

**KARVEDİLOL'ÜN ELEKTROKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE TAYİNİ
İÇİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

Emre GÜVEN
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

2015

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARVEDİLOL'ÜN ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ VE TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

Emre GÜVEN

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: YRD. DOÇ. DR. FUNDA ÖZTÜRK

TEKİRDAĞ-2015

Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Funda Öztürk danışmanlığında, Emre Güven tarafından hazırlanan “Karvedilol’ün Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi ve Tayini İçin Elektrokimyasal Yöntem Geliştirilmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Yrd. Doç. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

İmza :

Üye: Doç. Dr. Zerrin BAĞCI

İmza :

Üye: Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARVEDİLOL'ÜN ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Emre GÜVEN

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

Bu tez çalışmasında, hipertansiyon tedavisinde kullanılan karvedilol'ün (CAR) elektrokimyasal davranışı, modifiye karbon pasta elektrot yüzeyinde, Britton-Robinson (BR) tamponunda dönüşümlü voltametri (DV) yöntemi ile incelendi. CAR'ın adsorpsiyon özellikleri incelenerek yükseltgenme reaksiyonunda aktarılan elektron sayısı, difüzyon katsayısı gibi bazı elektrokimyasal parametreleri hesaplandı. CAR'ın farmasötik örnekler ve serumda tayini için kare dalga anodik adsorptif sıyırma voltametri (KDAAdSV) yöntemi kullanılarak yöntem geliştirildi. KDAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımı derişim grafiğinden doğrusal çalışma aralığı $7,4 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1} - 4,1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ olarak belirlendi. Geliştirilen yöntem için alt tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı belirlendi. Farmasötik ve biyolojik numunelere uygulanan bu yöntemle, güvenilir, tekrarlanabilir, yüksek doğruluk ve kesinliğe sahip sonuçlar elde edildi. Geliştirilen yöntem ile CAR tayini için literatürde bulunan standart yöntem karşılaştırıldığında % 95 güven seviyesinde her iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Karvedilol, Voltametri, Elektrokimyasal Davranış, Adsorptif Sıyırma Kare Dalga Voltametrisi

2015, 48 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

**INVESTIGATION OF ELECTROCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CARVEDILOL
AND DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL METHOD TO ITS DETERMINATION**

Emre GÜVEN

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry Division

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Funda ÖZTÜRK

In this study, electrochemical behavior of carvedilol (CAR), used in treatment of hypertension, was investigated on carbon paste electrode (GCE) in Britton- Robinson buffer (BR) by cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetric (SWV). Adsorption properties of CAR were investigated. Some electrochemical parameters such as; number of electron transferred in the oxidation of CAR and diffusion coefficient were determined. Also in biological media, such as drug and serum samples, the pharmaceutical active substance used with the cases in question for the determination of substances have been studied. Linear working concentration range for these methods was evaluated as $7,4 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1} - 4,1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ for SWAAdSV. Limit of detection and limit of quantitation were calculated. Proposed methods were applied to pharmaceutical and biological samples and reproducible results with high accuracy, precision and confidence were obtained. These results were also compared with those of standart methods proposed for determination of CAR and results were found to be insignificant at 95% confidence level.

Keywords: Carvedilol, voltammetry, electrochemical behaviour, adsorptive stripping square wave voltammetry

2015, 48 page

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Hipertansiyon	3
2.1.1. Karvedilol (CAR).....	4
2.2. Elektrokimya	4
2.3. Voltametik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	4
2.3.1. Dönüşümlü voltametri (DV)	5
2.3.2. Puls voltametri.....	7
2.3.3. Sıyırma voltametri (SV)	8
2.3.4. Polarografi.....	10
2.4. Voltametricte Kullanılan Çalışma Elektrotları.....	11
2.5. Elektrokimyanın Temel Kavramları.....	12
2.6. Elektrot Reaksiyon Çeşitleri.....	13
2.6.1. Kimyasal reaksiyonlar.....	13
2.6.2. Adsorpsiyon kontrollü mekanizmalar	13
2.7. Karbon Pasta Elektrot (KPE).....	14
2.8. Mekanizma Çeşitleri.....	15
2.8.1. Tersinir mekanizmalar.....	15
2.8.2. Yarı tersinir tepkimeler	15
2.8.3. Tersinmez tepkimeler	16
2.9. Kaynak Araştırması	17
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Cihazlar.....	20
3.2. Kullanılan Elektrotlar	21
3.2.1. Modifiye edilmiş karbon pasta elektrotun hazırlanması	21
3.3. Kullanılan Kimyasallar.....	21

3.4. Kullanılan Diğer Cihaz ve Malzemeler	21
3.5. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	22
3.5.1. Destek elektrolit stok çözeltilerinin hazırlanması	22
3.5.2. Standart CAR çözeltilerinin hazırlanması	22
3.5.3. Farmasötik örneklerin ve biyolojik sıvıların hazırlanması	22
3.5.4. Elektrokimyasal deneyler ve ölçümlerin yapılışı	23
3.6. Difüzyon Katsayısının (D) Hesaplanması	23
3.7. Yüzey Kaplama Katsayısının (Γ) Hesaplanması	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	25
4.1. CAR'ın ZnO NP - KPE Yüzeyindeki Elektrokimyasal Davranışı	25
4.2. CAR'ın Sıyırma Voltametri ile Tayin Yöntemi Geliştirme	31
4.2.1. Cihaz ve deneysel parametrelerinin optimizasyonu	31
4.2.2. Yöntem parametrelerinin optimizasyonu	31
4.3. Geliştirilen Yöntemin Analitik Uygulamaları	34
4.3.1. Kalibrasyon grafiği ve doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi	34
4.4. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyon Parametrelerinin İncelenmesi	38
4.4.1. Doğrusal çalışma aralığı	38
4.4.2. Yöntemin doğruluğu	38
4.4.3. Tekrarlanabilirlik	38
4.4.4. Yöntemin kesinliği	40
4.4.5. Yöntemin duyarlılığı	40
4.4.6 Yöntemin seçiciliği	40
4.4.7. Gözlenebilme sınırı	41
4.4.8. Alt tayin sınırı	41
4.5. Farklı Yöntem Sonuçlarının ve Parametrelerinin İstatiksel Olarak Karşılaştırılması	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
6. KAYNAKÇA	45
TEŞEKKÜRLER	47
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. CAR molekülünün kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2. Voltametik metotların sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.3. Dönüşümlü voltametri için uyarma sinyali.....	5
Şekil 2.4. Diferansiyel puls voltametri için uyarma sinyali.....	7
Şekil 2.5. Kare dalga voltametri için uyarma sinyali.....	8
Şekil 2.6. Voltammetride kullanılan elektrotların sınıflandırılması.....	12
Şekil 2.7. Tersinir bir reaksiyon için alınan dönüşümlü voltamogram.....	15
Şekil 2.8. Yarı tersinir bir reaksiyon için alınan dönüşümlü voltamogram.....	16
Şekil 3.1. DROP-SENSE çalışma ünitesi.....	20
Şekil 3.2. Çalışmanın yapıldığı BAS C3 elektrot hücre standı.....	20
Şekil 4.1. CAR'ın molekül yapısı.....	25
Şekil 4.2. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ CAR'ın, MeOH-BR (1:5) ortamında, ZnO-KPE'de elde edilen dönüşümlü voltamogramları (v : 0,1 V.s ⁻¹ , pH: 8,0).....	26
Şekil 4.3. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ CAR'ın, MeOH-BR ortamında (1:5) ZnO NP-KPE'de farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları.....	27
Şekil 4.4. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ CAR'ın farklı tarama hızlarından elde edilen akım fonksiyonunu ($i_p^a/v^{1/2}$) tarama hızıyla (v) değişim grafiği.....	27
Şekil 4.5. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ CAR'ın MeOH-BR (1:5) ortamında, ZnO NP - KPE'de farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen $\log i_p - \log v$ grafiği.....	28
Şekil 4.6. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ CAR'ın ZnO NP-KPE'ta KDV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının pH ile değişim grafiği.....	29
Şekil 4.7. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ CAR'ın, ZnO NP-KPE'de KDV yöntemi ile elde edilen pik potansiyelinin pH ile değişim grafiği.....	29
Şekil 4.8. CAR'ın olası yükseltgenme mekanizması.....	30
Şekil 4.9. KDAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının biriktirme potansiyeli ile değişim grafiği.....	32
Şekil 4.10. KDAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının biriktirme süresi ile değişim grafiği.....	33
Şekil 4.11. ZnO NP-KPE yüzeyinde alınan CAR'ın farklı derişimlerdeki KDAAdSV voltamogramları (pH: 8,0; E_{bir} : 0,3 V, t_{bir} : 15 s).....	34
Şekil 4.12. ZnO NP- KPE ile KDAAdSV yönteminde pik akımının CAR derişimi ile değişim grafiği; (pH:8,0, E_{bir} : 0,3 V, t_{bir} : 15 s).....	35
Şekil 4.13. CAR'ın tayini için geliştirilen KDAAdSV yönteminin tablet numunelerine uygulanması sonucu elde edilen voltamogramlar.....	36
Şekil 4.14. CAR'ın tayini için geliştirilen KDAAdSV yönteminin serum numunelerine uygulanması sonucu elde edilen voltamogramlar.....	37
Şekil 4.15. KDAAdSV yöntemi ile aynı gün, aynı çözeltide yapılan ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 0,3 V, t_{bir} : 15 s, C_{CAR} : $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ , pH 8,0).....	39
Şekil 4.16. KDAAdSV yöntemi ile farklı gün, farklı çözeltide yapılan ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 0,3 V, t_{bir} : 15 s, C_{CAR} : $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ , pH 8,0).....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	21
Çizelge 4.1. ZnO NP-KPE yüzeyinde CAR analizi için yapılan voltametrik çalışmalardaki optimum cihaz ve deneysel parametreler	33
Çizelge 4.2. Tabletlerde CAR analizine ait sonuçlar	36
Çizelge 4.3. Serumda CAR analizine ait sonuçlar	37
Çizelge 4.4. Geliştirilen voltametrik yöntemin kalibrasyon verilerinden hesaplanan validasyon parametreleri.....	41
Çizelge 4.5. Karvedilol içeren tabletlerde kemilüminesans yöntemi ile elde edilen sonuçlar .	42
Çizelge 4.6. Karvedilol içeren serumlarda HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlar	42
Çizelge 4.7. Geliştirilen KDAAdsV yöntemi ile kemilüminesans ve HPLC yöntemini karşılaştırmak için hesaplanan F ve t değerleri	43

SİMGELER DİZİNİ

A	: Elektrodun yüzey alanı, cm^2
Ag	: Gümüş
AgCl	: Gümüş klorür
BP	: Biriktirme potansiyeli
BR	: Britton-Robinson tamponu
BS	: Biriktirme süresi
C	: Ana çözeltideki elektroaktif maddenin analitik derişimi, mol.cm^{-3}
CAR	: Karvedilol
DPV	: Diferansiyel puls voltametri
DV	: Dönüşümlü voltametri
E	: Uygulanan potansiyel, V
E_0	: Standart potansiyel, V
E_{bir}	: Biriktirme potansiyeli, V
E_p	: Pik potansiyeli, V
E_p^a	: Anodik pik potansiyeli, V
E_p^k	: Katodik pik potansiyeli, V
F	: Faraday sabiti, 96485 C/mol e-
\dot{I}_p	: Pik akımı, A
i_p^a	: Anodik pik akımı, A
i_p^k	: Katodik pik akımı, A
KDAAdSV	: Kare dalga anodik adsorptif sıyırma voltametri
KDV	: Kare-dalga voltametri
KPE	: Karbon pasta elektrot
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Alt tayin sınırı
M	: Molarite (mol.cm^{-3} , mol.L^{-1})
n	: Aktarılan elektron sayısı
NaCl	: Sodyum klorür
Pt	: Platin
Q	: Yük miktarı
R	: Gaz sabiti, $8,314 \text{ joule.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
sb	: Birleşik standart sapma
s	: Standart sapma
SV	: Sıyırma voltametri
T	: Mutlak sıcaklık, K
t	: Zaman, s
t_{bir}	: Biriktirme süresi, s
v	: Tarama hızı, V.s^{-1} , mV/s^{-1}
V	: Volt
Γ	: Elektrot yüzeyine adsorbe olan madde miktarı, mol/cm^2
Π	: Pi sayısı, 22/7

1.GİRİŞ

Hipertansiyon olarak da bilinen yüksek kan basıncı; tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça yaygın olarak görülen ve önemini her geçen gün artırarak hissettiren bir sağlık sorunudur.

Dünya genelinde hipertansiyon toplam ölümlerin % 13'ünün (yılda 7,1 milyon ölüm) ana sebebi olduğu bilinmektedir. Buna rağmen gerek dünyada gerekse ülkemizde hipertansiyondan haberdar olma oranları ve kan basıncı kontrol oranları istenilen düzeylerde değildir. Ülkemizde 18 yaş üstündeki yaklaşık her üç kişiden birinde hipertansiyon olduğu bilinmesine rağmen, yine her üç kişiden birinin tansiyon ölçümü ve kontrolü yaptırmadığı bilinmektedir. Ülkemizde yüksek kan basıncı sorunu olan bireylerin sadece % 40'ı kan basıncı yüksekliğinin farkında olup, yalnızca % 31'inin antihipertansif tedavi aldığı da bilinmektedir (www.sağlık.gov.tr 2014).

Hipertansiyonun tedavisinde kullanılmak üzere günümüzde çeşitli hipertansiyon ilaçları üretilmektedir. Ayrıca, yeni ilaç geliştirme çalışmaları da hızla sürdürülmektedir.

İlaç analizleri; formülasyon, kalite kontrol, kararlılık çalışmaları, farmakolojik testler gibi farmasötik işlemlerin çeşitli aşamalarında önem kazanmaktadır. Hastanelerde klinik çalışmaların desteklenmesi amacıyla ilaç analiz çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar, formülasyon ve biyolojik sıvı gibi karmaşık ortamlardaki ilaçların analizleri için güvenilir ve geçerli analitik bir yöntem gerektirmektedir. Ayrıca gerekli çalışmalardan sonra üretime sunulan her etken madde için ayrı bir analiz yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Uygulamada olan analiz yöntemlerinin maliyetlerini azaltmak, daha güvenilir ve daha hassas duruma getirmek için çalışmalar yapılmaktadır (Zorluoğlu 2012).

Günümüzde ilaç analizlerinde analitik yöntemler olarak genellikle kromatografik yöntemler tercih edilmektedir. Kromatografik yöntemlerin yanında titrimetrik, spektroskopik ve voltametrik yöntemler de kullanılmaktadır.

Son yıllarda voltametrik yöntemlerin, elektrokimyasal olarak aktif olan türlerin tayininde yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanması dikkat çekicidir. Bu yöntemler, kolay uygulanabilmekte, uygulanmasında diğer yöntemlerden daha az miktarlarda kimyasal kullanılmakta ve bu yöntemler için gerekli sistemler daha ucuza kurulabilmektedir. Geliştirilen elektrokimyasal yöntemlerin gözlenebilme ve alt tayin sınırları diğer yöntemlerde bulunanlara göre oldukça düşük olabilmektedir.

Elektrokimyasal yöntemlerin özel bir uygulaması olan voltametrik sıyırma yöntemleriyle nanomolar gibi çok daha düşük miktarlardaki maddelerin tayini

yapılabilmektedir. Bu tayinlerde, numunenin ayrı bir ön işleme tabii tutulmaması bu yöntemlerin düşük alt tayin sınırlarından sonra gelen en önemli üstünlüğüdür.

Bu avantajlarında dolayı elektrokimyasal yöntemler ilaç etkin madde nicel analizinde geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Bu tez çalışmasında da, hipertansiyon tedavisinde kullanılan bazı ilaçlarda etken madde olarak bulunan karvedilol (CAR) molekülünün ZnO nanopartikülü ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot (ZnO NP-KPE) yüzeyinde elektrokimyasal davranışının dönüşümlü voltametri yöntemi ile incelenmesi ve çalışmalar sonunda tersinirlik, aktarılan elektron sayısı, adsorpsiyon özellikleri gibi elektrokimyasal parametrelerinin belirlenmesi amaçlandı. Daha sonra CAR'ın nicel tayini için voltametrik sıyırma yöntemlerinde kare dalga anodik adsorptif sıyırma voltametri (KDAAdSV) yöntemi kullanılarak yeni bir yöntem geliştirildi. Bu amaçla, deneysel ve cihaz parametreleri değiştirilerek uygun çalışma koşulları belirlendi. KDAAdSV yöntemi, CAR içeren farmasötik ve serum örneklerine uygulandı ve elde edilen veriler, literatürde bulunan standart yöntemle karşılaştırılarak doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER

Bu bölümde çalışma kapsamında ele alınan ilaç etken maddenin bazı kimyasal, fiziksel ve farmakolojik özellikleri ile literatür taraması sonucu madde tayini için geliştirilmiş mevcut yöntemler ve yeni tayin yöntemi geliştirmek amacıyla kullanılacak olan voltametrik yöntemler açıklanmıştır.

