

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**BUDESONİDİN ELEKTROKİMYASAL  
DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ VE  
VOLTAMMETRİK YÖNTEMLE MİKTAR TAYİNİ**

**ORKHAN YOLCHUYEV**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. ZEYNEP AYDOĞMUŞ**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
TEZLİ YÜKSEK LİSANS**

**İSTANBUL-2021**

## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yanımda olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep Aydoğmuş'a,

Bu tez çalışmasının yapılmasına olanak sağlayan her konuda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sıdıka Toker'e,

Bana her türlü yardımlarıyla destek olan Anabilim Dalımız Öğretim üyesi, Sayın Arş. Gör. Dr. Ece Merve Yılmaz'a,

Her zaman her koşulda bana desteğini esirgemeyen, hep yanımda ve arkamda olduklarını hissettiren babam Mehman Yolchuyev, annem Khalida Yolchuyeva ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2020-35210.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	Vİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİ
ÖZET .....	XİV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Budesonid Hakkında Genel Bilgi .....	3
2.1.1. Kortikosteroidler .....	3
2.1.2. Budesonidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
2.1.3. Farmakolojik Özellikleri .....	6
2.2. Literatürde budesonidin miktar tayini yapılmış çalışmalar .....	9
2.3. Elektroanalitik Yöntemlerin Kuramsal Temelleri .....	17
2.3.1. Elektrokimyasal Olaylarda Kütle Aktarım Mekanizmaları .....	17
2.3.2. Elektrokimyasal hücreler .....	18
2.3.3. Elektrokimyasal Hücre Potansiyeli .....	19
2.3.4. Elektroanalitik Yöntemler .....	19
2.4. Voltametri .....	20
2.4.1. Voltametri uyarma sinyalleri.....	21
2.4.2. Dönüşümlü voltametri (CV) .....	22
2.4.2.1. Tersinir reaksiyonlar .....	23
2.4.2.2. Tersinmez reaksiyonlar .....	25
2.4.2.3. Yarı tersinir reaksiyonlar.....	26
2.4.3. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) .....	27
2.5. Voltametri Tekniğinde Kullanılan Çalışma Elektrotları .....	28
2.5.1. Cıva elektrotlar.....	29

2.5.2. Platin, altın ve diğer soy metal elektrotlar .....	29
2.5.3. Karbon elektrotlar .....	29
2.5.3.1. Elektrotların temizlenmesi .....	30
2.5.4. Voltametri Tekniğinde Kullanılan Referans Elektrotlar .....	31
2.5.4.1. Kalomel referans elektrot .....	31
2.5.4.2. Gümüş-gümüş klorür referans elektrot .....	31
2.5.5. Voltametri Tekniğinde Kullanılan Yardımcı (Karşıt) Elektrotlar.....	32
2.6. Modifiye Elektrotlar.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1. Aletler ve Gereçler .....	33
3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	35
3.3. Hazırlanan Çözeltiler .....	36
3.3.1. Budesonid Stok Çözeltisi .....	36
3.3.2. Tampon Çözeltiler.....	37
3.4. Etken Madde ve İlaç .....	38
3.4.1. Karbon pasta elektrotların hazırlanması .....	38
3.5. Budesonidin tayini .....	38
3.5.1. Elektrokimyasal deneylerin yapılışı.....	38
3.5.2. Döngüsel Voltametik (CV) Deneylerin Yapılışı .....	39
3.5.3. DPV'nin Yapılışı ve Ölçü Eğrisi .....	39
3.5.4. DPV'nin ilaç formülasyonunun uygulanması.....	39
3.6. Elektrokimyasal Yöntemlerde Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi .....	40
3.6.1. Doğrusallık ve doğrusal aralık .....	40
3.6.2. Doğruluk ve Kesinlik .....	40
3.6.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin sınırları (LOQ) .....	40
4. BULGULAR.....	42
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar .....	42
4.1.1. Denenen Çalışma elektrotları.....	42
4.1.2. Elektrolit Çözeltisinin Seçimi ve pH etkisi.....	43
4.1.3. Tarama hızı etkisi.....	47
4.1.4. Budesonidin muhtemel reaksiyon mekanizması.....	51
4.1.5. Ölçü eğrisinin hazırlanması .....	51
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu .....	54

4.2.1. Doğrusallık ve doğrusal aralık .....	54
4.2.2. Duyarlılık (Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)) .....	54
4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik .....	55
4.2.4. Seçicilik.....	56
4.2.5. Elektrot stabilitesi ve tekrar üretilebilirlik .....	56
4.3. Budesonidin inhalasyon süspansiyon ampullerinde miktar tayini.....	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	59
KAYNAKLAR .....	62
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	70
ÖZGEÇMİŞ .....	71



