

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**BAZI ANTİDEPRESAN İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN TAYİNİ İÇİN  
ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLER GELİŞTİRİLMESİ VE BUNLARIN  
ANALİTİK UYGULAMALARI**

**Deniz ALTUNÖZ ERDOĞAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ANKARA**

**2011**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Doktora Tezi

### BAZI ANTİDEPRESAN İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLER GELİŞTİRİLMESİ VE BUNLARIN ANALİTİK UYGULAMALARI

Deniz ALTUNÖZ ERDOĞAN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Esmâ KILIÇ

Bu çalışmanın ilk kısmında, depresyon tedavisinde kullanılan reboksetin (RBK) ve moklobemidin (MKB) elektrokimyasal indirgenme/yükseltgenme davranışları incelenip bu etken maddelerin çeşitli ortamlarda tayini için voltametrik yöntemler geliştirilmiştir. Maddelerin indirgenme davranışı asılı damla cıva elektrot (ADCE); yükseltgenme davranışı ise camsı karbon elektrot (CKE) kullanılarak incelenmiştir. İki etken madde için aktarılan elektron sayısı, tepkimeye katılan proton sayısı gibi bazı parametreler hesaplanmış ve indirgenme/yükseltgenme için olası elektrot tepkime mekanizmaları önerilmiştir. Her iki maddenin elektrokimyasal davranışının adsorpsiyon kontrollü olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, kare dalga voltametri (KDV) ve diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemlerinin doğrudan ve adsorptif sıyırma basamakları (KDKAdSV ve DPKAdSV) kullanılarak reboksetin ve moklobemid için çeşitli nicel tayin yöntemleri geliştirilmiştir. MKB ve RBK tayini için ADCE kullanılarak KDV, KDKAdSV, DPV ve DPKAdSV yöntemleri; CKE kullanılarak ise, sadece KDV yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir. Geliştirilen tüm yöntemlerle tabletlerde etken madde analizleri yapılmış, yaklaşık % 100 geri kazanım verimleri elde edilmiştir. Bu yöntemlerin ilaç tabletlerinin kalite kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılabilmesi düşünülmüştür. Geliştirilen bazı yöntemlerin doğrusal çalışma aralıkları fizyolojik ortamlardaki etken madde derişimlerine uygun olmasına rağmen, her iki etken maddenin serum proteinlerine kuvvetle bağlanması nedeniyle, herhangi bir ön işlem yapılmadan bu maddelerin geliştirilen yöntemlerle tayininin mümkün olmadığı görülmüştür. Sadece RBK'nın idrar numunelerinde analizinin DPKAdSV yöntemiyle yüksek bir doğrulukla yapılabileceği gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve % 95 güven seviyesinde aralarında anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, MKB ve RBK'nın bovin (sığır) serum albümin (BSA) ile etkileşimi voltametrik yöntemlerle incelenerek, bu etken maddelerin proteinlere kuvvetle bağlandığı da gösterilmiştir. Bu tür çalışmaların ilaçların farmakolojik davranışlarının aydınlatılmasında kullanılabilmesi belirlenmiştir.

**Temmuz 2011, 131 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Moklobemid, reboksetin, tayin, ilaç, serum, idrar, voltametri

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### DEVELOPING ELECTROCHEMICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF SOME ANTIDEPRESSANT DRUG ACTIVE INGREDIENTS AND THEIR ANALYTICAL APPLICATIONS

Deniz ALTUNÖZ ERDOĞAN

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Esmâ KILIÇ

In the first step of this study, the electrochemical reduction and oxidation behaviours of reboxetine (RBX) and moclobemide (MCB) that are used for the treatment of depression were examined and some voltammetric methods were developed for determining those substances in the different mediums. The reduction behaviours of the substances were examined by using hanging drop mercury electrode (HDME) and oxidation behaviours were by using glassy carbon electrode (GCE). At the end of first phase of the experiments, the parameters of electron and proton were examined and calculated for both substances and probable electrode reactions mechanisms for the reduction and oxidation were defined. It is determined that electrochemical behaviours of both substances were adsorption controlled.

In the second step of the study, quantitative detection methods were developed for both substances by using square wave voltammetry (SWV) and differential pulse voltammetry (DPV) in two different steps both direct and adsorptive stripping (SWCAdSV and DPCAdSV). SWV, SWCAdSV, DPV and DPCAdSV methods were employed to determine REB and MOC by using HDME, and only SWV method was employed by using GCE. Active substance analyses were conducted on the tablets for all methods employed and approximately one hundred percent of recovery efficiency rate was obtained. It is concluded that these methods can successfully be applied for quality control of these tablets. Although the linear working ranges of some methods developed in this study are suitable for active substance concentration analyses in the physiological mediums, it is observed that it is not possible to determine the substances by using the methods developed, unless pre-treatment, because of the strong bonds of both substances with the serum proteins. It is demonstrated that only DPCAdSV method can give high accuracy for analysis of REB in urine samples. The results obtained through the experiments were compared with the spectrophotometric and chromatographic methods in the literature and it is observed that there is no meaningful difference between them, within the 95% confidence interval. Also it is proved that these substances strongly bonded with the proteins by examining interaction of substances and bovine serum albumin (BSA) with voltammetric methods. It is proven that this kind of experiments can be used for the explanation of pharmacological behaviours of the drugs.

**July 2011, 131 pages**

**Key Words:** Moclobemide, reboxetine, assay, drug, serum, urine, voltammetry

## TEŞEKKÜR

Araştırmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bilimsel motivasyonumu sağlayan, bana ve araştırmaya olan güvenini her fırsatta hissettiren, araştırmamın sürdürülmesi ve sonuçlandırılmasında en büyük paya sahip danışmanım Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi sayın Prof.Dr. Esmâ KILIÇ'a,

Bilgi birikimi ve önerileriyle yardımlarını esirgemeyen, Tez İzleme Komitesi Üyelerinden; Ahi Evran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Başkanı sayın Prof.Dr. Orhan ÇAKIRER'e, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi sayın Doç.Dr. Esin CANEL'e, deneylerin yapılışı ve yorumlar sırasında katkılarından dolayı Dr. İbrahim H. TAŞDEMİR'e

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Yaşantımın her alanında olduğu gibi '*Bilimsel Araştırma ve Uygulama*' sürecinde de beni ve çalışmalarımı maddi ve manevi yönden destekleyen eşim Ahmet ERDOĞAN'a ve aileme teşekkür ederim.

Deniz ALTUNÖZ ERDOĞAN

Ankara, Temmuz 2011

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER .....	5
2.1 Depresyon ve Antidepresan İlaçlar .....	5
2.1.1 Reboksetin metansülfonat (RBK).....	8
2.1.2 Moklobemid (MKB).....	10
2.2 İlaç Analiz Yöntemleri .....	12
2.2.1 Elektroanalitik yöntemler .....	13
2.2.1.1 Dönüşümlü voltametri (DV).....	17
2.2.1.2 Puls voltametri .....	22
2.2.1.3 Voltametrik sıyırma yöntemleri .....	27
2.3 Kaynak Araştırması .....	29
2.3.1 RBK tayini için yapılan çalışmalar .....	29
2.3.2 MKB tayini için yapılan çalışmalar.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
3.1 Cihazlar ve Malzemeler .....	37
3.2 Kimyasal Maddeler .....	39
3.3 Standart İlaç Etken Maddeleri .....	40
3.4 İlaç Tabletleri ve Biyolojik Sıvılar .....	40
3.5 Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	40
3.5.1 Standart etken maddelerin stok çözeltileri.....	40
3.5.2 Destek elektrolit çözeltileri.....	41
3.6 İlaç Tabletlerinin Analize Hazırlanması .....	41
3.7 Bovin (sığır) Serum Albümin (BSA) Çözeltisi .....	42
3.8 Serum Numunelerinin Analize Hazırlanması.....	42

3.9	İdrar Numunelerinin Analize Hazırlanması.....	42
3.10	Deneylerin Yapılışı .....	43
3.10.1	Dönüşümlü voltametri .....	43
3.10.2	Diferansiyel puls ve kare dalga voltametri .....	43
3.10.3	Kronokulometri.....	43
3.10.4	Diferansiyel puls ve kare dalga adsorptif sıyırma voltametri.....	45
3.10.5	Bulk elektroliz (BE) .....	45
3.10.6	Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması .....	46
3.10.7	İlaçlarda, serumda ve idrarda ilaç etken madde analizleri .....	46
3.10.8	İlaç - protein etkileşiminin incelenmesi.....	47
3.11	Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi .....	47
3.11.1	Doğrusal çalışma aralığı .....	47
3.11.2	Doğruluk .....	47
3.11.3	Tekrarlanabilirlik .....	48
3.11.4	Duyarlık .....	48
3.11.5	Gözlenebilme sınırı ( <i>LOD</i> ) ve alt tayin sınırı ( <i>LOQ</i> ).....	48
3.12	Elektron Sayısının ( <i>n</i> ) Hesaplanması .....	49
3.13	Yük Aktarım Katsayısının ( $\beta$ , $\alpha$ ) Hesaplanması.....	49
3.14	Difüzyon Katsayısının ( <i>D</i> ) Hesaplanması .....	50
3.15	Yüzey Kaplama Katsayısının ( <i>I</i> ) Hesaplanması .....	50
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	51
4.1	Reboksetin Metansülfonat (RBK).....	51
4.1.1	RBK'nın elektrokimyasal davranışı.....	51
4.1.2.	RBK tayini için voltametrik yöntemler.....	69
4.2	Moklobemid (MKB) .....	87
4.2.1	MKB'nin elektrokimyasal davranışı.....	87
4.2.2.	MKB tayini için voltametrik yöntemler.....	103
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	120
	KAYNAKLAR .....	125
	ÖZGEÇMİŞ.....	131

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\pi$	Pi sayısı (3,14)
$\Gamma$	Yüzey kaplama katsayısı
[O]	Yükseltgenmiş türün denge derişimi (mol cm <sup>-3</sup> , mol L <sup>-1</sup> )
[R]	İndirgenmiş türün denge derişimi (mol cm <sup>-3</sup> , mol L <sup>-1</sup> )
$A$	Elektrodun yüzey alanı (cm <sup>2</sup> )
ADCE	Asılı damla cıva elektrot
AdKSV	Adsorptif katodik sıyırma voltametri
AdSV	Adsorptif sıyırma voltametri
ASV	Anodik sıyırma voltametri
BE	Bulk elektroliz
BP	İngiliz Farmakopesi
BR	Britton-Robinson tamponu
BSA	Bovin (sığır) serum albmümin
BSS	Bağıl standart sapma
$C$	Analitin derişimi (mol cm <sup>-3</sup> , mol L <sup>-1</sup> )
CK	Camsı karbon
CKE	Camsı karbon elektrot
$D$	Difüzyon katsayısı (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
DP	Diferansiyel puls
DPAdSV	Diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametri
DPKAdSV	Diferansiyel puls katodik adsorptif sıyırma voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametri
DSM-IV	Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı
DV	Dönüşümlü voltametri
$E_b$	Başlama potansiyeli
$E_{bir}$	Biriktirme potansiyeli
$E_d$	Dönme potansiyeli
EP	Avrupa Farmakopesi
$E_p$	Puls genliği (V)
$E_{p,a}$	Anodik pik potansiyeli (V)

$E_{p,k}$	Katodik pik potansiyeli (V)
$E_s$	Bitiş potansiyeli
$E_t$	Puls periyodu
$F$	Faraday sabiti (96485 C)
$f$	Frekans
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
$i_p$	Pik akımı (A)
$i_{p,a}$	Anodik pik akımı (A)
$i_{p,k}$	Katodik pik akımı (A)
KD	Kare dalga
KDAdS	Kare dalga adsorptif sıyırma
KDAdSV	Kare dalga adsorptif sıyırma voltametri
KDKAdSV	Kare dalga katodik adsorptif sıyırma voltametri
KDV	Kare dalga voltametri
KK	Kronokulometri
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
$m$	Kalibrasyon doğrusunun eğimi
MKB	Moklobemid
$n$	Aktarılan elektron sayısı
N	Numune sayısı
NPV	Normal puls voltametri
$Q$	Toplam yük (C)
$R$	İdeal gaz sabiti ( $J K^{-1} mol^{-1}$ )
$R^2$	Regresyon katsayısı
RBK	Reboksetin metansülfonat
s	Standart sapma
$s_b$	Kalibrasyon doğrusunda başlangıç ordinatının standart sapması
$T$	Sıcaklık (K)
$t$	Zaman (s)
$t_b$	Bekleme süresi



$t_{bir}$	Biriktirme süresi (s)
$t_p$	Puls süresi
USP	Amerikan Farmakopesi
$v$	Potansiyel tarama hızı (V/s)
VK	Varyasyon katsayısı
$\alpha$	Katodik yük aktarım katsayısı
$\beta$	Anodik yük aktarım katsayısı
$\Delta E$	Basamaklı adım yüksekliği (V)
$\partial$	Mekanizmaya katılan proton sayısı (mol proton/mol molekül)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	RBK'nın molekül yapısı.....	9
Şekil 2.2	MKB'nin molekül yapısı.....	10
Şekil 2.3	DV yönteminde (A) potansiyel-zaman sinyali (B) dönüşümlü voltamogram ( $E_b$ : başlama potansiyeli, $E_d$ : dönme potansiyeli, $E_s$ : bitiş potansiyeli, $i_{p,k}$ katodik pik akımı, $i_{p,a}$ anodik pik akımı, $E_{p,k}$ : katodik pik potansiyeli, $E_{p,a}$ :anodik pik potansiyeli) .....	17
Şekil 2.4	DV'de tersinmez (A) ve yarı tersinir (B) mekanizmalara ait voltamogramlar .....	20
Şekil 2.5	Normal puls voltametri'de uygulanan potansiyel dalgasının şekli ve yöntem parametreleri ( $E_b$ : başlama potansiyeli, $E$ : pik potansiyeli, $E_s$ : bitiş potansiyeli, $\Delta E$ : iki puls arasındaki potansiyel farkı, $t_b$ : bekleme süresi, $t_p$ : puls süresi, $\tau$ : puls periyodu, $\bullet$ : akım ölçümü).....	23
Şekil 2.6	Diferansiyel puls voltametri'de uygulanan potansiyel dalgasının şekli ve yöntem parametreleri ( $E_b$ : başlama potansiyeli, $E$ : pik potansiyeli, $E_s$ : bitiş potansiyeli, $\Delta E_p$ : puls genliği, $t_p$ : puls süresi, $E_a$ : basamaklı adım yüksekliği, $\tau$ : puls periyodu, $\bullet$ : akım ölçümü).....	24
Şekil 2.7	Kare dalga voltametrinde uygulanan potansiyel dalgasının şekli ve yöntem parametreleri ( $i_i$ : ileri yönlü akım, $i_g$ : geri yönlü akım, $\Delta E$ : basamaklı adım yüksekliği, $E_p$ : ileri yönlü puls genliği, $-E_p$ : geri yönlü puls genliği, $E_t$ (1/f): puls periyodu, $f$ : frekans).....	26
Şekil 2.8	Tersinir ve hızlı bir tepkime için kare dalga voltamogramı ( $nE_p=50$ mV ve $n\Delta E=2$ mV, $\Delta\Phi_{net}$ : net cevap ve $\Phi_f$ : ileri ve $\Phi_b$ : geri bileşenleri) .....	27
Şekil 3.1	Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan elektrotlar ve hücre stantları .....	37
Şekil 4.1	Çalışmada kullanılan etken maddeler (A) reboksetin metansülfonat (RBK) (B) moklobemid (MKB).....	51
Şekil 4.2	Farklı derişimlerde RBK içeren çözeltilerin dönüşümlü voltamogramları: iç grafik $\diamond$ katodik ve $\blacklozenge$ anodik pik akımlarının RBK derişimi ile değişimi (ÇE: ADCE, $v$ : 0,100 V/s, pH:11,0 BR, $E_b$ : -0,6 V, $E_d$ : -1,8 V, $E_s$ : -0,6 V).....	52

Şekil 4.3	Sabit derişimde RBK içeren çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan dönüşümlü voltamogramları (A) pH 5,0 ve 6,0; (B) pH 7,0 ve 8,0; (C) pH 9,0 - 11,0; (D) pik potansiyelinin pH ile değişimi ( $C_{RBK} = 0,3 \text{ mM}$ , ÇE: ADCE, $v: 0,100 \text{ V/s}$ ).....	53
Şekil 4.4	Sabit derişimde RBK içeren çözelti kullanılarak farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlar: iç grafikler: (A) katodik ve anodik pik akımının tarama hızı ile değişimi, (B) katodik ve anodik pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi, (C) katodik ve anodik pik akımının logaritmasının tarama hızının logaritması ile değişimi, (D) katodik pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi (ÇE: ADCE, $C_{RBK} = 0,3 \text{ mM}$ , pH:11,0 BR, $E_b: -1,0 \text{ V}$ , $E_d: -1,8 \text{ V}$ , $E_s: -1,0 \text{ V}$ ; $\diamond$ katodik pik, $\blacklozenge$ anodik pik).....	56
Şekil 4.5	RBK'nın elektrokimyasal davranışına adsorpsiyonun etkisi: (A) $i_{p,k}/C$ oranının RBK derişimi, (B) $i_{p,k}/Cv$ oranının tarama hızı, (C) $i_{p,k}/Cv^{1/2}$ oranının tarama hızı ile değişimi (ÇE: ADCE, $C_{RBK} = 0,3 \text{ mM}$ , pH:11,0 BR) .....	57
Şekil 4.6	RBK moleküllerinin ADCE yüzeyinde gerçekleşen elektroindirgenme tepkimesi için önerilen mekanizma.....	61
Şekil 4.7	Farklı derişimlerde RBK içeren çözeltilerin dönüşümlü voltamogramları: iç grafik anodik pik akımının RBK derişimi ile değişimi (ÇE: CKE, $v: 0,100 \text{ V/s}$ , pH: 7,0 BR, $E_b: 0,0 \text{ V}$ , $E_d: 1,6 \text{ V}$ , $E_s: 0,0 \text{ V}$ ).....	63
Şekil 4.8	Sabit derişimde RBK içeren çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan dönüşümlü voltamogramları: iç grafik: pik potansiyelinin pH ile değişimi ( $C_{RBK} = 50,3 \text{ } \mu\text{M}$ , ÇE: CKE, $v: 0,100 \text{ V/s}$ ).....	64
Şekil 4.9	Sabit derişimde RBK içeren çözelti kullanılarak farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlar: iç grafik: (A) pik akımının tarama hızı ile değişimi, (B) pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi, (C) pik akımının logaritmasının tarama hızının logaritması ile değişimi, (D) pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi (ÇE: CKE, $C_{RBK} = 49,0 \text{ } \mu\text{M}$ , pH:7,0 BR, $E_b: 0,0 \text{ V}$ , $E_d: 1,4 \text{ V}$ , $E_s: 0,0 \text{ V}$ ) .....	65

Şekil 4.10	Viloksazin'in moleküler orbital analizi (HOMO: en yüksek dolu moleküler orbital, HOMO-1: ikincil en yüksek dolu moleküler orbital).....	67
Şekil 4.11	Viloksazin'in CKE yüzeyinde yükseltgenmesine ait olası tepkime mekanizması (Garrido vd. 2008).....	67
Şekil 4.12	RBK moleküllerinin CKE yüzeyinde gerçekleşen elektroyükseltgenme tepkimesi için önerilen mekanizma .....	68
Şekil 4.13	RBK'nın KDV voltamogramlarına pH'nın etkisi ( $C_{RBK} = 0,9$ mM, ÇE: ADCE).....	70
Şekil 4.14	KDKAdSV yönteminde (A) biriktirme potansiyelinin ve (B) biriktirme süresinin pik akımına etkisi (ÇE: ADCE, $C_{RBK}$ : 0,14 $\mu$ M, pH 11,0 BR) .....	71
Şekil 4.15	DPKAdSV yönteminde (A) biriktirme potansiyelinin ve (B) biriktirme süresinin pik akımına etkisi (ÇE: ADCE, $C_{RBK}$ : 0,04 $\mu$ M, pH 11,0 BR).....	71
Şekil 4.16	KDV voltamogramlarına RBK derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE) .....	72
Şekil 4.17	KDKAdSV voltamogramlarına RBK derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE, $E_{bir.}$ : -0,8 V, $t_{bir.}$ : 45 s).....	72
Şekil 4.18	DPV voltamogramlarına RBK derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE) .....	73
Şekil 4.19	DPKAdSV voltamogramlarına RBK derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE, $E_{bir.}$ : -0,4 V, $t_{bir.}$ : 60 s).....	73
Şekil 4.20	RBK tayini için standart katma kalibrasyon grafikleri: (A) KDKAdSV ve (B) DPKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 11,0 BR. Her bir veri ayrı ayrı elde edilen 5 kalibrasyon eğrisi için ortalama değer olup hata çubukları ile birlikte verilmiştir.) .....	76
Şekil 4.21	RBK içeren tablet çözeltilerinin voltamogramlarının derişimle değişimi: (A) KDV ve (B) KDKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 11,0 BR).....	77
Şekil 4.22	RBK içeren tablet çözeltilerinin voltamogramlarının derişimle değişimi: (A) DPV ve (B) DPKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 11,0 BR) .....	77

Şekil 4.23	(a) Proteini çöktürüldükten sonra etken madde eklenen, (b) proteini çöktürülmeden etken madde eklenen ve sonra proteini çöktürülen serum numunesinin DPKAdS voltamogramı (ÇE: ADCE, $C_{RBK} = 0,06 \mu\text{M}$ , pH: 11,0 BR) .....	80
Şekil 4.24	DPKAdSV yönteminde RBK'nın pik akımına BSA'nın etkisi. BSA derişimleri (a) 0 (b) 8,8 nM (c) 13,2 nM (d) 17,5 nM (e) 22,0 nM (f) 26,3 nM (ÇE: ADCE, $C_{RBK} = 0,1 \mu\text{M}$ , pH: 11,0 BR) .....	81
Şekil 4.25	RBK içeren idrar çözeltilerinin DPKAdS voltamogramlarının derişimle değişimi (ÇE: ADCE, pH: 11,0 BR) .....	82
Şekil 4.26	RBK'nın farklı derişimlerdeki KDV voltamogramları (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: CKE) .....	83
Şekil 4.27	RBK içeren tablet çözeltilerinin KDV voltamogramlarının derişimle değişimi (ÇE: CKE, pH: 7,0 BR) .....	85
Şekil 4.28	Farklı derişimlerde MKB içeren çözeltilerin dönüşümlü voltamogramları: iç grafik $\diamond$ katodik ve $\blacklozenge$ anodik pik akımlarının MKB derişimi ile değişimi (ÇE: ADCE, $v: 0,100 \text{ V/s}$ , pH:10,0 BR, $E_b: -0,8 \text{ V}$ , $E_d: -1,7 \text{ V}$ , $E_s: -0,8 \text{ V}$ ) .....	88
Şekil 4.29	Sabit derişimde MKB içeren çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan dönüşümlü voltamogramları iç grafik: (A) pH 8,0 (B) pik potansiyelinin pH ile değişimi ( $C_{MKB} = 0,3 \text{ mM}$ , ÇE: ADCE, $v: 0,100 \text{ V/s}$ ) .....	90
Şekil 4.30	Sabit derişimde MKB içeren çözelti kullanılarak farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlar: iç grafik: (A) katodik ve anodik pik akımının tarama hızı ile değişimi, (B) katodik ve anodik pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi, (C) katodik ve anodik pik akımının logaritmasının tarama hızının logaritması ile değişimi, (D) katodik pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi (ÇE: ADCE, $C_{MKB} = 0,3 \text{ mM}$ , pH:10,0 BR, $E_b: -1,0 \text{ V}$ , $E_d: -1,7 \text{ V}$ , $E_s: -1,0 \text{ V}$ ; $\diamond$ katodik pik, $\blacklozenge$ anodik pik) .....	91
Şekil 4.31	MKB'nin elektrokimyasal davranışına adsorpsiyonun etkisi (A) $i_{p,k}/C$ oranının MKB derişimi, (B) $i_{p,k}/Cv$ oranının tarama hızı, (C) $i_{p,k}/Cv^{1/2}$	

	oranının tarama hızı ile değişimi (ÇE: ADCE, $C_{MKB} = 0,3 \text{ mM}$ , pH: 10,0 BR) .....	93
Şekil 4.32	MKB moleküllerinin ADCE yüzeyinde gerçekleşen elektroindirgenme tepkimesi için önerilen mekanizma.....	95
Şekil 4.33	Farklı derişimlerde MKB içeren çözeltilerin dönüşümlü voltamogramları: iç grafik anodik pik akımının MKB derişimi ile değişimi (ÇE: CKE, $v: 0,100 \text{ V/s}$ , pH: 6,0 BR, $E_b: 0,0 \text{ V}$ , $E_d: 1,6 \text{ V}$ , $E_s: 0,0 \text{ V}$ ).....	98
Şekil 4.34	Sabit derişimde MKB içeren çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan dönüşümlü voltamogramları: iç grafik: pik potansiyelinin pH ile değişimi ( $C_{MKB} = 15,0 \text{ } \mu\text{M}$ , ÇE: CKE, $v: 0,100 \text{ V/s}$ ) .....	99
Şekil 4.35	Sabit derişimde MKB içeren çözelti kullanılarak farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlar: iç grafik: (A) pik akımının tarama hızı ile değişimi, (B) pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi, (C) pik akımının logaritmasının tarama hızının logaritması ile değişimi, (D) pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi (ÇE: CKE, $C_{MKB} = 13,6 \text{ } \mu\text{M}$ , pH:6,0 BR, $E_b: 0,5 \text{ V}$ , $E_d: 1,4 \text{ V}$ , $E_s: 0,5 \text{ V}$ ) .....	100
Şekil 4.36	MKB'nin elektrokimyasal davranışına adsorpsiyonun etkisi: (A) $i_{p,k}/C$ oranının MKB derişimi, (B) $i_{p,k}/Cv$ oranının tarama hızı, (C) $i_{p,k}/Cv^{1/2}$ oranının tarama hızı ile değişimi (ÇE: CKE, $C_{MKB} = 13,6 \text{ } \mu\text{M}$ , pH: 6,0 BR) .....	101
Şekil 4.37	MKB moleküllerinin CKE yüzeyinde gerçekleşen elektroyükseltgenme tepkimesi için önerilen mekanizma .....	102
Şekil 4.38	KDKAdSV yönteminde (A) biriktirme potansiyelinin ve (B) biriktirme süresinin pik akımına etkisi (ÇE: ADCE, $C_{MKB}: 0,14 \text{ } \mu\text{M}$ , pH 8,5 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ ).....	104
Şekil 4.39	DPKAdSV yönteminde (A) biriktirme potansiyelinin ve (B) biriktirme süresinin pik akımına etkisi (ÇE: ADCE, $C_{MKB}: 0,14 \text{ } \mu\text{M}$ , pH 8,5 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ ) .....	104
Şekil 4.40	KDV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{MKB}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE).....	105

Şekil 4.41	KDKAdSV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{MKB}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE, $E_{bir}$ : -0,55 V, $t_{bir}$ : 30 s).....	105
Şekil 4.42	DPV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{MKB}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE).....	106
Şekil 4.43	DPKAdSV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{MKB}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE, $E_{bir}$ : -0,65 V, $t_{bir}$ : 60 s).....	106
Şekil 4.44	MKB tayini için standart katma kalibrasyon grafikleri: (A) KDKAdSV ve (B) DPKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 8,5 NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> Cl. Her bir veri ayrı ayrı elde edilen 5 kalibrasyon eğrisi için ortalama değer olup hata çubukları ile birlikte verilmiştir.) .....	109
Şekil 4.45	MKB içeren tablet çözeltilerinin voltamogramlarının derişimle değişimi: (A) KDV ve (B) KDKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 8,5 NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> Cl) .....	110
Şekil 4.46	MKB içeren tablet çözeltilerinin voltamogramlarının derişimle değişimi: (A) DPV ve (B) DPKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 8,5 NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> Cl) .....	110
Şekil 4.47	(a) Proteini çöktürüldükten sonra etken madde eklenen, (b) proteini çöktürülmeden etken madde eklenen ve sonra proteini çöktürülen serum numunesinin KDKAdS voltamogramı (ÇE: ADCE, $C_{MKB}$ = 0,11 µM, pH 8,5 NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> Cl).....	113
Şekil 4.48	KDKAdSV yönteminde MKB'nin pik akımına BSA'nın etkisi. BSA derişimleri (a) 0 (b) 8,8 nM (c) 17,5 nM (d) 22,0 nM (ÇE: ADCE, $C_{MKB}$ = 40,0 nM, pH 8,5 NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> Cl) .....	114
Şekil 4.49	KDV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{MKB}$ ) ile değişimi, ÇE: CKE).....	115
Şekil 4.50	MKB içeren tablet çözeltilerinin KDV voltamogramlarının derişimle değişimi (ÇE: CKE, pH: 6,0 BR).....	117

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler.....	39
Çizelge 4.1 RBK tayini için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak değerlendirilmesiyle hesaplanan regresyon parametreleri.....	74
Çizelge 4.2 Dört farklı voltametrik yöntemle Edronax <sup>®</sup> tabletlerinde RBK tayininde doğrudan kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar .....	78
Çizelge 4.3 Dört farklı voltametrik yöntemle Edronax <sup>®</sup> tabletlerinde RBK tayininde standart katma yöntemiyle elde edilen sonuçlar.....	78
Çizelge 4.4 DPKAdSV yöntemiyle idrar numunelerinde RBK tayininden doğrudan kalibrasyon ve standart katma ile elde edilen sonuçlar.....	82
Çizelge 4.5 RBK tayini için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak değerlendirilmesiyle hesaplanan regresyon parametreleri.....	84
Çizelge 4.6 KDV yöntemiyle Edronax <sup>®</sup> tabletlerinde RBK tayininde doğrudan kalibrasyon ve standart katma ile elde edilen sonuçlar .....	86
Çizelge 4.7 Edronax <sup>®</sup> tabletlerinde RBK tayini için geliştirilen voltametrik yöntemlerin türev spektrofotometre yöntemi ile istatistiksel olarak karşılaştırılması .....	87
Çizelge 4.8 MKB için kronokulometri tekniğiyle elde edilen yüzey kaplama katsayısı ( $I$ ) değerleri.....	96
Çizelge 4.9 MKB tayini için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak değerlendirilmesiyle hesaplanan regresyon parametreleri.....	107
Çizelge 4.10 Dört farklı voltametrik yöntemle Aurorix <sup>®</sup> tabletlerinde MKB tayininde doğrudan kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar .....	111
Çizelge 4.11 Dört farklı voltametrik yöntemle Aurorix <sup>®</sup> tabletlerinde MKB tayininde standart katma yöntemiyle elde edilen sonuçlar <sup>a</sup> .....	111
Çizelge 4.12 MKB tayini için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak değerlendirilmesiyle hesaplanan regresyon parametreleri.....	116



Çizelge 4.13	KDV yöntemiyle Aurorix® tabletlerinde MKB tayininde doğrudan kalibrasyon ve standart katma ile elde edilen sonuçlar .....	118
Çizelge 4.14	Aurorix® tabletlerinde MKB tayini için geliştirilen voltametrik yöntemlerin HPLC yöntemi ile istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	119
Çizelge 5.1	RBK tayini için literatür özeti .....	123
Çizelge 5.2	MKB tayini için literatür özeti .....	124

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde toplumsal bir sağlık sorunu haline gelen depresyon, verimlilik ve iş gücü kaybının yanısıra, tedavi süreciyle birlikte ekonomik kayıplara da yol açmaktadır. Toplumumuzun genelinde hastalık olarak nitelendirilmeyen, dolayısıyla tedavi yoluna gidilmeyen depresyon; fiziksel, biyokimyasal ve ruhsal değişimlere neden olarak kronikleşmekte ve kişiye doğrudan ya da dolaylı olarak zarar vermektedir. Depresyonun alkol ve madde kullanımıyla birlikte intihar eğilimini artırdığı; birçok medikal hastalığın kaynağı olduğu ya da mevcut bir hastalığı olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Dolayısıyla depresyon, en kısa sürede ve en doğru yöntemle tedavi edilmesi zorunlu bir hastalıktır.

Depresyonun tedavisinde kullanılmak üzere günümüzde çeşitli antidepresan ilaçlar üretilmektedir. Ayrıca, yeni ilaç geliştirme çalışmaları da hızla sürdürülmektedir. Bu çalışmalar ile farklı etki mekanizmaları olan, yan etkileri azaltılmış ilaçların kullanıma sunulması hedeflenmektedir. Depresyonun kaynağının ve antidepresan ilaçların etki mekanizmalarının tam olarak aydınlatılamamış olmasından dolayı antidepresan ilacın tedavi sürecindeki başarı yüzdesi hastaya bağlı olarak değişmektedir. Seçilen ilacın etki alanının, etki gücünün, dozunun, kullanım süresinin, yan etkilerinin, diğer ilaçlarla etkileşiminin ve toksik etkilerinin tedavinin başarısı açısından iyi araştırılması gerekir. İlaç geliştirme faaliyetlerinde genel olarak ilaç formülasyonundaki etken maddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri, saflık derecesi, miktarı, kararlılığı, metabolizması, fizyolojik ve biyokimyasal sistemlere etkileri, yan etkileri ve etkileşimleri araştırılır. Bu noktada, validasyonu yapılmış, düşük maliyetli, hassas ve hızlı ilaç analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Araştırma, geliştirme ve kalite kontrol çalışmalarında kullanılmak üzere bilinen pek çok etken madde ve ilaç için geliştirilmiş analiz yöntemleri, Amerikan Farmakopesi (USP) ile Avrupa Farmakopesi (EP) ve İngiliz Farmakopesi (BP)'de yayınlanmaktadır.

Analiz yöntemleri, oluşturulan ilaç formunda yeralan (tablet, kapsül vb) etken maddenin tanımlanmasında, beyan edilen dozun nicel analizinde ve her ilaç formundaki dozun

aynılığını (içerik tekdüzeliği) kanıtlamak amacıyla kullanılmaktadır. Çözünme testleri ilaç formülasyonu geliştirme ve kararlılık çalışmalarında ürün tutarlılığını kontrol amacıyla standartlaştırılmış koşullarda etken maddenin salınımının ölçülmesi için kullanılır. Elde edilen in-vitro değerler klinik çalışmalarda katı doz formlarındaki in-vivo biyoyararlanım ile bağdaştırılabilir (Dong 2006). Etken maddelerin analizinin yanı sıra ilaç formunda bulunan koruyucuların nicel analizinin yapılması da ilacın raf ömrünün belirlenebilmesi açısından önemlidir. Diğer yandan ilacın saflığının ve kararlılığının sağlanabilmesi için üretim sürecinden kaynaklanabilecek safsızlıkların ve bulaşmaların izlenmesi de gereklidir. Ayrıca, klinik çalışmalarda deney hayvanlarından ve gönüllü insanlardan sağlanan fizyolojik sıvılarda (plazma, serum ve hücre özütleri) ilaç ve olası metabolitlerinin tayini için de analiz yöntemleri kullanılmaktadır.

Geliştirilen yeni etken maddeler için mevcut analiz yöntemlerinin daha güvenilir, duyarlı ve uygun maliyetli hale getirilebilmesi önem taşımaktadır. Gelişen teknoloji, kullanımı kolay, hızlı cevap verebilen, otomasyona elverişli ve yüksek duyarlılıkta yeni cihaz ve tekniklerle, yeni analiz yöntemleri geliştirme çalışmalarını mümkün kılmaktadır. Uygulanmasının kolay ve hızlı olması, numune ön hazırlık işlemlerinin sade olması, cihazların kurulum-kullanım maliyetlerinin düşük olması, otomasyona elverişli olması, elde edilen sonuçların kesin, doğru, duyarlı ve özgün olması yöntem ve kullanılan cihaz için avantaj olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanı sıra, her etken madde için alternatif analiz yöntemlerinin bulunması mevzuata uygunluk açısından da önem içermektedir. Yeni analitik yöntemlerin oluşturulması, mevcut analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve bunların validasyonu zaman ve deneyim gerektirdiği gibi oldukça da maliyetlidir.

Sağlıklı yaşam için olası sağlık problemlerinin erken tanı ve teşhisi oldukça önemlidir. Sağlıklı bireylerin plazma, serum ve idrar gibi biyolojik örneklerinde bulunabilecek bazı moleküllerin miktarlarına ait alt ve üst sınırları belirlidir. Herhangi bir sağlık problemine maruz kalmadan, biyolojik öneme sahip bazı moleküllerin tayini ile önleyici tedbirlerin belirlenmesi kadar, gerekli tedavilerin sonuçlarının takip edilmesi de önemlidir. Bunun yanında tedavi amaçlı kullanılan ilaçların ve ilaçlarla bağlantılı moleküllerin ilgili doku ve hücre örneklerinde tayin edilmesi; tedavi ile ilgili ilaca ve

etkilediği organlara ait bazı önemli bilgilerin elde edilmesinde önem arz edebilmektedir. İlaç analizleri veya biyolojik öneme sahip moleküllerin analizlerinde yöntem geliştirilirken biyolojik ortamın karmaşık yapısı ve olası girişim etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için birçok yöntemde; ayırma, saflaştırma, özütleme, deriştirme gibi bazı ön işlemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ön işlemler ise, hem analizin maliyetini arttırmakta hem de analiz için gerekli sürenin uzamasına sebep olmaktadır.

İlaç analizlerinde çeşitli analitik yöntemler kullanılır. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanları kromatografik yöntemlerdir. Infrared spektrofotometri, atomik spektrofotometri, NMR spektroskopisi, kütle spektrometri yöntemleri ile titrimetrik yöntemler de önemli ölçüde kullanılmaktadır.

Biyolojik ortamlarda bulunması muhtemel hücre ve doku bileşenleri ile ilaç ve ilaçla ilgili bazı moleküllerin tayini için genelde kromatografik yöntemler ve bu yöntemler ile uyum sağlayabilen bazı sistemler kombine halde kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin; aynı anda çok sayıdaki molekülün tayinini mümkün kılması, kolay uygulanabilir olması; tekrarlanabilir sonuçlar vermesi gibi birtakım üstünlükleri mevcuttur. Bu üstünlüklerin yanı sıra karmaşık ve pahalı cihazlara gereksinim duyulması gibi dezavantajları da vardır. Ayrıca, bu yöntemlerin gözlenebilme ve alt tayin sınırları biyolojik ortamda bulunan bazı önemli türlerin derişiminin oldukça üzerinde olabilmektedir. Bu durumda orijinal örnekten her hangi bir ön işleme başvurmadan tayin yapmak imkânsız olabilmektedir. Bu yöntemlerin uygulanmasında fazla miktarda kimyasala ihtiyaç duyulması da ayrı bir dezavantajdır.

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

seviyesindeki moleküllerin tayininde kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Elektrokimyasal yöntemlerin özel bir uygulaması olan voltametrik sıyırma yöntemleriyle ise, 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 en önemli üstünlüğüdür.

Bu tez çalışmasında, antidepresan ilaç etken maddesi olarak kullanılan reboksetin metansülfonat (RBK) ve moklobemid'in (MKB) elektrokimyasal davranışının incelenmesi ve bu etken maddelerin nicel tayini için yeni voltametrik yöntemler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Elektrokimyasal davranış incelenmesi sonucu elektrot yüzeyinde indirgenme ve/veya yükseltgenme tepkimeleri için olası tepkime mekanizmaları önerilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilecek yöntemlerin ilaç tabletlerinde, insan serumunda ve idrarda etken madde tayinine uygulanabilirliğinin araştırılması düşünülmüştür.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Bu bölümde çalışma kapsamında ele alınan ilaç etken maddelerin bazı kimyasal, fiziksel ve farmakolojik özellikleri ile literatür taraması sonucu maddelerin tayini için geliştirilmiş mevcut yöntemler ve çalışmanın temelini oluşturan yeni tayin yöntemleri geliştirmek amacıyla kullanılacak olan voltametrik yöntemler irdelenmiştir.

### 2.1 Depresyon ve Antidepresan İlaçlar

Duygudurum bozuklukları çok eski çağlardan beri bilinmektedir. Yazılı belgeler incelendiğinde, Homeros'un kitaplarında betimlenen karakterler ve M.Ö. 450 yıllarında Hipokrat'ın "melankoli" terimini kullanması gibi hususlar depresyonun oldukça eski bir hastalık olduğunun kanıtı olarak kabul görmektedir (Alper 1999, Beck ve Alford 2009).

Duygudurum bozuklukları kalıtsal faktörlere, normal durumdan farklılaşma düzeylerine, hastaların öykülerine ve tedaviye verdikleri yanıtlara, hastalığın seyrine ve sonlanmasına göre çeşitli alt gruplara ayrılır. Duygudurum bozuklukları, sınıflandırma sistemlerine göre çeşitlilik gösterir. Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından yayınlanan "Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı" (DSM-IV)'na göre, esas olarak duygudurum bozuklukları dört grupta incelenir:

- Depresif bozukluk
- Bipolar (iki uçlu) bozukluklar
- Genel tıbbi duruma ve madde kullanımına bağlı bozukluklar
- Başka türlü adlandırılmayan bozukluklar

Depresyon; derin üzüntülü, bazen hem üzüntülü hem bunaltılı bir duygudurumla birlikte, düşünme, konuşma, devinim ve fizyolojik işlevlerde yavaşlama, durgunlaşma ve bunların yanı sıra değersizlik, küçüklük, güçsüzlük, isteksizlik, karamsarlık duygu ve düşünceleri ile oluşan bir sendromdur. Bu sendrom ruhsal ya da ruhsal olmayan bir çok hastalıkta görülebilir (Öztürk ve Uluşahin 2008).

Duygudurum bozuklukları olarak adlandırılan hastalıklarda, depresyon veya kişinin kendisini aşırı derecede iyi hissetmesi (öfori) birincil derece belirtilerdir. Oluşan klinik tabloya birçok belirti eşlik edebilmektedir (Yüksel 2003). Ruhsal çöküntü olarak bilinen depresyon; hüznle başlayıp, yoğun kedere kadar uzanan bir duygudurum bozukluğudur. Çökkün duygudurum içinde olan hastalarda enerji ve ilgi kaybı, suçluluk duygusu, yoğunlaşma güçlüğü, iştah azalması, ölüm ya da intihar düşüncesi belirtileri ortaya çıkabilmektedir. Depresyonun belirtileri; hayattan eskisi kadar zevk almama, isteksizlik, uykusuzluk, iştahsızlık, yorgunluk, unutkanlık ve cinsel ilgide azalmadır. Oluşan bu değişiklikler, kişiler arası ve toplumsal ilişkilerin yanı sıra mesleki işlevsellikte bozulma olarak ortaya çıkabilmektedir (Stahl 2000, Yüksel 2003).

Depresyon başta olmak üzere, duygudurum hastalıkları tüm hastalıklar arasında toplumda en yaygın olan bozukluklardır. Biyokimyasal denge bozuklukları, hormon bozuklukları, kalıtsal yatkınlıklar, ameliyatlar, gebelik ve enfeksiyon hastalıkları gibi alt başlıkları içeren biyolojik nedenler ve psikososyal nedenler birbirleri ile etkileşerek duygudurum bozukluklarına neden olabilirler. Depresyonla ortaya çıkan yetiyitimi toplumdan çekilme, yalnızlaşma, boşanma gibi sosyal; ölüm riskinin artması, bedensel sağlığın zayıflaması, sağlık hizmetlerinin fazla kullanılması gibi bedensel; özyıkım, yaşam niteliğinin azalması, bilişsel yetilerde zayıflama gibi psikolojik alanlarda görülür.

Depresyonun kaynağını açıklamaya yönelik çalışmalar yoğun bir biçimde sürdürülmektedir. Genel yaklaşım, beynin kimyasının depresyona yol açtığı şeklindedir. Duygular, beyinde bulunan karmaşık sinir sistemiyle yönetilir. Bilgi, sinir hücreleri arasındaki iletişim ağının kurulduğu sinaps olarak tanımlanan bilgi geçiş noktalarındaki kimyasal ileticiler yolu ile iletilir. Dolayısıyla, klinik ruhsal çöküntünün kimyasal ileticilerin (noradrenalin, dopamin, serotoninin gibi monoaminler) düzensizliğinden ve yetersizliğinden kaynaklandığı kabul edilir.

Depresyonun tedavisinde ilaçların, elektro konsültiv terapinin ve psikoterapinin iyileştirici etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Depresyonun tedavisi günümüzde büyük ölçüde antidepresan ilaçların kullanımına dayanmaktadır.

Çok eski çağlardan beri alkol, tütün, afyon, esrar, kokain, peyote gibi günümüzde psikoaktif ilaçlar olarak bilinen maddeler insan psikolojisini çeşitli amaçlarla etkilemek, acı dindirmek ya da keyif vermek amacı ile kullanılmıştır (Öztürk ve Uluşahin 2008). Çağdaş anlamda psikofarmakolojik çalışmalar 20. yüzyılın ikinci yarısında başlamış ve büyük bir hızla gelişmiştir. Günümüzde depresyonun tedavisinde etkili ilaçlar kullanılmakta ve yeni ilaçlar satışa sunulmaktadır. Kullanılmakta olan depresyon ilaçları etki mekanizmaları, ilaç etkileşimleri ve yan etkileri açısından farklılık göstermekle birlikte; etkinlikleri ve etki hızları açısından birbirinden farklı değildir. Dolayısıyla antidepresan ilaç seçiminde yan etkilerinin ve ilacın etkileşim özelliklerinin dikkate alınması gerekir.

Genel bir yaklaşım olarak, antidepresan ilaçların enzim ya da reseptör önleyicileri ve geri alım önleyicileri olarak etki gösterdikleri düşünülmektedir. Bu yaklaşımdan hareketle, depresyon tedavisinde kullanılan antidepresan ilaçlar etki mekanizmalarına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

- Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI)
  - Seçici olmayan ve geri dönüşsüz MAOI
  - Seçici ve geri dönüşsüz MAOI
  - Seçici ve geri dönüşlü MAOI
- Trisiklik antidepresanlar (TSA)
- Seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI)
- Serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI)
- Noradrenalin seçici geri alım inhibitörleri (NARI)
- Noradrenalin ve dopamin geri alım inhibitörleri (NDRI)

Depresyon tedavisinde kullanılan ilk ilaç, bir monoamin oksidaz inhibitörü (MAOI) olan ve tüberküloz hastalarının kullanımı sırasında depresyona iyi geldiği tesadüfen fark edilen iproniazid'dir (Lieberman ve Tasman 2006). İproniazid, depresyonun tedavisinde başarılı olan antidepresan ilaçların ilk örneğidir. Ancak, bu sınıftaki ilaçlar potansiyel öldürücü ilaç etkileşimleri ve yan etkileri yüzünden günümüzde en az yaygınlıkla kullanılmaktadır.



Trisiklik antidepresanlar, depresyon tedavisinde kullanılan birinci kuşak antidepresanlardır. Bu grup ilaçlar, noradrenalin ve serotoninin geri alınımını seçici olmayarak engeller. Heterosiklik antidepresanlar, ikinci ve üçüncü kuşak ilaçlardır. Trisikliklere benzerler. Güvenilirlikleri artırılmış ve yan etkileri azaltılmıştır. Günümüzde essitalopram, fluoksetin ve sertralin gibi serotonin geri alınımını seçici olarak önleyen ilaçlar geliştirilmekte ve daha yaygın olarak kullanımı sağlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, depresyonun tedavisinde kullanılan reboksetin metansülfonat (RBK) ve moklobemid (MKB) adlı ilaç etken maddeleri incelenmiştir. Etki biçimine göre, reboksetin metansülfonat, seçici noradrenalin geri alım önleyicisi sınıfında; moklobemid ise, geriye dönüşlü monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI) sınıfında yer alan antidepresan ilaç etken maddeleridir.

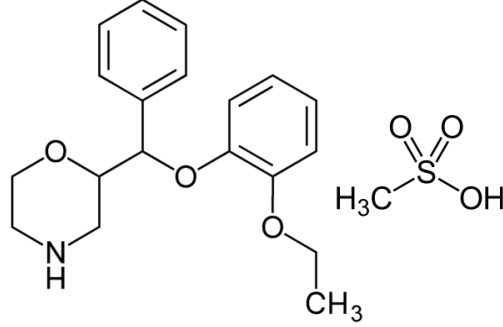
### **2.1.1 Reboksetin metansülfonat (RBK)**

Şekil 2.1’de molekül yapısı verilen RBK, her türlü depresyonun tedavisinde etkili bir şekilde kullanılır. Enerji azlığı, ilgi ve motivasyon eksikliği gibi belirtilerde daha etkin olması beklenir. İlaç formülasyonu 4 mg reboksetine eşdeğer 5,2 mg reboksetin metansülfonat içeren film kaplı tabletler halindedir. Formülasyonunda mikro kristal selüloz, susuz kalsiyum hidrojen fosfat, krospovidon, silikon dioksit ve magnezyum stearat da kullanılır (Raggi vd. 2002).

#### ***Fiziksel özellikleri***

RBK, beyaz renkte ve kokusuz bir tozdur. Metanol, dimetilformamit ve dioksanda çözünür, etanol ve suda ise kısmen çözünür.  $pK_a$  değeri yaklaşık  $8,34 \pm 0,20$  dir (Barri ve Jönsson 2004).

