

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**VALSARTAN'IN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞININ İNCELENMESİ VE
TAYİNİ İÇİN ANODİK ADSORPTİF SIYIRMA YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Nedim GÜRLER

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2012**

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

VALSARTAN'IN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞININ İNCELENMESİ VE
TAYİNİ İÇİN ANODİK ADSORPTİF SIYIRMA YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Nedim GÜRLER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zehra DURMUŞ

Bu çalışmada, hipertansiyon tedavisinde kullanılan valsartan (VSN)'in camısı karbon yüzeyindeki elektrokimyasal davranışı; dönüşümlü voltametri (DV), kare-dalga voltametri (KDV) ve sabit potansiyelli kulometri yöntemleri ile Britton-Robinson (BR) tamponu ortamında incelendi. Valsartan'ın adsorpsiyon ve difüzyon özellikleri incelenerek, elektrot tepkimesinde aktarılan elektron sayısı, difüzyon katsayısı, yük transfer katsayısı gibi bazı elektrokimyasal parametreleri hesaplandı. Ayrıca valsartan'ın farmasötik örnekler ve biyolojik sıvılarda tayini için diferansiyel puls anodik adsorptif sıyırma voltametri (DPAAdSV) ve kare dalga anodik adsorptif sıyırma voltametri (KDAAdSV) yöntemleri geliştirildi. Doğrusal çalışma aralığı DPAAdSV yöntemi için $8,0 \times 10^{-7}$ M - $7,0 \times 10^{-6}$ M iken; KDAAdSV yöntemi için ise $5,0 \times 10^{-7}$ M - $5,0 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı. Yapılan kalibrasyon çalışmalarının analitik parametreleri en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilerek her iki yöntem için gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı değerleri belirlendi. Geliştirilen yöntemlerin validasyonu yapıldı. Bu yöntemler farmasötik örnekler ile idrar ve serum gibi biyolojik ortamlarda bulunan Valsartan'ın tayini için kullanıldığında; güvenilir, tekrarlanabilir, yüksek doğruluk ve kesinliğe sahip sonuçlar elde edildi. Geliştirilen yöntemlerin uygulama sonuçları ve validasyon parametreleri söz konusu ilaç etken maddesi için önerilen standart yöntemlerin sonuçları ve parametreleri ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bu parametreler ve sonuçlar arasında %95 güven seviyesinde anlamlı bir farkın olmadığı görüldü.

Temmuz 2012, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: Valsartan, voltametri, elektrokimyasal davranış, adsorptif sıyırma voltametri, yöntem validasyonu.

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF ELECTROCHEMICAL BEHAVIORS OF VALSARTAN AND DEVELOPMENT OF ANODIC ADSORPTIVE STRIPPING VOLTAMMETRIC METHOD TO ITS DETERMINATION

Nedim GÜRLER

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

Supervisor: Prof. Dr. Zehra DURMUŞ

In this study, electrochemical behaviour of valsartan (VSN) used for treatment of hypertension on glassy carbon electrode was investigated by using cyclic voltammetry (CV), square-wave voltammetry (SWV) and constant potential bulk electrolysis (BE) in Britton-Robinson (BR) buffer. Adsorption and diffusion properties of VSN were investigated. Some electrochemical parameters such as; diffusion coefficient, number of transferred electron in electrochemical step, charge transfer coefficient were calculated. Furthermore, differential pulse anodic adsorptive stripping voltammetric (DPAAdSV) and square-wave anodic adsorptive stripping voltammetric (SWAAdSV) methods were developed to its direct determination in pharmaceutical preparations and biological samples including human serum and human urine. . Linear working concentration range for DPAAdSV method was evaluated between $8,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ - $7,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ and for SWAAdSV was evaluated between $5,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ - $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$. Limit of quantification and detection for these developed methods were calculated from analytical parameters of calibration studies by using least squared method. Validation of methods was also performed. Results of applications of developed methods to pharmaceutical preparations and biological liquids were found to have high accuracy and precision, reproducible and high confidence. These results were also compared with those of standard methods proposed for determination of VSN and results were found to be insignificant at 95 % confidence level.

July 2012, 78 pages

Key Words: Valsartan, voltammetry, electrochemical behaviour, adsorptive stripping voltammetry, method validation.

TEŐEKKÖR

Tez alıőmam sırasında ve tezimin hazırlanmasında bana her konuda yardımcı olan, bilgisini, tecrübelerini, hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Zehra DURMUŞ'a,

Çalıőmalarım sırasında bilgi birikimi ve deneyimleri ile yardımlarını esirgemeyen ve özgüven veren, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Esmâ KILIÇ'a,

Çalıőmalarımda, yardımcı olan Düzce Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Arő. Gör. Dilek ESKİKÖY'e

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitikkimya ABD'daki değerli hocalarım ve arkadaşlarıma,

Maddi manevi destekleriyle bana güç vererek, hoşgörülerini ve anlayışını esirgemeyen ve her zaman yanımda olduklarına inandığım aileme, en içtenlikle teşekkür ederim.

Nedim GÖRLER

Ankara, Temmuz 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Antihipertansif İlaçlar ve Sınıflandırılması.....	3
2.1.1 Valsartan (VSN).....	4
2.1.2 Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	5
2.1.3 Farmakolojik özellikleri.....	6
2.1.4 Farmakodinamik özelliği.....	6
2.1.5 Farmakokinetik özelliği.....	8
2.1.6 Tedavi edici kullanımı(dozu).....	8
2.2 İlaç Analiz Yöntemleri.....	9
2.3 Elektroanalitik yöntemler.....	9
2.3.1 Voltametri.....	11
2.3.1.1 Dönüşümlü voltametri (DV).....	15
2.3.1.2 Diferansiyel puls voltametrisi (DPV).....	23
2.3.1.3 Kare-dalga voltametrisi (KDV).....	24
2.3.1.4 Bulk elektroliz(sabit potansiyelli kulometri).....	25
2.3.1.5 Sıyırma voltametrisi.....	26
2.3.1.6 Kronoamperometri (KA).....	29
2.3.1.7 Kronokulometri (KK)	31
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI	33
4. MATERYAL VE YÖNTEM	37
4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	37
4.2 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	37
4.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	39
4.3.1 Standart VSN çözeltileri.....	39
4.3.2 Destek elektrolit çözeltisi ve hazırlanışı.....	40
4.3.3 İlaç tabletlerinin analize hazırlanması.....	40
4.3.4 Serum numunelerin analize hazırlanması.....	41
4.3.5 İdrar numunelerin analize hazırlanması.....	41
4.3.6 Bulk elektroliz (BE) çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	41
4.4 Elektrokimyasal Deneylerin Yapılışı.....	42
5. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	43
5.1 Valsartan'ın Elektrokimyasal Davranışı	43
5.1.1 VSN'nin adsorpsiyon özelliği.....	47
5.1.2 pH'nın pik akımına ve pik potansiyeline etkisi.....	48
5.1.3 Aktarılan elektron sayısının bulunması	50
5.1.4 Difüzyon ve yüzey kaplama katsayısının bulunması	51
5.2 Voltametrik Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi.....	53
5.2.1 Cihaz parametrelerinin optimizasyonu	53

5.2.2 Yöntem parametrelerinin optimizasyonu	54
5.2.2.1 Biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi optimizasyonu.....	54
5.3 DPAAAdSV ve KDAAdSV Yöntemleriyle Elde edilen Kalibrasyon Grafığı ve Çalışma Aralığının Belirlenmesi	57
5.4 Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik ve Biyolojik Örneklerde Uygulamaları.....	59
5.5 Geliştirilen Elektroanalitik Yöntemlerin Validasyon Parametrelerinin İncelenmesi.....	65
5.5.1 Doğrusal çalışma aralığı.....	65
5.5.2 Doğruluk.....	66
5.5.3 Tekrarlanabilirlik.....	67
5.5.3.1 Aynı çözelti (gün içi) için pikin tekrarlanabilirliği.....	67
5.5.3.2 Farklı çözeltiler (günler arası) için pikin tekrarlanabilirliği.....	68
5.5.4 Kesinlik.....	70
5.5.5 Duyarlılık.....	70
5.5.6 Seçicilik.....	70
5.5.7 Gözlenebilme sınırı.....	71
5.5.8 Alt tayin sınırı.....	71
5.5.9 Sağlamlık.....	71
5.6 Farklı Yöntem Sonuçlarının ve Parametrelerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması.....	71
6. SONUÇLAR.....	74
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Elektrodun yüzey alanı, cm^2
BE	Bulk elektroliz, sabit potansiyelli kulometri
BP	Biriktirme potansiyeli
BR	Britton-Robinson tamponu
BS	Biriktirme süresi
C	Ana çözeltideki elektroaktif maddenin analitik derişimi, mol/cm^3 , mol/L
DV	Dönüşümlü voltametri
D	Difüzyon katsayısı, cm^2/s
DPA _{AdSV}	Diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametrisi
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
E	Uygulanan potansiyel, V
E^0	Standart potansiyel, V
E_p	Pik potansiyeli, V
E_p^a	Anodik pik potansiyeli, V
E_p^k	Katodik pik potansiyeli, V
F	Faraday sabiti, $96485 \text{ C}/\text{mol } e^-$
f	Uyarma sinyalinin frekansı, $1/\text{s}$
i_d	Difüzyon akımı, A
İnd	İndirgenmiş tür
i_p	Pik akımı, A
i_p^a	Anodik pik akımı, A
i_p^k	Katodik pik akımı, A
KDA _{AdSV}	Kare-dalga adsorptif sıyırma voltametrisi
KDV	Kare-dalga voltametrisi
KH	Karıştırma hızı, tur/s
N	Aktarılan elektron sayısı
Ss	Standart sapma
T	Mutlak sıcaklık, K
T	Zaman, s
YBSK	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
Yük	Yükseltgenmiş tür

A	Elektrot reaksiyonunun yük transfer katsayısı
Γ	Elektrot yüzeyine adsorbe olan madde miktarı, mol/cm ²
ΔE_a	Puls genliği, V
ΔE_i	Kare-dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin basamak yüksekliği
ΔE_p	Pik potansiyelleri arasındaki fark, V
ΔI	Net akım, A
ΔI_{puls}	Puls voltametrilerinde puls öncesi ve puls sonrası ölçülen akımların farkı, A
Π	Pi sayısı, 22/7
ν	Tarama hızı, V/s, mV/s

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	VSN molekülünün kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.2	Voltametrde kullanılan katı elektrotlar.....	12
Şekil 2.3	Camsı karbonun yapısı.....	13
Şekil 2.4	Elektrot üzerinde kütle aktarımı gösterimi	15
Şekil 2.5	a.Dönüşümlü voltametrde elektroda uygulanan gerilim b.Elde edilen akım-gerilim eğrisi.....	16
Şekil 2.6	Çalışma elektroduna uygulanan gerilim sonunda elde edilen dönüşümlü, dönüşümsüz ve yarı-dönüşümlü voltamogramı.....	17
Şekil 2.7	Tersinir bir elektrot reaksiyonun dönüşümlü voltamogramı.....	18
Şekil 2.8	Tersinmez bir elektrot reaksiyonunda DV' de tarama hızı artışı ile anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması.....	19
Şekil 2.9	Dönüşümlü voltametrde pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi.....	20
Şekil 2.10	a.DPV' de uygulanan potansiyelin zaman ile değişimi. b.DPV' de akım potansiyel eğrisi. c.DA' da akım-potansiyel eğrisi.....	24
Şekil 2.11	Kare dalga voltamogramı.....	25
Şekil 2.12	Sıyırma tekniklerinde potansiyel-zaman profili ve akım potansiyel eğrileri	26
Şekil 2.13	Sıyırma tekniği.....	27
Şekil 2.14	Adsorptif sıyırma voltametrisinin şematik gösterimi	29
Şekil 2.15	Kronoamperometride Potansiyel-zaman ilişkisi.....	30
Şekil 2.16	Kronoamperometride akım-zaman ilişkisi.....	30
Şekil 2.17	Kronokulometride yük-zaman grafiği.....	31
Şekil 4.1	Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan elektrotlar, çalışma ünitesi ve standı.....	38
Şekil 5.1	VSN'nin molekül yapısı.....	44
Şekil 5.2	Farklı derişimlerde VSN'nin, BR ortamında, CKE' de elde edilen dönüşümlü voltamogramları (v : 0,100 V/s, pH: 3,0).....	45
Şekil 5.3	0,3 mM EZE' nin, pH:3,0 BR ortamında CKE yüzeyinde farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları (İç grafik, anodik pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi).....	46
Şekil 5.4	0,3 mM EZE' nin BR ortamında CKE yüzeyinde farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen $\log i_p$ - $\log v$ grafiği (pH:3,0)	48
Şekil 5.5	Çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan kare dalga Voltamogramlarda pH-Ep ve pH -İp grafiği.....	50
Şekil 5.6	VSN'nin olası yükseltgenme reaksiyon mekanizması.....	52
Şekil 5.7	DPAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının pik potansiyeli İle değişimi.....	54
Şekil 5.8	KDAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının pik potansiyeli ile değişimi.....	55
Şekil 5.9	DPAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının biriktirme süresi ile değişimi (KH: 600 rpm, E_{bir} : 0,8 V).....	56

Şekil 5.10	KDAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının biriktirme süresi ile değişimi (KH: 600 rpm, E_{bir} : 0,2 V).....	56
Şekil 5.11	VSN'nin diferansiyel puls anodik adsorptif sıyırma voltamogramları (iç grafik: pik akımının VSN derişimi ile değişimi, pH: 3,0; E_{bir} : 800 mV, t_{bir} :60 s).....	58
Şekil 5.12	VSN'nin kare-dalga anodik adsorptif sıyırma voltamogramları (iç grafik: pik akımının VSN derişimi ile değişimi, pH:10,0; E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45 s).....	58
Şekil 5.13	DPAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri ile VSN içeren Diovan® tablet çözeltilerinin derişimle değişen pik akımları ve voltamogramları (pH: 3,0; CKE; DPAAdSV için E_{bir} : 800 mV; t_{bir} : 65 s; KDAAdSV için E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45).....	60
Şekil 5.14	a.Proteini çöktürülmemiş serum numunesine VSN eklenen ve daha sonra proteini çöktürülen örnek, b.Proteini çöktürülmüş serum numunesine VSN eklenen serum örneğinin DPAAdSV voltamogramları (C_{VSN} : $3,0 \times 10^{-6}$ M; pH: 3,0; CKE; E_{bir} : 800 mV; t_{bir} : 60 s).....	61
Şekil 5.15	a.Proteini çöktürülmemiş serum numunesine VSN eklenen ve daha sonra proteini çöktürülen örnek, b.Proteini çöktürülmüş serum numunesine VSN eklenen serum örneğinin KDAAdSV voltamogramları (C_{VSN} : $3,0 \times 10^{-6}$ M; pH: 3,0; CKE; E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45 s).....	61
Şekil 5.16	VSN tabletini içeren idrar çözeltilerinin derişimle değişen pik akımlarının diferansiyel puls anodik adsorptif ve kare dalga anodik adsorptif voltamogramları (pH: 3,0; CKE; DPAAdSV için E_{bir} : 800 mV; t_{bir} :65s;KDAAdSV için E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45).....	62
Şekil 5.17	DPAAdSV yöntemi için aynı günde yapılan ardışık ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 800 mV; t_{bir} : 60 s, pH: 3,0; C_{VSN} : $1,0 \times 10^{-6}$ M).....	67
Şekil 5.18	KDAAdSV yöntemi için aynı günde yapılan ardışık ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45 s, pH: 3,0; C_{VSN} : $1,0 \times 10^{-6}$ M).....	68
Şekil 5.19	DPAAdSV yöntemi için farklı günlerde yapılan ardışık ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 800 mV; t_{bir} : 60 s, pH: 3,0; C_{VSN} : $1,0 \times 10^{-6}$ M).....	69
Şekil 5.20	KDAAdSV yöntemi için farklı günlerde yapılan ardışık ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45 s, pH: 3,0; C_{VSN} : $1,0 \times 10^{-6}$ M).....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1	Kullanılan kimyasal maddeler.....	37
Çizelge 5.1	$3,0 \times 10^{-4}$ VSN çözeltisinin bazı pik parametrelerinin tarama hızı ile değişimi (DV, CKE).....	47
Çizelge 5.2	Voltametrik sıyırma yöntemleri için optimum cihaz parametreleri.....	53
Çizelge 5.3	Voltametrik sıyırma yöntemleri için optimize edilen yöntem parametreleri.....	57
Çizelge 5.4	Geliştirilen yöntemlerin tablet örneklerinde elde edilen sonuçları.....	59
Çizelge 5.5	KDAAdSV yöntemi ile idrar numunelerinde VSN tayininde doğrudan kalibrasyon yöntemi ile elde edilen bulgular.....	63
Çizelge 5.6	DPAAdSV yöntemi ile idrar numunelerinde VSN tayininde doğrudan kalibrasyon yöntemi ile elde edilen bulgular.....	64
Çizelge 5.7	Kalibrasyon parametreleri.....	66
Çizelge 5.8	Yöntemlerin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında kullanılan analitik veriler.....	72
Çizelge 5.9	Geliştirilen yöntemlerin UV spektroskopisi ile karşılaştırılması.....	73

1. GİRİŞ

Hipertansiyon toplumumuzda yaygın olarak görülen ancak hastalar tarafından çok iyi tanınmayan bir hastalıktır. Hipertansiyonun nedeni %90-95 hastada bilinmemektedir, yani hipertansiyon bilinen bir hastalığa bağlı değildir. Yüzde 5-10 hastada ise hipertansiyon başka bir hastalığa bağlıdır. İnsan vücudunda tüm organ ve dokularda damarlar bulunur. Su borularında basınç artışının nasıl bir tıkanma ve patlamalara yol açıyorsa, hipertansiyon da damarlarda patlamalara ve tıkanmalara yol açar. Hipertansiyondan en çok etkilenen organlar kalp, beyin, böbrekler, atardamarlar ve gözlerdir. Hipertansiyon bu organları etkileyerek kalıcı sakatlıklara ve ölümlere yol açabilir. Bu yüzden, hipertansiyon (tansiyon yüksekliği) için sessiz katil deniliyor.

Dünya erişkin nüfusunun yaklaşık dörtte birinde, 65 yaşın üzerinde ise üçte ikisinde hipertansiyon var (Peeters 2005). Yüksek tansiyon çok büyük oranda (%95'in üzerinde) genetik faktörlerin de içinde olduğu insan yapısına ait birden fazla faktörün bir arada bulunmasıyla oluşur. Küçük bir kısmından ise (%3-5) böbrek, damar veya hormon hastalıkları sorumludur.

Hipertansiyon tedavisinde çeşitli antihipertansif ilaçlar üretilmektedir. Günümüzde değişik gruplardan ilaçlar, birçok etki mekanizmasıyla hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Bu da hipertansiyon tedavisinde ilaç seçimini çok önemli hale getirmektedir. Hipertansiyon yönteminde hedef, kan basıncının ilaç tedavisi ile ideal sınırlarda tutulmasıdır. Yani ilaç tedavisi ile kan basıncını optimal düzeyde tutmaktır. Farmakoloji alanındaki gelişmeler sayesinde, günümüzde birçok farklı antihipertansif ilaçlar tedavi programlarında yer almaktadır.

Antihipertansif ilaçların vücuttaki etki mekanizmalarına göre birçok ilaç geliştirilmiştir ve geliştirilmeye de devam edilmektedir. Tabii burada geliştirilen ilaçlar için de birçok analitik yöntem vardır. Bunlar; atomik absorpsiyon, florometrik, kromatografik, gibi metotlarla analiz edilmektedir. Ancak bu metotlardan atomik absorpsiyon adından da anlaşılacağı gibi atomlarına parçalamadır ve bu da tahrip edici yani destructive bir metottur. Bir diğer örnek de kromatografik yöntem olan yüksek basınçlı sıvı

kromatografisidir. Bu analiz metodu da bir ön işlem olarak ekstraksiyona gerek duyması ve pahalı olmasından dolayı dezavantajları vardır. Bu yüzden geliştirilecek ilaç analiz metodunun tekrarlanabilir, ucuz, karmaşık olmayan, basit, daha duyarlı ve herhangi bir ön işleme gerek duymadan yeni bir alternatif yöntem geliştirilmeye ihtiyaç duyulmuştur.

Son zamanlarda elektrokimyasal olarak aktif olan ilaç etken maddelerin tayininde elektroanalitik bir yöntem olan, voltametrik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Voltametrik yöntemlerin gerekli bir ön işleme tabi tutulmaması, az madde ile tayinin mümkün olması, basit ve daha ucuz olması ilaç etken madde tayini için yapılan çalışmaları bu yöne kaydırmıştır.

Bu tez çalışmasında, antihipertansif bir ilaç olan valsartanın elektrokimyasal davranışının incelenmesi ve ilaç etken maddesinin nicel olarak tayini için voltametrik yöntem geliştirilmiştir. Bunun için elektrokimyasal davranışı dönüşümlü voltametri de, sabit potansiyelli kulometrik yöntemlerle de tersinirlik, aktarılan elektron sayısı, adsorpsiyon özellikleri, difüzyon katsayısı ve olası reaksiyon mekanizması gibi elektrokimyasal parametrelerinin belirlenmesi düşünülmüştür. Bu amaçla, pH, derişim, tarama hızı, biriktirme süresi, biriktirme potansiyeli gibi deneysel parametreler değiştirilip, en uygun optimize koşullar belirlenerek, nicel tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilecek yöntemlerin ilaç tabletlerine ve biyolojik örneklere uygulanabilirliği araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Elektroanalitik kimya, bir elektrokimyasal hücredeki analit çözeltisinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan nicel bir yöntemdir. Elektroanalitik yöntemler ile çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler (Izutsu 2002). Elektroanalitik teknikler özellikle modern puls tekniklerine, örneğin diferansiyel puls ve kare dalga, biyolojik ortamda çalışmada ve geniş çaplı ilaç tayinlerinde kullanılmaktadır. Bu voltametrik teknikler ilaçların yükseltgenme özelliklerini araştırmada en uygun yöntemdir. Bu bize in vivo çalışmalarda ilaç aktivite özelliğini vermektedir.

Antihipertansif ilaç madde tayinlerinde elektroanalitik yöntemlerden olan voltametri tekniği de son zamanlarda kullanılan yöntemdir. Bu antihipertansif ilaçlara hakkındaki bilgilere bakılacak olursa;

2.1 Antihipertansif İlaçlar ve Sınıflandırılması

Antihipertansif ilaçlara genel olarak bakacak olursak, altı ana başlık etrafında toplayabiliriz.

A. Diüretikler

- Tiyazidler ve ilgili ajanlar (hidroklorotiyazid, klortalidon)
- Loop ajanları (furosemid)
- Potasyum tutucu ajanlar (spironolakton, triamteren)

B. Kalsiyum Kanal Blokörleri (nifedipin, diltiazem, verapamil)

C. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) İnhibitörleri (kaptopril, enalapril, lisinopril)

D. Sempatolitikler

- Santral etkili ajanlar (klonidin, metildopa)
- Adrenerjik Blokörler (rezerpin, guanetedin)
- α_1 -Adrenerjik Antagonistler (prazosin)
- β - Adrenerjik Antagonistler (propranolol, nadolol, pindolol, metoprolol, labetolol)

E. Vazodilatörler (hidralazin, minoksidil, nitroprussid, diazoksit)

F. Anjiyotensin II Antagonistleri (sartanlar).

- Eprosartan(teveteni)
- İrbesartan (karvea)
- Kandesartan (atecand)
- Losartan (cozaar)
- Termisartan (micardis)
- Olmesartan
- Valsartan (diovan)

Biz bu tez çalışmasında kullanılan anjiotensin II reseptör antogonisti ailesine ait, valsartan üzerine duracağız.

2.1.1 Valsartan (VSN)

Şekil 2.1’de molekül yapısı verilen VSN, hipertansiyon(yüksek tansiyon) tedavisinde kullanılan trisiklik yapılu bir moleküldür. VSN (Diovan), anjiyotensin II reseptör antagonist grubu ilaçlardan biridir. VSN kan damarlarının daralmasını engelleyerek, kan basıncını düşürür ve kan akışını düzene sokar.

Kan basıncının düzenlenmesinde etkili olan hormon anjiotensinojendir. Anjiotensinojen kinin yolu ile anjiotensin I’e ve daha sonra (Anjiotensin dönüştürücü enzim) ACE ile anjiotensin II’ye dönüşmektedir. ACE inhibitörleri ACE’nin fonksiyonunu engelleyerek anjiotensin I’in anjiotensin II’ye dönüşümünü önlemektedir. Ayrıca ACE inhibitörleri bradikininin inaktif kininojene dönüşümünü sağlayan kinaz II’yi inhibe etmektedir. Artan bradikinin seviyesi prostoglandin sentezinde artışa, vazodilatasyona ve vasküler permeabilitede artışa neden olmaktadır. Böylece bradikinin seviyesinde artış ve kuvvetli bir vazokonstrüktör olan anjiotensin II oluşumunun engellenmesi ile ACE inhibitörlerinin antihipertansif etkileri ortaya çıkmaktadır.

