkate alınmış ve t değeri hesaplanmıştır. 3 tekrarlı sonuçlar dikkate alınmıştır.

$$t = \frac{\bar{X}_d - \mu_0}{S_d / \sqrt{N}}$$

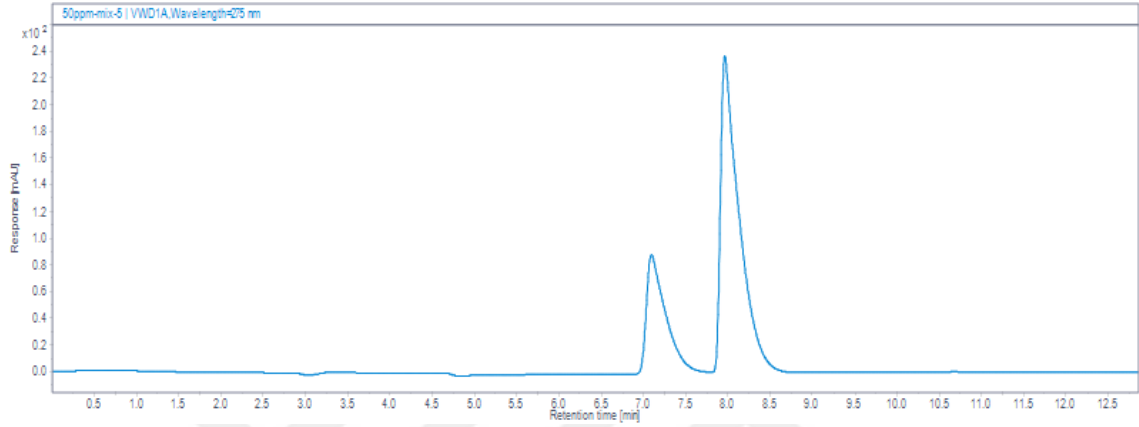
t : t testi

\bar{X}_d : Farkların Ortalaması

S_d : Farkların Standart Sapması

N: Farkların Sayısı

İki metottan elde edilen verilerle hesaplanan t değerleri kritik t değerinden düşük hesaplanmıştır ($p=0.05$). Bu bilgiler ışığında iki metottan elde edilen verilerin birbirinden anlamlı olarak farklı olmadığı görülmüş ve valide edilen metodun parasetamol ve kafein analizlerinde kullanılabileceği tespit edilmiştir.



Şekil 4.30. C18 kolonu parasetamol ve kafein tayinine ait kromatogram

Çizelge 4.9. t testi

ppm	Literatür	Metot 9	\bar{X}_d	Sd	t testi	t kritik: 4,303
Parasetamol	501	515	14	17	1,426	
Kafein	65	75	10	23	0,753	

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Boyutları ve fonksiyonel yüzey özellikleri nedeniyle GO ve türevlerinin tıp, eczacılık, kimya, elektrik-elektronik, gıda, sensör gibi birçok alanda uygulamaları bulunmaktadır. Genel olarak bu nanopartiküller, malzemelerin en temel unsurları ve atomik/moleküler yapılar arasında köprü görevi görürler. Bugüne kadar, GO ve türevlerinin sentezlenmesi için pek çok yöntem geliştirilmiştir.

Kimyasal türlerin ayrılması ve saflaştırılması için katı faz ekstraksiyon sistemlerinde katı faz olarak ve monolitik, elektrokromatografi, kapiler kromatografi, gaz kromatografisi, sıvı kromatografi ve hidrofilik etkileşim kromatografisi gibi kromatografik yöntemlerde de sabit faz olarak kullanılan GO ve türevlerinin; ilaç etken maddelerinin kalitatif ve kantitatif olarak **ilk defa** sıvı kromatografisinde tayin etmek amacıyla, modifiye hummers metodu ile GO sentezlenmiş, aminopropilsilika üzerine immobilize edilmiş, immobilizasyon sonunda indirgenmiş, elde edilen GO-Si ve rGO-Si sabit fazları boş kolonlara doldurulmuş, parasetamol ve kafein ilaç etken maddelerinin tayini için HPLC metotları geliştirilmiş, gerçek ilaç analizleri ve metot validasyonları yapılmıştır. Tez çalışması boyunca gerçekleştirilen her bir sentez, karakterizasyon, metot geliştirme ve validasyon sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Modifiye hummers yöntemiyle sentezlenmiş GO parçacıkları, pul pul dökülmüş, istenilen boyuta gelmiş ve iyi bir şekilde oksitlenmiştir. GO parçacıklarının hidroksil, karboksil ve eter gruplarını bulundurduğu FTIR analizi ile tespit edilmiştir. XRD, UV-Vis, TEM, SEM analizleriyle kristal örgüleri hakkında bilgiler elde edilmiştir.

GO parçacıkları aminopropilsilika üzerine EDC-NHS katalizörlüğünde immobilize edilmiştir. Immobilizasyon, aminopropilsilikadaki amin uçları ve GO'nun karboksil uçları arasında meydana gelerek kimyasal amid bağı ile oluşturulmuştur. Immobilizasyon sonunda elde edilen ürünün FTIR spektrumunu alınmış ve fonksiyonel grup tayini yapılmıştır. Immobilizasyon öncesi ve sonrası spektrumlarında 1620cm^{-1} ve 3652cm^{-1} frekanslardaki karboksil ve amin bantlarının kaybolduğu 1540cm^{-1} frekansda amid bağının oluştuğu görülmüştür. XRD analizi ile kristal yapısı aydınlatılmıştır. Daha sonra bağlanma görüntüleri TEM ve SEM analizleri ile kanıtlanmıştır.

rGO-Si sabit fazını elde etmek için GO-Si hidrazin ile indirgenmiştir. Elde edilen ürünün FTIR spektrumu, TEM ve SEM görüntüleri alınmıştır.

GO-Si ve rGO-Si sabit fazları yüksek basınçta boş kolonlara doldurulmuştur. Doldurulan kolonlar metanol, saf su ve asetonitril ile yıkanmıştır.

GO-Si kolonunda parasetamol ve kafeinin ayrılması için önce su, metanol ve asetonitril saf çözücüleri ile ön denemeler yapılmış, daha sonra bu çözücülerin farklı karışımları ile izokritik ayırmalar gerçekleştirilmiştir. İzokritik şartlarda 5 farklı metot kullanılmasına rağmen istenilen ayırmalar olmamıştır. Bu nedenle 9 farklı gradient uygulamalar denenmiş ve en iyi ayırma Metot 9'da tespit edilmiştir. Metot 9 şartlarında standartların kalibrasyon grafiği çizilmiş ve ilaç moleküllerinin gerçek değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra geliştirilen metodun validasyonu; kesinlik, doğruluk, doğrusallık, aralık, LOD ve LOQ dikkate alınarak yapılmıştır. Maksimum bağıl standart sapma 0,54, geri kazanım değerlerinin %98-%99 aralığında, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla parasetamol ve kafein için 6×10^{-3} - $6,5 \times 10^{-3}$ mg/L ve 2×10^{-2} - $2,2 \times 10^{-2}$ mg/L olduğu hesaplanmıştır. Geliştirilen metodun literatürde yer alan bir metot yerine kullanılıp kullanılmayacağını tespit etmek için t testi yapılmıştır. Test sonunda geliştirilen metodun kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

rGO-Si sabit fazı için de GO-Si sabit fazında olduğu gibi saf çözücülerle ön ayırma denemeleri yapılmıştır. Ön denemeler sonunda istenilen ayırmanın gerçekleştirilemediği tespit edilince kemometrik dizayn ile yeni metotlar denenmiştir. Kemometrik dizayn ile 21 farklı metot geliştirilmiş ve bunlardan en uygun metot belirlenmiştir. Uygun metot şartları; mobil faz bileşimi %81,3 metanol-%18,7 asetonitril, akış hızı 1,2 mL/dak ve sıcaklık 23°C olarak belirlenmiştir. Geliştirilen metot şartlarında standartların kalibrasyon grafiği çizilmiş ve ilaç moleküllerinin gerçek değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra geliştirilen metodun validasyonu; kesinlik, doğruluk, doğrusallık, aralık, LOD ve LOQ dikkate alınarak yapılmıştır. Maksimum bağıl standart sapma 0,85, geri kazanım değerlerinin %90-%85 aralığında, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla parasetamol ve kafein için $4,5 \times 10^{-3}$ - $7,7 \times 10^{-3}$ mg/L ve $1,5 \times 10^{-2}$ - $2,6 \times 10^{-2}$ mg/L olduğu hesaplanmıştır. Geliştirilen metodun literatürde yer alan bir metot yerine kullanılıp kullanılmayacağını tespit etmek için t testi yapılmıştır. Test sonunda geliştirilen metodun kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