### ***Kimyasal yapısı***



Şekil 2.1 RBK'nın molekül yapısı

IUPAC adı : (2S)-2-[(S)-(2-etoksifenoksi)-fenilmetil]morfolin; metansülfonat  
Kapalı formülü : C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>S  
Mol kütlesi : 409,5 g mol<sup>-1</sup>

### ***Farmakolojik özellikleri***

Seçici noradrenalin geri alım önleyici (NARI) olan RBK, sinaptik boşluktaki noradrenalin seviyesini tekrar eski haline getirir ve böylece antidepresan etki ortaya çıkar (Koroğlu 2007).

### ***Farmakokinetik özellikleri***

RBK, oral yolla alındıktan sonra mide-bağırsak (gastrointestinal) sisteminde iyi emilir. RBK'nın tedavi edici derişim aralığının 10,0-100,0 ng mL<sup>-1</sup> dir (Baumann vd. 2004, Laux vd. 2007). Yüksek orandaki ilk geçiş metabolizması nedeni ile biyoyararlanımı % 94 oranındadır. Plazma proteinlerine % 98 oranında bağlanır (Kadhe vd. 2003). Plazmada pik düzeyine 2-4 saatte, kararlı düzeye 5 günde ulaşır. RBK oral yolla alındıktan sonra % 10'luk kısmı idrarla değişmeden atılır (Kadhe vd. 2003), kalanı karaciğerde metabolize olur. Karaciğerde metabolizasyon, etoksifenoksi halkasının hidroksilasyonu, 2-O-dealkilasyonu ve morfolin halkasının morfolon türevlerine yükseltgenmesi ile gerçekleşir. Aktif metaboliti yoktur (Işık 1991, Yüksel 2003).

### ***Tedavi edici (terapotik) kullanımı***

Oral yolla günde iki kez 4 mg alınarak başlanan tedavi, üç hafta sonra yeterli klinik yanıt alınmaması durumunda günde 10 mg'a kadar artırılarak sürdürülür. Önerilen en yüksek günlük doz 10 mg'dır (Öztürk ve Uluşahin 2008).

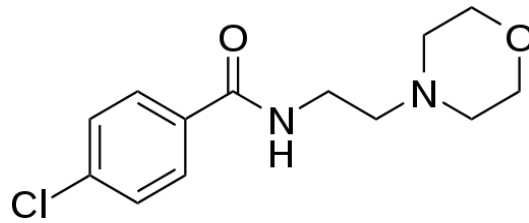
### **2.1.2 Moklobemid (MKB)**

MKB, depresyonun ve sosyal fobinin tedavisinde, panik bozukluğu olan hastalarda ve sık olmamakla birlikte obsesif-kompulsif bozukluğu olan hastalarda kullanılır (Şekil 2.2). Bir benzamit türevi olan MKB, serotonin, noradrenalin ve dopaminin deaminasyonunu engeller. İlaç formülasyonu, 150 mg ya da 300 mg MKB içeren film kaplı tabletler halindedir. Formülasyonda laktoz, mısır nişastası, povidon, sodyum glikolat ve magnezyum stearat da bulunur. Film tabakası ise, metilhidroksipropilselüloz, etil selüloz, polietilen glikol ve pudra içerir. Renklendirici olarak titanyum dioksit ve sarı demir oksit kullanılır (www.roche.com 2009, <http://www.medsafe.govt.nz> 2010).

### ***Fiziksel özellikleri***

MKB, beyaza yakın renkte ve belirgin kokusu olmayan bir tozdur. Çözünürlüğü (25 °C'de, g / 100 mL çözücü) kloroformda 33,6; metanolde 11,8 ve suda 0,4'tür.  $pK_a$  değeri yaklaşık 6,02'dir (Ignjatovic vd. 2009).

### ***Kimyasal yapısı***



Şekil 2.2 MKB'nin molekül yapısı

IUPAC adı : 4-kloro-N-(2-morfolin-4-etil)benzamid  
Kapalı formülü : C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Mol kütlesi : 268,7 g mol<sup>-1</sup>

### ***Farmakolojik özellikleri***

MKB, etki mekanizmasına göre seçici geri dönüşlü monoamin oksidaz-A (MAO-A) önleyici sınıfındadır. MAO-A, nörotransmitter olarak tanımlanan noradrenalin, serotonin, dopamin gibi monoaminlerin metabolizmasında yer alan bir enzim olup monoaminleri, ilgili karboksilik asitlere dönüştürür. Antidepresan olarak kullanılan MKB, monoamin oksidaz enzimini engelleyerek noradrenalin, serotonin, dopamin gibi nörotransmitterlerin sinapstaki düzeylerini ve etkinliğini artırır (Köroğlu 2007).

### ***Farmakokinetik özellikleri***

MKB için günlük uygulanan doz 150-300 mg'dır. MKB oral yoldan alındıktan sonra mide-bağırsak (gastrointestinal) sisteminden tamamen emilerek portal dolaşıma geçer ve 1-2 saatte plazmada en yüksek düzeyine ulaşır. MKB'nin absorpsiyonu oldukça hızlıdır ve devam eden kullanımında biyoyararlanımı % 90'a ulaşır (Raaflaub vd. 1984). MKB'nin tedavi edici derişim aralığı 300,0-1000,0 ng mL<sup>-1</sup> dir (Laux vd. 2007, Baumann vd. 2004). MKB plazma proteinlerine % 50 oranında bağlanır. (Mayersohn ve Guentert 1995). Verilen dozun tamamına yakını karaciğerde morfolin N-yükseltgenmesi yolu ile metabolize olur. Bu sebepten kaynaklı uygulanan günlük dozun % 0,5'den daha az kısmının idrarla değişmeden vücuttan atıldığı bilinmektedir (Jauch vd. 1990, Nair vd. 1993). Plazma ve idrarda toplam 19 metaboliti saptanmış olup, metabolitler farmakolojik olarak aktif değildir.

### ***Tedavi edici (terapotik) kullanımı***

Tedaviye günlük 150-300 mg dozlarla başlanması; ilacın günde iki üç defa olmak üzere bölünmüş dozlar halinde alınması gerekir. İlaç biyoyararlanımı bir haftalık sürede

arttığından, bir hafta sonra doz artışına gidilir ve 600 mg gün<sup>-1</sup> doza çıkarılır. Klinik uygulamalarda gerektiğinde 750 mg gün<sup>-1</sup> doza çıkarılabilir (Öztürk ve Uluşahin 2008).

## 2.2 İlaç Analiz Yöntemleri

İlaç analiz yöntemleri, toksik derişim seviyesi esas alınarak, klinik çalışmalarda biyolojik ortamdaki tedavi edici ilaç dozunun belirlenmesinde kullanılır. Pek çok maddenin çeşitli numunelerinin analizinde yaygın olarak spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerden yararlanılır. Kromatografik tekniklerin diğer yöntemlere göre duyarlı, özgün, kararlı ve hızlı sonuçlarının düşük dozlar için de mümkün olması yanında çoklu karışımlara uygulanabilirliği en önemli üstünlüğüdür. Ancak, cihaz ve kullanılan kimyasalların maliyetlerinin oldukça yüksek olduğunun belirtilmesi gerekir. Sıvı kromatografi yönteminin yanında, pek çok ilaç etken maddesinin absorbans özelliğine sahip olması dolayısıyla spektrofotometrik teknikler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin kullanımı zaman alıcı özütleme işlemleri ya da türevlendirme çalışmalarını gerektirir. Bu nedenlerden dolayı, cihaz ve kullanım maliyetleri daha düşük, basit, hızlı ve duyarlı elektroanalitik yöntemler bu yöntemlerin alternatifi olarak ön plana çıkmaktadır. Biyolojik numunelerin ve ilaçların analizinde elektroanalitik yöntemlerin kullanımı gittikçe artmaktadır. Kolayca ve güvenle kullanılabilir, geniş çeşitliliğe sahip elektrotların, cihazların ve elektroanalitik yöntemlerin ticari olarak geliştirilmesi bu yaygın kullanımın en önemli sebepleridir. İlaç etken maddelerinin birçoğu elektroanalitik yöntemlere cevap vermektedir. Bu yöntemlerle saf etken maddelerin analizi, çözünmeyen ilaç katkı maddelerine, serumda ve plazmada bulunabilen bozucu etkilere rağmen girişim etkisi olmaksızın duyarlı bir şekilde yapılabilir. Elektroanalitik yöntemlerin diğer yöntemlere göre en önemli üstünlükleri; analiz için az miktarda etken maddenin ve çözücünün kullanıldığı ekonomik bir yöntem olması, kolay uygulanabilir olması, analitlerin ön saflaştırma işlemine ihtiyaç duyulmaması ve oldukça duyarlı olması (Kissinger ve Heineman 1996, Zuman 2006) şeklinde sıralanabilir.

Devam eden bölümlerde, elektroanalitik yöntemlerle ilgili genel bilgiler yer almaktadır.

### 2.2.1 Elektroanalitik yöntemler

Elektroanalitik yöntemler; akım, potansiyel, yük gibi elektriksel niceliklerin ölçümü ya da bunların kimyasal parametrelerle olan ilişkileri olarak tanımlanan elektrik ve kimya arasındaki karşılıklı etkileşimin incelenmesi temeline dayanır. Homojen bulk çözeltilerinde oluşan pek çok kimyasal ölçümün aksine, elektrokimyasal işlemler elektrot-çözelti arayüzeyinde gerçekleşir. Elektroanalitik teknikler arasındaki fark, miktar tayini için kullanılan elektrik sinyalinin dalga şekillerinin çeşidi ile yansıtılır. Potansiyometrik ve potansiyostatik olmak üzere elektroanalitik ölçümlerin prensipte iki çeşidi vardır. Bunlar, elektrokimyasal hücreyi oluşturan en az iki elektrot (iletken) ve iletken çözelti (elektrolit) gerektirir. Böylece elektrot yüzeyinde iyonik ve elektronik iletken arasındaki bağlantı sağlanır (Wang 2006).

Elektroanalitik yöntemler, net akımın sıfır olduğu denge durumundaki statik ( $i = 0$ ) yöntemler ve denge durumundan uzakta net akımın gözlemlendiği dinamik ( $i \neq 0$ ) yöntemler olmak üzere esas olarak iki ana grupta sınıflandırılmaktadır (Zoski 2007).

Dinamik yöntemler genelde ya potansiyel kontrollü ya da akım kontrollüdür. Potansiyel veya akımın kontrol edildiği yöntemlerde bu parametreler büyük genlikli veya küçük genlikli olarak uygulanır.

Elektroanalitik yöntemlerin çok çeşitli sınıflandırma yolları vardır. En yaygın olarak kullanılan, kabul görmüş sınıflandırma şekli aşağıda verildiği gibidir. (Kissinger ve Heineman 1996):

- A) Statik ( $i=0$ ) yöntemler
  - a) Potansiyometri
  - b) Seçici elektrotlar
  - c) Potansiyometrik titrasyonlar
- B) Dinamik ( $i \neq 0$ ) yöntemler
  - a) Potansiyel kontrollü yöntemler
    - i) Kronoamperometri
    - ii) Kronokulometri

- iii) Potansiyel kontrollü kulometri
- iv) Voltametri
  - Hidronidamik voltametri
  - Puls voltametri
  - Sabit elektrot voltametri (doğrusal taramalı ve dönüşümlü voltametri)
- b) Akım kontrollü yöntemler
  - i) Kronopotansiyometri
  - ii) Kulometrik titrasyon
- c) Yük kontrollü yöntemler

Bu tez çalışmasında, başta voltametrik yöntemler olmak üzere potansiyelin kontrol edildiği elektrokimyasal dinamik yöntemlerden yararlanılmıştır.

Potansiyel kontrollü tekniklerden olan voltametri, elektroaktif türlerin bulunduğu hücrede bulunan elektroda uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesi temeline dayanan elektroanalitik yöntemlerin genel adıdır (Bond 1980, Bard ve Rubinstein 1999, Wang 2006). Polarize olabilen çalışma elektrodunun potansiyeli sistematik bir biçimde değiştirilerek elektroaktif kimyasal türlerin indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sağlanır; gerçekleşen tepkimenin hızının ölçümü, oluşan akım ile belirlenir.

Voltametri, elektrokimyasal tepkimelerin kinetiğinin ve mekanizmasının incelenmesinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Voltametrinin geliştirilen sıyırma ve puls teknikleri kullanılarak, daha duyarlı ve güvenilir eser miktar tayinlerinin gerçekleştirilmesi mümkündür. Pek çok çalışmada voltametrik tekniklerle, düşük maliyetli, yüksek doğruluk ve kesinlikle duyarlı analizler yapılabileceği belirtilmektedir (Wang 2006).

Voltametrinin temel üstünlükleri; az miktarda numune kullanılarak düşük derişimlerde analizlerin yapılabilmesi, numunelerin kolaylıkla analize hazırlanabilmesi, çok bileşenli numunelerin incelenebilmesi, renkli ya da bulanık numunelerle de çalışılabilmesi, analizlerin hızlı, tekrarlanabilir ve güvenilir olması şeklinde sıralanabilir.

Voltametrik yöntemlerde kullanılan çalışma elektrotları; altın, platin, cıva, rutenyum gibi inert metallere (Bishop 1984), pirolitik grafit ve camı karbon (Panzer 1972, Shearer 1972, Tjaden 1976), çinko oksit, iridyum oksit gibi yarı iletken elektrotlardır. Tel, levha, disk biçiminde olan katı elektrotların sabit, döner ya da titreşen çeşitleri vardır. Başarılı bir çalışma elektrotu için elektrotun hazırlandığı materyal;

- kullanıldığı koşullarda kimyasal olarak inert,
- geniş bir potansiyel aralığında elektrokimyasal olarak inert,
- elektron aktarabilir ve elektriksel direnci düşük,
- geniş potansiyel aralığındaki artık akımı düşük olmalıdır.

Bu çalışmada, çalışma elektrodu olarak cıva elektrot ve camı karbon elektrot kullanılmıştır. Cıvanın kimyasal açıdan inert olması ve cıva üzerinde hidrojen gazının aşırı geriliminin diğer elektrotlara göre yüksek olması nedeniyle bu elektrotla daha çok indirgenme olayı; katı elektrotlarla ise, yükseltgenme olayı incelenmiştir.

Cıva elektrodunu çalışma elektrotu olarak kullanışlı kılan bazı karakteristik özellikler vardır. Oda sıcaklığında cıva sıvı halde bulunduğu için, elektrot yüzey alanı geometrik yüzey alanına eşit olur. Ayrıca, her ölçümden önce oluşturulan damla ile yeni bir elektrot yüzeyi oluşturulur. Bu nedenle cıva ile yapılan ölçümlerde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilir. Cıva ile oluşturulan pürüzsüz yüzey, artık akımın en aza indirilmesini sağlar. Hidrojen iyonlarının indirgenmesinden kaynaklanan artık akımda anlamlı bir yükseliş kaydedilmeden önce cıvanın kullanıldığı potansiyel aralığı oldukça negatif potansiyellere doğru genişletilebilmektedir (Munson 1984). Böylece, pek çok indirgenme çalışmasında cıva elektrot kullanmak mümkün olmaktadır. Cıva ile sınırlı sayıda yükseltgenme çalışması yürütülmektedir. Metalik cıvanın düşük pozitif gerilimde (yaklaşık +0,4 V) bile kolayca yükseltgenebilmesi, cıva elektrodun anodik potansiyellerde kullanımını sınırlar. Kullanılan cıvanın temizlenmesinin oldukça zahmetli olması, cıva buharının zehirleyici olması ve kullanılan kılcal kanalın kolaylıkla tıkanabilir olması cıva elektrot kullanımının zorlukları arasında sayılabilir.

Çeşitli formlarda oluşturulan karbon, yaygın olarak kullanılan diğer bir elektrot malzemesidir. Camı karbon, sert ve kırılabilir bir malzemedir. Elektrot yapımında camı



karbona şekil vermek oldukça güçtür. Anodik potansiyellerdeki yükseltgenme çalışmalarında karbon elektrotta kaydedilen artık akım oldukça düşüktür. Camsı karbon pek çok ortamda inert davranış gösterir. Elektrot yüzeyine parlatma işlemi uygulanarak pürüzsüz bir yüzey sağlanmaya çalışılır (Munson 1984).

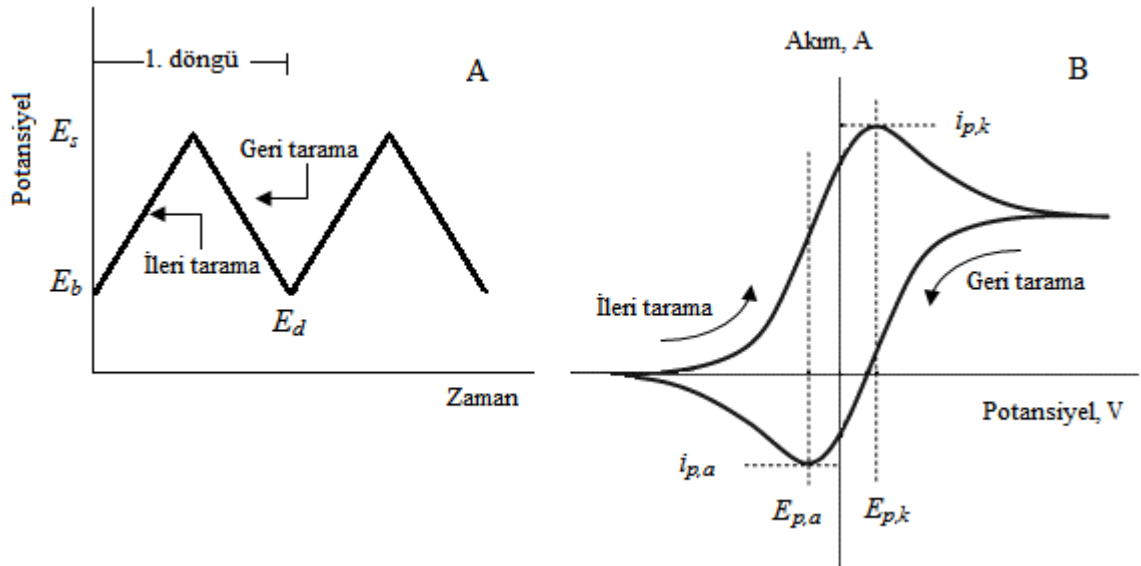
Camsı karbon, yüzeyin deneye hazırlanması, tekrarlanabilirliğin sağlanması açısından önem taşımaktadır. Deney süresince camsı karbon yüzey üzerindeki adsorplanan birikintilerden kaynaklanan elektrot davranışları düzensizlik göstermektedir. Bu nedenle katı elektrot yüzeyinin her ölçümden önce temizlenmesi gerekir. Fiziksel, kimyasal, elektrokimyasal işlemler ya da tüm bu işlemlerin kombinasyonları, deney çözeltisinin bileşenlerine ve derişimine bağlı olarak camsı karbon elektrot yüzeyinin temizlenmesinde uygulanır (Wang 1985, Fagan 1985).

Voltametrik analizlerde, uygulanan potansiyele karşılık elde edilen akım eğrisi voltamogram olarak adlandırılır. Pik akımının büyüklüğü analitin derişimine bağlıdır ve analit hakkında nicel bilgiler elde etmek amacıyla kullanılır. Pik potansiyeli analitin tanımlanmasına hizmet eder. Uygulanan potansiyel sürekli değiştirilerek analiz edilecek maddenin elektrokimyasal davranışı incelenir. Her maddeye ait karakteristik voltamogram, referans elektroda karşılık çalışma elektrotunun potansiyelinin değiştirilmesiyle elde edilen akım-potansiyel eğrileridir. Uygulanan potansiyel aralığında, elektroaktif maddenin yükseltgenme/indirgenme davranışlarına göre değişen elektrokimyasal tepkimeler gerçekleşir.

Voltametrde elektrokimyasal hücreye zamana bağlı değiştirilebilir potansiyelerde uyarma sinyalleri uygulanarak karakteristik akım cevapları elde edilir. Uyarma sinyallerinin dalga şekillerine bağlı olarak; polarografi, diferansiyel puls voltametri, kare dalga voltametri ve dönüşümlü voltametri gibi çeşitli voltametrik yöntemler oluşturulur. Aşağıda, bu tez çalışmasında yararlanılan voltametrik yöntemlerle ilgili kısa bilgiler verilmiştir.

### 2.2.1.1 Dönüşümlü voltametri (DV)

Dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal tepkimeler hakkında bilgi edinmek için ilk akla gelen ve en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde, potansiyel sabit bir hızla belli bir değere kadar çıkarılır sonra aynı ya da değişik bir hızla ilk potansiyel değerine ya da başka bir değere döndürülür (Şekil 2.3, a); oluşan akım potansiyele karşı ölçülür. Elde edilen potansiyel akım grafiği, dönüşümlü voltamogram olarak tanımlanır (Şekil 2.3, b). Bu işlem zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilen akımla defalarca tekrar edilebilir (Gosser 1994, Wang 2006). Potansiyel taraması  $E_b$  ve  $E_s$  arasında yapıldığında ise yöntem “Doğrusal taramalı voltametri” (LSV) olarak tanımlanır.



Şekil 2.3 DV yönteminde (A) potansiyel-zaman sinyali (B) dönüşümlü voltamogram ( $E_b$ : başlama potansiyeli,  $E_d$ : dönme potansiyeli,  $E_s$ : bitiş potansiyeli,  $i_{p,k}$  katodik pik akımı,  $i_{p,a}$  anodik pik akımı,  $E_{p,k}$ : katodik pik potansiyeli,  $E_{p,a}$ :anodik pik potansiyeli)

Elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal tepkime tersinir, tersinmez ya da yarı tersinir bir davranış gösterebilir. Tersinir sistemlerde, ileri yöndeki potansiyel taraması sırasında bir yükseltgenme olmuşsa, potansiyel taraması tersine çevrildiğinde yükseltgenme sırasında oluşan ürünün elektrotta yeniden indirgenmesi ile bu yönde de bir pik gözlenebilir. Tersinir sistemlerdeki bütün potansiyellerde elektron aktarım hızı, kütle aktarım hızından büyük olduğu için elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerlidir. Tersinir sistemler için pik akımı Randles-Sevcik eşitliği ile verilir (Eşitlik 2.1).

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} (25 \text{ } ^\circ\text{C}) \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte:

- $i_p$  : pik akımı (A)
- $n$  : aktarılan elektron sayısı (mol e<sup>-</sup>/mol molekül)
- $A$  : elektrot yüzey alanı (cm<sup>2</sup>)
- $C$  : elektroaktif türün derişimi (mol molekül/cm<sup>3</sup>)
- $D$  : elektroaktif türün difüzyon katsayısı (cm<sup>2</sup>/s)
- $v$  : potansiyel tarama hızı (V/s)

Eşitlik 2.1'den de anlaşılacağı üzere pik akımı, madde derişimine bağılı olarak değişir ve tarama hızının karekökü ile artar. Tersinir bir sistemde elektron aktarımı difüzyon tarafından kontrol ediliyorsa  $i_p-v^{1/2}$  grafiğinin doğrusal olması gerekir. Basit bir tersinir sistem için, anodik ve katodik pik akımları oranının mutlak değerinin 1 olması beklenir. Ayrıca, kaydedilen pik potansiyelleri arasındaki farkın Eşitlik 2.2'ye uyması gerekir. Bu eşitlik kullanılarak, gerçekleşen elektrokimyasal tepkimede aktarılan elektron sayısı hesaplanabilir.

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,k} = \frac{0,059}{n} V \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte;  $E_{p,a}$ , anodik pik potansiyelini (V);  $E_{p,k}$ , katodik pik potansiyelini (V) ve  $n$ , aktarılan elektron sayısını (mol e<sup>-</sup> mol molekül<sup>-1</sup>) ifade eder.

Tersinir elektron aktarımının olduğu tepkimelerde katodik ve anodik pik potansiyelleri tarama hızından bağımsızdır; yarı pik potansiyeli ( $E_{p/2}$ ) ile yarı dalga potansiyelini ( $E_{1/2}$ ) Eşitlik 2.3'teki gibi ilişkilendirmek mümkündür (Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006).

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm \frac{0,028}{n} V \quad (2.3)$$

Tersinmez sistemlerde ise elektron aktarım hızı yeterince büyük olmadığı için elektrot yüzeyinde denge sağlanamaz ve Nernst eşitliği geçersizdir. Düşük tarama hızlarında elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından fazla olduğundan sistem tersinir gibi görünebilir. Tarama hızının artmasıyla kütle aktarım hızı elektron aktarım hızı ile karşılaştırılabilir bir büyüklüğe gelir. Anodik ve katodik pik potansiyelleri tarama hızının artmasıyla birbirinden uzaklaşır. Tamamen tersinmez sistemler, pik potansiyelinin tarama hızı ile kayması şeklinde karakterize edilir. Pik potansiyeli ve yarı pik potansiyeli arasındaki fark  $48/\alpha n$  ( $\alpha$ , yük aktarım katsayısı)'dır.

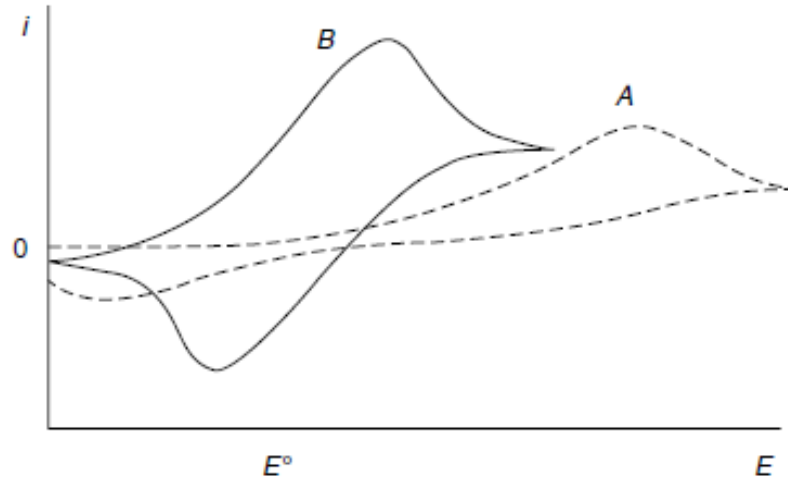
Tam tersinmez bir sistemde anodik pik gözlenmez (Şekil 2.4). Ancak, anodik pikin kaydedilmemesi her zaman elektrot yüzeyinde gerçekleşen tepkimenin tersinmez olduğunu kanıtlamaz. Tersinir sistemlerde, elektron aktarım basamağını takip eden çok hızlı bir kimyasal basamağın varlığında oluşan elektroaktif olmayan ürün hızlı bir şekilde elektrot yüzeyinden uzaklaşır ve bu durumda tersinmez sistemlerde olduğu gibi anodik pik gözlenmeyebilir.

Tersinmez sistemler için pik akımının matematiksel ifadesi Eşitlik 2.4'deki gibidir. Pik akımı tersinir sistemlerde olduğu gibi derişime bağlıdır ve  $\alpha$  değeri ile değişir.

$$ip = (2,99 \times 10^5)n (\alpha n_a)^{1/2} ACD^{1/2}v^{1/2} \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte daha önceki eşitliklerde tanımlanmayan terimlerden;  $n_a$ , hız belirleyen basamaktaki elektron sayısını sembolize etmektedir.

Yarı tersinir sistemlerde (Şekil 2.4) akım, hem elektron aktarımı hem de kütle aktarımı ile kontrol edilir. Tarama hızı arttıkça tersinmezlik eğilimi artar; aynı zamanda pik potansiyelinde tarama hızıyla kayma kaydedilir. Anodik ve katodik pikler birbirinden uzaklaşır (Brett ve Brett 1994, Wang 2006).



Şekil 2.4 DV’de tersinmez (A) ve yarı tersinir (B) mekanizmalara ait voltamogramlar

Tüm bunlara ek olarak, DV tekniği ile elektron aktarımına eşlik eden kimyasal tepkimeler ve bunların mekanizması araştırılabilir. Mekanizmaların sınıflandırılmasında elektrokimyasal basamağı tanımlamak için  $E$ , kimyasal basamağı tanımlanmak için ise  $C$  harfi kullanılır. Literatürde en sık karşılaşılan  $EC$ ,  $CE$  ve  $ECE$  mekanizmalarıyla ilgili genel bilgiler aşağıda sırasıyla verilmiştir.

Bir elektrot tepkimesi, önce bir elektron aktarım basamağı ve ardından onu izleyen bir kimyasal basamaktan oluşuyorsa, Eşitlik 2.5’deki  $EC$  mekanizması geçerlidir. Bu durumda elektron aktarım basamağı sonucu oluşan ürünün ( $R$ ) elektrot yüzeyinden hızlıca uzaklaşma eğiliminde olması dolayısıyla, geri potansiyel taramasında daha küçük bir ters pik kaydedilir (Wang 2006).



Elektrokimyasal basamak tamamen tersinmez ise veriler kinetik açıdan incelenemez. Elektrokimyasal basamağın tersinir olduğu durumda kimyasal tepkime basamağı hızlıysa anodik pik gözlenemezken, kimyasal basamağın hızı düşük ise anodik pik gözlenir.  $EC$  mekanizmasının tersinirlik kriterleri aşağıdaki gibidir:

- $|i_{p,a} / i_{p,k}|$  oranı 1’den küçüktür ve tarama hızı ( $v$ ) arttıkça 1’e yaklaşır.
- $i_{p,k} / v^{1/2}$  oranı tarama hızı ( $v$ ) arttıkça çok az da olsa azalır.

- $E_{p,k}$  tersinir durumdakinden daha pozitifdir.
- Artan tarama hızı ( $v$ ) ile  $E_{p,k}$  negatif değerlere kayar, tarama hızındaki 10 katlık değişim, anodik pik potansiyeli ile katodik pik potansiyeli arasında birinci dereceden tepkimeler için  $30/n$  mV'luk, ikinci dereceden tepkimeler için ise  $19/n$  mV'luk bir kaymaya yol açar.

$EC$  mekanizmasının özel bir hali olan  $EC_{katalitik}$  mekanizmasında elektroaktif tür elektrokimyasal değişikliğe uğradıktan sonra bir kimyasal tepkimeyle tekrar oluşur (Brett ve Brett 1994, Wang 2006).

Bu mekanizmada;

- $i_{p,k}/v^{1/2}$  oranı,  $v^{1/2}$ 'nin azalmasıyla artar.
- $|i_{p,a}/i_{p,k}|$  oranı 1'den küçüktür.
- $i_{p,k}$  düşük tarama hızlarında sınır değere ulaşabilir, Randles-Sevcik eşitliğinden beklenenden daha büyüktür.

Elektrot tepkimesinde, elektroaktif maddenin oluşmasının ardından kimyasal bir tepkimenin meydana gelmesi  $CE$  mekanizması olarak tanımlanır (Eşitlik 2.6).  $C$  basamağı çok yavaş ve  $E$  basamağı tersinir ise akım kinetik kontrollüdür;  $DV$ 'de pik gözlenmez. Akım, değişen potansiyelle belli bir sınır değerine ulaşır.



Elektrot tepkimesinde, elektroaktif türün indirgenmesinden sonra kimyasal bir tepkimenin sonucu oluşan elektroaktif ürünün yine elektroaktif başka bir türe dönüşmesi  $ECE$  mekanizması olarak tanımlanır. Bu mekanizmada  $i_{p,k}/v^{1/2}$  tarama hızı ile değişir; düşük tarama hızlarındaki bu oran yüksek tarama hızlarına göre daha büyüktür.  $|i_{p,a}/i_{p,k}|$  oranı artan tarama hızı ile artar ve yüksek tarama hızlarında 1'e ulaşır (Bard ve Faulkner 2001).

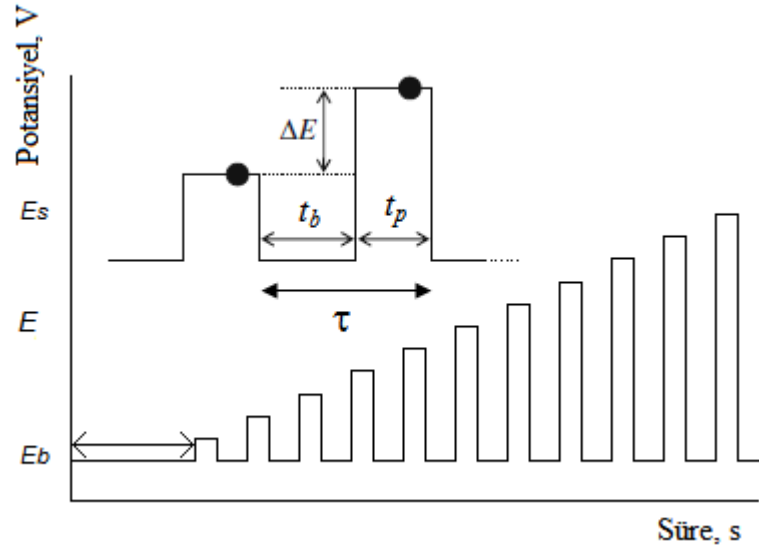
### 2.2.1.2 Puls voltametri

Potansiyel adımı puls voltametrimin temelini oluşturur. Puls tekniklikleri ilk olarak damlayan cıva elektrot için geliştirilmiştir. Hedef, uygulanan pulsların damlanın büyümesiyle birlikte hareket etmesini sağlamak ve damla ömrü sonunda akımın ölçülmesiyle kapasitif akımının katkısını azaltmaktır. Potansiyel pulsu uyguladıktan sonra, çalışma ortamındaki kapasitif akım faradaik akımdan daha hızlı uzaklaşır ve akım uygulanan puls sonunda ölçülür. Akım ölçümlerinin bu şekilde alınması yapılan ölçümlerin duyarlılığını artırmaktadır. Ayrıca, katı elektrot kullanılarak yapılan çalışmalarda da yüzey adsorpsiyonu engellemesinden kaynaklı puls teknikleri önemlidir.

Puls voltametrimin pek çok çeşidi bulunmaktadır. Bu tez kapsamında puls tekniklerinden normal puls voltametri (NPV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve kare dalga voltametri (KDV)'den faydalanılmıştır. Dolayısıyla aşağıda, bu üç yöntemle ilgili bilgilere aşağıda yer verilmiştir.

#### *Normal puls voltametri (NPV)*

NPV'de çalışma elektroduna uygulanan potansiyel pulsu Şekil 2.5'de gösterildiği gibidir (Brett ve Brett 1994, Scholz vd. 2010, www.basinc.com 2011). NPV'de Faradayik akımın normalde olmadığı bir başlangıç potansiyeli belirlenir ve elektroda uygulanır. Bu değerden başlayarak artan basamak adımlarında ( $\Delta E$ ) pulslar uygulanır. Basamak adım yüksekliği her zaman eşittir. Her bir potansiyel pulsu uygulanmadan önce, çalışma elektrodunun potansiyeli bekleme süresi ( $t_b$ ) kadar başlangıç potansiyelinde tutulur ve puls belirlenen süre ( $t_p$ ) zarfında uygulanır. NPV'de akım, uygulanan puls sonlanmadan hemen önce okunur (Şekil 2.5). Ardışık potansiyel pulslarıyla akım incelenen elektroaktif maddenin derişimi elektrot yüzeyinde sıfıra yaklaşıp kadar artar ve sonrasında akım sabit değerine ulaşır.



Şekil 2.5 Normal puls voltametri’de uygulanan potansiyel dalgasının şekli ve yöntem parametreleri ( $E_b$ : başlama potansiyeli,  $E$ : pik potansiyeli,  $E_s$ : bitiş potansiyeli,  $\Delta E$ : iki puls arasındaki potansiyel farkı,  $t_b$ : bekleme süresi,  $t_p$ : puls süresi,  $\tau$ : puls periyodu, •: akım ölçümü)

Her bir potansiyel pulsundan sonra oluşan ürünün başlangıç formuna dönüştüğü düşünüldüğünde NPV’de dalga yüksekliği ( $i_{lim}$ ) aşağıdaki eşitlikle verilir (Scholz vd. 2010).

$$i_{lim} = \frac{nFAD^{1/2}C}{\pi^{1/2}t_p^{1/2}} \quad (2.7)$$

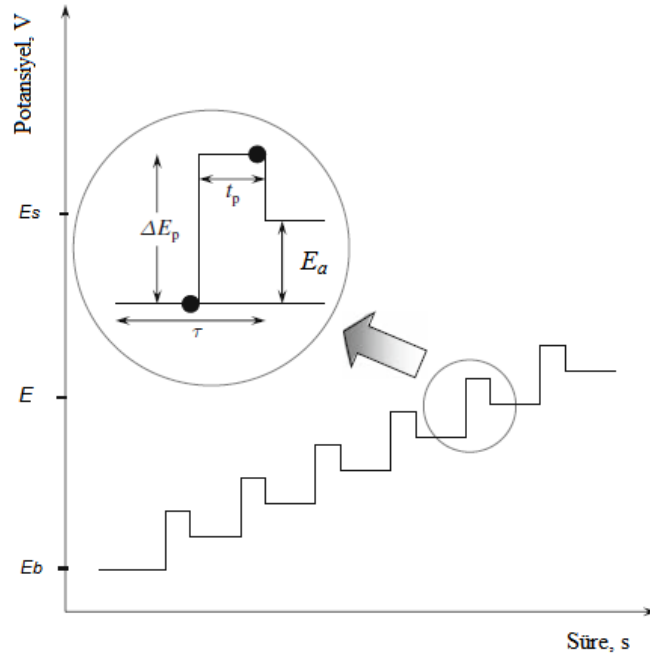
Bu eşitlikte daha önceki eşitliklerde tanımlanmayan terimlerden;  $F$ , Faraday sabitini (96485 C/mol e<sup>-</sup>);  $t_p$ , ölçümün başladığı andan pikin oluşması anına kadar geçen süreyi (s);  $\pi$  ise sabiti (3,14) sembolize etmektedir.

NPV, elektroaktif türün veya elektrokimyasal dönüşüm sonucu oluşan ürünün elektrot yüzeyine adsorbe olup olmadığını kontrol etmek için oldukça faydalı ve pratik bir yöntemdir. İncelenen başlangıç molekülünün yüzeye adsorpsiyonu söz konusu olduğunda kaydedilen voltamogram dalga şeklinden pik şekline dönüşmektedir. Ayrıca, ana dalgadan daha önce bir ön dalga gözlenmesi ise elektrot tepkimesi sonucu oluşan ürünün elektrot yüzeyine adsorbe olduğunun göstergesidir (Scholz vd. 2010).



### Diferansiyel puls voltametri (DPV)

DPV, Faradayik akımın yüksek, kapasitif akımın ise düşük değerlerde olduğu duyarlı bir yöntemdir. DPV’de, doğrusal bir potansiyel rampada tanımlanmış sabit büyüklükte pulsler çalışma elektroduna uygulanır. Böylece, pulsun uygulamasından ve sonlanmasından hemen önce olmak üzere akım iki kere ölçülür. DPV’de potansiyel-zaman profili Şekil 2.6’da verilmiştir (Scholz vd. 2010).



Şekil 2.6 Diferansiyel puls voltametri’de uygulanan potansiyel dalgasının şekli ve yöntem parametreleri ( $E_b$ : başlama potansiyeli,  $E$ : pik potansiyeli,  $E_s$ : bitiş potansiyeli,  $\Delta E_p$ : puls genişliği,  $t_p$ : puls süresi,  $E_a$ : basamaklı adım yüksekliği,  $\tau$ : puls periyodu, •: akım ölçümü)

Kaydedilen akımlar arasındaki fark, potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen diferansiyel puls voltomogramının yüksekliği, analit derişimi ile değişen piklerden oluşur. Diferansiyel puls voltametrisinde pik akımı aşağıdaki eşitlikle verilir (Eşitlik 2.8).

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left( \frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right) \quad (2.8)$$

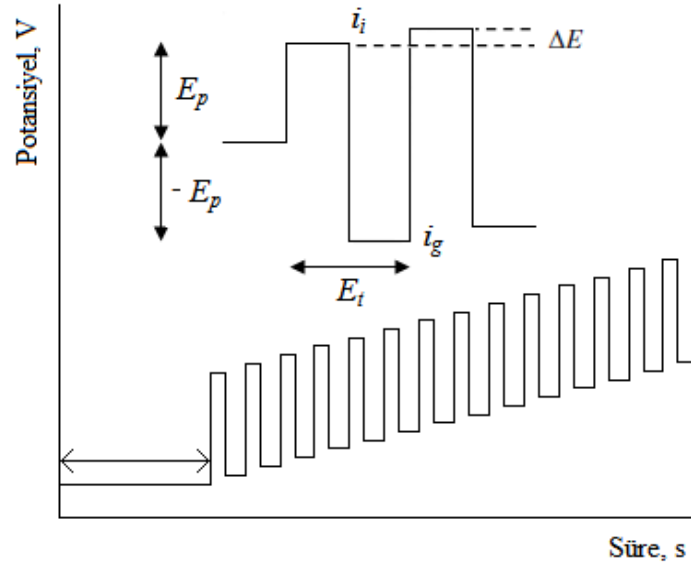
Bu eşitlikte:

$$\begin{aligned}\sigma & : \exp[(nf/RT)(\Delta E/2)] \\ \Delta E & : \text{puls genliği (V)} \\ (1-\sigma)/(1+\sigma) & : 1 \text{ (yüksek puls genliklerinde)}\end{aligned}$$

### ***Kare dalga voltametri (KDV)***

KDV, elektrokinetik ve analitik ölçümlere uygulanabilen hızlı ve duyarlı bir elektrokimyasal puls tekniğidir (Mirceski 2007). Aslında, Ramaley ve Krause tarafından önerilen KDV yönteminde Barker, Kalousek ve Osteryoung formatları olmak üzere temelde üç farklı dalga formu uygulanabilir. Barker kare dalga voltametrisi, anlaşılması en kolay olanıdır. Dalga formu, bir merdiven ya da rampa şeklinde olan, simetrik kare dalga frekansı ve genliği ile sinüzoidal alternatif akım voltametrisinin örneğidir. Kalousek kare dalga voltametrisi, kare dalga voltametrisinin düşük frekans yöntemidir. Voltamogram, kare dalganın sadece ters yarı devrindeki akımın ölçülmesi ile elde edilir. Yaygın olarak kullanılan kare dalga formu Osteryoung kare dalda voltametrisidir. Uygulanan alt potansiyel kare dalganın her tam devrinde ( $\Delta E$ ) kadar artar (Kissinger ve Heineman 1996).

Şekil 2.7'de KDV yöntemi ile elde edilen basamaklı sinyal görölmektedir (Scholz vd. 2010, www.basinc.com 2011). Uygulanan potansiyellere karşılık akım pulsun pozitif ve negatif kısmının sonuna doğru iki kere ölçülür ve akımların farkı alınır. İleri puls bir katodik akımı, geri puls ise bir anodik akımı oluşturur.

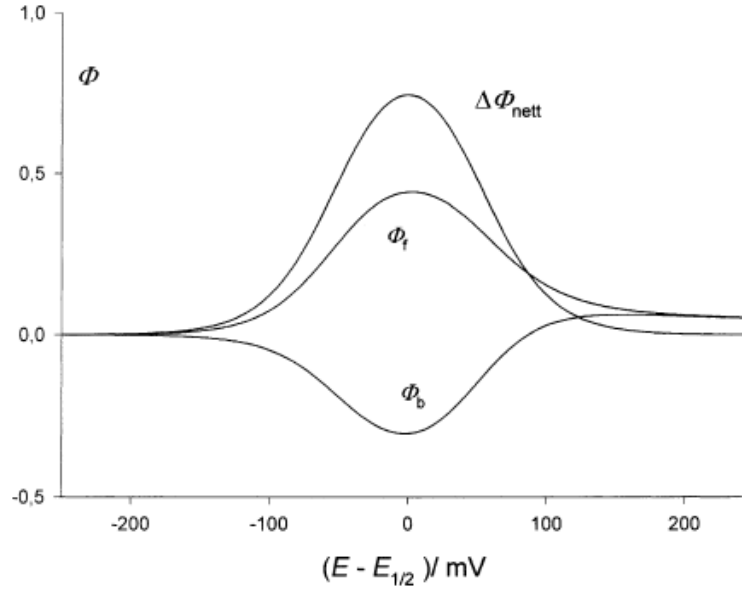


Şekil 2.7 Kare dalga voltametri uygulanan potansiyel dalgasının şekli ve yöntem parametreleri ( $i_i$ : ileri yönlü akım,  $i_g$ : geri yönlü akım,  $\Delta E$ : basamaklı adım yüksekliği,  $E_p$ : ileri yönlü puls genliği,  $-E_p$ : geri yönlü puls genliği,  $E_t$  ( $1/f$ ): puls periyodu,  $f$ : frekans)

Basamaklı sinyalde her basamağın uzunluğu ve puls periyodu ( $E_t$ ) eşittir ve yaklaşık 5 ms civarındadır. Basamaklı sinyalin potansiyel basamağı genellikle 10 mV'dur. Pulsun büyüklüğü ise genelde 50 mV'dur. Sistemin bu şartlar altında çalışması 200 Hz'lik puls frekansına karşılık gelir ve bu durumda 1 V'luk bir tarama 0,5 s'de yapılır. Tersinir bir indirgenme tepkimesinde bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. Şekil 2.8 basit, tersinir hızlı bir tepkime için kare dalganın boyutsuz net cevabını gösterir ve bu cevap aşağıdaki biçimde ifade edilir;

$$\Delta\phi = \Delta i [nFSC(D_r f)^{1/2}]^{-1} \quad (2.9)$$

Bu eşitlikte;  $n$ , aktarılan elektron sayısını (mol  $e^-$ /mol molekül);  $F$ , Faraday sabitini (96485 C/mol  $e^-$ );  $S$ , elektrodun yüzey alanını ( $\text{cm}^2$ );  $C$ , indirgenmiş türün bulk derişimini (mol molekül/ $\text{cm}^3$ );  $D_r$  indirgenmiş türün difüzyon katsayısını ( $\text{cm}^2/\text{s}$ );  $f$ , kare dalga frekansını (Hz);  $E_{1/2}$  ise tepkimenin yarı dalga potansiyelini (V) ifade eder.



Şekil 2.8 Tersinir ve hızlı bir tepkime için kare dalga voltamogramı ( $nE_p=50$  mV ve  $n\Delta E=2$  mV,  $\Delta\Phi_{net}$ : net cevap ve  $\Phi_f$ : ileri ve  $\Phi_b$ : geri bileşenleri)

Böylece Şekil 2.8’de gösterildiği gibi ileri puls bir katodik akımı geri puls ise bir anodik akımı oluşturur. Bu akımların farkı uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilerek kare dalga voltamogramları oluşturulur. Bu fark derişimle doğru orantılıdır, pik potansiyeli de yarı dalga potansiyeline karşılık gelir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini artırmak mümkündür (Skoog vd. 2004, Scholz vd. 2010).

### 2.2.1.3 Voltametrik sıyırma yöntemleri

Sıyırma voltametri, voltametrimin alt gruplarından birisi olan ve elektroanalitik kimyada önemli uygulama alanına sahip tekniklerdendir. Yüksek duyarlılığa ve seçiciliğe sahip bir yöntem olmasından dolayıyla sıyırma voltametri, eser miktar tayinlerinde kullanılır (Thomas ve Henze 2001). Sıyırma voltametrisi yöntemi ile çevre, klinik ve endüstriyel numunelerde duyarlı analizler yapmak mümkündür. Ayrıca, sıyırma voltametrisi teknikleri çoklu element analizlerinde çeşitlendirilerek uygulanabilir.

Sıyırma voltametri, ön derişirme işlemi uygulanarak analit çalışma elektrodunda biriktirilir. Böylece, bu tekniğin en önemli avantajı olan seyreltik çözeltilerde, düşük

tain sınırlarında ( $10^{-10}$  M -  $10^{-12}$  M) çalışma olanağı sağlanmış olur. Biriktirme basamağı sırasında voltametrik hücre içerisindeki çözelti kontrol edilebilir bir hızla karıştırılır. Karıştırma, analitin elektrot yüzeyine ulaşmasına yardımcı olur ve elektrodun difüzyon tabakasını azaltır. Elektrot yüzeyinde biriktirilen maddenin tamamının geri kazanılabilmesi ve yöntemin duyarlılığının iyi olması için karıştırma hızı tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir olmalıdır.

Ön deriştirme işlemini izleyen sıyırma adımında analit, elektrot yüzeyinden çözeltiliye tekrar alınır. Bu sırada kaydedilen akım cevabı, numunedeki analit derişimiyle doğrudan ilişkilendirilir. Sıyırma basamağında DV, KDV ve DPV gibi çeşitli voltametrik teknikler kullanılabilir.

Sıyırma voltametrinde analizin duyarlılığı, karıştırma hızının yanı sıra biriktirme süresine ve biriktirme potansiyeline de bağlıdır. Biriktirme işlemi sırasında elektroda uygulanan potansiyel, belirlenen biriktirme süresinde analitin yarı dalga potansiyelinden birkaç yüz mili volt daha büyük bir potansiyelin uygulanmasıyla belirlenebilir. Duyarlılığı artırabilmek için elektrot yüzeyine mümkün olduğunca çok madde biriktirilmesi amaçlanır. Biriktirme süresinin uzun tutulması, elektrot yüzeyinde biriken madde miktarını artırmanın bir yoludur. Ancak, yöntem geliştirme çalışmalarında uzun analiz süreleri tercih edilmemektedir. Elektrot yüzeyine biriktirilen maddenin çözeltiliye geri verilmesi, istenmeyen etkileşimlerin ve kimyasal tepkimelerin gerçekleşme olasılığının bulunmasından dolayı zorlaşabilmektedir. Elektrot yüzeyi, biriktirme süresi ile doygunluğa ulaşır ve ölçülen akımlarda değişim kaydedilmeye başlar.