VSN, anjiotensin I’i anjiotensin II’ye dönüştüren enzimi inhibe etmektedir. Yani, kan damarlarını daraltarak (büzererek) kan basıncının (tansiyonun) yükselmesine sebep olan ‘anjiyotensin II’ isimli maddenin vücutta üretimini engeller. Ayrıca, anjiyotensin

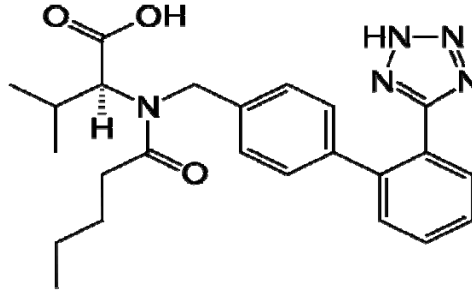
II'nin sebep olduğu vücutta sodyum ve su tutulumunu önleyerek de tansiyonun yükselmesine engel olur.

VSN, oral yoldan alınarak etki gösteren spesifik AT II reseptör blokörü olan bir antihipertansiftir. Anjiotensin II'nin, AT1 ve AT2 olmak üzere bilinen iki reseptör alt tipi mevcuttur. VSN diğer AT II reseptör antagonistlerinden farklı olarak, selektif biçimde AT1 reseptör alt tipini bloke eder. Valsartan anjiotensin I (AT I)'i AT II'ye dönüştüren Anjiotensin Dönüştürücü Enzimi (ADE) inhibe etmez, dolayısıyla bradikini arttırıcı etkisi yoktur. Valsartan'ın anjiotensin II tip 1 reseptörüne afinitesi anjiotensin II tip 2 reseptörüne olan afinitesinden yaklaşık 2000 kat daha fazladır. Bu sayede kan damarlarında gevşemeye ve kan basıncında düşmeye yol açmaktadır.

2.1.2 Fiziksel ve kimyasal özellikleri

Valsartan (VSN), kokusuz, yuvarlak şeklinde ve beyaz renkte bir tozdur. Etanol ve metanol de çok iyi çözünür, suda çok az çözünür. Erime derecesi 116 -117°C'dir. pK_a değeri 4.90 ± 0.09 dur (Cagigal ve González 2001).

Kimyasal yapısı



Şekil 2.1 VSN'nin molekül yapısı

Ticari adı	: Diovan
IUPAC adı	: (S)-3-metil-2-(N- {[2'-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)bifenil-4-yl]metil}pentanamido)bütanoik asit
Kapalı formülü	: C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃
Mol kütlesi	: 435.52 g/mol

2.1.3 Farmakolojik özelliği

VSN, yüksek kan basıncını engelleyerek, kan akışını hızlandırır. Valsartanın amlodipin, atenolol, simetidin, digoksin, furosemid, hidroklorotiyazid, indometazin ve varfarin ile birlikte kullanımında klinik açıdan önemli herhangi bir ilaç etkileşimi gözlenmemiştir. VSN önemli ölçüde metabolize olmadığından, sitokrom P450 sisteminin metabolik induksiyonu veya inhibisyonu şeklindeki klinik olarak önemli ilaç-ilaç etkileşimleri, valsartan ile beklenmez. VSN metabolizasyonundan sorumlu olan enzim tanımlanmamıştır. Yiyecekler ile birlikte alındığında, absorpsiyon oranı %50 ve absorpsiyon miktarı %40 düşer. Bu azalmaya, terapötik etkide klinik önemi olan bir azalma eşlik etmez ve bu yüzden de valsartan, yemeklerde veya aç karnına alınabilir.

2.1.4 Farmakodinamik özelliği

VSN, anjiotensin I (AT1) reseptörleri üzerinde etkili olan spesifik bir anjiotensin II (AT2) reseptör antagonistidir. Anjiotensin dönüştürücü enzimin (ADE, kininaz II)

katalizlediği reaksiyonda anjiotensin I, anjiotensin II'ye dönüşmektedir. Anjiotensin II, reninanjiotensin-aldosteron sisteminin en önemli baskılayıcı maddesidir. Bu madde vazokonstriksiyon sağlama, aldosteron sentezini ve salınmasını teşvik etme, kardiyak stimülasyon sağlama ve sodyumun böbreklerden geri emilimini sağlama gibi etkilere sahiptir.

VSN, oral yoldan aktif, güçlü ve spesifik bir anjiotensin II reseptör blokörüdür. Anjiotensin II'nin bilinen etkilerinden sorumlu olan anjiotensin I reseptör alt tipini selektif olarak etkiler. Böylece anjiotensin II'nin vazokonstriktör ve aldosteron salgılayıcı etkisini engeller. VSN ile AT1 reseptör blokajından sonra yükselen AT2 plazma seviyeleri, bloke olmayan ve AT1 reseptörlerin etkisini ortadan kaldırıyor gibi görünen AT2 reseptörleri stimüle eder. AT1 reseptöründe hiçbir kısmi agonist aktiviteye sahip olmayan VSN'nin bu reseptöre olan ilgisi, AT2 reseptörüne olan ilgisinden çok daha fazladır (yaklaşık 2000 misli).

VSN, anjiotensin I'i II'ye dönüştüren ve bradikini parçalayan, kininaz II olarak da bilinen, anjiotensin dönüştürücü enzimi (ADE) inhibe etmez. ADE etkili olmadığı ve bradikinin yıkımını inhibe etmediği için, bradikinin birikimine bağlı öksürük ve anjiödem gibi yan etkilere de neden olmaz. VSN'nin bir ADE inhibitörüyle karşılaştırıldığı klinik çalışmalarda kuru öksürük görülme sıklığı VSN grubunda, ADE inhibitörü kullanan gruba kıyasla anlamlı şekilde daha düşük olmuştur. ADE inhibitörü kullanırken kuru öksürük olan hastalar üzerinde yapılan bir klinik çalışmada, VSN kullanan hastaların %19'unda ve bir ADE inhibitörü alan hastaların ise, %68.5'inde öksürük görülmüştür.

Ayrıca, diğer hormon reseptörlerine veya kardiyovasküler düzenlemede önemli olduğu bilinen iyon kanallarına bağlanmaz veya bunları bloke etmez. Anjiotensin II'nin etkilerini bloke ederek kalp hızında önemli bir etki yaratmadan sistemik vasküler direnci düşürür.

Yani; VSN, kan damarlarını daraltarak (büzererek) kan basıncının (tansiyonun) yükselmesine sebep olan "anjiotensin II" isimli maddenin kan damarlarını daraltmasını engelleyerek çalışır, böylece tansiyonu düşürür ve kan akışını geliştirir.

Ayrıca VSN, anjiyotensin II'nin sebep olduğu vücutta sodyum ve su tutulumunu önleyerek de tansiyonun yükselmesine engel olur. (**antagonist:** Bir maddenin ya da sistemin etkisine karşı koyan, karşı etki gösteren, engelleyen ya da tersi yönde etki yapan etken (madde, ilaç)).

2.1.5 Farmakokinetik özelliği

VSN, oral yolla alındığı zaman aktif olan, spesifik bir anjiotensin reseptör antagonistidir. Ağızdan alınan VSN hızla emilir, ancak emilen miktar çok değişik olabilir. VSN içeren diovan için ortalama mutlak biyoyararlanım %23'tür. Emilen valsartan dozunun %83'ü feçes yoluyla, %13'ü idrar yoluyla değişikliğe uğramadan vücuttan uzaklaştırılır. Değişmemiş ilacın %20'si metabolitleri şeklinde elimine olur. Bunun %9'unu esas metaboliti olan valeril 4-hidroksi valsartan oluşturur. Ortalama eliminasyon yarı ömrü 6 saattir. VSN, başlıca serum albümini olmak üzere plazma proteinlerine yüksek oranda (%94-97) bağlanır. Kararlı durumdaki dağılım hacmi düşüktür (yaklaşık 17 L). Tekrarlanan kullanımda valsartanın farmakokinetiğinde değişiklik olmaz. Yarılanma ömrü 6 saat'tır.

2.1.6 Tedavi edici kullanımı(dozu)

Oral yolla günde önerilen dozu, hastanın ırkına, yaşına ve cinsiyetine bakılmaksızın günde 2 defa 80 mg'dır. Antihipertansif etki, 2 hafta içerisinde kendini gösterir ve 4 hafta sonra en yüksek düzeye ulaşır. Kan basıncı yeterince kontrol altına alınamayan hastalarda, antihipertansif etkinin artırılması istendiğinde, doktor tavsiyesi ile günlük doz en fazla 320 mg'a kadar yükseltilebilir veya bir diüretik eklenebilir. Valsartanın aşırı dozda kullanımı ile ilgili bir kesin veriye rastlanmamıştır. Aşırı dozda valsartan kullanılması bilinç kaybına, dolaşım kollapsı ve/veya şoka yol açabilen hipotansiyon, bradikardi, taşikardi ve hiperkalemi ile sonuçlanabilir. VSN, plazma proteinlerine yüksek oranda bağlandığından vücuttan hemodiyalizle uzaklaştırılması mümkün olmadığından, hasta ilacı yeni almışsa hemen kusturulmalıdır. VSN; rutubetsiz, kuru ve 25°C'nin altında ambalajında saklanmalıdır.

2.2 İlaç Analiz Yöntemleri

İlaç analiz yöntemlerinde toksik derişim seviyesi esas alınarak klinik çalışmalarda biyolojik ortamdaki tedavi edici ilaç dozunu belirlenmesinde kullanılır. Önceden ilaç analizlerinde yaygın olarak spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerden yararlanılırdı. Bu yöntemlerle yapılan ilaç analizlerinde numunelerin bir ön işleme tabi tutulması ve bu yüzden zaman alıcı olması farklı analiz yöntemleri geliştirme çabalarına girmiştir. Elektroanalitik yöntemler bu nedenlerden dolayı cihaz maliyetinin daha düşük, basit, hızlı ve duyarlı elektroanalitik yöntemler bu yöntemlerin alternatifi olarak ön plana çıkmaktadır. Bu elektroanalitik yöntemlerle analiz, ilaç etken maddelerine, serum, idrar gibi biyolojik numunelere duyarlı bir şekilde yapılmaktadır. Bu yüzden, elektroanalitik yöntem diğerlerine göre üstün olmasından dolayı, ilaç analizlerinde daha sıklıkla kullanılmaktadır.

2.3 Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik yöntemler; numunedeki analitin miktarı ile ilgili bir elektrik özelliğın ölçüldüğü metodlardır (Skoog vd. 1998). Elektroanalitik yöntemler çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler ve elektrokimyasal yöntemlerin uygulanabildiği sistemler hakkında; ara yüzeylerdeki yük aktarımının stokiometrisi ve hızı, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon ve kemisorpsiyonun derecesi, kimyasal reaksiyonlarının hız ve denge sabitleri gibi bilgileri de içeren çok fazla sayıda sistemi karakterize eden bilgiler verirler (Skoog vd. 1998).

Elektroanalitik yöntemler; ara yüzey elektrokimyasal yöntemler diye ikiye ayrılır. Net akımın sıfır olduğı denge durumundaki statik(durgun) yani $i=0$ yöntemler. Hiçbir zaman akım sıfır değildir, sadece elektrotlar arasında net bir akım geçmez ve elektrokimyasal hücredeki türlerin derişimi de değışmeden kalıyor. Devreden net bir akım yok. Yani; 10^{-9} A'lik akım geçiyorsa saniyede 10^{-9} A'lik akımda değışen 10^{-14} mol'luk analitte değışim oluyor. Bu yüzden akım çözelti ortamında derişimi değıştirecek düzeyde olmadığından ihmal ediliyor, durgun denmesinin de sebebi budur (Durmuş 2011).

Net akımın gözlemlendiği dinamik, yani akım sıfıra eşit değildir. Dinamik yöntemlerde kendi aralarında genel olarak potansiyel kontrollü ve akım kontrollü ikiye diye ayrılır. Potansiyel kontrollüye potansiyel kontrollü kulometri ve amperometri örnek verilebilir. Akım kontrollüye de akım kontrollü kulometri örnek verilebilir.

Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılmasına genel olarak bakılırsa en yaygın olarak kullanılan ve kabul görmüş sınıflandırma aşağıdaki gibidir (Kissinger 1996).

- A) Statik($i=0$) yöntemler
 - a) Seçici elektrotlar
 - b) Potansiyometri
 - c) Potansiyometrik titrasyonlar
- B) Dinamik yöntemler
 - a) Potansiyel kontrollü yöntemler
 - i. Kronoamperometri
 - ii. Kronokulometri
 - iii. Potansiyel kontrollü kulometri
 - iv. Voltametri
 - Hidrodinamik voltametri
 - Puls voltametri
 - Sabit elektrot voltametri
 - b) Akım kontrollü yöntemler
 - i. Kronopotansiyometri
 - ii. Kulometrik titrasyonlar
 - c) Yük kontrollü yöntemler

Bu tez çalışmasında, yukarıda bahsedilen voltametri yöntemi ile diferansiyel puls, dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametrisi ile VSN'nin elektrokimyasal davranışı ve tayini incelenmiştir.

2.3.1 Voltametri

Voltametri, vol-am(pero)-metri kelimesinden türetilmiş olup, elektrokimyasal bir hücreye uygulanan potansiyelin sonucu olarak kimyasal değişim nedeniyle hücreden geçen akımın ölçüldüğü tekniklerin genel adıdır. Başka bir şekilde de ifade edilirse; Voltametri, bir indikatör ya da çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanarak, analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik metotlara verilen isimdir. Elde edilen akım-potansiyel eğrisine *voltamogram* denir. Voltametri tekniğinde; yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinin kinetiğinin ve mekanizmasının incelenmesinde, yüzeydeki adsorpsiyon olayının araştırılması, kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeyinde cereyan eden elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması ve elektroaktif maddelerin tayinleri için kullanılan oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Voltametri, Çek kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında geliştirilen ve uygulanan polarografi tekniğine dayalı bir yöntemdir.

Voltametrideki sıyırma tekniği kullanarak eser miktarda bulunan maddelerin tayinlerinin gerçekleştirilmesi oldukça mümkün olmaktadır. Yapılan birçok çalışmada voltametri tekniği kullanarak, düşük maliyetli, yüksek doğruluk, ve kesinlikle duyarlı analizler yapılabileceği belirtilmektedir (Wang 2006).

Voltametri tekniğinde az maddeye ihtiyaç duyulması, düşük derişimlerde çalışılması, birden fazla numunelerin analizinin yapılabilmesi, analizlerin hızlı ve tekrarlanabilir olmasından dolayı diğer analitik yöntemlere göre üstündür.

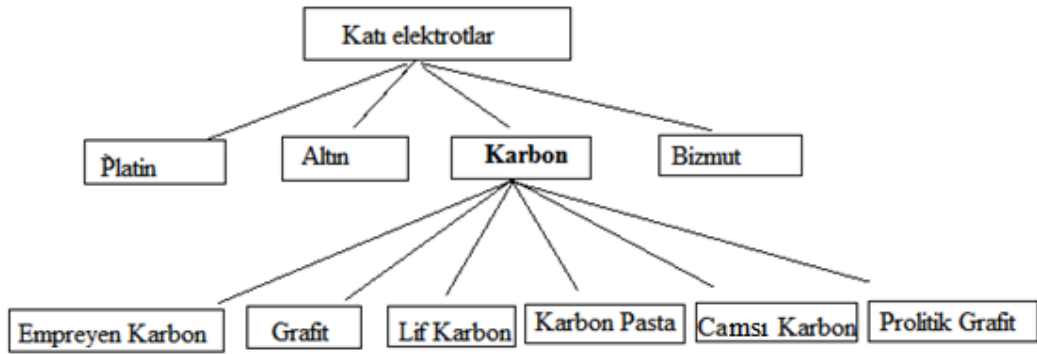
Voltametrimin çalışma prensibi; elektrokimyasal hücrede, polarize olabilen bir çalışma (indikatör) elektrodu ile karşılaştırma (referans) elektrodu arasına değeri zamanla değiştirilen potansiyel uygulanması sonucu ortaya çıkan akımın, üç elektrotlu hücrelerde çalışma elektrodu ile yardımcı (karşıt) elektrot, iki elektrotlu hücrelerde ise çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasından ölçülmesi ilkesine dayanır (Yıldız ve Genç 1993, Bond 1980).

Voltametri deneyleri üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirilir. Potansiyeli değişen elektrot, çalışma elektrodu veya çalışma elektrodudur. Çalışma elektrodu; incelenen elektrokimyasal olayın gerçekleştiği elektrottur ve işlevi elektrokimyasal ölçüm bölgesini oluşturmaktır. Çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesinden dolayı oluşan akıma *katodik akım*, yükseltgenmesinden dolayı oluşan akıma *anodik akım* denir. Voltametricte indikatör elektrot olarak; civa, platin, altın, paladyum, karbon elektrot(grafit, karbon pasta elektrot, camsı karbon) gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Voltametric metotta kullanılan çalışma elektrodu damlayan civa elektrodu (DCE) ise metot polarografi adını alır.

Genel anlamda bir çalışma elektrodu;

- ✓ İletken olmalı,
- ✓ Çalışılan potansiyel aralığında inert olmalı,
- ✓ Negatif potansiyel sınırı yüksek olmalıdır.

Voltametricte değişik tiplerde katı elektrotlar (Şekil 2.2) kullanılmaktadır. Voltametric çalışmalarda yaygın olarak kullanılan katı elektrotlar arasında bulunan camsı karbon elektrot, karbonun çeşitli formlarından oluşturulmuş bir elektrottur.

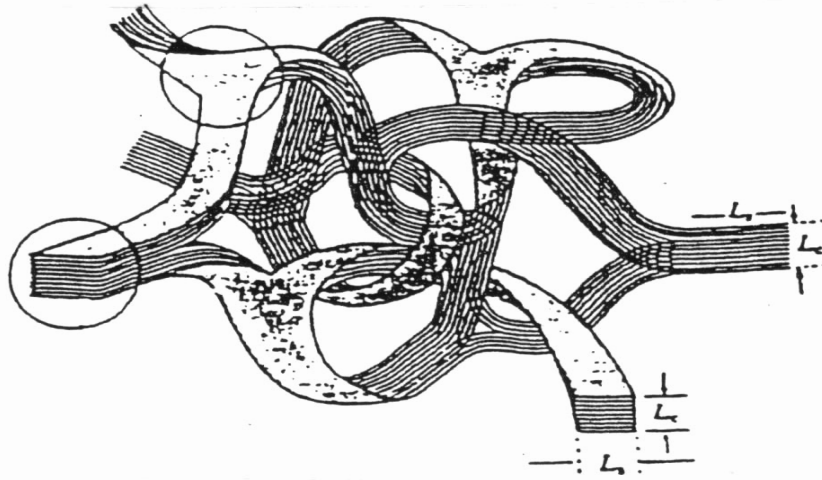


Şekil 2.2 Voltametricte kullanılan katı elektrotlar

Camsı karbon; diğer karbon yapılarından farklı fiziksel özellikler taşır. Yüzeyinde daha ufak gözenekler bulunur ve bu özelliğinden dolayı diğer karbon türlerine göre daha çok kullanılır. Yapılan pek çok çalışmada camsı karbon elektrottaki elektron transferinin metal elektrottakinden daha yavaş olduğu bulunmuştur. Camsı karbon elektrodun yapısı

ve özellikleri ile elektroanalitik kimyadaki kullanımı Van der Linden ve Dieker tarafından hazırlanan bir derlemede açıklanmıştır (Van der Linden ve Dieker 1986).

Camsı karbon elektrot materyali ilk defa Yamada ve Sato tarafından 1962 yılında geliştirilmiştir. Bu araştırmalar, camsı karbon elektrodu inert bir gaz içerisinde fenol formaldehit reçinesini çok dikkatli bir şekilde ısıtma sonucunda elde edilmiştir. Şekil 2.3'de camsı karbonun yapısını göstermektedir (Pravda 1998).



Şekil 2.3 Camsı karbonun yapısı

Potansiyeli deney süresince sabit kalan elektrot, referans elektrottur. Bu elektrot polarizlenmeyen elektrot olarak da tanımlanmaktadır. Referans elektrodun potansiyeli yeterince sabit olup, pil hücrelerinde potansiyeli ölçülen diğer elektrotlara kıyasla bir karşılaştırma görevi görür. Buradaki yeterince dememizdeki kasıt, potansiyelindeki değişim; akım, zaman ve değişkenlerdeki değişimlerden minimum etkilenmesidir. Referans elektrot olarak Ag/AgCl, doymuş kalomel elektrot (SCE) yaygın şekilde kullanılır.

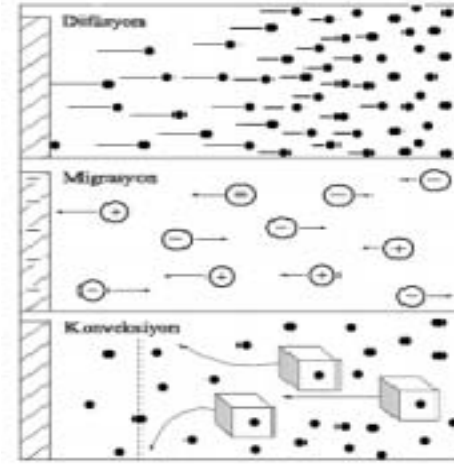
Yarı tepkime reaksiyonu: $AgCl_{(k)} + e^- \rightleftharpoons Ag_{(k)} + Cl^-$ (Erbil, 2004).

İdeal bir referans elektrot;

- ✓ Tersinir olmalı ve Nerst eşitliğine uymalı,
- ✓ Potansiyeli zamanla değişmemeli,
- ✓ Az miktarda akım geçmesi ile potansiyelinde değişme olmamalı,
- ✓ Potansiyeli, sıcaklık değişiminden fazla etkilenmemelidir.

Üçüncü elektrot, yardımcı elektrot, bir diğer ifadeyle karşıt elektrottur. İki elektrotlu sistemlerdeki polarlanmayan elektrot, üzerinden akım geçtiği için, yüksek akımlarda polarlanır. Ayrıca çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli olan potansiyel (IR) önemli bir düzeye çıkar. Bu iki nedenden dolayı çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyeli hatalı okunabilir. Bunun sonucu olarak $i = f(E)$ eğrileri yatıklaşırlar ve belirli bir noktadan sonra pikler kaybolur. Bu sorun, sistemde üçüncü bir elektrot kullanılarak çözümlenir. Akım, çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot ikilisinden geçirilir ve çalışma elektrodunun potansiyeli karşılaştırma elektroduna karşı sıfır akım altında saptanır. Görevi elektronlar için kaynak veya havuz oluşturmaktır ve böylece akımın geçmesi sağlanmaktadır. Akım yardımcı elektrot üzerinden geçtiği için bu elektrotların soy metal olmaları gerekir. Bu nedenle daha çok platin, grafit, tantal ya da tungsten tel çubuklar kullanılır.

Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine kütle aktarımı üç yolla olur (Şekil 2.4). Bu elektron aktarım yolları, elektriksel göç (migrasyon), difüzyon ve karıştırma (konveksiyon) olarak adlandırılır. Elektrokimyasal hücredeki katot ile anot arasındaki potansiyel farkı elektriksel bir alan oluşturur. İyonlar bu alanın etkisiyle ters yüklü elektrotlara doğru hareket etme eğilimi içine girerler ve böylece elektriksel göç adı verilen bir olayla madde aktarımı olur. İyonların elektriksel alandaki hareket hızları, iyon yüküne, büyüklüğüne ve çalışılan ortamdaki yönlenme biçimine bağlıdır. Deneysel koşullara bağlı olarak bu olaylardan birisi veya birkaçı kütle aktarımına katkıda bulunabilir. Hücredeki elektrotta tüketilen elektroaktif maddenin ara yüzeyde azalan derişimini arttırmak üzere, çözeltilen madde aktarımı olayı *difüzyon* adını alır. Difüzyonla kütle aktarımın hızı, ara yüzeyle çözeltinin iç kesimleri arasındaki derişim farkına ve elektroaktif madde ile çözücünün türlerine bağlıdır. Her maddeye özgü difüzyon hızını belirten bir difüzyon katsayısı (D), vardır. Çözeltinin karıştırıldığı durumlarda elektrot ara yüzeyine *konveksiyon* yolu ile de madde aktarılır.



Şekil 2.4 Elektrot üzerinde kütle aktarımı gösterimi

Voltametik yöntemler, elektrokimyasal hücreye zamana bağlı değiştirilebilen potansiyellerde uyarma sinyalleri uygulandığında, elde edilen karakteristik akım cevapları ve uyarma sinyallerinin dalga şekillerine bağlı olarak; polarografi, diferansiyel puls voltametri, kare dalga voltametri ve dönüşümlü voltametri gibi çeşitli yöntemlere ayrılır. Bu tez çalışmasında kullanılan çeşitli voltametik yöntemler aşağıda kısaca anlatılmaktadır.