Sonuç olarak; bu tez çalışması ile, şimdiye kadar ilaç moleküllerinin sıvı kromatografisinde ayrılması için sabit faz olarak kullanılmamış olan GO ve rGO'nun sabit faz sentezi ve karakterizasyonu yapılmış, ilaç etken maddesi olan parasetamol ve kafeinin ayrılmasında kullanılmış; elde edilen veriler sentezlenen sabit fazların farklı

ilaç etken maddelerinin ayrılmasında kullanılabileceği ortaya koyulmuştur. Ayrıca yapılan bu çalışma ile GO-Si'nin üzerine kiral molekülleri bağlanarak kiral ilaç etken maddelerinin ayrılmasında kullanılabileceği görülmüştür.



KAYNAKLAR

- Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(2), 164.
- Abdolmohammad-Zadeh, H., Zamani, A., & Shamsi, Z. (2020). A simple magnetic solid-phase extraction method based on magnetite/graphene oxide nanocomposite for pre-concentration and determination of melamine by high-performance liquid chromatography. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 9826-9834.
- Abd-Rabboh, H. S., E. Amr, A. E. G., Almehezia, A. A., Naglah, A. M., & H. Kamel, A. (2022). New Potentiometric Screen-Printed Platforms Modified with Reduced Graphene Oxide and Based on Man-Made Imprinted Receptors for Caffeine Assessment. *Polymers*, 14(10), 1942.
- Abusnina, A., & Lugnier, C. (2017). Therapeutic potentials of natural compounds acting on cyclic nucleotide phosphodiesterase families. *Cellular signalling*, 39, 55-65.
- Alam, P., Shakeel, F., Ali, A., Alqarni, M. H., Foudah, A. I., Aljarba, T. M., ... & Ali, A. (2022). Simultaneous determination of caffeine and paracetamol in commercial formulations using greener normal-phase and reversed-phase HPTLC methods: A contrast of validation parameters. *Molecules*, 27(2), 405.
- Arshad, A., Jabbal, M., Yan, Y., & Reay, D. (2019). A review on graphene based nanofluids: Preparation, characterization and applications. *Journal of Molecular Liquids*, 279, 444-484.
- Arvand, M., & Masouleh, A. N. (2017). Magnetic solid-phase extraction of imatinib and doxorubicin as cytostatic drugs by Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 14, 1673-1682.
- Assadi, M. K., Bakhoda, S., Saidur, R., & Hanaei, H. (2018). Recent progress in perovskite solar cells. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 2812-2822.
- Bakandritsos, A., Pykal, M., Błoński, P., Jakubec, P., Chronopoulos, D. D., Poláková, K., ... & Otyepka, M. (2017). Cyanographene and graphene acid: emerging derivatives enabling high-yield and selective functionalization of graphene. *ACS nano*, 11(3), 2982-2991.
- Balandin, A. A., Ghosh, S., Bao, W., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Miao, F., & Lau, C. N. (2008). Superior thermal conductivity of single-layer graphene. *Nano letters*, 8(3), 902-907.
- Balazs, A. C., Emrick, T., & Russell, T. P. (2006). Nanoparticle polymer composites: where two small worlds meet. *Science*, 314(5802), 1107-1110.
- Banerjee, A. N. (2018). Graphene and its derivatives as biomedical materials: Future prospects and challenges. *Interface focus*, 8(3), 20170056.
- Barden, J., Edwards, J. E., McQuay, H. J., & Moore, R. A. (2004). Pain and analgesic response after third molar extraction and other postsurgical pain. *Pain*, 107(1-2), 86-90.
- Becerril, H. A., Mao, J., Liu, Z., Stoltenberg, R. M., Bao, Z., & Chen, Y. (2008). Evaluation of solution-processed reduced graphene oxide films as transparent conductors. *ACS nano*, 2(3), 463-470.
- Biosciences, A. (2002). Ion Exchange chromatography, Principles and methods, Amercham Pharmacia. *Biotech SE*, 751.
- Bo, Z., Shuai, X., Mao, S., Yang, H., Qian, J., Chen, J., ... & Cen, K. (2014). Green preparation of reduced graphene oxide for sensing and energy storage applications. *Scientific reports*, 4(1), 1-8.

- Boukhvalov, D. W. (2010). Stable antiferromagnetic graphone. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 43(1), 199-201.
- Boukhvalov, D. W., Katsnelson, M. I., & Lichtenstein, A. I. (2008). Hydrogen on graphene: Electronic structure, total energy, structural distortions and magnetism from first-principles calculations. *Physical Review B*, 77(3), 035427.
- Brisebois, P. P., & Sijaj, M. (2020). Harvesting graphene oxide—years 1859 to 2019: a review of its structure, synthesis, properties and exfoliation. *Journal of Materials Chemistry C*, 8(5), 1517-1547.
- Brodie, B. C. (1859). XIII. On the atomic weight of graphite. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (149), 249-259.
- Bychko, I., Abakumov, A., Didenko, O., Chen, M., Tang, J., & Strizhak, P. (2022). Differences in the structure and functionalities of graphene oxide and reduced graphene oxide obtained from graphite with various degrees of graphitization. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 164, 110614.
- Cai, B., Wang, S., Huang, L., Ning, Y., Zhang, Z., & Zhang, G. J. (2014). Ultrasensitive label-free detection of PNA–DNA hybridization by reduced graphene oxide field-effect transistor biosensor. *ACS nano*, 8(3), 2632-2638.
- Cai, Z., Hu, X., Zong, R., Wu, H., Jin, X., Yin, H., ... & Ye, N. (2020). A graphene oxide-molybdenum disulfide composite used as stationary phase for determination of sulfonamides in open-tubular capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1629, 461487.
- Cakici, M., Kakarla, R. R., & Alonso-Marroquin, F. (2017). Advanced electrochemical energy storage supercapacitors based on the flexible carbon fiber fabric-coated with uniform coral-like MnO₂ structured electrodes. *Chemical Engineering Journal*, 309, 151-158.
- Capadona, J. R., Van Den Berg, O., Capadona, L. A., Schroeter, M., Rowan, S. J., Tyler, D. J., & Weder, C. (2007). A versatile approach for the processing of polymer nanocomposites with self-assembled nanofibre templates. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 765-769.
- Cardoso Silva, A., Pinho de Oliveira Ribeiro, N., Rafael de Mello Schier, A., Martinho Pereira, V., Machado Vilarim, M., Marinho Pessoa, T., ... & Egidio Nardi, A. (2014). Caffeine and suicide: a systematic review. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 13(6), 937-944.
- Ceja-Navarro, J. A., Vega, F. E., Karaoz, U., Hao, Z., Jenkins, S., Lim, H. C., ... & Brodie, E. L. (2015). Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nature communications*, 6(1), 7618.
- Chen, H., Müller, M. B., Gilmore, K. J., Wallace, G. G., & Li, D. (2008). Mechanically strong, electrically conductive, and biocompatible graphene paper. *Advanced Materials*, 20(18), 3557-3561.
- Chen, K., Lu, G., Chang, J., Mao, S., Yu, K., Cui, S., & Chen, J. (2012). Hg (II) ion detection using thermally reduced graphene oxide decorated with functionalized gold nanoparticles. *Analytical chemistry*, 84(9), 4057-4062.
- Chen, L., Shi, G., Shen, J., Peng, B., Zhang, B., Wang, Y., ... & Fang, H. (2017). Ion sieving in graphene oxide membranes via cationic control of interlayer spacing. *Nature*, 550(7676), 380-383.
- Chen, X., Gao, P., Guo, L., & Zhang, S. (2015). Graphdiyne as a promising material for detecting amino acids. *Scientific Reports*, 5(1), 1-9.