**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2.1 Budesonidin miktar tayini için kayıtlı likit kromatografisi çalışmaları.....	9
Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, onların saflıkları ve temin edildiği firmalar .....	35
Tablo 4.1 Budesonid standart çözeltinin (10 µg/mL) KPE üzerinde değişik elektrolit çözeltisindeki potansiyel ve akım değerleri (N=3).....	46
Tablo 4.2 0,1 M HCl- %13 KCl-%8 metanol çözeltisinde budesonidin elektrot değiştirilmeden test edilen artan tarama hızındaki Ep ve Ip değerleri (N=3).....	48
Tablo 4.3 Budesonid standart çözeltisinin 1,65-35,35 µg/mL konsantrasyon aralığında elde edilen ölçü eğrisine ait akım (Ip) değerleri ve istatistiksel verileri.....	53
Tablo 4.4 Tablo 4.3'teki ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler .....	53
Tablo 4.5 Günlük yapılan budesonid analizlerin tekrarlanabilirliği .....	55
Tablo 4.6 Günlerarası yapılan budesonid analizlerin tekrarlanabilirliği .....	56
Tablo 4.7 10 µg /mL budesonid içeren süspansiyon ampullerde yapılan tayin sonuçları .....	58

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Budesonid molekülünün kimyasal yapısı .....	4
Şekil 2.2 Budesonidin UV spektrumu (asetonitril/metanol çözeltisi) .....	5
Şekil 2.3 Budesonidin KBr1 diskinde alınan FT-IR spektrumu .....	5
Şekil 2.4 Budesonidin Raman spektrumu .....	6
Şekil 2.5 Budesonidin Kütle Spektrumu (MS) .....	6
Şekil 2.6 Budesonid içeren ilaç çeşitleri .....	8
Şekil 2.7 Elektrokimyasal hücrede yük aktarım şekilleri .....	18
Şekil 2.8 Elektrokimyasal hücre şeması .....	19
Şekil 2.9 Elektroanalitik yöntemlerin şematik olarak genel bir sınıflandırılması .....	20
Şekil 2.10 Voltametrik tekniklerin şematik olarak genel bir sınıflandırılması .....	21
Şekil 2.11 Voltametri de kullanılan uyarma sinyalleri .....	22
Şekil 2.12 Dönüşümlü voltametri de uygulanan potansiyelin zamanla değişmesi: .....	23
Şekil 2.13 Redoks reaksiyonunun döngüsel voltamogramı .....	23
Şekil 2.14 Tersinir bir reaksiyonun dönüşümlü voltamogramı .....	24
Şekil 2.15 Yarı tersinir bir elektrot reaksiyonunda pik akımının tarama hızının kareköküne oranı .....	26
Şekil 2.16 Diferansiyel puls voltametri için uyarma sinyalleri .....	27
Şekil 2.17 Voltametri de kullanılan elektrotlarının sınıflandırılması .....	28
Şekil 2.18 Cıva elektrotlar .....	29
Şekil 2.19 Karbon pasta elektrot (MF-2010) ve Karbon pasta (CF-1010) .....	30
Şekil 2.20 GCE ve elmas elektrotların temizleme malzemeleri ve yöntemi .....	30
Şekil 2.21 Gümüş / Gümüş klorür (Ag/AgCl) referans elektrodu .....	31
Şekil 2.22 Platin tel yardımcı elektrot .....	32
Şekil 3.1 BASi Epsilon markalı elektrokimyasal çalışma cihazı .....	34
Şekil 3.2 BASi C3 elektrot hücre standı ünitesi .....	34
Şekil 4.1 Budesonidin (2 µg/mL) çalışma elektrodu olarak KPE ve %10 grafen modifiye KPE ile 0,1 M HCl çözeltisinde alınmış döngüsel voltamogramları .....	42
Şekil 4.2 10 µg/ mL Budesonid çözeltisinin KPE (1), GCE (2), MWCN (3) ve %25 Gr (4) ile CV voltamogramları (v: 0,1 V/s) .....	43
Şekil 4.3 Budesonidin 0.0 mV ile -1400 mV aralığında 10 µg/mL konsantrasyonda farklı pH'lardaki döngüsel voltamogramları .....	45