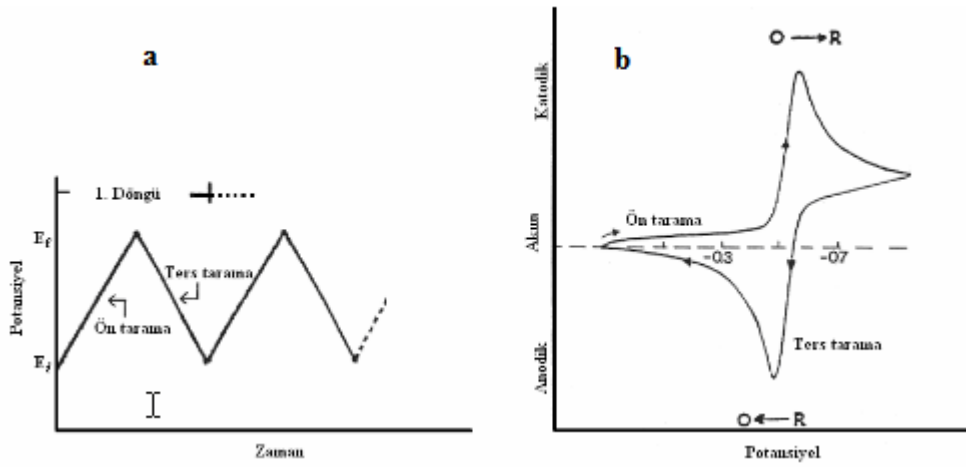
2.3.1.1 Dönüşümlü voltametri (DV)

Dönüşümlü voltametri yöntemi elektrokimyasal yöntemler içinde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde potansiyel, zamanla doğrusal olarak değiştirilir. Potansiyelin zaman ile değişmesi tarama hızı olarak adlandırılır. Dönüşümlü voltametri, çözültide ve çözülti-elektrot ara yüzeyinde elektroaktif türlerin incelenmesi açısından en uygun yöntemdir. DV, redoks tepkimelerin mekanizmalarını incelemek ve bileşiklerin redoks özelliklerini karakterize etmek için kullanılır. Elektrot tepkimelerinin dönüşümlü olup olmadıklarını ve elektrot yüzeyinde oluşabilecek adsorpsiyon tepkimelerinin türünü açıklamak için kullanılan bir tekniktir.

Dönüşümlü voltametri tekniğinde tarama hızı değiştirilerek pik yüksekliklerinin tarama hızı ile değişiminden adsorpsiyon, difüzyon ve elektron aktarım sayısına eşlik eden kimyasal reaksiyon olaylarının var olup olmadığı hakkında bilgiler edinilir.

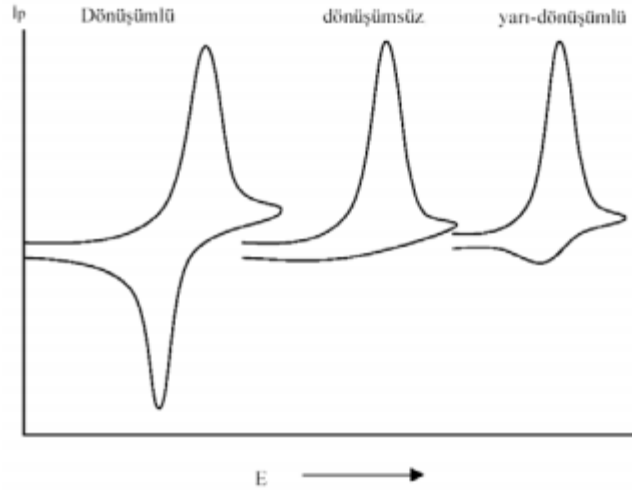
Dönüşümlü voltametri de ileri yönde tarama yapılırken madde indirgeni ise, bir katodik pik (E_p^k); geri yöndeki potansiyel taramasında bu indirgenmiş maddenin elektrotta tekrar yükseltgenmesinden dolayı bir anodik pik (E_p^a) gözlenebilir.

Çalışma elektroduna ileri ve geri yönde potansiyel taraması uygulandıında elde edilen akım potansiyel eğrisi bir dönüşümdür. Dönüşümlü voltametri de potansiyel- zaman ilişkisi ve elde edilen voltamogram grafiğı şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5.a.Dönüşümlü voltametri de elektroda uygulanan gerilim, b.Elde edilen akım gerilim eğrisi

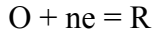
Dönüşümlü voltametri verileri ile bir elektrot tepkimesinin tersinirlik testi yapılabilir. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal tepkimeler elektrot yüzeyinde davranışlarına göre tersinir, tersinmez ya da yarı tersinir olarak adlandırılırlar (Şekil 2.6). Bunlar açıklanacak olursa;



Şekil 2.6 Çalışma elektroduna uygulanan gerilim sonunda elde edilen dönüşümlü, dönüşümsüz ve yarı-dönüşümlü voltamogramı

Tersinir reaksiyonlar

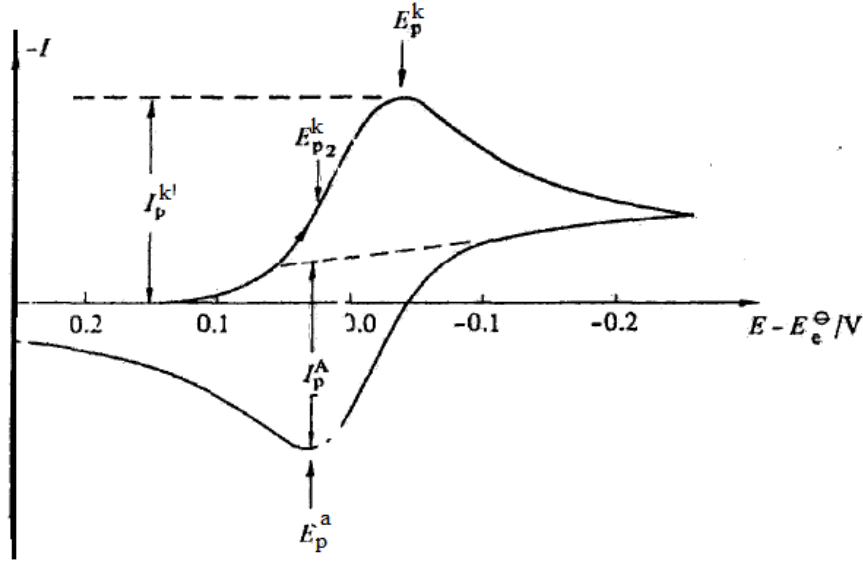
Elektrot reaksiyonu,



şeklinde ise ve başlangıçta çözeltilerde yalnız O maddesi bulunuyor, ayrıca elektron aktarımı dışında herhangi bir kimyasal reaksiyon bulunmuyor ve elektrot yüzeyinde adsorpsiyon olayı meydana gelmiyor ise $i - E$ grafiği pik şeklinde gözlenir ve tarama hızı arttıkça pik yüksekliği artar. Dönüşümlü voltametri de akımın maksimum olduğu noktadaki pik potansiyeli E_p olarak adlandırılır.

Potansiyel taraması geriye doğru yapıldığı zaman tarama hızlı ise elektrot yüzeyinde yeteri kadar R bulunacağından E_0 değerinden itibaren daha pozitif potansiyellerde R yükseltgenmeye başlayacaktır. Bu nedenle ters taramada anodik pik oluşacaktır. Ters tarama esnasında E_0 değerine kadar O indirgenmeye yani R oluşmaya devam edecektir. Ters taramada potansiyel pozitifleştikçe Nernst eşitliğine göre R yüzey konsantrasyonu azalacak ve yeteri kadar pozitif değerlerde sıfıra gidecektir. Ancak deney sırasında yüzeyde oluşan R, çözeltilere doğru difüzleneceğinden ters tarama akımı katodik akımdan biraz daha düşük olacaktır.

Tersinir $O + ne = R$ reaksiyonunun CV voltamogramı şekil 2.7’de verilmiştir



Şekil 2.7 Tersinir bir elektrot reaksiyonunun dönüşümlü voltamogramı

Tersinir bir pik için pik akımı (25 °C), Randles-Sevcik eşitliğiyle verilir (Eşitlik 2.1).

$$i_{p(ter)} = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} ACD^{1/2} v^{1/2} \quad (2.1)$$

Bu eşitlikteki terimlerin anlamı aşağıdaki gibidir.

- i_p : pik akımı, amper
- D : O türünün difüzyon katsayısı, cm^2 / s
- v : Tarama hızı, V / s
- C : O türünün ana çözelti konsantrasyonu, mol / cm^3
- n : aktarılan elektron sayısı

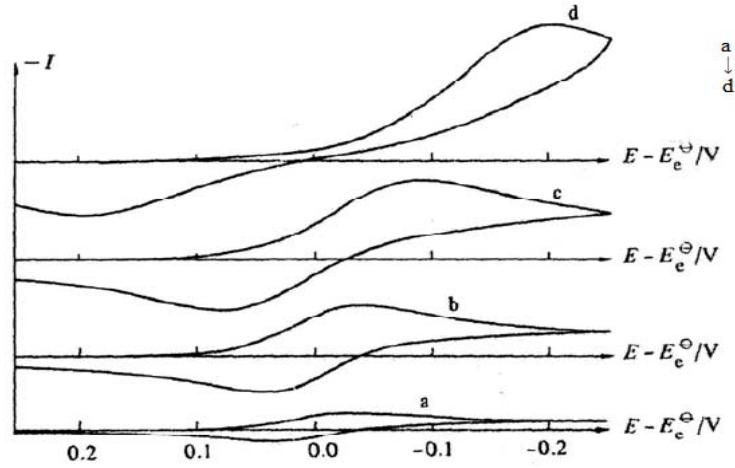
Dönüşümlü voltametri (DV) tekniği ile sistemin tersinirlik testi yapılabilir. Eğer $i_p - v^{1/2}$ doğrusalsa ve orjinden geçiyorsa sistem tersinirdir. Bunun için sistemin bazı kriterlere uyması gerekmektedir (Greef vd. 1990). Bu kriterler şunlardır:

1. $i_p - v^{1/2}$ grafiği doğrusal olmalıdır.
2. $E_{p_k} - E_{p_a} = 59/n$ mV veya $E_p - E_{p/2} = 57/n$ mV olmalıdır.
3. E_p , tarama hızı ile değişmemelidir.

4. $i_{p_a} / i_{p_k} = 1$ olmalı ve bu oran tarama hızı ile değişmemelidir.
5. E_p 'ten daha negatif potansiyellerde akım, $t^{-1/2}$ ile orantılı olmalıdır.

Tersinmez reaksiyonlar

Tersinmez sistemlerde elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerli değildir. Tersinmez durumlarda tarama hızı çok düşük ise, elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından daha yüksektir ve sistem tersinir gibi gözlenebilir. Tarama hızı arttıkça kütle aktarım hızı elektron aktarım hızı ile aynı seviyeye gelir. Bu durum tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması ile belli olur (Şekil 2.8). Tersinmez elektron aktarım reaksiyonlarında standart hız sabiti tersinir reaksiyonlardakine göre daha küçüktür. Tamamen tersinmez sistemlerde anodik pik gözlenmez. Anodik pik gözlenmeyişi her zaman sistemin tersinmez olduğunu ispatlamaz. Elektron aktarım basamağını takip eden çok hızlı kimyasal bir reaksiyon varlığında yani oluşan ürün, hızlı bir şekilde başka bir maddeye dönüştüğünde de anodik pik gözlenmeyebilir.



Şekil 2.8 Tersinmez bir elektrot reaksiyonunda DV'de tarama hızı artışı ile anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması

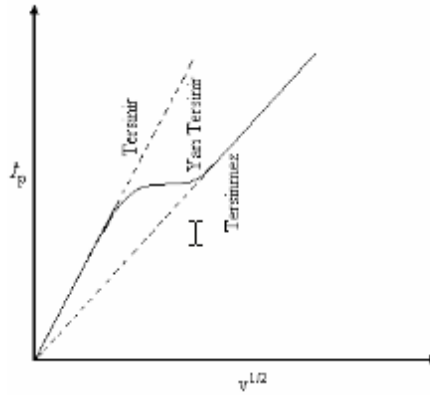
Kısacası, dönüşümlü voltametri ile tersinmez bir reaksiyonun tanıma kriterleri (Greef vd.1990).

1. Anodik pik gözlenmez.
2. i_p^k , tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olarak değişir.
3. E_p^k kayması tarama hızındaki 10 kat artmada $30/\alpha c n a$ kadardır.

4. $|E_p - E_{p/2}| = 48/(\alpha n a) \text{ mV}$ dur.

Yarı-tersinir reaksiyonlar

Yarı tersinir reaksiyonlarda akım, difüzyon hızı ve elektron aktarım hızı ile kontrol edilir. Tersinir, yarı tersinir ve tersinmez durumlar için akım- tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirilirse şekil 2.9'daki gibi bir grafik elde edilir.



Şekil 2.9 Dönüşümlü voltametri de pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi

Şekilden tarama hızındaki artış ile sistemin tersinir durumdan tersinmez duruma geçişi görülmektedir.

Dönüşümlü voltametri de bir reaksiyonun yarı tersinirlik kriterleri (Greef vd. 1990);

1. i_p , $v^{1/2}$ ile artar ancak doğrusal değildir.
2. E_p^k , tarama hızı ile değişir bu değişim genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.
3. $i_p^a / i_p^k = 1$ olmalıdır. ($\alpha = 0,5$ ise)
4. $E_p^k - E_p^a$ farkı düşük tarama hızlarında $59/n$ 'e yaklaşmalıdır.

CV tekniği ile elektron mekanizmasının belirlenmesi

EC mekanizması

EC mekanizmasında, elektrokimyasal basamağı bir kimyasal basamak takip etmektedir. EC mekanizması şematik olarak şöyle gösterilir.



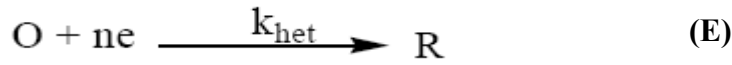
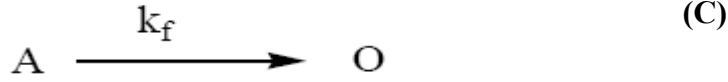
Elektrokimyasal reaksiyonun hız sabiti, heterojen hız sabiti adını alır ve k_{het} ile, kimyasal reaksiyonun hız sabiti ise k_f ile gösterilir. EC mekanizmasına göre tarama hızındaki artma ile katodik pik akımı artar ve pik potansiyeli negatife kayar. Yukarıdaki mekanizmaya göre yürüyen bir sistemde R türü, takip eden kimyasal reaksiyonun hızından etkilenmektedir. Eğer kimyasal reaksiyon hızlı ve tarama hızı düşük ise, R türü hızlı bir şekilde elektrot yüzeyinde kimyasal reaksiyon ile tüketilmekte ve bu nedenle anodik pik gözlenmemektedir. E basamağının tersinir olduğu durumlarda C basamağının hız sabiti büyük ise anodik pik yine gözlenmez. Fakat hız sabiti küçük ise anodik pik gözlenir. Tarama hızı arttırıldığında ise anodik pik ortaya çıkmaktadır.

EC mekanizması için testler aşağıdaki gibidir (Greef vd. 1990):

- 1) $|i_{pa} / i_{pk}| < 1$ 'dir. Ancak v arttıkça bu değer 1'e yaklaşmalıdır.
- 2) $i_{pk} / v^{1/2}$ oranı v artıkça çok az da olsa azalmalıdır.
- 3) E_{pk} , tersinir durumdakinden daha pozitif olmalıdır.
- 4) Artan v ile E_{pk} negatif bölgeye kayar ve saf kinetik bölge için v 'deki 10 kat artış 30/n mV kaymaya neden olmalıdır.

CE mekanizması

Bir elektrot reaksiyonunda elektrot aktarım basamağından önce elektroaktif maddenin oluşmasına yol açan kimyasal reaksiyonun bulunması CE mekanizması olarak adlandırılır ve reaksiyonu aşağıdaki gibidir.



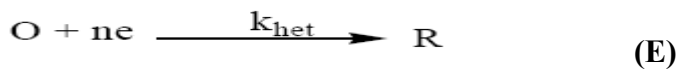
Bu eşitliklerde A, elektroaktif olmayan bir maddeyi ifade etmektedir. Bu maddenin elektrot yüzeyinde ne indirgendiği ne de yükseltgendiği kabul edilir. Elektroaktif tür O maddesidir. O ile gösterilen elektroaktif türün, indirgenmesi ile konsantrasyonu azalır ve kimyasal reaksiyon sağa doğru kayar. Böyle bir mekanizmada C basamağının hızı çok yavaş ve E basamağı tersinir ise DV de pik gözlenmez.

CE mekanizması kriterleri:

- 1) Tarama hızındaki artış E_p 'yi anodik yöne kaydırır.
- 2) Tarama hızındaki artış ile $i_p^k / v^{1/2}$ oranı azalır.
- 3) i_p^a / i_p^k oranı her zaman 1'e eşit veya birden büyüktür ve tarama hızındaki artış ile artar (Greef vd. 1990).

EC_{katalitik} mekanizması

Katalitik mekanizma, EC mekanizmasının özel bir halidir. Bu mekanizmada reaktif indirgendikten sonra bir kimyasal reaksiyonla tekrar oluşur.



Katalitik mekanizma için test kriterleri şunlardır (Greef vd. 1990)

1. $|i_p^k / v^{1/2}|$ oranı, v arttıkça azalmalıdır.
2. i_p^k , düşük tarama hızlarında sınır değere ulaşabilir.
3. i_p^k değeri Randles – Sevcik eşitliğinden beklenenden daha büyük olmalıdır.
4. $|i_p^a / i_p^k| < 1$ olmalıdır.

ECE mekanizması

ECE mekanizmasında birinci basamakta bir elektrokimyasal basamak gerçekleşmektedir. Bu basamağı bir kimyasal basamak takip eder. Sonra ikinci bir elektron aktarım basamağı tekrar meydana gelir.



ECE mekanizmasına göre yürüyen bir elektrot reaksiyonu aşağıdaki kriterlere uymalıdır (Greef vd. 1990).

- 1) $|i_p^k / v^{1/2}|$ değeri tarama hızı ile değişir. Ancak yüksek ve düşük tarama hızlarında limit değere ulaşır ve $|i_p^k / v^{1/2}|$ (düşük v) $>$ $|i_p^k / v^{1/2}|$ (yüksek v)'dir.
- 2) i_p^a / i_p^k oranı artan tarama hızı ile artar ve yüksek tarama hızlarında 1'e yaklaşır.

2.3.1.2 Diferansiyel puls voltametri (DPV)

Diferansiyel puls teknikleri birçok elektroaktif türün eser miktarlarının tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. En çok tercih edilen puls tekniği diferansiyel puls polarografisi veya voltametri olup, bu teknikte yavaşça yükselen bir doğru akım (DA) sinyali üzerine yükseklikleri sabit voltaj pulslarının biniştirilmesi ile oluşan uyarıcı sinyal kullanılmaktadır. Akım, pulstan önce ve pulsun sonuna doğru iki kere ölçülerek bunların farkı sinyal olarak kaydedilmektedir. Her bir analite ait yarı dalga potansiyeli;

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2$$

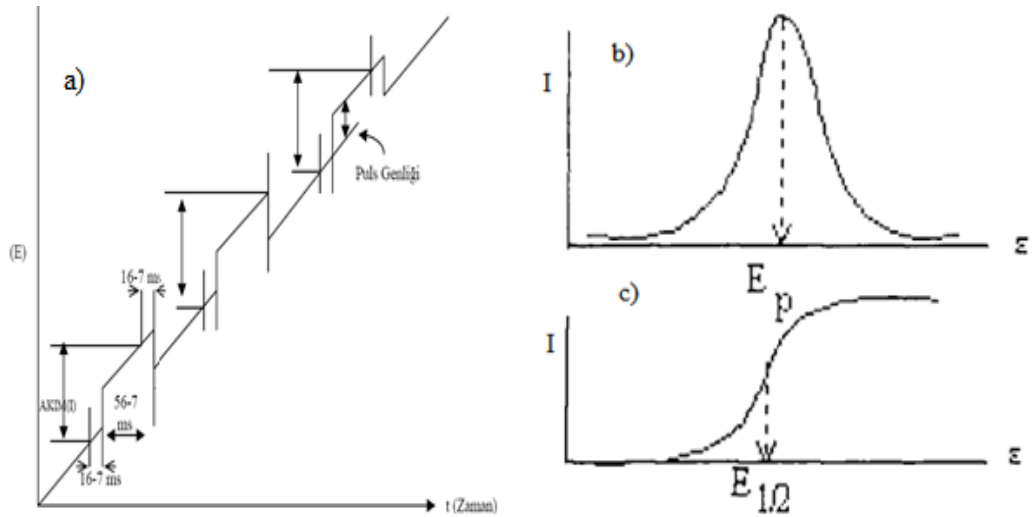
eşitliğinden hesaplanabilir. Burada, ΔE , puls genliğidir.

Voltamogramlardaki pik akımlarının yüksekliği, analit derişimi ile orantılıdır.

$$i_p = \frac{nFACD^{1/2}}{\sqrt{\pi t}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right)$$

Diferansiyel puls tekniğinin avantajı, akımın örneklendiği noktada kapasitif akımın minimum olmasıdır. Bu nedenle sinyal/gürültü oranı iyileştirilmiş olup, 10^{-8} - 10^{-7} tayinlerine imkan vermektedir.

Diferansiyel puls polarografisinde uygulanan potansiyel ve elde edilen pik şekil 2.10'da gösterilmiştir.

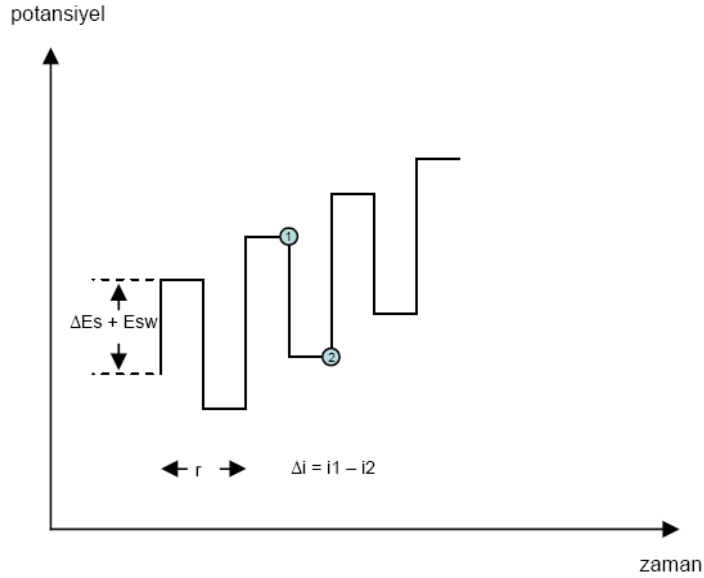


Şekil 2.10.a.DPV'de uygulanan potansiyelin zaman ile değişimi, b.DPV'de akım potansiyel eğrisi. c.DA'da akım-potansiyel eğrisi

2.3.1.3 Kare dalga voltametri (KDV)

Kare dalga voltametri, diferansiyel pulstan daha sık tercih edilen elektroanalitik yöntemdir. Kısaca SWV olarak gösterilir ve çalışma elektroduna uygulanan potansiyel, büyük genişlikli bir diferansiyel teknik olmasını sağlayan simetrik kare dalgalar şeklindedir. Basamakların üst üste biniştirildiği simetrik bir kare dalganın birleştirilmesiyle oluşan bir dalga şeklidir. Her bir kare dalga döngüsü boyunca, akım

iki kez ölçülür. Birincisi, ileri yöndeki pulsun sonunda (t_1) ikincisi ise geri yöndeki pulsun sonundadır (t_2). Bu iki akım arasındaki fark, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde kare dalga voltamogramı elde edilir (Şekil 2.11). İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 olmak üzere her bir kare dalganın net akımı $\Delta i = i_1 - i_2$ 'ye eşittir ve ileri fark akımı olarak adlandırılır.