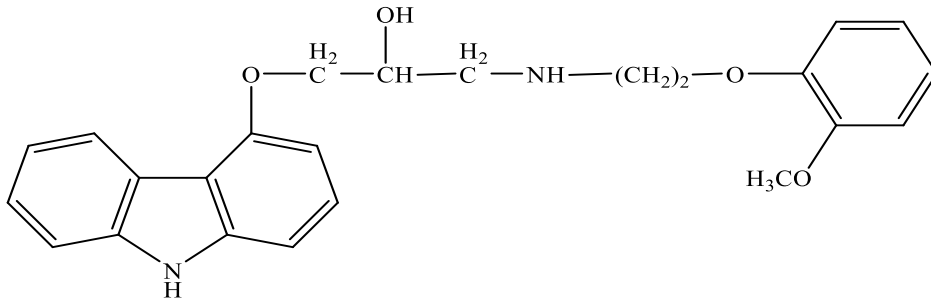
2.1. Hipertansiyon

Hücre ve dokulardaki canlılık faaliyetleri için kan dolaşımına, kan dolaşımı için ise belirli sınırlarda olmak üzere kan basıncına ihtiyaç vardır. Ancak bu basıncın belirli bir süre zarfında normalden yüksek olması durumunda gerekli tedaviler ile kontrol altına alınması gereken tıbbi bir rahatsızlığı ortaya çıkarmaktadır ve bu rahatsızlık hipertansiyon olarak bilinmektedir. Hipertansiyon için kullanılan diğer bir isim ise yüksek tansiyondur. Bütün tıbbi rahatsızlıklarda olduğu gibi hipertansiyonun tedavisinde de belirli bir aşamadan sonra farklı yapı ve özelliklerdeki ilaçların kullanılması kaçınılmaz bir sonuçtur. Tedavide kullanılacak olan ilaç hastanın ve hastalığın durum ve evresine göre farklılık göstermekle birlikte hipertansiyon tedavisinde genel olarak aşağıdaki sınıflardan ilaçlar kullanılmaktadır;

- Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri
- Adrenerjik reseptör blokerleri
- Adrenerjik nöron blokerleri
- Santral etki kili sempatolitik ilaçlar ve diğer sempatolitikler
- Kalsiyum kanal blokerleri
- Beta blokerleri
- Anjiyotensin II reseptör antagonistleri (ARA II)
- Tiyazit ve tiyazit benzeri diüretikler

Bu tez çalışması, aşağıda bazı özellikleri verilen beta blokerleri grubuna ait olan karvedilol (CAR) ilaç etken maddesi ile ilgili yapılan çalışmaları kapsamaktadır.

2.1.1. Karvedilol (CAR)



Şekil 2.1. CAR molekülünün kimyasal yapısı

Karvedilol beyaz veya beyaza yakın renkte bir tozdur. Erime noktası 114 – 115 °C'dir. Dimetilsülfoksitte, metilen klorür ve metanolde çözünür; etanol ve izopropanolde az çözünür. Pratik olarak suda çözünmez (Moffat 2004).

IUPAC adlandırılması: (±)-1-(karbazol-4-iloksi)-3-[[2-(*O*-metoksifenoksi)etil]amino]-2-propanol

Molekül kütlesi: 406,47 g.mol⁻¹

Kapalı formülü: C₂₄H₂₆N₂O₄

Sınıfı: beta blokerleri

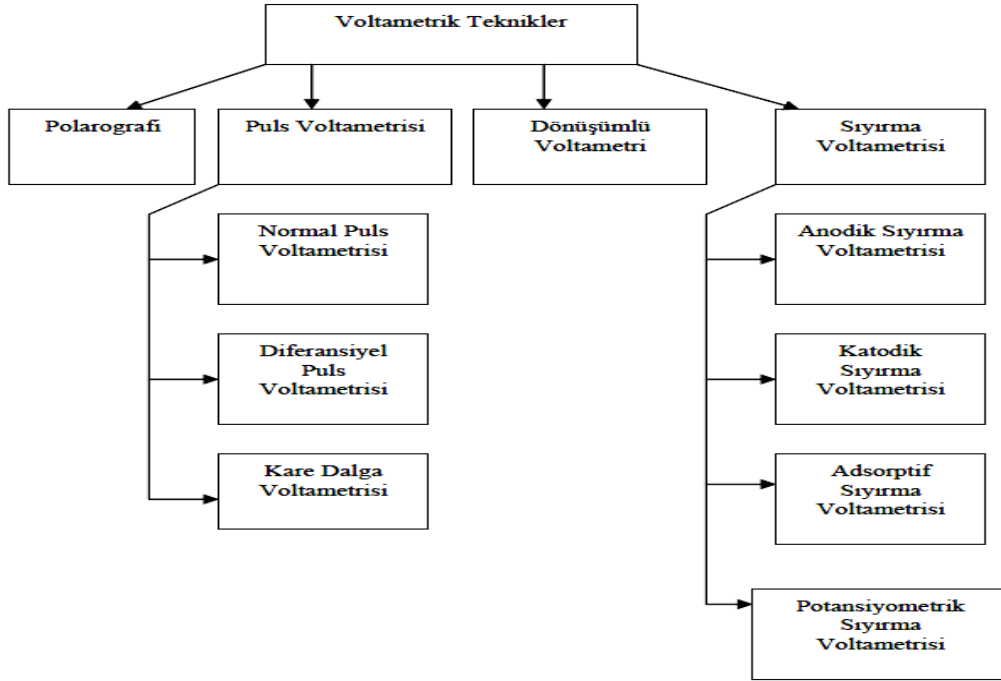
2.2. Elektrokimya

Elektrokimya; maddenin elektrik enerjisi ile etkileşimini, etkileşim sonucunda oluşan kimyasal dönüşümleri, fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini incelemektedir.

Elektrokimya uzun bir geçmişe sahiptir ve 200 yıl önce Volta'nın elektrik pilini (1799) keşfi ile başlar. Son yıllarda elektrokimya alanında ilerlemeler oldukça fazladır. Günümüzde elektrokimya, bilim ve teknolojinin yeni alanlarının geliştirilmesinde önemli rol oynamakta ve küresel enerji ve çevre sorunlarının çözümüne gerekli katkılar yapmaktadır (Izutsu 2002, Kaçar 2010).

2.3. Voltametrik Yöntemlerin Sınıflandırılması

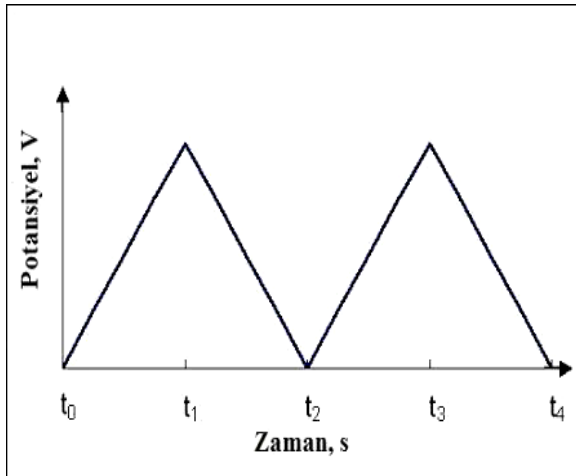
Günümüzün ileri teknolojik yöntemlerinden olan voltametrik yöntemler; çözelti ve elektrodun bulunduğu sisteme elektriksel etki uygulanarak sistemin verdiği cevabın ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Elektrokimyasal tekniklerin hemen hemen hepsinde potansiyel (E), akım (i), zaman (t) parametreleri bulunmaktadır. Örneğin; voltametri tekniği potansiyel-akım hakkında bilgi vermektedir.



Şekil 2.2. Voltametrik metotların sınıflandırılması

2.3.1. Dönüştümlü voltametri (DV)

Durgun bir çözelti içinde bulunan çalışma elektroduna uygulanan potansiyel polarizasyon dalgasının düzgün bir şekilde değiştirilmesi sonucu oluşan akım-potansiyel davranışını inceleyen elektrokimyasal yöntemdir. DV nitel analiz için kullanılan en yaygın elektrokimyasal yöntemdir (Wang 2006, Zorluoğlu 2012).



Şekil 2.3. Dönüştümlü voltametri için uyarma sinyali

2.3.1.1. DV'de akım çeşitleri ve önemli parametreler

Diğer elektrokimyasal yöntemlerde olduğu gibi voltametrik çalışmalarda da kaynağına bağlı olarak isimlendirilen iki farklı akım vardır:

- i. **Kapasitif akım:** Çalışmalarda kullanılan çözücü-destek elektrolit moleküllerinin çalışma elektrodu çevresinde bulunan kısımları uygulanan potansiyel sonucunda bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörlerin elektriksel yüklenmeleri sonucu oluşan akıma kapasitif akım denir. Bazı kaynaklarda artık akım olarak da isimlendirilen bu akımın elektron transferi ile ilgisi yoktur. Kullanılan çözücü-destek elektrolit çeşidi ve derişimi, sıcaklık, çalışma elektrodu cinsi ve yüzey alanı, pH ve tarama hızı gibi bazı deneysel parametrelerden etkilenir. Elektrokimyasal tayin yöntemi çalışmalarında bu akım bileşeninin minimum olması istenir.
- ii. **Faradayik akım:** Elektron aktarımı sonucu oluşan akımdır. Elektrokimyasal çalışmalarda değerlendirilen ve değerlendirilmesi sonucu sistem ile ilgili termodinamik ve/veya kinetik bilgilerin elde edildiği akım çeşididir.

Dönüşümlü voltametride çalışma elektroduna uygulanan potansiyel için deneysel olarak kontrol edilebilecek farklı parametreler vardır. Bu parametreler aşağıda sıralanmıştır.

- **Başlangıç potansiyeli:** Çalışma elektroduna uygulanacak olan potansiyel taramasının başladığı potansiyel değeridir. Çalışmalarda başlangıç potansiyelinin elektron aktarımının olmadığı bir değer seçilmesi tercih edilir.
- **Dönme potansiyeli:** Potansiyel taramasının yönünün değiştirileceği (anodik yönden katodik yöne veya katodik yönden anodik yöne) potansiyel değeridir.
- **Bitiş potansiyeli:** Potansiyel taramasının sonlandırılacağı potansiyel değeridir. Bu değer incelenen özelliklere göre başlangıç potansiyeli ile aynı veya başlangıç potansiyelinden farklı bir değer olabilir.
- **Anodik tarama:** Başlangıç potansiyeline göre daha pozitif potansiyel değerine doğru yapılan potansiyel taramasıdır. Bu taramada olası yükseltgenme davranışları incelenir.
- **Katodik tarama:** Başlangıç potansiyeline göre daha negatif potansiyel değerlerine doğru yapılan potansiyel taramasıdır. Bu taramada olası indirgenme davranışları incelenir.
- **Tarama hızı:** Başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline kadar yapılacak olan potansiyel taramasında potansiyelin hangi hızda değişeceğini belirten parametredir. Tepkime mekanizmasının aydınlatılmasında oldukça önemlidir.

- **Segment:** Başlangıç potansiyelinden dönme potansiyeline kadar yapılan taramaya veya bu tarama sonucu elde edilen voltamograma segment denir.
- **Döngü:** Başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline kadar yapılan, genelde iki segmentten oluşan taramaya veya bu tarama sonucu elde edilen voltamograma döngü denir.

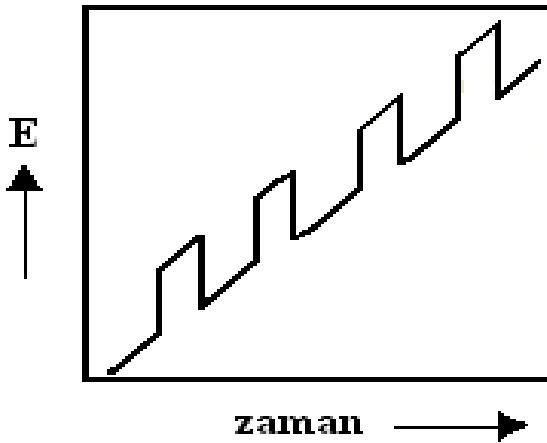
Bu parametreler kontrol edilerek sabit tarama hızında, uygulanan potansiyele karşı oluşturulan akım grafiğine volt-ampereogram (voltamogram) denilir (Scholz 2010).

2.3.2. Puls voltametri

2.3.2.1. Diferansiyel puls voltametri (DPV)

Elektroanaliz ve elektrokimyasal çalışmalarda kapasitif akımın faradayik akımdan ayrılması için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemlerde faradayik akımın kapasitif akıma oranı yüksektir. Bu çalışma elektroduna uygulanan pulsun ve uygulamadaki akımın ölçülme şekline kaynaklanmaktadır. Her bir pulsta iki ölçüm alınır. Birinci ölçüm puls uygulamadan hemen önce alınırken ikinci ölçüm ise puls bitmeden alınmalıdır. Net akım, son akım ile ilk akımın farkı alınarak bulunmakta ve yapılan fark alma işlemi kapasitif akımın yok edilmesi olarak bilinmektedir (Bard ve Faulkner 2001).

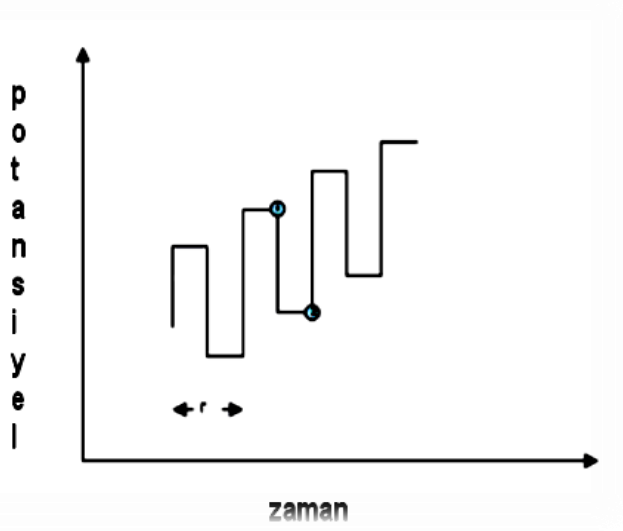
DPV, elektroaktif türlerin nicel analizi için en yaygın kullanılan elektroanalitik yöntemlerden biridir. Bu yöntemle analite bağlı olarak gözlenebilir sınırları 10^{-8} M'a kadar indirilebilmektedir (Wang 2000, Kaçar 2010).



Şekil 2.4. Diferansiyel puls voltametri için uyarma sinyali

2.3.2.2. Kare dalga voltametri (KDV)

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



Şekil 2.5. Kare dalga voltametri için uyarma sinyali

Şekil 2.5'de kare dalga voltametrisinde elde edilen basamaklı sinyal görülmektedir. Basamaklı sinyalde her basamağın boy ve puls periyodu eşit olup bu yaklaşık 5ms civarındadır.

Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} M olduğundan dolayı hem süresinin daha kısa oluşu hem de tayin sınırının düşük olmasından dolayı elektro analizde çok kullanılan bir yöntemdir (Skoog, West ve Holler 1996).

2.3.3. Sıyırma voltametri (SV)

Sıyırma voltametri yöntemiyle hem organik hem de anorganik maddelerin eser miktardaki tayinleri yapılabilmektedir. Bozucu etkisi olmadığından dolayı analiz aynı numuneyle defalarca yapılabilir. Elektroanalitik yöntemler arasında en duyarlı yöntem sıyırma yöntemidir (Bard 2001, Zorluoğlu 2012).

Sıyırma yöntemi farklı şekillerde uygulanabilir: Analizi yapılacak madde seyreltik çözeltilerden indirgenme veya yükseltgenme suretiyle elektrot yüzeyinde biriktirilir. Bu basamakta bir elektrokimyasal ön deriştirme işlemi yapılmaktadır. Bu basamak, birçok yöntemde çözücü ekstraksiyonuna karşılık gelen bir işlem olarak görülebilir.

Elektroda uygulanan sabit potansiyelde çözeltideki madde indirgenerek veya yükseltgenerek elektrot yüzeyinde çözünmez duruma dönüştürülmekte, daha sonra elektroda pozitif (anodik) veya negatif (katodik) yönde potansiyel taraması uygulanmakta ve elektrot yüzeyinde toplanan madde yükseltgenme veya indirgenme ile elektrot yüzeyinden sıyrılarak

tekrar çözeltiye aktarılmaktadır. Bu esnada oluşan akım ölçülerek madde miktarı tayin edilmektedir. Diğer sıyırma tekniği adsorptif sıyırma voltametridir. Bu teknikte çözeltide bulunan madde sabit bir potansiyelde herhangi bir kimyasal ve elektrokimyasal değişikliğe uğratılmadan doğrudan doğruya elektrot yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla toplanır.

Elektrot yüzeyinde toplanan eser miktardaki madde, potansiyel taraması ile indirgenmeye veya yükseltgenmeye uğratarak oluşan akım ölçülmektedir. Bu yöntem voltametri de dezavantaj olarak bilinen adsorpsiyonu avantaj haline getirmiştir (Bard 2001, Wang 2000).

2.3.3.1. Anodik sıyırma voltametrisi (ASV)

Sıyırma adımı, elektrot potansiyeli anodik yönde ilerlerken elektrotta birikmiş olan madde, yükseltgenme potansiyeline ulaştığında bir akım oluşturur. Sıyırma veya yükseltgenme akımı elektrot potansiyelinin fonksiyonu olarak okunmaktadır. Sıyırma akımı, maddenin elektrottaki ve çözeltideki derişimi ile doğru orantılıdır (Bard ve Faulkner 2001).

2.3.3.2. Katodik sıyırma voltametrisi (KSV)

Katodik sıyırma voltametrisiyle anyonlar ve moleküller tayin edilebilmektedir. Katodik sıyırma voltametrisinde biriktirme basamağında, elektrot üzerinde toplama basamağında gerçekleşen anodik reaksiyon, maddenin iyonlarına yükseltgenmesidir. Oluşan maddenin iyonları da çözünmeyen tuzları halinde elektrot yüzeyi üzerinde çöker. Gerekli anodik toplama potansiyeli, ilgili anyonlara bağlıdır.