- Chen, Y., Yang, X., Kitta, M., & Xu, Q. (2017). Monodispersed Pt nanoparticles on reduced graphene oxide by a non-noble metal sacrificial approach for hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane. *Nano Research*, 10, 3811-3816.
- Chen, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Gao, H., & Yan, H. (2018). Large-area perovskite solar cells—a review of recent progress and issues. *RSC advances*, 8(19), 10489-10508.
- Chronopoulos, D. D., Bakandritsos, A., Lazar, P., Pykal, M., Čépe, K., Zbořil, R., & Otyepka, M. (2017). High-yield alkylation and arylation of graphene via grignard reaction with fluorographene. *Chemistry of Materials*, 29(3), 926-930.
- Chronopoulos, D. D., Bakandritsos, A., Pykal, M., Zbořil, R., & Otyepka, M. (2017). Chemistry, properties, and applications of fluorographene. *Applied materials today*, 9, 60-70.
- Chung, FL (1999). The prevention of lung cancer induced by tobacco-specific carcinogen in rodents by green and black tea. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 220(4):244-248
- Clark, W.G; Brater, D.C. and Johnson, A.R. (1992). *Medical Pharmacology*. 13ed. Mosby year book.
- Compton, O. C., & Nguyen, S. T. (2010). Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials. *small*, 6(6), 711-723.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., & Anfinsen, C. B. (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 636-643.
- Das, M., & Dasgupta, D. (1998). Pseudo-affinity column chromatography based rapid purification procedure for T7 RNA polymerase. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 28(4), 339-348.
- Dasari, B. L., Nouri, J. M., Brabazon, D., & Naher, S. (2017). Graphene and derivatives—Synthesis techniques, properties and their energy applications. *Energy*, 140, 766-778.
- de Mejia, E. G., & Ramirez-Mares, M. V. (2014). Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(10), 489-492. Fulay, A.P.; Rifas-Shiman, S.L.; Oken, E.; Perng, W. Associations of the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet with pregnancy complications in Project Viva. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2018**, 72, 1385–1395.
- Delvadiya, K., Kimbahune, R., Kabra, P., Sunil, K., & Patel, P. (2011). Spectrophotometric simultaneous analysis of paracetamol, propyphenazone and caffeine in tablet dosage forms. *Int J Pharm Pharm Sci*, 3(3), 170-74.
- Deng, F., Lu, X., Pei, X., Luo, X., Luo, S., & Dionysiou, D. D. (2017). Fabrication of ternary reduced graphene oxide/SnS₂/ZnFe₂O₄ composite for high visible-light photocatalytic activity and stability. *Journal of hazardous materials*, 332, 149-161.
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology*, 12(4), 214-219.
- Dideikin, A. T., & Vul', A. Y. (2019). Graphene oxide and derivatives: the place in graphene family. *Frontiers in Physics*, 6, 149.
- Dimiev, A., Kosynkin, D. V., Alemany, L. B., Chaguine, P., & Tour, J. M. (2012). Pristine graphite oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 134(5), 2815-2822.
- Dinç, E., & Baleanu, D. (2002). Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical

- least-squares and principal component regression techniques. *Il Farmaco*, 57(1), 33-37.
- Dobrzański, L. A., Prokopiuk vel Prokopowicz, M., Drygała, A., Wierzbicka, A., Lukaszewicz, K., & Szindler, M. (2017). Carbon nanomaterials application as a counter electrode for dye-sensitized solar cells. *Archives of Metallurgy and Materials*.
- Dreyer, D. R. (2010). S.; Park, CW; R, Bielawski.; and Ruoff, RS "The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society reviews*, 39(1), 228-240.
- Dreyer, D. R., Todd, A. D., & Bielawski, C. W. (2014). Harnessing the chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, 43(15), 5288-5301.
- Feicht, P., Biskupek, J., Gorelik, T. E., Renner, J., Halbig, C. E., Maranska, M., ... & Eigler, S. (2019). Brodie's or Hummers' method: oxidation conditions determine the structure of graphene oxide. *Chemistry—A European Journal*, 25(38), 8955-8959.
- Fekry, R. A., Kelani, K. M., Fayez, Y. M., & Tantawy, M. A. (2022). Comparative validated chromatographic methods for the simultaneous determination of caffeine, codeine, paracetamol along with the related compound" p-aminophenol" in tablets. *JPC—Journal of Planar Chromatography—Modern TLC*, 35(1), 51-59.
- Feng, L., & Zhang, W. X. (2012). The structure and magnetism of graphone. *AIP Advances*, 2(4), 042138.
- Feng, Y., Wang, Z., Zhang, R., Lu, Y., Huang, Y., Shen, H., ... & Liu, J. (2018). Anti-fouling graphene oxide based nanocomposites membrane for oil-water emulsion separation. *Water Science and Technology*, 77(5), 1179-1185.
- Firer, M. A. (2001). Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3), 433-442.
- Franeta, J. T., Agbaba, D., Eric, S., Pavkov, S., Aleksic, M., & Vladimirov, S. (2002). HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Il Farmaco*, 57(9), 709-713.
- Gao, X., Mo, R., & Ji, Y. (2015). Preparation and characterization of tentacle-type polymer stationary phase modified with graphene oxide for open-tubular capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1400, 19-26.
- Geim, A. K., & Novoselov, K. S. (2007). The rise of graphene. *Nature materials*, 6(3), 183-191.
- Giovanni, M., Poh, H. L., Ambrosi, A., Zhao, G., Sofer, Z., Šaněk, F., ... & Pumera, M. (2012). Noble metal (Pd, Ru, Rh, Pt, Au, Ag) doped graphene hybrids for electrocatalysis. *Nanoscale*, 4(16), 5002-5008.
- González-Álvarez, J., Arias-Abrodo, P., Puerto, M., Viguri, M. E., Pérez, J., & Gutiérrez-Álvarez, M. D. (2013). Polymerized phosphonium-based ionic liquids as gas chromatography stationary phases. *Rsc Advances*, 3(44), 21377-21380.
- Goodman, LS. and Gilman ,A.(1996) *The Pharmacologic Basis of Therapeutics* . 8 th ed. London, MacMillan.
- Goyal, R. N., & Singh, S. P. (2006). Voltammetric determination of paracetamol at C60-modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 51(15), 3008-3012.
- Griffiths, R and woodson p .(1988) Reinforcing properties of caffeine . studies in human and labrotary animals. *Pharmacology. Biochem. and Behavior*. 29:416-427.
- Guo, H. L., Wang, X. F., Qian, Q. Y., Wang, F. B., & Xia, X. H. (2009). A green approach to the synthesis of graphene nanosheets. *ACS nano*, 3(9), 2653-2659.
- Haley, M. M. (2008). Synthesis and properties of annulenic subunits of graphyne and graphdiyne nanoarchitectures. *Pure and Applied Chemistry*, 80(3), 519-532.