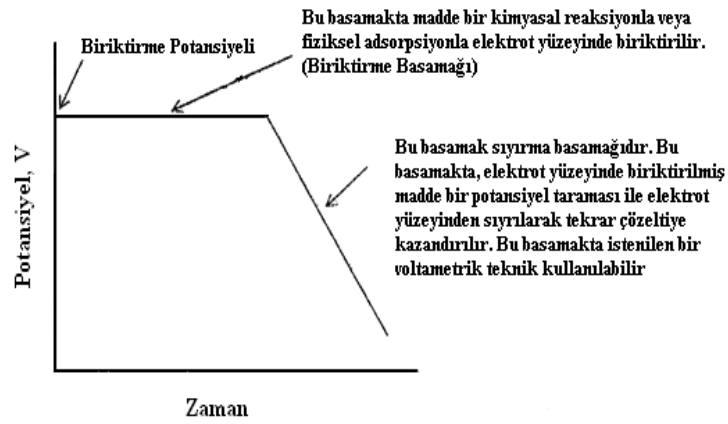
Şekil 2.11 Kare dalga voltamogramı

2.3.1.4 Bulk elektroliz (sabit potansiyelli kulometri)

Çalışma elektrodunun potansiyelinin sabit tutulup çözeltideki yükseltgenmiş Yük türünün, elektrot yüzeyinde tamamen indirgenerek İnd türüne dönüştüğü ve elektroliz süresince, Yük türünün derişiminin zamanla azalıp sıfıra yaklaştığı elektrolizdir (Izutsu 2002). Diğer yöntemlerdekinin aksine çalışılan elektrodun yüzey alanının oldukça büyük olduğu bir yöntemdir. Bir saat veya daha fazla zaman alabilir ve bu süre sonunda, elektroaktif türün derişiminin başlangıç derişiminin %1'ine ulaştığında elektrolizin tamamlandığı kabul edilir. Bulk elektroliz, yüzey alanının çözelti hacmine oranının oldukça büyük olduğu, yüksek akımlar ve uzun zaman skalasıyla karakterize edilen (Bard ve Faulkner 2001) ve deney sonunda devreden geçen toplam yük miktarını vererek elektrot reaksiyonunda aktarılan elektron sayısının hesaplanmasında kullanılan yöntemdir.

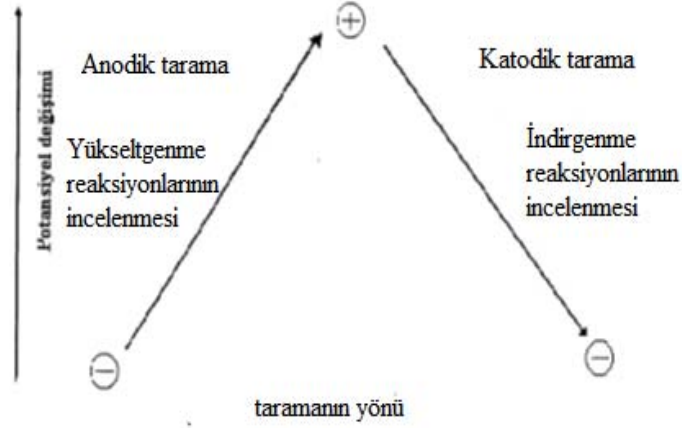
2.3.1.5 Sıyırma Voltametrisi

Çevre ve klinik örneklerdeki eser miktardaki elementlerin tayin etmek için geliştirilmiş yöntemdir. Sıyırma voltametrisi tüm elektroanalitik teknikler arasında tayin sınırı en iyi olan tekniktir. Analiz iki adımdan oluşur. Birinci adımda analit potansiyel kontrollü elektroliz ile elektrot yüzeyinde toplanır, ikinci adımda ise analit elektrot yüzeyinde uygun bir potansiyel taraması ile sıyırılır. Sıyırma tekniğinin şematik gösterimi aşağıda verilmiştir (Şekil 2.12)



Şekil 2.12 Sıyırma tekniklerinde potansiyel-zaman profili ve akım potansiyel eğrileri

İlk aşamada eser düzeydeki türler, uygun bir potansiyel altında elektrot yüzeyinde önderiştirilir. Ardından potansiyelin anodik veya katodik yönde taranması sonucu yüzeyde deriştirilen maddeye ilişkin akım-potansiyel eğrilerinden gidilerek analiz gerçekleştirilir. Önderiştirmenin niteliği ve sıyırma aşamasında potansiyelin taranma yönüne göre bu teknik farklı adlar alır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Sıyırma tekniği

Sıyırma yöntemleri birçok voltametrik yöntem ile kullanılmaktadır. Bunlardan en çok diferansiyel puls anodik sıyırma voltametrisi kullanılmaktadır. Bu yöntem ile oluşturulan daha dar pikler karışımların analizinde büyük kolaylık sağlar. Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi diferansiyel puls anodik sıyırma voltametrisine göre daha hızlı ve daha duyarlıdır.

Sıyırma yöntemleri anodik sıyırma, katodik sıyırma, adsorptif sıyırma ve potansiyometrik sıyırma olarak dört şekilde uygulanabilir. Bunlardan ilk üçü voltametrik yöntem iken potansiyometrik sıyırma adından da anlaşılacağı gibi voltametrik değildir.

Anodik sıyırma voltametrisi

En yaygın kullanım alanı bulan bu teknikte, çözeltideki metal iyonlarının bir kesimi yeterince negatif potansiyel altında elektrot yüzeyinde metalik olarak önderiştirilir ve ardından potansiyel anodik (+) akım değişimi izlenir. Bir başka deyişle metalik halde elektrot yüzeyinde toplanan maddenin yüzeyden anodik çözünmesi söz konusudur.

Sıyırma analizi ile elde edilen belirtme sınırının çok düşük olması önderiştirme bir başka deyişle biriktirme aşamasında önelektrolizle zenginleştirme olayına bağlıdır. Önelektroliz olayı önderiştirme tekniklerinden farklı olarak çözelti ortamındaki türün

yüzde birinden az bir kesiminin yüzeyde toplanmasını öngörür. Önderiştirme işleminin yürütüldüğü biriktirme aşamasında genellikle karıştırılan çözeltilerde ve belli bir potansiyel altında çalışılır. Bu aşamada kullanılacak elektrodun yüzeyi; saptanacak türün küçük bir hacimde toplanıp, deriştirilebilmesi için olabildiğince küçük olmalıdır.

Katodik sıyırma voltametrisi

Sıyırma yöntemi ile analiz, metal iyonlarından başka elektrot yüzeyinde çözünmeyen bir katyon oluşturan örneklerle de uygulanabilir. Potansiyel tarama yönüne katodik sıyırma adını alan bu yöntemde önce elektrot olarak kullanılan metalik civa ya da gümüşün yükseltgenmesi, ardından halojenürler, molibdat ve tungstat iyonlarının ve tiyol grubu içeren organik moleküllerin çözünürlüğü az olan bir tuzu biçiminde yüzeyde toplanması sağlanır. Daha sonra potansiyel negatif yönde taranarak, az çözünen tuzun bileşimindeki metal iyonunun indirgenmesine ilişkin akım geçişi izlenir. Aşağıda bu aşamalara ilişkin tepkimeler verilmiştir.

Biriktirme aşaması;



Sıyırma aşaması;

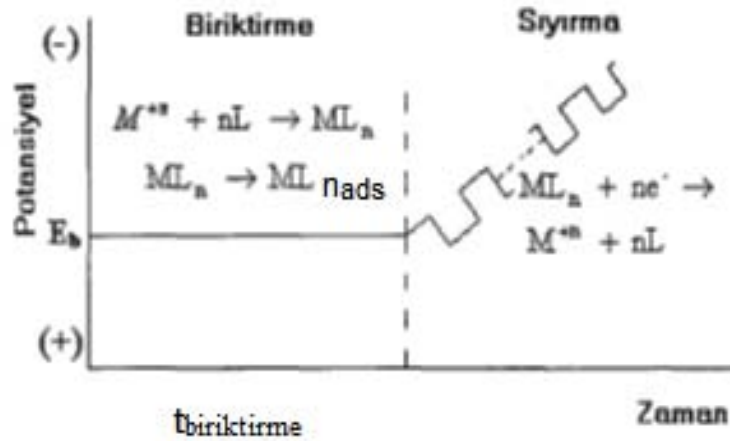


M: Hg , Ag gibi metaller, **Aⁿ⁻:** S²⁻, Cl⁻, Br⁻, CN⁻, organik SH bileşikleri olabilir.

Adsorptif sıyırma voltametrisi

Adsorptif sıyırma voltametrisi anodik ve katodik sıyırma yöntemlerine benzemektedir. Ancak elektroaktif türün elektrot yüzeyine birikmesi elektrolitik olarak değil fiziksel adsorpsiyon ile meydana gelmektedir. Analit biriktirildikten sonra bir Voltametrik yöntem ile analiz tamamlanır. Adsorptif sıyırma voltametrisi organik ve anorganik

maddelerin çok düşük derişimlerinin tayininde kullanılır. Genellikle elektroaktif tür dimetilglioksim ve bipyridin gibi yüzey-aktif kompleksleştiricilerle kompleksleri haline dönüştürülür. Adsorpsif sıyırma voltametrisinde ligandların metal kapasitelerine göre iki veya üç metal belirlenebilir. Aşağıdaki şekilde adsorptif sıyırmanın şematik şekli gösterilmektedir (Şekil 2.14).



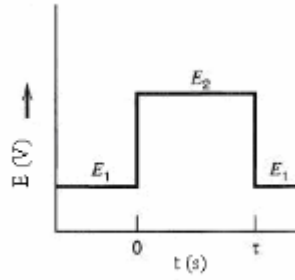
Şekil 2.14 Adsorptif sıyırma voltametrisinin şematik gösterimi

Adsorptif toplamanın iki üstünlüğü vardır. Birincisi metalin herhangi bir değerliğinin toplanabilir olmasıdır. İkincisi ise analitin elektrot yüzeyinde monomoleküler olarak toplanabilmesidir. Bu nedenle indirgeme akımı etkin türlerin difüzyonundan bağımsızdır. Çok hızlı tarama teknikleri uygulanabilmektedir.

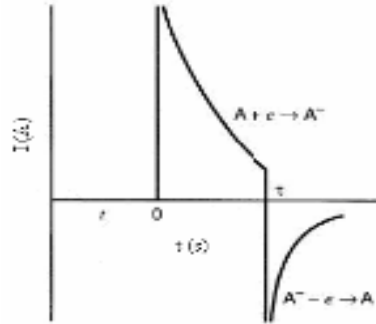
2.3.1.6 Kronoamperometri (KA)

Bu teknik, çözeltiye daldırılmış olan çalışma elektrodu potansiyelinin ani olarak değiştirilmesi ile durgun ortamda akım–zaman ilişkisinin gözlenmesine dayanır. Başlangıçta çözeltide O maddesinin olduğu ve $O + ne \rightarrow R$ reaksiyonunun gerçekleştiği durumda, öncelikle çalışma elektroduna herhangi bir redoks reaksiyonunun olmadığı E_1 potansiyeli uygulanır. Sonra aniden elektrodun potansiyeli E_2 'ye değiştirilir. DV voltamogramının pik potansiyelinin ötesinde bir potansiyelde E_2 potansiyeli seçilir. Potansiyel E_2 de sabit tutulur. Bu potansiyelde oluşan akımın zamanla değişimine

bakılır (Şekil 2.15). Potansiyel- zaman grafiği de (Şekil 2.16) aşağıda verilmiştir. Oluşan akım Cottrell eşitliği ile verilir.



Şekil 2.15 Kronoamperometride potansiyel-zaman ilişkisi



Şekil 2.16 Kronoamperometride akım-zaman ilişkisi

$$I = \frac{nFD^{1/2}C_o}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

Cottrell eşitliğinden de görüldüğü gibi akım $t^{-1/2}$ ile doğru orantılı olarak değişir. I değerleri $t^{-1/2}$ 'ye karşı grafiğe geçirildiğinde orijinden geçen bir doğru elde edilir.

Kronoamperometri tekniği kullanarak; Bir maddenin difüzyon katsayısı bulunabilir,

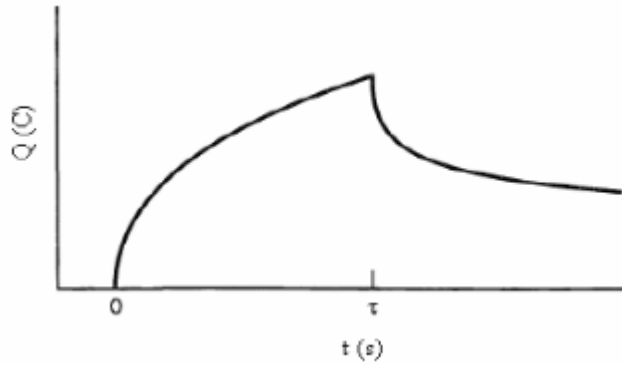
- Elektron aktarım reaksiyonunu hız sabiti hesaplanabilir,
- Elektrotta bir adsorpsiyon meydana gelip gelmediği belirlenebilir,
- Elektrot reaksiyonunun mekanizması belirlenebilir,
- Elektron aktarım basamağına eşlik eden bir kimyasal reaksiyonun hız sabiti bulunabilir.

2.3.1.7 Kronokulometri (KK)

Kronokulometri tekniğinde kronoamperometrideki akım – zaman ilişkisi yerine yük – zaman ilişkisi incelenir. Deney süresince oluşan akım zamana karşı grafiğe geçirilir. Matematiksel metotla bu grafiğin integralinin alınması sonucunda toplam yük bulunur. Toplam yük ile zaman arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlikte verilmiştir.

$$Q(t) = \frac{2nFAD_0^{1/2}C_0t^{1/2}}{\pi^{1/2}}$$

$Q-t^{1/2}$ grafiğinin eğiminden elektrot reaksiyonunda aktarılan elektron sayısı ve difüzyon katsayısı hesaplanabilir. Şekil 2.17’de kronokulometride yük-zaman ilişkisi verilmiştir.



Şekil 2.17 Kronokulometride yük-zaman grafiği

Elektrot üzerine iletken madde adsorplanmışsa, elektrot yüzeyine adsorbe olmuş madde ve çift tabakada biriken yükleri de göz önüne almak gerekir. Bu durumda eşitlik aşağıdaki gibi olur.

$$Q(t) = \frac{2nFAD^{1/2}C t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + Q_{dl} + nF\Gamma$$

Bu eşitlikte;

$Q(t)$: Difüzyonla elektrot yüzeyine ulaştıktan sonra indirgenen maddenin yük miktarı,

Q_d : Çift tabakada biriken yük miktarı, C

- nFA Γ : Adsorbe olan X maddesinin indirgenmesi sonucunda oluşan Coloumb cinsinden yük miktarı
- n : Aktarılan elektron sayısı, e⁻/mol
- F : Faraday sabiti, C/mol
- A : Elektrodun yüzey alanı, cm²
- C : Ana çözeltideki X maddesinin derişimi
- D : X maddesinin difüzyon katsayısı, cm²/s
- Γ : Elektrot yüzeyine adsorbe olmuş X maddesinin mol/cm² birimli derişimi

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Önemli ilaç sınıfından olan Valsartan'ın elektrokimyası ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Ancak adsorptif anodik sıyırma yöntemleriyle tayini konusunda herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Ayrıca, Valsartan'ın biyolojik sıvılardaki miktar tayininin yapılması çok önem arz etmektedir. Farmakokinetik çalışmalarını desteklemek için yeterince hızlı ve uygun analitik yöntemlere ihtiyaç vardır. Literatürlerde valsartanın tayini ile ilgili bazı yöntemler; HPLC, sıvı kromatografisi olarak bulunmaktadır. Valsartan ile ilgili çalışmalar kısaca aşağıda özetlenmiştir.

Demiralay vd. (2010) çalışmalarında, anjiotensin reseptör antagonisti(ARA II) olan; irbesartan, losartan, valsartan ve telmisartanın yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak (HPLC) bunların alıkonma faktörlerinin davranışları; hareketli fazın polaritesinin etkisi ve farklı pH'lardaki hareketli fazların etkileri araştırılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril-su karışımı kullanılmıştır. Hareketli faz için %50 ile %60 arasında değişen oranlardan yararlanılarak ayrımlar yapılmıştır. Bu amaçla HPLC analizi; 20µL numune girişli, C₁₈ kolon(150mmx4.6mm, 5µm), diyot dedektör kullanılmıştır. Analiz 30°C'de gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda en iyi ayırmanın pH=4'de ve 7 dakikada olduğu belirlenmiştir. Anjiotensin reseptör antagonistlerin alıkonma faktörleri, teorik tabaka sayısı ve seçicilik katsayısı gibi parametreler hesaplanmıştır. Alıkonma faktörleri telmisartan, losartan, irbesartan ve valsartan için sırasıyla; 1,12; 1,43; 1,67; 2,72 olarak bulunmuştur. Buradan anlaşılacağı gibi ARA II'lerin birlikte ayrılması mümkün olmaktadır. Geliştirilen metot ilaç aktif bileşiklerin aynı anda ayrılmasında ve ticari ilaçların tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Brunetto vd (2009) çalışmalarında, yüksek performanslı sıvı kromatografisi(HPLC) metodu ile insan idrarındaki valsartan, losartan ve telmisartanın nicel tayinini geliştirmişlerdir. Analiz için önce idrar numuneleri hareketli faz(1:4, v/v) ekstrakte edildi. Analitler katı-faz ekstraksiyonu kullanılarak girişim yapan bileşikler ayrıldı (ekstraksiyona hareketli faz: C₁₈ alkil-diol 25µm iç çaplı kolonda pH 3.8 de 5mmol/L⁻¹ fosfat tamponu içinde %2'lik metanol varlığında gerçekleştirildi) ve bu karışımdan 20µL alınıp direkt olarak HPLC sistemine enjekte edildi. Analitler 259 nm ve 399 nm

dalga boyunda floresans dedektör ile 5mM fosfat tamponu (pH 3.8)-asetonitril-metanol (65:20:15, v/v/v) hareketli fazlı, dakikada 3ml akış hızına sahip olacak şekilde HPLC sistemine enjekte edildi. Losartan, telmisartan ve valsartanın ayırımı Chromolith RP-18e monolitik kolonda gerçekleştirildi. Analiz sonucunda losartan, valsartan ve telmisartanın alıkonma zamanları sırasıyla 5.2 dak, 5.8 dak, ve 7.3 dak'dır. Gün içi ve günler arası kabul edilir sonuçlar elde edildi, gün içi çalışmalarda katsayı değişimi %3.7'den küçük; günler arası ise katsayı değişimi %3.5'den küçüktür. Tahmin edilen kalibrasyon aralığı iyi bir tayin katsayısı (>0.9981) ile 0.001-2.5µg/ml'dir. 5:1 sinyal:gürültü oranında Losartan, telmisartan ve valsartanın tayin sınırı sırasıyla 0.002, 0.0002 ve 0.001 µg/mL'dir. Önerilen metot 8 dakikada insan idrarındaki anjiyotensin II antagonisti olan losartan, valsartan ve telmisartanın aynı anda tayin edilebileceğini gösterdi.

Bayır vd. (2008) çalışmalarında, Valsartan ve hidroklorotiazit'in aynı anda analizi için bir ultra performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile incelenmiştir. Bu yöntemde; bir ters-faz kolonu (Acquity UPLC BEH C₁₈, 2.1x50 mm 1.7 µm) 0,4 ml/dk akış hızındaki asetonitril NaH₂PO₄ tampon (pH:2,5) gradient karışımından oluşan bir hareketli faz ile 280 nm dalga boyunda iki bileşiğin ayrılması için kullanılmıştır. Kromatografik ayırım 25°C'de yapılmıştır. Geliştirilen yöntem kısa bir süre içerisinde valsartan-hidroklorotiazitin iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır. Bu şartlar kullanılarak, valsartan için 2,266 dk; hidroklorotiazit için 1,084 dk alıkonma zamanı elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini ve uygulanabilirliğini göstermek için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Geri kazanımda sonuçlar yaklaşık olarak %99,4-%101,59 arasında çıkmıştır. Geliştirilen ultra performans sıvı kromatografisi çalışması, hammaddede ve farmasötik formülasyonlarda valsartan ve hidroklorotiazitin aynı anda tayini için geliştirilmiş olan yöntem hızlı, basit, yüksek kesinlik ve doğruluktadır.

Jinlong Yan vd. (2008) çalışmalarında, valsartanın civa film elektrotta (MFE), elektrokimyasal davranışını ve kapsül içindeki tayinini; dönüşümlü, doğrusal tarama, diferansiyel puls ve kare dalga voltametri ile incelenmiştir. Bu çalışmalarında HOAc-NaOAc, KH₂PO₄-K₂HPO₄ ve B-R gibi değişik tampon çözeltiler kullanılmış. Ama en iyi sinyalin gözlemlendiği B-R destek elektrolit çözeltisi ile pH 7,0'da gerçekleştiği

görülmüştür. Karşıt elektrot olarak platin tel, referans elektrot olarak da doymuş kalomel elektrot (SCE) kullanılmıştır. Diferansiyel puls adsorptif sıyırmaya göre optimum cihaz şartları; biriktirme potansiyeli 0.1 V, 50 mV puls genliği, 4 mV potansiyel artış, puls periyodu 0.2 s ve 0.05 puls genişliği. Kare dalga adsorptif sıyırma için deneysel şartlar: 25 mV puls genliği, 4 mV potansiyel artış, biriktirme potansiyeli 0.1 V, ve 25 Hz frekans şeklinde belirlenmiştir. Dönüşümlü voltametri ile pH 7,0 de 30 sn'lik biriktirme zamanı ile en iyi indirgenme pikinin 0.3 V'da bir katodik pik olduğunu ve anodik pike gözlenmediğini ve tersinmez bir reaksiyon olduğunu göstermiştir. ilk taramadan sonraki akımın daha sonraki diğer taramadaki akımlara göre yüksek olduğu yani aynı derişimlerde ve aynı tarama hızında art arda yapılan ilk taramaya göre akımın azaldığını buda valsartanın civa film elektrotta elektrokimyasal davranışının adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermiştir. Diferansiyel puls ve kare dalga voltametri için doğrusal çalışma aralığı 6×10^{-8} ile 4×10^{-6} aralığında olduğu tespit edilmiştir. Önerilen bu metotla yöntemin doğruluğu için ticari valsartan(kapsül içindeki) geri kazanım çalışmaları yapılmış ve yaklaşık olarak %100,5'lik bir geri kazanım değeri elde edilmiştir. Ancak biyolojik numunelere uygulanmamıştır.

Koseki vd. (2007) çalışmalarında, sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi(LC-MS/MS) ile insan plazmasındaki valsartanın nicel tayini için bir metot geliştirdiler. Bunun için yüksek performanslı sıvı kromatografik için C₁₈ tipi 2.1 mm x 50 mm, 3.5 µm kolon, hareketli faz olarak %0.1 trifloroasetik asit/metanol/asetonitril (45/30/25, v/v/v), akış hızı 0.2 ml/dak ve 50°C kolon sıcaklığıdır ve analiz izokratik yöntemle gerçekleştirildi. Kütle spektroskopisi için bir elektrosprey iyonlaştırıcı bir arayüzlü donanımlı TSQ700 üçlü dörtkutuplu cihaz kullanıldı. İnsan plazmasındaki valsartan katı faz ekstraksiyonu ile ekstrakte edildi ve plazma bileşiminde herhangi bir girişim yapan madde olmadan Analit için kalibrasyon aralığı: 2-2000 ng/ml olarak tespit edildi. Metot başarılı bir şekilde valsartanın klinik çalışmalarında ve Farmakokinetik uygulaması için plazma konsantrasyondaki tayini için etkili bir şekilde araştırıldı. Gün içi ve günler arası kesinliği %5.7 den daha az olduğu ve yöntemin doğruluğu için geri kazanım çalışmaları da %97.2 ile %105 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Jingkai vd. (2007), insan kanındaki valsartan(VSN) ve hidroklorotiazit'in(HCT) aynı zamanda tayini için hızlı ve duyarlı bir sıvı kromatografisi/kütle spektroskopisi (LC/MS/MS) metodu geliştirilmiştir. Bunun için asetonitril kullanılarak proteinler çöktürüldükten sonra, analitler 1.2 mL/dak akış oranında, hareketli faz olarak asetonitril–10mM amonyum asetat (60:40, v/v, pH 4.5) kullanılarak, Zorbax SB-Aq C₁₈ (150mm-4,6mm) tipi kolonda ayırmalar gerçekleştirilmiştir. Valsartan ve hidroklorotiazit sırasıyla 2.08 ve 1.50 dakikada, ESI kaynağı kullanılarak iyonize edilip, ayırma işlemi gerçekleştirildi. İyon geçişinde valsartan ve hidroklorotiazit için sırayla; m/z 434.2–350.2 ve m/z 295.9–268.9 kullanıldı. VSN için $y = 0.0174x + 0.0106$, $r = 0.9982$, HCT için; $y = 0.00272x + 0.00114$, $r = 0.9988$ denklemi elde edildi. Buradan VSN ve HCT için çalışma konsantrasyonu sırayla 1–900 ng/mL, 4–3600 ng/mL olarak belirlendi. Önerilen yöntem ile 80 mg valsartan için ve 12.5 mg hidroklorotiazit için farmakokinetik çalışmalar başarı ile yapılmıştır.