Bütün katodik sıyırma işlemlerinde, toplama basamağında elektrot yüzeyi üzerinde çözünmeyen bir tabaka oluşur. Eğer çok madde toplanırsa sıyırma piki bozulabilir. Bu nedenle KSV, çok seyreltik çözeltilerin analizi için uygun bir yöntemdir (Brainina 1972). Ayrıca katodik sıyırma voltametrisi yönteminin, selenyum ve arsenik metalleri için çok duyarlı olduğu kanıtlanmıştır (Saltman 1983, Kaçar 2010).

2.3.3.3. Adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV)

Adsorptif sıyırma voltametrisi, maddelerin analizlerinde son bir kaç yıldır önemli derecede ilgi çekmiş yöntemlerden biridir. Bu ilginin nedeni yöntemin mükemmel duyarlılığı, doğruluğu, hızı ve düşük maliyetidir. Ayrıca bu yöntemle hem inorganik hem de organik maddelerin tayini yapılabilmektedir.

Voltametrik yöntemlerde adsorpsiyon genel olarak iyon ya da moleküllerin elektrot yüzeyine tutunmasını ifade eder. Bu tutunma olayı voltametrik ölçüm sonuçlarını etkiler ve genelde ASV'de bu olaya istenmeyen durum gözüyle bakılır ve olmaması istenir. Son yıllarda

yapılan çalışmalar, türlerin elektrot yüzeyine kontrollü adsorpsiyonunun bir avantaj olarak kullanılabilceğini göstermiştir.

Adsorptif sıyırma voltametrisinde, ön deriştirme, karıştırılan bir çözeltiden elektrot yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla sağlanır. Bu yöntem ile elektroaktif ve yüzey aktif özellikte birçok önemli madde hassas olarak tayin edilebilmektedir. Ayrıca çalışma elektrodunun yüzeyi modifiye edilerek, kimi bileşikler için adsorpsiyon daha seçimli hale getirilebilir. Çalışma koşulları optimize edilerek uygun çözücü, pH, iyon şiddeti, karıştırma hızı ve sıcaklıkta çalışılır.

Kalibrasyon grafiğinin doğrusal aralığı ön deriştirilen bileşiğin büyüklüğüne, hidrofobik özelliğine ve elektrot yüzeyine yönelimine göre değişir. Genellikle de seyreltik çözeltilerde ve kısa sürelerde biriktirme uygulanır. Bu da analizler için tercih edilir bir durumdur (Wang 2000, Kaçar 2010).

2.3.4. Polarografi

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

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

Maddenin yükseltgenmesinden veya indirgenmesinden kaynaklanan bir akım artışı olur ve sonra akım sabit hale gelir. Bu akıma da sınır akımı denir. Sınır akım ile artık akım arasındaki yükseklik dalga yüksekliğidir. Dalga yüksekliği elektroaktif maddenin derişimi ile doğrusal olarak artar. Bu özellik nedeniyle polarografi nicel analizlerde kullanılır (Yılmazgüç 2008).

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

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

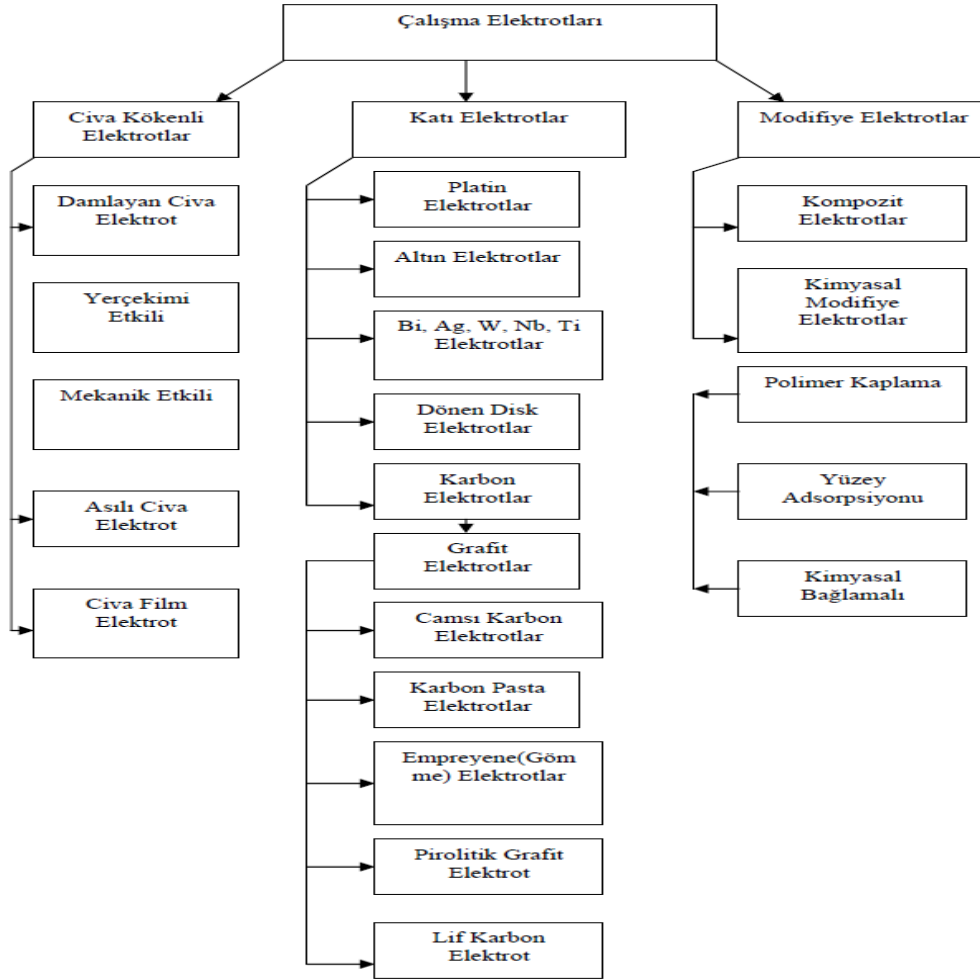
- 1. Konveksiyon:** (Mekanik karıştırma ve ısısal karıştırma) Çözeltinin sabit hız ve sıcaklıkta homojen olarak karıştırılmasıyla gerçekleşir.
- 2. Elektrostatik çekim (iyonik göç):** Uygulanan potansiyelin elektrotları yüklemesi sonucu, elektrotların çözeltilerdeki iyonları elektrostatik kuvvet uygulayarak çekmesi veya itmesidir.
- 3. Difüzyon:** Maddenin derişik olduğu bölgeden(ana çözeltilerden), seyreltik olduğu bölgeye (elektrot yüzeyine) hareketidir.

2.4. Voltametri de Kullanılan Çalışma Elektrotları

Voltametri de kullanılan çalışma elektrotları, elektroaktif türün voltametrik tayininde en önemli araçtır. Çalışma elektrotlarının polarlanabilmesi için yüzey alanları küçüktür ve çok az miktarda elektroaktif tür ile reaksiyona girerler. Bunun sonucunda aynı çözeltilerde birden fazla voltamogram alınabilir. Çalışma elektrotları cıva kökenli elektrotlar, katı elektrotlar, modifiye elektrotlar, dönen elektrotlar olarak sınıflandırılabilirler.

Her bir çalışma elektrodun potansiyel çalışma aralığı farklıdır ve bu çalışma aralığı elektrodun türüne, pH'a, destek elektrolite ve çözücü türüne bağlıdır. Asitlik arttıkça katodik bölge daralır. Metal çalışma elektrotları ile kompleks oluşturucu türlerin varlığında ise anodik bölgede daralma olur. **Şekil 2.6**'da voltametri de kullanılan elektrotların sınıflandırılması görülmektedir (Yeniğül 2001).

Çalışma elektrotlarının kullanıldığı potansiyel aralık, sulu çözeltilerde pozitif potansiyel sınır, suyun moleküler oksijen vereceği şekilde yükseltgenmesi sonucu oluşan akım ile belirlenirken, negatif potansiyel sınırı ise suyun moleküler hidrojen verecek şekilde indirgenmesi sonucu oluşan akım ile belirlenir. Çalışma potansiyel aralığı, suya göre daha güç indirgenen veya yükseltgenen çözücülerin kullanılması, uygun bir elektrot ve destek elektrolit ile genişletilebilir.



Şekil 2.6. Voltammetride kullanılan elektrotların sınıflandırılması

2.5. Elektrokimyanın Temel Kavramları

Bu bölümde elektrokimyadaki temel kavramlardan, elektrot reaksiyonlardan ve hücre kimyasından bahsedilmiştir. Elektrot tepkimeleri, iletken ya da yarı iletken bir madde ile çözelti-ara yüzeyinde elektron aktarımı yoluyla meydana gelen elektrokimyasal değişimlerdir. Elektrot tepkimelerinde anot ve katot olmak üzere iki çeşit elektrot vardır.

Anot: Çözeltiden elektroda elektron aktarımının olabildiği yani yükseltgenmenin gerçekleştiği elektrottur. Katot: Elektrottan çözeltiye elektron aktarımının olabildiği yani indirgenmenin gerçekleştiği elektrottur.

Anot tepkimelerinde akım negatif yönlü, katot tepkimelerinde ise akım pozitif yönlü olarak kabul edilmektedir. Elektrot yüzeyinde değişikliğe uğrayan elektroaktif yapıya sahip organik veya inorganik maddeler çözücü yardımıyla çözülmüş halde ya da elektrot yüzeyine kaplı ince bir film şerit halinde bulunabilmektedir. Tepkimelere elektrodun kendisi de katılabilmektedir.

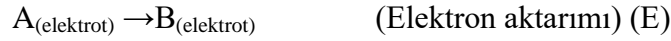
2.6. Elektrot Reaksiyon Çeşitleri

“A” ile gösterilen bir madde elektron aktarımı yoluyla “B” maddesine dönüşmesi elektrot-çözelti ara yüzeyinde;

- a. “A” maddesinin çözeltilerden elektrot yüzeyine taşınmasıyla,



- b. “A” maddesinin elektrot yüzeyinde indirgenmesi için elektrot aktarımı,



- c. oluşan “B” maddesinin çözeltiye taşınması

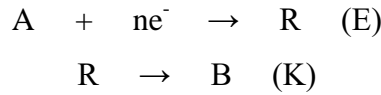


olayları gerçekleşebilir (Bard ve Faulkner 2001, Zorluoğlu 2012).

2.6.1. Kimyasal reaksiyonlar

Elektron aktarımı yoluyla oluşan ürünler kararlı olmayabilirler. Kararlı olmayan elektroaktif ürün ara ürüne dönüşmekte ve daha sonra kimyasal tepkime yardımıyla son ürüne dönüşmektedir.

Organik maddelerden kimyasal basamakla genellikle birkaç ürün oluşurken, inorganik maddelerden genellikle bir ürün oluşmaktadır.



Ara ürün olan “R” maddesinin son ürün olan “B” maddesine dönüşü 3 şekilde gerçekleşebilir:

- Ara ürün olan “R” maddesi “B” maddesine, elektrot yüzeyine adsorplanmış halinden uzaklaştıktan sonra çözeltideki homojen tepkimeyle,
- Ara ürün olan “R” maddesi “B” maddesine elektrot yüzeyindeki “R” maddesinin heterojen tepkimesiyle,
- Ortamda bulunan başka bir reaktifte tepkimeye girerek “B” ye dönüşebilmektedir.

Bu tür tepkimelerde tepkime hızını kimyasal basamak belirlemektedir.

2.6.2. Adsorpsiyon kontrollü mekanizmalar

Adsorpsiyon; çözeltide bulunan molekül ve iyonların elektrodun yüzeyine farklı yollarla tutunması olarak tanımlanmaktadır. Adsorpsiyon sonucu elektrot yüzeyine bağlanan iyon ve moleküller ile elektrot yüzeyi arasında farklı türde bağlar oluşmaktadır. Genellikle beklenilmeyen elektrokimyasal davranışlar adsorpsiyon olayıyla açıklanmaktadır. Elektroaktif türlerin adsorplanması tepkime kinetiğinde değişmeye ve tepkime hızının azalmasına neden

olmaktadır. Bu değişiklik elektron aktarımını sağlayan aktif yüzeyin azalmasından ve elektron aktarımının elektrot yüzeyinden uzakta meydana gelmesinden kaynaklanır.

Elektroaktif maddelerin adsorplanması ortamda gerçekleşen elektron aktarımının termodinamiğinde değişikliklere yol açmaktadır. Elektrot yüzeyine adsorbe olan türler yüksüz organik moleküller, metal katyonlar, inorganik türler şeklinde bulunabilmektedirler.

Anyonların adsorpsiyonu elektrodun pozitifliği arttıkça artmakta yüksüz organik moleküllerin adsorpsiyonu ise hidrofobik özellik arttıkça artmaktadır (organik maddelerde bulunan pi elektronları ve bağ yapmamış elektron çifti bulunduran azot, molekülün adsorpsiyonunu artırır).

Yüksüz organik moleküller genellikle yüksüz elektrotlara adsorbe olmaktadır. Elektrot yüzeyi farklı yüklerle yüklendikçe polar su molekülleri elektrot ile etkileşmekte ve ortamda ki yüksüz organik moleküller su molekülleriyle yer değiştirmektedir (Zorluoğlu 2012).

2.7. Karbon Pasta Elektrot (KPE)

Grafit tozu ve bağlayıcı olarak çeşitli mineral yağlarının karıştırılması ile hazırlanan karbon pasta elektrotlar çeşitli elektrotların, sensörlerin ve dedektörlerin hazırlanmasında kullanılan en yaygın elektrot materyallerinden biridir. İlk kez 1958 yılında Ralph Norman Adams ve çalışma grubu tarafından geliştirilmiştir. Karbon pasta elektrotların en önemli bileşeni yüksek saflıkta ve µm boyutlarında partiküllere sahip grafit tozudur. Elektrodun diğer bir bileşeni ise inert ve elektroaktif, yüksek viskozite ve düşük volatiliteye sahip bir pasta bağlayıcı sıvıdır.

Karbon pastaların hazırlanmasında genellikle parafin, nujol ve uvasol gibi yağlar kullanılır. Nanoteknolojinin gelişimi ile birlikte karbon pasta elektrotların kullanımı da yaygınlaşmıştır. Özellikle çeşitli nanoyapıların kolayca modifiye edilmesi için karbon pasta elektrotlar oldukça uygun matrislerdir.

Son yıllarda önemli ölçüde ilerleme gösteren nanopartikül modifiyeli karbon pasta elektrotlar aşağıda belirtildiği gibi birçok avantaja sahiptir (Santos vd. 2007).

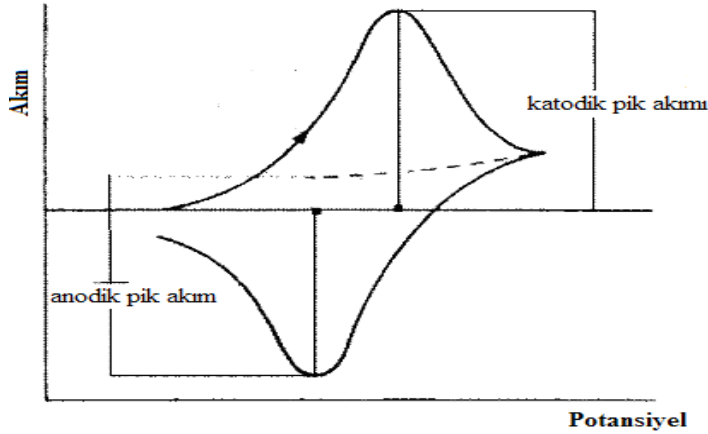
- Hazırlaması oldukça pratik ve hızlıdır.
- Pasta yüzeyi kolayca yenilenebilir.
- Düşük maliyetlidir.
- Birçok biyosensör materyalini bir arada içerebilir.

Bu çalışmada ZnO nanopartikülleri ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot (KPE) kullanılmıştır.

2.8. Mekanizma Çeşitleri

2.8.1. Tersinir mekanizmalar

Tersinir tepkimelerde yüzeyde elektron aktarım hızlı gerçekleşmektedir. Bir tepkime yavaşsa ve potansiyel tarama hızı arttırılırsa tepkimede kararsız hal difüzyonu artar.



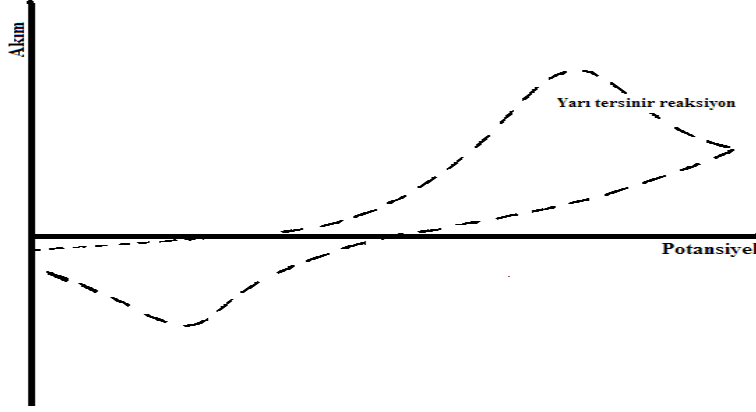
Şekil 2.7. Tersinir bir reaksiyon için alınan dönüşümlü voltamogram

Dönüşümlü voltametri çalışmalarından yararlanılarak bir tepkimenin tersinir olup olmadığının belirlenmesinde aşağıdaki kriterler kullanılır:

- $E_p^k - E_p^a = 59/n$ mV veya $E_p - E_{p/2} = 57/n$ mV'tur.
- E_p tarama hızı ile değişmez.
- $I_p^a / I_p^k = 1$ 'dir ve bu oran tarama hızıyla değişmez.
- $I_p/v^{1/2}$, tarama hızıyla değişmez.
- Dalga şekli tarama hızıyla değişmez.