- Haley, M. M., Brand, S. C., & Pak, J. J. (1997). Carbon networks based on dehydrobenzoannulenes: synthesis of graphdiyne substructures. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 36(8), 836-838.
- Harris, D. C. (2012). Exploring chemical analysis. Macmillan.
- Hashemzadeh, H., & Raissi, H. (2020). Understanding loading, diffusion and releasing of doxorubicin and paclitaxel dual delivery in graphene and graphene oxide carriers as highly efficient drug delivery systems. *Applied Surface Science*, 500, 144220.
- Hashibe, M., Galeone, C., Buys, S. S., Gren, L., Boffetta, P., Zhang, Z. F., & La Vecchia, C. (2015). Coffee, tea, caffeine intake, and the risk of cancer in the PLCO cohort. *British journal of cancer*, 113(5), 809-816.
- Hass, J., De Heer, W. A., & Conrad, E. H. (2008). The growth and morphology of epitaxial multilayer graphene. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 20(32), 323202.
- He, Q., Wu, S., Yin, Z., & Zhang, H. (2012). Graphene-based electronic sensors. *Chemical Science*, 3(6), 1764-1772.
- Hou, X., Lu, X., Niu, P., Tang, S., Wang, L., & Guo, Y. (2018). β -Cyclodextrin-modified three-dimensional graphene oxide-wrapped melamine foam for the solid-phase extraction of flavonoids. *Journal of Separation Science*, 41(10), 2207-2213.
- Hsu, C.W; Wang, C.S. and chui, T.H. (2010). Caffeine and selective atenosine A2A repton antagonist induce sensitiation and crosssensitization and cross – sensitization behavairo associated with increased striatal dopamine in mice . *Biomed. Sci.* 15(1):4-4.
- Hummers Jr, W. S., & Offeman, R. E. (1958). Preparation of graphitic oxide. *Journal of the american chemical society*, 80(6), 1339-1339.
- Ibrahim, I. R. (2011). Effect of Paracetamol and caffeine in structure and function of thyroidgland in male rats. *Journal of College of Education for Pure Science*, 1(5), 89-102.
- Inagaki, M., & Kang, F. (2014). Graphene derivatives: graphane, fluorographene, graphene oxide, graphyne and graphdiyne. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(33), 13193-13206.
- Jin MJ, Yoon CH, Ko HJ, Kim HM, Kim AS, Moon HN, Jung SP (2016) The relationship of caffeine intake with depression, anxiety, stress, and sleep in Korean adolescents. *Korean J Fam Med* 37(2):111–117
- Jung, H. S., Kong, W. H., Sung, D. K., Lee, M. Y., Beack, S. E., Keum, D. H., ... & Hahn, S. K. (2014). Nanographene oxide–hyaluronic acid conjugate for photothermal ablation therapy of skin cancer. *ACS nano*, 8(1), 260-268.
- Kakavelakis, G., Maksudov, T., Konios, D., Paradisanos, I., Kioseoglou, G., Stratakis, E., & Kymakis, E. (2017). Efficient and highly air stable planar inverted perovskite solar cells with reduced graphene oxide doped PCBM electron transporting layer. *Advanced Energy Materials*, 7(7), 1602120.
- Kang, D. W., & Shin, H. S. (2012). Control of size and physical properties of graphene oxide by changing the oxidation temperature.
- Karlsson E, Ryden L, Brewer J. Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications, 2nd Edition, Ion Exchange chromatography. Wiley-VCH, New York;1998.
- Kartal, M. (2001). LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26(5-6), 857-864.

- Khodadoust, S., & Ghaedi, M. (2013). Optimization of dispersive liquid–liquid microextraction with central composite design for preconcentration of chlordiazepoxide drug and its determination by HPLC-UV. *Journal of separation science*, 36(11), 1734-1742.
- Kumar, S., Bukkitgar, S. D., Singh, S., Pratibha, Singh, V., Reddy, K. R., ... & Naveen, S. (2019). Electrochemical sensors and biosensors based on graphene functionalized with metal oxide nanostructures for healthcare applications. *ChemistrySelect*, 4(18), 5322-5337.
- Lee, C., Wei, X., Kysar, J. W., & Hone, J. (2008). Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *science*, 321(5887), 385-388.
- Lee, J. K., Smith, K. B., Hayner, C. M., & Kung, H. H. (2010). Silicon nanoparticles–graphene paper composites for Li ion battery anodes. *Chemical communications*, 46(12), 2025-2027.
- Lee, X. J., Hiew, B. Y. Z., Lai, K. C., Lee, L. Y., Gan, S., Thangalazhy-Gopakumar, S., & Rigby, S. (2019). Review on graphene and its derivatives: Synthesis methods and potential industrial implementation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 98, 163-180.
- Li, M., & Jing, L. (2007). Electrochemical behavior of acetaminophen and its detection on the PANI–MWCNTs composite modified electrode. *Electrochimica Acta*, 52(9), 3250-3257.
- Li, S. S., Tu, K. H., Lin, C. C., Chen, C. W., & Chhowalla, M. (2010). Solution-processable graphene oxide as an efficient hole transport layer in polymer solar cells. *ACS nano*, 4(6), 3169-3174.
- Li, X., Xu, X., Albano, D. R., & You, T. (2011). Optimization using central composite design for antihistamines separation by nonaqueous capillary electrophoresis with electrochemical and electrochemiluminescence detections. *Analyst*, 136(24), 5294-5301.
- Li, X., Yu, J., Wageh, S., Al-Ghamdi, A. A., & Xie, J. (2016). Graphene in photocatalysis: a review. *Small*, 12(48), 6640-6696.
- Li, Y., Qi, L., & Ma, H. (2013). Preparation of porous polymer monolithic column using functionalized graphene oxide as a functional crosslinker for high performance liquid chromatography separation of small molecules. *Analyst*, 138(18), 5470-5478.
- Li, Y., Tang, L., & Li, J. (2009). Preparation and electrochemical performance for methanol oxidation of Pt/graphene nanocomposites. *Electrochemistry Communications*, 11(4), 846-849.
- Li, Z., Zhang, W., Wang, H., & Qin, Z. (2018). Activated pyrene decorated graphene with enhanced performance for electrochemical energy storage. *Chemical Engineering Journal*, 334, 845-854.
- Liang, X., Hou, X., Chan, J. H., Guo, Y., & Hilder, E. F. (2018). The application of graphene-based materials as chromatographic stationary phases. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98, 149-160.
- Liang, X., Wang, X., Ren, H., Jiang, S., Wang, L., & Liu, S. (2014). Gold nanoparticle decorated graphene oxide/silica composite stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Journal of separation science*, 37(12), 1371-1379.
- Lieberman, H.R. (1988). Beneficial effects of caffeine. In: Twelfth International Scientific Colloquium on Coffee. Paris, ASIC.
- Lieberman, H.R. (1992). Caffeine. In: Smith, A.P., Jones, D.M. (Eds.), *Handbook of Human Performance*, vol. 2. Academic Press, London, pp. 49–72.