Anodik sıyırma voltametri ve katodik sıyırma voltametri, önderiştirme ve sıyırma basamaklarında farklılık gösteren sıyırma voltametrinin iki çeşididir. Anodik sıyırma voltametrisinde, katodik ön deriştirme işleminden sonra daha pozitif potansiyellere doğru potansiyel taraması yapılır ve yükseltgenme akımı ölçülür. Katodik sıyırma voltametri bunun tam tersidir ve indirgenme akımı ölçülür.

Ayrıca, adsorptif sıyırma voltametrisinde tain edilecek madde, adsorptif olarak elektrot yüzeyinde biriktirildikten sonra katodik ya da anodik yönde taranarak elektrot

yüzeyinden sıyrılır. Katodik yönde yapılan taramaya, katodik adsorptif sıyırma voltametri (KAdSV); anodik yönde yapılan taramaya anodik adsorptif sıyırma voltametri (AAdSV) denir.

### **2.3 Kaynak Araştırması**

Bu bölümde RBK ve MKB tayini için yapılmış spektrofotometrik, kromatografik ve elektrokimyasal çalışmalar kısaca özetlenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında bu ilaç etken maddelerinin tayininde voltametrik yöntemlerin kullanılmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, temel farmakopelerde de (Amerikan Farmakopesi, Avrupa Farmakopesi ve İngiliz Farmakopesi) belirtilen etken maddelerin analiz yöntemi ile ilgili bir rapor bulunamamıştır.

#### **2.3.1 RBK tayini için yapılan çalışmalar**

Hartter ve arkadaşlarınca (2000), reboksetin'in nicel analizi için kolon değiştirme, izokratik HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Serum numunesi doğrudan sisteme enjekte edilmiş, 20 µm boyutunda C<sub>8</sub> bağlı silika ile doldurulmuş 10 × 4 mm boyutunda temizleme kolonu, % 2,5 asetonitril–su çözeltisi kullanılarak serum içerisindeki protein ve bozucu etkiler uzaklaştırılmıştır. Lichrospher CN (tanecik boyutu 5 µm) analitik kolonda (250 × 4,6 mm iç çapında) 15 dakikadan az bir sürede ayırma gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 1,5 mL dakika<sup>-1</sup> akış hızında, asetonitril-0,008 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH'sı 6,4'e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ile ayarlanmış) karışımı kullanılmış; UV dedektör kullanarak 273 ve 226 nm dalga boylarında ölçüm yapılmıştır. Reboksetin için alt tayin sınırı 273 nm'de 15 ng mL<sup>-1</sup>, 226 nm'de 4 ng mL<sup>-1</sup>, günler arası standart sapma değerini % 2,7–% 6,7; geri kazanım ise ≥ % 90 olarak hesaplanmıştır. Reboksetin ile birlikte kullanılabilen diğer psikotrop ilaçların analizleri de yapılmış; sonuç olarak, reboksetin'in amisülpirid, olanzapin ve risperidon ile girişim etkisi yapabileceği tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin ilaç analizleri dışında farmakokinetik çalışmalarda da kullanılabilen kesinlik ve doğrulukta sonuç verdiği belirtilmiştir.

Raggi ve arkadaşlarınca (2002), türev spektrofotometre ve kapiler elektroforez ile ilaç tabletlerinde reboksetin'in nicel tayini yapılmıştır. Numunelerin analize hazırlanması için pH 2,5'e ayarlanmış 50 mM fosfat tamponu ile ekstraksiyon işleminden sonra, santrifuj ve seyretme işlemleri yapılmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerde UV bölgede 206 ve 274 nm'de iki maksimum absorbans değeri kaydedilmiş, alınan dördüncü türevler sonucunda 287 nm ve 282 nm dalga boylarındaki değerler kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Dördüncü türev spektrofotometrik yöntemde, doğrusal çalışma aralığı 20-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , gözlenebilme sınırı 7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve alt tayin sınırı 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hesaplanmıştır. Spektrofotometrik tayinde doğruluk (% 99,7 geri kazanım) ve kesinlik (% 3,4 ortalama bağıl standart sapma) açısından tatmin edici sonuçlar elde edildiği; uygulanan yöntemlerin basit, güvenilir, hızlı, ekonomik ve çevreye zarar vermeyen uygulamalar olduğu belirtilmiştir.

Raggi vd. tarafından (2002), reboksetin'in insan serumunda iki farklı yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile tayini yapılmıştır. Reboksetin'in plazmadaki tayini için UV dedektör kullanılarak izokratik sıvı kromatografi yöntemi ve florimetrik dedektör kullanılarak ön kolon türevlendirme yöntemi uygulanmıştır. HPLC–UV yönteminde; durgun faz olarak Varian ters faz ResElut C<sub>8</sub> kolon (150 × 4,6 mm iç çapında, 5  $\mu\text{m}$ ), hareketli faz olarak asetonitril–pH 2,6; 11,3 mM sulu tetrametil amonyum perklorat (40:60, h/h) karışımı 1 mL dakika<sup>-1</sup> akış hızında kullanılmıştır. Ölçümler 230 nm dalga boyunda yapılmıştır. HPLC–FL (florimetri) yönteminde ise durgun faz olarak aynı kolon, hareketli faz olarak tetrahidrofuran–pH 7,5; 0,1 M fosfat tamponu (50:50, h/h) karışımı 1,3 mL dakika<sup>-1</sup> akış hızında kullanılmıştır. Reboksetin 260 nm'de uyarılırken floresans şiddeti 314 nm de izlenmiştir. Dibenzepin'in iç standart olarak kullanıldığı HPLC–UV yönteminde reboksetin için alıkonma süresi 7,8 dakika, HPLC–FL yönteminde ise 14,3 dakika olarak bulunmuştur. Plazmada çok düşük düzeylerdeki reboksetin miktarını tayin etmek için, alt tayin sınırının 11,0 ng mL<sup>-1</sup>, gözlenebilme sınırının 4,0 ng mL<sup>-1</sup> olduğu, 9–florenilmetil kloroformatla türevlendirme işleminin yapıldığı HPLC–FL yöntemi uygulanmıştır. HPLC–UV yönteminde alt tayin sınırı 45 ng mL<sup>-1</sup>, gözlenebilme sınırı 15 ng mL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Plazmada bulunan reboksetin tayini için her iki yöntemin hızlı ve basit uygulamaları ile doğru ve kesin sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir.

Frahnert ve arkadaşlarınca (2003), insan serumunda onsekiz antidepresan ve dört atipik antipsikotiğin ve aktif metabolitlerinin izokratik ters faz HPLC yöntemi ile tayini yapılmıştır. Kromatografik ayırma, ilaç ve metabolitlerinin katı faz ekstaksiyonu sonrasında Nucleosil 100-5-Protect 1 kolonda (250 x 4,6 mm I.D., 5 µm) yapılmıştır. Mobil faz olarak 25 mM potasyum dihidrojenfosfat tamponu (pH 7,0)-asetonitril (60:40) karışımı kullanılmıştır. Reboksetin için kaydedilen alıkonma zamanı 10,2 dakikadır. Reboksetin için belirlenen doğrusal çalışma aralığı 5-1000 ng mL<sup>-1</sup> dir. Geri kazanım değeri % 93,4-% 100,6, gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri sırasıyla % 3,8-% 7,0 ve % 2,9-% 7,0 aralığındadır.

Kirchherr ve Kühn-Velten tarafından (2006), HPLC ve kütle spektrofotometresi kullanılarak 48 tane antidepresan ve antipsikotiğin serumda eş zamanlı nicel tayini için tek örnek-üç enjeksiyon yaklaşımı ile bir yöntem geliştirilmiştir. İlaçlar; düşük, orta ve yüksek derişimde olmak üzere (0,5–2000 ng mL<sup>-1</sup> aralığında) üç gruba ayrılmış; çalışmada Chromolith Speed ROD C<sub>18</sub> (50 mm × 4,6 mm) analitik kolon, metanol ve 5 mM asetik asit (pH 3,9) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Reboksetin için çalışılan derişim aralığı 10-1000 ng mL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiş, alıkonma süresi 3,5 dakika, korelasyon katsayısı 0,9987, geri kazanım % 109 ve alt tayin sınırı 1,43 ng.mL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

Khalil tarafından (2010), reboksetinin insan serumunda eser nicel analizi için otomatik, yüksek seçiciliğe sahip, hızlı bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Numune hazırlama basamağında ön kolon türevlendirme işlemi 7-floro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. İç standart olarak paroksetin kullanılmıştır. Reboksetin ve paroksetin içeren serum numunesi NBD-F ile borat tamponunda (pH 8) 70 °C'de 30 dakika ısıtılarak türevlendirilmiştir. Türevlendirilmiş plazma numunesi ön kolonu (Shim-pack MAY1-ODS, 10 mm × 4, 6 mm I.D., 12 nm gözenek çapı, 50 µm tanecik çapı) bulunan HPLC sistemine enjekte edilmiş, numune 1 dakika süreyle 5 mL dakika<sup>-1</sup> akış hızında asetonitril-% 2 asetik asit (40:60) hareketli fazında yıkanmıştır. Otomatik olarak numunenin analitik kolona geçmesiyle ayırma işlemi yapılmıştır. Kromatografik ayırma işlemi Hypersil 120A (250 mm × 4,6 mm I.D., 5 µm) analitik kolonda 10 mmol L<sup>-1</sup> sodyum asetat tamponu (pH 3,5)-tetrahidrofurana-asetonitril



(55:35:10, h/h/h) karışımı kullanılarak 2,0 mL dakika<sup>-1</sup> akış hızında gerçekleştirilmiştir. Tayin için floresans dedektör kullanılmış ve uyarma dalga boyu 470 nm ve emisyon dalga boyu 530 nm olarak belirlenmiştir. Reboksetin için doğrusal çalışma aralığı 2-500 ng mL<sup>-1</sup>, gözlenebilme sınırı 0,5 ng mL<sup>-1</sup> ve alt tayin sınırı 1,7 ng mL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinin standart sapma değerleri sırasıyla % 2,25 ve % 3,01; geri kazanım değerleri % 100,11 ± 2,24 ve % 100,99 ± 2,98 olarak belirlenmiştir.

### 2.3.2 MKB tayini için yapılan çalışmalar

Stefan ve arkadaşlarınca (1996) nitrobenzende, MKB tayini için MKB-dipikrilamin iyon çifti kompleksiyle sıvı membran elektrot hazırlanmış; bu seçici elektrodun doğrusal çalışma aralığı 10<sup>-3</sup>-10<sup>-6</sup> M, gözlenebilme sınırı 3 × 10<sup>-7</sup> M olarak belirlenmiştir. Seçici, kararlı, tekrarlanabilir ve hızlı sonuçlar elde edilmiştir. Membran elektrotta moklobemidin ilaçlardaki tayini potansiyometrik olarak gerçekleştirilmiş; geri kazanım değeri % 99,96 ve bağıl standart sapma < % 2 olarak hesaplanmıştır.

Adikwu ve Ofokansi (1997) tarafından, moklobemid tayini için basit ve duyarlı bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiş; bu yöntemde moklobemid Lewis bazı, kloranilik asit Lewis asiti olarak kullanılmıştır. Dioksanda hazırlanmış kloranilik asite ilişkin maksimum absorpsiyon 430 nm'de kaydedilmiştir. Kloranilik asit çözeltisi ile moklobemid birebir oranında karıştırılmış; sarımsı-pembe rengin kompleks oluşum sonrasında eflatuna dönüştüğü görülmüştür. Yük aktarım kompleksi oluşumunu doğrulayan, 526 nm'de güçlü bir absorpsiyon piki kaydedilmiştir. Beer kanunu ile uyum 4-36 mg.100 mL<sup>-1</sup> derişim aralığında kaydedilmiştir. Geliştirilen yöntemin yüksek bir geri kazanım oranı ve iyi bir tekrarlanabilirlikle piyasadaki moklobemid içeren tablet analizlerine başarıyla uygulanabileceği belirtilmiştir.

Hoskins ve arkadaşlarınca (2001), plazmadaki moklobemid ve metabolitlerinin (Ro 12-5637 ve Ro 12-8095) tayini için hızlı ve duyarlı sıvı kromatografi-elektrosiprey iyonizasyon kütle spektrometresi (HPLC-ESI-MS) yöntemi geliştirilmiştir. Örnek hazırlama basamağında 0,5 mL plazma için C<sub>18</sub> kartuju kullanarak katı faz

ekstraksiyonu yapılmıştır. Çalışmada Nova-Pak fenil kolon (Waters, 4 µm, 150 × 2 mm), 0,2 M amonyum format tamponu (pH 3,57) ve asetonitril karışımından oluşan (55:45, h/h) hareketli faz kullanılmıştır. Tüm analitler için alt tayin sınırı 0,01 µg mL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

Misztal ve arkadaşlarınca (2002), iç standart olarak nadolol kullanılarak, 1 mL plazma ve 500 mg siyanopropilsilan ile doldurulmuş Bakerbond CN kolonunda katı faz ekstraksiyonuyla moklobemid ve üç metabolitinin miktar tayinini yapılmıştır. Asetonitril-metanol-0,067 M fosfat tamponu (pH 2,65)-% 0,4 trietilamin (12,7:1,9:85:0,4, h/h/h/h) hareketli faz, Nova-Pak C<sub>8</sub>-dp 4 µm ile doldurulmuş analitik kolon (150 × 3,9 mm iç çapında) ve 230 nm UV dedektör kullanılarak 1,3 mL dakika<sup>-1</sup> akış hızında izokratik olarak ayırma ve tayin işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hareketli fazdaki % 0,4 trietilaminin, moklobemid ve metabolitlerinin pik simetrisini iyileştirdiği belirtilmiştir. Nova-Pak C<sub>18</sub> ve LiChrosorb C<sub>18</sub> kolonlarının performansı incelenmiş, tüm bileşenler için Nova-Pak C<sub>8</sub> kolonunun analiz edilen maddeler için en iyi ayırmayı sağladığı gözlenmiştir. Hareketli fazın akış hızının ve pH değerinin pik simetrisine etkisi de incelenmiştir. Hareketli fazın pH'sının 4'den büyük olduğu durumlarda M3 (Ro 12-8095) ve M1 (Ro 16-3177) için; 6'dan büyük olduğu durumlarda moklobemid ve M2 (Ro 12-5637) için pik kuyruklanması olduğu belirlenmiştir. Alt tayin sınırı moklobemid için 10 ng mL<sup>-1</sup>, M1 için 8 ng mL<sup>-1</sup>, M2 için 10 ng mL<sup>-1</sup>, ve M3 için ise 15 ng mL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Üç farklı derişimde yöntemin doğruluğu incelenmiş; moklobemid için 84,55-93,68, M1 için 83,28-92,30, M2 için 86,31-92,66 ve M3 için 88,42-93,40 olarak hesaplanmıştır. Günler arası kesinlik verileri moklobemid için 5,71-7,50, M1 için 2,91-6,58, M2 için 4,98-6,40 ve M3 için 0,94-4,73 olarak hesaplanmıştır.

Amini ve arkadaşlarınca (2004), kan plazmasında moklobemid tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir. Moklobemid'in standart stok çözeltisi metanolde hazırlanmıştır. Kan örnekleri çalışmaya katılan ondört sağlıklı gönüllüden ilacın alımından önce ve 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8 ve 10 saat sonra toplanmıştır. Plazma örneklerinin ekstraksiyonu dipotasyum hidrojen fosfat ve diklorometan ile yapılmış; organik tabaka % 1'lik fosforik asit ile muamele edilmiştir. ODS kolonda (250 mm × 4,6 mm, 5µm), oda sıcaklığında izokratik ayırma yapılmıştır.

Hareketli faz olarak 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-asetonitril-trietilamin (1000:350:10, h/h/h), pH 3,4 karışımı kullanılmıştır. Analizler 1,0 mL dakika<sup>-1</sup> akış hızında gerçekleştirilmiş; moklobemid 240 nm de ultraviyole (UV) bölgede tayin edilmiştir. Moklobemid'in alıkonma süresi 6,7 dakika olarak belirlenmiştir. Doğrusal çalışma aralığı 15,6-2000 ng mL<sup>-1</sup> (korelasyon katsayısı > 0,999), alt tayin sınırı 15,6 ng mL<sup>-1</sup> ve gözlenebilme sınırı 5 ng mL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Ortalama mutlak geri kazanım % 98,2 bulunmuştur. Önerilen yöntemin moklobemid'in plazmada tayininde, basit bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile seçici, kesin ve doğru bir yöntem olduğu; zaman kazandıran ve ekonomik bir yöntem olduğu; farmakokinetik çalışmalara uygun olduğu belirtilmiştir.

Kirchherr ve Kühn-Velten tarafından (2006), HPLC ve kütle spektrofotometresi kullanılarak 48 tane antidepresan ve antipsikotiğin serumda eş zamanlı nicel tayini için tek örnek-üç enjeksiyon yaklaşımı ile bir yöntem geliştirilmiştir. İlaçlar; düşük, orta ve yüksek derişimde olmak üzere (0,5–2000 ng mL<sup>-1</sup> aralığında) üç gruba ayrılmış; çalışmada Chromolith Speed ROD C<sub>18</sub> (50 mm × 4,6 mm) analitik kolon, metanol ve 5 mM asetik asit (pH 3,9) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Moklobemid için çalışılan derişim aralığı 100-10000 ng mL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiş, alıkonma süresi 2,1 dakika, korelasyon katsayısı 0,9997, geri kazanım % 102 ve alt tayin sınırı 5,7 ng mL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

Rakic ve arkadaşlarınca (2007), moklobemid'in ve iki metabolitinin (Ro 12-5637 ve Ro 12-8095) plazmada tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Numune hazırlama basamağında katı faz ekstraksiyonu kullanılmış; 0,5 mL plazma, 25 µL iç standart ve 2 mL, 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8,4) ile karıştırılarak Speedisk<sup>®</sup> H<sub>2</sub>O-Philoc DVB kolondan geçirilmiştir. Ayırma işlemi, Waters XTerra<sup>™</sup> RP18 kolon (5 µm, 150 mm × 4,6 mm) kullanılarak yapılmıştır. Hareketli faz olarak % 1 trietilamin (pH 3,9) içeren 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve asetonitril (83:17, h/h) karışımı kullanılmış; akış hızı 1,2 mL dakika<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. UV dedektör kullanılarak 240 nm'de tayin yapılmıştır. Moklobemid için 0,02-5,00 mg.L<sup>-1</sup>, Ro 12-5637 için 0,02-1,00 mg L<sup>-1</sup>, Ro 12-8095 için ise 0,02-3,00 mg L<sup>-1</sup> derişim aralığı çalışılmıştır. Ortalama mutlak geri kazanımı % 90'dan büyük ya da eşit; alt tayin sınırı 0,02 mg L<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Gözlenebilme sınırı moklobemid ve Ro 12-5637 için 0,005 mg L<sup>-1</sup>, Ro

12-8095 için 0,008 mg L<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Yöntem seçiciliğini kesinleştirmek amacıyla hedeflenen hasta popülasyonunda sıklıkla kullanılan diğer ilaçların potansiyel girişim etkileri de incelenmiştir. Depresif hastalarda, tekli ya da çoklu tedavilerde moklobemid'in ve iki metabolitinin farmakokinetiğini belirlemek için, geliştirilen bu yöntemin klinik farmakokinetik çalışmalarda kullanılabileceği belirtilmiştir.

Plenis vd. (2007), moklobemid'in ve iki metabolitinin (Ro 12-5637 ve Ro 12-8095) insan serumunda RP-HPLC yöntemi ile tayini için yöntem geliştirilmiştir. Hareketli faz olarak, pH değeri 2,7'ye % 85 orto-fosforik asitle ayarlanmış asetonitril-su (25:75, h/h) karışımı, sabit faz olarak Nucleosil 100 (125 × 4; 5 µm) C<sub>18</sub> analitik kolon ve iç standart olarak fenasetin kullanılmıştır. Ön deriştirme işlemi uygulanmış ve tayin UV dedektörle 239 nm'de gerçekleştirilmiştir. Doğrusal çalışma aralığı moklobemid için 20–2500 ng mL<sup>-1</sup>, Ro 12-8095 için 20–1750 ng mL<sup>-1</sup>, Ro 12-5637 için 30–350 ng mL<sup>-1</sup>; alt tayin sınırı moklobemid ve Ro 12-8095 için 10 ng mL<sup>-1</sup> ve Ro 12-5637 için ise 30 ng mL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Sağlıklı 20 gönüllü üzerinde tek doz alımı (Aurorix<sup>®</sup> 150 mg/tablet) ile yapılan değerlendirmeler sonucunda yöntemin farmakokinetik çalışmalar için başarı ile uygulanabileceği belirtilmiştir.

Malfara vd. (2007), en yaygın kullanılan 10 tirisiklik ve tirisiklik olmayan antidepresanın tayini için HPLC yöntemi önerilmiştir. Bu antidepresanlar imitramin, amitriptilin, klomipramin, fluoksetin, sertralın, paroksetin, mirtazapin, moklobemid ve duloksetindir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonuyla moklobemid dışındaki ilaçların geri kazanım değerleri % 72 ile % 86 arasında hesaplanmıştır. Moklobemid için hesaplanan % 59 geri kazanım değeri kabul edilebilir bulunmuştur. İzokratik elüsyon, oda sıcaklığında LiChrospher 60 RP-select B (250 mm × 4 mm, 5 µm) kolonu kullanılarak, 230 nm'de gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz % 35 asetonitril-metanol (92:8, h/h) ve % 65; 0,25 M sodyum asetat tamponu (pH 4,5) karışımından oluşturulmuştur. Moklobemid için doğrusal çalışma aralığı 2,5–1000 ng mL<sup>-1</sup>, alt tayin sınırı 2,5 ng mL<sup>-1</sup> hesaplanmıştır.

Vujic ve arkadaşlarınca (2009), antidepresan olan maprolin, desipramin ve moklobemid'in ters-faz yüksek perormanslı sıvı kromatografisi (PR-HPLC) ile elüsyonu için bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Optimum kromatografik

koşulların belirlenmesi için iki farklı hareketli faz karışımında, sıcaklığın ve akış hızının ayırmaya etkileri Supelcosil LC-18 (120 mm × 4,6 mm, 5 µm) kolonda incelenmiştir. Hareketli faz olarak amonyak-etanol (6:94, h/h) karışımı ve asetonytril kullanılmıştır. Doğrusal çalışma aralığı maprolin için 36,3-400 ng mL<sup>-1</sup>, desipramin için 9,1-100 ng mL<sup>-1</sup> ve moklobemid için 45,45-500 ng mL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Yöntem Auromid® tablet numunelerine başarıyla uygulanmış; geri kazanım değeri 99,48-101,64 olarak belirlenmiştir. Hareketli fazda tampon çözelti kullanılmaması ve numune hazırlama basamağının ekstraksiyon içermemesi yöntemin avantajları olarak belirtilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde, deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ile donanımları, ilaç etken maddeleri ile diğer kimyasal maddeler, çözeltiler ile hazırlanmaları, ilaç tabletlerinin, serum ve idrar numunelerinin analize hazırlamaları ve kullanılan deneysel teknikler kısaca anlatılmıştır.

#### 3.1 Cihazlar ve Malzemeler

Cıva yüzeyindeki elektrokimyasal çalışmalar BAS marka cıva elektrot standı (BAS, CGME), CHI-760 B marka elektrokimyasal çalışma ünitesi; camsı karbon yüzeyindeki çalışmalarda BAS C3 katı elektrot standı, BAS 100W elektrokimyasal çalışma ünitesi kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.1).



*CHI-760 B elektrokimyasal çalışma ünitesi*



*BAS 100 W elektrokimyasal çalışma ünitesi*



*BAS cıva elektrot standı*



*BAS C3 katı elektrot standı*



*BAS camsı karbon elektrot*



*BAS grafit kafes elektrot*



*BAS referans elektrot*



*BAS karşıt elektrot*

Şekil 3.1 Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan elektrotlar ve hücre stantları

Voltametrik çalışmalarda, çalışma elektrodu olarak asılı damla cıva elektrodu (ADCE) ve 3 mm çaplı, camı karbon elektrot (CKE) (BAS MF 2012); karşıt elektrot olarak Pt tel (BAS MW-1032); referans elektrot olarak ise Ag/AgCl elektrot (BAS MF-2052 RE-3M KCl) kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bulk elektroliz çalışmaları, ADCE'deki ilaç etken maddelerinin indirgenmesinde aktarılan elektron sayısının belirlenmesi için, çalışma elektrodu olarak yüzey alanı  $56 \text{ cm}^2$  olan cıva havuzu: CKE'deki ilaç etken maddelerinin yükseltgenmesinde aktarılan elektron sayısının belirlenmesi için ise, BAS marka grafit kafes elektrot (BAS MF-2077), referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot (BAS MF-2052 RE-3M KCl), karşıt elektrot olarak ise Pt tel (BAS MW-1032) kullanılarak yapılmıştır. Voltametrik çalışmaların öncesinde ve sonrasında referans elektrot ile karşıt elektrot kullanılan çözücü-destek elektrolit çözeltisi ve saf su ile yıkanmıştır. Çalışma elektrodu olarak ADCE'nin kullanılmadığı durumlarda, cıva standındaki kılcal seyreltik nitrik asit çözeltisine daldırılarak saklanmıştır. Bu kılcal, çalışmaların öncesinde makul bir süre sırasıyla saf suda ve kullanılan çözücü-destek elektrolit çözeltisinde bekletilmiştir. Çalışmalarda her voltametrik ölçüm öncesi 2 damla cıva akıtılmış ve ölçümlerde taze (temiz) cıva damlası kullanılması sağlanmıştır.

CKE'nin kullanıldığı çalışmalarda, elektrot her ölçümden önce üretici firma tarafından sağlanan temizleme pedi ve alimüna süspansiyonu kullanılarak mekanik olarak temizlenmiştir. Mekanik temizleme aşamasından sonra yüzeyde birikmesi muhtemel organik kirliliklerin giderilmesi için belirli bir süre (1-2 dakika) etanol veya metanolde ultrasonik banyoda tutulmuştur. Sonra elektrot sırasıyla saf su ve kullanılan çözücü-destek elektrolit çözeltisi ile yıkanmıştır. Bazı durumlarda, camı karbon elektrot farklı potansiyel aralıklarında elektrokimyasal olarak temizlenmiştir.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin tartımları, 0,1 mg duyarlılıkla tartım yapan GEC AVERY marka elektronik terazi ve 0,01 mg duyarlılıkla tartım yapan Mettler Toledo marka elektronik terazi ile yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan saf su Elga Purelab marka saf su cihazından elde edilmiştir.

pH ölçümleri, Thermo Orion Model 720A pH-iyon metre ve Orion kombine cam pH elektrodu (912600) sistemiyle yapılmıştır. pH elektrotları, kullanımdan önce primer standart potasyum hidrojenfталat (pH 4,13) ve sodyum bikarbonat (pH 8,20) tampon çözeltileri ile oda sıcaklığında kalibre edilmiştir.

Çözeltileri karıştırılmasında farklı marka ve modellerde manyetik karıştırıcılar kullanılmıştır.

Çalışma elektrotları temizleme ve gerekli çözme işlemleri Ultrasonic LC30H marka ultrasonik banyo kullanılarak yapılmıştır.

### 3.2 Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve temin edildiği firmalar Çizelge 3.1’de alfabetik olarak listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal maddenin adı	Formülü	Saflık derecesi	Temin edildiği firma
Alüminyum oksit	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	Merck, Almanya
Amonyak	NH <sub>3</sub>	> % 25	Merck, Almanya
Amonyum klorür	NH <sub>4</sub> Cl	> % 99,8	Merck, Almanya
Asetik asit	CH <sub>3</sub> COOH	> % 99,5	Merck, Almanya
Asetonitril	CH <sub>3</sub> CN	≥ 99,9% (HPLC saflıkta)	Sigma-Aldrich
Azot gazı	N <sub>2</sub>	% 99,99	Oksan, Türkiye
Borik asit	B(OH) <sub>3</sub>	% 99,5	Merck, Almanya
Albümin (sığır serumundan)	-	≥ % 97	Fluka
Cıva	Hg	Yüksek saflıkta	BDH Chem, İngiltere
Fosforik asit	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	% 85,0	Pancreac, İspanya
Hidroklorik asit	HCl	% 37,0	Pancreac, İspanya
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	≥ 99,9% (HPLC saflıkta)	Riedel-de Haen
Nitrik asit	HNO <sub>3</sub>	> % 65,0	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	NaOH	> % 99,0	Merck, Almanya
Sodyum bikarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	% 99,5-100,5	Sigma-Aldrich
Potasyum hidrojenfталat	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub>	% 99,9-100,5	Merck, Almanya



### 3.3 Standart İlaç Etken Maddeleri

Çalışmada kullanılan standart ilaç etken maddeleri ve temin edildiği firmalar aşağıda verilmiştir:

- *Reboksetin metansülfonat* (RBK): Beyaz ve kokusuz toz halindeki etken madde % 98,0 saflıkta olup Pfizer Inc. Grodon/New London Laboratories'den temin edilmiştir.
- *Moklobemid* (MKB): Beyaz ve kokusuz toz halindeki etken madde % 99,9 saflıkta olup Eczacıbaşı İlaç San. ve Tic. AŞ'den temin edilmiştir.

### 3.4 İlaç Tabletleri ve Biyolojik Sıvılar

Çalışmada, Türk ilaç rehberi Vademecum 2010'da kayıtlı olan aşağıdaki ilaç tabletleri kullanılmıştır:

- *Edronax*: RBK'ya yönelik analitik uygulamalarda, her bir tablette etken madde olarak 4 mg reboksetine eş değer 5,2 mg reboksetin metansülfonata içerdiği bilinen Pfizer Italia S.r.l. tarafından üretilen *Edronax*<sup>®</sup> tabletleri kullanılmıştır.
- *Aurorix*: MKB'ye yönelik analitik uygulamalarda, her bir tablette etken madde olarak 150 mg MKB içerdiği bilinen Roche Müstahzarları San. A.Ş. Türkiye tarafından üretilen *Aurorix*<sup>®</sup> tabletleri kullanılmıştır.

Biyolojik sıvı olarak kullanılan kan serumu ve idrar örnekleri ise sağlıklı gönüllülerden alınmıştır.

### 3.5 Çözeltiler ve Hazırlanışı

#### 3.5.1 Standart etken maddelerin stok çözeltileri

Çalışmalarda kullanılan her bir ilaç etken maddesinden uygun miktarda tartılıp metanolde çözülerek 5,0 mM 25,0 mL ilgili maddelerin stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler ışık almayacak şekilde alüminyum folye ile sarılmış ve +4 °C'de saklanmıştır. Çalışma çözeltileri ise, bu stok çözeltilerin deneysel çalışmalarda kullanılacak olan çözücü-destek elektrolitle seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Seyreltme işlemleri kullanılmadan hemen önce yapılmıştır.

### 3.5.2 Destek elektrolit çözeltileri

*Britton–Robinson tamponu (BR)* (pH 2,0 - 12,0): BR çözeltisi buzlu asetik asit, borik asit ve fosforik asit çözeltilerinden, her bir bileşenin analitik derişimi 0,04 M olacak şekilde, gerekli miktarlarda alınıp hacim 1,0 L olacak şekilde suda çözülerek hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin pH'ları 0,10 M NaOH ve 0,10 M HCl çözeltileri kullanılarak istenilen değere ayarlanmıştır. BR tamponu +4 °C'de saklanmıştır (Rege 2011).

*Amonyak–amonyum klorür tamponu* (pH 8,2 - 10,2): Toplam analitik derişim 1,2 M, pH değeri yaklaşık 8,5 olacak şekilde derişik NH<sub>3</sub> çözeltisi ile NH<sub>4</sub>Cl çözeltisinin belirli oranlarda karıştırılıp hacmin 1,0 L'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin pH'ları 0,10 M NaOH ve 0,10 M HCl çözeltileri kullanılarak istenilen değere ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon çözelti +4 °C'de saklanmıştır.

*Sodyum hidroksit çözeltisi*: 0,10 M NaOH çözeltisi, belirli miktarda katı sodyum hidroksitin ultra saf su ile toplam hacim 25,0 mL olacak şekilde ölçülü balonda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

*Hidroklorik asit çözeltisi*: Derişik HCl çözeltisinin belirli oranda seyreltilmesiyle 0,10 M 25,0 mL HCl çözeltisi hazırlanmıştır.

### 3.6 İlaç Tabletlerinin Analize Hazırlanması

Her bir ilaç için 10 tabletin tamamı tartılarak 1 tabletin ortalama kütlesi belirlenmiş; tartılan bu tabletlerin tamamı porselen havanda öğütülerek toz haline getirilmiş; 1 tabletin kütlesine eşit miktarda tartım alınmış; 100,0 mL'lik ölçülü balona aktarılmıştır. Ölçülü balona yaklaşık 75-80 mL metanol konup 30 dakika ultrasonik banyoda ilaç etken maddesinin çözünmesi sağlanmış ve hacmi metanol ile 100,0 mL'ye tamamlanmıştır. Çözünmeyen destek ve katkı maddelerinin çökmesi için, oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Çökme işlemi tamamlandıktan sonra 100,0 mL'lik ölçülü balondaki karışımın berrak kısmından belirli hacimde çözelti alınmış ve

kullanılan çözücü-destek elektrolitle seyreltilerek analizlerde kullanılmıştır. Tablet çözeltileri kullanılacağı zaman taze olarak çözücü-destek elektrolitle seyreltilmiştir.

### **3.7 Bovin (sığır) Serum Albümin (BSA) Çözeltisi**

Liyofilize BSA'dan uygun miktarda tartılıp saf suda çözülerek 5,0 mM 25,0 mL stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti ışık almayacak şekilde alüminyum folye ile sarılmış ve +4 °C'de saklanmıştır. Çalışma çözeltileri ise, bu stok çözeltilerin saf su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Seyreltme işlemleri kullanılmadan hemen önce yapılmıştır.

### **3.8 Serum Numunelerinin Analize Hazırlanması**

Serum numuneleri söz konusu ilacı kullanmayan gönüllülerden alınmış ve -25° C'de saklanmıştır. Her bir çalışma için 1,0 mL serum numunesine belirli miktarda standart ilaç etken maddesi veya tablet çözeltisi ilave edilmiş ve iki kısma ayrılmıştır. İlk kısım üzerine serum proteinlerini çöktürmek için asetonitril ilave edilmiş ve 2500 devir/dakika hızla 15 dakika santrifüjlenerek çöken proteinler ayrılmıştır. Diğer kısım ise, serum proteinlerini çöktürmeden analizlerde kullanılmıştır. Analizler sırasında, bu kısımlardan alınan belirli miktarlar çözücü-destek elektrolit ile seyreltilmiştir.

### **3.9 İdrar Numunelerinin Analize Hazırlanması**

İdrar numuneleri söz konusu ilacı kullanmayan sağlıklı bireylerden alınmıştır. Her bir çalışma için 1,0 mL idrar numunesine belirli miktarda standart ilaç etken maddesi veya tablet çözeltisi eklenmiş ve toplam hacim 10,0 mL olacak şekilde çözücü-destek elektrolit ile belirli oranlarda seyreltilerek kullanılmıştır.

### 3.10 Deneylerin Yapılışı

#### 3.10.1 Dönüşümlü voltametri

Çalışma çözeltisinin 10,0 mL'sine çalışma, referans ve karşıt elektrotlar daldırıldıktan sonra, çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için, çözeltiden başlangıçta 25-30 dakika argon veya azot gazı geçirilmiştir. İnert gaz geçişi kesildikten sonra (ancak çözelti üzerinden gaz geçirilerek) başlangıç ve bitiş potansiyeli aynı olacak şekilde ayarlama yapıp sabit tarama hızında dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir. Ölçüm aralarında 30 s gaz geçirilmiş ve 2 s'lik durulma süresinden sonra voltamogramlar kaydedilmiştir. Bu voltamogramın pik parametreleri yazılım tarafından otomatik olarak belirlenmiştir.

#### 3.10.2 Diferansiyel puls ve kare dalga voltametri

Çalışma çözeltisinin 10,0 mL'sine çalışma, referans ve karşıt elektrotlar daldırıldıktan sonra, çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için, çözeltiden başlangıçta 25-30 dakika argon veya azot gazı geçirilmiştir. İnert gaz geçişi kesildikten sonra (ancak çözelti üzerinden gaz geçirilerek) basamaklı adım yüksekliği 1-8 mV; sinyal genliği 10-90 mV; puls periyodu 50-300 ms; örnekleme genişliği 50-300 ms; uyarma sinyalinin frekansı (KDV için) 5-250 Hz aralığında değiştirilerek voltamogramlar kaydedilmiştir. Pik akımı ve pik şekli dikkate alınarak optimum parametreler belirlenmiştir.

#### 3.10.3 Kronokulometri

Çalışma çözeltisinin 10,0 mL'sine çalışma, referans ve karşıt elektrotlar daldırıldıktan sonra, çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için, çözeltiden başlangıçta 25-30 dakika argon veya azot gazı geçirilmiştir. İnert gaz geçişi kesildikten sonra (ancak çözelti üzerinden gaz geçirilerek) dönüşümlü voltametriden elde edilen voltamogramlardan yararlanarak indirgenme veya yükseltgenmenin başladığı ve tamamlandığı potansiyeller seçilerek yükün (coulomb olarak) ve akımın zamanla değişimi incelenmiştir.  $Q_{toplam}-t^{1/2}$  ve  $i-1/t^{1/2}$  grafikleri çizilerek elektrokimyasal tepkimeler için difüzyon katsayıları ve yüzey kaplama katsayılarının hesaplanmasında yararlanılmıştır.

Bu amaçla, Cottrell eşitliği (Eşitlik 3.1)

$$i(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2} \quad (3.1)$$

ve bu eşitlikteki akımın 0 -  $t$  zaman aralığında alınan integrali ile yükün zamanla değişimini veren ifade kullanılmıştır:

$$Q_{dif} = \frac{2nFACD^{1/2}t^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (3.2)$$

Buradan, oluşturulan  $Q_{dif} - t^{1/2}$  grafiğinin eğiminden difüzyon kontrollü elektrot tepkime mekanizmalarına ait difüzyon katsayısı hesaplanır. Ancak, çalışılan etken maddeler elektrot yüzeyine adsorplandığından, aşağıdaki ifadeden yararlanılarak yüzey kaplama katsayısı ve difüzyon katsayısı hesaplanmıştır (Eşitlik 3.3, Kissinger ve Heineman 1996):

$$Q_{toplam} = Q_{dif} + Q_{ads} + Q_{\zeta t} \quad (3.3)$$

$$Q_{toplam} = \frac{2nFACD^{1/2}t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + nFA\Gamma_0 + Q_{\zeta t} \quad (3.4)$$

Bu eşitliklerdeki terimler:

$Q_{toplam}$ : elektroliz boyunca sistemden geçen toplam elektriksel yük (C)

$Q_{dif}$  : elektrot yüzeyine difüzyon ile taşınan elektroaktif türün elektrolizi için harcanan yük miktarı (C)

$Q_{ads}$  : Çalışma elektrodu yüzeyine adsorplanan elektroaktif türün elektrolizi için harcanan yük miktarı (C)

$Q_{\zeta t}$  : elektriksel çift tabakadaki kapasitif yüklenme için harcanan yük miktarı (C)

$n$  : aktarılan elektron sayısı (mol  $e^-$ /mol molekül)

$F$  : Faraday sabiti (96485 C/mol  $e^-$ )

- $A$  : elektrot yüzey alanı ( $\text{cm}^2$ )  
 $C$  : elektroaktif türün derişimi ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ )  
 $D$  : elektroaktif türün difüzyon katsayısı ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )  
 $t$  : elektroliz süresi (s)  
 $\Gamma$  : yüzey kaplama katsayısı ( $\text{mol}/\text{cm}^2$ )

Çift tabaka yükü ( $Q_{ct}$ ) hesaplanması için ortamda elektroaktif tür yokken kronokulometri deneyleri yapılmıştır.  $Q_{toplam} - t^{1/2}$  değişim grafiğı çizilmiş ve bu grafiğın kesim noktasından  $Q_{ads} + Q_{ct}$  toplam değeri bulunmuştur. Aynı grafiğın eğiminden, difüzyon katsayısı; kesim noktasındaki verilerden ise, yüzey kaplama katsayısı hesaplanmıştır.

#### **3.10.4 Diferansiyel puls ve kare dalga adsorptif sıyırma voltametri**

Çalışma çözeltilisinin 10,0 mL'sine çalışma, referans ve karşıt elektrotlar daldırıldıktan sonra cihaz parametreleri optimum koşullara ayarlanmış ve çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için, çözeltiden başlangıçta 25-30 dakika argon veya azot gazı geçirilmiştir. İnert gaz geçişi kesildikten sonra (ancak çözelti üzerinden gaz geçirilerek) biriktirme süresi 0-300 s; biriktirme potansiyeli, ADCE ve CKE'nin kullanımına bağılı olarak adsorptif biriktirmeye uygun şekilde, her hangi bir elektrokimyasal dönüşümün gerçekleşmediğı potansiyel aralığında değiştirilip DP ve KD voltamogramları kaydedilmiş; pik akımının en yüksek ve pik şeklinin de en uygun olduğu süre ve potansiyel belirlenmiştir.

#### **3.10.5 Bulk elektroliz (BE)**

Cıva elektrot kullanılarak yapılan BE çalışmalarında, belirli derişimde etken madde içeren 50,0 mL'lik çözeltiler yüzey alanı yaklaşık  $56 \text{ cm}^2$  olan cıva havuzundan oluşan çalışma elektroduna, CKE kullanılarak yapılan BE çalışmalarında ise grafit kafes tel elektrodun bulunduğu hücreye eklenmiştir. Bu çözeltiye, bir referans elektrot ile içerisine sadece destek elektrolit çözeltilisi konulmuş ve gözenekli bir disk ile deney çözeltilisinden ayrılmış bir karşıt elektrot daldırılıp 30-35 dakika inert gaz geçirilmiştir.

Elektroliz devresine, anodik pikler için pik potansiyelinden daha anodik, katodik pikler için ise pik potansiyelinden daha katodik olacak şekilde bir potansiyel uygulanmıştır. Sistemden geçen akım, başlangıç akımının % 0,1'ine ininceye kadar elektrolize devam edilmiştir. Elektroliz için gerekli olan yük miktarından yararlanarak Eşitlik 3.5'den indirgenme veya yükseltgenme tepkimesinde aktarılan elektron sayısı hesaplanmıştır (Kissinger ve Heineman 1996).

$$N = \frac{Q}{nF} \quad (3.5)$$

Bu eşitlikte:

- $N$  : elektroliz olan maddenin miktarı (mol)
- $Q$  : toplam yük (C)
- $n$  : aktarılan elektron sayısı (mol e<sup>-</sup>/mol molekül)
- $F$  : Faraday sabiti (96485 C/mol e<sup>-</sup>)

### 3.10.6 Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması

KDV, DPV, KDAdSV ve DPAdSV yöntemlerinde, çeşitli ilaç etken madde derişimindeki çözeltilerin belirlenen optimum koşullarda voltamogramları alınmış ve pik akımları belirlenmiştir. Ölçülen pik akımları, etken madde derişimine karşı grafiğe geçirilip kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel değerlendirilmesi sonucu doğrusal çalışma aralığı, alt tayin sınırı ve gözlenebilme sınırları hesaplanmıştır.

### 3.10.7 İlaçlarda, serumda ve idrarda ilaç etken madde analizleri

Destek elektrolit ortamına, belirtilen bölümlerdeki gibi hazırlanan, ilaç tablet çözeltilerinden (Bölüm 3.6), serum (Bölüm 3.7) veya idrar (Bölüm 3.8) numunelerinden belirli miktarda ilave edilerek KDV, DPV, KDAdSV ve DPAdSV voltamogramları kaydedilip pik akımları ölçülmüştür. Bölüm 3.9.6'daki gibi hazırlanan kalibrasyon eğrilerinden, etken madde miktarları doğrudan hesaplanmıştır.

Ayrıca, aynı numunelerde etken madde miktarı standart katma yöntemi ile de tayin edilmiştir. Bu amaçla, destek elektrolit ortamına ilgili numunelerden belirli miktarda konmuş ve ilgili voltamogramlar kaydedilerek pik akımları ölçülmüştür. Sonra, bu çözeltiye artan derişimlerde standart etken madde katılmış ve her bir ilave sonrası voltamogramlar alınmış ve pik akımları kaydedilmiştir. Katılan standart etken madde derişimlerine karşı pik akımları grafiğe geçirilerek oluşturulan standart katma grafiklerinin  $x$ -ksenini kestiği noktadan yararlanarak etken madde derişimleri hesaplanmıştır.

### **3.10.8 İlaç - protein etkileşiminin incelenmesi**

Destek elektrolit ortamına, Bölüm 3.6'da belirtildiği gibi hazırlanan ilaç tablet çözeltilerinden ya da standart madde çözeltilerinden belirli miktarda ve Bölüm 3,7'de belirtildiği gibi hazırlanan bovin (sığıır) serum albümin (BSA) çözeltisinden artan derişimlerde eklendikten sonra puls voltamogramları kaydedilip pik akımları incelenmiştir.

### **3.11 Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi**

#### **3.11.1 Doğrusal çalışma aralığı**

Bölüm 3.10.6'da belirtildiği şekilde elde edilen kalibrasyon grafiklerinin regresyon katsayısının ( $R^2$ ) 0,98 ve daha büyük olduğu derişim aralığı doğrusal çalışma aralığı olarak belirlenmiştir.

#### **3.11.2 Doğruluk**

İlaçlar için, üretici firma tarafından verilen nominal değerin ve katılan standart etken madde miktarının (ND); serum ve idrar numunelerinde ise, katılan ilaç etken madde miktarlarının (ND) voltametrik yöntemler kullanılarak bulunan miktarlarına (DD) oranından yararlanarak yüzde geri kazanımları aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır:



$$\% GK = \frac{DD}{ND} \times 100 \quad (3.6)$$

Bu eşitlikte; *GK*, geri kazanım; *DD*, deneysel değer ve *ND*, nominal değerdir.

### 3.11.3 Tekrarlanabilirlik

Pik akımı, pik potansiyeli ve pik alanının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için aynı çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde; aynı şekilde hazırlanmış farklı çözeltiler kullanılarak farklı günlerde optimum şartlarda voltamogramlar kaydedilmiş ve belirtilen parametreler için bağıl standart sapma değerleri en az 5 ölçüm için hesaplanmıştır.

### 3.11.4 Duyarlık

Bölüm 3.10.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan kalibrasyon grafiklerinin eğimi (birim derişim başına sinyal) yöntemin duyarlılığı olarak değerlendirilmiştir.

### 3.11.5 Gözlenebilme sınırı (*LOD*) ve alt tayin sınırı (*LOQ*)

Bölüm 3.10.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan kalibrasyon grafikleri en küçük kareler yöntemiyle değerlendirilmiş ve aşağıdaki formüller kullanılarak gözlenebilme sınırı (*LOD*) ve alt tayin sınırı (*LOQ*) hesaplanmıştır:

$$LOD = \frac{3 \times s_b}{m} \quad (3.7)$$

$$LOQ = \frac{10 \times s_b}{m} \quad (3.8)$$

Burada  $s_b$ , kalibrasyon doğrusunda başlangıç ordinatının standart sapması ve  $m$ , kalibrasyon doğrusunun eğimidir.

### 3.12 Elektron Sayısının ( $n$ ) Hesaplanması

Sabit potansiyelde yapılan BE verilerinden Eşitlik 3.5 kullanılarak aktarılan elektron sayısı hesaplanmıştır. BE çalışmalarından olumlu sonuç alınmadığı durumlarda ise, aktarılan elektron sayısı;

- dönüşümlü voltametrde tarama hızı çalışmalarından,

$$i_p = \frac{nF\vartheta Q}{4RT} \quad (3.9)$$

- tersinmez elektrot mekanizmalarında pik potansiyeli ( $E_p$ ) ile yarı pik potansiyeli ( $E_{p,h}$ ) arasındaki farktan;

$$|E_p - E_{p,h}| = \frac{47,7}{n\alpha} \text{ mV } (25^\circ\text{C}) \quad (3.10)$$

- yarı pik genişliğinden ( $W^{1/2}$ );

$$W^{1/2}(\text{mV}) = \frac{3,52RT}{nF} \quad (3.11)$$

yararlanarak Eşitlik 3.9, 3.10 ve 3.11 kullanılarak hesaplanmıştır.

Bu eşitliklerde daha önceki eşitliklerde tanımlanmayan terimlerden;  $i_p$ , ölçülen akımı (A);  $F$ , Faraday sabitini (96485 C/mol  $e^-$ );  $R$ , ideal gaz sabitini (J/mol K);  $T$ , mutlak sıcaklığı (K);  $\alpha$  ise, yük aktarım katsayısını sembolize etmektedir.