2.8.2. Yarı tersinir tepkimeler

Yarı tersinir tepkimelerde akım, difüzyon hızı ve elektron aktarım hızı ile birlikte kontrol edilir. Redoks çiftinin elektrot yüzeyindeki derişimlerinin değişmesinde difüzyon ve kinetik olaylarının her ikisi de etkilidir.



Şekil 2.8. Yarı tersinir bir reaksiyon için alınan dönüşümlü voltamogram

Bu sebeple difüzyon ve kinetik eşitlikleri birlikte çözülür. Bu tür mekanizmalarda sistem tersinir ve tersinmez mekanizmalar arasında davranış sergiler (Zorluoğlu 2012).

Bir tepkimenin yarı-tersinir olduğunun belirlenmesinde de dönüşümlü voltametri çalışmalarından elde edilen verilerden yararlanır. Bu amaçla, aşağıdaki kriterler incelenir (Bard and Faulkner 2001).

Yarı-tersinir bir sistem için:

- $\dot{I}_p/v^{1/2}$ tarama hızına bağlı değildir.
- $\dot{I}_p^a / \dot{I}_p^k = 1$ 'dir.
- E_p^k tarama hızı ile değişir. Bu değişme genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.
- $E_p^k - E_p^a$ farkı düşük tarama hızlarında $59/n$ 'e yaklaşır. Yüksek tarama hızlarında bu değerden daha büyüktür ve tarama hızı ile artar.

2.8.3. Tersinmez tepkimeler

Elektrokimyasal olarak bir elektrot tepkimesinin tersinmez olduğunu gösteren ilk gözlem dönüşümlü voltametri çalışmalarında ters tarama yönünde herhangi bir pikin gözlenmemesidir.

Bunun yanında;

- $E_p^a - E_p^k > 59/n$ mV veya $E_p - E_{p/2} = 48/n$ mV'tur.
- E_p tarama hızı ile değişir. Tarama hızı artırıldıkça anodik pikler daha anodik potansiyele, katodik pikler ise daha katodik potansiyele kaymaktadır.

2.9. Kaynak Araştırması

Karvedilol, ağız yoluyla alındıktan sonra hızla emilir. Bir-iki saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır. Karvedilol hızla ve büyük oranda metabolize edilir, idrarda ana ilacın % 2'si tespit edilebilir. Karvedilol, hemen hemen sadece karaciğer tarafından metabolize edilir. Bu metabolitlerin yaklaşık % 60'ı safraya salınır ve safra yolu ile atılır.

Literatürlerde CAR'ın tayini ile ilgili spektrofotometrik, kromatografik ve voltametrik yöntemler bulunmaktadır. CAR ile ilgili çalışmalar kısaca aşağıda özetlendi.

Xu ve arkadaşları (2005) asidik, alkali ortamların ve organik çözücülerin karvedilolün floresans spektrumu üzerine etkilerini incelemiştir. Farmasötik dozaj formundan karvedilolün miktar tayini için basit, hızlı ve oldukça duyarlı bir yöntem geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Bağlı floresans şiddeti 254 nm uyarma dalga boyu ve 356 nm emisyon dalga boylarında ölçülmüştür. Karvedilolün tayini için pH, bekleme süresi ve iyon etkisini incelemiştir. Bağlı floresans şiddetinin karvedilol derişimine karşı grafiğinde 0.50-270 ng/ml aralığında doğrusallık saptanmıştır. Korelasyon katsayısı 0.9998, bağlı standart sapma % 2,31 tayin limiti 0,19 ng/ml olarak bulunmuştur.

Wen ve arkadaşları (2004) karvedilolü β -siklodekstrinle inklüzyon kompleksine alarak floresans spektrometrisiyle ve ¹H NMR, ¹³C NMR ile tayin etmişlerdir. Katı inklüzyon kompleksinin özellikleri IR spektroskopisi, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve elemental analiz ile incelenmiştir.

Shadjou ve arkadaşları (2011) atenolol, karvedilol ve propanololün elektrokimyasal davranışını bakır-oksit modifiye karbon pasta elektrot üzerinde araştırmışlardır. Bakır-oksit modifiye karbon pasta üzerinde BR tamponunda dönüşümlü voltametri ve kronoamperometri tekniklerini kullanarak çalışmışlardır. Atenolol, karvedilol ve propanololün doğrusal çalışma aralığı sırasıyla 12-96, 5-37 ve 10-104 μ M olarak bulunmuştur. Atenolol, karvedilol ve propanol için elde edilen tayin alt sınırı ise sırasıyla 7,11 9,43 ve 8,33 μ M dır. Geliştirilen yöntem insan serum numunesinde madde tayini kullanılmıştır.

Arfaj ve arkadaşları (2007) tris (2,2 bipyridil) rutenyum (II), KMnO_4 ve sülfürik asitli ortamda karvedilol tayini için kemilüminesans yöntemini geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde elde edilen doğrusal çalışma aralığı 0,04–1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($9,8 \times 10^{-8} - 2,5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gözlenebilme sınırı ise 0,025 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($6,2 \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) olarak bulunmuştur. Yöntem tabletlerde ve insan serumunda karvedilol'un belirlenmesi için başarıyla uygulanmıştır.

Machida ve arkadaşları (2003) karvedilol ve karvedilol M21-aglikonun plazmadaki miktarını elektrokimyasal dedektörlü HPLC yöntemi kullanarak tayin etmişlerdir. Tayin alt tayin sınır

her iki analit için de 0,10 ng/ml bulunmuştur. Karvedilol ve M21-aglikonun gün içi tekraredilebilirliği sırasıyla % 6,1 ve % 6,7'dir. Tayin alt sınırı klinik kullanım için yeterli düzeyde görülmüştür.

Xiao ve arkadaşları (2005) karvedilol ve ampisilin sodyumu aynı anda, herhangi bir ayırma işlemi yapmaksızın senkronize florimetri yöntemini kullanarak tayin etmişlerdir. Karvedilol ve ampisilin sodyumun emisyon spektrumlarının kısmi olarak örtüşmesi nedeniyle florimetrik yöntemle doğrudan tayin edilememektedir. Senkronize floresans yöntemi ile $\Delta\lambda = 80$ nm seçildiğinde her iki etken maddenin aynı anda tayinine olanak sağlamaktadır. Karvedilol ve ampisilin sodyumu kalibrasyon grafiklerinde sırasıyla, 0,005-0,1 ve 5-70 mg/l derişim aralığında doğrusallık saptanmıştır. Tayin alt sınırı karvedilol ve ampisilin sodyum için sırasıyla 1 ng/ml ve 1 mg/l bulunmuştur. Bağlı standart sapma karvedilol ve ampisilin sodyum için sırasıyla % 2,41 ve 1,61, geri kazanımlar ise karvedilol için % 96-103 arası; ampisilin sodyum için % 98-105 arasında bulunmuştur.

Radi ve arkadaşları (2004) antihipertansif karvedilolün pH 2,0-11,0 aralığında camısı karbon elektrotla doğrusal taramalı ve diferansiyel puls voltametriyle elektrokimyasal yükseltgenmesini incelemişlerdir. pH 8,0 Britton-Robinson tamponunda (BR) diferansiyel puls voltametriyle miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon aralığı olarak 0,25-10,0 mg/l kullanılmış, tayin limiti 0,10 mg/l bulunmuştur. Bu yöntemde maddenin yükseltgenme mekanizmasına açıklık getirilmemiş tayin yöntemi üzerinde yoğunlaşmıştır. Geliştirilen yöntem tablet dozaj formuna uygulanmıştır.

Hokama ve arkadaşları (2005) serumda karvedilolü tayin etmişlerdir. Çalışmada katı faz ekstraksiyonu sonrasında C18 kolon, floresans dedektörü kullanarak basit, hızlı ve duyarlı bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geri kazanım çalışmalarında karvedilol seruma ilave edilmiş ve % 97,6-101,44 arası bulunmuştur. Plazma tayin alt limiti 3,6 ng/ml'dir. Gün içi ve günler arası tekraredilebilirliği sırasıyla % 2,7 – 7,5 ve % 2,6 – 7,4 arasında bulunmuştur.

Doğan ve Özkan (2005) karvedilolün yükseltgenme davranışını camısı karbon elektrot üzerinde ve alkol-su karışımı ortamda (20/80, metanol/su, pH aralığı 1,0-12,0), dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametri tekniklerini kullanarak çalışmışlardır. Deneyler, destek elektrolit yapısının, pH'ın ve potansiyel tarama hızının reaksiyon üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla BR, fosfat, asetat tamponları ve 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 M H₂SO₄ destek elektrolitleri içerisinde gerçekleştirilmiştir. Molekül, bütün pH değerlerinde tersinmez olarak iki yükseltgenme piki vermiştir. Bu iki pik sırasıyla difüzyon ve adsorpsiyon kontrollü bulunmuştur. İkinci yükseltgenme piki kullanılarak camısı karbon üzerinde, adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametri ve adsorptif sıyırma kare dalga voltametri yöntemleri

karvedilolün miktar tayini için seçilmiştir. Karvedilolün biriktirme işleminin optimizasyonunda, en iyi ortam 0,2 M H₂SO₄ çözeltisi ve 275 saniye biriktirme zamanı saptanmıştır. İki voltametik metot için karvedilolün saf maddesinde 2x10⁻⁷- 2x10⁻⁵ M derişim aralığında; insan serumu numunesinde 2x10⁻⁷-1x10⁻⁵ M derişim aralığında doğrusallık sağlanmıştır. Yöntemler karvedilolün farmasötik dozaj formlarına ve insan serumundan tayinine başarıyla uygulanmıştır. Tabletlerdeki katı maddelerden ve biyolojik sıvılardaki endojen maddelerden herhangi bir elektroaktif girişime rastlanmamıştır.

Clohs ve arkadaşları (2001) serumdaki karvedilol enantiomerlerini kapiler elektroforez yöntemiyle, kiral seçici ajan olarak siklodekstrin kullanarak analiz etmişlerdir. Birçok siklodekstrin türü denenmiştir. En iyi sonuç tampon içinde 10 mM hidroksipropil-β-siklodekstrin kullanılarak elde edilmiştir. Elektroforetik şartlar optimize edilmiş ve yöntem serumdaki karvedilol enantiomerleri için valide edilmiştir. Serumdaki her enantiomer için 50-4000 ng/ml derişim aralığında doğrusallık saptanmıştır.

Mauer ve arkadaşları (2004) sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisiyle karvedilol dahil 22 beta blokörün tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmalarda katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmış ve yöntem valide edilmiştir.

Gannu ve arkadaşları (2007) insan serumundaki karvedilolün miktar tayini için ters faz sıvı kromatografisini kullanmışlardır. UV dedektör ve 238 nm dalga boyu ile çalışılmıştır. Analit, önceden 300 µl 0,1 N NaOH ilave edilmiş serum numunelerinden n-hegzan ve diklorometan karışımı (70/30% h/h) ile ekstrakte edilmiştir. Kromatografik ayırım, Kromasil KR 100 5C8 kolon ve hareketli faz olarak akış hızı 1 ml/dk olan asetonitril, 15 mM H₃PO₄ (37/63) ve % 0,25 trietilamin karışımı kullanılarak yapılmıştır. Kalibrasyon doğrusu 5-500 ng/ml aralığında doğrusaldır. Yöntem valide edilmiş ve farmakokinetik çalışmalara başarıyla uygulanmıştır.

Jouyban ve arkadaşları (2014) serumda karvedilol analizi için kapiler elektroforez yöntemini kullanarak tayin etmişlerdir. 20 °C sıcaklıkta ve 200-350 nm dalga boyu aralığında çalışmışlardır. Metanol/etanol karışımı (65/35 % v/v) içerisinde çözünmüş 80 mM asetat tamponu kullanılmıştır. Kullanılan yöntem için doğrusal çalışma aralığı 240-700 µg.ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı ise sırasıyla 5,01 ve 11,40 µg.ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem insan serumunda karvedilol tayini için kullanılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

Kullanılan cihazlar, cihaz donanımları, ilaç etken madde, çözeltiler, çözeltilerde kullanılan kimyasal maddeler, çözeltilerin hazırlanması, numunelerin hazırlanması, analizde kullanılan teknikler hakkında bilgiler bu bölümde verilmiştir.

3.1. Cihazlar

CAR'ın elektrokimyasal davranışının incelendiği ZnO nanopartikülü ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal çalışmalar; DROP-SENSE (Şekil 3.1.) marka elektrokimyasal çalışma sistemi ile yapıldı. Bu sisteme BAS C3 (Şekil 3.2.) elektrot hücre standı bağlanarak tüm deneyler bu hücrelerde gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. DROP-SENSE çalışma ünitesi



Şekil 3.2. Çalışmanın yapıldığı BAS C3 elektrot hücre standı

3.2. Kullanılan Elektrotlar

Deneylerde çalışma elektrotu olarak ZnO nanopartikülü kullanılarak modifiye edilmiş karbon pasta elektrot kullanıldı. Karşıt elektrot olarak 0,5 mm çapında Pt tel (BAS MW - 1032), referans elektrot olarak Ag/AgCl referans elektrodu (BAS-MF 2052 RE-5B) kullanıldı. Çalışmalarda kullanılan Ag/AgCl referans elektrodu, kullanılmadığı zamanlarda 3,0 mol.L⁻¹ KCl çözeltisinde bekletilmiştir.

3.2.1. Modifiye edilmiş karbon pasta elektrotun hazırlanması

Modifiye edilmiş karbon pasta elektrotun hazırlanması için 12,5 mg spektroskopik saflıkta grafit tozu, 2,5 mg ZnO nanopartikülleri ve 10 µL sıvı parafin içeren karışım homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve ticari karbon pasta elektrot gövdesine (BAS MP-5023) yerleştirildi. Elektrot pürüzsüz bir kağıt üzerinde düzleştirildi.

3.3. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasal maddeler, temin edildikleri firmalar ve saflık dereceleri **Çizelge 3.1**'de verildi. Deneylerimizde kullanılan CAR etken maddesi Ankara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü tarafından temin edildi.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler	Temin edildiği firma	Saflık
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Sigma	% 99,8
Azot gazı (N ₂)	Yalız A.Ş.	% 99,99
Borik asit (H ₃ BO ₄)	Tekkim	% 99,8
Fosforik asit (orto-H ₃ PO ₄)	Sigma	% 85
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma	% 36,5-% 38
Metanol (CH ₃ OH)	Sigma	% 99
Sodyum hidroksit (NaOH)	Tekkim	% 99
Potasyum hidrojenftalat (C ₈ H ₅ KO ₄)	Merck	% 99

3.4. Kullanılan Diğer Cihaz ve Malzemeler

Ortamdaki oksijeni uzaklaştırmak amacıyla yüksek saflıktaki azot gazı kullanıldı. Çözelti hazırlarken kimyasal malzemelerin tartımı 0,1 mg hassasiyette tartım yapan Ohaus

marka elektronik teraziyle yapıldı. Karıştırma ve çözme işlemleri Ultrasonic Elma E30H marka ultrasonik banyoda yapıldı.

Sulu ortam çalışmalarında ortamın pH'ını ölçmek için HI2210 pH / ORP marka pH - iyon metre ve onun bağlı bulunduğu HI1131 cam pH elektrodu kullanıldı. pH iyonmetre pH'ları potasyum hidrojen ftalattan ve sodyum bikarbonattan hazırlanan ve pH'ları sırasıyla 4,0 ve 10,0 olan tampon çözeltilerle 25 °C kalibre edildi. Çözeltileri karıştırmak için Wisestir MSH-20D marka magnetik karıştırıcı kullanılarak yapıldı. Sulu çözeltiler, Elga Purelab Option DU2 marka saf su cihazından elde edilen bidestile su ile hazırlandı.

3.5. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

3.5.1. Destek elektrolit stok çözeltilerinin hazırlanması

Yapılan elektrokimyasal çalışmalarda destek elektrolit ortamı olarak pH 1,81 – 11,98 arasında kullanılabilen Britton-Robinson (BR) tamponu kullanıldı. Bu tampon hazırlanırken 2,29 mL asetik asit, 2,69 mL fosforik asit ve 2,47 g borik asit karıştırılıp bidistile su ile hacmi 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan BR tamponuna uygun hacimlerde 1 M NaOH ilave edilerek istenilen pH'a sahip çözeltiler elde edildi.

3.5.2. Standart CAR çözeltilerinin hazırlanması

Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan CAR çözeltilerinin hazırlanması amacıyla standart maddeden uygun miktarda tartıldı. Tartılan madde metanol ile belirli bir hacme tamamlanarak çözüldü. Elde edilen stok çözeltiden uygun miktarda alınarak hacmi % 20 MeOH - % 80 BR olacak şekilde 25 mL'ye tamamlandı Bunun sonucunda $1,04 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ stok çözelti elde edildi.

3.5.3. Farmasötik örneklerin ve biyolojik sıvıların hazırlanması

Farmasötik örnek olarak kullanılan Arlec tabletler Ali Raif İlaç sanayi tarafından üretilmiştir ve her tablette 12,5 mg CAR olduğu belirtildi.