- Lin, L. Y., Nie, Y., Kavadiya, S., Soundappan, T., & Biswas, P. (2017). N-doped reduced graphene oxide promoted nano TiO₂ as a bifunctional adsorbent/photocatalyst for CO₂ photoreduction: Effect of N species. *Chemical Engineering Journal*, 316, 449-460.
- Lin, Z., Wang, J., Yu, R., Yin, X., & He, Y. (2015). Incorporation of graphene oxide nanosheets into boronate-functionalized polymeric monolith to enhance the electrochromatographic separation of small molecules. *Electrophoresis*, 36(4), 596-606.
- Liszt, K. I., Ley, J. P., Lieder, B., Behrens, M., Stöger, V., Reiner, A., ... & Somoza, V. (2017). Caffeine induces gastric acid secretion via bitter taste signaling in gastric parietal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(30), E6260-E6269.
- Liu, J., Xue, Y., Gao, Y., Yu, D., Durstock, M., & Dai, L. (2012). Hole and electron extraction layers based on graphene oxide derivatives for high-performance bulk heterojunction solar cells. *Advanced Materials*, 24(17), 2228-2233.
- Liu, Y., Yu, D., Zeng, C., Miao, Z., & Dai, L. (2010). Biocompatible graphene oxide-based glucose biosensors. *Langmuir*, 26(9), 6158-6160.
- Liu, Z., Robinson, J. T., Sun, X., & Dai, H. (2008). PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *Journal of the American Chemical Society*, 130(33), 10876-10877.
- Lu, C. H., Yang, H. H., Zhu, C. L., Chen, X., & Chen, G. N. (2009). A graphene platform for sensing biomolecules. *Angewandte Chemie*, 121(26), 4879-4881.
- Lu, G., Park, S., Yu, K., Ruoff, R. S., Ocola, L. E., Rosenmann, D., & Chen, J. (2011). Toward practical gas sensing with highly reduced graphene oxide: a new signal processing method to circumvent run-to-run and device-to-device variations. *ACS nano*, 5(2), 1154-1164.
- Luo, Y. B., Zhu, G. T., Li, X. S., Yuan, B. F., & Feng, Y. Q. (2013). Facile fabrication of reduced graphene oxide-encapsulated silica: A sorbent for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography a*, 1299, 10-17.
- Ma, F., Li, Z., Zhao, H., Geng, Y., Zhou, W., Li, Q., & Zhang, L. (2017). Potential application of graphene oxide membranes for removal of Cs (I) and Sr (II) from high level-liquid waste. *Separation and Purification Technology*, 188, 523-529.
- Ma, N., Liu, J., He, W., Li, Z., Luan, Y., Song, Y., & Garg, S. (2017). Folic acid-grafted bovine serum albumin decorated graphene oxide: an efficient drug carrier for targeted cancer therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 490, 598-607.
- Malko, D., Neiss, C., Vines, F., & Görling, A. (2012). Competition for graphene: graphynes with direction-dependent dirac cones. *Physical review letters*, 108(8), 086804.
- Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., ... & Tour, J. M. (2010). Improved synthesis of graphene oxide. *ACS nano*, 4(8), 4806-4814.
- Marx, B., Scuvée, É., Scuvée-Moreau, J., Seutin, V., & Jouret, F. (2016). Mechanisms of caffeine-induced diuresis. *Medecine Sciences: M/S*, 32(5), 485-490.
- Matyba, P., Yamaguchi, H., Eda, G., Chhowalla, M., Edman, L., & Robinson, N. D. (2010). Graphene and mobile ions: the key to all-plastic, solution-processed light-emitting devices. *ACS Nano*, 4(2), 637-642.
- Meng, F., Zhang, S., Oh, Y., Zhou, Z., Shin, H. S., & Chae, S. R. (2017). Fouling in membrane bioreactors: An updated review. *Water research*, 114, 151-180.

- Mensah, B., Gupta, K. C., Kim, H., Wang, W., Jeong, K. U., & Nah, C. (2018). Graphene-reinforced elastomeric nanocomposites: A review. *Polymer Testing*, 68, 160-184.
- Meyer, J. C., Geim, A. K., Katsnelson, M. I., Novoselov, K. S., Booth, T. J., & Roth, S. (2007). The structure of suspended graphene sheets. *Nature*, 446(7131), 60-63.
- Mitchell, D. C., Knight, C. A., Hockenberry, J., Teplansky, R., & Hartman, T. J. (2014). Beverage caffeine intakes in the US. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 136-142.
- Moore, A., Collins, S., Carroll, D., McQuay, H., & Edwards, J. (2000). Single dose paracetamol (acetaminophen), with and without codeine, for postoperative pain (Cochrane Review). *The Cochrane Library*, 4.
- Moore, R. A., & McQuay, H. J. (1997). Single-patient data meta-analysis of 3453 postoperative patients: oral tramadol versus placebo, codeine and combination analgesics. *Pain*, 69(3), 287-294.
- Moreno, R. A., Sverdloff, C. E., Oliveira, R. A., Oliveira, S. E., & Borges, D. C. (2009). Comparative bioavailability and pharmacodynamic aspects of cyclobenzaprine and caffeine in healthy subjects and the effect on drowsiness intensity. *J Bioequiv Availab*, 1, 086-092.
- Morley, R., & Minceva, M. (2021). Liquid-Liquid Chromatography: Current Design Approaches and Future Pathways. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 12, 495-518.
- Nair, R. R., Ren, W., Jalil, R., Riaz, I., Kravets, V. G., Britnell, L., ... & Geim, A. K. (2010). Fluorographene: a two-dimensional counterpart of Teflon. *small*, 6(24), 2877-2884.
- Nair, R. R., Wu, H. A., Jayaram, P. N., Grigorieva, I. V., & Geim, A. K. (2012). Unimpeded permeation of water through helium-leak-tight graphene-based membranes. *Science*, 335(6067), 442-444.
- Nanda, S. S., Papaefthymiou, G. C., & Yi, D. K. (2015). Functionalization of graphene oxide and its biomedical applications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 40(5), 291-315.
- Narayanan, V. L., & Austin, A. (2016). Determination of acetaminophen and caffeine using reverse phase liquid (RP-LC) chromatographic technique. *Quest J. Res. Pharm. Sci*, 3, 5-10.
- Nehlig A, Daval JL, Debry G (1992) Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* 17(2):139-170
- Oliveira, A. E. F., Braga, G. B., Tarley, C. R. T., & Pereira, A. C. (2018). Thermally reduced graphene oxide: synthesis, studies and characterization. *Journal of Materials Science*, 53(17), 12005-12015.
- Ong, C. B., Ng, L. Y., & Mohammad, A. W. (2018). A review of ZnO nanoparticles as solar photocatalysts: Synthesis, mechanisms and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 536-551.
- Paredes, J. I., Villar-Rodil, S., Martínez-Alonso, A., & Tascon, J. M. (2008). Graphene oxide dispersions in organic solvents. *Langmuir*, 24(19), 10560-10564.
- Pei S, Cheng HM (2012) The reduction of graphene oxide. *Carbon* 50(9):3210-3228
- Peng, Q., Dearden, A. K., Chen, X. J., Huang, C., Wen, X., & De, S. (2015). Peculiar pressure effect on Poisson ratio of graphone as a strain damper. *Nanoscale*, 7(22), 9975-9979.
- Peng, Q., Dearden, A. K., Crean, J., Han, L., Liu, S., Wen, X., & De, S. (2014). New materials graphyne, graphdiyne, graphone, and graphane: review of properties,