### 3.13 Yük Aktarım Katsayısının ( $\beta$ , $\alpha$ ) Hesaplanması

Yükseltgenme tepkimesi için anodik ( $\beta$ ), indirgenme tepkimesi için katodik ( $\alpha$ ) yük aktarım katsayısı, dönüşümlü voltametri çalışmalarındaki pik potansiyeli ile yarı pik potansiyeli arasındaki farkın (Eşitlik 3.10) ve pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişiminin (Eşitlik 3.12); kare dalga voltametri çalışmalarında ise, pik potansiyelinin uyarma sinyalinin logaritması ile değişiminin Eşitlik 3.10 ve literatürde verilen eşitlikler (Hilali vd. 2005, Wang vd. 2006) ile birlikte kullanılması sonucu hesaplanmıştır.

$$E_p = k + \frac{RT}{(n\alpha)F} \log \vartheta \quad (3.12)$$

Bu eşitlikte,  $E_p$ , pik potansiyelini (V);  $\vartheta$  ise, tarama hızını (V/s) sembolize etmektedir.

### 3.14 Difüzyon Katsayısının ( $D$ ) Hesaplanması

Difüzyon katsayısı, hem Bölüm 3.9.3'de anlatıldığı gibi hem de adsorpsiyon kontrollü elektrot tepkime mekanizmasına sahip maddeler için dönüşümlü voltametrideki tarama hızı verilerinden Eşitlik 3.13 ve Eşitlik 3.14 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (3.13)$$

$$i_p = 1,06 \times 10^6 n^2 ACvD^{1/2} t_p^{1/2} \quad (3.14)$$

Bu eşitlikte daha önceki eşitliklerde tanımlanmayan terimlerden;  $t_p$ , puls süresini (s) sembolize etmektedir.

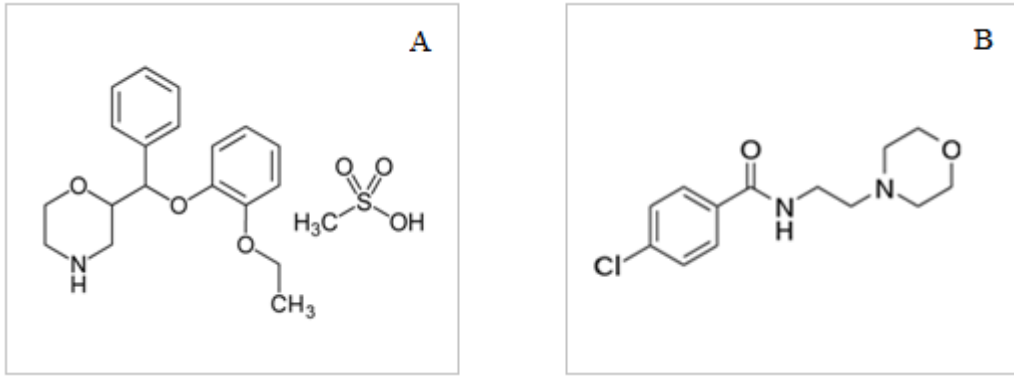
### 3.15 Yüzey Kaplama Katsayısının ( $\Gamma$ ) Hesaplanması

Yüzey kaplama katsayısı, hem Bölüm 3.9.3'de anlatıldığı gibi hem de dönüşümlü voltametriye yapılan tarama hızı çalışmalarından elde edilen sonuçların Eşitlik 3.13 ve Eşitlik 3.15 ile birlikte değerlendirilmesi sonucu hesaplanmıştır:

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} \vartheta A \Gamma \quad (3.15)$$

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, voltametrik yöntemler kullanılarak reboksetin metansülfonat (RBK) ve moklobemid (MKB) moleküllerinin (Şekil 4.1) asılı damla cıva elektrot (ADCE) ve camsı karbon elektrot (CKE) yüzeylerindeki elektrokimyasal davranışları incelenmiş ve olası elektrot tepkime mekanizmaları önerilmiştir. Ayrıca, söz konusu ilaç etken maddelerinin nicel analizi için voltametrik tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Elde edilen bulgular aşağıda ayrıntılarıyla değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan etken maddeler (A) reboksetin metansülfonat (RBK) (B) moklobemid (MKB)

#### 4.1 Reboksetin Metansülfonat (RBK)

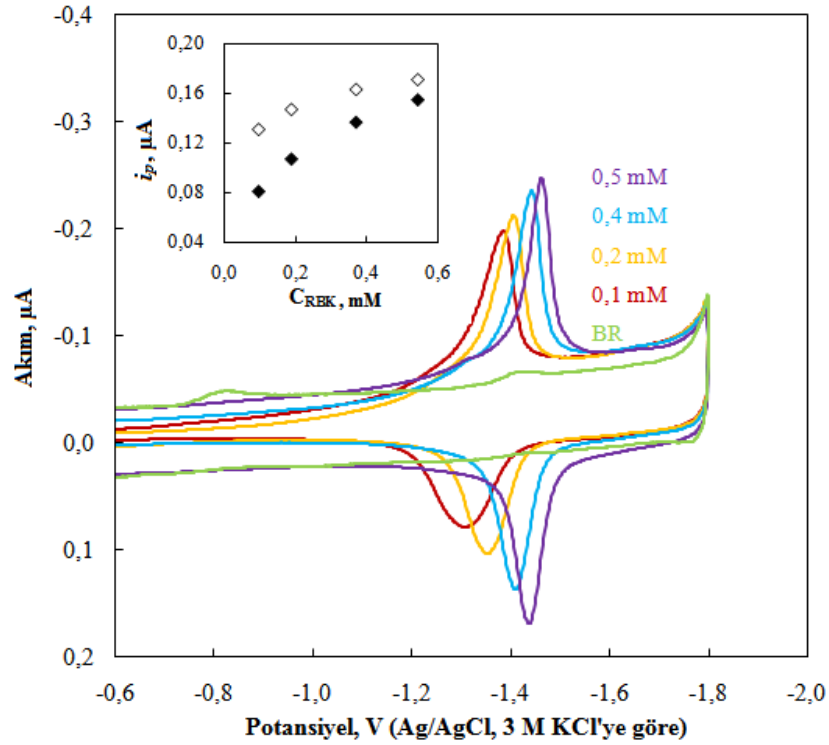
Bu bölümde RBK ile ilgili elektrokimyasal çalışmaların ve voltametrik yöntem geliştirme çalışmalarının sonuçları incelenmiştir.

##### 4.1.1 RBK'nın elektrokimyasal davranışı

Çalışmanın bu kısmında, özellikleri Bölüm 2.1.1'de verilen, RBK'nın elektrokimyasal davranışı sırasıyla ADCE ve CKE yüzeylerinde incelenmiştir. Elde edilen elektrokimyasal çalışmaların sonuçları değerlendirilmiş ve elektrot yüzeyindeki indirgenme/yükseltgenme tepkimeleri için olası mekanizmalar önerilmiştir. Elde edilen bulgular ve değerlendirmeler aşağıda ayrıntılarıyla verilmiştir.

RBK'nin elektrokimyasal davranışının incelenmesinde dönüşümlü voltametri (DV), kare dalga voltametri (KDV), normal puls voltametri (NPV), kronokulometri (KK) ve sabit potansiyelli bulk elektroliz (BE) yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmalarda Şekil 3.1'deki elektrokimyasal sistem kullanılmış, voltametrik ölçümler, Bölüm 3.9'da açıklandığı şekilde yapılmıştır.

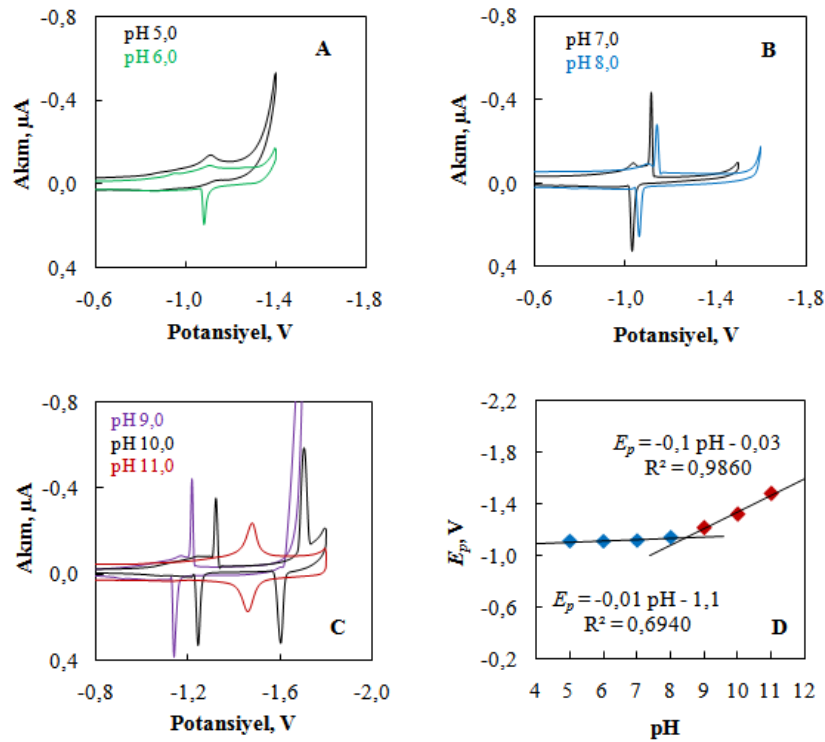
Elektrokimyasal çalışmalarda, öncelikle RBK'nın pH 11,0'da BR tamponunda farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerinin  $-0,6$  V -  $(-1,8$  V) aralığında dönüşümlü voltamogramları alınmış ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Söz konusu şekilden de görüldüğü gibi, yaklaşık  $-1,4$  V'da bir indirgenme/yükseltgenme pik çifti gözlenmiştir. Elde edilen bu piklerin akımlarının RBK derişimi ile artması (Şekil 4.2, iç grafik) ve RBK içermeyen BR çözeltilisinden alınan ölçümlerde herhangi bir pikin gözlenmemesi söz konusu pik çiftinin RBK moleküllerinin ADCE yüzeyindeki indirgenmesi/yükseltgenmesinden kaynaklanabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. Şekil 4.2'de verilen voltamogramlarda yükseltgenme pikinin de gözlenmesi, RBK'nın ADCE yüzeyindeki indirgenmesinin tersinir olabileceğini düşündürmüştür.



Şekil 4.2 Farklı derişimlerde RBK içeren çözeltilerin dönüşümlü voltamogramları: iç grafik  $\diamond$  katodik ve  $\blacklozenge$  anodik pik akımlarının RBK derişimi ile değışimi (ÇE: ADCE,  $v$ : 0,100 V/s, pH:11,0 BR,  $E_b$ :  $-0,6$  V,  $E_d$ :  $-1,8$  V,  $E_s$ :  $-0,6$  V)

Şekil 4.2'den de görüldüğü gibi, yapılan ölçümlerde RBK derişimi arttıkça pik potansiyeli daha katodik değerlere kaymaktadır. Bu potansiyel kayması, gerçekleşen elektrokimyasal dönüşümlerin elektrot yüzeyinde, adsorpsiyon kontrollü olarak gerçekleştiği şeklinde değerlendirilmiştir (Pereira 2001, Bard ve Faulkner 2001, Wang vd. 2002, Manjunatha 2011). Yani, RBK moleküllerinin elektrot yüzeyine adsorbe olması elektrot yüzeyinin RBK moleküllerince kısmen modifiye edilmesine sebep olmuş, bu modifikasyon pik potansiyelinin kaymasıyla sonuçlanmıştır.

ADCE yüzeyinde elektroaktif olduğu belirlenen RBK moleküllerinin bu elektrottaki elektrokimyasal davranışının ayrıntılı olarak incelenmesinde, ilk olarak pik potansiyeli ve pik akımına pH'nın etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, RBK derişimi 0,3 mM olan çözeltilerin pH'sı BR tamponu kullanılarak 2,0-12,0 arasında değiştirilmiş ve dönüşümlü voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.3). Bu molekülün indirgenme piki pH 5,0-11,0 aralığında gözlenmiş, pH'nın 5,0'den düşük olduğu çözeltilerde her hangi bir pik gözlenmemiştir.



Şekil 4.3 Sabit derişimde RBK içeren çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan dönüşümlü voltamogramları (A) pH 5,0 ve 6,0; (B) pH 7,0 ve 8,0; (C) pH 9,0 - 11,0; (D) pik potansiyelinin pH ile değişimi ( $C_{\text{RBK}} = 0,3 \text{ mM}$ , ÇE: ADCE,  $v$ : 0,100 V/s)

pH çalışmalarında, pH değerinin 5,0'dan küçük olduğu durumlarda herhangi bir pik gözlenmemesi, RBK'nın bu pH değerlerinde elektrokimyasal olarak aktif olmamasından kaynaklandığı şeklinde değerlendirilmiştir. pH 5,0'dan başlayarak yapılan çalışmalarda, pH arttıkça keskin anodik ve katodik pikler gözlenmiştir. pH 10,0'dan küçük ya da 10,0'dan büyük olduğunda tek indirgenme-yükseltgenme çifti gözlenirken pH 10,0 olduğunda iki tane indirgenme-yükseltgenme çifti gözlenmiştir (Şekil 4.3, C). Aslında pH 9,0 olduğunda hidrojen aşırı gerilimi yakınlarında bir akım oluşmakta, ancak oluşan bu akımın pikleşmesi hidrojen aşırı geriliminden dolayı mümkün olmamaktadır. Elde edilen bulgular;

- pH'nın 9,0 ya da daha düşük olduğunda, gözlenmesi beklenen iki pikten birisinin potansiyelinin hidrojen aşırı geriliminden daha katodik değerde kalmasından dolayı gözlenemediği,
- elektrokimyasal basamaktan önce kimyasal bir basamağın gerçekleşebileceği, bunun pH'dan etkilendiği ve farklı pH değerlerinde farklı ürünlerin oluşmasından kaynaklı farklı elektrokimyasal davranışların gözlemlendiği

alternatiflerini akla getirmiştir.

Buradan RBK'nın indirgenmesinde hidronyum iyonunun önemli bir etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalarda katodik pik potansiyelinin pH ile değişimi incelenmiş ve Şekil 4.3, D'de verilen grafik elde edilmiştir. Bu grafikte, pik potansiyelinin pH ile iki farklı bölgede doğrusal olarak değiştiği ve bu iki doğrunun pH'nın yaklaşık 8,4 olduğu değerde kesiştiği belirlenmiştir. Belirlenen bu pH değerinin literatürde RBK için hesaplanan  $pK_a$  değeri 8,4 ile aynı olduğu görülmüştür (Barri ve Jönsson 2004). Literatürde (Wang 2006) pik potansiyelinin pH ile değişimine ait denklem aşağıdaki gibi verilmektedir:

$$E_p = E^o - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O]}{[R]} \mp \frac{2,303}{nF} \partial RT \text{ pH} \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte;  $E_p$ , pik potansiyeli (V);  $E^o$ , standart pik potansiyeli (V);  $R$ , ideal gaz sabiti (J/mol K);  $T$ , mutlak sıcaklık (K);  $n$ , aktarılan elektron sayısı (mol elektron/mol molekül);  $F$ , Faraday sabiti (C/mol elektron);  $[O]$ , yükseltgenmiş türün analitik derişimi

(mol/cm<sup>3</sup>); [R], indirgenmiş türün analitik derişimi (mol/cm<sup>3</sup>);  $\partial$ , mekanizmaya katılan proton sayısı (mol proton/mol molekül)' dır.

Deneysel olarak bazik bölge için elde edilen doğrunun eğiminden (Şekil 4.3 D ve  $E_p$  (V) = -0,1pH - 0,03) ve Eşitlik 4.1'den yararlanarak, RBK'nın ADCE yüzeyindeki indirgenmesinde yer alan proton sayısının mekanizmada aktarılan elektron sayısına oranı ( $\partial n$ ) hesaplanmış ve bazik ortamlarda (pH > 8,4) yaklaşık 3/2 olarak bulunmuştur. Bu durum, RBK için cıva yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal tepkime mekanizmasında önce 1 protonun katıldığı protonlanma kimyasal tepkimesinin; bunu takip eden 2 proton, 2 elektron ile indirgenme tepkimesinin gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır.

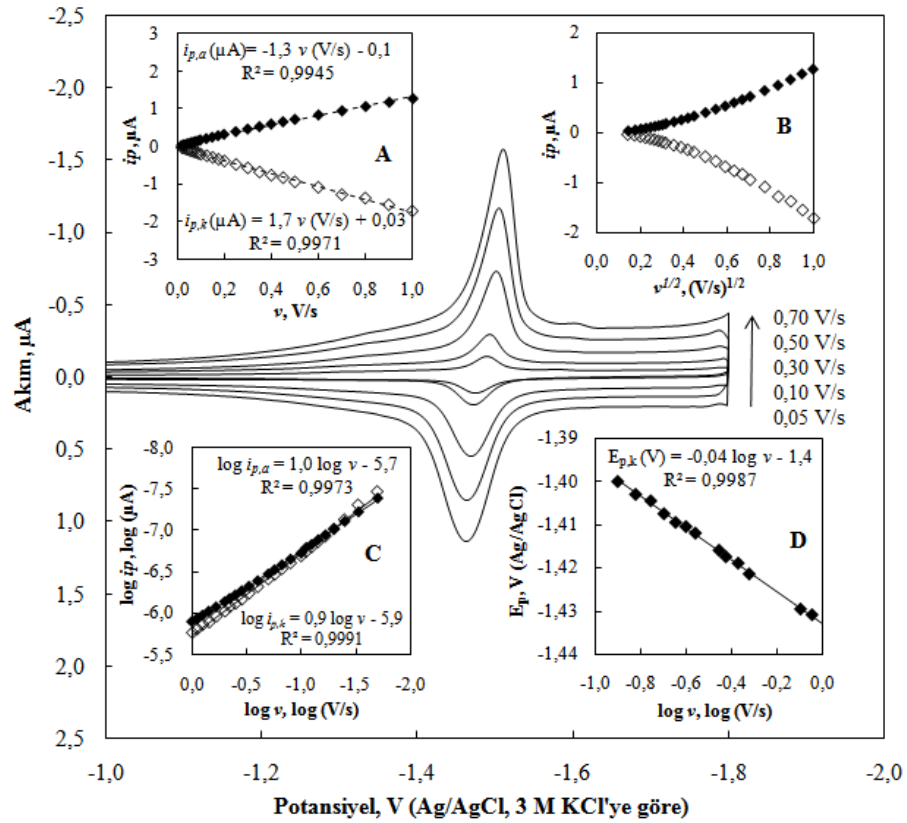
DV (Şekil 4.3) ve KDV yöntemleri ile yapılan ölçümlerde, en düzgün ve en yüksek pik akımı pH 11,0'da elde edilmiştir. Bu nedenle, mekanizma ile ilgili diğer bütün çalışmalar, pH'sı 11,0 olan çözeltilerde gerçekleştirilmiştir.

RBK'nın elektrokimyasal davranışının incelenmesinde, pH değişkeninden sonra pik akımı ve pik potansiyeline tarama hızının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, pH'sı 11,0'a ayarlanmış 0,3 mM RBK çözeltisinin 0,005 Vs<sup>-1</sup> - 1,000 Vs<sup>-1</sup> arasındaki çeşitli tarama hızlarında voltamogramları kaydedilmiş ve  $i_p-v$ ,  $i_p-\sqrt{v}$ ,  $\log i_p-\log v$  grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.4). Tarama hızının çok küçük tutulduğu (0,005 ve 0,01 Vs<sup>-1</sup>) değerlerde RBK'ya ait bir pik kaydedilmemiştir. Bu gözlem, elektroda uygulanan potansiyelin başlangıç değerinden elektron aktarımı için gerekli değere ulaşmaya kadar geçen sürede RBK moleküllerinin başka bir forma dönüşebileceğini akla getirmiştir. Yani, elektrokimyasal basamaktan önce bir kimyasal basamağın olabileceği düşünülmektedir.

Şekil 4.4 incelendiğinde, tarama yönü değiştirildiğinde indirgenme pikinin yanısıra elektron aktarımının tersinir olabileceğini düşündüren yükseltgenme piki de gözlenmektedir. Çalışmalarda Şekil 4.4'den de görülebileceği gibi, pik potansiyelinin tarama hızı ile az da olsa değiştiği gözlenirken anodik pik akımının katodik pik akımına oranı yaklaşık 1,0 hesaplanmıştır. Bu verilerden, incelenmekte olan mekanizmanın tersinir olabileceği düşünülmüştür. İdeal tersinir mekanizma için, anodik/katodik pik



potansiyelinin tarama hızı ile değişmemesi; akımlar oranının 1 olması gerekmektedir (Wang, 2006). Ancak, moleküllerin yüzeye adsorbe olmasından sonra gerçekleşecek olan bir elektron aktarımı inceleniyorsa, elektroaktif türün derişimi ve tarama hızı ile pik potansiyelinin değişmesi tersinir sistemler için de geçerli olabilmektedir. Buna ek olarak, elektrokimyasal basamak öncesinde olası bir kimyasal basamağın gerçekleşmesi ve bu kimyasal basamağın hız sabitine göre elektrokimyasal basamak tersinir olsa bile pik potansiyelinin tarama hızı ile değişebileceği düşünülmektedir.

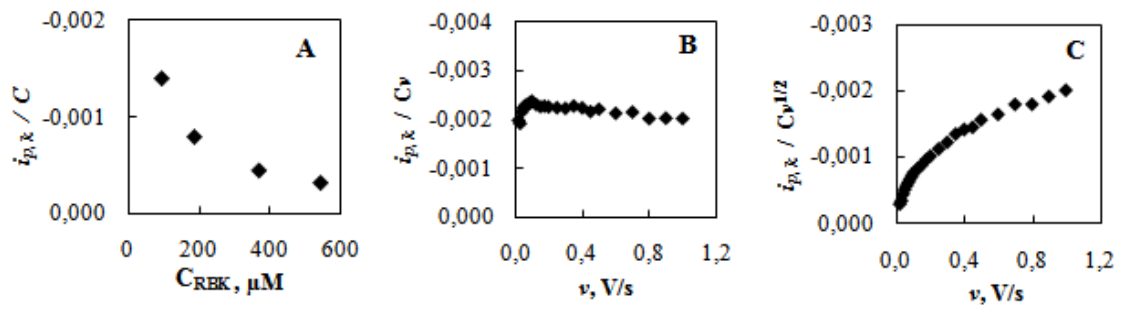


Şekil 4.4 Sabit derişimde RBK içeren çözelti kullanılarak farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlar: iç grafikler: (A) katodik ve anodik pik akımının tarama hızı ile değişimi, (B) katodik ve anodik pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi, (C) katodik ve anodik pik akımının logaritmasının tarama hızının logaritması ile değişimi, (D) katodik pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi (ÇE: ADCE,  $C_{\text{RBK}} = 0,3 \text{ mM}$ , pH:11,0 BR,  $E_b: -1,0 \text{ V}$ ,  $E_a: -1,8 \text{ V}$ ,  $E_s: -1,0 \text{ V}$ ;  $\diamond$  katodik pik,  $\blacklozenge$  anodik pik)

Tarama hızının pik akımına etkisinin incelendiği çalışmalarda, pikin gözleendiği tarama hızı değerlerinde, tarama hızı ile katodik pik akımının ( $i_{p,k}$ ) doğrusal değişiminin  $i_{p,k} (\mu\text{A}) = 1,7 v (\text{Vs}^{-1}) + 0,03$ ;  $R^2 = 0,9971$  eşitliği ile; anodik pik akımının ( $i_{p,a}$ ) doğrusal

değişiminin ise  $i_{p,a} (\mu A) = -1,3 v (Vs^{-1}) - 0,1$ ;  $R^2 = 0,9945$  eşitliği ile ifade edilebileceği belirlenmiştir (Şekil 4.4, iç grafik A). Pik akımı ve tarama hızı arasındaki doğrusal ilişki, gözlenen elektrokimyasal dönüşümün elektrot yüzeyinde adsorpsiyon kontrollü olarak gerçekleştiği varsayımını destekler niteliktedir. Pik akımının (A) logaritmasının tarama hızının ( $Vs^{-1}$ ) logaritması ile değişiminin incelenmesinde, anodik ve katodik pikler için oluşturulan doğrusal değişim grafiklerinin eğimleri sırasıyla 0,9 ve 1,0 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4, iç grafik C). Katodik ve anodik pikler için hesaplanan eğim değerleri de, elektron aktarımının elektrot yüzeyinde gerçekleştiğine yönelik bulguları desteklemektedir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, pik akımının tarama hızının karekökü ile doğrusal değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.4, iç grafik B). Bu sonuçlara göre, elektron aktarımının adsorpsiyon kontrollü olması gerektiği düşünülmüştür.

Elektrot yüzeyinde gerçekleşen adsorpsiyon davranışlarını değerlendirmek amacıyla, literatürde benzer durumlar için yapılan çalışmalara (Wopschall ve Shain 1967, Hulbert ve Shain 1970) paralel çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalarda; artan RBK derişimiyle, katodik pik akımının RBK derişimine oranının ( $i_{p,k}/C$ ) azaldığı; tarama hızının artmasıyla, katodik pik akımının derişim ile tarama hızı çarpımına oranının ( $i_{p,k}/Cv$ ) 0,1  $Vs^{-1}$  tarama hızı değerine kadar arttığı; daha yüksek tarama hızlarında ise sabit kaldığı; tarama hızının artmasıyla, katodik pik akımının, derişim ile tarama hızının karekökünün çarpımına oranının ( $i_{p,k}/Cv^{1/2}$ ) arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 RBK'nın elektrokimyasal davranışına adsorpsiyonun etkisi: (A)  $i_{p,k}/C$  oranının RBK derişimi, (B)  $i_{p,k}/Cv$  oranının tarama hızı, (C)  $i_{p,k}/Cv^{1/2}$  oranının tarama hızı ile değişimi (ÇE: ADCE,  $C_{RBK} = 0,3$  mM, pH:11,0 BR)

Deney sonuçlarının değerlendirilmesinden, cıva yüzeyinde gözlenen elektrokimyasal indirgenme/ yükseltgenme olaylarının tersinir ve adsorpsiyon kontrollü olabileceği

sonucu çıkarılmıştır. Bu çalışmalara ek olarak, NPV yöntemi ile yapılan çalışmalarda dalga şekli yerine pik şeklinde kaydedilen voltamogramlar elektroaktif türün elektrot yüzeyine adsorbe olarak elektron aktarımına katıldığı varsayımını desteklemektedir (Scholz vd. 2010).

Tarama hızının pik akımına etkisinin yanında, pik potansiyeline etkisi de araştırılmıştır. Bu inceleme için, tarama hızının logaritmasına karşı pik potansiyeli grafiğe geçirilmiş ve pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile;  $E_{p,k} \text{ (V)} = -0,04 \log v \text{ (log Vs}^{-1}) - 1,4$ ;  $R^2 = 0,9987$  eşitliğini sağlayacak şekilde değiştiği görülmüştür (Şekil 4.4, iç grafik D). Çizilen bu grafikten elde edilen doğrunun eğiminin  $29,6 \text{ (mV)/}n\alpha$  oranına eşit olduğu (Brett ve Brett 1994) düşünüldüğünde  $n\alpha$  ( $\alpha$ : katodik yük aktarım katsayısı,  $n$ : elektron sayısı) değeri 0,80 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca,  $n\alpha$  değeri Eşitlik 3.12 (Barek 2008) kullanılarak da hesaplanmıştır:

$$E_p = k + \frac{RT}{(n\alpha)F} \log v \quad (3.12)$$

Bu eşitlikte;  $E_p$ , pik potansiyeli (V);  $R$ , ideal gaz sabiti (J/mol K);  $T$ , mutlak sıcaklık (K);  $n$ , hız belirleyen basamakta aktarılan elektron sayısı (mol elektron/mol molekül);  $F$ , Faraday sabiti (C/mol elektron);  $\alpha$ , katodik yük aktarım katsayısı;  $v$ , tarama hızı (V/s) ve  $k$ , sabittir.  $E_p - \log v$  grafiğinden elde edilen doğrunun eğiminin Eşitlik 3.12'deki  $RT/(n\alpha)F$  değerine eşit olduğu düşünüldüğünde,  $n\alpha$  değeri 0,74 olarak bulunmuştur.

Yük aktarım katsayısının 0 ile 1 arasında değer alabileceği ve birçok çalışma elektrodu için bu parametrenin 0,50 olduğu düşünüldüğünde, RBK'nın yükseltgenme mekanizmasında 2 elektronun aktarıldığı söylenebilir. Aktarılan elektron sayısı 2 olarak kabul edilirse, yük aktarım katsayısının değeri 0,40 civarında bulunur. Bu durum, ADCE yüzeyinde meydana gelen indirgenme olayında RBK indirgenmiş forma dönüşürken elektrot tepkimesinde olduğu varsayılan aktifleşmiş kompleksin, tepkime koordinatına göre simetri merkezinde yer almadığını gösterebilir. Ölçümlerde alınan voltamogramların simetrik olmaması da bu varsayımı destekler niteliktedir.

RBK'nın indirgenmesinde aktarılan elektron sayısını hesaplamak için, sabit potansiyelde bulk elektroliz çalışması yapılmıştır. Bu çalışma, Bölüm 3.9.5'de anlatıldığı şekilde, pH 11,0'da  $-1,60$  V'ta sabit potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bulk elektroliz sırasında ilk aşamalarda yük geçişi ile birlikte kaydedilen akım ilk 10 saniye içinde başlangıçtaki akımın % 8,0'i civarına inmiş ve sonrasında sabitlemiştir. RBK çözeltisinin elektroliz öncesi/sonrası kaydedilen voltamogramları değerlendirildiğinde pik akımı ve pik potansiyelinde kayda değer bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Bulk elektroliz uzun süre devam ettirilse bile aynı gözlemler kaydedilmiştir. Ancak, bulk elektroliz devam ederken yapılan kontrollerde sistem içerisinde elektrokimyasal dönüşümün olduğunu gösteren akım değerleri (bir kaç mA) yük geçişi ile birlikte kaydedilmiştir. Bu durum elektrokimyasal dönüşümün tersinir olduğu ve elektroliz işlemi süresinde yük aktarımının yaklaşık aynı potansiyelde gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır. Bulk elektroliz süresince sistemden geçen yükün ne kadarının indirgenme için harcadığının tespit edilememesinden kaynaklı mekanizmada aktarılan elektron sayısı bu yöntemle hesaplanamamıştır. Bundan dolayı RBK moleküllerinin cıva yüzeyindeki elektrokimyasal dönüşümüne eşlik eden elektron sayısı, DV çalışmalarında adsorpsiyon kontrollü sistemler için önerilen aşağıdaki eşitlikler (Eşitlik 3.15 ve Eşitlik 4.3) kullanılarak hesaplanmıştır (Wang 2006):

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4 R T} v A \Gamma \quad (3.15)$$

$$Q = nFA\Gamma \quad (3.13)$$

Burada;  $i_p$ , pik akımı (A);  $Q$ , yük (C);  $n$ , elektrot tepkimesinde aktarılan elektron sayısı (mol elektron/mol molekül);  $\Gamma$ , adsorplanan maddenin yüzey kaplama katsayısı (mol/cm<sup>2</sup>);  $A$ , cıva elektrot yüzey alanı (0,0145 cm<sup>2</sup>);  $F$ , Faraday sabiti (96485 C/mol); ve  $v$ , tarama hızı (V/s)' dir (Wang 2006).

Eşitlik 3.15'deki  $\Gamma$  değeri, Eşitlik 3.13'de yerine konulduğunda, elektron sayısını ( $n$ ) hesaplamak için aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir:

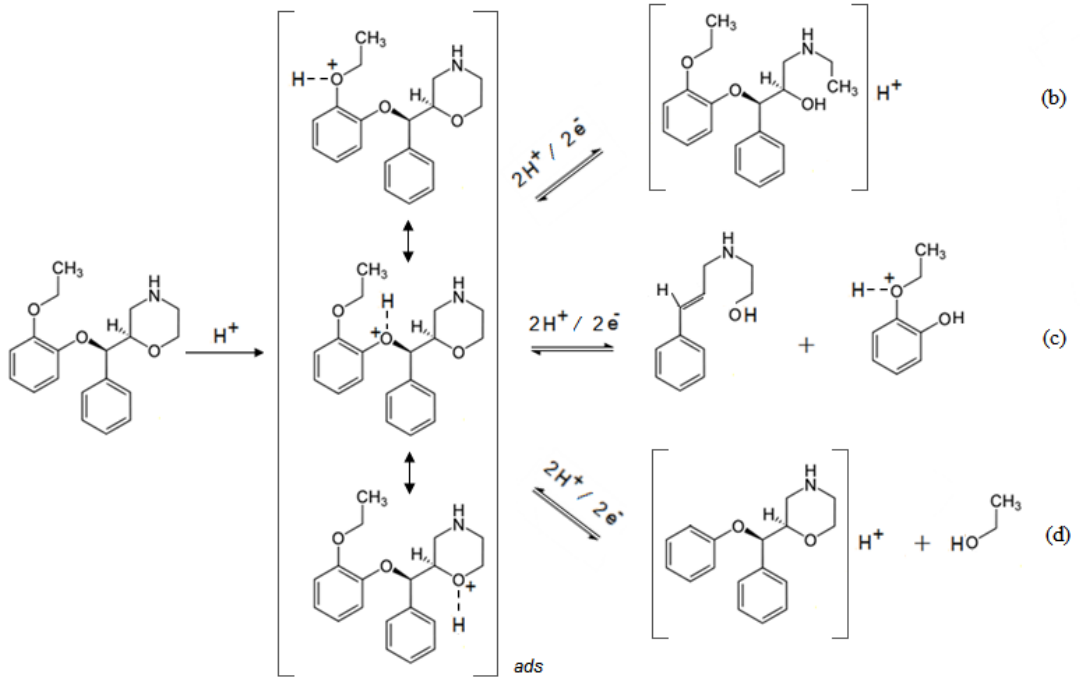
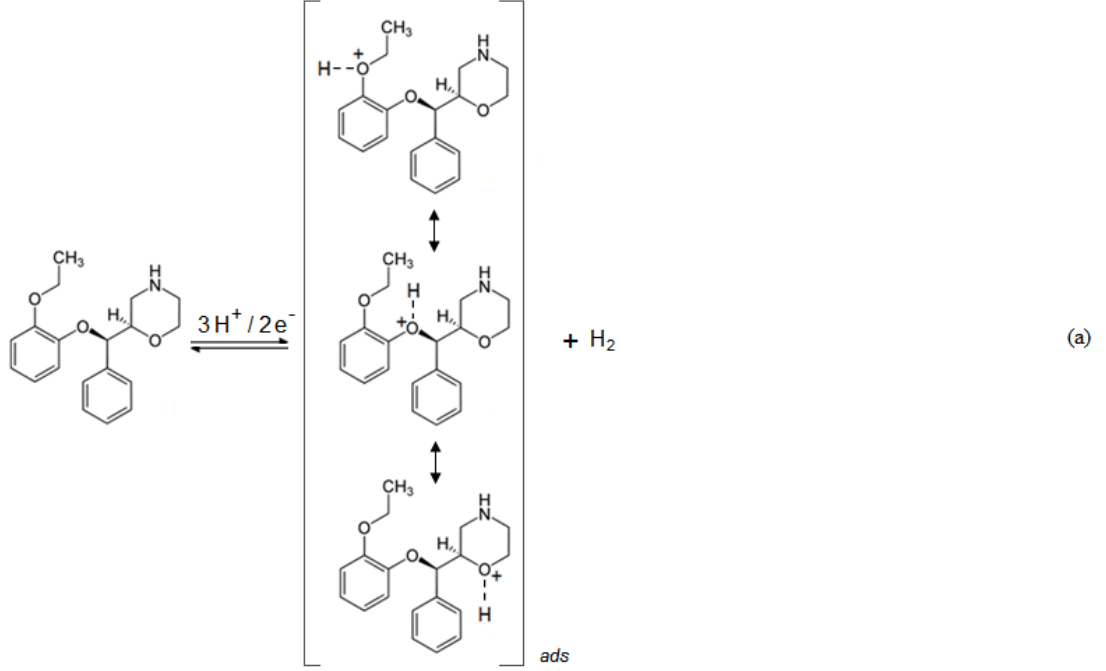
$$n = \frac{4 i_p RT}{FQv} \quad (4.2)$$

0,005–1,000 Vs<sup>-1</sup> tarama hızı aralığında RBK'nın indirgenmesinde aktarılan elektron sayısı ( $n$ ), her bir tarama hızı için, yukarıdaki eşitlikten, pik akımına karşılık tarama hızı grafiğinden elde edilen doğru denkleminin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonrasında RBK'nın ADCE yüzeyinde indirgenmesinin 2 elektron aktarımını ile gerçekleştiği bulunmuştur. Eşitlik 4.1'den, proton sayısının elektron sayısına oranı 3/2 olarak hesaplanmıştır. Şimdiye kadar elde edilen bulgular birleştirildiğinde ADCE yüzeyinde RBK'nın indirgenmesinin 3 proton 2 elektron aktarımı ile tersinir olduğu ve indirgenme tepkimesinin adsorpsiyon kontrollü olarak gerçekleştiği sonucuna varılabilir.

Pik potansiyelinin pH ile değişmesi (artan pH ile daha katodik değerlere kayması) elektron aktarımından önce bir protonlanma basamağının olması gerektiğini düşündürmüştür. RBK molekülünün kimyasal yapısı incelendiğinde (Şekil 4.1, A) molekül yapısında ortaklanmamış elektron çifti bulunduran ve proton bağlanma yeteneğinin oldukça yüksek olduğu düşünülen oksijen atomları mevcuttur. Buna göre elektron aktarımından önce gerçekleştiği varsayılan protonlanmanın yapıdaki üç oksijen atomunun herhangi biri üzerinden yürüdüğü düşünülebilir. Şekil 4.6'da her üç oksijenin protonlanmasına karşılık gelen olası mekanizmalar önerilmiştir.

Deneysel çalışmalarda elde edilen 2 elektrona karşılık 3 protonun aktarıldığı hesaplanmıştır. Buna göre Şekil 4.6, a'da verilen elektrot tepkime mekanizmasında RBK'nın indirgenmesinde katalitik etkinin söz konusu olabileceği gösterilmiştir. Şekil 4.6 b, c ve d'de verilen elektrot tepkime mekanizmalarında ise molekülden bir grubun ayrıldığı/bir bağın koptuğu şeklinde öneriler yapılmıştır. Literatürde bir molekülün ayrılması sonucunda oluşan elektrot tepkimelerinin tersinir olabileceği ile ilgili bilgiye Şekil 4.6 c dışında tarafımızdan rastlanmamıştır (Baizer 1973). Dolayısıyla diğer iki durum (Şekil 4.6 b ve d) pek olası görülmemektedir. Şekil 4.6 a ve c'de verilen elektrot tepkime mekanizmalarından katalitik hidrojene ait olanının, yapılan bulk elektroliz

deneyleri sonucunda alınan voltamogramların başlangıç voltamogramları ile aynı olması sonucuna dayanarak daha olası olabileceği düşünülmüştür.



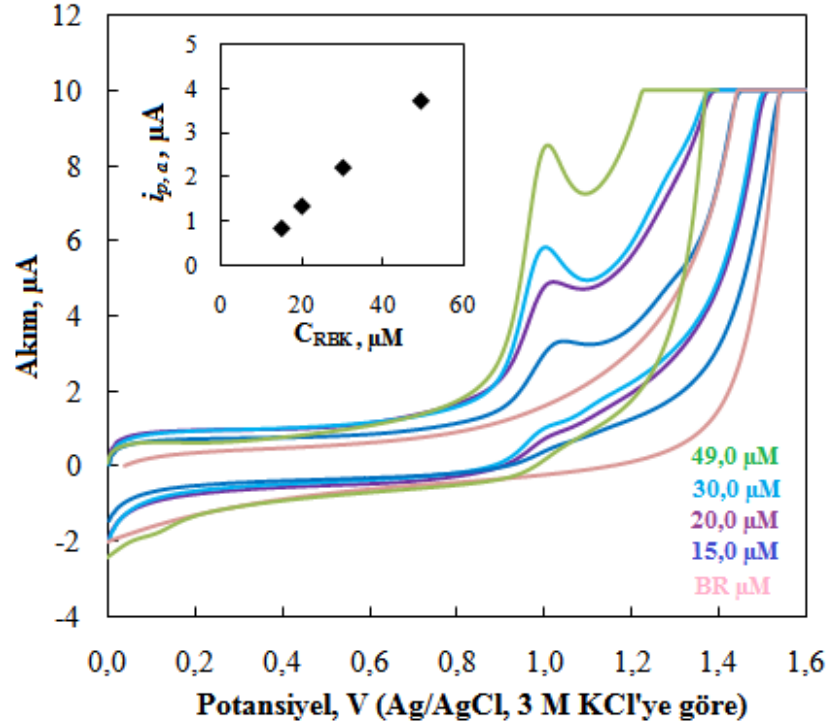
Şekil 4.6 RBK moleküllerinin ADCE yüzeyinde gerçekleşen elektroindirgenme tepkimesi için önerilen mekanizma

Tüm bunların yanı sıra bu çalışmada, kronokulometri yönteminden elde edilen veriler de kullanılarak, RBK için yüzey kaplama katsayısı ( $I$ ) ve difüzyon katsayısı ( $D$ ) hesaplanmıştır. Yüzey kaplama katsayısının hesaplanması için kronokulometri çalışmalarından elde edilen parametreler ve Eşitlik 3.13 kullanılmış ve yüzey kaplama katsayısı ortalama  $(7,2\pm 0,4) \times 10^{-10}$  mol cm<sup>-2</sup> bulunmuştur. Hesaplanan bu değer RBK'nın ADCE yüzeyinde adsorpsiyon kontrollü olarak indirgendiği varsayımını destekler niteliktedir. Çünkü, pek çok kaynakta adsorpsiyon kontrollü mekanizmalar için yüzey kaplama katsayısının  $10^{-8}$  -  $10^{-10}$  mol cm<sup>-2</sup> aralığında olduğu belirtilmiştir (Brett ve Brett 1994, Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006).

RBK'nın difüzyon katsayısı ise, adsorpsiyon kontrollü sistemler için Garrido ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve validasyonu yapılan Eşitlik 3.14 kullanılarak hesaplanmıştır. Bu eşitlikte cıva elektrodunun yüzey alanı  $A = 0,0145$  cm<sup>2</sup> olarak kullanılmıştır. Bu eşitlikten  $0,02$ - $1,000$  Vs<sup>-1</sup> tarama hızı aralığında hesaplanan ortalama difüzyon katsayısı  $(3,4\pm 0,3) \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Hesaplanan difüzyon katsayısı değerinin, difüzyon kontrollü elektrokimyasal dönüşümler için literatürde verilen değerlerden oldukça küçük olduğu görülmektedir. Çünkü pek çok kaynakta difüzyon kontrollü mekanizmalar için difüzyon katsayısının  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> aralığında olduğu belirtilmiştir (Brett ve Brett 1994, Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006).

RBK'nın ADCE yüzeyindeki elektrokimyasal davranışının belirlenmesinden sonra CKE yüzeyindeki elektrokimyasal davranışı da incelenmiştir. Bu çalışmada, ADCE yüzeyinde yapılan deneysel çalışmalara benzer çalışmalar yapılmıştır. Dolayısıyla, RBK'nın pH 7,0'da BR tamponunda farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerinin  $0,0$  V -  $1,6$  V aralığında dönüşümlü voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.7). Şekil 4.7'den de görüldüğü gibi, yaklaşık  $1,0$  V civarında, destek elektrolit olarak kullanılan BR çözeltisinden alınan ölçümlerde görülmeyen bir yükseltgenme piki gözlenmiştir. Farklı derişimlerdeki RBK çözeltileri kullanarak alınan voltamogramlarda elde edilen pik akımlarının RBK derişimi ile artması (Şekil 4.7, iç grafik), söz konusu pikin RBK'nın yükseltgenmesine ait olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Yükseltgenme yönündeki potansiyel taraması yaklaşık  $1,6$  V'ta tamamlanıp başlangıç potansiyeline doğru indirgenme yönünde geri tarama yapıldığında ise, herhangi bir pik gözlenmemiştir. Bu

deneysel sonuç RBK moleküllerinin camsı karbon yüzeyindeki yükseltgenmesinin tersinmez olabileceğini düşündürmüştür.



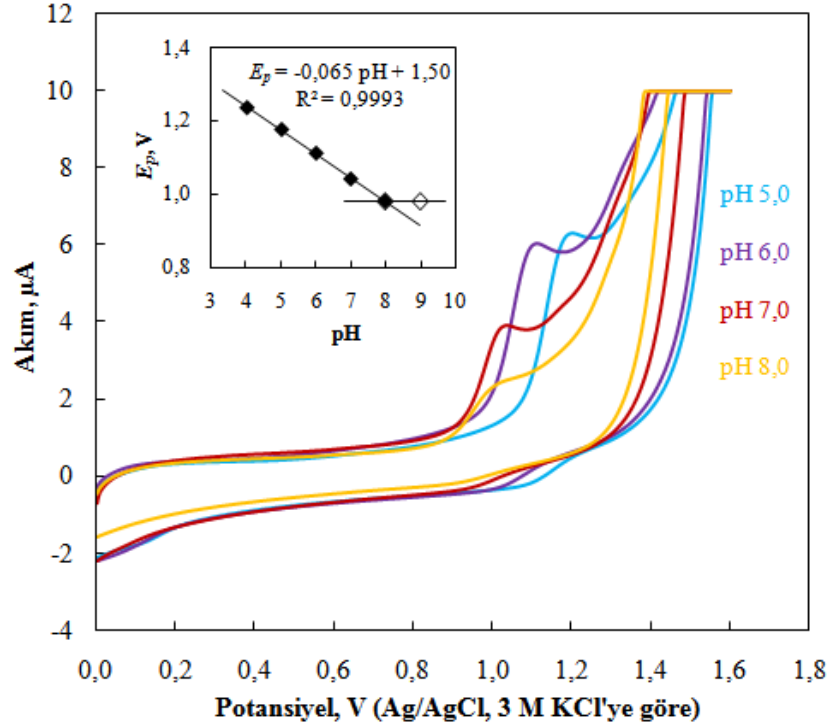
Şekil 4.7 Farklı derişimlerde RBK içeren çözeltilerin dönüşümlü voltamogramları: iç grafik anodik pik akımının RBK derişimi ile değişimi (ÇE: CKE,  $v$ : 0,100 V/s, pH: 7,0 BR,  $E_b$ : 0,0 V,  $E_d$ : 1,6 V,  $E_s$ : 0,0 V)

RBK'nın CKE'deki elektrokimyasal davranışının ayrıntılı olarak incelenmesi için ilk olarak pH'nın pik potansiyeli ve pik akımına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla BR tamponu kullanılarak RBK derişimi 50,3 µM olan çözeltilerin pH'sı 2,0-12,0 aralığında ayarlanmış ve dönüşümlü voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.8).

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, RBK'ya ait anodik pik potansiyelinin pH ile değiştiği belirlenmiştir. DV çalışmalarında, pH < 4,0 ve pH > 10,0 olduğu durumlarda RBK'ya ait herhangi bir pik kaydedilmemiştir. Artan pH değeri ile pik potansiyelinin daha anodik potansiyellere doğru kayması, RBK'nın elektrokimyasal mekanizmasında hidronyum iyonunun etkisi olduğunu düşündürmüştür. Oluşturulan  $E_p$ -pH grafiği incelendiğinde, iki farklı bölgede doğrusal değişim belirlenmiştir (Şekil 4.8, iç grafik). Bu iki doğrunun keştiği pH değerinin (yaklaşık 8,0) RBK'nın  $pK_a$  değeri ile doğrudan



ilişkili olduğu bilinmektedir. Bulunan değer ADCE elektrotta yapılan çalışmalarla elde edilen sonuçla da uyuşmaktadır.



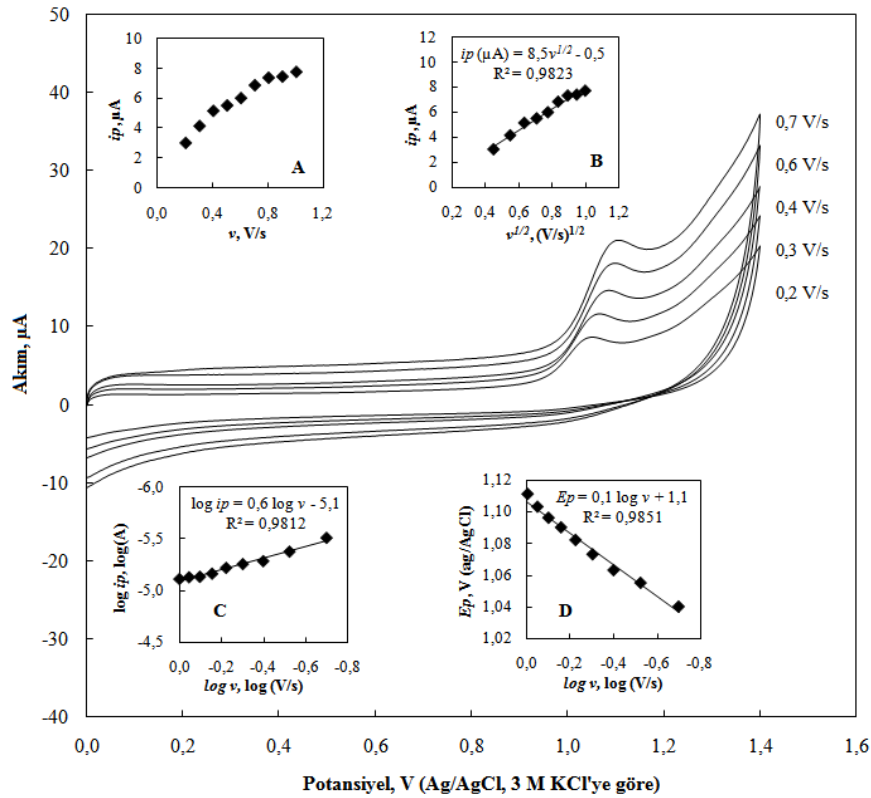
Şekil 4.8 Sabit derişimde RBK içeren çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan dönüşümlü voltamogramları: iç grafik: pik potansiyelinin pH ile değişimi ( $C_{RBK} = 50,3 \mu\text{M}$ , ÇE: CKE,  $v: 0,100 \text{ V/s}$ )

Ayrıca, pH 4,0 - 8,0 aralığında kaydedilen doğrusal değişimin eğim değeri 0,065 V/pH olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8, iç grafik). Eşitlik 4.1 kullanılarak  $\partial/n$  değeri yaklaşık 1,1 bulunmuştur. Buradan, RBK'nın CKE'de yükseltgenme mekanizmasında aktarılan proton sayısının elektron sayısına eşit olduğu sonucu çıkarılmıştır.