Macek vd. (2006) çalışmalarında, protein çöktürme yöntemi ile insan plazmasındaki valsartanın tayini yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile incelenmiştir. Sıvı kromatografisi, ayırma için oktadesilsilika (C₁₈) tipi kolon (50 mm x 4 mm, 5 µm tanecikli) kullanılmış, hareketli faz olarak asetonitril ve 15 mM dihidrojen potasyum pH 2.0 (45:55, v/v) kullanılmıştır. Alıkonma zamanı 2.8 dakikadır. Florimetrik detektörde 234/374 dalga boyuna sahiptir. Kantitatif tayin sınırı plazmadan 0.2 ml kullanılarak 98 ng/ml olarak gözlenmiştir. Bağlı standart sapma ile ifade edilen gün içi ve günler arası kesinliğinin %5 den daha az olduğu ve standart hatanın %8 i geçmediği görülmüştür. Doğrusal çalışma aralığı $y = 83.2(\pm 1.5)x - 205(\pm 572)$, korelasyon katsayısı $r^2 = 0.9999$. Kantitatif tayin sınırı 97.9ng/ml ($N=6$), bu konsantrasyonda sinyal/gürültü oranı 10:1 dir. Önerilen metot insan plazmasındaki valsartanın farmakokinetik çalışması içinde uygulanmıştır. Sonuç olarak valsartanın insan plazmasına %96 bağlandığını göstermiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde, deney çalışmalarında kullanılan cihazlar ve donanımları, ilaç etken maddeleri ile diğer kimyasal maddeler, çözeltilerin hazırlanması, ilaç tabletlerinin, serum ve idrar numunelerinin analize hazırlanması hakkında kısaca bahsedilmiştir.

4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

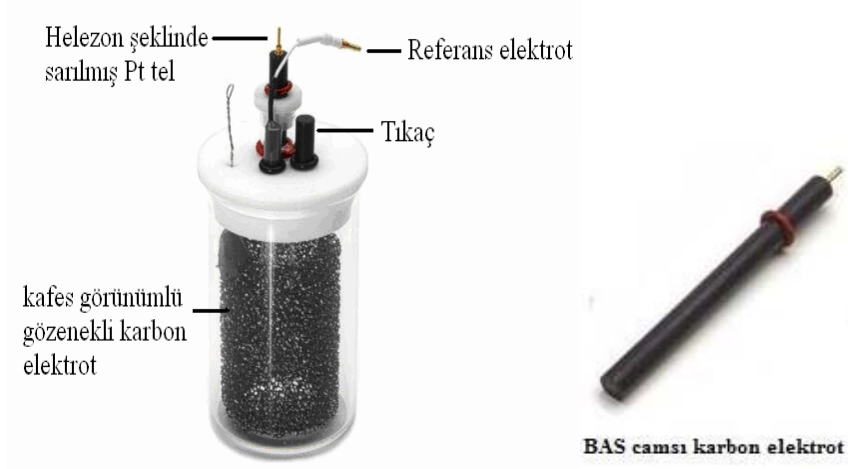
Kullanılan kimyasal maddeler, temin edildikleri firma ve saflık dereceleri belirtilerek, çizelge 4.1’de alfabetik sıraya göre verilmiştir. Deneylerde kullanılan valsartan hammaddesi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden temin edilmiştir.

Çizelge 4.1 Kullanılan kimyasal maddeler

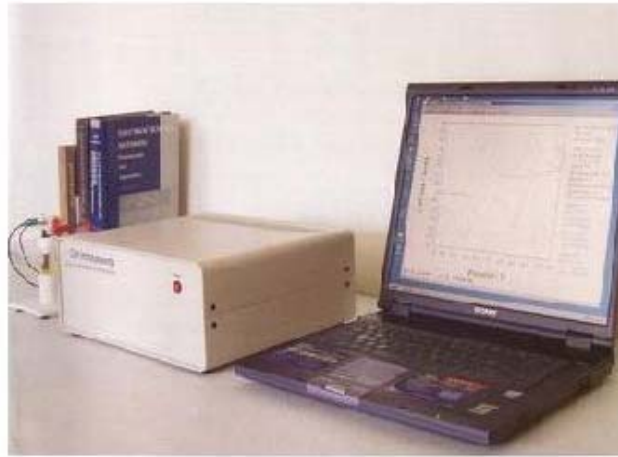
Kimyasal maddenin adı	Formülü	Saflık derecesi	Temin edildiği firma
Alüminyum oksit	Al ₂ O ₃	-	Merck
Asetik asit	CH ₃ COOH	> % 99,5	Merck
Asetonitril	CH ₃ CN	> % 99,9	Sigma-Aldrich
Azot gazı	N ₂	> % 99,9	Oksan Koll. ŞTİ.
Borik asit	B(OH) ₃	> % 99,5	Merck
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	% 99,8	Riedel de Haën
Fosforik asit	H ₃ PO ₄	> % 85,0	Pancreac
Hidroklorik asit	HCl	> % 37,0	Pancreac
Metanol	CH ₃ OH	> % 99,9	Riedel-de Haen
Nitrik asit	HNO ₃	> % 65,0	Merck
Sodyum hidroksit	NaOH	> % 99,0	Merck
Sodyum bikarbonat	NaHCO ₃	%99,5-100,5	Sigma-Aldrich
Potasyum hidrojenftalat	C ₈ H ₅ KO ₄	%99,9-100,5	Merck
Valsartan	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃		Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

4.2 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

VSN’nin camı karbon elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal çalışmaları CHI 660C marka çalışma ünitesi, BAS C3 katı elektrot standı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 4.1).



BAS C3 katı elektrot standı



CHI-660 C elektrokimyasal çalışma ünitesi

Şekil 4.1 Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan elektrotlar, çalışma ünitesi ve standı

Şekil 4.1’de görülen elektrokimyasal sistemde, voltametrik çalışmalar için 3 mm çapında camşu karbon çalışma elektrot (CKE) (BAS MF 2012); Pt tel karşıt elektrot; Ag/AgCl (CHI 111) referans elektrot kullanılmıştır. Bulk elektroliz çalışması için BAS MF-1056 bulk elektroliz hücresine ait (Şekil 4.1), kafes görünümlü gözenekli karbon elektrot BAS MF-2077 kullanılmıştır. CKE’da Valsartan’ın reaksiyon mekanizmasında aktarılan elektron sayısını tayin edebildiğimiz yöntem olan bulk elektrolizde de karşıt elektrot olarak helezon şeklinde sarılmış Pt tel (BAS MW- 1033) ve Ag/AgCl referans elektrot kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan Ag/AgCl referans elektrodu, kullanılmadığı zamanlarda 3,0 M KCl çözeltisi içerisinde saklanmıştır.

Çalışmalarda kullanılan ortamlarda, çözülmüş oksijenin, valsartanın yükseltgenmesine etki etmemesi için oksijenin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla inert bir gaz olan azot gazı kullanılmıştır. Ayrıca inert gaz, oksijenin elektrot yüzeyinde adsorplanmasını önlemek için geçirilir.

Elektrokimyasal çalışmalar süresince, kullanılan kimyasal maddeler 0,1 mg duyarlılıktaki GEC AVERY ve 0,01 mg duyarlılıkta Mettler Toledo marka elektronik terazilerde tartılmıştır.

Çalışmada kullanılan saf su Elga Purelab marka saf su cihazından temin edilmiştir. Sulu ortamda yapılan pH ölçümleri için Orion kombine cam pH elektrodu (912600) ve onun bağlı olduğu Thermo Orion Model 720 A pH-iyon metre kullanılmıştır. Çözeltilerin karıştırılması, çözünmesi ve elektrotların temizlenmesi için Ultrasonic LC30H marka ultrasonik banyodan yararlanılmıştır.

Camsı karbon elektrot hassas bir yüzeye sahiptir ve yüzeylerinin temiz olması gerekmektedir. Bu nedenle elektrot yüzeyi her ölçümden önce ve sonra üretici firmadan temin edilen temizleme pedi ve alümina süspansiyonu kiti ile mekanik temizleme işlemi yapılmıştır. Bu kit içinde yer alan temizleme pedi suyla ıslatıldıktan sonra üzerine alümina süspansiyonundan dökülerek, elektrot yüzeyi bu temizleme pedi üzerinde dairesel sekiz şekli yapılarak elektrot yüzeyi temizlendi. Buna ilaveten, elektrot yüzeyinde kalabilecek kirlilikler ve süspansiyon kalıntılarını uzaklaştırmak için etanol içerisinde kısa sürelerde ultrasonik banyoda sonikasyon uygulanmıştır.

4.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

4.3.1 Standart VSN çözeltileri

Çalışmalarda kullanılan VSN, uygun miktarda tartılıp etanolde çözülerek, 25 mL'lik $1,0 \times 10^{-3} M$ - $1,0 \times 10^{-5} M$ 'lık standart stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler $+4 \text{ } ^\circ C$ 'de saklanmıştır. Çalışma çözeltileri ise, bu stok çözeltilerden deneysel

çalışmalara uygun olacak şekilde alınıp, deneysel çalışmalarda kullanılacak olan çözücü-destek elektrolitle seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

4.3.2 Destek elektrolit zeltisi ve hazırlanışı

Ortamın iletkenliğini ve elektroaktif maddenin elektrot yüzeyine yalnızca difüzyonla taşınmasını sağlamak için destek elektrolit kullanılır. Destek elektrolit bu göreve ek olarak bazı uygulamalarda ortamın pH'sını ayarlayan bir tampon ya da ortamda bazı iyonları kompleksleştiren bir ligand görevi görmektedir. Voltametrik tekniklerde kullanılan destek elektrolit yeterince saf olmalıdır. Eğer safsızlık varsa, bunların derişimi analit derişiminin % 1'ini geçmemelidir. Ayrıca destek elektrolit çalışma elektrodunun çalışma potansiyel aralığını daraltır nitelikte olmamalıdır. Başka bir deyişle, destek elektrolit anyonu elektrodun metal iyonu ile kompleks oluşturmamalı, kasyonu veya üzücü indirgenerek katodik bölgeyi daraltmamalıdır.

Deneysel çalışmalarda, geniş bir pH aralığına sahip olan (pH 2,0 – 12,0) Britton-Robinson tamponu (BR) destek elektrolit kullanılmıştır. Tampon zeltisi hazırlanırken 1,23 g borik asit, 1,36 mL % 85'lik fosforik asit ve 1,15 mL glasiyel asetik asit saf su ile seyreltilerek, hacmi 0,5 L'ye tamamlanmıştır. Bu tampon zeltinin pH'sı 0,10 M NaOH ve 0,10 M HCl zeltileri kullanılarak istenilen pH değerlerine ayarlanmıştır. BR tamponu +4 C'te saklanmıştır.

4.3.3 İlaç tabletlerinin analize hazırlanması

Farmasötik rnek olarak NOVARTİS firması tarafından üretilen Valsartan® tabletleri kullanılmıştır. Her bir ilaç için 10 tabletin tamamı tartılarak 1 tabletin ortalama kütlesi belirlendi, tartılan bu tabletlerin tamamı porselen havanda iyice ğtlp toz haline getirildi, 1 tabletin kütlesine eşit miktarda tartım alınmış ve 100,0 mL'lik ll balona aktarılmıştır. ll balona ilk önce yaklaşık 50 ml etanol konup 30 dakika ultrasonik banyoda ilaç etken maddesinin znmesi sağlanmış ve hacmi etanol ile 100,0 mL'ye tamamlanmıştır. znmeyen destek ve katkı maddelerinin çökmesi için bir gece +4 C' de buzdolabında bekletilmiştir. Çökme işlemi tamamlandıktan sonra 100,0 mL'lik

ölçülü balondaki karışımın berrak kısmından belirli hacimlerde çözelti alınmış ve BR tamponu ile seyreltilerek analizlerde kullanılmıştır.

4.3.4 Serum numunelerinin analize hazırlanması

Serum numuneleri söz konusu ilacı kullanmayan gönüllülerden alınmış ve -25°C'de saklanmıştır. Çalışma için; her bir çalışma için 1,0 mL serum numunesine belirli miktarda ilaç etken maddesi veya tablet çözeltisi ilave edilmiş ve buda iki kısma ayrılmıştır. İlk kısım üzerine serum proteinlerini çöktürmek için asetonitril ilave edilmiş ve 1500 devir/dakika hızla 15 dakika santifürjlenerek çöken proteinler ayrılmış ve daha sonra berrak kısmından alınarak BR tamponu ile seyreltilip analizlerde kullanılmıştır. İkinci kısım ise, serum proteinlerini çöktürmeden analizlerde kullanılmıştır.

4.3.5 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 BR tamponu ile seyreltilip analize hazır hale getirilmiştir.

4.3.6 Bulk Elektroliz (BE) çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Bulk elektroliz çalışmalarında bulk elektroliz hücresi içerisine grafit kafes tel yerleştirilmiştir ve pH'sı 3,0 olan BR tamponunda hazırlanan $1,0 \times 10^{-5}$ M 'lık 75 mL etken madde çözeltisi hücreye eklenmiştir. Bulk elektroliz yapılmadan önce etken madde çözeltisinden elektrokimyasal ölçümler alınarak kaydedilmiştir. Bu çözeltilere, referans elektrot, helezon şeklinde sarılmış Pt tel ve karşıt elektrot daldırılarak, 30 dakika inert gaz geçirilmiştir. Elektroliz devresine anodik pik potansiyelinden daha anodik bir potansiyel uygulanmıştır. Sistemden geçen akım başlangıç akımının % 1' ine ininceye kadar elektrolize devam edilmiştir. Elektroliz sonlandığında elektroliz için gerekli olan yük miktarından yararlanarak yükseltgenme tepkimesinde aktarılan

elektron sayısı hesaplanmıştır. Bulk elektroliz sonrası etken madde çözeltisinden belli miktar kullanılarak elektrokimyasal ölçümler alınmıştır. Bulk elektrolizden sonra pik akımında ve potansiyelinde meydana gelen değişimler kaydedilmiştir.

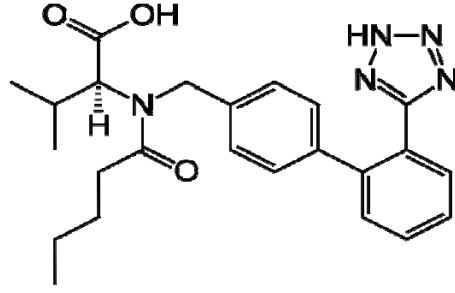
4.4 Elektrokimyasal Deneylerin Yapılışı

Elektrokimyasal deneyler şekil 4.1’de gösterilen CHI 660 C sisteminde, BAS C3 elektrot hücre standı kullanılarak yapılmıştır. Deneysel çalışmalarda pH’ı optimum değere ayarlanmış belli hacimde tampon çözeltisi veya idrar ve serum içeren tampon çözeltisi hücreye konulmuştur ve çalışmada kullanılacak çalışma elektrot, referans elektrot ve platin elektrot ile üçlü elektrot sistemi oluşturulmuştur. Çözeltiden ilk ölçüm öncesinde 10 dakika, sonraki ölçümler arasında 30 saniye azot gazı geçirilerek, çözelti içindeki çözünmüş oksijenin bertaraf edilmesi sağlanmıştır. VSN çözeltisi eklenmeden tanık ortam olarak elektrokimyasal ölçümler alınmış ve zemin sinyali olarak kaydedilmiştir. Bu ölçümlerden yararlanılarak, çalışma potansiyel penceresi belirlenmiş ve farklı miktarlarda standart ve tablet çözeltilerinden eklemeler yapılarak, belirlenen potansiyel değerleri arasında elektrokimyasal ölçümler alınmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

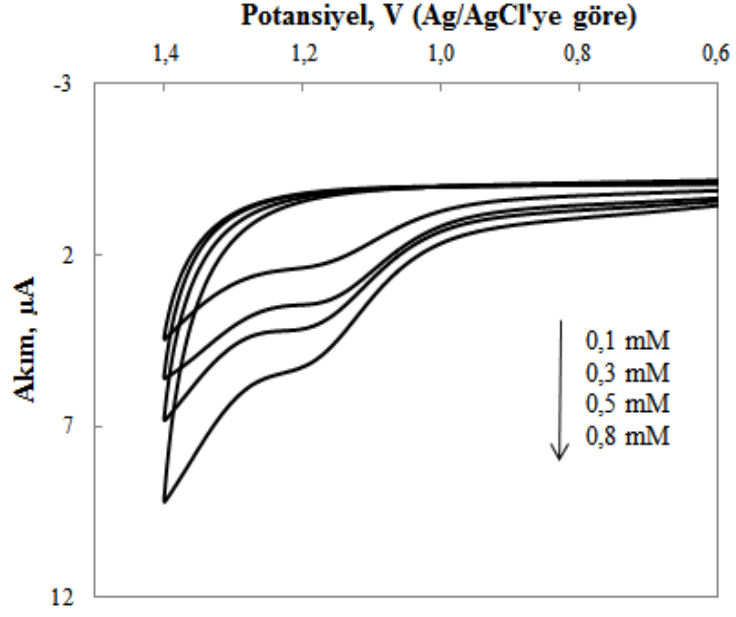
5.1 Valsartan'ın Elektrokimyasal Davranışı

Yapılan literatür araştırmasına göre Valsartan'ın (Şekil 5.1) analizinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi başta olmak üzere kromatografik yöntemler bulunmaktadır. Valsartan'ın elektrokimyasal redoks özellikleri ve voltametrik yöntemlerle analizlerine yönelik olarak bir-iki araştırmadan fazla ayrıntılı çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca valsartanın voltametrik yöntemlerle biyolojik örneklerde analizine hiç rastlanılmadı. Bu nedenle valsartanın voltametrik yöntemlerle elektrokimyasal yükseltgenme davranışı incelendikten sonra hem tabletlerde hem de biyolojik örneklerde analizinin gerçekleştirilmesi hedeflendi. Bu amaçla, molekül yapısında yükseltgenme tepkimeleri için elverişli fonksiyonel grupların bulunması nedeniyle voltametrik yöntemlerle elektrokimyasal yükseltgenme davranışları camsı karbon elektrot yüzeyinde incelendi. Katı elektrotlar, civa elektrotların aksine yükseltgenme tepkimelerinin incelenmesini mümkün kılar. Ayrıca camsı karbon elektrodun geniş bir potansiyel çalışma aralığına sahip olması, düşük artık akım göstermesi, ucuz olması ve kimyasal inert olması nedeniyle elektroanalizlerde kullanılmaları önem kazanmıştır. Bu nedenle, çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot seçildi. Camsı karbon elektrot yüzeyinde elde edilen bulguların ışığında valsartanın diferansiyel puls ve kare dalga anodik adsorptif sıyırma yöntemleri ile tayini için optimum koşulları (pH, biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi) belirlemek üzere çalışmalar yapıldı. Belirlenen optimum koşullarda hem tabletlerde hem de biyolojik örneklerde anodik voltametrik sıyırma yöntemleri ile analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda tartışıldı.



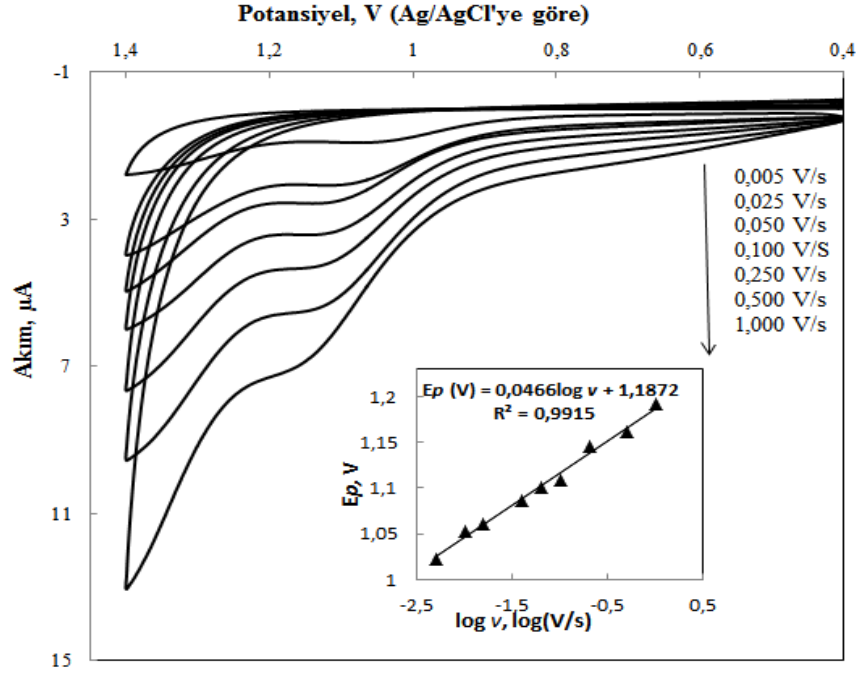
Şekil 5.1 VSN'nin molekül yapısı.

VSN'nin camısı karbon elektrotta elektrokimyasal davranışının incelenmesinde, dönüşümlü voltametri yöntemleri kullanılmıştır. Öncelikle VSN'nin pH 3,0'da BR tamponu içerisinde farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerinin 0,6 V – 1,4 V aralığında dönüşümlü voltamogramları alınmıştır (Şekil 5.2). Şekilden de görüldüğü üzere yaklaşık 1,10 V'da bir yükseltgenme piki gözlenirken, katodik pik gözlenmemiştir. Bu durum VSN'nin CKE yüzeyinde yükseltgenmesinin tersinmez olduğu düşünülmüştür. VSN derişiminin arttırılması ile pik akımının arttığı gözlenmiştir. Buna göre VSN'nin CKE yüzeyinde yükseltgendiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 5.2 Farklı derişimlerde VSN'nin, BR ortamında, CKE'de elde edilen dönüşümlü voltamogramları (v : 0,100 V/s, pH: 3,0)

Elektrokimyasal davranışın belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemlerden birisi dönüşümlü voltametri yöntemidir. Dönüşümlü voltametri yönteminde elektroda uygulanan potansiyelin zamanla değişim hızını ifade eden tarama hızı çalışması, çalışılan maddenin elektrokimyasal davranışı ve mekanizması ile ilgili aydınlatıcı bilgi verebilmektedir. Tarama hızının pik potansiyeline ve pik akımına etkisinin incelenmesi için 0,3 mM VSN içeren çözeltilerde 0,005 V/s - 1,0 V/s aralığında tarama hızı çalışmaları yapıldı. Farklı tarama hızı ile pik potansiyelinin anodik değere kaydığı gözlenmiştir (Şekil 5.3). Tarama hızı ile pik potansiyelinin değişmesi incelenen elektrot reaksiyonunun tersinmez veya yarı-tersinir olduğunu göstermektedir. Tarama hızı çalışmalarında pik potansiyelinin tarama hızı ile değişmesinden yararlanarak transfer katsayıları ve elektron sayıları ile ilgili birtakım hesaplamalar yapmak mümkündür (Brett 2000). Buna göre, E_p - $\log v$ grafiğinin eğimi, mV olarak $29,6/n\alpha$ 'dır. Bu eşitlikte n değeri, hız belirleyen basamaktaki elektron sayısı ve α yük aktarım katsayısıdır. Buna göre söz konusu molekül için şekil 5.3'te iç grafikte belirlenen regresyon eşitliğinin eğimi kullanılarak, $n\alpha$ değeri 0,64 olarak hesaplandı.