- synthesis, and application in nanotechnology. *Nanotechnology, science and applications*, 1-29.
- Peng, W., Li, H., Liu, Y., & Song, S. (2017). A review on heavy metal ions adsorption from water by graphene oxide and its composites. *Journal of Molecular Liquids*, 230, 496-504.
- Porath, J. (1997). From gel filtration to adsorptive size exclusion. *Journal of protein chemistry*, 16, 463-468.
- Pujari, B. S., Gusarov, S., Brett, M., & Kovalenko, A. (2011). Single-side-hydrogenated graphene: Density functional theory predictions. *Physical Review B*, 84(4), 041402.
- Qi, Y., Yang, M., Xu, W., He, S., & Men, Y. (2017). Natural polysaccharides-modified graphene oxide for adsorption of organic dyes from aqueous solutions. *Journal of colloid and interface science*, 486, 84-96.
- Qingzhong, L., Fei, F., Yang, W., Wei, F., & Peijun, J. (2013). Enzyme Immobilization on Carboxyl-Functionalized Graphene Oxide for Catalysis in Organic Solvent.
- Qu, Q., Shen, Y., Gu, C., Gu, Z., Gu, Q., Wang, C., & Hu, X. (2012). Capillary column coated with graphene oxide as stationary phase for gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 757, 83-87.
- Rahimi, M., Khorshidi, N., & Heydari, R. (2020). Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in aqueous samples by ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Separation Science Plus*, 3(11-12), 561-570.
- Ramanathan, T., Abdala, A. A., Stankovich, S., Dikin, D. A., Herrera-Alonso, M., Piner, R. D., ... & Brinson, L. C. (2008). Functionalized graphene sheets for polymer nanocomposites. *Nature nanotechnology*, 3(6), 327-331.
- Ramezanzadeh, B., Haeri, Z., & Ramezanzadeh, M. (2016). A facile route of making silica nanoparticles-covered graphene oxide nanohybrids (SiO₂-GO); fabrication of SiO₂-GO/epoxy composite coating with superior barrier and corrosion protection performance. *Chemical Engineering Journal*, 303, 511-528.
- Rao, C. N. R., Gopalakrishnan, K., & Govindaraj, A. (2014). Synthesis, properties and applications of graphene doped with boron, nitrogen and other elements. *Nano today*, 9(3), 324-343.
- Ray, S. C. (2015). Application and uses of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Applications of graphene and graphene-oxide based nanomaterials*, 6(8), 39-55.
- Reddy, C. D., Zhang, Y. W., & Shenoy, V. B. (2012). Patterned graphone—a novel template for molecular packing. *Nanotechnology*, 23(16), 165303.
- Ren, L., Zhang, Y., Cui, C., Bi, Y., & Ge, X. (2017). Functionalized graphene oxide for anti-VEGF siRNA delivery: preparation, characterization and evaluation in vitro and in vivo. *RSC advances*, 7(33), 20553-20566.
- Reuhs, B. L. (2017). High-performance liquid chromatography. *Food analysis*, 213-226.
- Robinson, J. T., Burgess, J. S., Junkermeier, C. E., Badescu, S. C., Reinecke, T. L., Perkins, F. K., ... & Snow, E. S. (2010). Properties of fluorinated graphene films. *Nano letters*, 10(8), 3001-3005.
- Rodenas, V., Garcia, M. S., Sanchez-Pedreno, C., & Albero, M. I. (2000). Simultaneous determination of propacetamol and paracetamol by derivative spectrophotometry. *Talanta*, 52(3), 517-523.

- Rogers, A. E., Hafer, L. J., Iskander, Y. S., & Yang, S. (1998). Black tea and mammary gland carcinogenesis by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene in rats fed control or high fat diets. *Carcinogenesis*, 19(7), 1269-1273.
- Rommozzi, E., Zannotti, M., Giovannetti, R., D'Amato, C. A., Ferraro, S., Minicucci, M., ... & Di Cicco, A. (2018). Reduced graphene oxide/TiO₂ nanocomposite: from synthesis to characterization for efficient visible light photocatalytic applications. *Catalysts*, 8(12), 598.
- Rowley-Neale, S. J., Randviir, E. P., Dena, A. S. A., & Banks, C. E. (2018). An overview of recent applications of reduced graphene oxide as a basis of electroanalytical sensing platforms. *Applied Materials Today*, 10, 218-226.
- Rusted, J. (2020). Caffeine and cognitive performance: effects on mood or mental processing?. In *Caffeine and Behavior* (pp. 221-230). CRC Press.
- Saha, S. K., Bhaumik, S., Maji, T., Mandal, T. K., & Pal, A. J. (2014). Solution-processed reduced graphene oxide in light-emitting diodes and photovoltaic devices with the same pair of active materials. *RSC advances*, 4(67), 35493-35499.
- Seger, B., & Kamat, P. V. (2009). Electrocatalytically active graphene-platinum nanocomposites. Role of 2-D carbon support in PEM fuel cells. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(19), 7990-7995.
- Shahriary, L., & Athawale, A. A. (2014). Graphene oxide synthesized by using modified hummers approach. *Int. J. Renew. Energy Environ. Eng*, 2(01), 58-63.
- Shao, Y., Wang, J., Engelhard, M., Wang, C., & Lin, Y. (2010). Facile and controllable electrochemical reduction of graphene oxide and its applications. *Journal of Materials Chemistry*, 20(4), 743-748.
- Sharma, S., Sharma, C., Sharma, R., & Sharma, A. D. (2011). High Performance Liquid Chromatographic Assay method for the determination of Paracetamol and Caffeine in Tablet Formulation-in vitro dissolution studies. *Journal of Pharmacy Research*, 4(5), 655-659.
- Sheak, K., Richards, A., & Greene, A. (2018, January). MYOCARDIAL INFARCT (MI) CAUSED BY LOW DOSE OF CAFFEINE IN PATIENT WITH UNSUSPECTED CORONARY ARTERY ANOMALY. In *JOURNAL OF INVESTIGATIVE MEDICINE* (Vol. 66, No. 1, pp. 246-246). BRITISH MED ASSOC HOUSE, TAVISTOCK SQUARE, LONDON WC1H 9JR, ENGLAND: BMJ PUBLISHING GROUP.
- Shen, H., Zhang, L., Liu, M., & Zhang, Z. (2012). Biomedical applications of graphene. *Theranostics*, 2(3), 283.
- Sherma, J., & Fried, B. (Eds.). (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*. CRC press.
- Shetti, N. P., Malode, S. J., Nayak, D. S., Bagihalli, G. B., Reddy, K. R., Ravindranadh, K., & Reddy, C. V. (2019). A novel biosensor based on graphene oxide-nanoclay hybrid electrode for the detection of Theophylline for healthcare applications. *Microchemical Journal*, 149, 103985.
- Shi, W., Zhu, J., Sim, D. H., Tay, Y. Y., Lu, Z., Zhang, X., ... & Yan, Q. (2011). Achieving high specific charge capacitances in Fe₃O₄/reduced graphene oxide nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry*, 21(10), 3422-3427.
- Sivakumar, T., Manavalan, R., Muralidharan, C., & Valliappan, K. (2007). Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(5), 1842-1848.

- Sivek, J., Leenaerts, O., Partoens, B., & Peeters, F. M. (2012). First-principles investigation of bilayer fluorographene. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(36), 19240-19245.
- Sjoukes, A., Venekamp, R. P., van de Pol, A. C., Hay, A. D., Little, P., Schilder, A. G., & Damoiseaux, R. A. (2016). Paracetamol (acetaminophen) or non-steroidal anti-inflammatory drugs, alone or combined, for pain relief in acute otitis media in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12).
- Smith, A. (2002). Effects of caffeine on human behavior. *Food and chemical toxicology*, 40(9), 1243-1255.
- Song, L., Zhang, H., Cai, T., Chen, J., Li, Z., Guan, M., & Qiu, H. (2019). Porous graphene decorated silica as a new stationary phase for separation of sulfanilamide compounds in hydrophilic interaction chromatography. *Chinese Chemical Letters*, 30(4), 863-866.
- Song, Y., Chen, Y., Feng, L., Ren, J., & Qu, X. (2011). Selective and quantitative cancer cell detection using target-directed functionalized graphene and its synergetic peroxidase-like activity. *Chemical Communications*, 47(15), 4436-4438.
- Stankovich, S., Dikin, D. A., Dommett, G. H., Kohlhaas, K. M., Zimney, E. J., Stach, E. A., ... & Ruoff, R. S. (2006). Graphene-based composite materials. *nature*, 442(7100), 282-286.
- Stankovich, S., Dikin, D. A., Piner, R. D., Kohlhaas, K. A., Kleinhammes, A., Jia, Y., ... & Ruoff, R. S. (2007). Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *carbon*, 45(7), 1558-1565.
- Staudenmaier, L. (1898). Verfahren zur darstellung der graphitsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 31(2), 1481-1487.
- Stobinski, L., Lesiak, B., Malolepszy, A., Mazurkiewicz, M., Mierzwa, B., Zemek, J., ... & Bieloshapka, I. (2014). Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 195, 145-154.
- Stoddard, J. M., Nguyen, L., Mata-Chavez, H., & Nguyen, K. (2007). TLC plates as a convenient platform for solvent-free reactions. *Chemical communications*, (12), 1240-1241.
- Su, C. Y., Xu, Y., Zhang, W., Zhao, J., Liu, A., Tang, X., ... & Li, L. J. (2010). Highly efficient restoration of graphitic structure in graphene oxide using alcohol vapors. *ACS nano*, 4(9), 5285-5292.
- Sudha, D., & Sivakumar, P. (2015). Review on the photocatalytic activity of various composite catalysts. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 97, 112-133.
- Sun, X., Liu, Z., Welsher, K., Robinson, J. T., Goodwin, A., Zaric, S., & Dai, H. (2008). Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano research*, 1, 203-212.
- Sun, Y., Wang, X., Song, W., Lu, S., Chen, C., & Wang, X. (2017). Mechanistic insights into the decontamination of Th (IV) on graphene oxide-based composites by EXAFS and modeling techniques. *Environ. Sci. Nano*, 4(222), 10-1039.
- Svensson, E., Persson, L. O., & Sjöberg, L. (1980). Mood effects of diazepam and caffeine. *Psychopharmacology*, 67, 73-80.
- Swift, C. G., & Tiplady, B. (1988). The effects of age on the response to caffeine. *Psychopharmacology*, 94(1), 29-31.
- Szczepanik, J. C., de Oliveira, P. A., de Oliveira, J., Mack, J. M., Engel, D. F., Rial, D., ... & Prediger, R. D. (2016). Caffeine Mitigates the Locomotor Hyperactivity in