DV (Şekil 4.8) ve KDV yöntemleri ile yapılan ölçümlerde pH 4,0 - 9,0 aralığında RBK piki kaydedilmiştir; ancak en yüksek pik akımı ve en düzgün pik şekli pH 7,0'da elde edilmiştir. Bu nedenle, mekanizma ile ilgili diğer bütün çalışmalar, pH'sı 7,0 olan çözeltilerde gerçekleştirilmiştir.

RBK'nın CKE'de elektrokimyasal davranışının incelenmesinde, pH değişkeninden sonra pik akımı ve pik potansiyeline tarama hızının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla

pH'sı 7,0'a ayarlanmış 49,0  $\mu\text{M}$  RBK çözeltisinin 0,1-1,0  $\text{Vs}^{-1}$  tarama hızı aralığında dönüşümü voltamogramları alınmış, anodik pik akımının tarama hızı ile doğrusal olmayan bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.9, iç grafik A). Bu durum, ilk bakışta RBK molekülleri ile CKE yüzeyinde adsorpsiyon olayının gerçekleşmediğini düşündürmüştür. Diğer taraftan, pik akımının  $i_p$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $8,5 v^{1/2} (\text{Vs}^{-1})^{1/2} - 0,5$ ;  $R^2 = 0,9823$  eşitliği ile tarama hızının karekökü ile doğrusal değişim gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.9, iç grafik B). Bu sonuç, CKE yüzeyinde yükseltgenme olayının difüzyon kontrollü olduğunu düşündürmüştür. Tarama hızının logaritmasının bir fonksiyonu olarak pik akımının logaritmasının değişimi, incelendiğinde ise, elde edilen doğrunun eğimi 0,57 olarak hesaplanmış (Şekil 4.9, iç grafik C) ve bu değer difüzyon kontrollü elektrokimyasal mekanizmalar için önerilen değere oldukça yakın olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9 Sabit derişimde RBK içeren çözelti kullanılarak farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlar: iç grafik: (A) pik akımının tarama hızı ile değişimi, (B) pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi, (C) pik akımının logaritmasının tarama hızının logaritması ile değişimi, (D) pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi (ÇE: CKE,  $C_{\text{RBK}} = 49,0 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH}: 7,0$  BR,  $E_b: 0,0 \text{ V}$ ,  $E_d: 1,4 \text{ V}$ ,  $E_s: 0,0 \text{ V}$ )

Tarama hızının, pik akımına etkisinin yanında, pik potansiyeline etkisi de incelenmiştir. RBK'ya ait pikin potansiyelinin ( $E_p$ ) tarama hızı arttıkça daha anodik değerlere doğru kayması RBK'nın camısı karbon elektrotta yükseltgenmesinin tersinmez olduğunu göstermiştir. Tersinmez elektrot tepkimeleri için pik potansiyeli ile tarama hızı arasındaki bağıntının ilişkilendirildiği Eşitlik 4.3'den faydalanılmıştır:

$$E_p = \left(2,303 \frac{RT}{\beta n_a F}\right) \log \left(\frac{RT k_f}{\beta n_a F}\right) - \left(\frac{2,303 RT}{\beta n_a F}\right) \log v \quad (4.3)$$

Bu eşitlikte;  $E_p$ , pik potansiyeli (V);  $R$ , ideal gaz sabiti (J/mol K);  $T$ , mutlak sıcaklık (K);  $n$ , hız belirleyen basamakta aktarılan elektron sayısı (mol elektron/mol molekül);  $F$ , Faraday sabiti (C/mol elektron);  $\beta$ , anodik yük aktarım katsayısı;  $v$ , tarama hızı (V/s) ve  $k$ , sabittir.

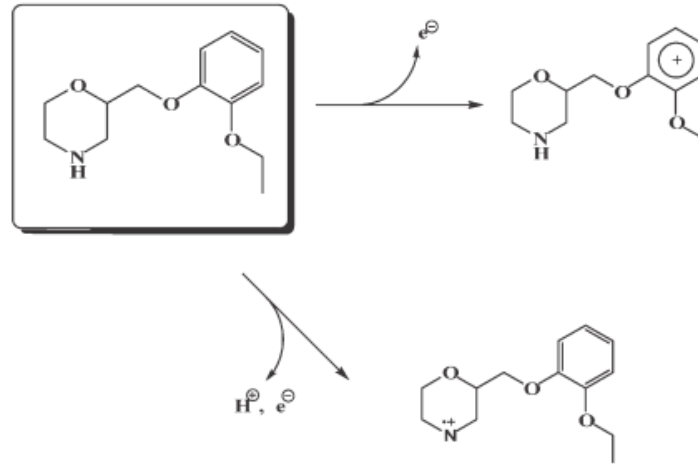
Deneyssel olarak elde edilen  $E_p$ -log  $v$  grafiğinin (Şekil 4.9, iç grafik D) eğiminden ve Eşitlik 4.6'dan  $\beta n$  değeri 0,59 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, RBK'ya ait tersinmez anodik pik için yaklaşık 98 mV olarak hesaplanan yarı pik genişliğinden yola çıkarak  $W_{1/2} = 62,4/n\beta$  eşitliğinden (Scholz vd. 2010)  $n\beta$  değeri 0,63 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen deneyssel sonuçlar değerlendirildiğinde camısı karbon yüzeyinde gözlenen elektrokimyasal yükseltgenme olayının tersinmez ve difüzyon kontrollü olabileceği sonucuna varılmıştır.

Yapılan literatür araştırmalarında, Garrido ve arkadaşlarının (2008) RBK'nın kimyasal yapısına çok benzer yapıda olan viloksazin'in CKE'de yükseltgenme davranışını incelendiği bir çalışmaya rastlanmıştır (Şekil 4.10). Yaptıkları çalışmada, viloksazin'in temel hal geometrisinin incelenmesinin yanı sıra molekülün elektrokimyasal davranışını belirleyen sınır molekül orbitallerinin (HOMO ve LUMO) yapısı da incelenmiştir. Temel hal geometrisinde, morfolin halkasında bulunan azotun yanında aromatik benzen halkasındaki oksijenlere yakın olan karbonların, molekülün diğer kısımlarına göre daha fazla elektron yoğunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). Bir molekülde verilebilecek ilk elektronların molekülün en yüksek enerjiye sahip dolu moleküler orbitalindeki (HOMO) elektronları olduğu bilinmektedir (Bard ve Faulkner 2001). Bu

çalışmada, viloksazin için en yüksek enerjili dolu moleküler orbitallerin aromatik halkada ve morfolin yapısında delokalize olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). Çalışmada viloksazin'in yükseltgenmesinin morfolin halkasının asit-baz özelliği ( $pK_a = 8,13$ ) ile bağlantılı olduğu, bu pH değerinde, amin grubundaki protonun uzaklaştığı ve ortaklanmamış elektron çiftinden dolayı viloksazin moleküllerinin camsı karbon elektrot yüzeyinde yükseltgenme davranışı gösterdiği yorumu yapılmıştır (Şekil 4.11).



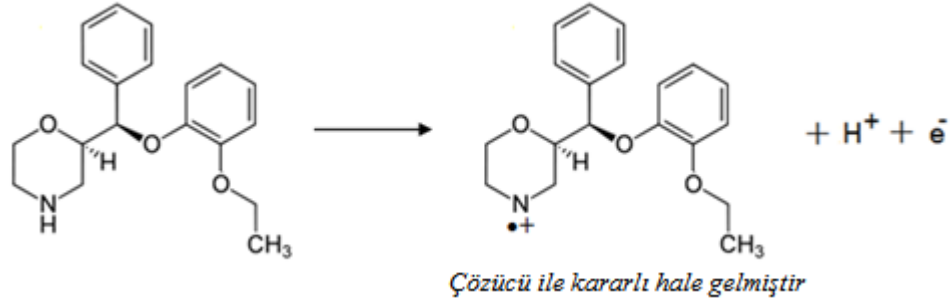
Şekil 4.10 Viloksazin'in moleküler orbital analizi (HOMO: en yüksek dolu moleküler orbital, HOMO-1: ikincil en yüksek dolu moleküler orbital)



Şekil 4.11 Viloksazin'in CKE yüzeyinde yükseltgenmesine ait olası tepkime mekanizması (Garrido vd. 2008)

Viloksazin molekülünün  $pK_a$  değeri 8,13 olup RBK'nın  $pK_a$  değeri olan  $8,34 \pm 0,20$ 'ye oldukça yakındır. Dolayısıyla, RBK'nın elektrokimyasal yükseltgenme davranışının da viloksazin molekülünün davranışına benzediği düşünülebilir. Sonuç olarak RBK moleküllerinin camsı karbon elektrottaki yükseltgenmesinin, morfolin halkasındaki

sekonderamin grubunun bir elektron bir proton vererek gerçekleştiği düşünülmüş ve olası elektrot tepkimesi Şekil 4.12’de verilmiştir. Oluşan ürünlerin çözücü ile kararlı hale geldiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.12 RBK moleküllerinin CKE yüzeyinde gerçekleşen elektroyükseltgenme tepkimesi için önerilen mekanizma

Literatürde viloksazin’in yükseltgenmesi pH 5,0’da incelenmiştir. RBK için pH 5,0’da elde edilen yükseltgenme pik potansiyeli viloksazin’in pik potansiyelinden daha düşüktür. Bu da, RBK’nın yükseltgenmesinin daha kolay olduğunu göstermektedir. İki molekülün yapısı karşılaştırıldığında, RBK’da bir fenil halkasının fazladan yapıda olduğu görülmektedir. Fenil halkasının indüktif etki yoluyla bağ elektronlarını kendine çekerek azot üzerindeki elektron yoğunluğunu, dolayısıyla diğer fenil halkasındaki elektron yoğunluğunu azalttığı düşünülebilir. Azot üzerindeki elektron yoğunluğunun azalması azota bağlı protonun dolayısıyla da elektronun daha kolay verilerek RBK’nın yükseltgenebileceği söylenebilir. Bu tip bir değerlendirme durumunda, diğer fenil halkası üzerinden yükseltgenmenin daha az olası olduğu sonucu çıkarılabilir. Sonuç olarak, RBK’nın en olası yükseltgenmesinin morfolin halkasındaki azot üzerinden olduğu yorumu yapılmıştır.

Bu çalışmada, ayrıca, RBK için Eşitlik 2.4 kullanılarak yüzey kaplama katsayısı hesaplanmış; 0,1 - 1,0 Vs<sup>-1</sup> tarama hızı aralığında ortalama olarak  $(2,7 \pm 0,6) \times 10^{-11}$  mol cm<sup>-2</sup> bulunmuştur. Buradan, adsorplanan her RBK molekülünün küresel olduğu ve yüzeye tek tabaka halinde adsorplandığı düşünülürse, elektrot yüzeyinde her bir molekülün 6,2 nm<sup>2</sup> alan kapladığı söylenebilir. Sonuç olarak, hesaplanan yüzey kaplama katsayısı RBK’nın CKE yüzeyinde difüzyon kontrollü olarak yükseltgendiği

varsayımını destekler niteliktedir (Brett ve Brett 1994, Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006).

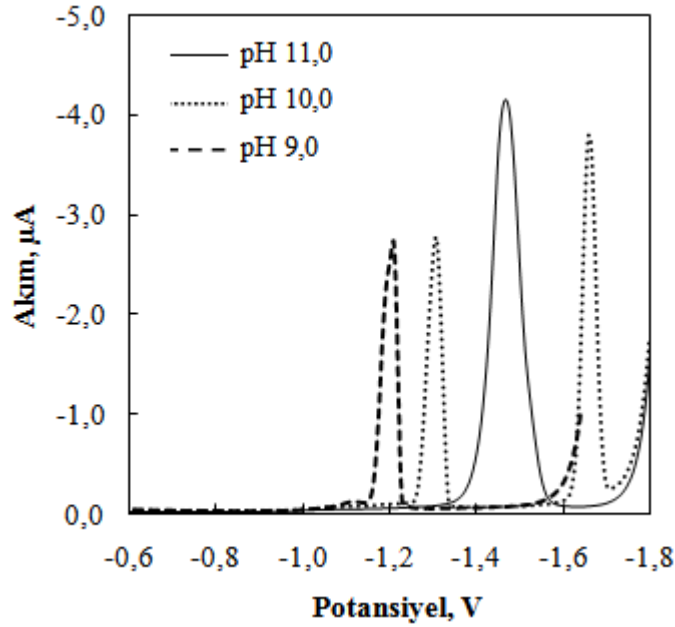
#### **4.1.2. RBK tayini için voltametrik yöntemler**

RBK'nın elektrokimyasal davranışı Bölüm 4.1.1'de verilmiştir. Bu veriler söz konusu ilaç etken maddenin nicel tayini için voltametrik yöntem geliştirilebileceğini göstermiştir. Yöntem geliştirme çalışmalarında, bu maddelere ait iyi tanımlanmış piklerden ve Bölüm 4.1.1'deki optimum deneysel koşullardan yararlanılmıştır. Geliştirilen her bir yöntemin ilaçların kalite kontrolüne uygulanabilirliği ile serum ve/veya idrarda tayinine uygunluğu test edilmiştir. Aşağıda geliştirilen yöntemler ve sonuçları açıklanıp irdelenmiştir. Geliştirilen yöntemler, Bölüm 3.10'da belirtilen validasyon parametreleri dikkate alınarak valide edilmiştir.

ADCE yüzeyinde RBK'nın pH 11,0'da elde edilen voltamogramdan en yüksek pik akımı elde edilmemekte birlikte en düzgün pik akımı oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Bu pik akımının RBK derişimi ile de doğrusal olarak değiştiği belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bundan yararlanarak, ADCE'de RBK'nın nicel tayini için DPV ve KDV yöntemlerinin geliştirilmesinin uygun olabileceği düşünülmüştür. Yöntem geliştirme çalışmalarında, söz konusu voltametrik yöntemlerin doğrudan uygulanması ve adsorptif sıyırma basamaklarının kullanılması ile dört ayrı yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda, öncelikle uygun derişimde RBK çözeltileri kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Optimum koşullar belirlenirken pik akımı ana kıstas olarak alınsa bile, pik şekli ve pik simetrisi de göz önüne alınmıştır. Optimizasyon çalışmalarının sonuçları şu şekilde özetlenebilir:

*Destek elektrolit cinsi:* Uygun destek elektrolitin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, her bir bileşenin analitik derişimi 0,04 M olan BR ve toplam analitik derişimi 1,2 M olan  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$  tamponu olmak üzere iki farklı destek elektrolit çözeltisi kullanılmıştır. Her iki destek elektrolit çözeltisinde elde edilen voltamogramlar incelendiğinde, pik parametrelerinin destek elektrolitin cinsine bağlı olmadığı belirlenmiştir. BR çözeltisinin daha geniş bir pH aralığındaki çalışmalara olanak sağlaması nedeniyle, devam eden çalışmalarda BR kullanılması uygun bulunmuştur.

*pH optimizasyonu:* pH 2,0-11,0 aralığında pH'nın KDV ve DPV'de pik parametrelerine etkisi incelenmiştir. DV yöntemi ile yapılan ölçümlerde belirtildiği gibi (Bölüm 4.1.1) KDV ve DPV yönteminde de pH<5,0 olduğu değerlerde herhangi bir voltametrik sinyal gözlenmemiştir. pH 9,0; 10,0 ve 11,0'da elde edilen KD voltamogramları Şekil 4.13'de verilmiştir. Pik şekli ve pik potansiyeli dikkate alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda, optimum pH değeri olarak 11,0 seçilmiştir. Aynı veriler DPV ile de elde edilmiştir.

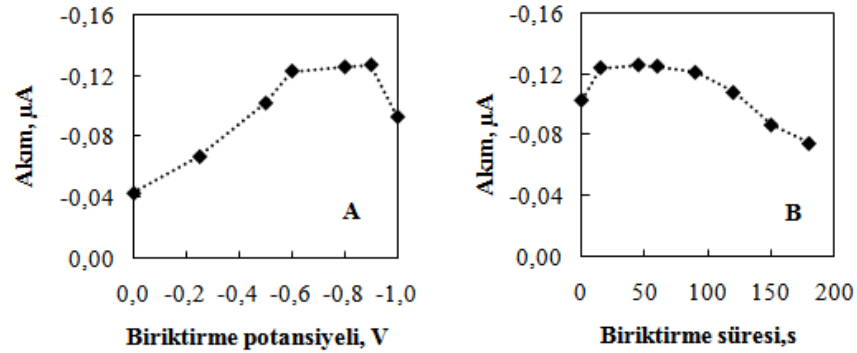


Şekil 4.13 RBK'nın KDV voltamogramlarına pH'nın etkisi ( $C_{RBK} = 0,9$  mM, ÇE: ADCE)

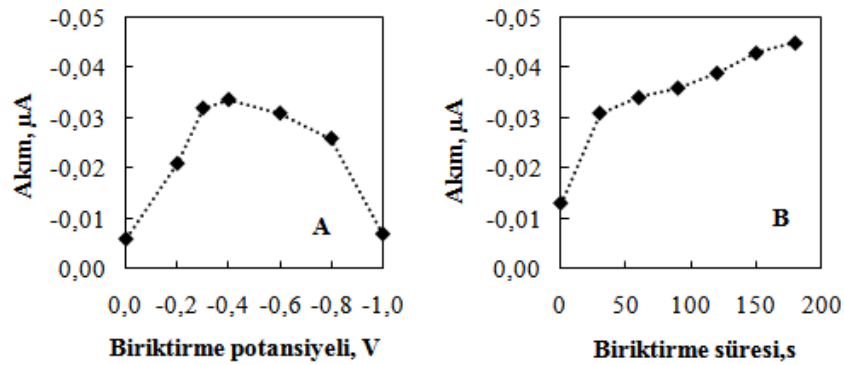
*Yöntem değişkenleri:* Optimizasyon çalışmalarında, seçilen voltametrik yönteme göre çeşitlilik gösterebilen frekans ( $f$ ), basamaklı adım yüksekliği ( $E_a$ ), puls genliği ( $E_p$ ), puls genişliği ( $E_w$ ) ve puls periyodu ( $E_t$ ) gibi parametreler optimize edilmiştir. Optimum parametreler 5,0  $\mu$ M RBK çözeltisi için KDV yönteminde  $E_a = 4$  mV,  $E_p = 25$  mV,  $f = 25$  Hz; DPV yönteminde ise,  $E_a = 5$  mV,  $E_p = 50$  mV,  $E_w = 50$  ms ve  $E_t = 200$  ms olarak belirlenmiştir.

Adsorptif sıyırma yöntemlerinde, doğrudan voltametrik yöntemlerdeki parametrelere ek olarak biriktirme potansiyelinin ve biriktirme süresinin optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla çeşitli potansiyelerde ve sürelerde biriktirme yapılarak biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresinin pik akımı ile değişimi grafiğe geçirilmiş ve KDKAdSV yöntemi

için elde edilen grafik Şekil 4.14'de; DPAdSV için Şekil 4.15'de verilmiştir. Şekillerden, maksimum pik akımının elde edildiği biriktirme süresi KDKAdSV için 45 s, biriktirme potansiyeli ise  $-0,8$  V; DPKAdSV için ise, sırasıyla 60 s ve  $-0,4$  V olarak belirlenmiştir. Bu değerlendirme yapılırken elde edilen kalibrasyon eğrilerinin doğrusal çalışma aralığı ve duyarlılığı da dikkate alınmıştır. Çünkü, DPKAdSV yöntemi için Şekil 4.15 B incelendiğinde, 60 s'den daha yüksek biriktirme sürelerinde daha yüksek pik akımları elde edilmiş olmasına rağmen, daha yüksek biriktirme sürelerinde elde edilen kalibrasyon eğrilerinin doğrusal çalışma aralığının ve eğimlerinin düşük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.14 KDKAdSV yönteminde (A) biriktirme potansiyelinin ve (B) biriktirme süresinin pik akımına etkisi (ÇE: ADCE,  $C_{RBK}$ :  $0,14 \mu\text{M}$ , pH 11,0 BR)

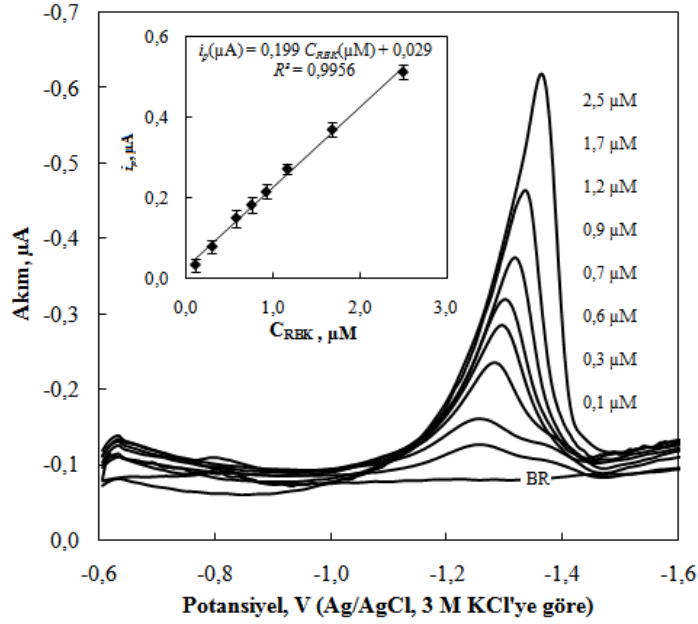


Şekil 4.15 DPKAdSV yönteminde (A) biriktirme potansiyelinin ve (B) biriktirme süresinin pik akımına etkisi (ÇE: ADCE,  $C_{RBK}$ :  $0,04 \mu\text{M}$ , pH 11,0 BR)

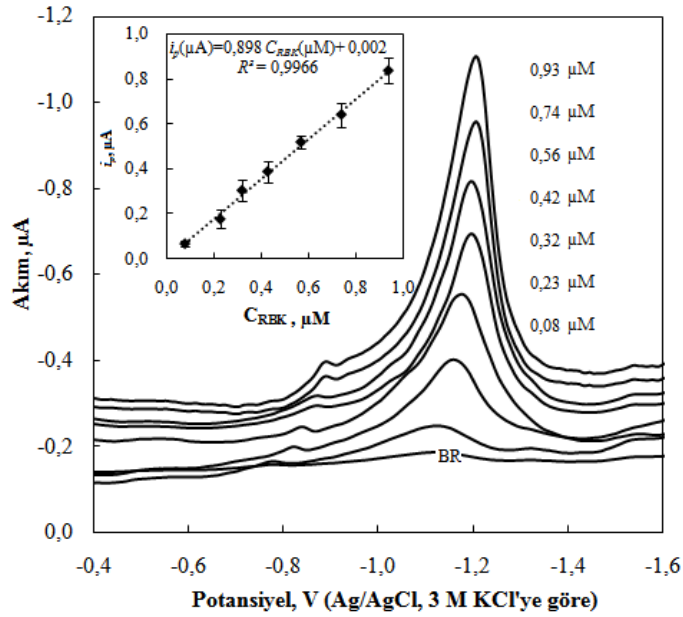
Belirlenen optimum koşullarda söz konusu dört yöntem için çeşitli derişimlerde RBK içeren çözeltilerin farklı voltametrik yöntemlerde voltamogramları alınmış ve bu voltamogramlar Şekil 4.16 (KDV için), Şekil 4.17 (KDKAdSV için), Şekil 4.18 (DPV



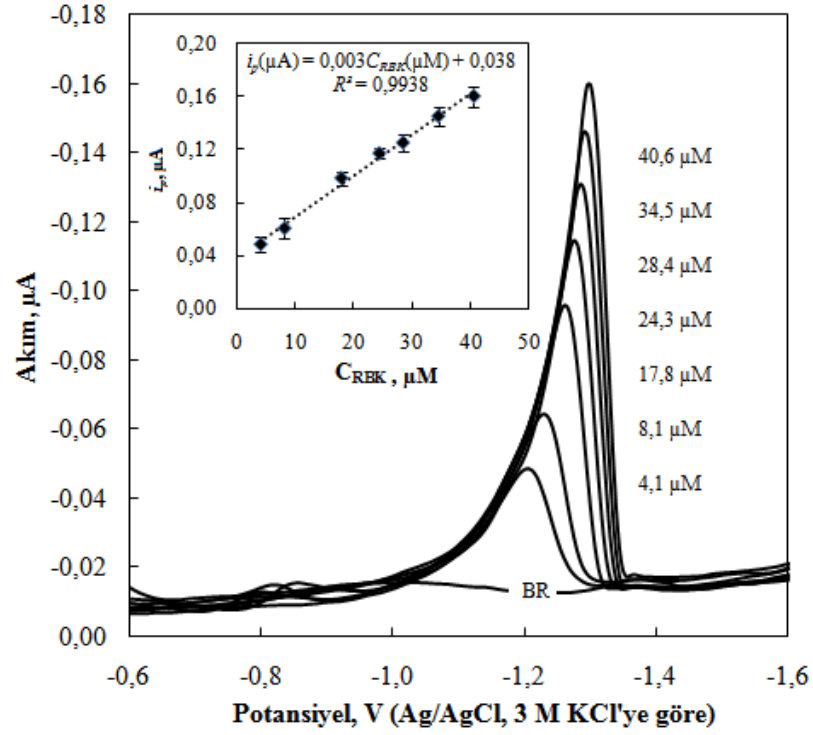
için) ve Şekil 4.19'da (DPKAdSV için) verilmiştir. Bu voltamogramlardaki çeşitli derişimler için, ortalama pik akımları derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğruları oluşturulmuş ve her bir yöntem için oluşturulan bu doğrular ilgili şekillerde iç grafik olarak verilmiştir.



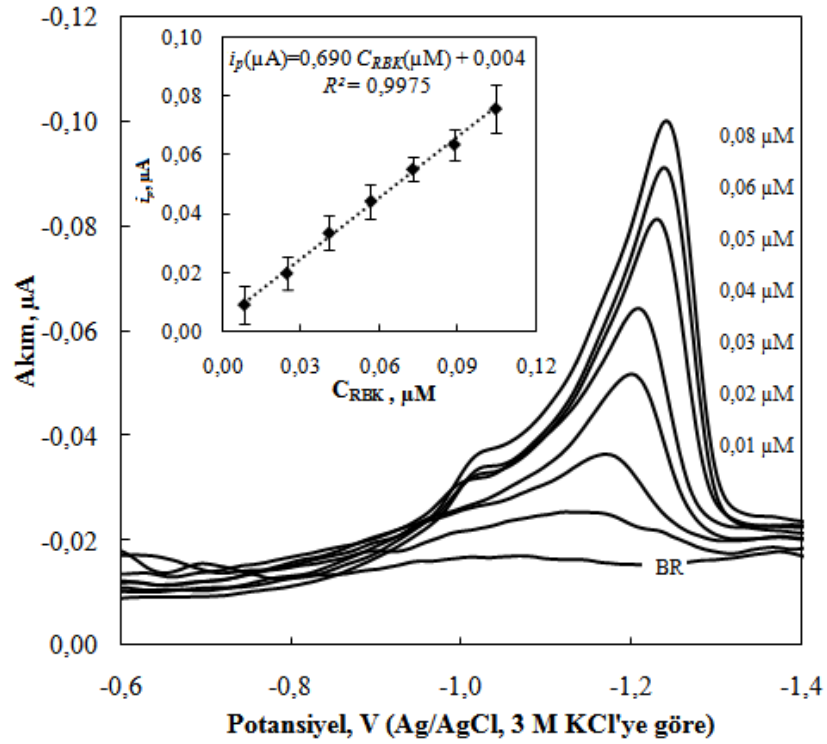
Şekil 4.16 KDV voltamogramlarına RBK derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE)



Şekil 4.17 KDKAdSV voltamogramlarına RBK derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE,  $E_{bir.}$ : -0,8 V,  $t_{bir.}$ : 45 s)



Şekil 4.18 DPV voltamogramlarına RBK derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE)



Şekil 4.19 DPKAdSV voltamogramlarına RBK derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE,  $E_{bir.}$ : -0,4 V,  $t_{bir.}$ : 60 s)

RBK'nın indirgenmesine dayanan nicel tayin yöntemi geliştirme çalışmalarında, elde edilen kalibrasyon verilerinin en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilmesi ile bazı parametreler hesaplanmış ve bunlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 RBK tayini için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak değerlendirilmesiyle hesaplanan regresyon parametreleri

Parametre	KDV	KDKAdSV	DPV	DPKAdSV
Doğrusal çalışma aralığı, $\mu\text{M}$	0,1 – 2,5	0,08 – 0,93	4,10 – 40,60	0,01 – 0,08
Regresyon eşitliğinin eğimi ( $m$ ), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,199	0,898	0,003	0,690
Regresyon eşitliğinin kesim noktası ( $b$ ), $\mu\text{A}$	0,029	0,002	0,038	0,004
Eğimin standart sapması ( $s_m$ ), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,0054	0,024	0,0001	0,016
Kesim noktasının standart sapması ( $s_b$ ), $\mu\text{A}$	0,007	0,013	0,003	0,001
Regresyon katsayısı ( $R^2$ )	0,9956	0,9966	0,9938	0,9975
Gözlenebilme sınırı ( $LOD$ ), $\mu\text{M}$	0,106	0,043	3,000	0,004
Alt tayin sınırı ( $LOQ$ ), $\mu\text{M}$	0,352	0,145	9,900	0,014
Gün-içi akım tekrarlanabilirliği (% BSS) *	4,2	6,2	5,4	7,0
Günler-arası akım tekrarlanabilirliği (% BSS) **	7,4	7,5	6,2	8,4
Gün-içi potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS) *	1,2	2,0	1,8	2,7
Günler-arası potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS) **	2,3	3,1	2,3	3,2

\*Aynı çözelti kullanılarak aynı günde yapılan 5 ölçüm değeri için

\*\*Aynı şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak 5 farklı günde yapılan 5 ölçüm değeri için

RBK için, ADCE kullanılarak voltametrik tayin yöntemi geliştirme çalışmalarında kalibrasyon eğrilerinin değerlendirilmesinde;

- ortalama pik akımının RBK derişimi ile doğrusal olarak değıştiği,
- regresyon katsayısının ( $R^2$ ) 0,99'dan büyük olduğu,
- yöntemlerin kesinliklerinin (pik akımı ve pik potansiyelinin gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirliklerinin) oldukça iyi olduğu

görülmüştür. Ayrıca, geliştirilen dört yöntemin de RBK tayini için uygun olduğu ve;

- doğrudan voltametrik yöntemlerin doğrusal çalışma aralıkları KDV için  $1,0 \times 10^{-7}$  M ( $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) -  $2,5 \times 10^{-6}$  M ( $1,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), DPV için  $4,1 \times 10^{-6}$  M ( $1,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) -  $4,1 \times 10^{-5}$  M ( $16,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) şeklinde olduğu,
- adsorptif sıyırma yöntemlerinin doğrudan voltametrik yöntemlere göre daha düşük derişim aralığında doğrusal ve doğrusal çalışma aralığının KDKAdSV için  $8,0 \times 10^{-8}$  M ( $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) -  $9,3 \times 10^{-7}$  M ( $0,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), DPKAdSV için  $1,0 \times 10^{-8}$  M ( $4,10 \text{ ng mL}^{-1}$ ) -  $1,0 \times 10^{-7}$  M ( $41,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ) şeklinde olduğu,
- kalibrasyon doğrularının eğimleri karşılaştırıldığında, kare dalga voltametri yönteminin diferansiyel pulsa göre daha duyarlı olduğu,
- ilaç geliştirme ve kalite kontrolü gibi göreceli olarak daha yüksek derişimlerde RBK içerdiği bilinen numunelerin analizi için doğrudan voltametrik yöntemlerin uygun olabileceği,
- idrar, serum ve plazma gibi eser miktarda RBK içeren biyolojik numunelerin analizinde ise adsorptif sıyırma yöntemlerinin uygun olabileceği

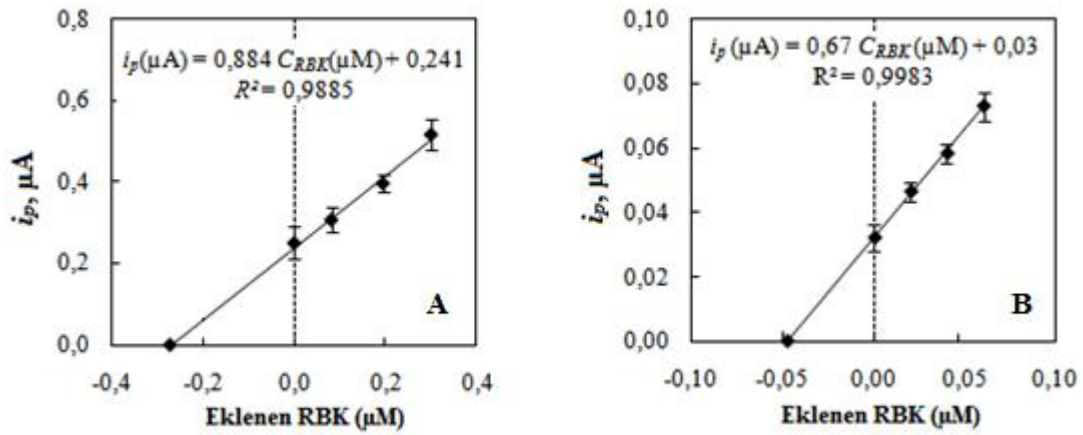
sonucuna varılmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak;

- RBK'nın tedavi edici derişim aralığının  $10,0 - 100,0 \text{ ng mL}^{-1}$  (Baumann vd. 2004, Laux vd. 2007) olduğu ve uygulanan günlük dozun ( $2 \times 4 \text{ mg}$ ) % 10'luk kısmının idrarla değişmeden vücuttan atıldığı (Kadhe vd. 2003) bilgileri de göz önüne alındığında, geliştirilen voltametrik yöntemlerden DPKAdSV yönteminin serum ve idrar numunelerindeki RBK tayinine; doğrudan ve sıyırma voltametrik yöntemlerin ise, ilaç numunelerinde RBK tayinine uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

Bütün bu bulgulardan yararlanılarak geliştirilen yöntemlerin piyasada bulunan ilaçlarda, serum ve idrar numunelerinde RBK tayini için uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla, tablet, serum ve idrar numuneleri Bölüm 3.6, 3.7 ve 3.8'de anlatıldığı şekilde analize hazırlanmıştır.

Tabletlerde ilaç etken maddesi analizlerinde numune matriksinin yöntem performansına anlamlı bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için, KDV, DPV, KDKAdSV ve DPKAdSV yöntemlerinde standart katma yöntemi ile kalibrasyon grafikleri de oluşturulmuş, KDKAdSV ve DPKAdSV için elde edilen eğriler Şekil 4.20'de

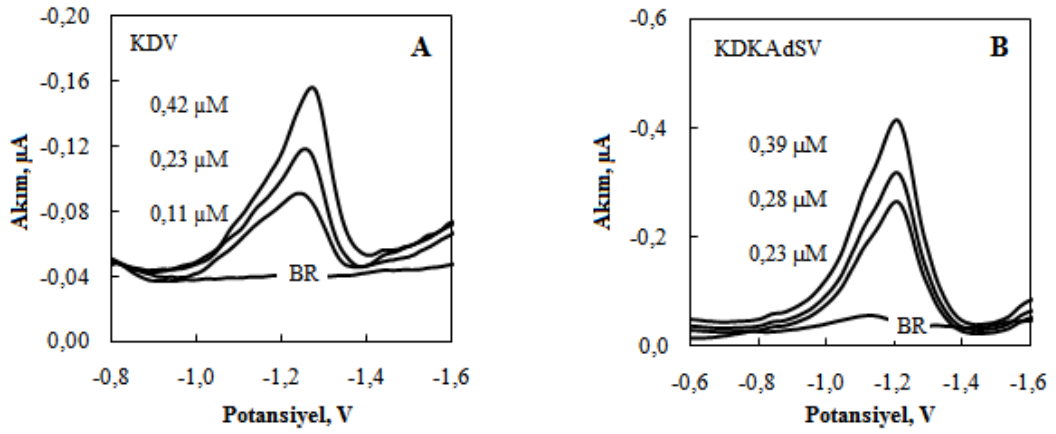
verilmiştir. Şekil 4.17 ve 4.19’da iç grafik olarak verilen kalibrasyon doğrularının eğimleri (KDKAdSV için 0,898 ve DPKAdSV için 0,69) ile standart katma yapılarak oluşturulan (Şekil 4.20) kalibrasyon grafiklerinin eğimleri (KDKAdSV için 0,884 ve DPKAdSV için 0,67) karşılaştırıldığında, eğimler arasında anlamlı bir farkın; yani tabletlerde kullanılan destek ve katkı maddelerinin geliştirilen yöntemlerin performansına etkisinin hemen hemen olmadığı belirlenmiştir. Benzer sonuçlar, KDV ve DPV yöntemlerinde de elde edilmiştir. Ancak, ilaçlarda yapılan nicel analizler hem doğrudan kalibrasyon yöntemi hem de standart katma yöntemi kullanılarak yapılmıştır.



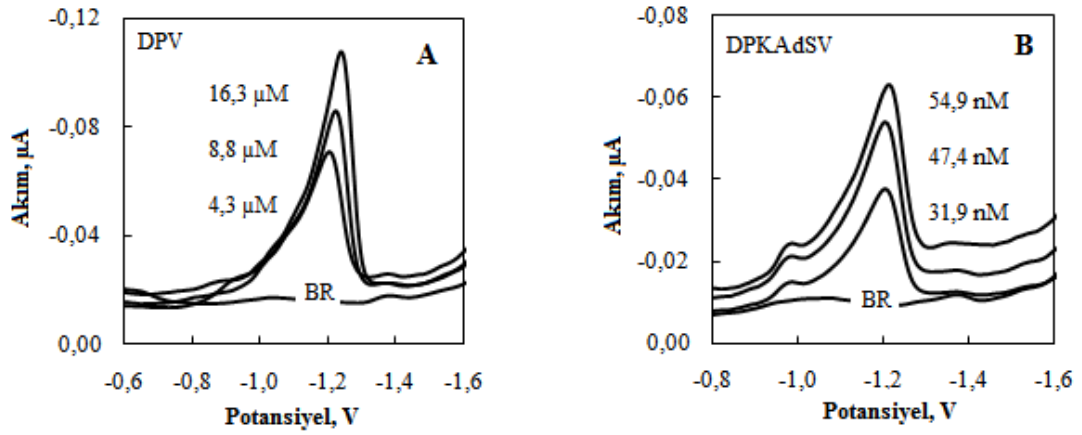
Şekil 4.20 RBK tayini için standart katma kalibrasyon grafikleri: (A) KDKAdSV ve (B) DPKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 11,0 BR. Her bir veri ayrı ayrı elde edilen 5 kalibrasyon eğrisi için ortalama değer olup hata çubukları ile birlikte verilmiştir.)

Bu amaçla, BR tamponuna tablet çözeltisi eklenip (Bölüm 3.6) optimum koşullarda KD, KDKAdS, DP ve DPKAdS voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.21 ve 4.22).

Söz konusu voltamogramlar incelendiğinde, tabletlerde bulunan RBK'nın standart RBK ile hemen hemen aynı potansiyelde bir indirgenme piki verdiği ve bu pikin akımının eklenen tablet çözeltisindeki RBK derişimi ile değiştiği görülmüştür. Ayrıca, bu potansiyel bölgesinde RBK'nın indirgenme pikine girişim etkisi yapabilecek herhangi bir pikin gözlenmemesi, tabletlerde kullanılan koruyucu ve destek maddelerinin bozucu bir etkiye sahip olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir. Bu voltamogramlardan elde edilen pik akımı değerlerinden ve oluşturulan kalibrasyon grafiklerinden doğrudan etken madde derişimleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.21 RBK içeren tablet çözeltilerinin voltamogramlarının derişimle değişimi: (A) KDV ve (B) KDKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 11,0 BR)



Şekil 4.22 RBK içeren tablet çözeltilerinin voltamogramlarının derişimle değişimi: (A) DPV ve (B) DPKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 11,0 BR)

Ayrıca, bu çözeltilere standart etken madde çözeltilerinden eklenerek oluşturulan standart katma grafiklerinden de tabletteki etken madde miktarları bulunmuştur. Her iki yöntemle hesaplanan etken madde derişimlerinden yararlanarak % geri kazanım değerleri bulunmuş ve tüm sonuçlar Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelgeler incelendiğinde, doğrudan kalibrasyon ve standart katma yöntemi ile, geliştirilen dört yöntem kullanılarak hesaplanan geri kazanım değerlerinin yaklaşık % 100 olduğu; bağıl standart sapma değerlerinin ise % 4’den küçük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen yöntemlerin ilaçlardaki etken madde tayinine yüksek bir doğruluk ve kesinlikle uygulanabileceği söylenebilir. Ayrıca, doğrudan kalibrasyon ve

Çizelge 4.2 Dört farklı voltametrik yöntemle Edronax® tabletlerinde RBK tayininde doğrudan kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar

Yöntem	KDV	KDKAdSV	DPV	DPKAdSV
Beyan edilen RBK miktarı, mg	5,2	5,2	5,2	5,2
Bulunan RBK miktarı *, mg	5,20 ± 0,01	4,92 ± 0,30	5,21 ± 0,07	5,16 ± 0,24
	4,92 ± 0,19	5,03 ± 0,33	5,11 ± 0,12	5,22 ± 0,28
	5,21 ± 0,05	5,07 ± 0,21	5,19 ± 0,05	5,08 ± 0,21
	5,08 ± 0,12	5,26 ± 0,27	5,33 ± 0,14	4,99 ± 0,45
	5,36 ± 0,17	5,22 ± 0,14	5,20 ± 0,06	4,95 ± 0,41
Geri kazanım değeri*, %	99,1 ± 3,6	98,1 ± 3,1	100,2 ± 1,7	97,7 ± 2,5
% BSS**	3,2	2,8	2,5	2,2

\*ortalama ± ts/√N (N=5),% 95 güven seviyesinde

\*\*Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

Çizelge 4.3 Dört farklı voltametrik yöntemle Edronax® tabletlerinde RBK tayininde standart katma yöntemiyle elde edilen sonuçlar

Yöntem	KDV	KDKAdSV	DPV	DPKAdSV
Beyan edilen RBK miktarı, mg	5,2	5,2	5,2	5,2
Bulunan RBK miktarı *, mg	5,14 ± 0,26	5,10 ± 0,33	5,19 ± 0,15	4,96 ± 0,28
	5,21 ± 0,48	5,04 ± 0,41	5,26 ± 0,04	5,10 ± 0,31
	5,56 ± 0,21	5,20 ± 0,28	5,15 ± 0,15	5,02 ± 0,25
	5,22 ± 0,12	5,04 ± 1,57	5,28 ± 0,47	5,12 ± 0,23
	5,20 ± 1,52	5,20 ± 0,63	5,14 ± 0,12	5,17 ± 0,36
Geri kazanım değeri*, %	100,7 ± 3,2	97,8 ± 1,6	100,1 ± 1,4	97,2 ± 1,8
% BSS**	3,8	1,5	1,2	1,6

\*ortalama ± ts/√N (N=5),% 95 güven seviyesinde

\*\*Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

standart katma yöntemiyle elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığından, çok sayıda numune analizleneceğinde doğrudan kalibrasyon yönteminin kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Yöntemin doğruluğunu belirlemek için tablet çözeltisi

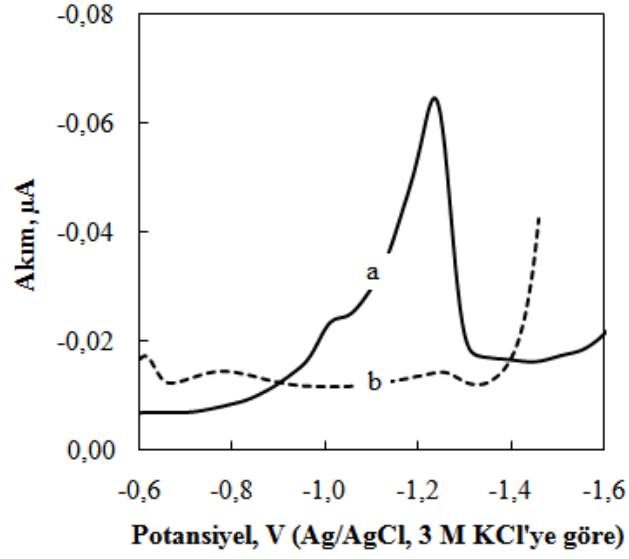
içeren BR tamponuna standart RBK katılmış ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin 100 civarında olması, geliştirilen yöntemlerin doğruluğunu göstermektedir.

RBK'nın serum ve idrar numunelerinde tayin edilip edilemeyeceği de araştırılmıştır. Bu amaçla serum ve idrar numunelerine, standart RBK veya tablet çözeltileri eklenmiş ve serumda proteinler çöktürülmüştür. Bu eklemeler fizyolojik ortamda bulunabilecek miktarlar dikkate alınarak yapılmıştır.

Serum numuneleri kullanılarak yapılan analizlerde, etken madde içeren numunelerin KDKAdS ve DPKAdS voltamogramları alınmıştır. Aynı miktarda etken madde BR tamponuna katıldığında elde edilen voltamogramlarda bir indirgenme pikine rastlanmasına rağmen, serum içeren numunelerde herhangi bir pike rastlanmamıştır. Literatürde, RBK'nın plazma proteinlerine yaklaşık % 98 oranında bağlandığı (Kadhe vd. 2003) belirtilmektedir. Serum numunelerinde herhangi bir pike rastlanmamasının nedeni, serum ortamına eklenen RBK'nın proteinlere kuvvetle bağlanmasından ve dolayısıyla bu aralıkta elektroaktivitesini kaybetmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Bu varsayımı desteklemek için, etken madde katılmamış serum numunelerinde proteinler çöktürülmüş ve sonra etken madde eklenerek voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 4.23).

Şekil 4.23'den de görüldüğü gibi, bu durumda RBK'ya ait bir indirgenme piki elde edilmiş ve pik akımının ilgili kalibrasyon eşitliğinde değerlendirilmesi sonucu % geri kazanım değeri  $98,5 \pm 5,2$  ( $N=5$ ) olarak hesaplanmıştır. Proteinsiz serum numunelerinde hesaplanan yüksek geri kazanım değerlerine karşılık ilaç eklendikten sonra proteinleri çöktürülen veya proteinli hali ile yapılan uygulamalarda RBK'ya ait pikin gözlenmemesi serum proteinlerinin RBK'nın elektrokimyasal aktifliğini engelleyecek şekilde davrandığı varsayımı desteklenmiştir.