Şekil 5.3 0,3 mM VSN'nin, pH:3,0 BR ortamında CKE yüzeyinde farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları (İç grafik, anodik pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile değişimi)

Tarama hızının pik potansiyeline etkisinin incelenmesi için tarama hızlarının logaritmasına karşı pik potansiyel değerleri grafiğe geçirilmiştir ve pik potansiyelinin tarama hızının logaritması ile $E_p (V) = 0,0466 \log v + 1,1872$; $R^2 = 0,9915$ eşitliğine göre ifade edilebileceği görülmüştür (Şekil 5.3, İç grafik). Ayrıca tersinmez elektrot mekanizmalarında pik potansiyeli (E_p) ile yarı pik potansiyeli ($E_p^{1/2}$) arasındaki farktan yararlanılarak da α hesaplanmıştır (Eşitlik 5.1).

$$|E_p - E_p^{1/2}| = 47,7 / \alpha \text{ (mV) (25 } ^\circ\text{C)} \quad (5.1).$$

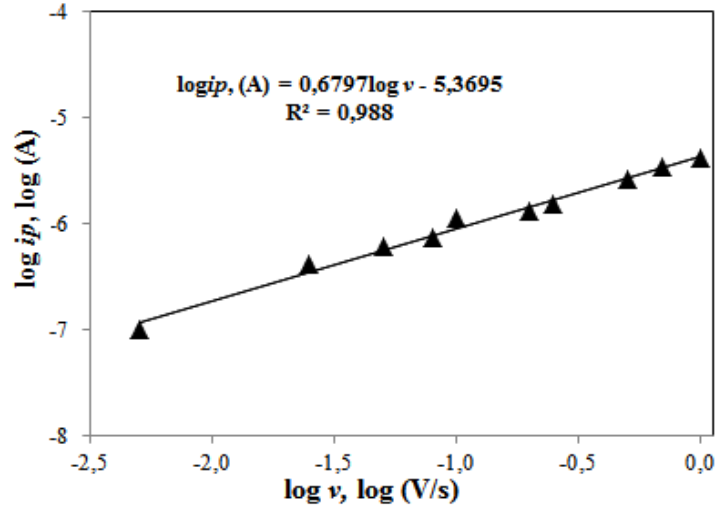
Eşitlikteki formülden hesaplanarak verilen sonuçlar çizelge 5.1'de verilmektedir. Bu eşitliğe göre hesaplanan α değeri 0,68 olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.1 $3,0 \times 10^{-4}$ M VSN çözeltisinin bazı pik parametrelerinin tarama hızı ile değişimi (DV, CKE)

Tarama Hızı, V/s	E_p , V	$E_p^{1/2}$, V	ΔE , mV	$\alpha n = 47,7/ \Delta E$
0,005	1,038	0,967	71,0	0,671
0,025	1,089	1,017	72,0	0,662
0,050	1,105	1,038	67,0	0,712
0,080	1,131	1,067	64,0	0,745
0,100	1,124	1,046	78,0	0,611
0,200	1,155	1,091	64,0	0,745
0,250	1,162	1,091	71,0	0,671
0,500	1,166	1,102	64,0	0,745
0,700	1,179	1,105	79,0	0,603
1,000	1,202	1,117	75,0	0,636
				Ortalama=0,68

5.1.1 VSN'nin adsorpsiyon özelliği

VSN'nin CKE yüzeyinde elektrokimyasal davranışının incelenmesi için yapılan tarama hızı çalışmalarında, tarama hızının pik akımına etkisi incelenmiştir. 0,3 mM VSN içeren çözeltiler kullanılarak, farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramların pik akımlarının tarama hızı ile değişimini gözlemlemek için $\log i_p^a - \log v$ grafikleri çizilmiştir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4 0,3 mM VSN'nin BR ortamında CKE yüzeyinde farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen $\log i_p$ - $\log v$ grafiği (pH:3,0)

Pik akımının logaritma değerlerinin, tarama hızının logaritma değerleri ile değişimi incelendiğinde ($\log i_p$ ve $\log v$ arasında) $\log i_p$ ($\log A$) = $0,6797 \times \log v - 5,3695$; $R^2 = 0,988$ şeklinde ifade edilebilecek bir eşitlik görülmüştür (Şekil 5.4). VSN'ye ait $\log i_p$ ve $\log v$ arasındaki eşitliğin eğimi adsorpsiyon kontrollü reaksiyonlar için önerilen 1,0 değeri ile difüzyon kontrollü reaksiyonlar için önerilen 0,5 değerinin arasında ancak 0,5'e yakın bir değerdir (Şekil 5.4). Buna göre, VSN'nin elektrokimyasal yükseltgenme reaksiyonunun adsorpsiyon etkisi altında difüzyonun da etkili olduğu düşünülmüştür.

5.1.2 pH'nın pik akımına ve pik potansiyeline etkisi

Elektrokimyasal sinyalin potansiyelini ve akımını değiştirebilen en önemli parametrelerden birisi olan pH, çalışma ortamında bulunan H^+ iyonları derişiminin VSN moleküllerine etkisini incelemek açısından önemlidir. Bu amaçla, geniş bir pH aralığında çalışmaya elverişli olan (2,0-12,0) BR tamponu kullanılmıştır. VSN derişimi 0,3 mM olan çözeltilerin pH'sı BR tamponu kullanılarak 2,0-12,0 arasında değiştirilmiş ve kare dalga voltamogramları alınmıştır (Şekil 5.6). Çalışmalar sonucunda pik akımlarının pH değerine etkisi incelendiğinde, pH 2,0'dan pH 3'e doğru gidildiğinde pik akımının arttığını, pH 3,0'den sonra pik akımının azaldığı görülmektedir. Buna karşılık pik potansiyelinin azalıp katodik bölgeye kaydığı gözlenmiştir. Sonuç olarak en

uygun pik şekli, simetrisi ve en yüksek akım göz önünde bulundurularak optimum pH 3,0 seçilmiştir.

VSN'nin elektrokimyasal yükseltgenme reaksiyonuna eşlik eden proton sayısı, pik potansiyelinin pH ile değişimine ait Eşitlik 5.2'de verilen denklemden yararlanarak hesaplanmıştır (Wang vd. 2006).

$$E_p = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O]}{[R]} - 2,303 \frac{\partial RT}{nF} \text{pH} \quad (5.2)$$

Bu eşitlikte;

E_p Pik potansiyeli(V)

E^0 Standart pik potansiyeli (V)

R İdeal gaz sabiti (J/mol K)

T Mutlak sıcaklık (K)

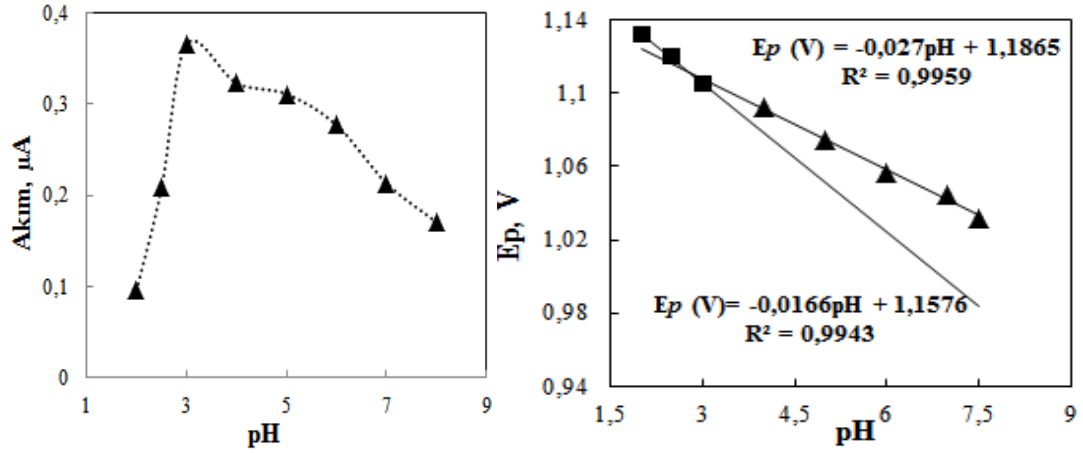
F Faraday sabiti (C/mol elektron)

[O] Yükseltgenmiş türün analitik derişimi (mol/cm³)

R İndirgenmiş türün analitik derişimi (mol/cm³)

∂ Mekanizmaya eşlik eden proton sayısı (mol proton/ mol molekül) ifade etmektedir.

Pik potansiyelinin ortamın pH değeri ile değişim grafiğinde, deneysel olarak bazik bölge için elde edilen doğrunun eğiminden (Şekil 5.5) ve Eşitlik 5.2'den yararlanarak, VSN'nin CKE yüzeyindeki yükseltgenmesinde yer alan proton sayısının mekanizmada aktarılan elektron sayısına oranı (∂/n) hesaplanmıştır ve pH 3,0'de 0,46 olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre, elektrokimyasal basamakta transfer edilen yaklaşık $2e^-$ karşı, 1 H^+ iyonu mekanizmaya katılmıştır.



Şekil 5.5 Çözeltilerin farklı pH değerlerinde alınan kare dalga voltamogramlarda pH-Ep ve pH –İp grafiği

5.1.3 Aktarılan elektron sayısının bulunması

VSN'nin elektrokimyasal yükseltgenme reaksiyonunda transfer edilen elektron sayısının hesaplanması için sabit potansiyelde bulk elektroliz çalışmaları yapılmıştır. Bunun için, ilk önce $1,0 \times 10^{-5}$ M VSN içeren 75,0 mL çözelti kullanılıp hem bulk öncesi hem de bulk elektroliz sonucu dönüşümlü voltamogramları alınmış ve bulk elektroliz için uygun potansiyel değeri, anodik pikin tamamlandığı ve başka bir pikin gözlenmediği daha anodik bir değer olan 1,38 V değeri alınmıştır. Çözelti, sabit tutulan bu potansiyel değerinde inert gaz olan azot gazı ile sürekli karıştırılarak elektroliz edilmiştir. Son akımın %1'e düştüğü anda elektroliz kesilmiş ve elektroliz sonrasında, elektroliz için gerekli olan yük miktarından $Q = nFN$ (Q , toplam yük, (C); n aktarılan elektron sayısı (mol e^- /mol molekül); F , Faraday sabiti (96485 C/mol e^-); N , elektroliz olan maddenin miktarı (mol)) eşitliği kullanılarak yükseltgenme tepkimesinde aktarılan elektron sayısı hesaplanmıştır. Sabit potansiyelli kulometri deneyleri sonucunda elektron sayısı $1,76 \pm 0,18$ olarak hesaplanmıştır. Bu değere göre aktarılan elektron sayısı yaklaşık 2 olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca VSN'nin transfer edilen elektron sayısı, farklı tarama hızlarında gerçekleştirilen dönüşümlü voltametri deneyleri ile elde edilen sonuçlara göre de hesaplanmıştır. Buna göre aşağıdaki Eşitlik 5.2 ve Eşitlik 5.3 kullanılmıştır (Wang 2000).

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma A \nu}{4RT} \quad (5.2)$$

$$Q = nFA\Gamma \quad (5.3)$$

Eşitlik 5.3'deki Γ değeri Eşitlik 5.2'de yerine konulduğunda, elektron sayısını hesaplamak için Eşitlik 5.4 elde edilmiştir.

$$i_p = \frac{nF\nu Q}{4RT} \quad (5.4)$$

Bu eşitliklerde; i_p , ölçülen akımı (A); F , Faraday sabitini, C/mol e^- ; R , ideal gaz sabitini (J/mol K); T , mutlak sıcaklığı (K); Γ , yüzey kaplama katsayısını, mol/cm², sembolize etmektedir. Eşitlik 5.4'den yararlanılarak 0,005 – 1,0 V/s aralığında yapılan çalışma sonucunda, VSN'nin elektrot reaksiyonunda aktarılan elektron sayısı 1,72±0,16 olarak bulunmuştur.

5.1.4 Difüzyon ve yüzey kaplama katsayısının bulunması

VSN'nin elektrot yüzeyine adsorpsiyon etkisi altında difüzyonundan yola çıkılarak, Garrido tarafından, adsorpsiyon göz önüne alınarak tersinmez sistemler için önerilen aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 5.5) kullanılarak difüzyon katsayısı hesaplanmıştır (Garrido 1986).

$$i_p = 1.06 \times 10^6 n^2 AC\nu D^{1/2} t_p^{1/2} \quad (5.5)$$

Bu eşitlikte t_p , puls süresini; D , elektroaktif türün difüzyon katsayısı, cm²/s; A , elektrodun yüzey alanı, cm², ($A = \pi \times 0,15^2 = 0,071 \text{ cm}^2$), C , ana çözeltideki elektroaktif maddenin analitik derişimi, mol/cm³, mol/L, sembolize etmektedir.

Difüzyon katsayısı, adsorpsiyonun etkin olduğu düşük tarama hızlarında hesaplanmıştır. 0,005 – 1,000 V/s tarama hızı aralığında hesaplanan ortalama difüzyon katsayısı 3,76±2,18 × 10⁻⁸ cm² s⁻¹ olarak bulunmuştur. Hesaplanan difüzyon katsayısı değerinin, difüzyon kontrollü elektrokimyasal dönüşümler için (10⁻⁵ – 10⁻⁶ cm² s⁻¹) literatürlerde

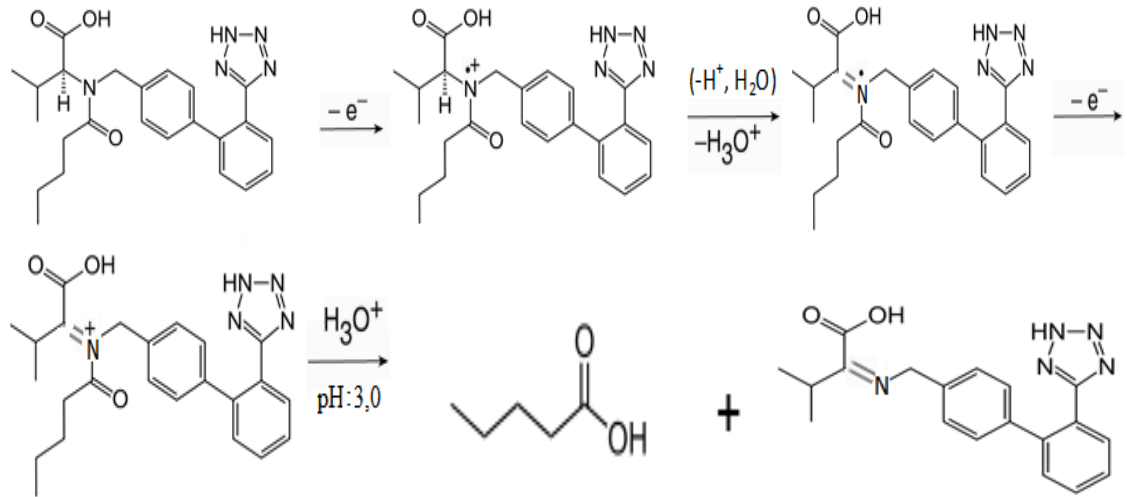
verilen değerlerden oldukça küçük olduğu görülmüştür. Buda VSN'nin elektrot yüzeyinde adsorpsiyon etkisi altında yükseltgendiği söylenebilir.

VSN'nin yüzey kaplama katsayısı ise, Eşitlik 5.3'den yararlanılmış ve yüzey kaplama ortalama katsayısı $(6,45 \pm 0,82) \times 10^{-10}$ mol/cm² bulunmuştur ve bu değer adsorpsiyon kontrollü mekanizmalar için çoğu kaynakta verilen yüzey kaplama katsayısı 10^{-8} - 10^{-10} mol cm⁻² aralığına denk gelmektedir (Brett 1994, Bard ve Faulkner 2001, Wang 2006).

Bu hesaplanan değerde adsorpsiyon kontrollü mekanizmalar için VSN'nin CKE yüzeyinde adsorpsiyon kontrollü olarak yükseltgendiğini destekler niteliktedir.

Yapılan elektrokimyasal çalışmalar değerlendirildiğinde, VSN'nin yükseltgenme reaksiyonunun camı karbon elektrot yüzeyinde tersinmez olduğu ve bazı adsorpsiyon etkileri altında difüzyonun etkisinde olduğu durumda 2 elektron, 1 proton transferi şeklinde olduğu söylenebilir. Molekülün hangi fonksiyonel kısmının yükseltgendiğini kesin olarak söyleyebilecek veriler elimizde olmamakla birlikte tersiyer amin kısımdan yükseltgenmenin gerçekleştiği söylenebilir.

Önerilen reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibidir.



Şekil 5.6 VSN'nin olası yükseltgenme reaksiyon mekanizması

5.2 Voltametrik Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi

VSN'nin elektrokimyasal davranışı incelendikten sonra, elde edilen optimum şartlara göre VSN'nin farmasötik örnekler, idrar ve serum gibi biyolojik ortam varlığında tekrarlanabilir, güvenilir ve yüksek doğrulukta tayin edilebilmesi için voltametrik yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalarda daha düşük alt tayin sınırlarına ulaşabilmek için voltametrik sıyırma yöntemleri üzerinde durulmuştur.

5.2.1 Cihaz parametrelerinin optimizasyonu

Voltametrik yöntemlerin sinyal cevapları, kullanılan yazılım ve cihazın sinyal parametreleri ile değiştiğinden dolayı, çalışmaların yapılacağı her madde için cihaz ve yazılım parametreleri optimize edilmelidir. Hem yükseltgenme pik akımı hem de pikin şekli dikkate alınarak yapılan çalışmalarda optimum parametreler belirlendi ve sonuçlar çizelge 5.2'te verildi.

Çizelge 5.2 Voltametrik sıyırma yöntemleri için optimum cihaz parametreleri

Parametre	KDAAdSV	DPAAdSV
Başlangıç potansiyeli, mV	500	500
Bitiş potansiyeli, mV	1200	1500
Tarama hızı, mV/s	4	40
Genlik, mV	50	25
Frekans, 1/s	-	10
Basamak potansiyeli, mV	4	4
Örnekleme genişliği, ms	-	17
Puls genişliği, ms	-	50
Puls periyodu, ms	-	200
Durulma süresi, s	5	5

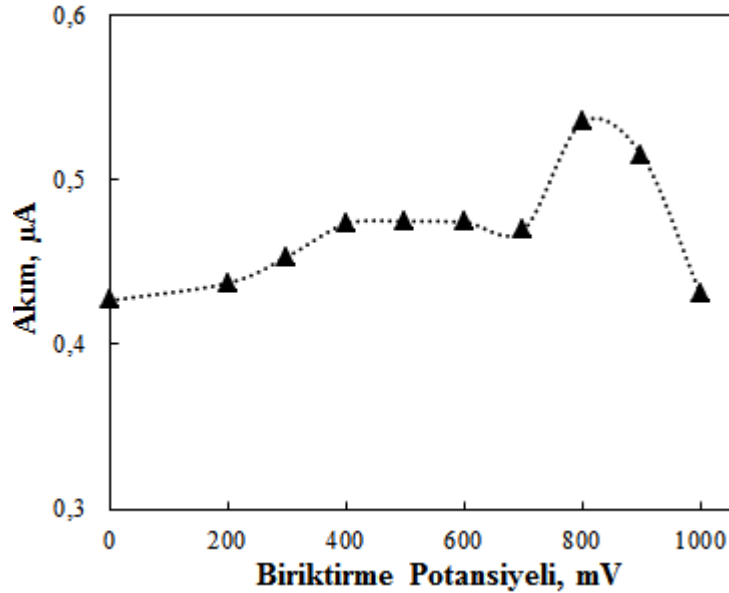
5.2.2 Yöntem parametrelerinin optimizasyonu

VSN'nin elektrokimyasal davranışı incelendikten sonra elde edilen sonuçlara göre VSN'nin farmasötik örnekler ile biyolojik numunelere hızlı, güvenilir, tekrarlanabilir ve yüksek doğrulukta tayin edilebilmesi için voltametrik yöntem geliştirilmesine çalışıldı. Bu çalışmalarda voltametrik sıyırma yöntemleri üzerine yoğunlaşıldı.

5.2.2.1 Biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi optimizasyonu

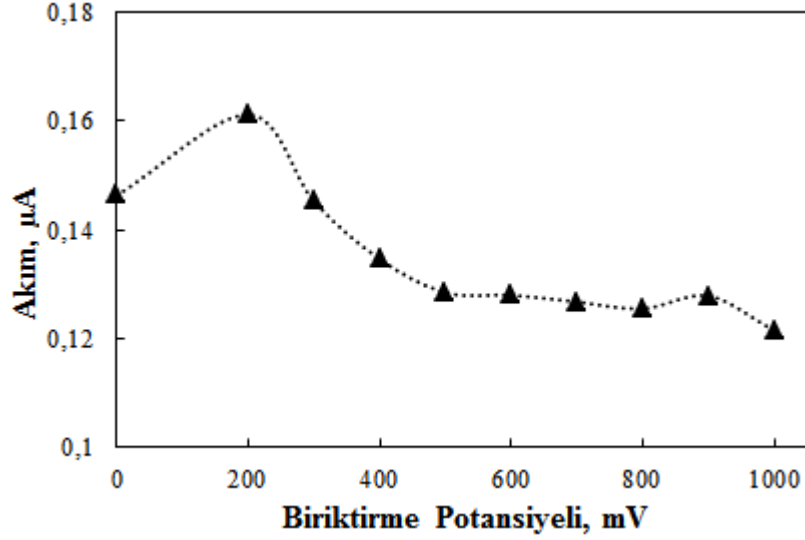
Optimum biriktirme potansiyelinin (E_{bir}) belirlenmesinde, pH 3,0'da 0,03 mM derişiminde, 0,0 – 1,0 V'luk aralığında değişen potansiyel aralığında camsı karbon elektrot yüzeyinde biriktirme yapıldıktan sonra, DPAAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri ile ölçümler alındı.

DPAAAdSV yöntemi ile pik akımlarının 0,0 V ile 0,8 V aralığında arttığını, 0,8 V'dan sonra azaldığı gözlenmiştir (Şekil 5.7). Buna göre, pik akımı ve şekli göz önünde bulundurularak, en uygun biriktirme potansiyeli 0,8 V seçilmiştir.



Şekil 5.7 DPAAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının pik potansiyeli ile değişimi

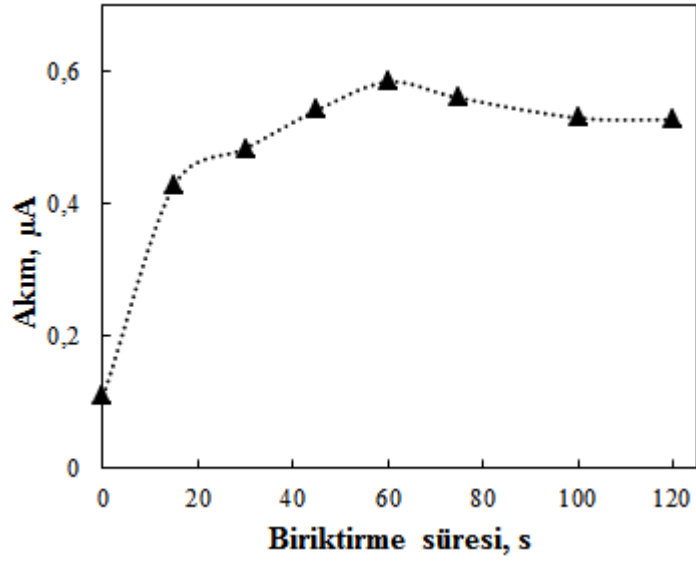
KDAAdSV yöntemi için ise, 0,0 V ile 0,2 V arasında arttığını, 0,2 V'dan sonra azaldığı gözlenmiş (Şekil 5.8) ve en uygun biriktirme potansiyeli 0,2 V seçilmiştir.



Şekil 5.8 KDAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının pik potansiyeli ile değişimi

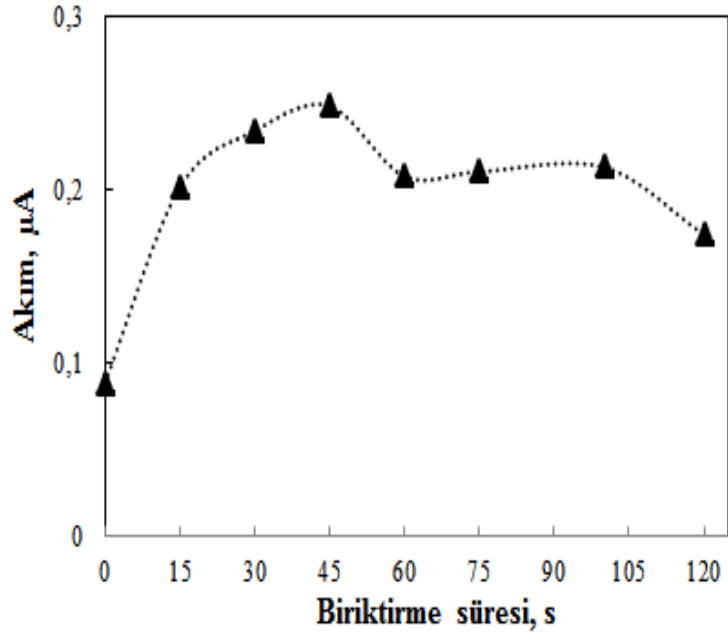
VSN'nin camı karbon elektrot üzerinde optimum biriktirme süresini (E_{bir}) belirlemek için, pH 3,0'te, 0,03 mM ve 0,0 s ile 120,0 s arasında ölçümler alınarak, her iki yöntem için optimum biriktirme süresi belirlenmiştir.

DPAAdSV yöntemi ile pik akımının 0,0 s ile 60,0 s arasında arttığını, 60,0 s ile 120,0 s arasında ise, hemen hemen sabit kaldığı görülmüştür. Buna göre en uygun optimum biriktirme süresi 60,0 s olarak belirlenmiştir (Şekil 5.9).