İlaç tabletlerinin analizlere hazırlanması için 10 adet tablet alınmış ve her bir tablet ayrı ayrı tartılarak bir tabletin ortalama kütlesi hesaplandı. Ortalama kütlesi hesaplanan tabletlerin 10 tanesi porselen havanda ezilerek homojen toz haline getirildi. Toz haline getirilen tablet örneğinden ortalama bir tablet kütlesinde tartılarak 250 mL'lik ölçülü balona aktarıldı. Ölçülü balona 50 mL metanol ilave edildi ve çözünme için yaklaşık 1 saat ultrasonik banyoda bekletildi. Daha sonra bu karışıma santrifüj işlemi yapıldı ve çözelti kısmı 250 mL'lik balona aktarıldı ve üzeri BR tamponu ile 250 mL'ye tamamlandı. Elde edilen bu çözelti Arlec stok çözeltisidir. Stok çözeltiden hücrelere uygun hacimlerde alınarak çalışma çözeltileri hazırlandı.

Serum çözeltileri, sağlıklı ve CAR ilacını kullanmayan kişilerden alındı. Bu örnekler üzerine belirli oranlarda (1:1) metanol ilave ederek serum proteinleri çöktürüldü ve çöken proteinler santrüfuj yardımıyla ayrıldı. Proteinlerinden ayrılan serum örneğinden 1,0 mL alındı ve üzerine pH 8'e tamponlanmış metanol - BR (1:5) karışımı ilave edilerek serum çözeltisi hazırlandı.

3.5.4. Elektrokimyasal deneyler ve ölçümlerin yapılışı

CAR'ın % 20 metanol % 80 BR ortamında gerçekleştirilen dönüşümlü voltametri deneyleri için Bölüm 3.1'de belirtilen elektrokimyasal hücrelere deneyde kullanılacak çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrot yerleştirilerek üçlü elektrot sistemi oluşturuldu. Dönüşümlü voltametri deneylerinde çalışmada kullanılan destek elektrolit-çözücü sistemi için potansiyel penceresini belirlemek amacıyla, hücreye destek elektrolit çözeltileri kondu. Çalışmanın başlangıcında çözeltilerden 10 dakika, ölçüm aralarında 30 saniye azot gazı geçirilerek ortamdaki oksijenin uzaklaşması sağlandıktan sonra farklı potansiyel aralıklarında dönüşümlü voltamogramları alındı. Akımın pratik olarak çok düşük olduğu ve değişmediği potansiyel aralığı potansiyel penceresi olarak belirlendi.

CAR'ın kare dalga voltametri çalışmaları Bölüm 3.5'de belirtilen çözeltilerde gerçekleştirildi. Dönüşümlü voltametri çalışmalarında kullanılan aynı elektrokimyasal hücrede, daha önceden belirlenen potansiyel aralığında, KDV tekniğinin en önemli parametresi olan frekansı 15 Hz değerinde, kare dalga genliğini 25 mV değerinde ve basamaklı adım yüksekliğini 4 mV değerinde sabit tutarak voltamogramlar alındı.

Kare dalga anodik adsorptif sıyırma tekniğinde, Bölüm 3.5'de kullanılan çözeltiler ve Bölüm 3.1'de kullanılan elektrokimyasal sistem kullanılarak belirlenen potansiyel aralığında inert gaz geçişi kesildikten sonra biriktirme süresi 0-300 s, biriktirme potansiyeli 0,0 – 0,5 V aralığında değiştirilip voltamogramları kaydedildi. Pik akımının en yüksek, en uygun pik şeklinin elde edildiği süre ve potansiyel belirlendi.

3.6. Difüzyon Katsayısının (D) Hesaplanması

Difüzyon katsayısı, adsorpsiyon kontrollü elektrot tepkime mekanizmasına sahip maddeler için dönüşümlü voltametrideki tarama hızı verilerinden Eşitlik 3.1 ve Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\dot{I}_p (A) = 2,99 \times 10^5 n^{3/2} ACD^{1/2} v^{1/2} \quad (3.1)$$

$$\dot{I}_p (A) = 1,06 \times 10^6 n^2 ACD^{1/2} t^{1/2} \quad (3.2)$$

Burada; \dot{I}_p , pik akımını (A); n, aktarılan elektron sayısını (mol.elektron / mol.molekül); A, elektrot yüzey alanını (cm²); C, elektroaktif türün analitik derişimini (mol.L⁻¹, mol.cm⁻³); D, difüzyon katsayısını (mol.cm⁻²); ν , tarama hızını (V.s⁻¹); ve t, puls süresini (s) sembolize etmektedir.

3.7. Yüzey Kaplama Katsayısının (Γ) Hesaplanması

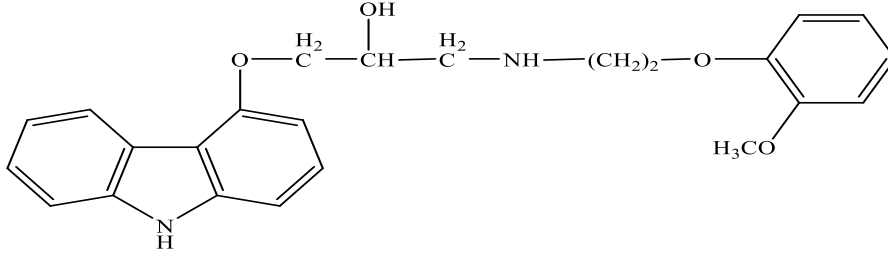
Yüzey kaplama katsayısı, dönüşümlü voltametri de yapılan tarama hızı çalışmalarından elde edilen sonuçların Eşitlik 3.3 ile değerlendirilmesi sonucu hesaplanmıştır:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma A \nu}{4RT} \quad (3.3)$$

Burada; \dot{I}_p , pik akımını (A); n, aktarılan elektron sayısını (mol.elektron⁻¹, mol.molekül⁻¹); Γ , adsorplanan maddenin yüzey kaplama katsayısını (mol.cm⁻²); F, Faraday sabitini (96485 C.mol⁻¹); A, elektrot yüzey alanını (cm²); ν , tarama hızını (V.s⁻¹) sembolize etmektedir (Wang 2006).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında, voltametrik yöntemler kullanılarak CAR'ın ZnO NP - KPE yüzeyindeki elektrokimyasal davranışı incelendi. Ayrıca söz konusu ilaç etken maddenin nicel analizi için voltametrik tayin yöntemi geliştirildi. Elde edilen bulgular aşağıda ayrıntılarıyla değerlendirildi.



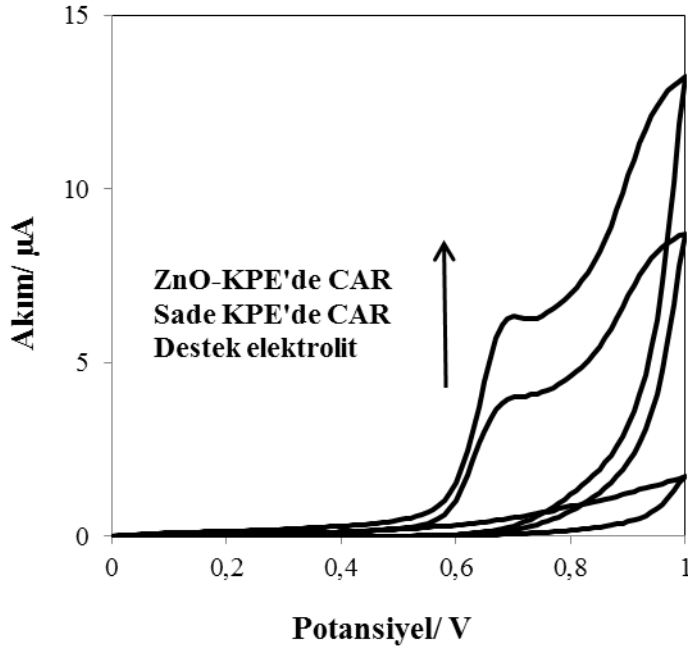
Şekil 4.1. CAR'ın molekül yapısı

İlk olarak CAR'ın dönüşümlü voltametri (DV) yöntemi ile elektrokimyasal davranışı incelendi. Daha sonra kare dalga anodik adsorptif sıyırma voltametrisi (KDAAdSV) yöntemi ile tayini için optimum deneysel koşulların (pH, biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi) belirlenmesi için çalışmalar yapıldı. Bu yöntemin geçerliliği için CAR içeren ticari tabletlerde ve serumda geri kazanım çalışmaları yapıldı. Geliştirilen yöntemin sonuçları kemilüminesans ve HPLC yönteminin sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bu çalışmadan elde edilen bulgu ve yorumlar aşağıda ayrıntılı bir şekilde verildi.

4.1. CAR'ın ZnO NP - KPE Yüzeyindeki Elektrokimyasal Davranışı

CAR moleküllerinin elektrokimyasal davranışını incelemeye önce % 20 MeOH - % 80 BR ortamı için potansiyel penceresi belirlendi. Bu amaçla MeOH-BR (1:5) karışımının pH 8,0'de dönüşümlü voltamogramı alındı (Şekil 4.2.) Şekilden de görüleceği gibi 0,0 – 1,0 V potansiyel aralığında çözücü sistemine ait herhangi bir yükseltgenme indirgenme pikine rastlanmadı. Bu nedenle çalışmaya uygun potansiyel penceresinin 0,0 V – 1,0 V olarak seçilmesine karar verildi. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ CAR çözeltisinin sade KPE ve ZnO ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot yüzeyindeki dönüşümlü voltamogramları çözücü sisteminin voltamogramı ile birlikte Şekil 4.2'de verildi. Şekil 4.2. incelendiğinde sade KPE ve ZnO NP-KPE yüzeyinde Ag/AgCl'e referans elektroduna karşı yaklaşık + 0.69 V civarında bir anodik pik gözlemlendi. ZnO NP-KPE yüzeyinde CAR'ın yükseltgenmesine ait pik akımlarının sade KPE yüzeyinde elde edilen pik akımlarından belirgin şekilde yüksek olduğu görüldü. Bu yüzden CAR'ın ZnO NP-KPE yüzeyindeki elektrokimyasal davranışı incelenerek CAR'ın

analizi için söz konusu elektrot yüzeyinde anodik sıyırma voltametrik yöntem geliştirilmesine karar verildi.

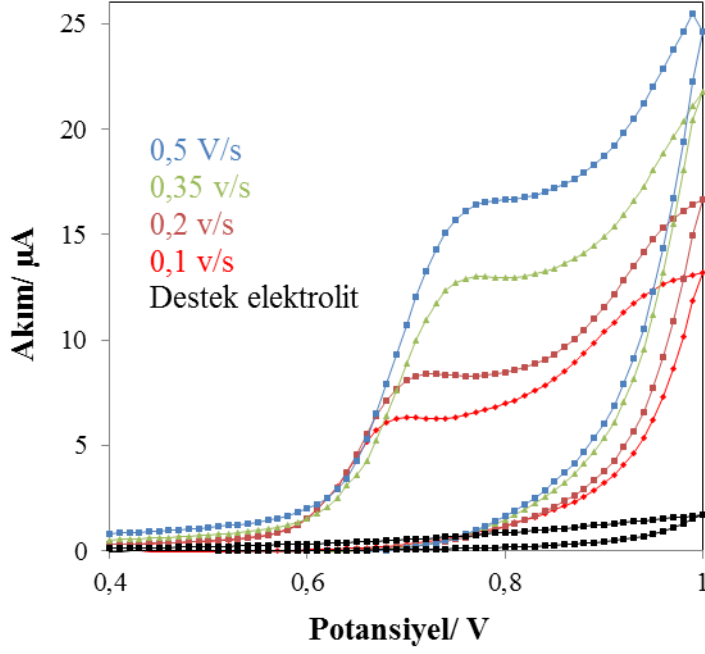


Şekil 4.2. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ CAR'ın, MeOH-BR (1:5) ortamında, ZnO-KPE'de elde edilen dönüşümlü voltamogramları (v : 0,1 V.s⁻¹, pH: 8,0)

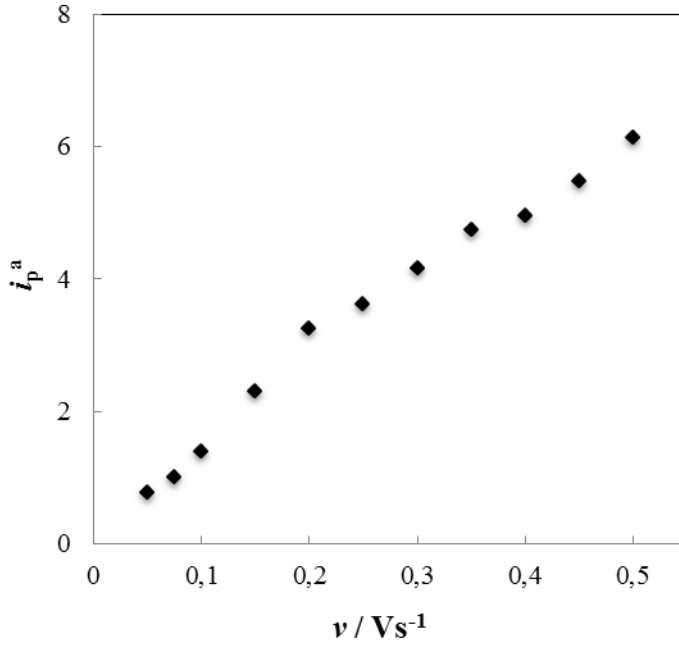
Elektrokimyasal yükseltgenme reaksiyonunun tersinir, yarı tersinir veya tersinmez olup olmadığına karar vermek için DV deney sonuçlarından yararlanıldı. **Şekil 4.2.** incelendiğinde 0,0 V - 1,0 V potansiyel aralığında +0,69 V'ta anodik pik gözlenirken yapılan geri taramada katodik pike rastlanmadı. Voltamogramda herhangi bir katodik pikin gözlenmemesi, elektrot yüzeyindeki reaksiyonun tersinir olmadığını düşündürdü.

Bu düşüncemizi desteklemek için farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltametri deneylerinden elde edilen voltamogramlardan yararlanıldı. **Şekil 4.3**'te görüldüğü gibi $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ CAR'ın MeOH-Br (1:5) karışımında ZnO NP-KPE'ta 0,05-0,5 V.s⁻¹ arasında farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları alındı. **Şekil 4.3**'te görüldüğü gibi tarama hızı arttıkça pik potansiyellerinin daha pozitif potansiyel değerlerine kayması yükseltgenmenin tersinir olmadığını gösterdi (Brett 2000).

Ayrıca, CAR'a ait yükseltgenme reaksiyonunun tersinir olmadığı, $i_p^a/v^{1/2}$ akım fonksiyonunun tarama hızıyla (v) değişimi incelenerek de doğrulandı (**Şekil 4.4**). Şekilde görüldüğü gibi, akım fonksiyonunun tarama hızına bağlı değişmesi sistemin tersinir olmadığını bir göstergesidir. (Bard and Faulkner 2001).



Şekil 4.3. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ CAR'ın, MeOH-BR ortamında (1:5) ZnO NP-KPE'de farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları

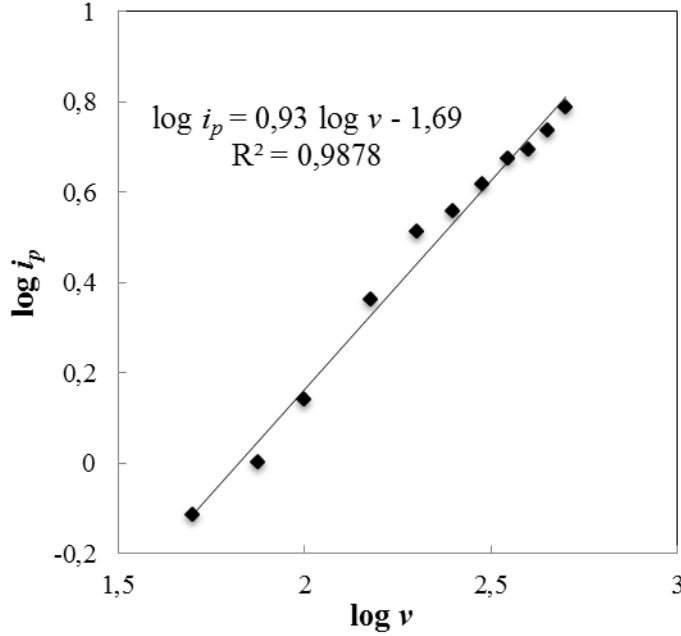


Şekil 4.4. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ CAR'ın farklı tarama hızlarından elde edilen akım fonksiyonunun ($i_p^a / v^{1/2}$) tarama hızıyla (v) değişim grafiği

Büyük moleküllü organik maddelerin önemli bir kısmı, elektrot yüzeyine adsorbe olur ve bu moleküllerin elektrot yüzeyine adsorbe olması elektrot reaksiyonlarını önemli ölçüde etkilemektedir. Çeşitli voltametrik teknikler için geliştirilmiş olan difüzyon eşitlikleri ise, adsorpsiyon olayı söz konusu olduğunda geçerli olmaz. Bu nedenle, maddelerin, elektrot yüzeyine adsorplanıp adsorplanmadığının belirlenmesi gerekir. Bu amaçla kullanılan en önemli

elektrokimyasal yöntemlerden biri, dönüşümlü voltametridir. CAR'ın elektrot yüzeyine adsorbe olup olmadığını araştırmak amacıyla, farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramların pik akımlarının tarama hızıyla değişiminden yararlanıldı. Bu amaçla, $\log i_p - \log v$ grafiği çizildi (Şekil 4.5.).

Pik akımının logaritmasının, tarama hızının logaritmasına karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen grafikteki doğrunun eğiminin yaklaşık 0,93 (1,0'e yaklaşması) bulunması maddenin elektrot yüzeyine kuvvetli adsorbe olduğunu düşündürdü (Şekil 4.5.).