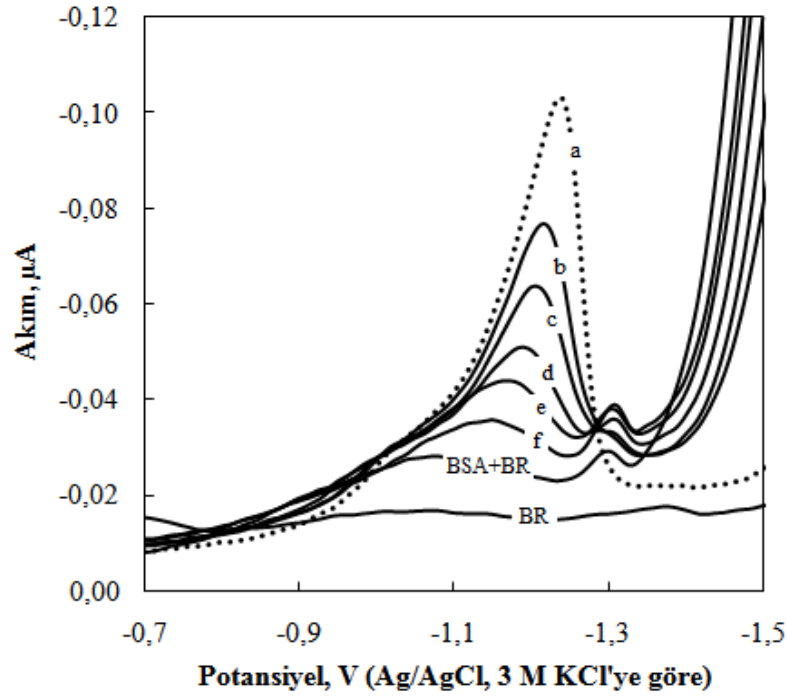




Şekil 4.23 (a) Proteini çöktürüldükten sonra etken madde eklenen, (b) proteini çöktürülmeden etken madde eklenen ve sonra proteini çöktürülen serum numunesinin DPKAdS voltamogramı (ÇE: ADCE,  $C_{RBK} = 0,06 \mu\text{M}$ , pH: 11,0 BR)

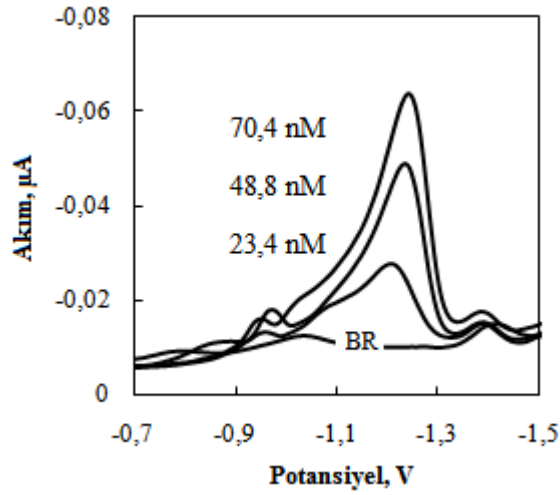
Literatürde benzer durumlar için yapılan çalışmalarda, benzer sonuçlarla karşılaşıldığı rapor edilmiştir (Fotouhi vd. 2009, Cai vd. 2010, Collins vd. 2010, Bi vd. 2011, Özdemir vd. 2011, Wei vd. 2011). Bu çalışmada da insan serumu albüminine (HSA) yapısal benzerliğinden dolayı bovin (sığır) serum albümin (BSA) kullanılarak RBK'nın elektroaktivitesinin protein ortamında azalıp azalmadığı incelenmiştir. Bu amaçla RBK içeren çözeltilere artan derişimlerde BSA çözeltileri katılmış, sıyırma voltamogramları kaydedilmiş ve Şekil 4.24'de DPKAdS voltamogramları verilmiştir.

Şekilden de görüldüğü gibi, RBK'nın pik akımı çözeltiye BSA eklendikçe azalmaktadır. Bu değerlendirmelerden, RBK'nın plazma proteinlerine bağlandığı, proteinle etkileştikten sonra elektroaktivitesini kaybettiği ve bu etkileşimden dolayı serum ortamında RBK'nın nicel tayininin yapılamayacağı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.24 DPKAdSV yönteminde RBK'nın pik akımına BSA'nın etkisi. BSA derişimleri (a) 0 (b) 8,8 nM (c) 13,2 nM (d) 17,5 nM (e) 22,0 nM (f) 26,3 nM (ÇE: ADCE,  $C_{RBK} = 0,1 \mu\text{M}$ , pH: 11,0 BR)

İdrar numunelerinde RBK'nın nicel tayini için, geliştirilen yöntemlerden sadece DPKAdSV yöntemi kullanılmıştır. Çünkü, bu yöntemin doğrusal çalışma aralığı, idrarda bulunan RBK derişim aralığına uygundur. Bölüm 3,9'da anlatıldığı şekilde hazırlanan idrar numunelerine uygun miktarda RBK katılmış ve DPKAdS voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.25). Voltamogramlardan da görüldüğü gibi RBK içermeyen idrar numunesinde ilgili potansiyel bölgesinde herhangi bir pike rastlanmamakla birlikte, RBK derişimi arttıkça artan pik akımına sahip bir pik oluşmaktadır. Hem standart katma hem de doğrudan kalibrasyon yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiklerinin eğimlerinin yaklaşık aynı olması nedeniyle doğrudan kalibrasyon yöntemiyle analiz yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelge 4.4'deki % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri, bu yöntemin, idrarda RBK'nın nicel tayininde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.25 RBK içeren idrar çözeltilerinin DPKAdS voltamogramlarının derişimle değişimi (ÇE: ADCE, pH: 11,0 BR)

Çizelge 4.4 DPKAdSV yöntemiyle idrar numunelerinde RBK tayininden doğrudan kalibrasyon ve standart katma ile elde edilen sonuçlar

Yöntem	DPKAdSV doğrudan kalibrasyon			DPKAdSV standart katma
	Eklene RBK miktarı *, µg	2,88	2,00	0,96
Bulunan RBK miktarı, µg	2,82	1,79	0,89	2,41
	3,13	1,99	0,93	2,65
	2,72	2,04	0,98	2,50
	2,82	1,86	0,94	2,39
	2,87	2,18	1,06	2,44
Geri kazanım değeri **, %	99,7 ± 6,1	98,6 ± 8,8	100,4 ± 7,8	98,3 ± 4,8
% BSS ***	5,3	7,7	6,7	4,2

\* 1,0 mL idrar numunesine eklene RBK miktarı

\*\* ortalama ± ts/√N (N=5), %95 güven seviyesinde

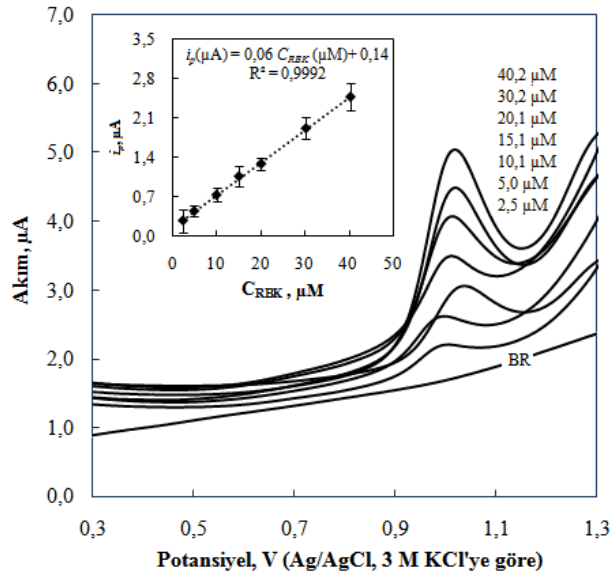
\*\*\* Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağul standart sapma

Bu sonuçlara göre, geliştirilen dört voltametrik yöntemin ilaç tabletlerinde etken madde tayini için kullanılabileceği; DPKAdSV yönteminin idrarda RBK tayinine uygulanabileceği ve proteinlere etken maddelerin bağlanma oranlarının hesaplanabileceği söylenebilir.

RBK'nın CKE yüzeyinde de elektrokimyasal aktifliğe sahip olduğu Bölüm 4.1.1'de belirlenmişti. Şekil 4.7 incelendiğinde, RBK'nın CKE yüzeyinde pH 7,0'da en yüksek pik akımı oluşturacak şekilde yükseltgenme piki verdiği ve bu pikin akımının RBK derişimi ile doğrusal olarak değiştiği görülmüştü. Bu nedenle RBK'nın nicel tayini için bu yükseltgenme pikinden yararlanarak çeşitli voltametrik yöntemlerin geliştirilebileceği düşünöldü. Ancak, RBK'nın CKE'de yapılan gerek optimizasyon gerekse yöntem geliştirme çalışmalarında sadece KDV yönteminde elde edilen parametrelerin tayin yöntemi geliştirmeye uygun olduğu görölmüştür. Bu yöntemde yapılan optimizasyon çalışmalarında elde edilen optimum parametreler aşağıda verilmiştir:

- Destek elektrolit cinsi ve derişimi: 0,04 M BR
- pH: 7,0
- Yöntem değişkenleri:  $E_a = 4$  mV,  $E_p = 25$  mV,  $f = 15$  Hz

Belirlenen optimum koşullarda, söz konusu yöntem için, çeşitli derişimlerde RBK içeren çözeltilerin KDV voltamogramları alınmış ve bu voltamogramlar Şekil 4.26'da verilmiştir. Her bir deney 5 kez tekrarlanmış olup ortalama pik akımları derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve Şekil 4.26'da iç grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4.26 RBK'nın farklı derişimlerdeki KDV voltamogramları (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) RBK derişimi ( $C_{RBK}$ ) ile değişimi, ÇE: CKE)

CKE kullanılarak RBK tayini için yapılan yöntem geliştirme çalışmalarında kalibrasyon çalışmalarında elde edilen kalibrasyon verilerinin en küçük kareler yöntemiyle değerlendirilmesi ile bazı validasyon parametreleri hesaplanmış ve bu parametreler Çizelge 4.5’de verilmiştir.

RBK’nın yükseltgenmesine dayanarak geliştirilen KDV yönteminde; ortalama pik akımının RBK derişimi ile doğrusal değiştigi, regresyon katsayısının ( $R^2$ ) 0,99’dan büyük olduğu, pik akımı ve pik potansiyelinin gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirliklerinin yeterli olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5 RBK tayini için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak değerlendirilmesiyle hesaplanan regresyon parametreleri

Parametre	KDV
Doğrusal çalışma aralığı, $\mu\text{M}$	2,5 – 40,2
Regresyon eşitliğinin eğimi ( $m$ ), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,06
Regresyon eşitliğinin kesim noktası ( $b$ ), $\mu\text{A}$	0,14
Eğimin standart sapması ( $s_m$ ), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,001
Kesim noktasının standart sapması ( $s_b$ ), $\mu\text{A}$	0,016
Regresyon katsayısı ( $R^2$ )	0,9992
Gözlenebilme sınırı ( $LOD$ ), $\mu\text{M}$	0,8
Alt tayin sınırı ( $LOQ$ ), $\mu\text{M}$	2,7
Gün-içi akım tekrarlanabilirliği (% BSS) *	6,3
Günler-arası akım tekrarlanabilirliği (% BSS) **	7,5
Gün-içi potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS) *	1,6
Günler-arası potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS) **	1,7

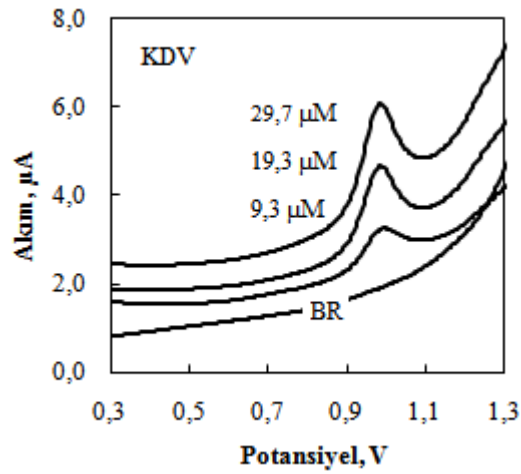
\*Aynı çözelti kullanılarak aynı günde yapılan 5 ölçüm değeri için

\*\*Aynı şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak 5 farklı günde yapılan 5 ölçüm değeri için

Ayrıca, geliştirilen KDV yönteminin RBK tayini için uygun olduğu ve doğrusal çalışma aralığının  $2,5 \times 10^{-6}$  M ( $1,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) -  $4,0 \times 10^{-5}$  M ( $16,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, geliştirilen KDV yönteminin elde edilen doğrusal çalışma aralığının

sadece tablet numunelerindeki RBK'nın tayinine yeterli olduğu, serum ve idrar gibi eser miktarda RBK içeren numunelere bir ön deriştirme yapılmadan uygulanamayacağı görülmüştür.

Bütün bu bulgulardan yararlanılarak, geliştirilen KDV yöntemi ile piyasadaki mevcut ilaçlarda RBK tayini yapılmıştır. Tayin çalışmasında kullanılan numune çözeltileri, Bölüm 3.6'da belirtildiği şekilde hazırlanmış, bu numunelerin KDV yöntemi kullanılarak voltamogramları alınmış ve bu voltamogramlar Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.27 RBK içeren tablet çözeltilerinin KDV voltamogramlarının derişimle değişimi (ÇE: CKE, pH: 7,0 BR)

Şekil 4.27'deki voltamogramlar incelendiğinde, RBK'nın CKE yüzeyindeki yükseltgenme pikinin tablet numunelerinde de belirgin bir şekilde gözleendiği ve pik akımının eklene tablet çözeltilerindeki RBK derişimi ile değiştirdiği görülmüştür. Ayrıca, tablet numunelerinde bulunan katkı maddelerinin RBK'nın yükseltgenme piki bölgesinde herhangi bir pik vermemesi, bu katkıların RBK tayinine girişim etkisi yapmayacağı sonucunu doğurmuştur. Bu amaçla hem doğrudan kalibrasyon hem de standart katma grafikleri oluşturulmuş ve elde edilen grafiklerin eğimlerinin yaklaşık aynı olması da ortamda bulunan katkı maddelerinin bozucu etki yapmadığını göstermiştir. Bütün bu bulgular, geliştirilen yöntemin ilaçlarda etken madde tayinine uygulanabileceğini ve doğrudan kalibrasyon yönteminin kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak, bu çalışmada her iki kalibrasyon yöntemiyle de tayin yapılmış ve % geri kazanım değerleri belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge

4.6’da verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, geliştirilen KDV yöntemiyle tablet numuneleri için hesaplanan geri kazanım değerinin yaklaşık % 100; bağıl standart sapma değerinin ise % 2’den küçük olduğu bulunmuştur. Geliştirilen KDV yönteminin, RBK içeren ilaçların kalite kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılabileceği sonucu çıkarılabilir.

Çizelge 4.6 KDV yöntemiyle Edronax<sup>®</sup> tabletlerinde RBK tayininde doğrudan kalibrasyon ve standart katma ile elde edilen sonuçlar

Yöntem	KDV, doğrudan kalibrasyon	KDV, standart katma
Beyan edilen RBK miktarı, mg	5,2	5,2
Bulunan RBK miktarı *, mg	5,16 ± 0,11	5,02 ± 0,32
	5,07 ± 0,10	5,22 ± 0,16
	5,04 ± 0,09	5,16 ± 0,14
	5,17 ± 0,18	5,10 ± 0,24
	5,24 ± 0,24	5,28 ± 0,08
Geri kazanım değeri *, %	98,4 ± 1,5	99,12 ± 2,3
% BSS **	1,8	2,0

\* ortalama  $\pm ts/\sqrt{N}$ , %95 (N=5) güven seviyesinde

\*\* Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

RBK’nın hem indirgenmesi hem de yükseltgenmesi için geliştirilen yöntemler, literatürde aynı madde için geliştirilen yöntemler ile karşılaştırılarak yöntemlerin doğruluğu ve kesinliği arasında anlamlı bir farkın olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, yöntemlerin doğrulukları % 95 güven seviyesinde *t* testi; kesinlikleri ise, *F* testi uygulamaları yapılarak karşılaştırılmıştır (Skoog 2004). Geliştirilen voltametik yöntemlerin tablet ilaç formlarına uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar, Raggi ve arkadaşları (2002) tarafından geliştirilen türev spektrofotometre yönteminin uygulama sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve hesaplanan *t* ve *F* değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Çizelge 4.7 incelendiğinde, yöntemler arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.7 Edronax<sup>®</sup> tabletlerinde RBK tayini için geliştirilen voltametrik yöntemlerin türev spektrofotometre yöntemi ile istatistiksel olarak karşılaştırılması

Yöntem	Geri kazanım değeri, %	% BSS	N	Hesaplanan <i>t</i> değeri	Hesaplanan <i>F</i> değeri
Türev spektrofotometre	99,6	2,9	6		
KDV <sub>ADCE</sub> 'de	99,1	3,2	10	0,21	0,82
KDKAdSV <sub>ADCE</sub> 'de	98,1	2,8	10	0,69	1,15
DPV <sub>ADCE</sub> 'de	100,2	2,5	10	0,76	1,34
DPAAdSV <sub>ADCE</sub> 'de	97,7	2,2	10	0,95	1,73
KDV <sub>CKE</sub> 'de	98,4	1,8	10	0,64	2,49
Teorik değerler*				2,15	2,71

\* % 95 güven seviyesinde (Gündüz 1997)

## 4.2 Moklobemid (MKB)

Bu bölümde MKB ile ilgili elektrokimyasal çalışmaların ve voltametrik yöntem geliştirme çalışmalarının sonuçları incelenmiştir.

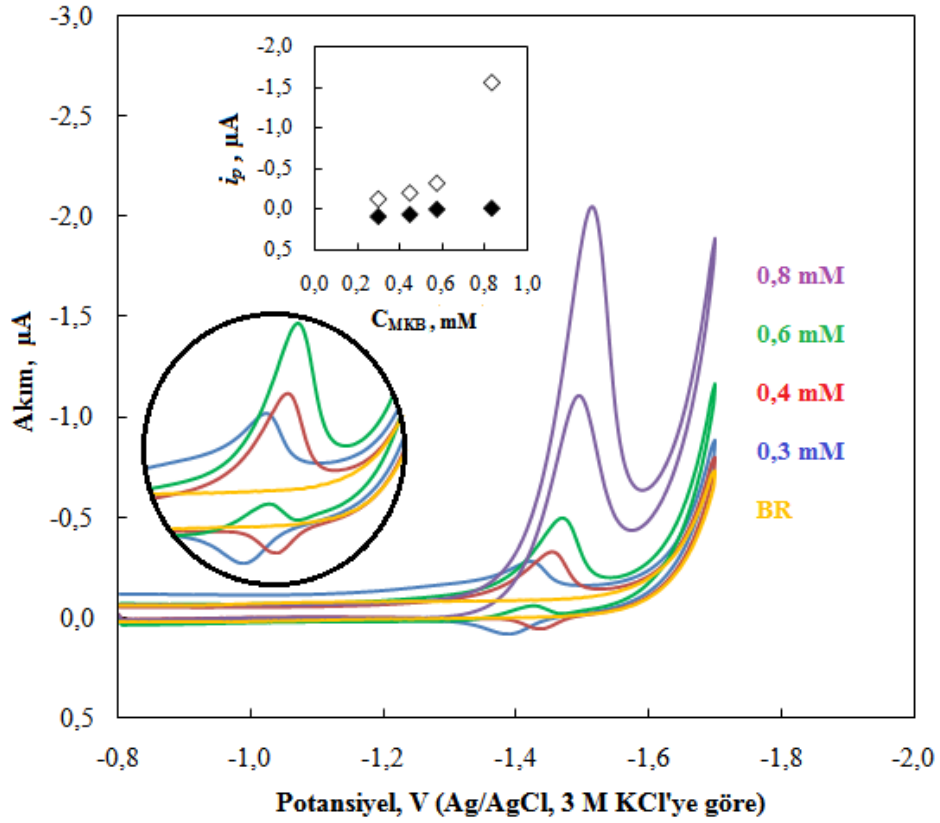
### 4.2.1 MKB'nin elektrokimyasal davranışı

Çalışmanın bu kısmında, özellikleri Bölüm 2.1.1'de verilen MKB'nin elektrokimyasal davranışı sırasıyla ADCE ve CKE yüzeylerinde DV, NPV, KDV, KK ve BE yöntemleri ile incelenmiştir. Yapılan elektrokimyasal deneylerin sonuçları değerlendirilmiş ve elektrot yüzeyindeki indirgenme/yükseltgenme tepkimeleri için olası mekanizmalar önerilmiştir. Çalışmalarda Şekil 3.1'deki elektrokimyasal sistem kullanılmış, voltametrik ölçümler, Bölüm 3.9'da açıklandığı şekilde yapılmıştır.

Elektrokimyasal çalışmalarda, öncelikle MKB'nin pH 10,0'da BR tamponunda farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerinin  $-0,8 \text{ V} - (-1,7 \text{ V})$  aralığında dönüşümlü voltamogramları alınmış ve Şekil 4.28'de verilmiştir. Söz konusu şekilden de görüldüğü



gibi, yaklaşık  $-1,45$  V'da akımı MKB derişimi ile değişen indirgenme/yükseltgenme pik çifti gözlenmiştir. Aynı çalışma koşullarında destek elektrolit olarak kullanılan BR çözeltisinin dönüşümlü voltamogramında herhangi bir pik kaydedilmemiştir. Artan MKB derişimi ile pik akımlarının artması (Şekil 4.28, iç grafik), gözlenen pik çiftinin ya MKB'nin cıva yüzeyinde kendi indirgenme/yükseltgenme davranışından ya da MKB'nin aracılık ettiği bir indirgenme/yükseltgenme olayından kaynaklandığı şeklinde değerlendirilmiştir. Şekil 4.28'de verilen voltamogramlarda yükseltgenme pikinin de gözlenmesi, MKB'nin ADCE yüzeyindeki indirgenmesinin tersinir olabileceğini düşündürmüştür.



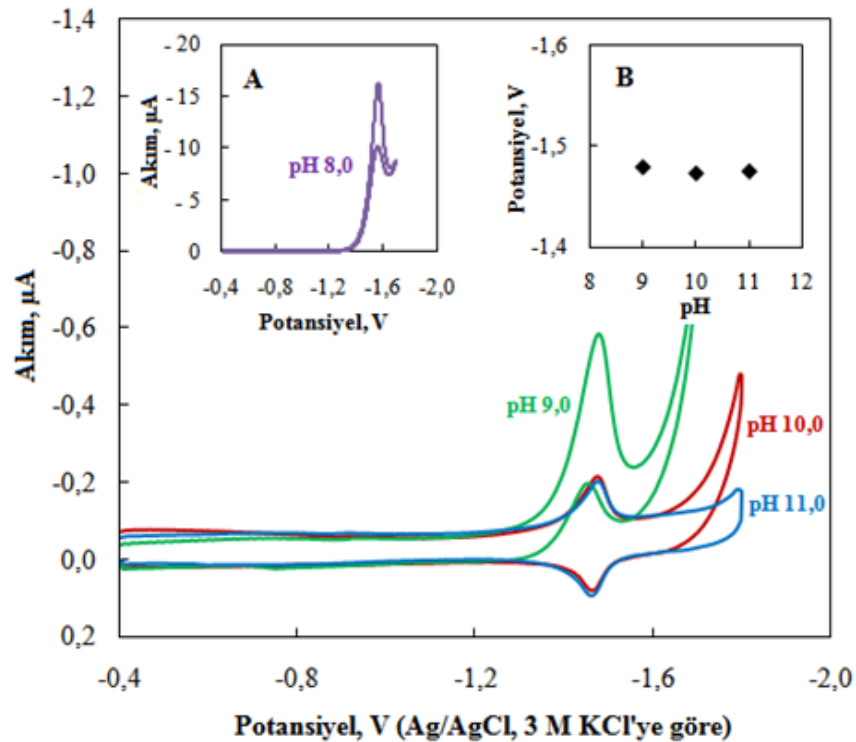
Şekil 4.28 Farklı derişimlerde MKB içeren çözeltilerin dönüşümlü voltamogramları: iç grafik  $\diamond$  katodik ve  $\blacklozenge$  anodik pik akımlarının MKB derişimi ile değişimi (ÇE: ADCE,  $v$ : 0,100 V/s, pH:10,0 BR,  $E_b$ :  $-0,8$  V,  $E_d$ :  $-1,7$  V,  $E_s$ :  $-0,8$  V)

Ayrıca, yüksek MKB derişimlerinde kaydedilen dönüşümlü voltamogramların incelenmesinde anodik piklerin davranışı MKB'nin cıva yüzeyindeki elektrokimyasal indirgenme/yükseltgenme mekanizmasında katalitik etkinin olabileceğini akla

getirmiştir. Öyle ki, çözeltideki MKB derişimi belirli bir değere kadar arttırıldığında, ileri ve geri taramada tersinir ya da yarı tersinir dönüşümlerden beklenen pikler gözlenmiştir. Ancak, daha yüksek MKB derişimlerinde yükseltgenme yönünde tarama yapıldığında, düşük derişimlerde gözlenen yükseltgenme pikinin akım polaritesi değişerek indirgenme yönündeki akım ile aynı polaritede pik verdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, düşük derişimlerdeki yükseltgenme davranışı, derişim arttırıldığında potansiyel tarama yönü yükseltgenme de olsa elektrot yüzeyinde indirgenmenin devam ettiği düşünülmüştür. Böyle bir davranışa tam bir açıklama getirilememiştir; ancak, bazı maddeler için böyle davranışların görüldüğü belirtilmiştir (Nakiboğlu 2010). Bu davranış maddenin elektrot yüzeyine çok kuvvetli adsorplanması dikkate alınarak açıklanabilir. MKB derişimi belirli bir değerin altında tutulduğunda, çalışma elektrodu yüzeyine adsorbe olan molekülün elektrot yüzeyinde tamamen indirgendiğini; geri tarama durumunda ise bu türlerin yükseltgendiğini söyleyebiliriz. Derişim belirli bir değeri aştığında ortaya çıkan bu durum, elektrot yüzeyinde adsorplanan türlerin belli bir kısmının indirgenebildiği; geri tarama sırasında indirgenen türlerin yükseltgenmesinin yanı sıra yüzeye kuvvetle adsorplanıp indirgenmemiş türlerin de indirgendiği; oluşan akımın bu indirgenmeye ve yükseltgenmeye ait olan akımların toplamı olduğu; indirgenme akımının daha baskın olduğu şeklinde yorumlanabilir.

ADCE yüzeyinde elektroaktif olduğu belirlenen MKB moleküllerinin bu elektrottaki elektrokimyasal davranışının ayrıntılı olarak incelenmesinde, ilk olarak pik potansiyeli ve pik akımına pH'nın etkisi araştırılmıştır. MKB derişimi 0,3 mM olan çözeltilerin pH'sı BR tamponu kullanılarak 2,0-12,0 arasında değiştirilmiş ve dönüşümlü voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.29). pH değerinin 8,0'dan küçük olduğu durumlarda, moleküle ait herhangi bir pik gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu durumun; MKB'nin yukarıda belirtilen pH değerlerinde elektrokimyasal olarak aktif olmamasından ya da elektrokimyasal olarak aktif olmasına rağmen beklenen pik potansiyelinin cıva yüzeyinde hidrojen aşırı gerilimi potansiyeline göre daha katodik değerlerde kalmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çünkü, cıva yüzeyinde ortamda bulunan hidronyum iyonlarının indirgenerek hidrojen molekülü oluşturması için gereken potansiyelin, çözeltinin pH değerine bağlı olarak -1,25 V ile -1,85 V arasında değiştiği bilinmektedir (Scholz vd. 2010). Diğer taraftan, pH 8,0'da kaydedilen

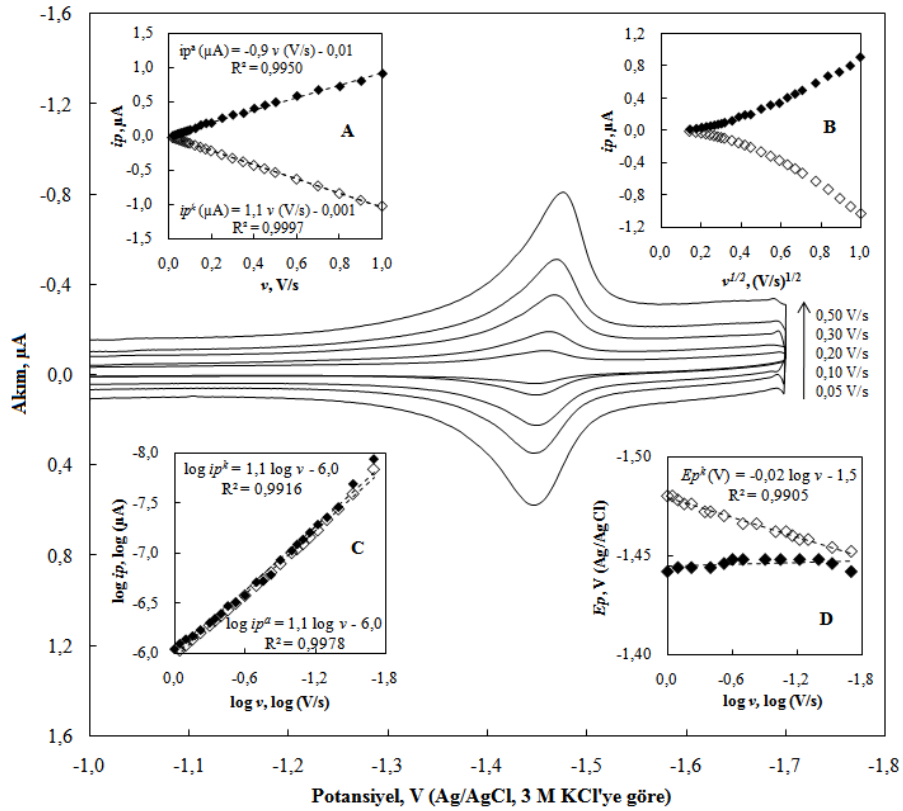
voltamogramın (Şekil 4.29, iç grafik A) pik akımının pH'nın 8,0'dan küçük olduğu değerlerde kaydedilen pik akımlarına oranla oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, söz konusu pH değerinde gerçekleşen elektrokimyasal dönüşümün potansiyeli ile hidrojenin indirgenme potansiyelinin aynı olması koşulunda, MKB pikinin hidrojen aşırı gerilimi ile birleşerek daha yüksek akım oluşturmasıyla ortaya çıktığı düşünülmüştür. Bu gözlem, yüzeyde gerçekleşen elektrokimyasal değişimin katalitik etkiden kaynaklanabileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Çünkü, katalitik etkiyle hidrojen iyonunun indirgenmesi daha düşük potansiyellerde gerçekleşebilmekte ve ilgili madde için elde edilen sinyalin şiddeti artabilmektedir (Nakiboğlu 2010). Benzer durumların KD voltamogramları alınarak da gözlenmiştir. Ayrıca, elde edilen verilerden, yüksek pH değerlerinde, MKB'nin indirgenme/yükseltgenme pik çiftinin potansiyel değerlerinin pH ile değişmediği de belirlenmiştir (Şekil 4.29, iç grafik B). Buradan, MKB'nin indirgenmesinde, hidronyum iyonunun moleküle bağlanmasıyla doğrudan bir etkisinin olmadığı, yani, MKB'nin hidrojenin indirgenmesinde katalitik bir rol oynadığı sonucu çıkarılabilir.



Şekil 4.29 Sabit derişimde MKB içeren çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan dönüşümlü voltamogramları iç grafik: (A) pH 8,0 (B) pik potansiyelinin pH ile değişimi ( $C_{MKB} = 0,3 \text{ mM}$ , ÇE: ADCE,  $v: 0,100 \text{ V/s}$ )

Şekil 4.29 incelendiğinde, anodik ve katodik piklerin birlikte gözlemlendiği pH değerinin 10,0 ve 11,0 olduğu görülmüştür; ancak, en yüksek pik akımı pH 10,0'da elde edilmiştir. Bu nedenle, mekanizma ile ilgili diğer bütün çalışmalar, pH'sı 10,0 olan çözeltilerde gerçekleştirilmiştir.

MKB'nin elektrokimyasal davranışının incelenmesinde, pH değişkeninden sonra pik akımı ve pik potansiyeline tarama hızının etkisi araştırılmıştır. Bunun amaçla, pH'sı 10,0'a ayarlanmış 0,3 mM MKB çözeltisinin 0,005 - 1,000  $Vs^{-1}$  arasındaki çeşitli tarama hızlarında voltamogramları kaydedilmiş ve  $i_p-v$ ,  $i_p-\sqrt{v}$ ,  $\log i_p-\log v$  grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.30).



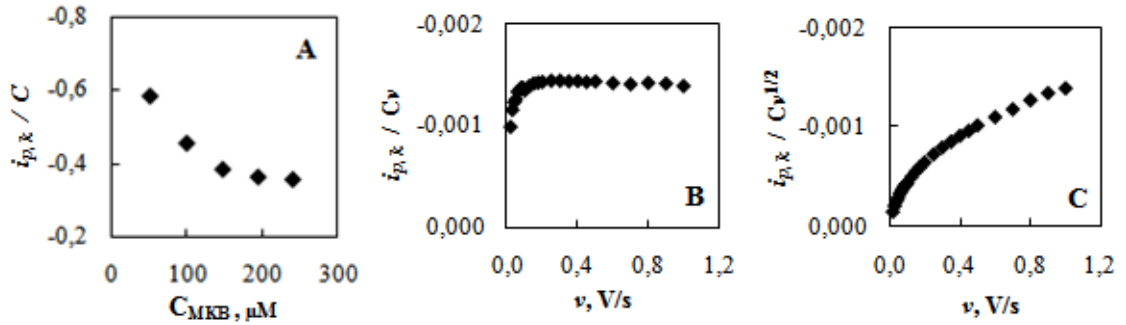
Şekil 4.30 Sabit derişimde MKB içeren çözelti kullanılarak farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlar: iç grafik: (A) katodik ve anodik pik akımının tarama hızı ile değişimi, (B) katodik ve anodik pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi, (C) katodik ve anodik pik akımının logaritmasının tarama hızının logaritması ile değişimi, (D) katodik pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi (ÇE: ADCE,  $C_{MKB} = 0,3$  mM, pH:10,0 BR,  $E_b$ : -1,0 V,  $E_d$ : -1,7 V,  $E_s$ : -1,0 V;  $\diamond$  katodik pik,  $\blacklozenge$  anodik pik)

Şekil 4.30 incelendiğinde, tarama yönü değiştirildiğinde gözlenen yükseltgenme piki, gerçekleşen elektrokimyasal dönüşümün tersinir olabileceğini düşündürmüştür. İdeal tersinir bir elektrokimyasal mekanizma için anodik pik akımının katodik pik akımına oranının 1,0 olması ve pik potansiyelinin tarama hızından etkilenmemesi gerekmektedir (Wang 2006). MKB için gerçekleştirilen bu çalışmada, pik potansiyeli tarama hızı ile değişmemiş; anodik pik akımının katodik pik akımına oranı yaklaşık 1,1 olarak hesaplanmıştır. Bu verilerden, incelenmekte olan mekanizmanın tersinir olabileceği düşünülmüştür.

Tarama hızı çalışmalarında, katodik pik akımının ( $i_{p,k}$ ) tarama hızı ile değişim denklemi  $i_{p,k} (\mu A) = 1,1 v (Vs^{-1}) - 0,001$ ;  $R^2 = 0,9997$ , anodik pik akımının ( $i_{p,a}$ ) tarama hızı ile değişim denklemi ise  $i_{p,a} (\mu A) = -0,9 v (Vs^{-1}) - 0,01$ ;  $R^2 = 0,9950$  şeklinde bulunmuştur (Şekil 4.30, iç grafik A). Pik akımı ve tarama hızı arasındaki doğrusal ilişki, MKB için cıva yüzeyinde adsorpsiyon kontrollü bir mekanizmanın söz konusu olduğunu düşündürmüştür. Pik akımının (A) logaritmasının tarama hızının ( $Vs^{-1}$ ) logaritması ile değişimi incelendiğinde ise, anodik ve katodik pikler için oluşturulan doğrusal değişim grafiklerinin eğimi 1,1 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.30, iç grafik C). Katodik ve anodik pikler için hesaplanan bu eğim değerlerinin, adsorpsiyon kontrollü mekanizmalar için önerilen 1,0 değerine (Wang 2006) oldukça yakın olduğu görülmüştür. Bu deneysel sonuç, mekanizmanın adsorpsiyon kontrollü olması gerektiğini düşündürmüştür. Ayrıca, pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi (Şekil 4.30, iç grafik B) incelendiğinde, doğrusal olmayan bir değişim gözlenmesi de elektron aktarımının adsorpsiyon kontrollü olması sonucunu desteklemektedir.

Adsorpsiyon davranışını değerlendirmek için literatürde verilen başka deneysel çalışmalar da yapılmış ve şu sonuçlar elde edilmiştir (Wopschall ve Shain 1967, Hulbert ve Shain 1970): Artan MKB derişimiyle, katodik pik akımının MKB derişimine oranının ( $i_{p,k}/C$ ) azaldığı; tarama hızının artmasıyla, katodik pik akımının derişim tarama hızı çarpımına oranının ( $i_{p,k}/Cv$ ) sabit kaldığı ve tarama hızının artmasıyla, katodik pik akımının, derişim ile tarama hızının karekökünün çarpımına oranının ( $i_{p,k}/Cv^{1/2}$ ) arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.31). Elde edilen deneysel sonuçlar değerlendirildiğinde, MKB'nin cıva yüzeyinde gözlenen elektrokimyasal indirgenme/yükseltgenme

davranışının tersinir ve adsorpsiyon kontrollü olabileceği sonucu çıkarılmıştır. Ayrıca, NPV yöntemi ile yapılan çalışmalarda, dalga şekli yerine pik şeklinde kaydedilen voltamogramlar, MKB'nin elektrot yüzeyine adsorbe olarak elektron aktarımına katıldığı varsayımını desteklemektedir (Scholz vd. 2010).



Şekil 4.31 MKB'nin elektrokimyasal davranışına adsorpsiyonun etkisi (A)  $i_{p,k}/C$  oranının MKB derişimi, (B)  $i_{p,k}/Cv$  oranının tarama hızı, (C)  $i_{p,k}/Cv^{1/2}$  oranının tarama hızı ile değişimi (ÇE: ADCE,  $C_{MKB} = 0,3$  mM, pH: 10,0 BR)

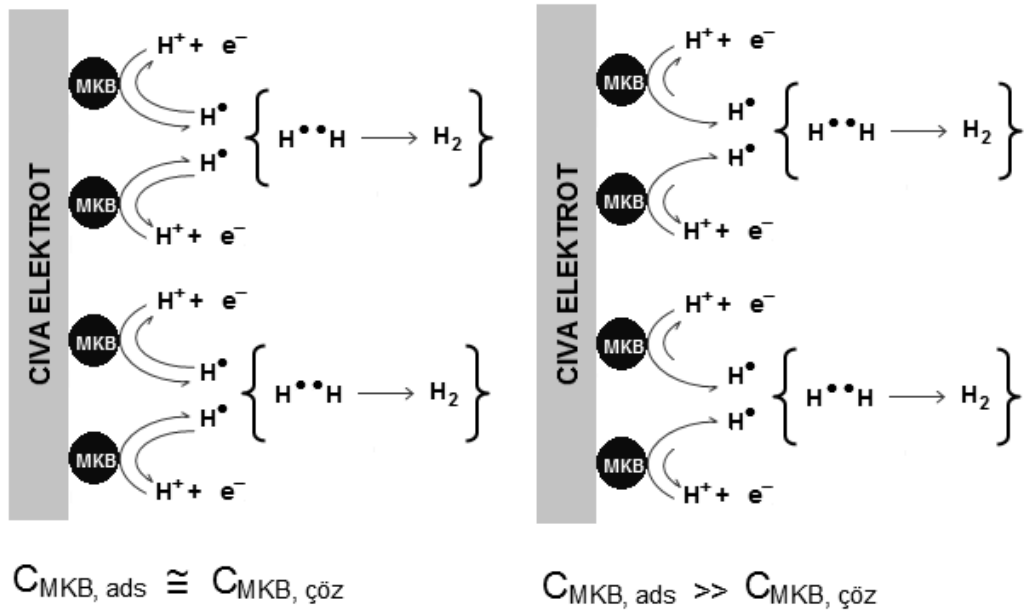
Tarama hızının pik akımına etkisinin yanı sıra, katodik ve anodik pik potansiyeline etkisi de araştırılmıştır. Tarama hızının artmasıyla anodik pik potansiyelinde belirgin bir değişim gözlenmemiş ancak, katodik pik potansiyelinde  $-1,45$  V'tan  $-1,50$  V'a doğru hafif bir kayma belirlenmiştir (Şekil 4.30). Tarama hızı ile anodik ve katodik pik potansiyellerinin farklı değişim göstermesi, indirgenmiş tür ile yükseltgenmiş türün elektrot yüzeyine farklı kuvvetlerle adsorbe olmasından kaynaklandığını düşündürmüştür. Tarama hızının logaritmasına karşı pik potansiyeli grafiğe geçirilmiş ve pik potansiyeli ile tarama hızının logaritmasının;  $E_p(V) = -0,02 \log v - 1,5$  ( $R^2 = 0,9905$ ) eşitliğini sağlayacak şekilde değiştirdiği görülmüştür (Şekil 4.30, iç grafik D). Çizilen bu grafikten elde edilen doğrunun eğimi ve Eşitlik 3.12 kullanıldığında, anodik yük aktarım katsayısı olan  $\alpha$  ile elektrot tepkimesinde aktarılan elektron sayısının çarpımı ( $n\alpha$ ) 0,72 olarak hesaplanmıştır. Aynı parametre kare dalga voltametriye yapılan frekans çalışmalarında ise, 0,75 olarak bulunmuştur. Yük aktarım katsayısının 0,5'den büyük bulunması elektrokimyasal tepkimede oluştuğu varsayılan aktifleşmiş kompleksin, tepkime koordinatına göre simetri merkezinde olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

MKB'nin indirgenmesinde aktarılan elektron sayısını hesaplamak için, sabit potansiyelli kulometri çalışması yapılmıştır. Bu çalışma, Bölüm 3.9.5'de anlatıldığı şekilde, pH 10,0'da  $-1,6$  V sabit potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. MKB çözeltisinin elektroliz öncesi ve elektroliz sonrası kaydedilen voltamogramları değerlendirilmiş, gerçekleşen elektroliz olayının, pik akımı ve pik potansiyelinde kayda değer bir değişikliğe sebep olmadığı gözlenmiştir. Bu deneysel sonuçlarla ilgili akla gelen ilk olasılık, yapılan bulk elektroliz çalışmalarında herhangi bir elektrokimyasal dönüşümün gerçekleşmediğidir. Ancak, bulk elektroliz devam ederken farklı zaman aralıklarında sistemden geçen akım değerlerinin kontrol edilmesi ve sistem içerisinde elektrokimyasal dönüşümün olduğunu gösteren akım değerlerinin (bir kaç mA) okunması bu olasılığın zayıf olduğunu düşündürmüştür. Diğer bir olasılık ise, bulk elektroliz anında yüzeydeki moleküller uygulanan potansiyel ile indirgenirken, indirgenme sonucunda kararsız bir ara ürünün oluşması şeklinde değerlendirilmiştir. Bulk elektroliz devam ederken, bu ara ürünün tekrar başlangıç molekülüne dönüşüp indirgenme/yükseltgenme döngüsü oluşturduğu varsayılmıştır. Yapılan çalışmalarda, belirli bir süre sistemden geçen akım şiddetinin düzenli olarak azalması ve belirli bir akım oranına geldikten sonra (% 6) akım değerinin neredeyse sabit kalması, bu olasılığın gerçekleşmiş olabileceğini destekleyen bir gözlem olmuştur. Bu olasılığın gerçekleşmiş olması durumunda, elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal dönüşümün katalitik bir dönüşüm olabileceği düşünülmektedir. Zira, belirli ara basamak ya da basamaklardan sonra MKB tekrar başlangıç formuna dönüşmektedir. Bu durumda, kaydedilen elektrokimyasal sinyalin (pik) aslında incelenen molekülün kendisinin indirgenip/yükseltgenmesi sonucu değil; bu molekülün katalizör rolü oynadığı ve ortamdaki başka bir türün indirgenip/yükseltgenmesi sonucu gözlenen bir sinyal olduğu sonucu çıkarılmıştır. Bu nedenle, bulk elektroliz yöntemi aktarılan elektron sayısını hesaplamak için kullanılamamıştır. Elektron sayısı, DV çalışmalarında adsorpsiyon kontrollü sistemler için önerilen Eşitlik 3.15 – Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$0,005 - 1,000 \text{ Vs}^{-1}$  tarama hızı aralığında MKB'nin indirgenmesinde aktarılan elektron sayısı ( $n$ ), her bir tarama hızı için, sözkonusu eşitliklerden ve pik akımına karşılık tarama hızı grafiğinden elde edilen doğru denkleminin eğiminden hesaplanmıştır. Her

iki yöntemle yapılan hesaplamalarda aktarılan elektron sayısı ortalama olarak 1 değerine yakın bulunmuştur.

Şimdiye kadar elde edilen bulgular birleştirildiğinde, ADCE yüzeyinde MKB'nin indirgenmesinin 1 elektron aktarımı ile tersinir olduğu ve adsorpsiyon kontrollü olarak gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır. Bütün bu değerlendirmelerden sonra MKB'nin ADCE yüzeyindeki indirgenmesi için aşağıdaki olası tepkime mekanizması önerilmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32 MKB moleküllerinin ADCE yüzeyinde gerçekleşen elektroindirgenme tepkimesi için önerilen mekanizma

Deneysel sonuçlar değerlendirildiğinde, gözlenen indirgenme/yükseltgenme piklerinin MKB'nin kendisinin indirgenme/yükseltgenmesine ait olmadığı bunun yerine cıva yüzeyine adsorbe olan MKB'deki ortaklanmamış elektronlara tutunan ortamdaki hidronyum iyonlarının indirgenmesi/yükseltgenmesine ait olduğu varsayılmaktadır. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: MKB moleküllerinin cıva yüzeyine adsorbe olmasıyla elektrot yüzeyinin modifiye olduğu; MKB ile modifiye olan cıva yüzeyinin katalizör görevi üstlendiği ve hidronyum iyonlarının indirgenip hidrojen gazına dönüşmesine yol açtığı söylenebilir. Çözelti derişimine bağlı olarak, elektrot yüzeyi ile çözelti arasındaki derişim farkı yeterince büyük olduğu durumda ( $C_{\text{MKB, ads}} \gg C_{\text{MKB, çöz}}$ ; Şekil 4.32)



indirgenmiş iyonların hızlı bir biçimde elektrot yüzeyinden çözeltiliye doğru difüzlendiği ve anodik pik akımı ile katodik pik akımı oranının 1'den küçük olduğu; ancak, elektrot yüzeyi ile çözeltili arasındaki derişim farkı indirgenmiş iyonları çözeltiliye difüzlerecek kadar büyük olmadığı durumda ( $C_{\text{MKB, ads}} \cong C_{\text{MKB, çöz}}$ ; Şekil 4.32), indirgenmiş iyonların elektrot yüzeyinden çözeltiliye hızlı bir şekilde difüzleneemediği ve anodik pik akımı ile katodik pik akımı oranının tersinir mekanizmalardan beklendiği gibi 1'e yaklaştığı gözlenmiştir.

Tüm bunların yanı sıra bu çalışmada, kronokulometri yönteminden elde edilen veriler de kullanılarak MKB için yüzey kaplama katsayısı ( $\Gamma$ ) ve difüzyon katsayısı ( $D$ ) hesaplanmıştır. MKB'nin yüzey kaplama katsayısı ( $\Gamma$ ), 0,005 - 1,000 Vs<sup>-1</sup> tarama hızı aralığında dönüşümlü voltametri verileri ve Eşitlik 3.13'den hesaplanmıştır. Yüzey kaplama katsayısı ( $\Gamma$ ) verilen tarama hızı aralığında ortalama olarak  $6,0 \times 10^{-11}$  mol cm<sup>-2</sup> bulunmuştur. Buradan, adsorplanan her MKB molekülünün küresel olduğu ve yüzeye tek tabaka halinde adsorplandığı düşünülürse, elektrot yüzeyinde 2,8 nm<sup>2</sup> alan kapladığı sonucuna ulaşılabilir. Ayrıca, kronokulometri tekniğiyle üç farklı derişim için hesaplanan yüzey kaplama katsayısı ( $\Gamma$ ) Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 MKB için kronokulometri tekniğiyle elde edilen yüzey kaplama katsayısı ( $\Gamma$ ) değerleri

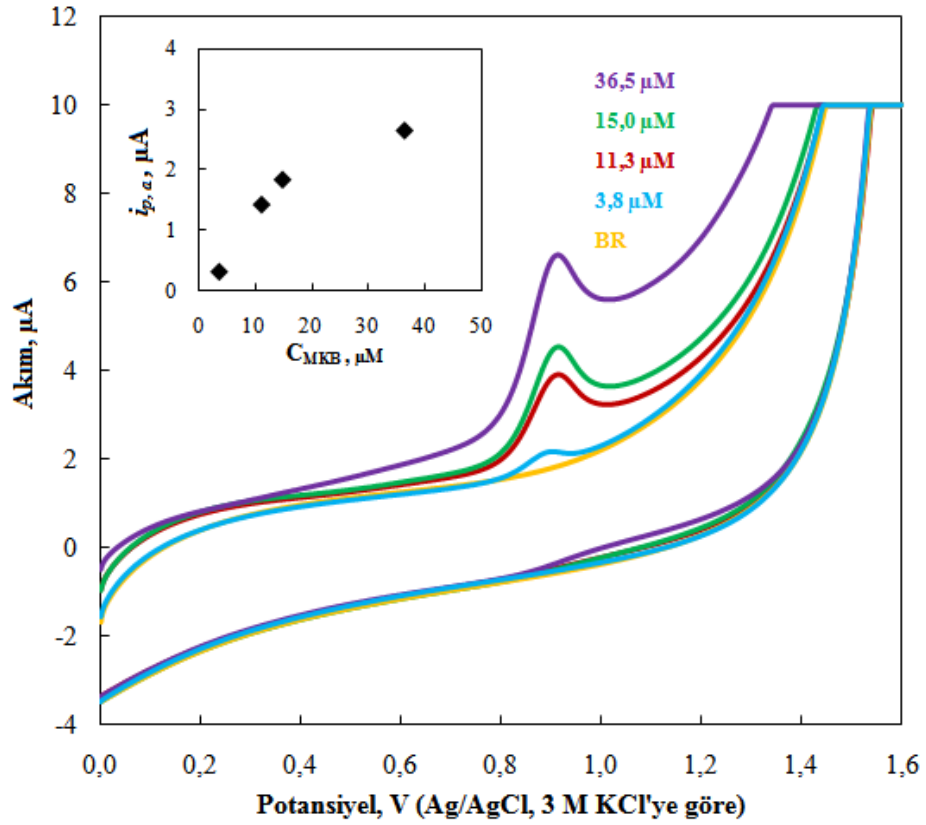
Derişim ( $\mu\text{M}$ )	10	50	500
$Q_{t=0}$ (C)	$1,3 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^{-7}$
$Q_{\text{dl}}$ (C)	$7,6 \times 10^{-8}$	$7,6 \times 10^{-8}$	$7,6 \times 10^{-8}$
$Q_{\text{Ads}}$ (C)	$5,4 \times 10^{-8}$	$9,5 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-7}$
$\Gamma$ (mol cm <sup>-2</sup> )	$(3,9 \pm 0,1) \times 10^{-11}$	$(6,8 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	$(8,8 \pm 0,3) \times 10^{-11}$

Çizelge 4.8'e göre, cıva yüzeyine adsorplanan madde miktarının, derişimin artmasıyla arttığı söylenebilir. Ayrıca, her iki yöntemle hesaplanan yüzey kaplama katsayısının ( $\Gamma$ ) bir biri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Hesaplanan yüzey kaplama katsayısı değerlerinin adsorpsiyon kontrollü elektrokimyasal dönüşümler için literatürde verilen değerlere yakın olduğu belirlenmiştir (Brett ve Brett 1994, Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006).