Şekil 5.9 DPAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının biriktirme süresi ile değişimi (KH: 600 rpm, E_{bir} : 0,8 V)

KDAAdSV yöntemi ile pik akımının 0,0 s ile 0,45 s arasında arttığını, 45,0 s’den sonra azalıp ve daha sonra pik akımının hemen hemen sabit kaldığı görülmüştür (Şekil 5.10). buna göre en uygun biriktirme süresi 45,0 s olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.10 KDAAdSV yöntemi ile elde edilen pik akımlarının biriktirme süresi ile değişimi (KH: 600 rpm, E_{bir} : 0,2 V)

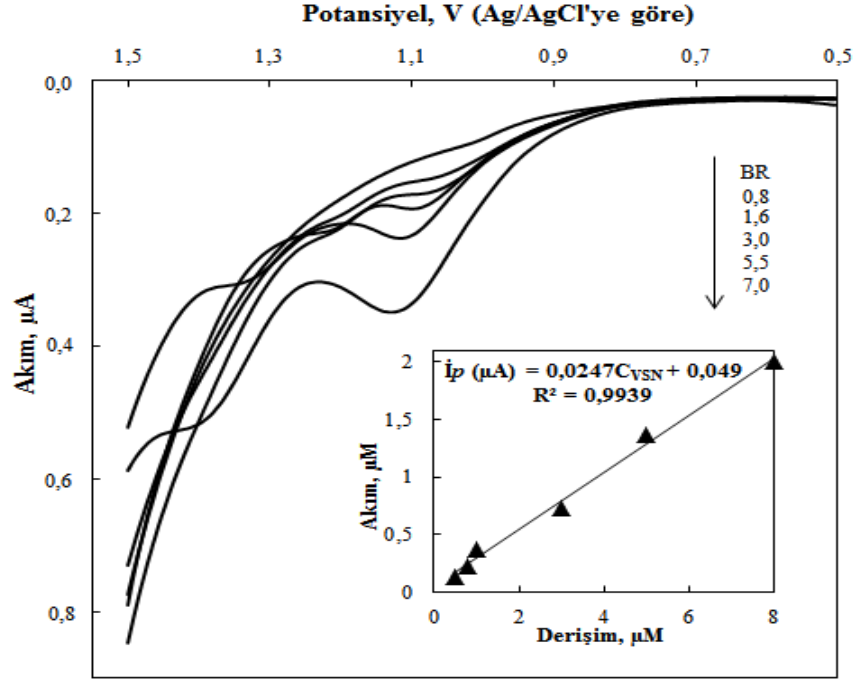
Çizelge 5.3 Voltametrik sıyırma yöntemleri için optimize edilen yöntem parametreleri

Parametre	DPAAdSV	KDAAdSV
Destek elektrolit türü	BR tamponu	BR tamponu
Destek elektrolit derişimi*	0,04	0,04
pH değeri	3,0	3,0
Biriktirme potansiyeli, V	0,8	0,2
Biriktirme süresi, s	60	45
Karıştırma hızı, rpm	600	600

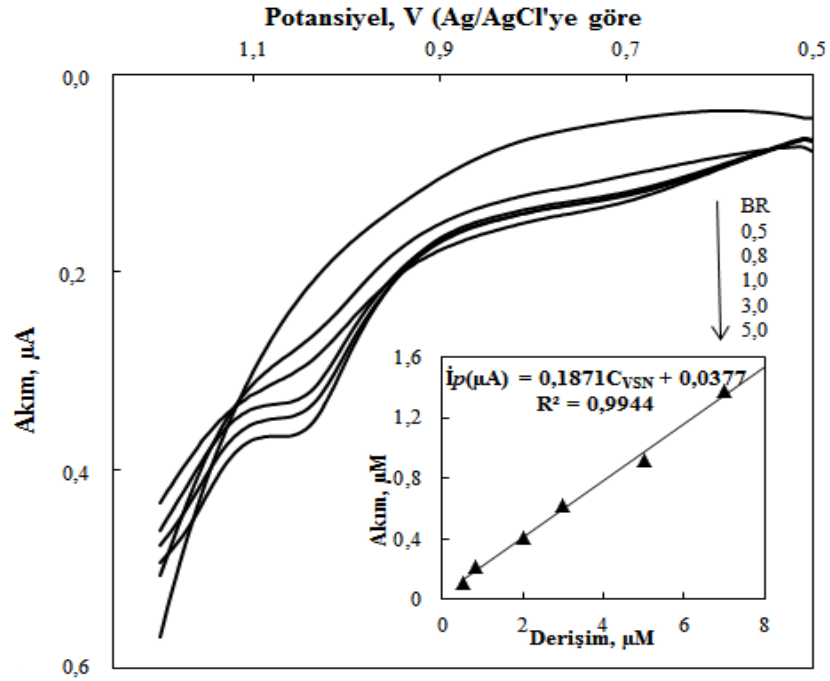
*BR tamponundaki her bileşenin analitik derişimi

5.3 DPAAdSV ve KDAAdSV Yöntemleriyle Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği ve Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Kalibrasyon grafiği çalışmalarında, optimum cihaz ve optimum yöntem parametreleri kullanılarak, VSN'nin farklı derişimlerine karşılık pik akımları grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. DPAAdSV yönteminde farklı derişimlerde incelenen pik (+1,10 V) yanında yaklaşık +1,30 V civarında bir pike rastlanmıştır. Ancak bu pikin tekrarlanabilir bir pik olmadığı belirlenmiştir. Buna göre, DPAAdSV yönteminde kalibrasyon grafikleri oluşturulurken +1,10 V'daki yükseltgenme piki esas alınmıştır. KDAAdSV yönteminde ise sadece tek pik yükseltgenme pikine (+1,06V) rastlanmıştır. Bu pikler yardımı ile DPAAdSV yöntemi için ortalama pik akımının derişimle $8,0 \times 10^{-7}$ mol/L ile $7,0 \times 10^{-6}$ mol/L aralığında doğrusal olduğu görülmüştür (Şekil 5.11). KDAAdSV için ise, $5,0 \times 10^{-7}$ mol/L ile $5,0 \times 10^{-6}$ mol/L aralığında olduğu görülmüştür (Şekil 5.12).



Şekil 5.11 VSN'nin diferansiyel puls anodik adsorptif sıyırma voltamogramları (iç grafik: pik akımının VSN derişimi ile değişimi, pH: 3,0; E_{bir}: 800 mV, t_{bir}: 60 s)



Şekil 5.12 VSN'nin kare-dalga anodik adsorptif sıyırma voltamogramları (iç grafik: pik akımının VSN derişimi ile değişimi, pH:10,0; E_{bir}: 200 mV; t_{bir}: 45 s)

5.4 Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik ve Biyolojik Örneklerle Uygulamaları

Farmasötik örnekler ile serum ve idrar gibi biyolojik numunelerde, VSN'nin DPAAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri ile tayinleri için, bölüm 4.3.3 - 4.3.4 - 4.3.5'te anlatıldığı gibi numuneler analize hazırlanmıştır. Çizelge 5.4'te verilen optimum koşullarda biriktirme yapıldıktan sonra, sıyırma voltamogramları alınmıştır. Alınan voltamogramlar şekil 5.12 - 5.13'te verilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin farmasötik örnekler ile idrar ve serum gibi numunelerde uygulanabilirliğini göstermek amacıyla da geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen geri kazanım çalışmaları çizelge 5.4'de verilmiştir. Geri kazanım çalışmalarında görüldüğü gibi farmasötik preparatlarındaki VSN ilaç etken analizlerinde, ilaç içinde bulunan matriksin(yardımcı maddeler) anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Çizelge 5.4 Geliştirilen yöntemlerin tablet örneklerinde elde edilen sonuçları

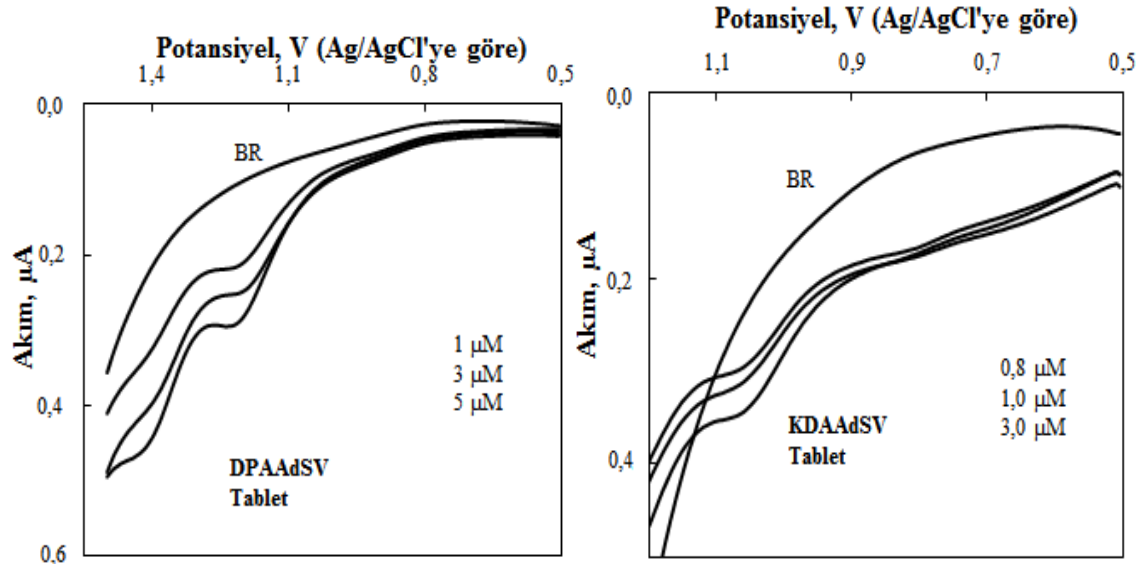
Yöntem	Tablette bulunan, mg	Yöntemle hesaplanan,* mg	Geri kazanım,*%	BSS, %**
KDAAdSV	80	76,2±2,34 81,8±2,27 83,6±1,88 81,2±3,1 79,5±2,85	100,6 ±3,47	3,47
DPAAAdSV	80	78,0±2,34 80,4±2,21 81,6±2,15 82,0±3,12 80,5±2,50	100,6±2,24	1,94

* Ortalama \pm ts/ \sqrt{N} (N=5) eşitliğine göre , % 95 güven seviyesinde hesaplanmıştır.

** Hesaplanan geri kazanım değerleri için de bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

VSN içeren tablet çözeltilerinde yapılan geri kazanım çalışmalarının voltamogramları şekil 5.13'te verilmiştir. Bu voltamogramlar incelendiğinde, tabletlerde bulunan VSN'nin standart VSN ile hemen hemen aynı potansiyelde bir yükseltgenme piki verdiği ve bu pik akımının eklenen tablet çözeltisindeki VSN derişimi ile değiştiği

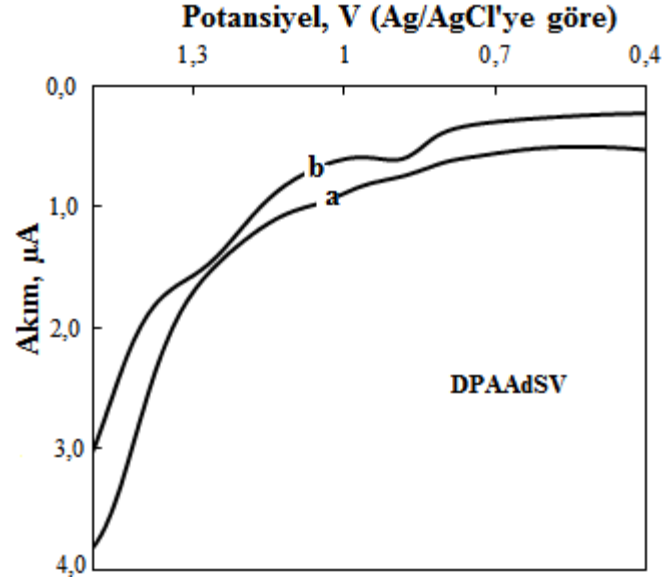
görülmüştür. Bu potansiyel bölgesinde VSN'nin yükseltgenme pikine girişim etkisi yapabilecek herhangi bir pik gözlenmemiştir. Buna dayanarak, tabletlerde kullanılan koruyucu maddelerinin herhangi bir bozucu bir etkiye sahip olmadığı söylenebilir.



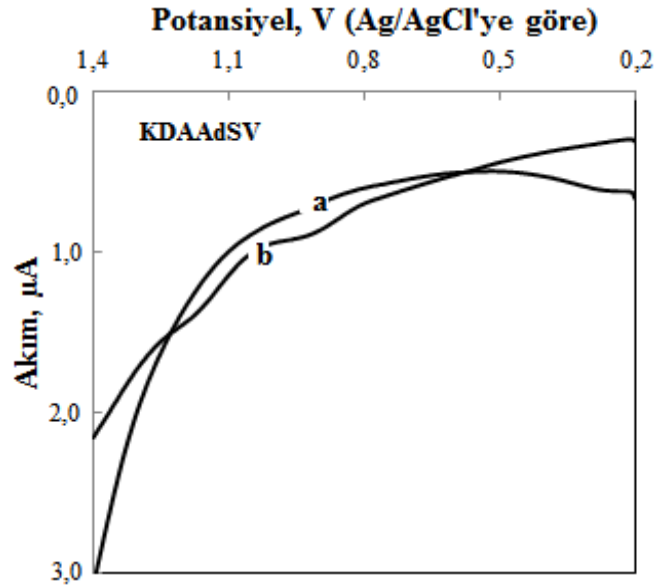
Şekil 5.13 DPAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri ile VSN içeren Diovan® tablet çözeltilerinin derişimle değişen pik akımları ve voltamogramları (pH: 3,0; CKE; DPAAdSV için E_{bir} : 800 mV; t_{bir} : 60 s; KDAAdSV için E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45).

VSN'nin serum ve idrar örneklerinde tayini DPAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri ile incelenmiştir. Bu amaçla serum ve idrar numunelerine, standart VSN veya tablet çözeltileri eklenmiştir ve serumda proteinler çöktürülmüştür.

Serum örnekleri kullanılarak yapılan analizlerde, VSN içeren serum örneklerinin her iki yöntemle de voltamogramları alınmıştır (Şekil 5.14 - 5.15). BR tamponuna standart VSV maddesi eklendiğinde görülen yükseltgenme piki, ortama serum numunesi eklendiğinde kaybolmuştur. Bunun nedeni, VSN'nin plazma proteinlerine % 95-96 oranında yüksek bir şekilde bağlanmasıdır. Bu yüzden, VSN'nin serum proteinlere uygulanabilirliği gerçekleştirilememiştir.

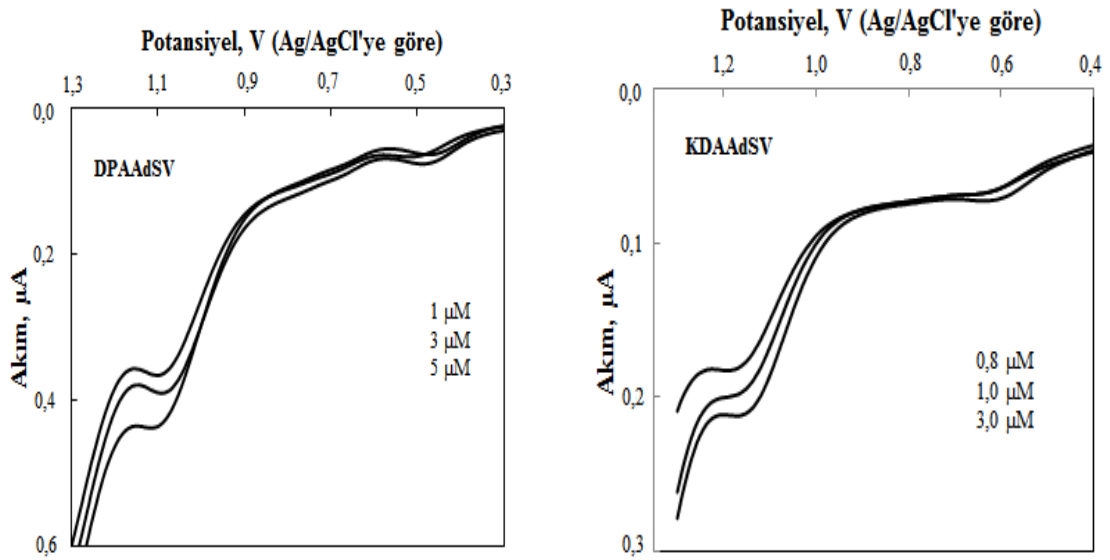


Şekil 5.14.a. Proteini çöktürülmemiş serum numunesine VSN eklenen ve daha sonra proteini çöktürülen örnek. b. Proteini çöktürülmüş serum numunesine VSN eklenen serum örneğinin DPAAdSV voltamogramları (C_{VSN} : $3,0 \times 10^{-6}$ M; pH: 3,0; CKE; E_{bir} : 800 mV; t_{bir} : 60 s)



Şekil 5.15.a. Proteini çöktürülmemiş serum numunesine VSN eklenen ve daha sonra proteini çöktürülen örnek. b. Proteini çöktürülmüş serum numunesine VSN eklenen serum örneğinin KDAAdSV voltamogramları (C_{VSN} : $3,0 \times 10^{-6}$ M; pH: 3,0; CKE; E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45 s)

Bölüm 4.3.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan idrar numunelerine çeşitli derişimlerde olacak şekilde standart VSN ve tablet çözeltilerinden eklenmiş ve her iki yöntemde voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 5.16). VSN içermeyen idrar numunesinde VSN’nin yükseltgenme potansiyel bölgesinde herhangi bir pik gözlenmemiştir. Fakat yaklaşık 0.6 mV’da idrara ait bir pik gözlenmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda, VSN derişimi arttıkça, pik akımlarının arttığını, fakat 0,6 mV ‘da idrara ait olan pik akımında herhangi bir değişme olmadığı ve VSN’nin pik akımı ve potansiyelinde herhangi bir değişme olmadığı görülmüştür. İdrar numunelerinde geri kazanım çalışmaları yapılmış, ve elde edilen sonuçlar çizelge 5.5 - 5.6’da verilmiştir. Çizelgelerde verilen % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerlerinin VSN tayinde başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir.



Şekil 5.16 VSN tabletini içeren idrar çözeltilerinin derişimle değişen pik akımlarının diferansiyel puls anodik adsorptif ve kare dalga anodik adsorptif voltamogramları (pH: 3,0; CKE; DPAAdSV için E_{bir} : 800 mV; t_{bir} : 60 s; KDAAdSV için E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45).

Çizelge 5.5 KDAAdSV yöntemi ile idrar numunelerinde VSN tayininde doğrudan kalibrasyon yöntemi ile elde edilen bulgular

Örnek	Eklenen VSN,µg	Bulunan VSN, µg	% Geri Kazanım *	BSS** %
İdrarda VSN	7,62 13,06 21,77	7,21; 7,93; 7,31; 7,80;7,50 12,74;12,86;13,25;13,40;13,10 21,84; 21,33; 21,45; 22,56;21,50	99,08±4,35 100,7±2,32 99,18±2,45	4,09 2,07 2,30
İdrarda Tablet	7,62 13,06 21,77	7,00;7,50;7,74;7,80;7,75 13,16; 13,61;13,04;13,78;13,00 21,20;21,80;21,72;21,75;21,64	99,18 ±2,36 101,9 ±2,98 99,32 ±1,90	4,25 2,66 1,11

* Ortalama ± ts/ \sqrt{N} (N=5) eşitliğine göre , % 95 güven seviyesinde hesaplanmıştır.

** Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 5.6 DPAAAdSV yöntemi ile idrar numunelerinde VSN tayininde doğrudan kalibrasyon yöntemi ile elde edilen bulgular

Örnek	Eklene VSN,µg	Bulunan VSN, µg	% Geri Kazanım *	BSS** %
İdrarda VSN	7,62	7,00;7,60;7,50;7,50;7,60	97,63±3,85	3,36
	13,06	13,34;12,56;13,04;13,40;13,10	100,2±2,91	2,52
	21,77	22,04; 21,50; 21,45; 21,56;21,50	99,26±1,94	1,12
İdrarda Tablet	7,62	7,45;7,50;7,74;7,80;7,75	100,3 ±2,36	2,09
	13,06	13,56;12,61;13,04;13,48;13,00	100,5 ± 3,10	2,96
	21,77	21,76;21,56;21,72;21,85;21,94	99,98 ± 1,10	0,65

*Ortalama ± ts/ √N (N=5) eşitliğine göre , % 95 güven seviyesinde hesaplanmıştır.

** Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

5.5 Geliştirilen Elektroanalitik Yöntemlerin Validasyon Parametrelerinin İncelenmesi

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

5.5.1 Doğrusal Çalışma Aralığı

Geliştirilen analitik yöntemlerle, değişen VSN derişimine karşılık ortalama pik akımları grafiğe geçirilerek iki farklı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. DPAAAdSV yöntemi için elde edilen kalibrasyon grafiğinde ortalama pik akımları $8,0 \times 10^{-7}$ mol/L ile $7,0 \times 10^{-6}$ mol/L derişim aralığında doğrusal sınırlar oluşturmaktadır. KDAAdSV yöntemi ise $5,0 \times 10^{-7}$ ile $5,0 \times 10^{-6}$ mol/L derişim aralığında doğrusal olarak değişmektedir. Kalibrasyon çalışmalarından elde edilen değerler en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilmiştir ve elde edilen kalibrasyon parametreleri çizelge 5.7’de verilmiştir.

Çizelge 5.7 VSN tayini için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak hesaplanan regresyon parametreleri

Parametreler	KDAAdSV	DPAAdSV
Doğrusal çalışma aralığı, μM	0,5 □ 5,0	0,8 □ 7,0
Potansiyel, V	1,104	1,056
Regresyon eşitliğinin eğimi (m), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,1871	0,0247
Regresyon eşitliğinin kesim noktası (b), μA	0,0377	0,049
Eğimin standart sapması (s_m), $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	0,0067	0,0015
Kesim noktasının standart sapması (s_b), μA	0,0026	0,0024
Regresyon katsayısı (R^2)	0,9939	0,9944
Gözlenebilme sınırı (LOD), μM	0,2932	0,1824
Alt tayin sınırı (LOQ), μM	0,9676	0,6021
Gün-içi akım tekrarlanabilirliği (% BSS)*	0,717	0,225
Günler-arası akım tekrarlanabilirliği (% BSS)**	4,151	5,917
Gün-içi potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS)*	0,452	0,093
Günler-arası potansiyel tekrarlanabilirliği (% BSS)**	2,063	0,833

5.5.2 Doğruluk

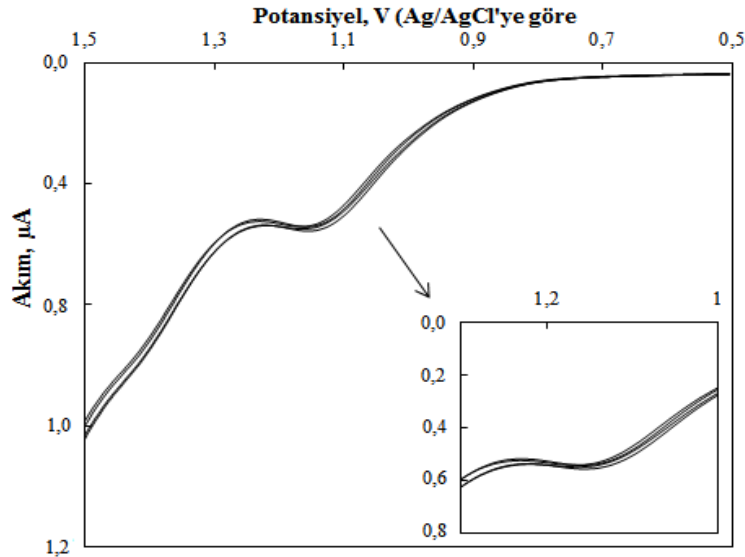
Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Geliştirilen yöntemlerin analitik uygulamaları için doğruluğu incelenmiştir. Geliştirilen yöntemlerin analitik uygulamalarında yöntemin doğruluğu araştırıldı. Bunun için, çalışma hücrelerine son derişimi doğrusal çalışma aralığında olacak şekilde bilinen miktarlarda VSN eklenerek bu çözeltilerden önerilen yönteme ait kalibrasyon parametreleri kullanıldı, geri kazanım miktarı ve geri kazanım % si hesaplandı. Çizelgeler 5.5, 5.6 ve 5.7’de verilen sonuçlardan da anlaşılacağı üzere KDAAdSV yönteminin % geri kazanım değerleri tablet çözeltileri için %100,6 civarında iken, idrar örneklerinde bu değer % 99,08 ile %101,9 arasında bulundu. Aynı şekilde DPAAdSV yönteminde tablet numuneleri için %100,6 civarında iken, idrar numuneleri için %97,63 ile %100,5 arasında değiştiği görüldü.