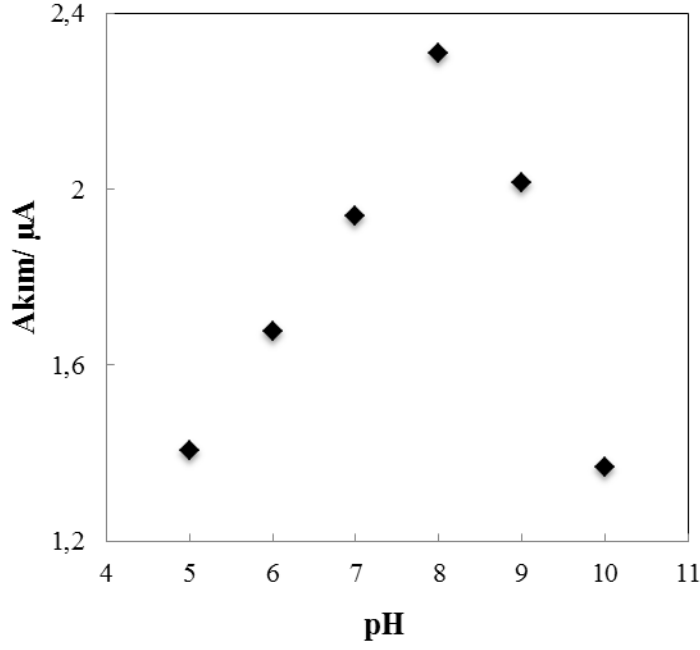


Şekil 4.5. $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ CAR'ın MeOH-BR (1:5) ortamında, ZnO NP - KPE'de farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen $\log i_p - \log v$ grafiği

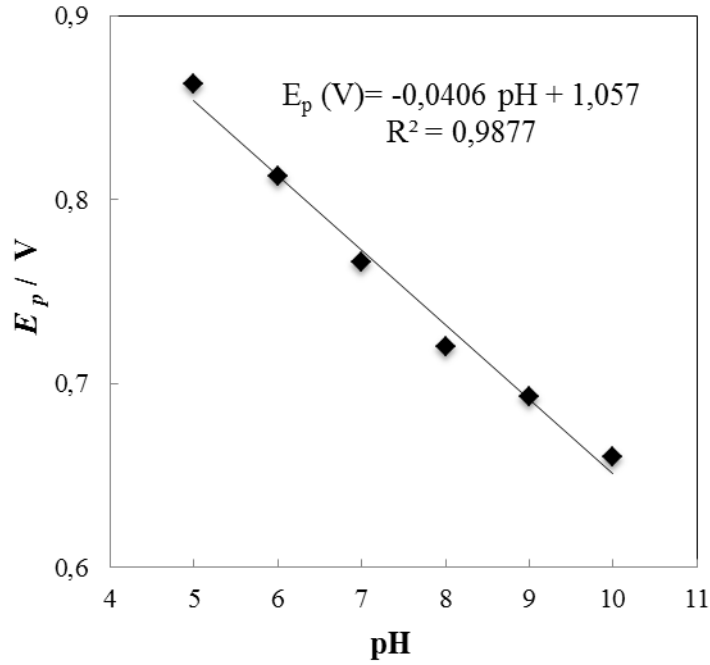
Çalışmaların yapıldığı ortamda bulunan H⁺ iyonları derişiminin bir ölçüsü olan pH değeri, elektrokimyasal sinyalin konumunu (E_p) ve şiddetini (i_p) değiştirebilen en önemli parametrelerden birisidir. Bu nedenle H⁺ iyonlarının CAR'ın elektrokimyasal reaksiyonuna olan etkisi incelendi. Bu çalışmalarda geniş bir pH aralığında (2,0-12,0) kullanılabilen BR tamponu tercih edildi. BR tamponu kullanılarak hazırlanan ve $1,01 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ CAR içeren çözelti çalışma hücresine konuldu. pH 5,0'den sonra sinyal alınmaya başladı. Bu yüzden pH 5,0-10,0 arasında CAR çözeltilerinin kare dalga voltamogramları alındı. Yapılan çalışmalar sonucunda pik akımlarının pH değerine etkisi incelendiğinde en yüksek pik akımının pH 8,0'de elde edildiği görüldü (Şekil 4.6.).

Pik potansiyelini pH ile değişimi incelendiğinde ise artan pH ile pik potansiyellerinin düzenli olarak katodik değerlere kaydığı gözlemlendi (Şekil 4.7.).

Pik potansiyelinin pH ile $E_p (V) = -0,0406 \text{ pH} + 1,057$ ($R^2 = 0,9877$) eşitliğine göre değiştiği belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. $1,01 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ CAR'ın ZnO NP-KPE'ta KDV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının pH ile değişim grafiği



Şekil 4.7. $1,01 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ CAR'ın, ZnO NP-KPE'de KDV yöntemi ile elde edilen pik potansiyelinin pH ile değişim grafiği

pH değişimine bağlı olarak pik potansiyelinin değişmesi CAR'ın yükseltgenme mekanizmasına hidrojen iyonunun (H^+) katıldığı şeklinde yorumladı (Wang 2006). CAR'ın

elektrokimyasal yükseltgenme reaksiyonuna eşlik eden proton sayısı Eşitlik 4.1'den hesaplandı.

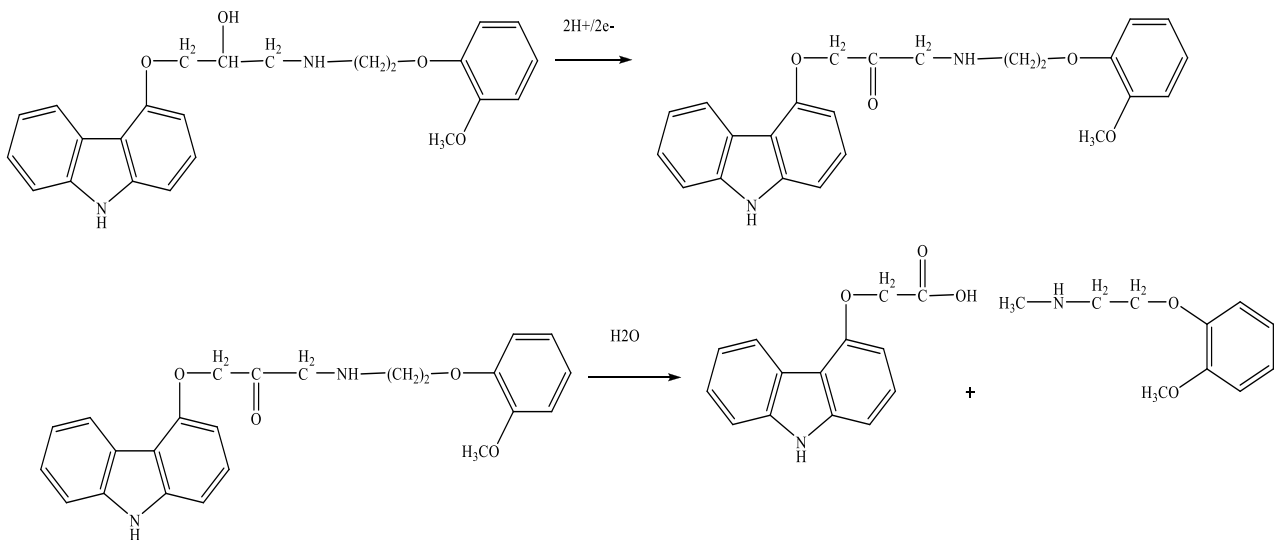
$$E_p = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Yük]}{[ind]} - \frac{n_H RT}{n_e F} \ln [H^+] \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte; E_p : Pik potansiyeli, (V); E^0 : Standart pik potansiyeli, (V); R: İdeal gaz sabiti, (J.mol⁻¹.K⁻¹); T: Mutlak sıcaklık, (K); n_H : Mekanizmadaki proton sayısı, (mol.proton⁻¹/mol.molekül⁻¹); n_e : Aktarılan elektron sayısı, (mol.elektron⁻¹/mol.molekül⁻¹); F: Faraday sabit, (C.mol⁻¹elektron⁻¹); (Yük): Yükseltgenmiş türün analitik derişimi, (mol.cm⁻³); (İnd): İndirgenmiş türün analitik derişimi, (mol.cm⁻³)'dir.

Eşitlik 4.1 ve pik potansiyeli-pH grafiğinin (Şekil 4.7.) eğimi kullanıldığında proton sayısının elektron sayısına oranı 0,73 yaklaşık 1,0 olarak bulundu. Bu sonuçtan, CAR'ın yükseltgenme mekanizmasında eşit sayıda H⁺ (proton) ve e⁻ (elektron) yer aldığı sonucuna varıldı.

Şekil 4.7.'de verilen E_p -pH grafiğinin eğiminin negatif olması (hidrojen iyonları derişimi azaldıkça pik potansiyelinin daha negatif değerlere kayması) yükseltgenme mekanizmasında elektron aktarımından önce protonlanma basamağının olduğu şeklinde yorumlandı.

Bütün bu sonuçlar ve literatürde CAR'ın elektrokimyasal yükseltgenme mekanizması ile ilgili yapılan çalışmalar göz önüne alındığında söz konusu ilaç etkin maddenin 2H⁺/2e⁻ ile yükselttiği sonucuna varıldı. Literatürde verilen olası yükseltgenme mekanizması aşağıda verildi (Shadjou 2011).



Şekil 4.8. CAR'ın olası yükseltgenme mekanizması

CAR molekülünün difüzyon katsayısının hesaplanması için tersinmez sistemler için önerilen Eşitlik 3.1 kullanıldı (Wang 2006).

Bu eşitlikten de anlaşılacağı üzere pik akımları tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değişmelidir. Bu eşitlikten 0,075-0,5 V.s⁻¹ tarama hızı aralığında hesaplanan ortalama difüzyon katsayısı $(2,097 \pm 1,30) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ olarak hesaplandı. Hesaplanan difüzyon katsayısı değerinin, difüzyon kontrollü mekanizmalar için literatürde verilen değerlerden oldukça küçük olduğu görülmektedir. Çünkü pek çok kaynakta difüzyon kontrollü mekanizmalar için difüzyon katsayısının 10^{-5} - $10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ aralığında olduğu belirtilmiştir (Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006).

Elde edilen difüzyon katsayı değerleri Garrido ve ark. (1986) tarafından geliştirilen Eşitlik 3.2 kullanılarak her bir tarama hızı için elektrot yüzey alanı hesaplandı. CAR'ın elektrot yüzeyine adsorbe olması sebebiyle, yüzey kaplama katsayısı (Γ) Eşitlik 3.3 yardımıyla hesaplandı.

Yüzey kaplama katsayısı ortalama $(2,81 \pm 1,639) \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ olarak bulundu. Hesaplanan bu değer CAR'ın ZnO NP-KPE yüzeyinde adsorpsiyon kontrollü olarak yükseltgendiği varsayımını destekler niteliktedir. Çünkü, pek çok kaynakta adsorpsiyon kontrollü mekanizmalar için yüzey kaplama katsayısının 10^{-8} - $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ aralığında olduğu belirtilmiştir (Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006).

4.2. CAR'ın Sıyırma Voltametri ile Tayin Yöntemi Geliştirme

CAR'ın elektrokimyasal davranışı incelendikten sonra elde edilen veriler ışığında, ilaç etken maddesinin farmasötik örnekler ve biyolojik sıvılardaki analizleri için voltametrik yöntem geliştirilebileceği düşünüldü. Bu amaçla öncelikle cihaz parametrelerinin ve seçilen yöntem parametrelerinin optimizasyonu yapıldı. Yapılan optimizasyon çalışmalarından yararlanılarak CAR'ın voltametrik tayini için yöntem geliştirildi. Geliştirilen yöntemin etken maddenin farmasötik örneklere ve biyolojik sıvılardaki analizlere uygulanabilirliği test edildi.

4.2.1. Cihaz ve deneysel parametrelerinin optimizasyonu

Bu bölümde voltametrik yöntemlerden KDAAdSV yöntemi ile, adsorptif sıyırma çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda, uygun derişimde CAR çözeltileri kullanılarak yöntem ve cihaz parametrelerinin optimizasyonu yapıldı ve belirlenen optimum parametreler **Çizelge 4.1**'de verildi.

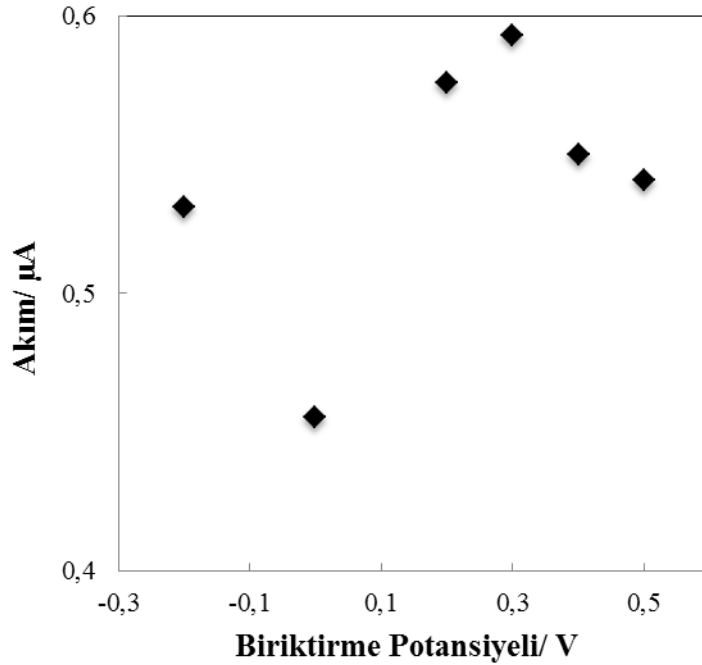
4.2.2. Yöntem parametrelerinin optimizasyonu

CAR elektrot yüzeyine adsorbe olabilen bir ilaç etken maddedir. Bu nedenle CAR'ın elektrokimyasal davranış çalışmalarından sonra farmasötik ve serum örneklerinde hızlı,

güvenilir, tekrarlanabilir ve yüksek doğrulukta tayin edilebilmesi için voltametrik yöntem geliştirildi. Çalışmada KDAAdSV yöntemi kullanıldı. Kullanılan yöntem optimize edildi.

4.2.2.1. Pik akımına biriktirme potansiyelinin etkisi

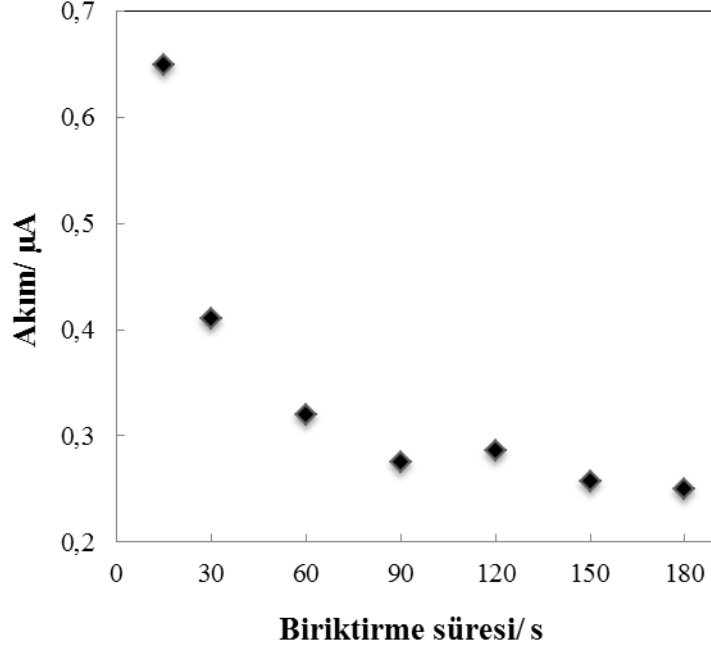
Optimum biriktirme potansiyelinin belirlenmesi için, potansiyel -0,2 V ile 0,5 V arasında değiştirildi. En yüksek pik akımı +0,3 V biriktirme potansiyelinde (E_{bir}) elde edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. KDAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının biriktirme potansiyeli ile değişim grafiği

4.2.2.2. Pik akımına biriktirme süresinin etkisi

Optimum biriktirme süresini belirlemek amacıyla, belirlenen optimum potansiyelde biriktirme süresi 15 s ile 150 s aralığında değiştirilerek ölçümler alındı. Değişen biriktirme sürelerine karşı elde edilen pik akımlarının değişim grafiği Şekil 4.10'da verildi. Pik akımlarının 15 s biriktirme süresinden sonra azaldığı gözlemlendi. Elde edilen sonuca göre en uygun biriktirme süresi 15 s olarak belirlendi.



Şekil 4.10. KDAAdsV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının biriktirme süresi ile değişim grafiği

Bu sonuçlara göre, CAR'ın voltametrik sıyırma yöntemi ile tayininde optimize edilen parametreler **Çizelge 4.1**'de özet olarak verildi.