MKB'nin difüzyon katsayısı ise, adsorpsiyon kontrollü sistemler için Garrido tarafından geliştirilen ve validasyonu yapılan Eşitlik 3.14 kullanılarak ( $A = 0,0145 \text{ cm}^2$ ) 0,005 - 1,000  $\text{Vs}^{-1}$  tarama hızı aralığında hesaplanmış ve  $(2,5 \pm 0,4) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Hesaplanan bu değer literatürdeki değerler ile karşılaştırıldığında, difüzyon katsayısının difüzyon kontrollü mekanizmalar ile elektrokimyasal dönüşüme uğrayan maddelerinkinden küçük, adsorpsiyon kontrollü mekanizmalar ile elektrokimyasal dönüşüme uğrayan moleküllerinkinden ise biraz büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu değerlendirmeden hareketle, söz konusu mekanizmanın esas olarak adsorpsiyon kontrollü olduğu, ancak mekanizmaya difüzyonun da etkisinin bulunduğu sonucu çıkarılmıştır.

MKB'nin ADCE yüzeyindeki elektrokimyasal davranışının belirlenmesinden sonra, CKE yüzeyindeki elektrokimyasal davranışı da incelenmiştir. Bu çalışmada, ADCE yüzeyinde yapılan deneysel çalışmalara benzer çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, MKB'nin pH 6,0'da BR tamponunda farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerinin 0,0 V - 1,6 V aralığında dönüşümlü voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.33). Şekil 4.33'den de görüldüğü gibi, yaklaşık 0,9 V civarında, iyi tanımlanmış bir yükseltgenme piki gözlenmiştir. Aynı çalışma koşullarında BR çözeltisinin voltamogramı alındığında, bu potansiyel penceresinde herhangi bir pik kaydedilmemiştir. Farklı derişimlerdeki MKB çözeltileri kullanılarak alınan voltamogramlarda elde edilen pik akımının MKB derişimi ile artması (Şekil 4.33, iç grafik), söz konusu pikin MKB'nin yükseltgenmesine ait olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Ters yönde taramada yükseltgenen türün indirgenmesine ait herhangi bir pik gözlenmemiştir. Bu deneysel sonuç, MKB moleküllerinin camsı karbon yüzeyindeki yükseltgenmesinin tersinmez olabileceğini düşündürmüştür.

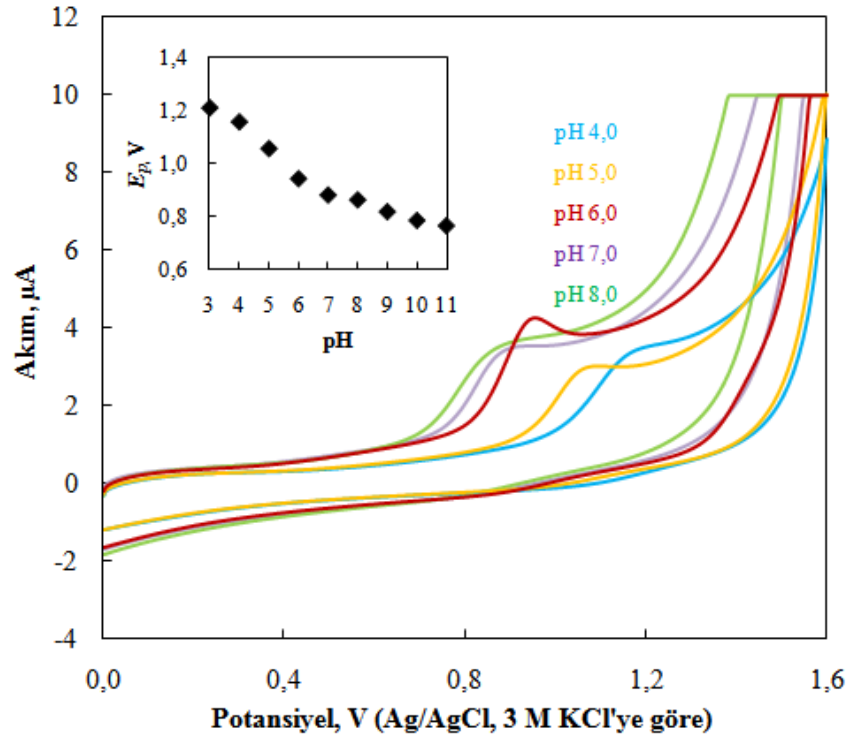
CKE yüzeyinde elektroaktif olduğu belirlenen MKB moleküllerinin bu elektrottaki elektrokimyasal davranışının ayrıntılı olarak incelenmesinde, ilk olarak pik potansiyeli ve pik akımına pH'nın etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla MKB derişimi 15,0  $\mu\text{M}$  MKB olan çözeltilerin pH'sı BR tamponu kullanılarak 2,0 - 12,0 aralığında ayarlanmış ve dönüşümlü voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.34). Elde edilen sonuçlar değerlendiril-



Şekil 4.33 Farklı derişimlerde MKB içeren çözeltilerin dönüşümlü voltamogramları: iç grafik anodik pik akımının MKB derişimi ile değişimi (ÇE: CKE,  $v$ : 0,100 V/s, pH: 6,0 BR,  $E_b$ : 0,0 V,  $E_d$ : 1,6 V,  $E_s$ : 0,0 V)

diğinde, MKB'ye ait anodik pik potansiyelinin pH 3,0-11,0 arasında pH arttıkça daha düşük potansiyellere kaydığı belirlenmiştir. DV çalışmalarında, pH'nın 2,0'den küçük ve 11,0'dan büyük olduğu çözeltilerde MKB'ye ait herhangi bir pike rastlanmamıştır. Yükseltgenme potansiyelinin artan pH ile daha küçük değerlere kayması, protonlanmış türün, protonlanmamış türe göre daha zor yükseltlendiği şeklinde yorumlanmıştır. Buradan, MKB'nin yükseltgenmesinde hidronyum iyonlarının önemli bir etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalarda asidik çözeltilerde pik potansiyelinin pH ile değişim denklemi  $E_p$  (V) = -0.1 pH + 1.60 ( $R^2 = 0.9988$ ) şeklinde, bazik çözeltilerde ise  $E_p$  (V) = -0.03 pH + 1.1 ( $R^2 = 0.9811$ ) şeklinde bulunmuştur (Şekil 4.34, iç grafik). Bu iki doğru pH'nın 6,0 - 7,0 olduğu bir noktada kesiştiği ve bu pH değerinin MKB'nin  $pK_a$  değeri (yaklaşık 6,02) ile doğrudan bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Ignjatovic vd. 2009). Eşitlik 3.12'den yola çıkarak bu iki doğrunun eğiminden  $\partial n$  değeri bazik çözeltiler için 0,5 asidik çözeltiler için ise 1,7 olarak

hesaplanmıştır. Camı karbon elektrottaki çalışmaların pH 6,0'da gerçekleştirilmesinden dolayı pH'nın pik potansiyeline etkisi 5,5 - 7,5 aralığında değerlendirilmiş, mekanizmaya katılan proton sayısının elektron sayısına oranı 1,0 olarak hesaplanmıştır. Buradan, asidik bölgede MKB'nin CKE'de yükseltgenme mekanizmasında aktarılan proton sayısının elektron sayısına eşit olduğu sonucu çıkarılmıştır.

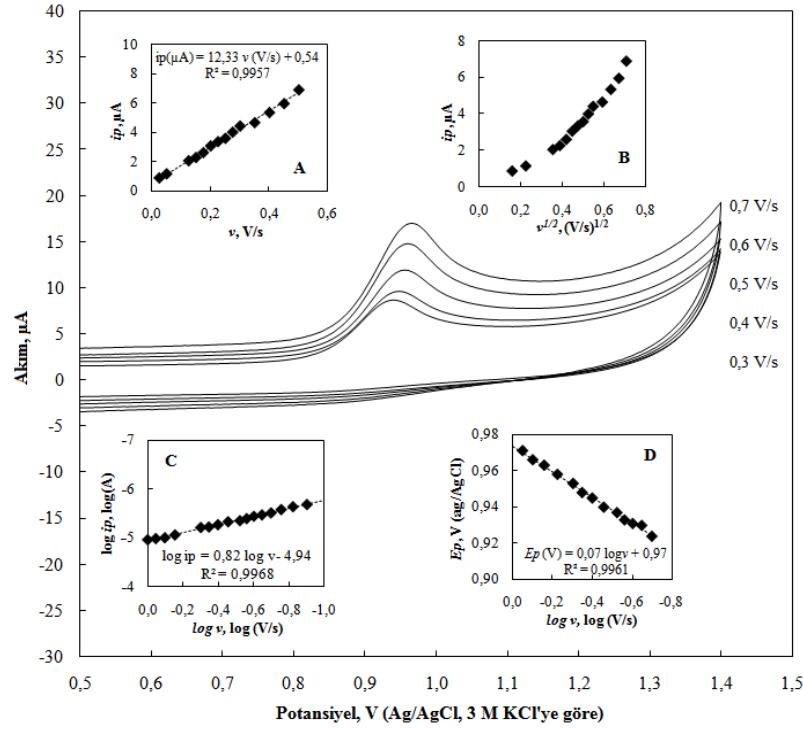


Şekil 4.34 Sabit derişimde MKB içeren çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan dönüşümlü voltamogramları: iç grafik: pik potansiyelinin pH ile değişimi ( $C_{MKB} = 15,0 \mu M$ , ÇE: CKE,  $v$ : 0,100 V/s)

DV (Şekil 4.34) ve KDV yöntemleri ile yapılan ölçümlerde pH 3,0 - 11,0 aralığında MKB piki kaydedilmiştir; ancak en yüksek pik akımı ve en düzgün pik şekli pH 6,0'da elde edilmiştir. Bu nedenle, mekanizma ile ilgili diğer bütün çalışmalar, pH'sı 6,0 olan çözeltilerde gerçekleştirilmiştir.

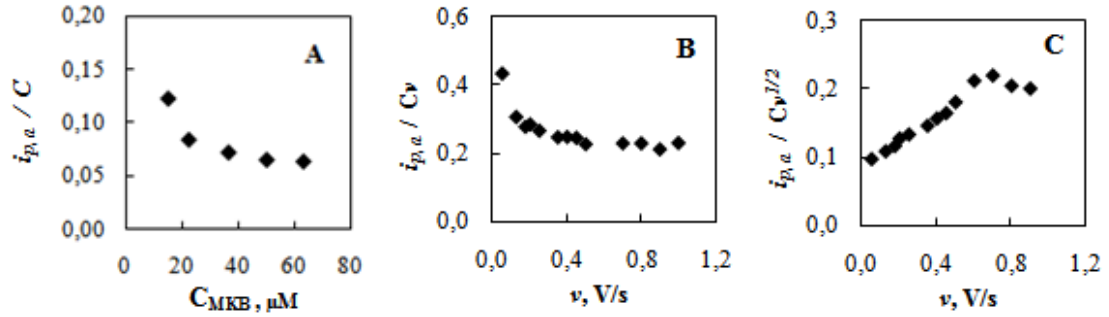
MKB'nin elektrokimyasal davranışının incelenmesinde, pH değişkeninden sonra pik akımı ve pik potansiyeline tarama hızının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, pH'sı 6,0'a ayarlanmış 13,6  $\mu M$  MKB çözeltisinin 0,025 - 1,000  $Vs^{-1}$  tarama hızı aralığında dönüşümü voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.35). Tarama hızı ile anodik pik akımının

( $i_{p,a}$ ) doğrusal değişiminin  $i_{p,a} (\mu\text{A}) = 12,3 v (\text{Vs}^{-1}) - 0,54$ ;  $R^2 = 0,9957$  eşitliği ile ifade edilebileceği bulunmuştur (Şekil 4.35, iç grafik A). Pik akımı ve tarama hızı arasındaki doğrusal ilişki MKB için camı karbon yüzeyinde adsorpsiyon kontrollü bir mekanizmanın söz konusu olduğunu düşündürmüştür. Pik akımının (A) logaritmasının tarama hızının ( $\text{Vs}^{-1}$ ) logaritması ile değişimi incelendiğinde, oluşturulan doğrusal değişim grafiklerinin eğimi 0,82 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.35, iç grafik C). Hesaplanan bu eğim değerinin, adsorpsiyon kontrollü mekanizmalar için önerilen 1,0 değerinden (Wang 2006) düşük ancak difüzyon kontrollü mekanizmalar için beklenen değerden yüksek olduğu görülmüştür. Bu deneysel sonuç, mekanizmanın adsorpsiyon kontrollü olmasının yanı sıra mekanizmaya difüzyonun da etki ettiğini göstermiştir. Ayrıca, pik akımının tarama hızının karekökü ile değişim grafiği incelendiğinde, doğrusal olmayan bir değişim gözlenmiştir (Şekil 4.35, iç grafik B). Böylece, incelenen elektrokimyasal dönüşüme adsorpsiyonun etkisinin difüzyonun etkisinden daha yüksek olduğu sonucu çıkarılmıştır.



Şekil 4.35 Sabit derişimde MKB içeren çözelti kullanılarak farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlar: iç grafik: (A) pik akımının tarama hızı ile değişimi, (B) pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi, (C) pik akımının logaritmasının tarama hızının logaritması ile değişimi, (D) pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi (ÇE: CKE,  $C_{\text{MKB}} = 13,6 \mu\text{M}$ , pH:6,0 BR,  $E_b$ : 0,5 V,  $E_d$ : 1,4 V,  $E_s$ : 0,5 V)

Elektrot yüzeyinde gerçekleşen adsorpsiyon davranışını değerlendirmek için yapılan diğer bir dizi çalışmada ise; artan MKB derişimiyle, anodik pik akımının MKB derişimine oranının ( $i_{p,k}/C$ ) azaldığı; tarama hızının artmasıyla, anodik pik akımının derişim tarama hızı çarpımına oranının ( $i_{p,k}/Cv$ )  $0,4 \text{ Vs}^{-1}$  tarama hızı değerine kadar azaldığı, daha yüksek tarama hızlarında ise sabit kaldığı ve tarama hızının artmasıyla, anodik pik akımının, derişim ile tarama hızının karekökünün çarpımına oranının ( $i_{p,k}/Cv^{1/2}$ )  $0,8 \text{ Vs}^{-1}$  tarama hızı değerine kadar doğrusal olarak arttığı ve daha sonra azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.36). Elde edilen tüm deneysel sonuçlardan, camsı karbon yüzeyinde MKB için gözlenen elektrokimyasal yükseltgenme olaylarının tersinmez ve adsorpsiyon kontrollü olabileceği kanaatine varılmıştır.

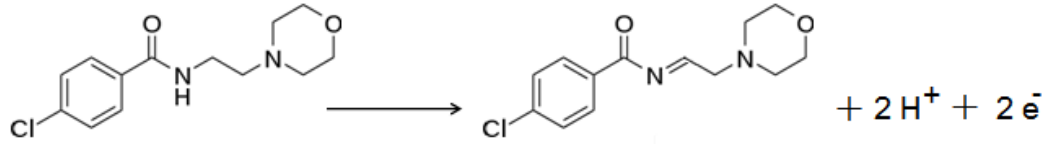


Şekil 4.36 MKB'nin elektrokimyasal davranışına adsorpsiyonun etkisi: (A)  $i_{p,k}/C$  oranının MKB derişimi, (B)  $i_{p,k}/Cv$  oranının tarama hızı, (C)  $i_{p,k}/Cv^{1/2}$  oranının tarama hızı ile değişimi (ÇE: CKE,  $C_{MKB} = 13,6 \mu M$ , pH: 6,0 BR)

Tarama hızının pik akımına etkisinin yanı sıra, pik potansiyeline etkisi de araştırılmıştır. Ters taramada herhangi bir yükseltgenme pikinin gözlenmemesi ve tarama hızının artmasıyla pik potansiyelinin daha pozitif değerlere kayması (Şekil 4.35) MKB moleküllerinin camsı karbon yüzeyinde yükseltgenmesinin tersinmez olduğunu doğrulamıştır. Tersinmez sistemler için anodik pik potansiyelinin ( $E_{p,a}$ ) tarama hızının logaritması ( $\log v$ ) ile doğrusal değişiminin eğiminin  $RT/n\beta F$  değerine eşit olduğu bilinmektedir (Brett ve Brett 1994). Buna göre, oluşturulan  $E_{p,a} - \log v$  grafiğinden elde edilen doğrusal değişim için  $E_{p,a} (V) = 0,07 \log v (\log \text{Vs}^{-1}) + 0,97$ ;  $R^2 = 0,9961$  denklemi elde edilmiş (Şekil 4.32, iç grafik D) ve  $n\beta$  değeri 0,4 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca,  $n\beta$  çarpımı, dönüşümlü voltametri yapılan tarama hızı çalışmasından elde edilen voltamogramdaki yarı pik genişliği dikkate alınarak da bulunmuştur. Tersinmez

elektrokimyasal tepkimelerde yarı-pik genişliğinin ( $W_{1/2}$ )  $62,4/n\beta$  değerine eşit olduğu bilinmektedir (Scholz vd. 2010). Yaklaşık 133,0 mV olarak hesaplanan yarı pik genişliğinden  $n\beta$  değeri 0,47 olarak elde edilmiştir.  $\beta$  değerinin 0-1 arasında değiştiği ve pek çok elektrokimyasal yükseltgenme tepkimesinde bu değer yaklaşık 0,5 olduğu bilindiğinden, MKB'nin yükseltgenmesinde aktarılan elektron sayısının 2 olduğu varsayılmıştır.

Şimdiye kadar elde edilen bulgular birleştirildiğinde ve MKB'nin kimyasal yapısı incelendiğinde, CKE yüzeyinde MKB'nin elektrokimyasal yükseltgenmesinin 2 proton 2 elektron aktarımı ile tersinmez olduğuna ve indirgenme tepkimesinin adsorpsiyon kontrollü olarak gerçekleştiğine sonucuna varılmıştır. Bütün bu değerlendirmelerden, MKB'nin CKE yüzeyindeki yükseltgenmesi için aşağıdaki olası elektrot tepkime mekanizmasının aşağıdaki gibi olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.37 MKB moleküllerinin CKE yüzeyinde gerçekleşen elektroyükseltgenme tepkimesi için önerilen mekanizma

Ayrıca, MKB için difüzyon katsayısı ( $D$ ) ve yüzey kaplama katsayısı ( $I$ ) değerleri hesaplanmıştır. Dönüşümlü voltametri verileri ve Eşitlik 4.3 kullanılarak MKB için difüzyon katsayısı  $2,0 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

Yüzey kaplama katsayısının hesaplanması için Eşitlik 3.13 kullanılmış ve yüzey kaplama katsayısı  $6,8 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$  olarak tespit edilmiştir. Buradan, adsorplanan her MKB molekülünün küresel olduğu ve yüzeye tek tabaka halinde adsorplandığı düşünülürse, elektrot yüzeyinde  $2,4 \text{ nm}^2$  alan kapladığı söylenebilir.

#### 4.2.2. MKB tayini için voltametrik yöntemler

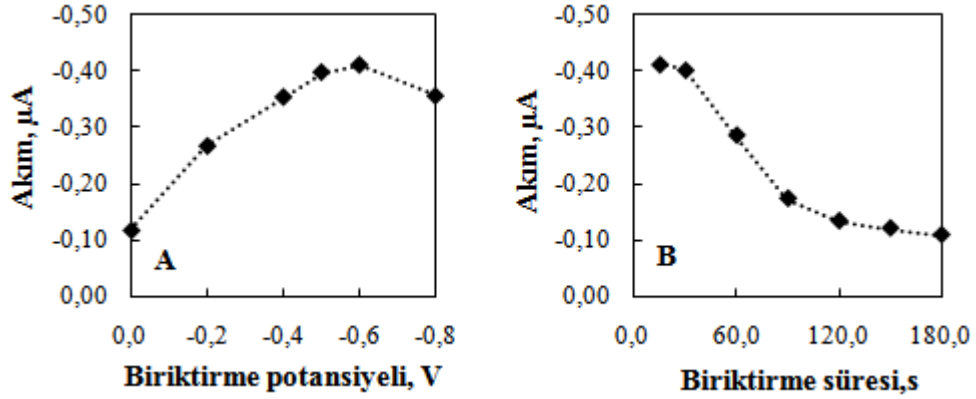
MKB'nin elektrokimyasal davranışı Bölüm 4.2.1'de verilmiştir. Bu veriler, söz konusu ilaç etken maddenin nicel tayini için voltametrik yöntem geliştirilebileceğini göstermiştir. Yöntem geliştirme çalışmalarında, bu maddelere ait iyi tanımlanmış piklerden ve Bölüm 4.2.1'deki optimum deneysel koşullardan yararlanılmıştır. Geliştirilen her bir yöntemin ilaçların kalite kontrolüne uygulanabilirliği ile serum ve/veya idrarda tayinine uygunluğu test edilmiştir. Aşağıda geliştirilen yöntemler ve sonuçları açıklanıp irdelenmiştir. Geliştirilen yöntemler, Bölüm 3.10'da belirtilen validasyon parametreleri dikkate alınarak valide edilmiştir.

MKB'nin elektrokimyasal davranışı BR tamponu kullanılarak incelenmiştir. Yöntem geliştirme çalışmalarında bu tampon çözelti ortamında yapılan deneyler geliştirilecek yöntemler için uygun olmadığı görülmüş; bu nedenle amonyak/amonyum klorür tamponu ortamında çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, MKB'nin amonyak/amonyum klorür ortamında pH 8,5'da ADCE kullanılarak elde edilen voltamogramında görülen indirgenmeye ait pik akımının MKB derişimi ile doğrusal olarak değiştiği belirlenmiştir. Bundan yararlanarak, ADCE'de MKB'nin nicel tayini için DPV ve KDV yöntemlerinin geliştirilmesinin uygun olabileceği düşünülmüştür. Yöntem geliştirme çalışmalarında, söz konusu voltametrik yöntemlerin doğrudan uygulanması ve adsorptif sıyırma basamaklarının kullanılması ile dört ayrı yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda, öncelikle uygun derişimde MKB çözeltileri kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

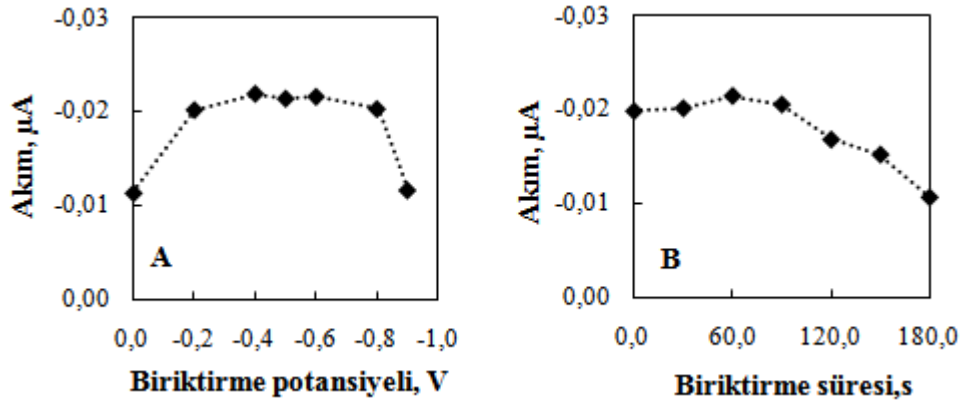
- *Destek elektrolit cinsi ve derişimi:* 1,2 M NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl
- *pH:* 8,5
- *Yöntem değişkenleri:*
  - Optimum parametreler 3,0 µM MKB çözeltisi için KDV yönteminde  $E_a = 2$  mV,  $E_p = 65$  mV,  $f = 25$  Hz olarak; DPV'de ise  $E_a = 5$  mV,  $E_p = 50$  mV,  $E_w = 60$  ms ve  $E_t = 200$  ms olarak belirlenmiştir.
  - Adsorptif sıyırma yöntemlerinde, doğrudan voltametrik yöntemlerdeki parametrelere ek olarak biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresinin de



optimizasyonu yapılmış ve KDKAdSV için optimum biriktirme potansiyeli  $-0,55$  V ve biriktirme süresi 30 s (Şekil 4.38), DPKAdSV için ise sırasıyla  $-0,65$  V ve 60 s (Şekil 4.39) olarak belirlenmiştir.

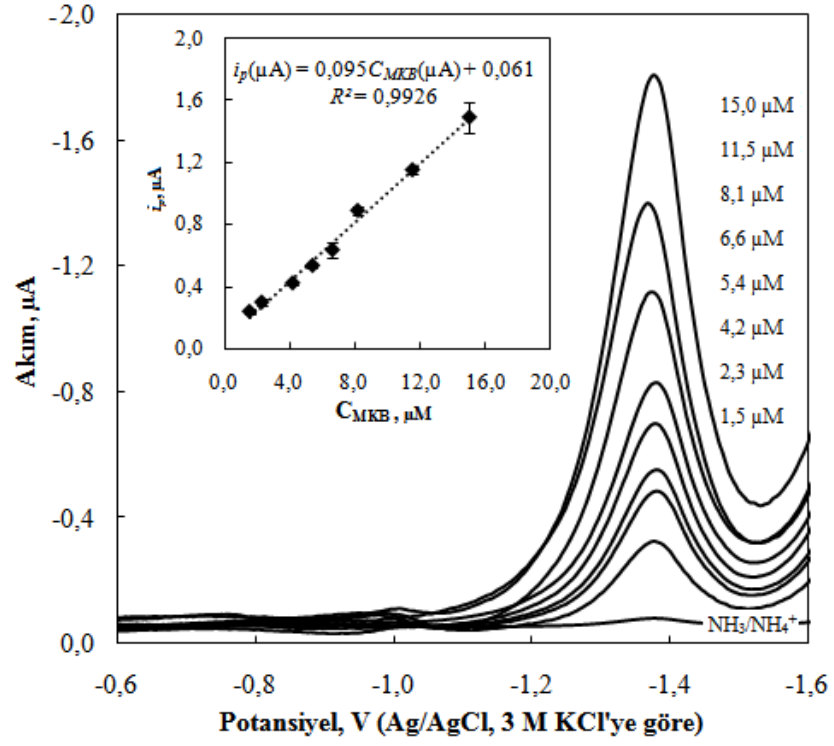


Şekil 4.38 KDKAdSV yönteminde (A) biriktirme potansiyelinin ve (B) biriktirme süresinin pik akımına etkisi (ÇE: ADCE,  $C_{\text{MKB}}$ :  $0,14 \mu\text{M}$ , pH 8,5  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ )

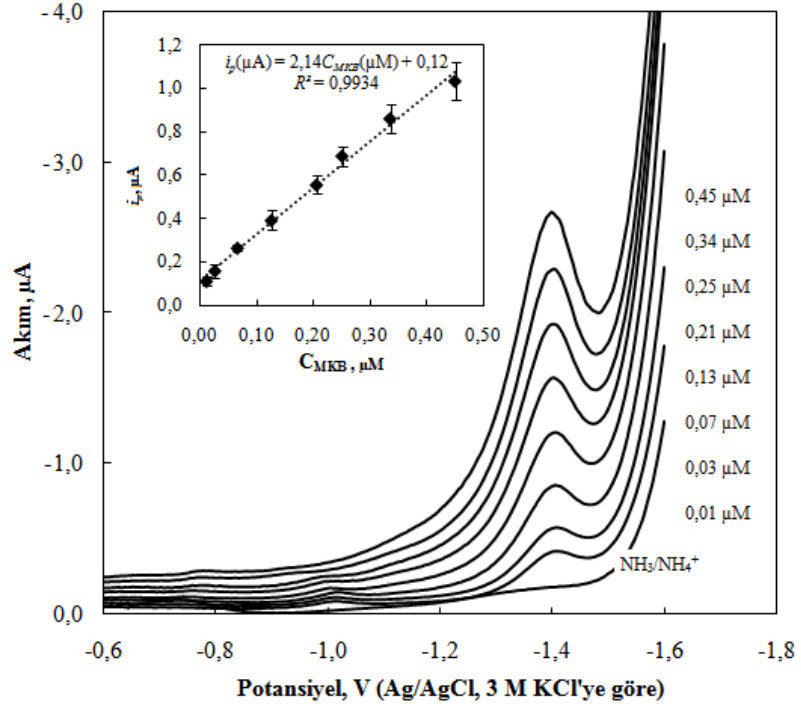


Şekil 4.39 DPKAdSV yönteminde (A) biriktirme potansiyelinin ve (B) biriktirme süresinin pik akımına etkisi (ÇE: ADCE,  $C_{\text{MKB}}$ :  $0,14 \mu\text{M}$ , pH 8,5  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ )

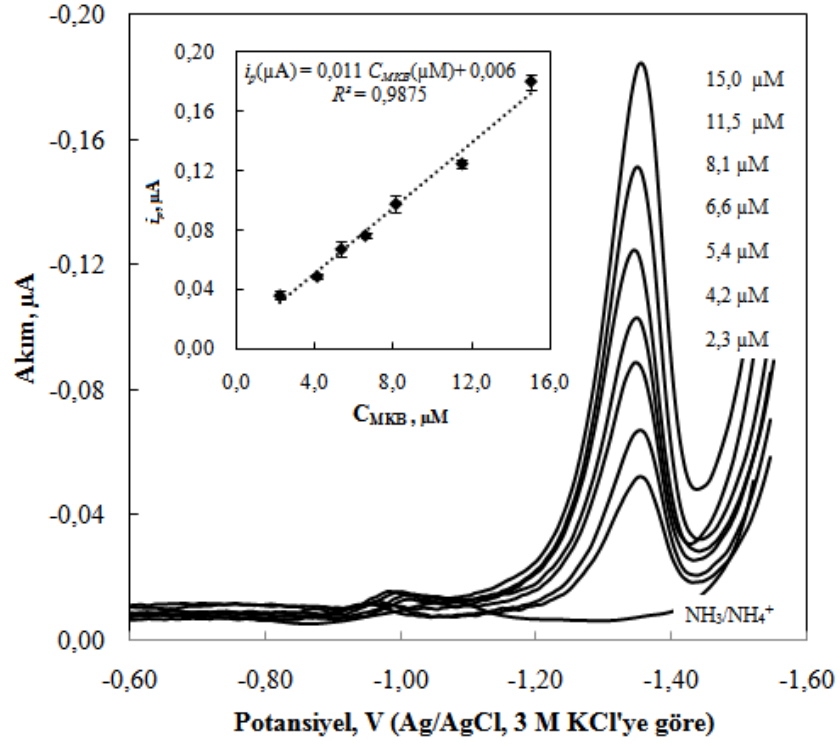
Belirlenen optimum koşullarda söz konusu dört yöntem için çeşitli derişimlerde MKB içeren çözeltilerin voltamogramları alınmış ve bu voltamogramlar Şekil 4.40 (KDV için), Şekil 4.41 (KDKAdSV için), Şekil 4.42 (DPV için) ve Şekil 4.43'de (DPKAdSV için) verilmiştir. Bu voltamogramlardaki çeşitli derişimler için, ortalama pik akımları derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğruları oluşturulmuş ve her bir yöntem için oluşturulan bu doğrular, ilgili şekillerde iç grafik olarak verilmiştir.



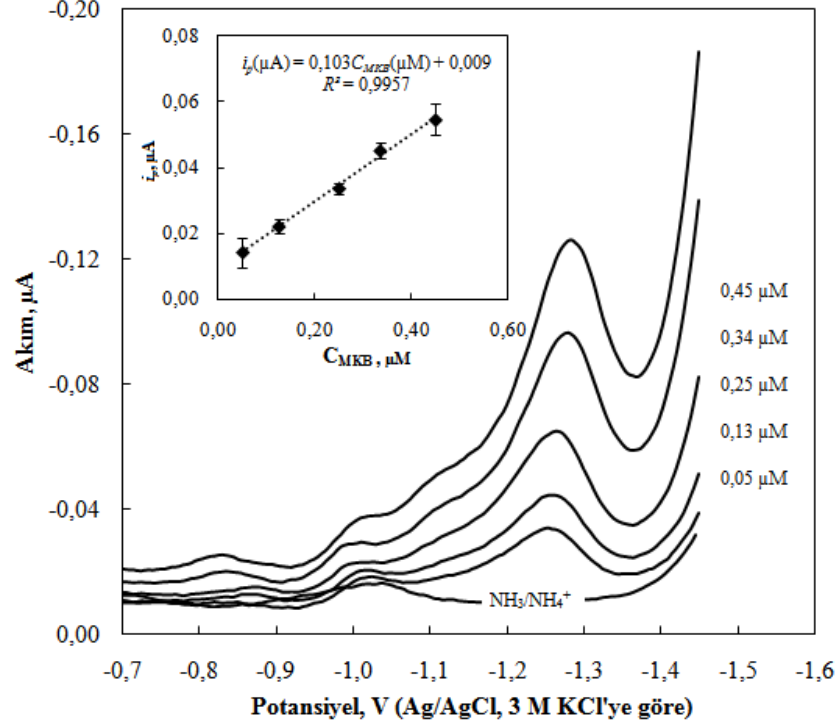
Şekil 4.40 KDV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{\text{MKB}}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE)



Şekil 4.41 KDKAdSV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{\text{MKB}}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE,  $E_{\text{bir.}}$ : -0,55 V,  $t_{\text{bir.}}$ : 30 s)



Şekil 4.42 DPV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{\text{MKB}}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE)



Şekil 4.43 DPKAdSV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{\text{MKB}}$ ) ile değişimi, ÇE: ADCE,  $E_{\text{bir.}}$ : -0,65 V,  $t_{\text{bir.}}$ : 60 s)

MKB'nin indirgenmesine dayanan nicel tayin yöntemi geliştirme çalışmalarında, elde edilen kalibrasyon verilerinin en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilmesi ile bazı parametreler hesaplanmış ve bunlar Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 MKB tayini için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak değerlendirilmesiyle hesaplanan regresyon parametreleri

Parametre	KDV	KDKAdSV	DPV	DPKAdSV
Doğrusal çalışma aralığı, $\mu\text{M}$	1,5 – 15,0	0,01 – 0,45	2,3 – 15,0	0,05 – 0,45
Regresyon eşitliğinin eğimi ( $m$ ), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,095	2,14	0,011	0,103
Regresyon eşitliğinin kesim noktası ( $b$ ), $\mu\text{A}$	0,061	0,12	0,006	0,009
Eğimin standart sapması ( $s_m$ ), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,003	0,008	0,001	0,004
Kesim noktasının standart sapması ( $s_b$ ), $\mu\text{A}$	0,027	0,006	0,005	0,001
Regresyon katsayısı ( $R^2$ )	0,9926	0,9934	0,9875	0,9957
Gözlenebilme sınırı ( $LOD$ ), $\mu\text{M}$	0,853	0,008	1,364	0,029
Alt tayin sınırı ( $LOQ$ ), $\mu\text{M}$	2,842	0,028	4,545	0,097
Gün-içi akım tekrarlanabilirliği (% BSS) *	2,3	4,5	2,7	5,4
Günler-arası akım tekrarlanabilirliği (% BSS) **	4,8	6,1	5,4	6,7
Gün-içi potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS) *	1,7	2,3	1,5	2,1
Günler-arası potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS) **	3,2	3,3	2,7	3,7

\* Aynı çözelti kullanılarak aynı günde yapılan 5 ölçüm değeri için

\*\* Aynı şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak 5 farklı günde yapılan 5 ölçüm değeri için

MKB için, ADCE kullanılarak voltametrik tayin yöntemi geliştirme çalışmalarında;

- ortalama pik akımının MKB derişimi ile doğrusal değıştiği,
- regresyon katsayısının ( $R^2$ ) 0,99'dan büyük olduğu,
- yöntemlerin kesinliklerinin (pik akımı ve pik potansiyelinin gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirliklerinin) oldukça iyi olduğu

görülmüştür. Ayrıca, geliştirilen dört yöntemin de MKB tayini için uygun olduğu ve;

- doğrudan voltametrik yöntemlerin doğrusal çalışma aralıkları KDV için  $1,5 \times 10^{-6}$  M ( $0,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) -  $1,5 \times 10^{-5}$  M ( $4,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), DPV için  $2,3 \times 10^{-6}$  M ( $0,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) -  $1,5 \times 10^{-5}$  M ( $4,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) şeklinde olduğu,
- adsorptif sıyırma yöntemlerinin doğrudan voltametrik yöntemlere göre daha düşük derişim aralığında doğrusal ve doğrusal çalışma aralığının KDKAdSV için  $1,0 \times 10^{-8}$  M ( $2,69 \text{ ng mL}^{-1}$ ) -  $4,5 \times 10^{-7}$  M ( $120,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ), DPKAdSV için  $5,0 \times 10^{-8}$  M ( $13,44 \text{ ng mL}^{-1}$ ) -  $4,5 \times 10^{-7}$  M ( $120,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ) şeklinde olduğu,
- kalibrasyon doğrularının eğimleri karşılaştırıldığında, kare dalga voltametrimin diferansiyel puls voltametriye göre daha duyarlı olduğu,
- ilaç geliştirme ve kalite kontrolü gibi göreceli olarak daha yüksek derişimlerde MKB içerdiği bilinen numunelerin analizi için doğrudan voltametrik yöntemlerin uygun olabileceği,
- idrar, serum ve plazma gibi eser miktarda MKB içeren biyolojik numunelerde ise adsorptif sıyırma yöntemlerinin uygun olabileceği

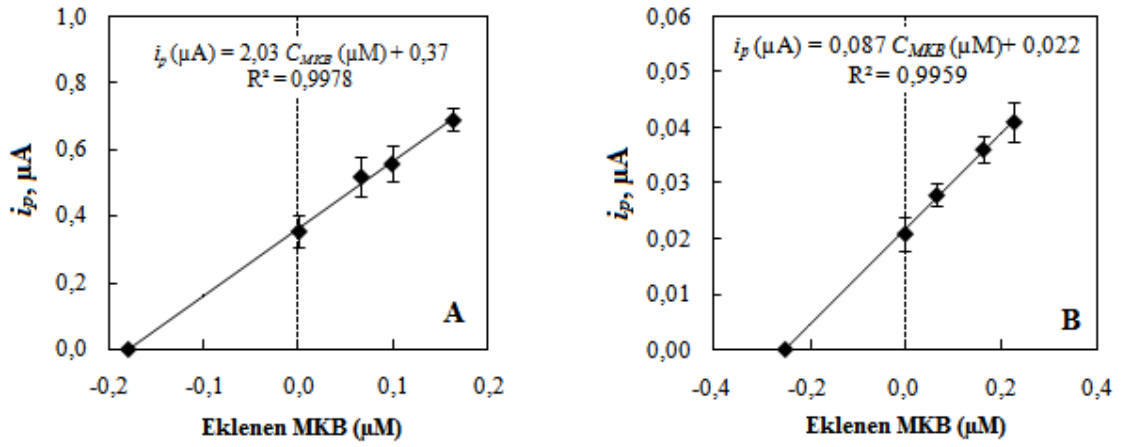
sonucuna varılmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak;

- MKB'nin tedavi edici derişim aralığının  $300,0 - 1000,0 \text{ ng mL}^{-1}$  (Baumann vd. 2004, Laux vd. 2007) olduğu ve uygulanan günlük dozun ( $2 \times 150 \text{ mg}$ ) % 0,5'den daha az kısmının idrarla değişmeden vücuttan atıldığı (Jauch vd. 1990, Nair vd. 1993) bilgileri de göz önüne alındığında, geliştirilen voltametrik yöntemlerden KDKAdSV ve DPKAdSV yöntemlerinin serum numunelerindeki MKB tayinine; doğrudan ve sıyırma voltametrik yöntemlerin ise ilaç numunelerinde MKB tayinine uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

Bütün bu bulgulardan yararlanılarak geliştirilen yöntemlerin piyasada bulunan ilaçlarda ve serum numunelerinde MKB tayini için uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla, tablet ve serum numuneleri Bölüm 3.6 ve 3.7'de anlatıldığı şekilde analize hazırlanmıştır.

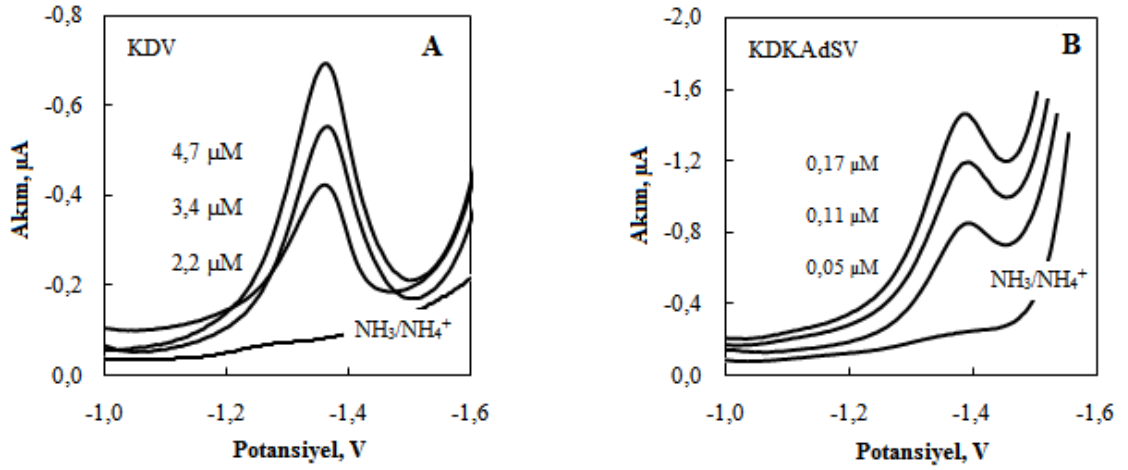
Tabletlerde ilaç etken maddesi analizlerinde numune matriksinin yöntem performansına anlamlı bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için, KDV, DPV, KDKAdSV ve DPKAdSV yöntemlerinde standart katma yöntemi ile kalibrasyon grafikleri de oluşturulmuş ve KDKAdSV ve DPKAdSV için elde edilen eğriler Şekil 4.44'de verilmiştir. Şekil 4.41 ve 4.43'de iç grafik olarak verilen kalibrasyon doğrularının

eğimleri (KDKAdSV için 2,14 ve DPKAdSV için 0,103) ile standart katma yapılarak oluşturulan ve Şekil 4.44’de verilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri (KDKAdSV için 2,03 ve DPKAdSV için 0,087) karşılaştırıldığında, eğimler arasında anlamlı bir farkın; yani tabletlerde kullanılan destek ve katkı maddelerinin geliştirilen yöntemlerin performansına etkisinin hemen hemen olmadığı belirlenmiştir. Benzer sonuçlar, KDV ve DPV yöntemlerinde de elde edilmiştir. Ancak, ilaçlarda yapılan nicel analizler hem doğrudan kalibrasyon yöntemi hem de standart katma yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

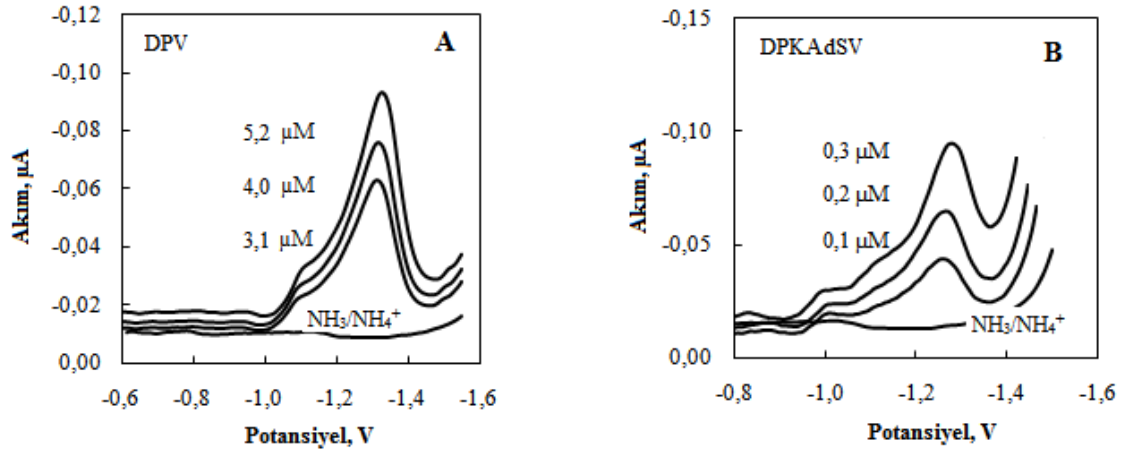


Şekil 4.44 MKB tayini için standart katma kalibrasyon grafikleri: (A) KDKAdSV ve (B) DPKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 8,5  $NH_3/NH_4Cl$ . Her bir veri ayrı ayrı elde edilen 5 kalibrasyon eğrisi için ortalama değer olup hata çubukları ile birlikte verilmiştir.)

Bu amaçla,  $NH_3/NH_4Cl$  tamponuna tablet çözeltisi eklenip (Bölüm 3.6) optimum koşullarda KD, KDKAdS, DP ve DPKAdS voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.45 ve 4.46).