- Middle-aged Low-density Lipoprotein Receptor (LDLr)-Knockout Mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 22(5), 420.
- Tang, L. H., Wang, Y., Li, Y. M., Feng, H. B., Lu, J., & Li, J. H. (2009). Preparation, structure and electrochemical properties of graphene modified electrode. *Adv. Funct. Mater.*, 19(17), 2782-2789.
- Tarcan, R., Todor-Boer, O., Petrovai, I., Leordean, C., Astilean, S., & Botiz, I. (2020). Reduced graphene oxide today. *Journal of Materials Chemistry C*, 8(4), 1198-1224.
- Teng, C. L., Lim, W. Y., Chua, C. Z., Teo, R. S. K., Lin, K. T. H., & Yeoh, J. C. (2016). Does a single cup of caffeinated drink significantly increase blood pressure in young adults?: A randomised controlled trial. *Australian family physician*, 45(1/2), 65-68.
- Thu, N. T. A., Duc, H. V., Hai Phong, N., Cuong, N. D., Hoan, N. T. V., & Quang Khieu, D. (2018). Electrochemical determination of paracetamol using Fe₃O₄/reduced graphene-oxide-based electrode. *Journal of Nanomaterials*, 2018.
- Titelman, G. I., Gelman, V., Bron, S., Khalfin, R. L., Cohen, Y. B. P. H., & Bianco-Peled, H. (2005). Characteristics and microstructure of aqueous colloidal dispersions of graphite oxide. *Carbon*, 43(3), 641-649.
- Topkafa, M. (2022) Ders Notları. KONYA
- Topkafa, M., Ayyildiz, H. F., Memon, F. N., & Kara, H. (2016). New potential humic acid stationary phase toward drug components: Development of a chemometric-assisted RP-HPLC method for the determination of paracetamol and caffeine in tablet formulations. *Journal of Separation Science*, 39(13), 2451-2458.
- Vanderploeg LC and Welsch CW. (1991) Inhibition by caffeine of ovarian hormone-induced mammary gland tumorigenesis in female GR mice. *Cancer Lett*, 56(3):245-250.
- VanderPloeg, L. C., Wolfrom, D. M., Rao, A. R., Braselton, W. E., & Welsch, C. W. (1992). Caffeine, theophylline, theobromine, and developmental growth of the mouse mammary gland. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 11(3), 177-189.
- Verma, R.; Huang, Z.; Deutschman, C. and Levy R. (2009) Caffeine restores myocardial cyto- chrome oxidase activity and improves cardiac function during sepsis. *Crit. care. Med.* 37 (4): 1397 – 1402.
- Vinoba, M., Bhagiyalakshmi, M., Alqaheem, Y., Alomair, A. A., Pérez, A., & Rana, M. S. (2017). Recent progress of fillers in mixed matrix membranes for CO₂ separation: A review. *Separation and Purification Technology*, 188, 431-450.
- Voser, W. (1982). Isolation of hydrophilic fermentation products by adsorption chromatography. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32(1), 109-118.
- Wang, C., Zhang, Z., Chen, B., Gu, L., Li, Y., & Yu, S. (2018). Design and evaluation of galactosylated chitosan/graphene oxide nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 516, 332-341.
- Wang, H., Cui, L. F., Yang, Y., Sanchez Casalongue, H., Robinson, J. T., Liang, Y., ... & Dai, H. (2010). Mn₃O₄-graphene hybrid as a high-capacity anode material for lithium ion batteries. *Journal of the American Chemical Society*, 132(40), 13978-13980.
- Wang, J., Li, Y., Chen, W., Peng, J., Hu, J., Chen, Z., ... & Wang, X. (2017). The rapid coagulation of graphene oxide on La-doped layered double hydroxides. *Chemical Engineering Journal*, 309, 445-453.

- Wang, L., Lee, K., Sun, Y. Y., Lucking, M., Chen, Z., Zhao, J. J., & Zhang, S. B. (2009). Graphene oxide as an ideal substrate for hydrogen storage. *ACS nano*, 3(10), 2995-3000.
- Wang, M. M., & Yan, X. P. (2012). Fabrication of graphene oxide nanosheets incorporated monolithic column via one-step room temperature polymerization for capillary electrochromatography. *Analytical chemistry*, 84(1), 39-44.
- Wang, R., & Chen, Z. (2018). Boronate affinity monolithic column incorporated with graphene oxide for the in-tube solid-phase microextraction of glycoproteins. *Journal of separation science*, 41(13), 2767-2773.
- Wang, S., Li, X., Liu, Y., Zhang, C., Tan, X., Zeng, G., ... & Jiang, L. (2018). Nitrogen-containing amino compounds functionalized graphene oxide: synthesis, characterization and application for the removal of pollutants from wastewater: a review. *Journal of hazardous materials*, 342, 177-191.
- Wang, S., Sun, H., Ang, H. M., & Tadé, M. O. (2013). Adsorptive remediation of environmental pollutants using novel graphene-based nanomaterials. *Chemical engineering journal*, 226, 336-347.
- Wang, X., Zhi, L., & Müllen, K. (2008). Transparent, conductive graphene electrodes for dye-sensitized solar cells. *Nano letters*, 8(1), 323-327.
- Wang, X., Zhi, L., Tsao, N., Tomović, Ž., Li, J., & Müllen, K. (2008). Transparent carbon films as electrodes in organic solar cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(16), 2990-2992.
- Wang, Y., Li, Z., Hu, D., Lin, C. T., Li, J., & Lin, Y. (2010). Aptamer/graphene oxide nanocomplex for in situ molecular probing in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 132(27), 9274-9276.
- Wang, Y., Shi, Z., Huang, Y., Ma, Y., Wang, C., Chen, M., & Chen, Y. (2009). Supercapacitor devices based on graphene materials. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(30), 13103-13107.
- Weil, K., Hooper, L., Afzal, Z., Esposito, M., Worthington, H. V., van Wijk, A., & Coulthard, P. (2007). Paracetamol for pain relief after surgical removal of lower wisdom teeth. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3).
- Wilchek, M., & Chaiken, I. (2000). An overview of affinity chromatography. *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, 1-6.
- Williams, G., Seger, B., & Kamat, P. V. (2008). TiO₂-graphene nanocomposites. UV-assisted photocatalytic reduction of graphene oxide. *ACS nano*, 2(7), 1487-1491.
- Wu, B., Kuang, Y., Zhang, X., & Chen, J. (2011). Noble metal nanoparticles/carbon nanotubes nanohybrids: synthesis and applications. *Nano Today*, 6(1), 75-90.
- Wu, F. C. (2004). Optimization of correlated multiple quality characteristics using desirability function. *Quality engineering*, 17(1), 119-126.
- Wu, J., Becerril, H. A., Bao, Z., Liu, Z., Chen, Y., & Peumans, P. (2008). Organic solar cells with solution-processed graphene transparent electrodes. *Applied physics letters*, 92(26), 237.
- Wu, Q., Chen, L., Gao, J., Dong, S., Li, H., Di, D., & Zhao, L. (2019). Graphene quantum dots-functionalized C18 hydrophobic/hydrophilic stationary phase for high performance liquid chromatography. *Talanta*, 194, 105-113.
- Wyatt, JK.; Cajochen, C.; Ritz –De, CA; Czeisler, CA. and Dijk , DJ (2004) Low- dose repeated caffeine administration for circadian dependent performance degradation during extended wakefulness- Sleep , 27:374-381.
- Xu, C., Wang, X., Zhu, J., Yang, X., & Lu, L. (2008). Deposition of Co₃O₄ nanoparticles onto exfoliated graphite oxide sheets. *Journal of Materials Chemistry*, 18(46), 5625-5629.