Şekil 4.4 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin pH'ına karşı Ip grafiği .....	46
Şekil 4.5 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin pH'ına karşı Ep grafiği .....	47
Şekil 4.6 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin 0,0 mV ile -1400 mV aralığında seçilen çözeltide 20-200 mV/s aralığında tarama hızları. ....	48
Şekil 4.7 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin akıma karşı tarama hızı grafiği .....	49
Şekil 4.8 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin pik potansiyeline karşı tarama hızı grafiği. ....	49
Şekil 4.9 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin akımın logaritmasının karşı tarama hızının logaritmasına olan grafiği .....	50
Şekil 4.10 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin akıma karşı tarama hızının kareköküne olan grafiği.....	50
Şekil 4.11 Budesonidin değişik konsantrasyondaki diferansiyel puls voltamogramları.Çalışma elektrodu: KPE, Referans elektrot Ag/AgCl ve karşıt elektrot: Platin elektrot. Tarama hızı: 20 mV/s, 100 µA.....	52
Şekil 4.12 Budesonidin 1,65-35,35 µg/mL konsantrasyon aralığındaki ölçü eğrisi.....	54
Şekil 4.13 Budesonidin KPE ile alınan DPV voltamogramları. Boş elektrolit çözeltisi (a) ve farmasötik preparatlarında (10 µg/ mL) (b).....	57

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı  
HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi  
UHPLC: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi  
LC: Sıvı kromatografisi  
GC: Gaz kromatografisi  
MS: Kütle spektrometrisi  
UV: Ultraviyole  
FT-IR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi  
HIV: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü  
MDI: Ölçülü doz inhalasyonu  
DPI: Kuru Toz inhaler  
IPC: İyon çifti kromatografisi  
RIA: Radyo immün testi  
FT-ICR: Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonansı  
FPD: Alev fotometrik dedektörü  
SEDS: Süperkritik akışkanlar tarafından solüsyonla geliştirilmiş dispersiyon  
MRM: Çoklu reaksiyon izleme  
APCI: Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon  
NRTL-SAC: Rastgele olmayan iki sıvı- segment etkinlik katsayısı  
 $E^0_{\text{hücre}}$ : Başlangıç hücre potansiyeli  
R: Molar gaz sabiti  
T: Mutlak sıcaklık  
N: Aktarılan elektronların oranı sayısı  
F: Faraday sabiti  
Q: İyonların aktivite oranı  
PG: Polarografi  
Hg: Cıva  
CV: Dönüşümlü voltmetri  
LSV: Doğrusal taramalı voltmetri  
SWV: Kare dalga voltmetri  
DPV: Diferansiyel puls voltmetri

NPV: Normal puls voltametri  
SV: Sıyırma voltametrisi  
 $I_p$ : Akım yoğunluğu,  $A/cm^2$ ;  
D: Difüzyon katsayısı,  $cm^2/s$ ;  
v: Tarama hızı,  $V/s$ ;  
 $C_o$ : Ox türünün ana çözelti konsantrasyonu  
r: Mikroelektrodun yarıçapı  
KPE: Karbon pasta elektrot  
GCE: Camı karbon elektrot  
GR: Grafen  
MWCN: Çok duvarlı karbon nanotüpler  
SCE: Doygun kalomel elektrot  
LOD: Teşhis sınırı  
LOQ: Tayin sınırı  
LLOQ: Daha düşük tayin sınırı  
SD: Standart sapma  
RSD: Bağlı standart sapma  
Pt: Platin  
Au: Altın  
Ag: Gümüş  
 $Hg_2Cl_2$ : Cıva (I) klorür  
KCl: Potasyum klorür  
HCl: Hidroklorik asit  
KBr: Potasyum Bromür  
 $CH_3OH$ : Metanol  
 $C_2H_5OH$ : Etanol  
 $CH_3COOH$ : Asetik asit  
 $H_2SO_4$ : Sülfirik asit  
 $H_3PO_4$ : Fosforik asit  
 $H_3BO_3$ : Borik asit  
NaOH: Sodyum hidroksit  
 $KH_2PO_4$ : Potasyum dihidrojen fosfat  
BR: Britton Robinson

## ÖZET

Yolchuyev, O. (2021). Budesonidin Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Voltammetrik Yöntemle Miktar tayini. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bir glukokortikosteroid olan budesonid geniş spektrumlu antienflamatuvar ve antialerjik ajandır. Bronşiyal astım, KOAH, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında kolay, hızlı, ucuz ve çok az organik çözücü kullanarak budesonidin preparatında tayin için yeni bir diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemi geliştirildi ve valide edildi. Budesonidin elektrokimyasal davranışları farklı elektrolit ve tampon çözeltilerinde (pH 2 ile 9) döngüsel voltametri (CV) ve DPV ile belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda maddenin en yüksek hassasiyetle %13 KCl ve %8 metanol içeren 0,1M HCl çözeltisinde tayin edilebildiği görüldü. Budesonidin en uygun çalışma aralığının 0,0 mV ile -1400 mV olduğu belirlendi. Yaklaşık -859 mV tersinmez iyi belirlenmiş bir madde indirgenme piki elde edildi.