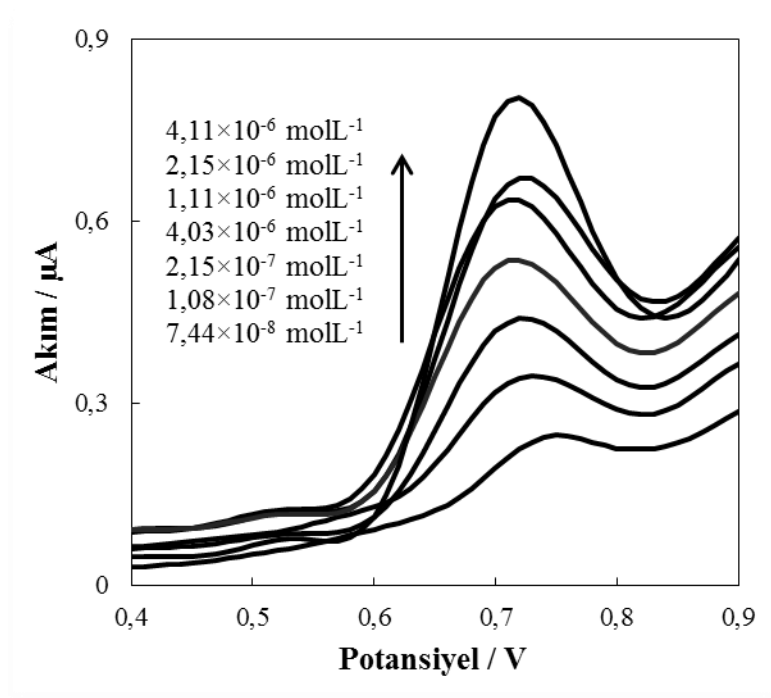
Çizelge 4.1. ZnO NP-KPE yüzeyinde CAR analizi için yapılan voltametrik çalışmalardaki optimum cihaz ve deneysel parametreler

Parametre	KDAAdsV
Başlangıç Potansiyeli, V	0
Bitiş Potansiyeli, V	1,0
Tarama Hızı, V/s	0,1
Genlik, mV	25
Frekans, s ⁻¹	15
Durulma Süresi, s	3
Destek Elektrolit	BR
pH	8,0
Biriktirme potansiyeli	0.3 V
Biriktirme süresi	15 s

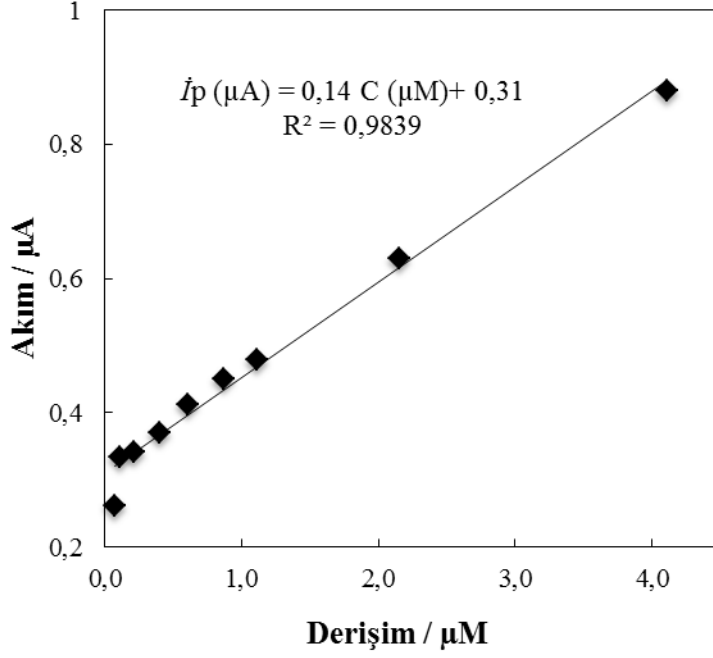
4.3. Geliştirilen Yöntemin Analitik Uygulamaları

4.3.1. Kalibrasyon grafiği ve doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi

Çizelge 4.1’de belirtilen optimum koşullar kullanılarak KDAAdSV yöntemi ile çeşitli derişimlerde CAR içeren çözeltilerin voltamogramları alındı (Şekil 4.11). Elde edilen ortalama pik akımları derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğruları oluşturuldu (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. ZnO NP-KPE yüzeyinde alınan CAR’ın farklı derişimlerdeki KDAAdSV voltamogramları (pH: 8,0; E_{bir}: 0,3 V, t_{bir}: 15 s)



Şekil 4.12. ZnO NP- KPE ile KDAAdSV yönteminde pik akımının CAR derişimi ile değişim grafiği; (pH:8,0, E_{bir}: 0,3 V, t_{bir}: 15 s)

CAR için ZnO NP-KPE ile voltametrik tayin yöntemi geliştirme çalışmalarında;

- KDAAdSV yöntemi için ortalama pik akımının CAR'ın derişimi ile doğrusal değiştiiği,
- Söz konusu yöntem için regresyon katsayısının (R²) 1,0'e yakın olduğu,
- KDAAdSV yöntemi için 10 µM CAR içeren çözeltilerle yapılan çalışmalarda, pik akımı ve pik potansiyeli tekrarlanabilirliği BSS değerlerinin sırasıyla gün içi 2,90; 1,74 günler arası 3,72; 0,89 olduğu görüldü. Sonuç olarak pik akımı ve pik potansiyelinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliklerinin oldukça iyi olduğu ve ZnO NP-KPE yüzeyinde KDAAdSV yönteminin CAR tayini için uygun olduğu,
- KDAAdSV yönteminde doğrusal çalışma aralığının 0,074 µM - 4,11 µM (0,03 - 1,67 mg.L⁻¹) olduğu,
- Adsorptif sıyırma yöntemleri için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri incelendiğinde ve CAR için plazmadaki tedavi edici dozun 0,768 µM – 1,537 µM (Vora ve ark. 2013) göz önüne alındığında geliştirilen yöntemin kan serumunda CAR tayinine uygulanabileceği, sonucuna varıldı.

Geliştirilen yöntemin doğruluk ve kesinliğini kontrol etmek amacıyla **Çizelge 4.1**'de verilen optimum koşullarda ve Bölüm 4.3.1'de verilen kalibrasyon çalışmalarının analitik parametreleri kullanılarak hem farmasötik hem de biyolojik örneklerde geri kazanım çalışmaları yapıldı. Tablet ve serum örnekleri Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra KDAADSV yöntemi ile sıyırma voltamogramları alındı. (**Şekil 4.13-4.14**). Ticari tabletlerdeki ve serumdaki CAR derişimi doğrudan kalibrasyon yöntemi ile belirlendi.

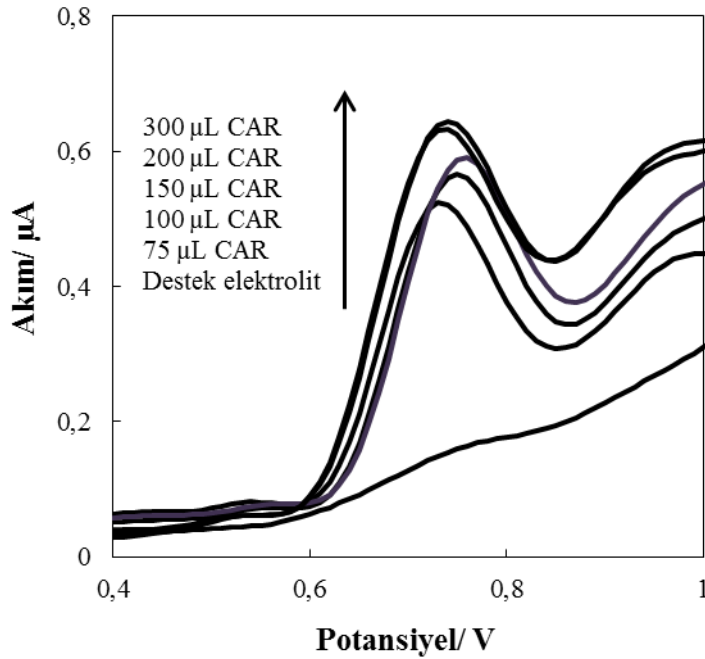
CAR'ın geri kazanım çalışmaları yapıldı ve farklı derişimlerde CAR için % geri kazanımlar hesaplanarak **Çizelge 4.2.** ve **Çizelge 4.3.**'de verildi.

Çizelge 4.2. Tabletlerde CAR analizine ait sonuçlar

Yöntem	Eklenen CAR, μg	Bulunan CAR, μg	Geri Kazanım ^a %	BSS ^b
KDAAdSV	3,72	3,65; 3,93; 3,93	103,13 \pm 2,48	4,52
	7,35	7,02; 7,02; 6,74	94,23 \pm 5,44	2,33
	9,79	9,55; 9,83; 9,83	99,43 \pm 3,15	1,66
	14,55	13,21; 13,21; 13,49	91,37 \pm 2,88	1,21

^a Geri kazanım değerleri % 95 güven seviyesinde (ortalama $\pm ts / N$) eşitliğine göre hesaplanmıştır.

^b Hesaplanan her değer için geri kazanım değeri bulunup bu değerlerin % bağıl standart sapmaları verilmiştir.



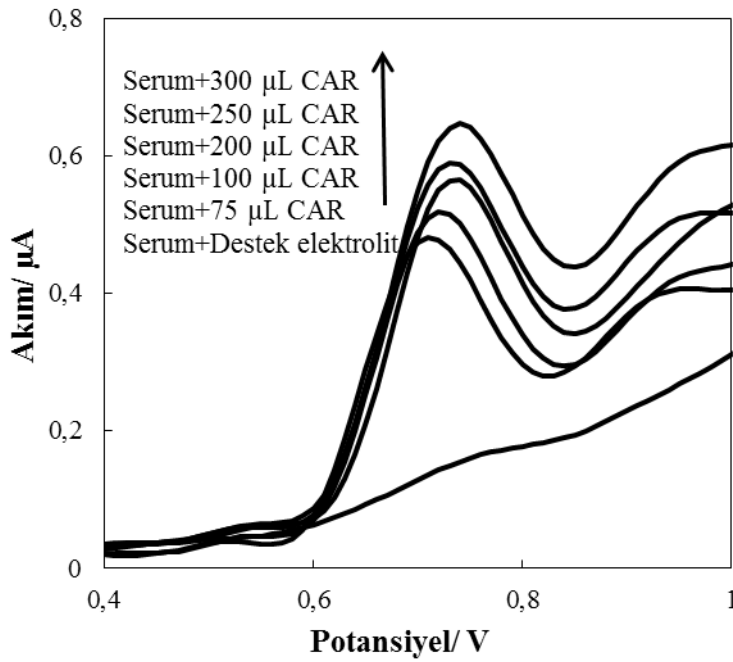
Şekil 4.13. CAR'ın tayini için geliştirilen KDAAdSV yönteminin tablet numunelerine uygulanması sonucu elde edilen voltamogramlar

Çizelge 4.3. Serumda CAR analizine ait sonuçlar

Yöntem	Eklenen CAR, μg	Bulunan CAR, μg	Geri Kazanım ^a %	BSS ^b
KDAAdSV	3,71	3,37; 3,65; 3,65	95,8 \pm 4,98	4,54
	7,35	6,99; 7,27; 7,27	97,64 \pm 3,75	2,25
	9,79	9,26; 9,26; 9,55	95,5 \pm 3,48	1,78
	12,19	11,78; 12,07, 12,35	98,98 \pm 3,83	2,36
	14,55	14,30; 14,59; 14,30	98,92 \pm 2,73	1,16

^a Geri kazanım değerleri % 95 güven seviyesinde (ortalama $\pm ts / N$) eşitliğine göre hesaplanmıştır.

^b Hesaplanan her değer için geri kazanım değeri bulunup bu değerlerin % bağıl standart sapmaları verilmiştir.



Şekil 4.14. CAR'ın tayini için geliştirilen KDAAdSV yönteminin serum numunelerine uygulanması sonucu elde edilen voltamogramlar

Şekil 4.14 incelendiğinde CAR içermeyen, ancak serum içeren BR tamponunda herhangi bir yükseltgenme piki gözlenmezken CAR ilave edilmiş serum numuneleri içeren BR tamponunda bir yükseltgenme piki gözlemlendi. Bu sonuç KDAAdSV yöntemi kullanılarak serumda CAR tayininin yapılabileceğini gösterdi.

Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3. incelendiğinde geliştirilen KDAAdSV yönteminin tablet, kapsül gibi farmasötik numunelere, kan, serum gibi biyolojik numunelere güvenli bir şekilde uygulanabileceği sonucu elde edildi.

4.4. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyon Parametrelerinin İncelenmesi

Analitik yöntem geliştirmenin en önemli basamaklarından birisi şüphesiz ki yöntemin valide edilmesidir. Yöntem validasyonu kısaca; geliştirilen yöntemin istenilen amaca uygun olduğunun onaylanması şeklinde tanımlanabilir. Geliştirmiş olduğumuz bu yöntemde aşağıdaki parametreler değerlendirilerek gerekli hesaplamaların validasyonu yapıldı.

4.4.1. Doğrusal çalışma aralığı

Doğrusal çalışma aralığı çalışmalarının sonuçları Bölüm 4.3’de verildiği gibi ortalama pik akımının CAR derişimi ile $7,44 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ ile $4,11 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ derişim aralığında doğrusal olarak değiştiği görüldü. Ayrıca kalibrasyon parametreleri **Çizelge 4.4**’de verildi.

4.4.2. Yöntemin doğruluğu

Bir yöntemin doğruluğu, gözlenen analiz sonuçlarının gerçek değere yakınlığının derecesi olarak ifade edilebilir. Yapılan analitik uygulamalar ile geliştirilen yöntemlerin doğruluğu araştırıldı. Bunun için, çalışma hücresine son derişimi doğrusal çalışma aralığında olacak şekilde bilinen miktarlarda CAR eklenerek bu çözülden önerilen yönteme ait kalibrasyon parametreleri kullanıldı ve % geri kazanım hesaplandı. **Çizelgeler 4.2 - 4.3**’de görüldüğü gibi KDAAdSV yönteminin % geri kazanım değerleri tablet çözeltileri için % 91,37- % 103,13 aralığında, serum örnekleri için % 95,5 ile % 98,98 arasında bulundu.

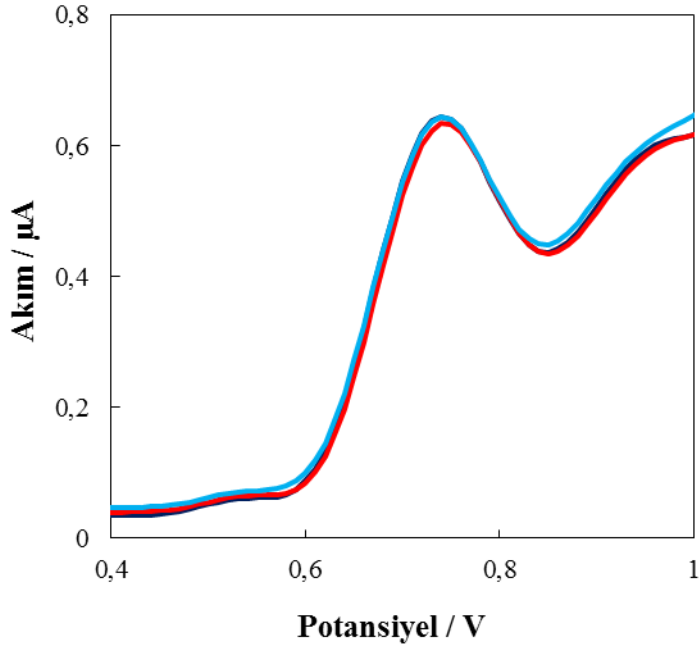
Sonuç olarak, geliştirilen yöntemin doğruluğunun yüksek olduğu ve herhangi bir girişim etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

4.4.3. Tekrarlanabilirlik

4.4.3.1 Aynı çözültide (gün içi) pik akımı ve pik potansiyeli için tekrarlanabilirlik

10^{-4} M CAR içeren, pH değeri 8,0’e ayarlanan çözülti kullanılarak optimum koşullarda karbon pasta elektrotta +0,3 V’da biriktirme yapıldıktan sonra, KDAAdSV yöntemi ile voltamogramlar alındı. Ölçümler ard arda üç kez tekrarlandı. Elde edilen voltamogramlar üst üste karşılaştırıldı. (**Şekil 4.15**). Aynı gün, aynı çözültide ard arda üç defa alınan sıyırma voltamogramlarından elde edilen pik akımlarının ve pik potansiyellerinin bağıl standart sapma (B.S.S.) değerleri söz konusu yöntem için sırasıyla % 2,90 ve % 1,74 olarak hesaplandı.

Bu sonuçlardan, aynı gün içinde sıyırma piklerinin akım ve potansiyel değerlerindeki tekrarlanabilirliğin oldukça yüksek olduğu belirlendi.