- Yang, L., Hu, J., Wu, W., Tang, J., Ding, K., & Li, J. (2016). In situ NH₂-functionalized graphene oxide/SiO₂ composites to improve Cu (II) removal from ammoniacal solutions. *Chemical Engineering Journal*, 306, 77-85.
- Yang, S., Feng, X., Ivanovici, S., & Müllen, K. (2010). Fabrication of graphene-encapsulated oxide nanoparticles: towards high-performance anode materials for lithium storage. *Angewandte Chemie*, 122(45), 8586-8589.
- Yang, X., Wang, Y., Huang, X., Ma, Y., Huang, Y., Yang, R., ... & Chen, Y. (2011). Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity. *Journal of materials chemistry*, 21(10), 3448-3454.
- Yang, X., Zhang, X., Ma, Y., Huang, Y., Wang, Y., & Chen, Y. (2009). Superparamagnetic graphene oxide-Fe₃O₄ nanoparticles hybrid for controlled targeted drug carriers. *Journal of materials chemistry*, 19(18), 2710-2714.
- Yoo, E., Kim, J., Hosono, E., Zhou, H. S., Kudo, T., & Honma, I. (2008). Large reversible Li storage of graphene nanosheet families for use in rechargeable lithium ion batteries. *Nano letters*, 8(8), 2277-2282.
- Yoon, J., Sung, H., Lee, G., Cho, W., Ahn, N., Jung, H. S., & Choi, M. (2017). Superflexible, high-efficiency perovskite solar cells utilizing graphene electrodes: towards future foldable power sources. *Energy & Environmental Science*, 10(1), 337-345.
- Yu, L., Li, P., Zhang, Q., Zhang, W., Ding, X., & Wang, X. (2013). Graphene oxide: an adsorbent for the extraction and quantification of aflatoxins in peanuts by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1318, 27-34.
- Yu, S., Wang, J., Song, S., Sun, K., Li, J., Wang, X., ... & Wang, X. (2017). One-pot synthesis of graphene oxide and Ni-Al layered double hydroxides nanocomposites for the efficient removal of U (VI) from wastewater. *Science China Chemistry*, 60, 415-422.
- Yu, W., Sisi, L., Haiyan, Y., & Jie, L. (2020). Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: A review. *RSC advances*, 10(26), 15328-15345.
- Zang, Z., Zeng, X., Wang, M., Hu, W., Liu, C., & Tang, X. (2017). Tunable photoluminescence of water-soluble AgInZnS-graphene oxide (GO) nanocomposites and their application in-vivo bioimaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 252, 1179-1186.
- Zarrinjahan, A., Moghadam, M., Mirkhani, V., Tangestaninejad, S., & Mohammadpoor-Baltork, I. (2017). Graphene oxide-bound electron-deficient tin (IV) porphyrin: a highly efficient and selective catalyst for trimethylsilylation of alcohols and phenols with hexamethyldisilazane. *Applied Organometallic Chemistry*, 31(2), e3568.
- Zhang, J., Liu, D., Meng, X., Shi, Y., Wang, R., Xiao, D., & He, H. (2017). Solid phase extraction based on porous magnetic graphene oxide/ β -cyclodextrine composite coupled with high performance liquid chromatography for determination of antiepileptic drugs in plasma samples. *Journal of Chromatography A*, 1524, 49-56.
- Zhang, L. N., Deng, H. H., Lin, F. L., Xu, X. W., Weng, S. H., Liu, A. L., ... & Chen, W. (2014). In situ growth of porous platinum nanoparticles on graphene oxide for colorimetric detection of cancer cells. *Analytical chemistry*, 86(5), 2711-2718.
- Zhang, L., Xia, J., Zhao, Q., Liu, L., & Zhang, Z. (2010). Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *small*, 6(4), 537-544.

- Zhang, M., Lei, D., Yin, X., Chen, L., Li, Q., Wang, Y., & Wang, T. (2010). Magnetite/graphene composites: microwave irradiation synthesis and enhanced cycling and rate performances for lithium ion batteries. *Journal of Materials Chemistry*, 20(26), 5538-5543.
- Zhang, X., Chen, S., Han, Q., & Ding, M. (2013). Preparation and retention mechanism study of graphene and graphene oxide bonded silica microspheres as stationary phases for high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1307, 135-143.
- Zhang, X., Luo, L., Li, L., He, Y., Cao, W., Liu, H., ... & Gao, D. (2019). Trimodal synergistic antitumor drug delivery system based on graphene oxide. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 15(1), 142-152.
- Zhang, X., Niu, J., Zhang, X., Xiao, R., Lu, M., & Cai, Z. (2017). Graphene oxide-SiO₂ nanocomposite as the adsorbent for extraction and preconcentration of plant hormones for HPLC analysis. *Journal of Chromatography B*, 1046, 58-64.
- Zhao, L., Yu, B., Xue, F., Xie, J., Zhang, X., Wu, R., ... & Luo, J. (2015). Facile hydrothermal preparation of recyclable S-doped graphene sponge for Cu²⁺ adsorption. *Journal of hazardous materials*, 286, 449-456.
- Zheng, X. C., Li, N., Wu, M., Guan, X. X., & Zhang, X. L. (2017). Synthesis of biofuel via levulinic acid esterification over porous solid acid consisting of tungstophosphoric acid and reduced graphene oxide. *Research on Chemical Intermediates*, 43, 6651-6664.
- Zhou, G., Wang, D. W., Li, F., Zhang, L., Li, N., Wu, Z. S., ... & Cheng, H. M. (2010). Graphene-wrapped Fe₃O₄ anode material with improved reversible capacity and cyclic stability for lithium ion batteries. *Chemistry of materials*, 22(18), 5306-5313.
- Zhou, J., & Sun, Q. (2012). How to fabricate a semihydrogenated graphene sheet? A promising strategy explored. *Applied Physics Letters*, 101(7), 073114.
- Zhou, J., Wang, Q., Sun, Q., Chen, X. S., Kawazoe, Y., & Jena, P. (2009). Ferromagnetism in semihydrogenated graphene sheet. *Nano letters*, 9(11), 3867-3870.
- Zhou, X., Huang, X., Qi, X., Wu, S., Xue, C., Boey, F. Y., ... & Zhang, H. (2009). In situ synthesis of metal nanoparticles on single-layer graphene oxide and reduced graphene oxide surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(25), 10842-10846.
- Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J. W., Potts, J. R., & Ruoff, R. S. (2010b). Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Advanced materials*, 22(35), 3906-3924.
- Zhu, Y., Murali, S., Stoller, M. D., Ganesh, K. J., Cai, W., Ferreira, P. J., ... & Ruoff, R. S. (2011). Carbon-based supercapacitors produced by activation of graphene. *science*, 332(6037), 1537-1541.
- Zhu, Y., Murali, S., Stoller, M. D., Velamakanni, A., Piner, R. D., & Ruoff, R. S. (2010a). Microwave assisted exfoliation and reduction of graphite oxide for ultracapacitors. *Carbon*, 48(7), 2118-2122.