Şekil 4.45 MKB içeren tablet çözeltilerinin voltamogramlarının derişimle değişimi: (A) KDV ve (B) KDKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 8,5 NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl)



Şekil 4.46 MKB içeren tablet çözeltilerinin voltamogramlarının derişimle değişimi: (A) DPV ve (B) DPKAdSV (ÇE: ADCE, pH: 8,5 NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl)

Söz konusu voltamogramlar incelendiğinde, tabletlerde bulunan MKB'nin standart MKB ile hemen hemen aynı potansiyelde bir indirgenme piki verdiği ve bu pikin akımının eklene tablet çözeltisindeki MKB derişimi ile değiştii görülmüştür. Ayrıca, bu potansiyel bölgesinde MKB'nin indirgenme pikine girişim etkisi yapabilecek herhangi bir pikin gözlenmemesi, tabletlerde kullanılan koruyucu ve destek maddelerinin bozucu bir etkiye sahip olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir. Bu voltamogramlardan elde edilen pik akımı değerlerinden ve oluşturulan kalibrasyon grafiklerinden doğrudan etken madde derişimleri hesaplanmıştır. Ayrıca, bu çözeltilere standart etken madde çözeltilerinden eklenerek oluşturulan standart katma

grafiklerinden de tabletteki etken madde miktarları bulunmuştur. Her iki yöntemle hesaplanan etken madde derişimlerinden yararlanarak % geri kazanım değerleri bulunmuş ve tüm sonuçlar Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.10 Dört farklı voltametrik yöntemle Aurorix® tabletlerinde MKB tayininde doğrudan kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar

Yöntem	KDV	KDKAdSV	DPV	DPKAdSV
Beyan edilen MKB miktarı, mg	150,0	150,0	150,0	150,0
Bulunan MKB miktarı*, mg	152,76 ± 1,91	147,09 ± 1,14	149,67 ± 0,81	144,03 ± 1,10
	147,81 ± 1,64	144,01 ± 1,06	151,16 ± 1,32	150,34 ± 0,67
	149,19 ± 0,86	144,12 ± 0,47	147,40 ± 1,11	147,94 ± 0,89
	151,45 ± 1,60	151,90 ± 0,68	150,92 ± 1,99	145,26 ± 0,47
	149,23 ± 0,45	153,57 ± 0,44	145,57 ± 0,88	151,49 ± 0,58
Geri kazanım değeri*, %	100,1 ± 1,5	98,8 ± 3,4	99,3 ± 1,8	102,2 ± 2,9
% BSS**	1,3	3,0	1,6	2,4

\* ortalama ± ts/√N, %95 (N=5) güven seviyesinde

\*\* Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

Çizelge 4.11 Dört farklı voltametrik yöntemle Aurorix® tabletlerinde MKB tayininde standart katma yöntemiyle elde edilen sonuçlar<sup>a</sup>

Yöntem	KDV	KDKAdSV	DPV	DPKAdSV
Beyan edilen MKB miktarı, mg	150,0	150,0	150,0	150,0
Bulunan MKB miktarı*, mg	148,04 ± 4,05	151,09 ± 6,74	148,43 ± 2,77	146,94 ± 3,03
	151,85 ± 5,64	145,95 ± 4,42	149,60 ± 1,66	147,12 ± 2,58
	146,52 ± 4,45	143,04 ± 4,70	150,63 ± 1,57	144,44 ± 2,04
	149,03 ± 3,10	153,00 ± 2,59	152,52 ± 4,33	150,25 ± 4,18
	150,64 ± 2,47	149,66 ± 3,92	151,98 ± 2,84	143,88 ± 2,87
Geri kazanım değeri*, %	99,48 ± 1,6	99,0 ± 3,1	100,4 ± 1,3	97,7 ± 1,9
% BSS**	1,4	2,7	1,1	1,7

\* ortalama ± ts/√N, %95 (N=5) güven seviyesinde

\*\* Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

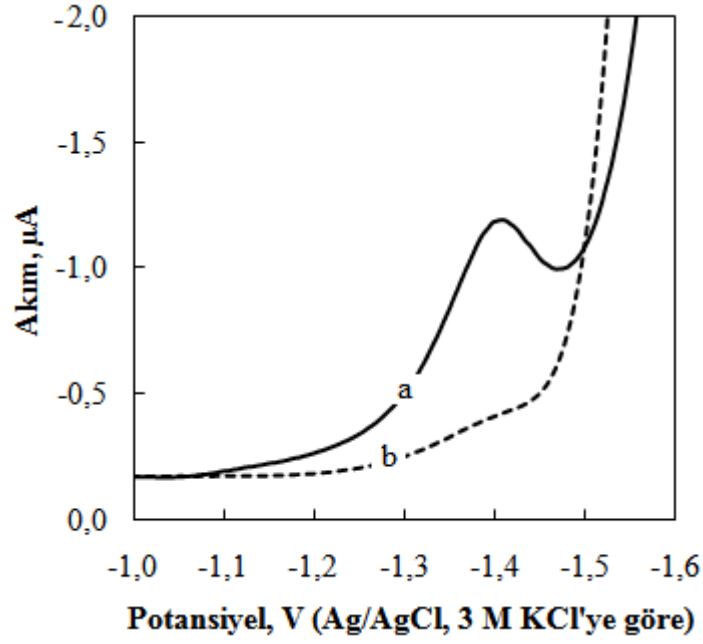
<sup>a</sup>Bu çalışmalar BR tamponunda yapılmıştır



Çizelgeler incelendiğinde, doğrudan kalibrasyon ve standart katma yöntemi ile, geliştirilen dört yöntem kullanılarak hesaplanan geri kazanım değerlerinin yaklaşık % 100 olduğu; bağıl standart sapma değerlerinin ise % 3'den küçük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen yöntemlerin ilaçlardaki etken madde tayinine yüksek bir doğruluk ve kesinlikle uygulanabileceği söylenebilir. Ayrıca, doğrudan kalibrasyon ve standart katma yöntemiyle elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığından, çok sayıda numune analizleneceğinde doğrudan kalibrasyon yönteminin kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

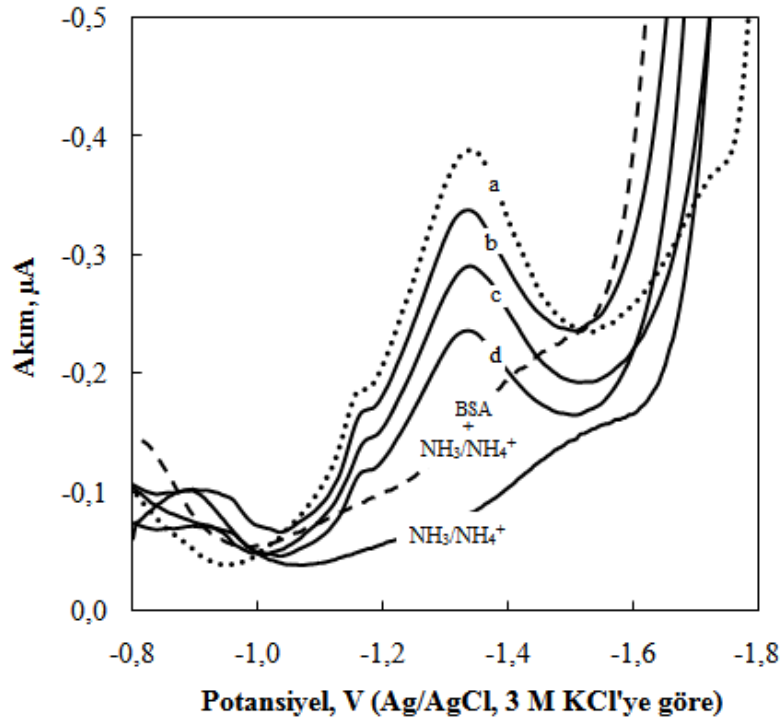
MKB'nin serum ve idrar numunelerinde tayin edilemeyeceği de araştırılmıştır. Bu amaçla serum ve idrar numunelerine standart MKB veya tablet çözeltileri eklenmiş ve serumda proteinler çöktürülmüştür. Bu eklemeler fizyolojik ortamda bulunabilecek miktarlar dikkate alınarak yapılmıştır.

Serum numuneleri kullanılarak yapılan analizlerde, etken madde içeren numunelerin KDKAdS ve DPKAdS voltamogramları alınmıştır. Aynı miktarda etken madde  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$  tamponuna katıldığında elde edilen voltamogramlarda bir indirgenme pikine rastlanmasına rağmen, serum içeren numunelerde herhangi bir pike rastlanmamıştır. Serum numunelerinde herhangi bir pike rastlanmamasının nedeni, serum ortamına eklenen MKB'nin proteinlere kuvvetle bağlanmasından ve dolayısıyla bu aralıkta elektroaktivitesini kaybetmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Bu varsayımı desteklemek için, etken madde katılmamış serum numunelerinde proteinler çöktürülmüş ve sonra etken madde eklenerek voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 4.47). Şekilden de görüldüğü gibi, bu durumda MKB'ye ait bir indirgenme piki elde edilmiş ve pik akımının ilgili kalibrasyon eşitliğinde değerlendirilmesi sonucu % geri kazanım değeri  $101,2 \pm 4,9$  ( $N=5$ ) olarak hesaplanmıştır. Proteinsiz serum numunelerinde hesaplanan yüksek geri kazanım değerlerine karşılık ilaç eklendikten sonra proteinleri çöktürülen veya proteinli hali ile yapılan uygulamalarda MKB'ye ait pikin gözlenmemesi serum proteinlerinin MKB'nin elektrokimyasal aktifliğini engelleyecek şekilde davrandığı varsayımı desteklenmiştir.



Şekil 4.47 (a) Proteini çöktürüldükten sonra etken madde eklenen, (b) proteini çöktürülmeden etken madde eklenen ve sonra proteini çöktürülen serum numunesinin KDKAdS voltamogramı (ÇE: ADCE,  $C_{MKB} = 0,11 \mu\text{M}$ , pH 8,5  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ )

Literatürde benzer durumlar için yapılan çalışmalarda, benzer sonuçlarla karşılaşıldığı rapor edilmiştir (Fotouhi vd. 2009, Cai vd. 2010, Collins vd. 2010, Bi vd. 2011, Özdemir vd. 2011, Wei vd. 2011). RBK'ya benzer şekilde yapılan bu çalışmada da insan serumu albüminine (HSA) yapısal benzerliğinden dolayı bovin (sığır) serum albümin (BSA) kullanılarak MKB'nin elektroaktivitesinin protein ortamında azalıp azalmadığı incelenmiştir. Bu amaçla MKB içeren çözeltilere artan derişimlerde BSA çözeltileri katılmış, sıyrma voltamogramları kaydedilmiş ve Şekil 4.48'de KDKAdS voltamogramları verilmiştir.



Şekil 4.48 KDKAdSV yönteminde MKB'nin pik akımına BSA'nın etkisi. BSA derişimleri (a) 0 (b) 8,8 nM (c) 17,5 nM (d) 22,0 nM (ÇE: ADCE,  $C_{MKB} = 40,0$  nM, pH 8,5  $NH_3/NH_4Cl$ )

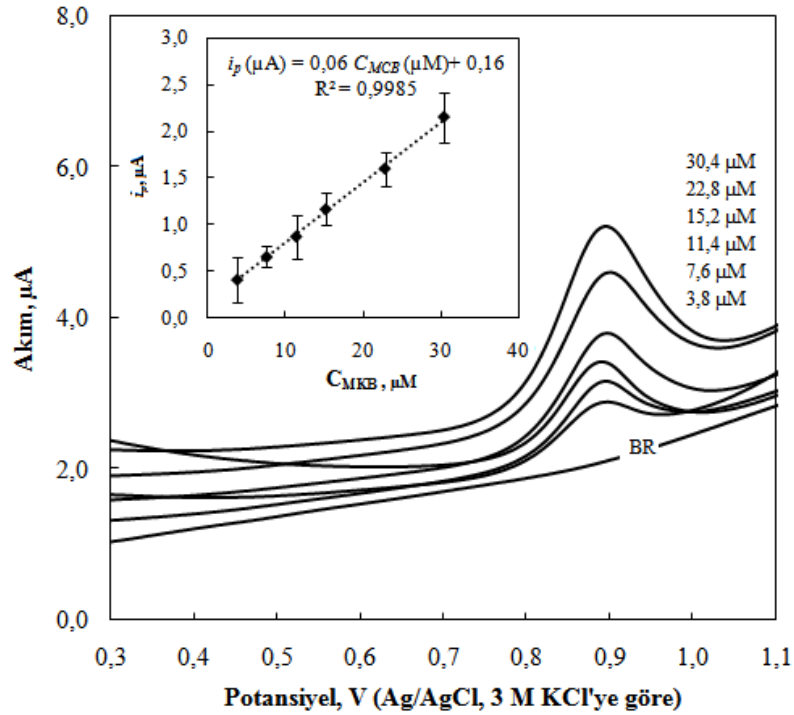
Şekilden de görüldüğü gibi, MKB'nin pik akımı çözeltiliye BSA eklendikçe azalmaktadır. Bu değerlendirmelerden, MKB'nin plazma proteinlerine bağlandığı, proteinle etkileştikten sonra elektroaktivitesini kaybettiği ve bu etkileşimden dolayı serum ortamında MKB'nin nicel tayininin yapılamayacağı sonucuna varılmıştır.

MKB için yapılan elektrokimyasal davranış inceleme çalışmalarından, MKB'nin ADCE yanında CEK yüzeyinde de elektrokimyasal aktifliğe sahip olduğu bilinmektedir. Şekil 4.34 incelendiğinde, MKB'nin CEK yüzeyinde pH 6,0'da en yüksek pik akımı oluşturacak şekilde yükseltgenme piki verdiği ve bu pikin akımının MKB derişimi ile doğrusal olarak değiştiği (Şekil 4.34) belirlenmişti. Bu nedenle, MKB'nin nicel tayini için bu yükseltgenme pikinden yararlanarak çeşitli voltametrik yöntemlerin geliştirilebileceği düşünülmüştür. Ancak, MKB'nin CEK'de yapılan gerek optimizasyon; gerekse yöntem geliştirme çalışmalarında sadece KDV yönteminde elde edilen parametrelerin tayin yöntemi geliştirmeye uygun olduğu görülmüştür. Bu

yöntemde yapılan optimizasyon çalışmalarında elde edilen optimum parametreler aşağıda verilmiştir:

- Destek elektrolit cinsi ve derişimi: 0,04 M BR
- pH: 6,0
- Yöntem değişkenleri:  $E_a = 4$  mV,  $E_p = 25$  mV,  $f = 15$  Hz

Belirlenen optimum koşullarda söz konusu tayin yöntemi için, çeşitli derişimlerde MKB



Şekil 4.49 KDV voltamogramlarına MKB derişiminin etkisi (iç grafik: pik akımının ( $i_p$ ) MKB derişimi ( $C_{MKB}$ ) ile değişimi, ÇE: CKE)

içeren çözeltilerin KDV voltamogramları alınmış ve bu voltamogramlar Şekil 4.49'da verilmiştir. Her bir deney 5 kez tekrarlanmış olup ortalama pik akımları derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve Şekil 4.49'da iç grafik olarak gösterilmiştir. Bu kalibrasyon grafiklerinin en küçük kareler yöntemiyle değerlendirilmesi ile bazı validasyon parametreleri hesaplanmış ve bu parametreler Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12 MKB tayini için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak değerlendirilmesiyle hesaplanan regresyon parametreleri

Parametre	KDV
Doğrusal çalışma aralığı, $\mu\text{M}$	3,8 – 30,4
Regresyon eşitliğinin eğimi ( $m$ ), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,06
Regresyon eşitliğinin kesim noktası ( $b$ ), $\mu\text{A}$	0,16
Eğimin standart sapması ( $s_m$ ), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,001
Kesim noktasının standart sapması ( $s_b$ ), $\mu\text{A}$	0,026
Regresyon katsayısı ( $R^2$ )	0,9985
Gözlenebilme sınırı ( $LOD$ ), $\mu\text{M}$	1,3
Alt tayin sınırı ( $LOQ$ ), $\mu\text{M}$	4,3
Gün-içi akım tekrarlanabilirliği (% BSS) *	5,4
Günler-arası akım tekrarlanabilirliği (% BSS) **	6,3
Gün-içi potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS) *	2,5
Günler-arası potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS) **	4,2

\* Aynı çözelti kullanılarak aynı günde yapılan 5 ölçüm değeri için

\*\* Aynı şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak 5 farklı günde yapılan 5 ölçüm değeri için

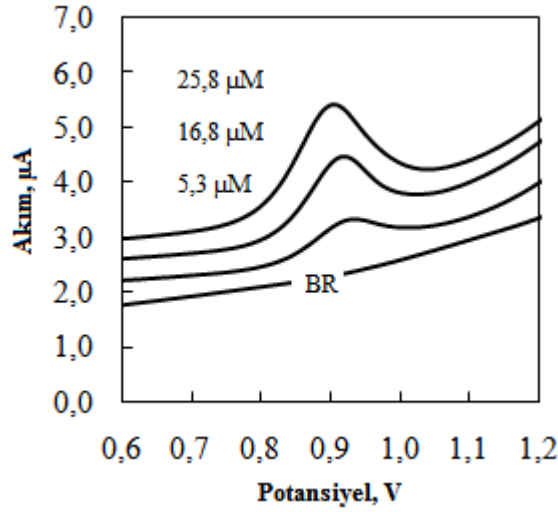
Şekil 4.49 ve Çizelge 4.12 incelendiğinde, MKB'nın yükseltgenmesine dayanarak geliştirilen KDV yönteminde;

- ortalama pik akımının MKB derişimi ile doğrusal değıştiği,
- regresyon katsayısının ( $R^2$ ) 0,99'dan büyük olduğu,
- pik akımı ve pik potansiyelinin gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirliklerinin oldukça iyi olduğu

görülmüştür.

Ayrıca, geliştirilen KDV yönteminin MKB tayini için uygun ve doğrusal çalışma aralığının  $3,8 \times 10^{-6} \text{ M}$  ( $1,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) -  $3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $8,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak; geliştirilen KDV yönteminin elde edilen doğrusal çalışma aralığının sadece tablet numunelerindeki MKB'nin tayinine yeterli olduğu, serum ve idrar gibi eser miktarda MKB içeren numunelere bir ön deriştirme yapılmadan uygulanamayacağı görülmüştür.

Bütün bu bulgulardan yararlanılarak, geliştirilen KDV yöntemi ile piyasadaki mevcut ilaçlarda MKB tayini yapılmıştır. Tayin çalışmasında kullanılan numune çözeltileri, Bölüm 3.6'da belirtildiği şekilde hazırlanmış ve bu tablet çözeltilerinin KDV yöntemi kullanılarak voltamogramları alınmış ve bu voltamogramlar Şekil 4.50'de verilmiştir.



Şekil 4.50 MKB içeren tablet çözeltilerinin KDV voltamogramlarının derişimle değişimi (ÇE: CKE, pH: 6,0 BR)

Şekil 4.50'deki voltamogramlar incelendiğinde, MKB'nin CKE yüzeyindeki yükseltgenme pikinin tablet numunelerinde de belirgin bir şekilde gözleendiği ve pik akımının eklenen tablet çözeltilerindeki MKB derişimi ile değiştirdiği görülmüştür. Ayrıca, tablet numunelerinde bulunan katkı maddelerinin MKB'nin yükseltgenme piki bölgesinde herhangi bir pik vermemesi, bu katkıların MKB tayininde girişim etkisi yapmayacağı sonucunu doğurmuştur. Bu amaçla, hem doğrudan kalibrasyon hem de standart katma grafikleri oluşturulmuş ve elde edilen grafiklerin eğimlerinin yaklaşık aynı olması da ortamda bulunan katkı maddelerinin bozucu etki yapmadığını göstermiştir. Bütün bu bulgular, geliştirilen yöntemin ilaçlarda etken madde tayinine uygulanabileceğini ve doğrudan kalibrasyon yönteminin kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak, bu çalışmada her iki kalibrasyon yöntemiyle de tayin yapılmış ve % geri kazanım değerleri belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, geliştirilen KDV yöntemiyle tablet numuneleri için hesaplanan geri kazanım değerinin yaklaşık % 100; bağıl standart

sapma değerinin ise % 3'den küçük olduğu bulunmuştur. Geliştirilen KDV yönteminin, MKB içeren ilaçların kalite kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılabilceği sonucu çıkarılabilir.

Çizelge 4.13 KDV yöntemiyle Aurorix® tabletlerinde MKB tayininde doğrudan kalibrasyon ve standart katma ile elde edilen sonuçlar

Yöntem	KDV, doğrudan kalibrasyon	KDV, standart katma
Beyan edilen MKB miktarı, mg	150,0	150,0
Bulunan MKB miktarı *, mg	151,0 ± 6,4	148,3 ± 4,6
	153,0 ± 7,2	146,4 ± 3,6
	147,8 ± 5,0	152,5 ± 2,4
	146,6 ± 3,0	151,8 ± 1,5
	154,7 ± 9,4	147,1 ± 5,8
Geri kazanım değeri*, %	100,4 ± 2,6	99,47 ± 2,1
% BSS**	2,3	1,9

\* ortalama ± ts/√N (N=5), %95 güven seviyesinde

\*\* Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

MKB'nin hem indirgenmesi hem de yükseltgenmesi için geliştirilen yöntemler, literatürde aynı madde için geliştirilen yöntemler ile karşılaştırılarak yöntemlerin doğruluğu ve kesinliği arasında anlamlı bir farkın olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, yöntemlerin doğrulukları % 95 güven seviyesinde *t* testi; kesinlikleri ise, *F* testi uygulamaları yapılarak karşılaştırılmıştır (Skoog 2004). Geliştirilen voltametrik yöntemlerin tablet ilaç formlarına uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar, Vujic ve arkadaşları (2009) tarafından geliştirilen HPLC yönteminin uygulama sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve hesaplanan *t* ve *F* değerleri Çizelge 4.14'de verilmiştir. Çizelge 4.14 incelendiğinde, yöntemler arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.14 Aurorix® tabletlerinde MKB tayini için geliştirilen voltametik yöntemlerin HPLC yöntemi ile istatistiksel olarak karşılaştırılması

Yöntem	Geri kazanım değeri, %	% BSS	N	Hesaplanan <i>t</i> değeri	Hesaplanan <i>F</i> değeri
HPLC	102,0	1,46	10		
KDV <sub>ADCE</sub> 'de	100,1	1,3	10	1,70	1,27
KDKAdSV <sub>ADCE</sub> 'de	98,8	3,0	10	1,74	0,26
DPV <sub>ADCE</sub> 'de	99,3	1,6	10	1,33	0,87
DPAdSV <sub>ADCE</sub> 'de	102,2	2,4	10	0,12	0,36
KDV <sub>CKE</sub> 'de	100,4	2,3	10	1,03	0,42
Teorik değerler*				2,10	2,71

\* % 95 güven seviyesinde (Gündüz 1997)



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında antidepresan etkiye sahip ilaç etken maddeler olan reboksetin metansülfonat (RBK) ve moklobemidin (MKB) voltametrik yöntemler kullanılarak elektrokimyasal davranışları ilk kez incelenmiş ve olası elektrot tepkime mekanizmaları önerilmiştir. Ayrıca, söz konusu iki ilaç etken maddesinin çeşitli ortamlarda nicel tayini için voltametrik yöntemler geliştirilmiş, elde edilen sonuçlar ve bazı öneriler aşağıda verilmiştir.

Çalışmaya konu olan ilaç etken maddelerinin asılı damla cıva elektrot (ADCE) yüzeyinde indirgendiği, camı karbon elektrot yüzeyinde (CKE) ise yükseltendiği belirlenmiş, olası tepkime mekanizması önerilmiştir. RBK'nın ADCE yüzeyindeki indirgenmesinin, 3 proton/2 elektron aktarımıyla tersinir, adsorpsiyon kontrollü bir mekanizmayla; CKE yüzeyinde yükseltgenmesinin ise 1 proton/1 elektron aktarımı ile tersinmez, difüzyon kontrollü bir mekanizma ile gerçekleştiği belirlenmiştir. MKB'nin ise ADCE yüzeyinde, katalitik etkinin söz konusu olduğu, tersinir adsorpsiyon kontrollü bir mekanizma ile indirgendiği; CKE yüzeyinde ise tersinmez adsorpsiyon kontrollü bir mekanizma ile 2 proton/2 elektron aktarımı sonucu yükseltendiği belirlenmiştir. Elektrokimyasal ve biyolojik tepkimeler arasındaki benzerlikten dolayı, literatürde elektrot yüzeyinde gerçekleşen indirgenme/yükseltgenme mekanizmaları ile canlı bünyesinde gerçekleşen etki mekanizmaların benzer prensipler üzerinden yürüyebileceği belirtilmektedir (La-Scalea vd. 2002, Rauf vd. 2005, Wang vd. 2006). Bu nedenle, MKB ve RBK'nın etki mekanizmaları ile elektrokimyasal indirgenme/yükseltgenme davranışları arasında ilişki kurmak mümkün olabilir.

Son yıllarda çeşitli moleküllerin elektrokimyasal davranışları belirlenirken, daha olası mekanizma önerebilmek için molekülle ilgili çeşitli teorik hesaplamaların yapıldığı görülmektedir. Bu şekilde yapılan molekül modelleme çalışmalarında, HOMO/LUMO enerji ve orbital şemaları, moleküler elektrostatik enerji haritası ve geometri optimizasyonu gibi bazı özellikler incelenmektedir (La-Scalea vd. 2006, Song 2007, Paula vd. 2010, Zhang vd. 2010). Dolayısıyla, bu çalışmanın devamı olarak, tez

kapsamında incelenen etken maddelerin molekül modelleme çalışmalarının yapılması ve önerilen elektrot tepkime mekanizmalarının desteklenmesi yararlı olacaktır.

RBK ve MKB'nin tayini için çeşitli voltametrik yöntemler geliştirilmiş ve bu yöntemlerin analitik uygulamaları yapılmıştır. MKB ve RBK tayini için ADCE kullanılarak KDV, KDKAdSV, DPV ve DPKAdSV yöntemleri; CKE kullanılarak ise, sadece KDV yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, ilaç dozaj formları gibi yüksek derişimde etken madde içeren numunelerin analizinde, geliştirilen doğrudan voltametrik yöntemlerin kullanılabilceği; serum, plazma ve idrar gibi eser miktarda etken madde içeren numunelerin analizinde ise geliştirilen adsorptif sıyırma yöntemlerinin kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

RBK ve MKB ile ilgili literatür araştırmalarında, söz konusu etken maddelerin nicel tayinleri için ağırlıklı olarak çeşitli kromatografik ve bazı spektrofotometrik yöntemlerin geliştirildiği görülmüştür. Bu çalışmalar Çizelge 5.1 ve 5.2'de verilmiştir. Bütün bu çalışmalarda, serum ve plazma numunelerinde etken maddelerin tayin edilebilmesi için katı faz özütleme yöntemi gibi çeşitli ön deriştirme yöntemleri uygulanarak numunedeki ilaç derişimi yöntemin doğrusal çalışma aralığına gelecek şekilde arttırılmıştır. Bu tez çalışmasında geliştirilen adsorptif sıyırma yöntemleri her iki ilaç etken maddesinin fizyolojik ortamdaki derişimlerinin tayin edilebileceği aralıkta olmasına rağmen, RBK ve MKB'nin serum proteinlerine kuvvetle bağlanması ve söz konusu bağlı moleküllerin voltametrik bir sinyal vermemesi nedeniyle serum ortamında tayinleri gerçekleştirilememiştir. İleride, bu ilaç etken maddelerin proteinden ayrılması için basit bir ön işlemin geliştirilmesi veya bağlı ilaçların elektroaktiviteye sahip olduğu bir elektrot yüzeyinin geliştirilmesi düşünülmektedir.

Elde edilen veriler sonucunda, RBK ve MKB'nin tayini için herhangi bir ön deriştirme işlemine ihtiyaç duyulmadan basit, hızlı, doğru, duyarlı ve kesin voltametrik yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen voltametrik yöntemlerin alt tayin sınırlarının literatürde bulunan spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlere oldukça yakın ya da daha düşük olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen voltametrik yöntemler tablet formundaki ilaçlarda etken madde tayinine başarıyla uygulanmıştır. Voltametrik yöntemler kolay ve

ucuz bir yöntem olması nedeniyle literatürde bulunan ve daha karmaşık, daha pahalı cihazların kullanıldığı ve işletim maliyetlerinin yüksek olduğu kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlere alternatif olabilir.

Bu çalışmada MKB ve RBK'nın proteinlere bağlandığı voltametrik çalışmalarla kabaca gösterilmiştir. Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi, elektrokimyasal çalışmalar kromatografik çalışmalar gibi sadece nicel tayin için değil ilaç etken maddelerinin etki mekanizmalarının, biyolojik ortamlarda bulunan farklı türler (protein gibi) etkileşimlerinin incelenmesi için de kullanılabileceği görülmektedir.

RBK ve MKB için elektrokimyasal çalışmaların sonuçları, ileride yapılması düşünülen, değişik spektrofotometrik yöntemlerin sonuçları ile birleştirilerek söz konusu ilaç etken maddeler ile ilgili bağlanma katsayısı, bağlanan fonksiyonel grupların sayısı, bağlanma mesafesi, etkileşimin termodinamiği gibi bazı teorik hesaplamalar yapılarak farmakolojik çalışmalarda biyolojik açıdan önemli olan bağlanma mekanizması aydınlatılabilir.

Çizelge 5.1 RBK tayini için literatür özeti

Yöntem	Çalışma ortamı	Doğrusal çalışma aralığı	LOD, LOQ	Uygulama*	Referans
HPLC-VIS 273,226 nm	Lichrospher CN (5 µm) MZ-Analysentechnik (250 × 34,6 mm I.D.) Asetonitril, potasyum fosfat tamponu (0,008 M, pH 6,4) (50:50, h/h)	15-153 ng /mL 0,04-0,4 µM	LOQ: 15 ng/mL 0,04 µM	Serum	Hartter vd. 2000
HPLC-UV 230 nm	Varian ters faz ResElut C <sub>8</sub> kolon (150 × 4,6 mm I.D., 5 µm) Asetonitril-pH 2,6, 11,3 mM tetra- metilamonyum perklorat çözeltisi (40:60, v/v)	50-1000 ng/mL 0,1-2,4 µM	LOD: 15 ng/mL 0,04 µM LOQ: 45 ng/mL 0,1 µM	Edronax tablet Serum	Raggi vd. 2002
Spektro- fotometrik	Dördüncü türev spektrofotometrik tayin RBK metanolde çözülüp, pH 2,5; 50 mM fosfat tamponuyla seyreltilmiştir. Doğrudan UV: 206, 274 nm'de iki tane pik kaydedilmiştir Dördüncü türev UV: 282 ve 287 nm'de okunan pik değerleri arasındaki fark alınmıştır	20-100 µg/mL 48,8-244,2 µM	LOD: 7 µg/mL 17,1 µM LOQ: 20 µg/mL 48,8 µM	Edronax	Raggi vd. 2002
HPLC-UV	(250x4,6 mm I.D., 5 µm) Nucleosil 100-5-Protect 1 25 mM potasyum dihidrojenfosfat (pH 7,0)-asetonitril (60:40)	5-1000 ng/mL 0,01-2,4 µM	-	Serum	Frahnert vd. 2003
HPLC-MS	Chromolith Speed ROD C18, 50 mm x 4,6 mm, 5 µm. Metanol ve 5mM asetik asit, pH 3,9	10-1000 ng/mL 0,02-2,4 µM	LOQ: 1,43 ng/mL 0,004 µM	Serum	Kirchherr vd. 2006
HPLC-FL	Hypersil 120A (250 mm × 4,6 mm I.D., 5 µm). 10 mmol.L <sup>-1</sup> sodyum asetat tamponu (pH 3,5)-tetrahidrofuran-asetonitril (55:35:10, h/h/h)	2-500 ng/mL 0,01-1,2 µM	LOD:0,5 ng/mL 0,001 µM LOQ:1,7 ng/mL 0,004 µM	Plasma	Khalil, 2010

\*Ekstraksiyon işlemi uygulanan yöntemler

Çizelge 5.2 MKB tayini için literatür özeti

Yöntem	Çalışma ortamı	Doğrusal çalışma aralığı	LOD, LOQ	Uygulama*	Referans
HPLC-UV	Supelcosil LC-18 (120mm, 4,6 mm, 5 mm) kolon 3% Amonyum-etanol ve asetonyril	45,45–500 ng/μL (169,1-1860,53 μM)	LOD: 10,37 ng/μL (38,59 μM)	Auromid tablet Serum	Vujic vd. 2009
HPLC-UV	LiChrospher 60 RP-select B kolon (250mm×4 mm, 5 μm) 35% asetonyril metanol karışımı (92:8, h/h) ve 65% of 0,25 mol/L sodyum asetat tamponu, pH 4,5	2,5-1000 ng/mL (0,01-3,7 μM)	LOQ: 2,5 ng/mL (0,01 μM)	Plazma	Malfara vd. 2007
HPLC-UV	Nucleosil 100 C18 analitik kolon (5 μm tanecik boyutu, 125 × 4 mm) Asetonyril-su (25:75, h/h) 85% <i>ortho</i> -fosforik asit ile pH 2,7'ye ayarlanmış	20-2500 ng/mL (0,074-9,30 μM)	LOQ: 10 ng/mL (0,037 μM)	Aurorix tablet Plazma	Plenis vd. 2007
HPLC-UV	Waters XTerra RP18 kolon (5 μm, 150 mm x 4,6 mm) 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1% trietilamin (pH 3,9) ve asetonyril (83:17, h/h)	0,02-5,00 mg/L (0,074-18,60 μM)	LOD: 0,005 mg/L (0,019 μM)	Auromid tablet Plazma	Rakic vd. 2007
HPLC-UV-VIS	ODS kolon (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – asetonyril - trietilamin (1000:350:10 (h/h/h))	15,6–2000 ng/mL (0,058-7,44 μM)	LOQ: 15,6 ng/mL (0,058 μM)	Aurorix tablet Plazma	Amini vd. 2004
HPLC-UV	Nova-pak C8 kolon ve 230 nm'de UV tayini. Asetonyril-metantol-0,067 M fosfat tamponu pH 2,65-0,4% trietilamin	50-2000 ng/mL (0,19-7,44 μM)	LOQ: 10 ng/mL (0,037 μM)	Aurorix tablet Plazma	Misztal vd. 2002
HPLC-MS	C18 kolon (50mm×4,6 mm) Metanol 5mM asetat tamponu (pH 3,9)	100–10000 ng/mL (0,37-37,21 μM)	LOQ: 5,7 ng/mL (0,021 μM)	Serum	Kirchherr ve Kühn-Velten 2006
HPLC-MS	Nova-Pak phenyl kolon (Waters, 4 μm,150x32 mm I.D.) 0,2 M amonyum format tamponu (pH 3,57) ve asetonyril	0,01-5,2 μg/mL (0,037-19,35 μM)	LOQ: 0,01 μg/mL (0,037 μM)	Plazma	Hoskins vd. 2001
Spektro-fotometrik	Lewis bazı: MCB, Lewis asidi: Kloranilik asit, 526 nm	4-36 mg/100 mL (148,8-1339,6 μM)	-	Aurorix tablet	Adikwu ve Ofokansi 1997
Potansiyometrik	MKB seçici membran elektrot	1-1000 μM	0,3 μM	Tablets	Stefan vd. 1996

\*Ekstraksiyon işlemi uygulanan yöntemler

## KAYNAKLAR

- Adikwu, M.U. and Ofokansi, K.C. 1997. Spectrophotometric determination of moclobemide by charge – transfer complexation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 16; pp. 529–532.
- Alper, Y. 1999. Bütün yönleriyle depresyon. Gendaş, 147 s., İstanbul.
- Amini, H., Shahmir, B., and Ahmadiani, A. 2004. Determination of moclobemide in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography B*, Vol. 807; pp. 271–275.
- Anonymous. 2009. Product Monograph, Manerix. Web sitesi. [www.roche.com](http://www.roche.com). Erişim Tarihi: 30.06. 2009.
- Anonymous. 2010. Data sheet, Aurorix. Web sitesi. <http://www.medsafe.govt.nz>. Erişim Tarihi: 04.08. 2010.
- Anonymous. 2010. Pulse voltammetric techniques. Web sitesi [www.basinc.com](http://www.basinc.com). Erişim Tarihi: 04.08. 2010.
- Baizer, M.M. 1973. *Organic electrochemistry*, Marcel Dekker, Inc. New York, sayfa 417.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R. 2001. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*. Second Edition, John Wiley and Sons, 833 p., New York.
- Bard, A.J. and Rubinstein, I. 1999. *Electroanalytical chemistry*. Dekker, 392 p., New York.
- Barek, J., Peckova, K., and Vyskocil, V. 2008. Adsorptive stripping voltammetry of environmental carcinogens. *Current Analytical Chemistry*, Vol. 4; pp. 242–249.
- Barri, T. and Jönsson, J.A. 2004. Supported liquid membrane work-up of blood plasma samples coupled on-line to liquid chromatographic determination of basic antidepressant drugs. *Chromatographia*, 59, February (No. 3/4)
- Baumann, P., Hiemke, C., Ulrich, S., Eckermann, G., Gaertner, I., Gerlach, M., Kuss, H.J., Laux, G., Müller-Oerlinghausen, B., Rao, M.L., Riederer, P., Zernig, G. 2004. The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry*, Vol. 37; pp. 243–265.
- Beck, A. T. and Alford, B.A. 2009. *Depression: Causes and treatments*. University of Pennsylvania Press, 405 p., Philadelphia.
- Bi, S., Yan, L., Wang, B., Bian, J. Sun, Y. 2011. Spectroscopic and voltammetric characterizations of the interaction of two local anesthetics with bovineserum albumin. *Journal of Luminescence*, Vol. 131; pp. 866–873.
- Bishop, E. and Hussein, W. 1984. Anodic voltammetry of dopamine, noradrenaline and related compounds at rotating disc electrodes of platinum and gold. *Analyst*, Vol. 109; pp. 627–632.
- Bond, A.M. 1980. *Modern polarographic methods in analytical chemistry*, 518 p., Marcel Dekker In., New York.
- Brett, C.M.A. and Brett, A.M.O. 1994. *Electrochemistry. Principles, methods, and applications*. Oxford University Press, 427 p., New York.

- Cai, H.H., Zhong, X., Yang, P.H., Wei, W., Chen, J., and Cai, J. 2010. Probing site-selective binding of rhodamine B to bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 372; pp. 35–40.
- Collins, C.J., Lyons, C., Strutwolf, J., Arrigan, D.W.M. 2010. Serum-protein effects on the detection of the  $\beta$ -blocker propranolol by ion-transfer voltammetry at a micro-ITIES array. *Talanta*, Vol. 80; pp. 1993–1998.
- Dong, M.W. 2006. *Modern HPLC for practicing scientists*. John Wiley & Sons, Inc., 286 p, New Jersey.
- Fagan, D.T., Hu, I.F., Kuwana, T. 1985. Vacuum heat treatment for activation of glassy carbon electrode. *Analytical Chemistry*, Vol. 57; pp. 2759–2763.
- Fotouhi, L., Banafsheh, S., Heravi, M.M. 2009. Electrochemistry of the interaction of furazolidone and bovine serum albumin. *Bioelectrochemistry*, Vol. 77; pp. 26–30.
- Frahnert, C., Rao, M.L., and Grasmader, K. 2003. A analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B*, Vol. 794; pp. 35–47.
- Garrido, E.M.P.J., Garrido, J.M.P.J., Esteves, Santos-Silva, A., Marques, M.P.M., Borgesb, F. 2008. Voltammetric and DFT studies on viloxazine: Analytical application to pharmaceuticals and biological fluids. *Electroanalysis*, Vol. 20; pp. 1454-1462.
- Gosser, D.K. 1994. *Cyclic voltammetry. Simulation and analysis of reaction mechanisms*. VCH, 154 p., New York.
- Gündüz, T. 1997. *Kimyacılar için istatistik*. Gazi büro kitapevi Tic. Ltd. Şti. Baran ofset, Ankara 230 s.
- Hartter, S., Weigmann, H., and Hiemke, C. 2000. Automated determination of reboxetine by high-performance liquid chromatography with column-switching and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, Vol. 740; pp. 135–140.
- Hilali, A., Jimenez, J.C., Callejon, M., Bello, M.A., Guiraum, A. 2005. Electrochemical study of imipenem's primary metabolite at mercury electrode Voltammetric determination in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 38; pp. 768-775.
- Hoskins, J.M., Gross, A.S., Shenfield, G.M. and Rivory, L.P. 2001. High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for the measurement of moclobemide and two metabolites in plasma. *Journal of Chromatography B*, Vol. 754; pp. 319–326.
- Hulbert, M.H. and Shain, I. 1970. Rate-controlled adsorption of product in stationary electrode polarography. *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 42; pp. 162-171.
- Ignjatovic, A.R., Nikolic, K. K., Miljkovic, B., Pokrajac, M., Agbaba, D. and Prostran, M. 2009. Determination of moclobemide and its metabolites in human plasma by SPE-HPLC-UV: Evaluation of critical experimental conditions and QSRR Study. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 32; pp. 2080–2096.
- Işık, E. 1991. *Duygulanım bozuklukları depresyon ve mani*. Boğaziçi Matbaası, 208 s., İstanbul.

- Jauch, R., Griesser, E., Oesterhelt G, Arnold W, Meister W, Ziegler WH, Guentert TW. 1990. Biotransformation of moclobemide in humans. *Acta Psychiatr Scand Suppl.*, Vol. 360; pp. 87-90.
- Kadhe, N.G., Chillar, A.J., Deshmukh, Y.A. 2003. Reboxetine: A novel antidepressant. *Journal of Postgraduate Medicine*, Vol. 49; pp. 373–375.
- Khalil, N. 2010. A highly sensitive HPLC method with automated on-line sample pre-treatment and fluorescence detection for determination of reboxetine in human plasma. *Talanta* Vol. 80; pp. 1251–1256.
- Kirchherr, H. and Kühn-Velten, W.N. 2006. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach. *Journal of Chromatography B*, Vol. 843; pp. 100–113.
- Kissinger, P.T., Heineman, W.R. 1996. *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*. Marcel Dekker, Inc. Second Edition, 983 s, New York.
- Köroğlu, E. 2007. *Psikiyatrisin ilaç rehberi*. Hyb yayıncılık, 288 s., Ankara.
- La-Scalea, M.A., Menezes, C.M.S., Matsutami, G.C., Polli, M.C., Serrano, S.H.P., Ferreira, E.I. 2006. Molecular modeling of the voltammetric oxidation at a glassy carbon electrode of the antimalarial drug primaquine and its prodrugs succinylprimaquine and maleylprimaquine. *Electrochimica Acta*, Vol. 51; pp. 5103–5111.
- La-Scalea, M.A., Serrano, S.H.P., Ferreira, E.I., Oliveira Brett, A.M. 2002. Voltammetric behavior of benznidazole at a DNA-electrochemical biosensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 29; pp. 561–568.
- Laux, G., Baumann, P., Hiemke, C. 2007. Therapeutic drug monitoring of antidepressants-clinical aspects. *Journal of neural transmission*, Vol. 72; pp. 261–267.
- Lieberman, J.A. and Tasman, A. 2006. *Handbook of Psychiatric Drugs*. John Wiley and Sons, 284 p., England.
- Malfara, W.R., Bertucci, C., Queiroz, M.E.C., Carvalho, S.D., Bianchi, M.L.P., Cesarino, E.J., Crippa, J.A., and Queiroz, R. H. C. 2007. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 44; pp. 955-962.
- Manjunatha, J. G., Kumara Swamy, B. E., Mamatha, G. P., Gilbert, O, Srinivas, M. T., Sherigara, B. S. 2011. Electrochemical studies of clozapine drug using carbon nanotube-SDS modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetry study. *Der Pharma Chemica*, Vol. 3; pp. 236-249.
- Mayersohn, M., Guentert, TW. 1995. Clinical pharmacokinetics of the monoamine oxidase-A inhibitor moclobemide. *Clinical Pharmacokinetics*, Vol. 29; pp. 292-332.
- Mirceski, V., Komorsky-Lovric, S., and Lovric, M. 2007. *Square-wave voltammetry: Theory and application*. Springer-Verlag Berlin, 201 p., Heidelberg.
- Misztal, G., Skibinski, R., Olajossy, M., and Paw, B. 2002. LC determination of moclobemide and three metabolites in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 30; pp. 1277–1285.
- Munson, J.W. 1984. *Pharmaceutical analysis*. Marcel Dekker, Inc., 496 p., New York.



- Nair, N.P.V., Ahmed, S.K., Ng Ying Kin, N.M.K. 1993. Biochemistry and pharmacology of reversible inhibitors of MAO-A agents: Focus on moclobemide. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, Vol. 18; pp. 214–225.
- Nakiboğlu, N. 2010. Elektroanalitik kimyada katalitik tepkimeler. *Elektrokimya yaz okulu*, İzmir.
- Özdemir, N., Özdemir, S., and Biçer, E. 2011. Interaction between Janus Green B and bovine serum albumin: Electrochemistry and spectroscopy studies. *Chinese Chemical Letters*, Vol. 22; pp. 717–720.
- Öztürk, M.O. ve Uluşahin, A. 2008. Ruh sağlığı ve bozuklukları II. 11. Baskı, Tuna matbaacılık, 1010 s., Ankara.
- Panzer, R.E. 1972. Behaviour of carbon electrodes in aqueous and non-aqueous system. *Journal of Electrochemical Society*, Vol. 2; pp. 119–864.
- Paula, F.R., Trossini, G.H.G., Ferreira, E.I., Serrano, S.H.P., Menezes, C.M.S. Tavares, L.C. 2010. Theoretical and voltammetric studies of 5-nitro-heterocyclic derivatives with potential trypanocidal activities *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 21; pp. 740–749.
- Pereira, F.C., Stradiotto, N.R., Zanoni, M.V.B. 2001. Electrochemical reduction and cathodic stripping voltammetric determination of clotrimazole. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 12; pp. 202-207.
- Plenis, A., Chmielewska, A. Konieczna, L. and Lamparczyk, H. 2007. A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of moclobemide and its two metabolites in human plasma and application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*, Vol. 21; pp. 958-966.
- Raaflaub, J. Haefelfinger, P., and Trautmann, KH. 1984. Single-dose pharmacokinetics of the MAO inhibitor moclobemide in man. *Arzneimittelforschung*, Vol. 34; pp. 80–82.
- Raggi, M.A., Bugamelli, F., Sabbioni, C., Ferranti, A., Fanali, S., and Volterra, V. 2002. Analysis of reboxetine, a novel antidepressant drug, in pharmaceutical tablets by capillary electrophoresis and derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 27; pp. 209–215.
- Raggi, M.A., Mandriolia, R., Casamentia, G., Volterrab, V., and Pinzauti, S. 2002. Determination of reboxetine, a recent antidepressant drug, in human plasma by means of two high-performance liquid chromatography methods. *Journal of Chromatography A*, Vol. 949; pp. 23–33.
- Rakic, A., Miljkovic, B., Pokrajac, M., and Vucicevic, K. 2007. High-performance liquid chromatographic method for the determination of moclobemide and its two major metabolites in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 43; pp. 1416–1422.
- Rauf, S., Gooding, J.J., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anwar, M.A., Khalid, A.M. 2005. Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 37; pp. 205–217.
- Rege, P.V., Sathe, P.A., Salvi, V.S. 2011. A simple electroanalytical method for estimation of norfloxacin and tinidazole individually from pharmaceutical formulation. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, Vol. 2; pp. 495-505.
- Scholz, F. (Editor). 2010. *Electroanalytical methods*. Second edition, Springer Heidelberg Dordrecht 359 p., London New York.

- Shearer, C.M., Christenson, K., Mujherji, A., Papariello, C.J. 1972. Peak voltammetry at glassy carbon electrode of acetaminophen dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Science*, Vol. 61; pp. 1627.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. and Crouch, S.R. 2004. *Analitik kimya temel ilkeler. Çeviri, Sekizinci Baskı*, 706 s., Ankara.
- Song, Y. 2007. Theoretical study on the electrochemical behavior of norepinephrine at Nafion multi-walled carbon nanotubes modified pyrolytic graphite electrode. *Spectrochimica Acta Part A*, Vol. 67; pp. 1169–1177.
- Stahl, M.S. 2000. *Essential psychopharmacology of depression and bipolar disorders*. Cambridge University Press, 135-199 p., United Kingdom.
- Stefan, R.I., Baiulescu, G.E., Aboul-Enein, H.Y. 1996. Moclobemide-selective membrane electrode and its pharmaceutical applications. *Talanta*, Vol. 43; pp. 1171-1175.
- Thomas, F.G. and Henze, G. 2001. *Introduction of voltammetric analysis. Theory and practice*. Csiro publishing, 264 p., Australia.
- Tjaden, U.R., Lankelma, J., Poppe, H. Muusze, R.G. 1976. Anodic coulometric detection with a glassy carbon electrode in combination with reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, Vol. 125; pp. 275–286.
- Vujic, Z., Uskokovic-Markovic, S. and Kuntic V. 2009. Simultaneous determination of maprotiline, desipramine, and moclobemide by reversed-phase high-performance liquid chromatography and statistical optimization. *Analytical Letters*, Vol. 42; pp. 2060-2070.
- Wang, C.Y., Hu, X.Y., Jin, G.D., Leng, Z.Z. 2002. Differential pulse adsorption voltammetry for determination of procaine hydrochloride at a pumice modified carbon paste electrode in pharmaceutical preparations and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 30; pp. 131-139.
- Wang, J. 2006. *Analytical electrochemistry*. Third edition, John Wiley, 250 p., New Jersey.
- Wang, J., Hutchins, L.D. 1985. Activation of glassy carbon electrodes by alternating current electrochemical treatment. *Analytical Chimica Acta*, Vol. 167; pp. 325–334.
- Wang, L., Zhang, Z., and Baoxian Ye, B. 2006. Study on the electrochemical behaviour of the anticancer herbal drug emodin. *Electrochimica Acta*, Vol. 51; pp. 5961–5965.
- Wei, Q.H., Han, L.J., Chen, J.H., Xiao, F.N., Zeng, S. L., Chen, G.N. 2011. Electrochemical behavior of Ru(H<sub>2</sub>bpp)<sub>2</sub>(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> and its interaction with bovine serum albumin (BSA). *Chinese Chemical Letters*, Vol. 22; pp. 713–716.
- Wopschall, R.H. and Shain, I. 1967. Effects of adsorption of electroactive species in stationary electrode polarography. *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 39; pp. 1514-1527.
- Yüksel, N. 2003. *Psikofarmakoloji. Çizgi Tıp Yayınevi*, 717 s., Ankara.
- Zhang, L., Reynolds, K.S., Zhao, P., Huang, S.M. 2010. Drug interactions evaluation: An integrated part of risk assessment of therapeutics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 243; pp. 134–145.
- Zoski, C.G. 2007. *Handbook of electrochemistry*. First edition, Elsevier, 892 p., Netherlands.

Zuman, P. 2006. Principles of applications of polarography and voltammetry in the analysis of drugs (Invited review). FABAD J. Pharm. Sci., Vol. 31; pp. 97-115.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Deniz ALTUNÖZ ERDOĞAN  
Doğum yeri : Ordu  
Doğum Tarihi : 10.12.1974  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Ankara Kocatepe Mimar Kemal Lisesi  
Lisans : Orta Doğu Teknik Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (1999)  
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (2002)

### Çalıştığı kurumlar ve Yıl

Zimmer GmbH., QA&RA Danışmanı	2010
Meteksan Metal Teknolojileri San. Ltd. Şti.	2008-2011
Ege Grup Holding, QA&RA Koordinatörü	2002-2008
Onay Gıda Kontrol Laboratuvarı, Laboratuvar Müdürü	1999-2001

### Yayımlar (SCI ve diğer)

**Erdoğan, D.A.**, Taşdemir, İ.H., Erk, N., Kılıç, E. 2011. Electrochemical behavior of moclobemide at mercury and glassy carbon electrodes and voltammetric methods for its determination. Collection of the Czechoslovak Chemical Communications, 76; 423-442.