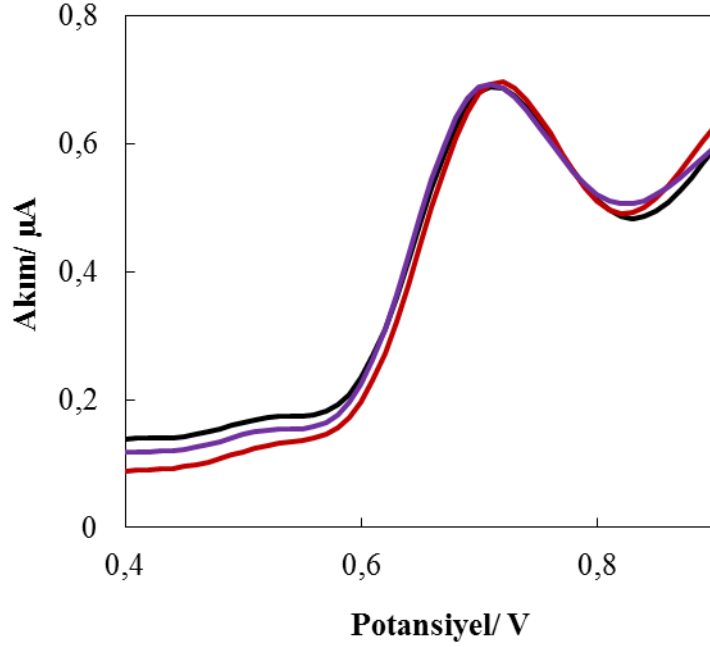


Şekil 4.15. KDAAdSV yöntemi ile aynı gün, aynı çözeltilerde yapılan ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 0,3 V, t_{bir} : 15 s, C_{CAR} : $1,01 \times 10^{-4}$ molL⁻¹, pH 8,0)

4.4.3.2 Farklı çözeltilerde (günler arası) pik akımı ve pik potansiyeli için tekrarlanabilirlik

Bölüm 4.4.3.1’de anlatıldığı gibi, farklı zamanlarda hazırlanan çözeltilerde, optimum koşullarda, ZnO NP - KPE’üzeyinde biriktirme yapıldıktan sonra, KDAAdSV yöntemi ile voltamogramlar alındı. Bu işlemler 3’er kez tekrarlandı. Elde edilen sıyırma voltamogramları üst üste çakıştırıldı (Şekil 4.16). Farklı günlerde, aynı derişimdeki çözeltiler kullanılarak ard arda üç defa alınan sıyırma voltamogramlarından elde edilen pik akımlarının ve pik potansiyellerinin bağıl standart sapma (BSS) değerleri sırasıyla % 3,72 ve % 0,89 olarak hesaplandı.

Sonuç olarak, sıyırma pikinin hem gün içindeki hem de günler arasındaki tekrarlanabilirliklerinin oldukça iyi olduğu belirlendi.



Şekil 4.16. KDAAdSV yöntemi ile farklı gün, farklı çözeltilerde yapılan ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 0,3 V, t_{bir} : 15 s, C_{CAR} : $1,01 \times 10^{-4}$ molL⁻¹, pH 8,0)

4.4.4. Yöntemin kesinliği

Geliştirilen yöntemin kesinlik değerleri, pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği ve analitik uygulamalarda elde edilen geri kazanım değerlerinin bağıl standart sapmaları (BSS) ile test edildi. KDAAdSV yönteminin analitik uygulamaları sonucu elde edilen geri kazanım değerlerine ait BSS değerleri tablet örnekleri için % 1,21 - % 4,52 aralığında serum numunelerine ait geri kazanım değerlerinin BSS değerleri ise % 1,16 - % 4,54 aralığında değiştiği görüldü. (Çizelge 4.2- 4.3).

4.4.5. Yöntemin duyarlılığı

Yöntemin CAR molekülüne karşı olan duyarlılığı kalibrasyon eğimi kullanılarak belirlendi (Çizelge 4.4). CAR tayini için geliştirilen KDAAdSV yönteminin yüksek duyarlılıkta olduğu görüldü.

4.4.6 Yöntemin seçiciliği

Serum ve tablet örneklerinde yapılan çalışmalarda çalışma hücrelerine CAR ilavesi yapılmadan önce aynı potansiyel aralığında voltametrik ölçümler yapıldı ve CAR moleküllerine ait yükseltgenme pikinin akım ve potansiyel değerini etkileyecek herhangi bir voltametrik sinyale rastlanmadı (Şekil 4.13-4.14). Buna göre çalışmaların dayandırıldığı yükseltgenme potansiyeli, serum ortamında bile CAR moleküllerine özgü (CAR molekülü için seçici) bir değerdir denilebilir.

4.4.7. Gözlenebilme sınırı

Geliştirilen yöntem için gözlenebilme sınırı hesaplamak için 3s/m eşitliği kullanıldı. Bu eşitlikte s başlangıç ordinatının standart sapması, m ise kalibrasyon eşitliğinin eğimini göstermektedir. Bu eşitliğe göre KDAAdSV için gözlenebilme sınırı $8,39 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ (0,34 mg.L^{-1}) olarak hesaplandı.

4.4.8. Alt tayin sınırı

Geliştirilen yöntem için alt tayin sınırını belirlemek için 10s/m eşitliği kullanıldı. Bu eşitliğe göre KDAAdSV için alt tayin sınırı $2,79 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (1,13 mg.L^{-1}) olarak hesaplandı.

Çizelge 4.4. Geliştirilen voltametrik yöntemin kalibrasyon verilerinden hesaplanan validasyon parametreleri

Validasyon Parametreleri	KDAAdSV
Doğrusal çalışma aralığı, mol.L^{-1}	$7,44 \times 10^{-8}$ - $4,11 \times 10^{-6}$
Pik potansiyeli, V	0,69
Kalibrasyon grafiğini eğimi, A.L.mol^{-1}	0,142
Eşitliğin kesim noktası (b)	0,308
Kesim noktasının standart sapması (ss)	0,0035
Gözlenebilme sınırı (LOD), mol.L^{-1}	$8,39 \times 10^{-7}$
Alt tayin sınırı (LOQ), mol.L^{-1}	$2,79 \times 10^{-6}$
Regresyon katsayısı (R^2)	0,9846
Gün içi akım tekrarlanabilirliği, (BSS, %)	2,90
Gün içi potansiyel tekrarlanabilirliği, (BSS, %)	1,74
Günler arası akım tekrarlanabilirliği, (BSS, %)	3,72
Günler arası potansiyel tekrarlanabilirliği, (BSS, %)	0,89

4.5. Farklı Yöntem Sonuçlarının ve Parametrelerinin İstatiksel Olarak Karşılaştırılması

Geliştirilen voltametrik yöntemin farmasötik örneklerle uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar, Arfaj ve arkadaşları (2007) tarafından CAR analizi için geliştirilen kemilüminesans yönteminin tabletlere uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldı. Kemilüminesans yöntemi ile elde edilen tayin sonuçları **Çizelge 4.5**'da verilmektedir.

Çizelge 4.5. Karvedilol içeren tabletlerde kemilüminesans yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Yöntem	Eklenen CAR, $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	Bulunan CAR, $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	Geri Kazanım %	
Kemilüminesans	0,5	0,494 \pm 0,032	98,92	X_{ort}=99,56
	0,5	0,479 \pm 0,010	95,90	ss=2,81
	0,5	0,509 \pm 0,042	101,77	n=4
	0,5	0,509 \pm 0,036	101,77	

Geliştirilen voltametrik yöntemin serum numunelerine uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar Hokama ve arkadaşları (1999) tarafından geliştirilen HPLC yönteminin sonuçları ile karşılaştırıldı. HPLC yöntemi ile elde edilen tayin sonuçları **Çizelge 4.6**'de verilmektedir.

Çizelge 4.6. Karvedilol içeren serumlarda HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Yöntem	Eklenen CAR, μg	Bulunan CAR, μg	Geri Kazanım %	
HPLC	6,25	6,21	99,36	
	6,25	6,34	101,44	X_{ort}=98,94
	6,25	6,17	98,72	ss=1,58
	6,25	6,10	97,6	n=5
	6,25	6,10	97,6	

İlk olarak, CAR analizi için geliştirilen voltametrik yöntemle karşılaştırılan kemilüminesans ve HPLC yönteminin kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla elde edilen sonuçlara F testi uygulandı (Eşitlik 4.4). Bulunan deneysel F değeri % 95 güven seviyesinde teorik f değerinden küçük olduğu için ($F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik}}$) her iki yöntemin kesinlikleri arasında önemli bir fark olmadığı sonucuna varıldı.

$$F = \frac{(s_1)^2}{(s_2)^2} \quad (4.4)$$

CAR tayini için geliştirilen voltametrik yöntem ile literatürde CAR analizi için geliştirilen kemilüminesans ve HPLC yönteminin doğruluğunu karşılaştırmak amacıyla t testi uygulandı. Eşitlik 4.5’de verilen formül yardımıyla birleşik standart sapma değeri (s_b) hesaplandı. Buna göre, Eşitlik 4.6’da yapılan hesaplamaların sonuçları değerlendirildi ve $t_{\text{deneysel}} < t_{\text{kritik}}$ olduğundan % 95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_1} (x_i - x_1)^2 + \sum_{j=1}^{N_2} (x_j - x_2)^2 + \sum_{k=1}^{N_3} (x_k - x_3)^2 + \dots}{N_1 + N_2 + N_3 + \dots - N}} \quad (4.5)$$

$$t_{\text{deneysel}} = \frac{x_1 - x_2}{s_b \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}} \quad (4.6)$$

Hesaplanan değerler **Çizelge 4.7**’de verildi. Elde edilen sonuçlar % 95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdi.

Çizelge 4.7. Geliştirilen KDAAdSV yöntemi ile kemilüminesans ve HPLC yöntemini karşılaştırmak için hesaplanan F ve t değerleri

Karşılaştırılan Yöntemler	F_{deneysel}	F_{kritik}	t_{deneysel}	t_{kritik}
KDAAdSV- kemilüminesans	3,49	5,19	0,45	2,31
KDAAdSV- HPLC	1,09	5,05	0,68	2,26

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada, hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaç etkin madde CAR'ın elektrokimyasal yükseltgenme davranışı DV yöntemi ile incelendi. Voltametrik davranışlarına bağlı olarak CAR'ın hem tabletlerde hem de serum numunelerinde analizi için yöntem geliştirildi. Geliştirilen yöntem, kemilüminesans ve HPLC yöntemi ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlendi.

1. CAR'ın ZnO nanopartikülleri ile modifiye karbon pasta elektrot yüzeyinde, % 20 MeOH-% 80 BR ortamında pH 5,0-10,0 arasında tek bir yükseltgenme pikine rastlandı. Yapılan DV çalışmalarına göre yükseltgenme reaksiyonunun tersinmez ve adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucuna varıldı.
2. CAR'ın elektrokimyasal yükseltgenme mekanizmasının $2e^-/2H^+$ transferi ile gerçekleştiği sonucuna varıldı. Olası yükseltgenme reaksiyon mekanizması önerildi. Önerilen mekanizma literatürde yer alan çalışmalar ile desteklendi.
3. CAR'ın tablet ve serumda tayini için KDAAdSV yöntemi geliştirildi. Geliştirilen yöntemin doğruluğunu belirlemek için tablet ve serum örneklerinde geri kazanım çalışmaları yapıldı. Doğrudan kalibrasyon yönteminde ilaç katkı maddelerinin ve serumda bulunabilecek diğer türlerin analizde herhangi bir girişim etkisinin olmadığı görüldü.
4. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğin BSS değerlerinin % 5'in altında bulundu.
5. Geliştirilen KDAAdSV yöntemi ile elde edilen sonuçların yöntemi ile elde edilen kemilüminesans ve HPLC yönteminin sonuçlarıyla % 95 güven seviyesinde uyumlu olduğu görüldü.
6. Geliştirilen adsorptif sıyırma voltametri yöntemi için doğrusal çalışma aralığı $7,44 \times 10^{-8}$ - $4,11 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹; gözlenebilme sınırı $8,39 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ olarak belirlendi.
7. Geliştirilen voltametrik sıyırma yönteminin ekonomik, hızlı, duyarlı olması, az miktarda numune ile çalışılması ve ayırma gibi zaman alıcı işlemlere gerek duyulmadan analiz yapılabilmesi gibi üstünlüklerden dolayı literatürde verilen bazı yöntemlere alternatif olabileceği sonucuna varıldı.

6. KAYNAKLAR

- Anonim (2014). Hipertansiyon. www.saglik.gov.tr. (Erişim Tarihi, 20 Mayıs 2014).
- Arfaj N.L, Abdine H, Sultan M.A. (2007). Sensitive Assay for Carvedilol in Tablets and Spiked Human Plasma Using a Flow-Injection Chemiluminometric Method. *International journal of biomedical science*. Vol. 3 No. 2.
- Bard, A.J. and Faulkner L.R. (2001). *Electrochemical methods: Fundamentals Applications*, John Wiley and Sons. Inc. New York.
- Bond, A.M. (1980). *Modern Polarographic methods in analytical chemistry*. Marcel Dekker, New York.
- Clohs L, McErlane K.M. (2001) Development of a capillary electrophoresis assay for the determination of carvedilol enantiomers in serum using cyclodextrins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24: 545-554
- Copeland, T.R. and Skogerboe, R.K (1974). Anodic stripping voltammetry. *Analytical Chemistry*, 46(14), 1257A-1268A.
- Doğan B, Özkan S.A. (2005). Electrochemical behavior of carvedilol and its adsorptive stripping determination in dosage forms and biological fluids. *Electroanalysis*, 22: 2074-2083.
- Gannu R, Yamsani V.V, Rao Y.M. (2007). New RP-HPLC method with UVdetection for the determination of carvedilol in human serum. *J. Liquid Chromatogr*, 30: 1677-1685.
- Garrido, J.A, Rodrigez, R.M., Bastidaa, R.M. and Brillas, E. (1986). Study by cyclic voltammetry of a reversible surface charge transfer reaction when the reactant diffuses of the electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 214; 157.
- Hokama N, Hobara N, Kameya H. (1999) Simple micro-determination of carvedilol in plasma by highperformance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*.732: 233-238.
- Izutsu, K. (2002). *Electrochemistry in nonaqueous solutions*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Jouyban A, Hasanzadeh M. and Shadjou N. (2014). Non-Aqueous Electromigration Analysis of Some Degradation Products of Carvedilol. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 13 (2): 471-486
- Kaçar C (2010). Trazodon'un Elektrokimyasal Davranışı ve Adsorptif Sıyırma Yöntemleri Tayini. Y.Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Machida M, Watanabe M, Takechi S, Kakinoki S, Nomura A. (2003). Measurement of carvedilol in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Biomed. Life Sci.*; 798: 187-91
- Mauer H.H, Tenberken O, Kratzsch C, Weber A.A, Peters F.T (2004). Scening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Chromatogr. A*, 1058: 169-81
- Moffat A.C, Osselton M.D, Widdop B. (2004) editors. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3 rd ed. London: Pharmaceutical Pres.
- Radi A, Elmogy T. (2004). Differential pulse voltametric determination of carvedilol in tablets dosage form using glassy carbon electrode, 60: 43.

- Saltman P. (1983). Trace elements and blood pressure, *Ann. Intern. Med.* 98, 823. Brainina, Kh. Z. 1972. Stripping voltammetry in chemical analysis. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- Santos, P.M, Sandrino B, Moreira, Wohnrath, Nagata, N. and Pessoa, C.A. (2007). Simultaneous voltammetric determination of dopamine and ascorbic acid using multivariate calibration methodology performed on a carbon paste electrode modified by a mer [RuCl₃(dppb)(4-pic)] complex. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 18; pp. 93-99.
- Shadjou N, Hasanzadeh M, Saghatforoush L, Mehdizadeh R (2011). Electrochemical behavior of atenolol, carvedilol and propranolol on copper-oxide nanoparticles. *Electrochimica Acta* 58 (2011) 336– 347.
- Skoog, D.A, West, D.M, Holler, F.J. and Crouch, S.R. (2004). *Analitik kimya temel ilkeler. Çeviri Sekizinci Baskı*, Ankara.
- Soleymanpour A, Ghasemian M. (2015). Chemically modified carbon paste sensor for the potentiometric determination of carvedilol in pharmaceutical and biological media. *Measurement*. 59: 14-20.
- Svancara I, Vytras K, Kalcher K, Walcarius A and Wang J. (2008). Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis*, Vol. 21; pp. 7-28.
- Vora N, Lin S, Madan P (2013). Development and in-vitro evaluation of an optimized carvedilol transdermal therapeutic system using experimental design approach. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8: 28-38.
- Wang J. (2006). *Analytical Electrochemistry, methodology and applications of dynamic techniques*, New Jersey. Scholz, F. *Electroanalytical Methods*. Greifswald, Germany.
- Wen X, Tan F, Jing Z, Liu Z. (2004). Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvedilol with β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34: 517-523.
- Xiao Y, Wang H.Y, Han Juan (2005). Simultaneous determination of carvedilol and ampicillin sodium by synchronous fluorimetry. *Spectrochim. Acta Part A*, 61(4): 567-573.
- Xu L.X, Hui N, Ma L.Y, Wang H.Y.(2005). Study on fluorescence property of carvedilol and determination of carvedilol by fluorimetry. *Spectrochim. Acta Part A*, 61(5): 855-859.
- Yenigül B, Ertas, F.N (2001). *Voltammetrik Analiz Yöntemleri I, Eser Analiz Yaz Okulu Kitabı* Ed, Henden, E, Gökçel, Ertas, F.N, Ege Üniversitesi, p.154.
- Yılmazgüç B (2008). *Telmisartan'ın Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Voltammetrik Yöntemle Tayini*. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Zorluoğlu L (2012). *Metoprolol ile Hidroklorazit İçeren İlaçlarda Etken Maddelerin Tayini İçin Voltammetrik Yöntem Geliştirilmesi*. Y.Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmam sırasında ve tezimin hazırlanmasında bana her konuda yardımcı olan, bilgisini, tecrübesini, hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK'e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Namık Kemal Üniversitesi, Fen Fakültesi, Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarında birlikte çalıştığım bütün arkadaşlara teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her döneminde bana verdiği manevi destek, göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı canım anneme ve her zaman yanımda olduğuna inandığım sevgili babama, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Kırıkkale’de doğdu. İlköğrenimi İstanbul İsmet İnönü İlköğretim Okulunda, lise öğrenimi de Maltepe Anadolu lisesinde tamamladı. 2011 yılında Evyap A.Ş de lisans stajını yaptı. 2008 yılında Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde başladığı lisans eğitimini, 2012 yılında bitirdi. 2012 yılında Namık Kemal Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim dalında başladığı yüksek lisans eğitimi devam etmektedir.

Emre Güven