Sonuç olarak, geliştirilen yöntemlerin doğruluklarının oldukça iyi olduğu ve herhangi bir girişim etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

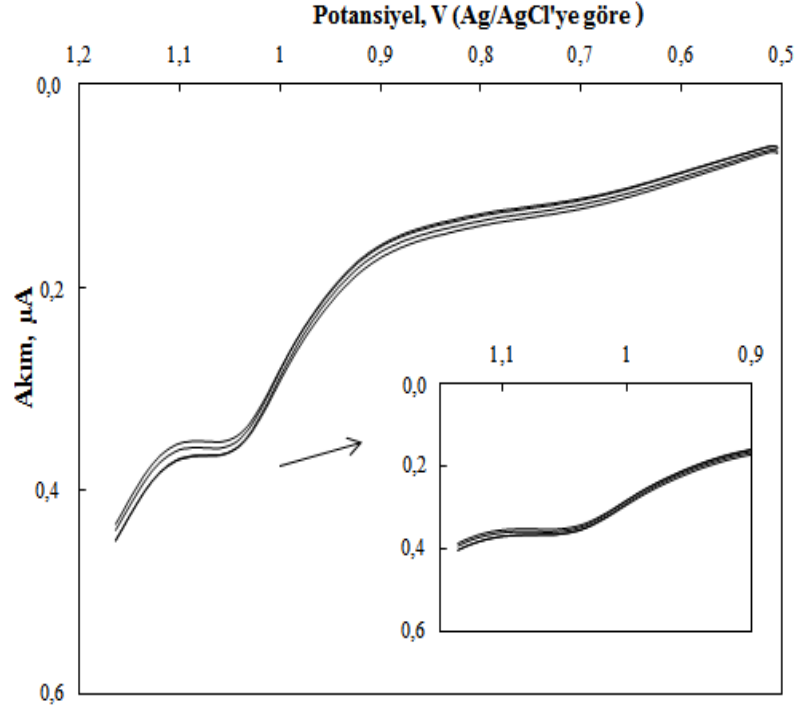
5.5.3 Tekrarlanabilirlik

5.5.3.1 Aynı çözelti (gün içi) için pikin tekrarlanabilirliği

1×10^{-6} M VSN içeren, pH değeri 3,0'e ayarlanan çözelti kullanılarak optimum koşullarda camı karbon elektrotta +1,1 V'da biriktirme yapıldıktan sonra, hem DPAAAdSV hem de KDAAdSV yöntemi ile voltamogramlar alındı. Yapılan bu işlem ardı ardına beş kez tekrarlandı. Elde edilen piklerde pik akımı ve pik potansiyelinin tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla, sıyırma voltamogramları üst üste çakıştırıldı ve Şekil 5.17 ve 5.18'de verildi. Aynı gün, aynı çözeltide ardı ardına beş defa alınan sıyırma voltamogramından elde edilen pik akımlarının bağıl standart sapma (B.S.S) değerleri, DPAAAdSV yöntemi için % 0,17; KDAAdSV yöntemi için ise % 0,18 olarak hesaplandı. Pik potansiyelleri için B.S.S değerleri ise DPAAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri için sırasıyla % 0,15 ve % 0,13 olarak hesaplandı. Sonuç olarak, aynı gün için sıyırma pikinin akım ve potansiyel değerlerindeki tekrarlanabilirliğin oldukça iyi olduğu belirlendi.



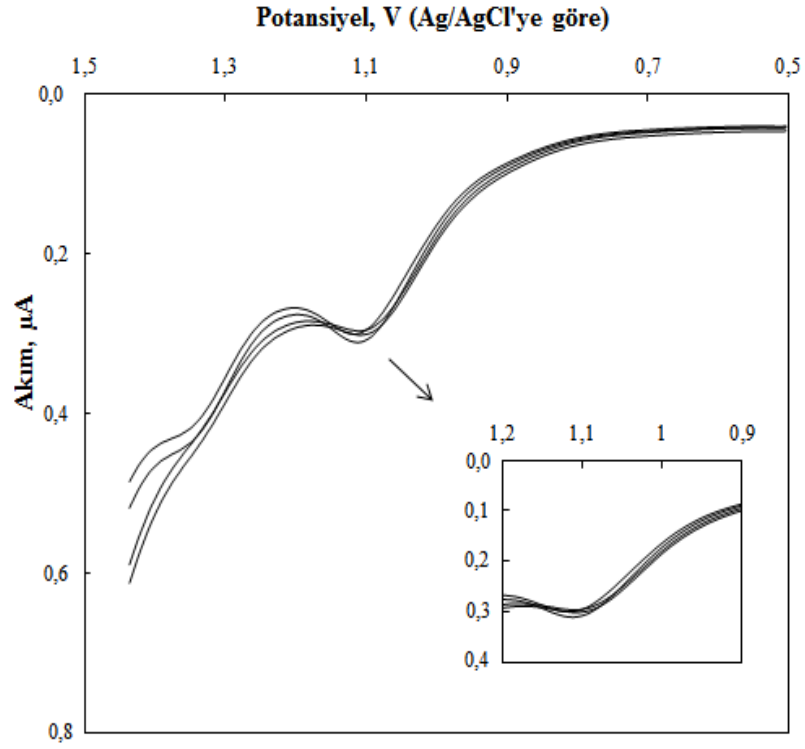
Şekil 5.17 DPAAAdSV yöntemi için aynı günde yapılan ardışık ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 800 mV; t_{bir} : 60 s, pH: 3,0; C_{VSN} : $1,0 \times 10^{-6}$ M)



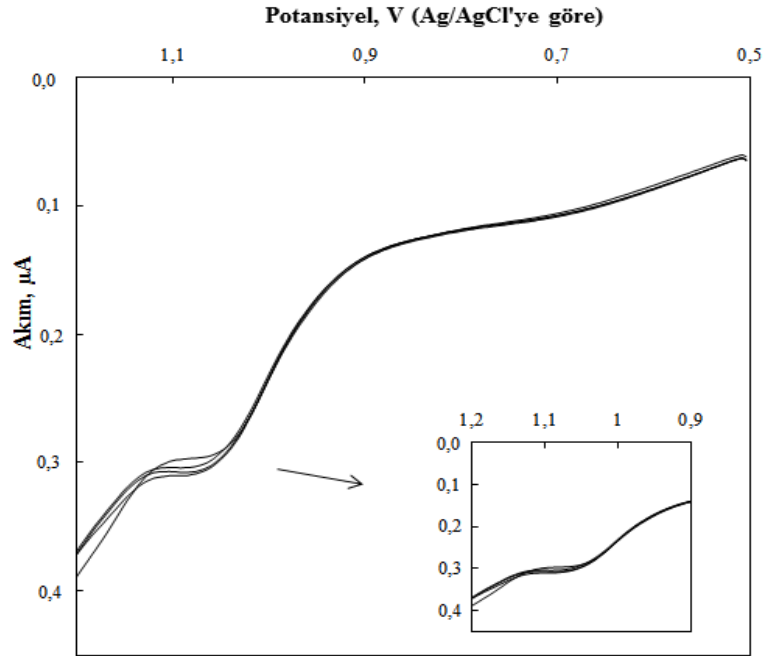
Şekil 5.18 KDAAdSV yöntemi için aynı günde yapılan ardışık ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45 s, pH: 3,0; C_{VSN} : $1,0 \times 10^{-6}$ M)

5.5.3.2 Farklı çözeltiler (günler arası) için pikin tekrarlanabilirliği

Farklı zamanlarda hazırlanan beş farklı çözeltide, optimum koşullarda CKE' de biriktirme yapıldıktan sonra, DPAAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri için voltamogramlar alınmıştır. Bu işlemler her iki yöntem için de 5'er kez tekrarlandı. Elde edilen bu piklerde pik akımı ve pik potansiyelinin farklı günlerdeki tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla, sıyırma voltamogramları üst üste çakıştırılmıştır (Şekil 5.19 - 5.20). Farklı günlerde, aynı derişimdeki çözeltiden ardı ardına beş defa alınan sıyırma voltamogramlarının kaydedilmesiyle VSN'ye ait pik akımlarının bağıl standart sapma (B.S.S) değerleri hesaplanmıştır. DPAAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri için B.S.S değerleri sırasıyla % 2,82 ve % 2,010 olarak hesaplanmıştır. VSN'ye ait pik potansiyellerinin B.S.S değerleri ise DPAAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri için sırasıyla % 0,84 ve % 2,06 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, farklı günler için sıyırma pikinin akım ve potansiyel değerlerindeki tekrarlanabilirliğin oldukça iyi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.19 DPAAdSV yöntemi için farklı günlerde yapılan ardışık ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 800 mV; t_{bir} : 60 s, pH: 3,0; C_{VSN} : $1,0 \times 10^{-6}$ M)



Şekil 5.20 KDAAdSV yöntemi için farklı günlerde yapılan ardışık ölçümlere ait voltamogramlar (E_{bir} : 200 mV; t_{bir} : 45 s, pH: 3,0; C_{VSN} : $1,0 \times 10^{-6}$ M)

5.5.4 Kesinlik

Geliştirilen yöntemlere ait kesinlik değerleri pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği ile birlikte analitik uygulamalarda elde edilen geri kazanım değerlerinin bağıl standart sapmaları (BSS) ile test edildi. Yöntemlerin analitik uygulamaları sonucu geri kazanım değerlerinin kesinliğine bakılınca KDAAdSV yönteminde tablet örnekleri için BSS değeri % 3,47 civarında bulunurken, idrar örnekleri için % 1,1 ile % 4,25 arasında bulundu. Aynı parametre DPAAAdSV yönteminde tablet analizi için % 1,94 civarında hesaplanırken, idrar numuneleri için % 0,65 ile % 3,36 arasında bulundu. Çizelgeler 5.5 - 5.6'dan da görüldüğü gibi geri kazanım deneylerine ait BSS değerleri çözeltide artan VSN derişimi ile azalmakta olduğu görüldü.

5.5.5 Duyarlılık

Yöntemlerin VSN moleküllerine karşı duyarlılığı kalibrasyon eğimleri kullanılarak karşılaştırıldı. Buna göre KDAAdSV yönteminin duyarlılığı DPAAAdSV yönteminin duyarlılığının yaklaşık olarak 7,5 katı civarındadır. Bu sonuca göre, VSN için KDAAdSV yönteminin daha duyarlı olduğu söylenebilir.

5.5.6 Seçicilik

Gerek idrar çözeltilerinde gerekse serum örneklerde çalışmalar yapılırken çalışma hücrelerine VSN eklemesi yapılmadan önce aynı potansiyel aralığında voltametik ölçümler yapılmış ve VSN molekülüne ait yükseltgenme pikinin akım ve potansiyel değerini etkileyecek herhangi bir voltametik sinyal ile karşılaşılması (Şekil 5.11 - 5.12). Sadece pik potansiyelinde KDAAdSV yönteminde yaklaşık 50-60 mV'luk DPAAAdSV yönteminde ise 10-15 mV arasında daha küçük değerlere kayma olduğu gözlemlendi. Yani çalışmaların dayandırıldığı yükseltgenme potansiyeli, farklı biyolojik ortamlarda bile VSN moleküllerine özgü bir değer olduğu bir değerdir.

5.5.7 Gözlenebilme sınırı

Geliştirilen analitik yöntemlere uygulanan kalibrasyon grafikleri en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilmiştir ve gözlenebilme sınırı $3s/m$ bağıntısı kullanılarak hesaplanmıştır. Eşitlikte verilen s kalibrasyon grafiğinin kesim noktasının standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eşitliğinin eğimidir. Bu eşitliğe göre DPAAAdSV yönteminin gözlenebilme sınırı $1,824 \times 10^{-7}$ mol/L olarak hesaplanırken, KDAAdSV yönteminin gözlenebilme sınırı ise $2,932 \times 10^{-7}$ mol/L olarak hesaplanmıştır.

5.5.8 Alt tayin sınırı

Geliştirilen yöntemler için alt tayin sınırı $10s/m$ bağıntısı kullanılarak hesaplanmıştır. Eşitliğe göre DPAAAdSV yönteminin alt tayin sınırı $6,021 \times 10^{-7}$ mol/L olarak hesaplanırken, KDAAdSV yönteminin alt tayin sınırı $9,676 \times 10^{-7}$ mol/L olarak hesaplanmıştır.

5.5.9 Sağlamlık

Geliştirilen yöntemlerin performans parametreleri ortam şartlarındaki ve deneysel koşullardaki (oda sıcaklığı, tampon derişimi, pH, biriktirme süresi, biriktirme potansiyeli... vb) küçük değişikliklerden ($\pm 2\%$) analiz performansını ciddi şekilde değiştirecek kadar etkilenmemekte olduğu tespit edildi.

5.6 Farklı Yöntem Sonuçlarının ve Parametrelerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

VSN tayininde geliştirilen DPAAAdSV ve KDAAdSV yöntemlerin doğruluk ve kesinlikleri % 95 güven seviyesinde t testi ve F testi uygulanarak karşılaştırıldı. Bu iki yöntemin, doğrudan kalibrasyon yöntemlerinin kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığını incelemek amacıyla F testi uygulanmıştır. F_d değerlerini bulmak için Eşitlik 5.8'den yararlanılmıştır. Eşitlik 5.8'de verilen standart sapma değerleri (eğimin standart sapması, s_m), kalibrasyon çalışmalarında elde edilen değerlerin en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilmesiyle hesaplanmıştır. DPAAAdSV ve KDAAdSV

yöntemlerinden elde edilen geri kazanım değerlerinin doğrulukları arasında bir fark olup olmadığını araştırmak için de t testi uygulanmıştır. t testi Eşitlik 5.9 ve Eşitlik 5.10'den yararlanılarak uygulanmıştır. % 95 güven seviyesinde 6 serbestlik derecesi için $t_{kritik} = 2,45$ olarak belirlenmiştir. Hesaplanan değerler çizelge 5.8'de verilmiştir.

$$F = \frac{(s_1)^2}{(s_2)^2} \quad (5.8)$$

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_1} (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_{j=1}^{N_2} (x_j - \bar{x}_2)^2 + \sum_{k=1}^{N_3} (x_k - \bar{x}_3)^2 + \dots}{N_1 + N_2 + N_3 = \dots - N_1}} \quad (5.9)$$

$$t_{deneysel} = \frac{x_1 - x_2}{s_b \sqrt{\frac{(N_1 + N_2)}{(N_1 \cdot N_2)}}} \quad (5.10)$$

Çizelge 5.8 Yöntemlerin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında kullanılan analitik veriler

Yöntem	KDAAdSV	DPAAdSV
F_{kritik}^*	4,28	4,28
$F_{deneysel}$	1,22	3,76
t_{kritik}^*	2,45	2,45
$t_{deneysel}$	0,47	2,42

*Kritik değerler %95 güven seviyesinde serbestlik derecesi 6 için verilmiştir.

Çizelge 5.8'de hesaplanan veriler yorumlandığında, KDAAdSV ve DPAAdSV yöntemleri için $F_{deneysel} < F_{kritik}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, DPAAdSV ve KDAAdSV yöntemleri için doğrudan kalibrasyon yöntemi ile anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Doğrudan kalibrasyon ile elde edilen geri kazanım değerlerinin

doğrulukları incelendiğinde, KDAAdSV ve DPAAAdSV yöntemleri için $t_{deneyse} < t_{kritik}$ olarak bulunmuştur. KDAAdSV yönteminin eğimine bakıldığında duyarlılığının DPAAAdSV yönteminden daha yüksek olduğu görülmüştür. KDAAdSV yönteminin eğimi daha büyük olduğu için bu yöntemle daha düşük alt tayin sınırlarına inilebilir.

Geliştirdiğimiz yöntemler, UV spektroskopisi yöntemi ile karşılaştırılmış ve kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla F testi uygulanmıştır. Çizelge 5.9’da verilen sonuçlara göre, $F_{deneyse} < F_{kritik}$ bulunmuştur. Buna göre yöntemlerin kesinlikleri arasında bir fark olmadığı söylenebilir. Buna ilaveten, geliştirdiğimiz voltametrik yöntemler ve UV spektroskopisi yönteminden elde ettiğimiz geri kazanım çalışmalarının doğrulukları arasında bir fark olup olmadığını araştırmak için t testi uygulanmıştır. UV spektroskopisi ile karşılaştırılan voltametrik yöntemler için elde edilen t_d değerleri, % 95 güven seviyesinde $n=6$ serbestlik derecesi için 2,23 olan t_k değeri ile karşılaştırılmıştır ve yöntemlerin doğrulukları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Çizelge 5.9 Geliştirilen yöntemlerin UV spektroskopisi ile karşılaştırılması

Karşılaştırılan Yöntemler	$t_{deneyse}$	t_{kritik}	$F_{deneyse}$	F_{kritik}
DPAAAdSV-UV	2,34	2,23	2,46	5,05
KDAAdSV-UV	1,49	2,23	1,16	5,05

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, hipertansiyon ilacı olan VSN'nin voltametrik yöntemler kullanılarak elektrokimyasal yükseltgenme davranışı incelenmiştir. Voltametrik davranışlarına bağlı olarak VSN'nin hem tabletlerde hem de biyolojik numunelerde analizi için yöntemler geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemler kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

1) Valsartan'ın elektrokimyasal yükseltgenmesi camısı karbon elektrot yüzeyinde BR tamponu ortamında farklı pH'larda gerçekleştirildi. Valsartan'ın dönüşümlü voltamogramı alındığında (pH: 2,0-9,0) tek bir yükseltgenme pikine rastlanmıştır. Geri döngüde herhangi bir pike rastlanmamıştır. Buna göre yükseltgenme reaksiyonunun tersinmez olabileceği ve difüzyonun yanında adsorpsiyonunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

2) VSN'nin elektrokimyasal yükseltgenme mekanizmasının $2e^-$, $1H^+$ vererek, tersiyer amin grubundan daha kolay yükseltgenebileceği ve yükseltgenmesinin bu grup üzerinde başladığı düşünülmüştür. Olası reaksiyon mekanizması önerilmiştir.

3) VSN'nin, hem tabletlerde hem de biyolojik numunelerde tayini için KDAAdSV ve DPAAAdSV yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin duyarlılıkları bakımından KDAAdSV daha iyi duyarlı olduğu belirlenmiştir.

4) Geliştirilen her iki yöntemin doğruluğunu belirlemek için, hem tabletlerde hem de biyolojik numunelerde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. İlaç katkı maddelerinin ve biyolojik numunelerde bulunabilecek diğer türlerin herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

5) Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğin BSS değerlerinin % 5 değerinin altında olduğu bulunmuştur. Her iki yöntemin de kesinliğinin oldukça iyi olduğu sonucuna varılmıştır.

6) Geliştirilen voltametrik sıyırma yöntemleri, literatürde verilen spektroskopik (UV) yöntemi ile istatiksels olarak karşılaştırılmış ve her iki yöntemin % 95 güven seviyesinde doğrulukları arasında herhangi bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

7) Geliştirilen voltametrik sıyırma yöntemlerinin, ekonomik, hızlı, duyarlı olması, az miktarda numune ile çalışılması ve ayırma gibi zaman alıcı işlemlere gerek duyulmadan analiz yapılabilmesi gibi üstünlüklerinden dolayı literatürde verilen kromatografik yöntemlere alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Altıokka, G.,1995. Doksazosin'in elektroanalitik ve bazı yöntemlerle miktar tayini. Doktora tezi. pp. 2.
- Anonim. 2012. Valsartan. Web sitesi <http://www.ilacpedia.com/diovan-film-tablet>. Erişim Tarihi: 09.04.2012.
- Anonim. 2012. Diovan. Web sitesi <http://www.ilacprospektusu.com/ilac/127/diovan-80-mg-28-film-kapli-tablet>. Erişim Tarihi: 09.04.2012.
- Anonymous. 2012. Valsartan. Web sitesi <http://en.wikipedia.org/wiki/Valsartan>. Erişim Tarihi: 09.04.2012.
- Aycan, Ş. 1994. Polarografik ve Voltametik teknikler, 269 s., Yıldız Teknik Üniversitesi Yayını, İstanbul.
- Aydın, Ö., Yayla, B., Mola, F.2004. Anjiotensin II Reseptör Antagonisti (Valsartan) Kullanımına Bağlı Anjiödem KBB-Forum. Vol.3; pp.2
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R. 2001. Electrochemical methods: Fundamentals Applications, John Wiley and Sons. Inc. New York
- Berzas Nevado, J.J., Rodriguez Flores, J., Castaneda Penalvo, G. 1999. Electroanalysis. Vol. 11; pp. 268
- Bond, A.M. and Canterford, D.R. 1972. Analytical Chemistry.
- Brett, C.M.A. and Brett, A.M.O. 1993. Electrochemistry, Principles, Methods and Applications. Oxford University Press, New York.
- Durmuş, Z. 1995. Voltametik sıyırma teknikleri ve analitik uygulamaları. Ankara.
- Franco OH, Peeters A, Bonneux L, de Laet C. 2005. Blood pressure in adulthood and life expectancy with cardiovascular disease in men and women. Hypertension. Vol.46; pp.280-286.
- Greef, R., Peat, R., Peter, M.L., Robinson,J.1990.Instrumental methods in electrochemistry, England: Ellis Horwood.
- İladou, E.N., Girousi, S.T., Dietze, U., Otto, M.,Voulgaropoulos, A.N., Papadopoulos, C.G. 1997. Simultaneous determinaton of nickel, cobalt, cadmium, lead and copper by adsorptive voltammetry using 1- phenylpropane-1-pentylsulfonylhyrazone-2-oxime as a chelating agent. Analyst, Vol.122; pp. 597-600.
- Izutsu, K. 2002. Electrochemistry in nonaqueous solutions.
- Kissinger, P.T. 1998. Cyclic voltammetry experiment, *Journal of Chemical Education*, 60(9), 772.
- Koseki, N., Kawashita, H., Hara, H., Niina, M., Tanaka, M., . Kawai, R., Nagae, Y., Masuda, N. 2007. Journal Pharmacology., Biomedical Analytical. Vol. 43; pp. 1769.
- Lukas, J., Goossen and Bettina M. 2007. Synthesis of Valsartan Via Decarboxylative Biaryl Coupling. *J. Org. Chem.* Vol. 72; pp. 7473 -7476.
- Mülazımoğlu, İ., E., 2008. Camsı karbon elektrot yüzeyine çeşitli flavonoid türevlerinin modifikasyonu, yüzey karakterizasyonu, elektrokimyasal ve spektroskopik özelliklerinin incelenmesi.doktora tez.

- Nadeem, S., Asif, H., Lakshita, C., Shamsheer, A. 2011. Moloy Mitra and Parminder S. Bhasin Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Valsartan: A Review Journal of Applied Pharmaceutical Science 01 (04); 12-19.
- Nesrin, T., Süner, A. 2008. Hipertansif olgularda non-farmakolojik yöntem ve antihipertansif ilaç kullanımının analizi Göztepe Tıp Dergisi 23(4):133-142.
- Nie, J., Zhang, M., Fan, Y., Xiang, B. Feng, Y.Q., 2005. Journal Chromatography. pp. 62.
- Öztürk, F. Taşdemir, İ.H., Durmuş, Z. ve Kılıç, E. 2010. Electrochemical behavior of disopyramide and its adsorptive stripping determination in pharmaceutical dosage forms and biological fluids Collect. Czech. Chem. Commun. 75, pp.685-702.
- Öztekın, Y., Yazıcıgil, Z. 2009. Preparation and characterization of a 1,10-phenanthroline-modified glassy carbon electrode. Electrochimica Acta, Volume 54, Issue 28, pages 7294-7298
- Pravda, M., (1998) Application of electrochemical sensors and detection system in biomedical analysis. Thesis presented to fulfil the requirements for the of doctor in Pharmaceutical Sciences. Vrije Universiteit, Brussel.
- Saydam, M., Takka, S., Fabad, J., 2007. scientific review. J. Pharm. Sci.Vol. 32; pp. 185-196.
- Shrikant H. Patil, Minakshi V.Janjale, Novel and validated titrimetric method for determination of selected angiotensin II receptor antagonists in pharmaceutical preparations and its comparison with UV spectrophotometric Determination. Journal of Pharmaceutical Analysis 2011.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. and Crouch, S.R. 2004. Analitik kimya temel ilkeler. Çeviri, Sekizinci baskı, Ankara.
- Soydan I. 2003. Hipertansiyonla ilgili TEKHARF çalışması verileri ve yorumu. In: Onat Deneyimine göre Türk Eriskinlerinde Kalp Sağlığı. İstanbul ARGOS iletişim Hizmetleri.
- Tural,H. 2001. Kronopotansiyometrik Sıyırma(PSA), Eser Analiz Yaz Okulu Kitabı Ed., Henden, E., Gökçel, İ., Ertaş, F.N., Ege Üniversitesi, 189-196.
- Wang, J., 1988. Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, VCH Publishers, Inc., New York.
- Wang, J. 1994. Analytical Electrochemistry, VCH publishers, Inc., New York. pp. 45-51.
- Wang, J. 2006. Analytical Electrochemistry, methodology and applications of dynamic techniques, New Jersey.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Nedim GÜRLER
Doğum yeri :Gaziantep
Doğum Tarihi :15.03.1986
Medeni Hali :Bekar
Yabancı Dili :İngilizce
e-posta :nedim2721@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise :19 Mayıs Lisesi Şahinbey/Gaziantep
Lisans :Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2010)
Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (Eylül2010- Temmuz 2012)

Katıldığı Kongreler

Valsartan'ın Tayini için anodik adsorptif sıyırma yönteminin geliştirilmesi. 9. Elektrokimya Kongresi. Çeşme/İzmir (Poster sunumu).