Maddenin pH-Ep grafikleri incelendiğinde, pik potansiyelinin pH artışıyla negatife doğru kaydığı görülmüştür. Buda reaksiyonda hidrojenin katılmasıyla gerçekleşebileceğini göstermiştir. Maddenin tarama hızı çalışmasında, pik akımının tarama hızı artışı ile doğru orantılı arttığını ve potansiyelinin ise tarama hızı artışı ile daha negatif alana kaydığını göstermektedir. Elde edilen grafiklerden elektrokimyasal reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermiştir. Maddenin tayini için geliştirilen DPV yönteminde pik akımı ile madde konsantrasyonu arasında kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve 1,65 – 35,35 µg/mL aralığında doğrusal ölçü eğrisi elde edildi. Maddenin teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 0,52 µg/mL ve 1,57 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen DPV yöntemi süspansiyon ampullerinde tayinlerine uygulandı. Geliştirdiğimiz yöntem daha önce mevcut olanlara alternatif herhangi bir ön işlem gerektirmeyen hassas, seçici, hızlı ve çevre dostu olup budesonidin tayini ve kalite kontrol laboratuvarlarında rutin analizlerinde başarı ile kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Budesonide, Voltametrik yöntem, Miktar tayini, Farmasötik preparat, Validasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2020-35210.



## ABSTRACT

Yolchuyev, O. (2021). Investigation of Electrochemical Behaviors of Budesonide and Quantification by Voltammetric Method. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. Istanbul.

Budesonide, a glucocorticosteroid, is a broad spectrum of anti-inflammatory and antiallergic agent. It is used in the treatment of bronchial asthmatic COPD, Crohn's disease and ulcerative colitis.

In this thesis, a new differential pulse voltammetry (DPV) method was developed and validated for the determination of budesonide in suspension ampoules, which is easy, fast, inexpensive, and environmentally friendly compared to previously available ones. The electrochemical behavior of budesonide was determined by cyclic voltammetry (CV) and DPV in different electrolyte and buffer solutions (pH 2 - 9). The analysis results showed that drug could be determined with the highest sensitivity in 0.1 M HCl solution containing 13% KCl and 8% methanol. The operating range of drug was determined to be 0.0 mV to -1400 mV. An irreversible well-defined reduction peak of about -859 mV was obtained.

From the examination of pH-Ep graphs, it was observed that the peak potential shifted towards negative with the increase of pH. This showed that the reaction could occur with the addition of hydrogen. In the scanning rate study, the peak current increases with the increase scanning rate, and the potential shifted to more negative area. These showed that the reaction was adsorption controlled. In DPV, calibration curve was linear between 1.65 – 35.35  $\mu\text{g/mL}$ . The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were found as 0.52  $\mu\text{g/mL}$  and 1.57  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The developed method is sensitive and accurate, and can be successfully used for routine analysis in drug determination and quality control laboratories.

Keywords: Budesonide, Voltammetric method, Quantification, Pharmaceutical preparation, Validation

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project Number TYL-2020-35210.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kortikosteroidler (Glukokortikoidler) doğal olarak vucutta böbreküstü bezleri tarafından üretilen hormonlardır. Kortikosteroidler hücrelerin şeker ve yağ kullanımını kontrol eden ve iltihapla savaşılan ve çok çeşitli sağlık sorunlarını tedavi etmek için bağışıklık sistemimizle birlikte çalışan güçlü ilaçlardır. Sentetik kortikosteroidler doğal kortikosteroidlerinki gibi işlevlere sahiptir ve özellikle allerjik inflamasyon hastalıkları için tedavide oldukça önemi vardır.

Kuvvetli bir glukokortikoid olan budesonid antiinflamatuvar bir ajandır. Budesonid başlıca astım, KOAH, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, nezle, üst solunum yollarının ve bağırsakların enflamatuvar durumlarında şişme ve iltihaplanmayı önleyerek ve azaltarak tedavi etmektedir. Kortikosteroidler uzun süreli yüksek dozda kullanımı hiperkortisizme ve adrenal aksın baskılanmasına neden olabilir.

Budesonid tedavisi gören hastalar, tedavinin etkinliğini değerlendirmek ve doz ayarı için semptom, bulgular ve solunum fonksiyon testleri ile takip edilmelidir. Budesonid esas olarak karaciğerde metabolize olduğundan, hepatosit fonksiyonunun bozulmasına ve kanda birikmesine neden olabilir. Bu nedenle, karaciğer hastalıkları olan hastaların yakından izlenmesi gerekir (1). Ayrıca, loop diüretikleri, tiyazid ve tiyazid benzeri diüretikler alan hastalarda birlikte kullanımında, hipokalemi gelişme riski artabilir. Hastalar, budesonid advers reaksiyonlarında tarif edildiği gibi diğer advers olayları tespit etmek için yakın izleme ve takip gerektirir. Budesonid tedavisi alanlarda diğer baş ağrısı, baş dönmesi, burun akıntısı, hapşırma, öksürme, mide bulantısı gibi diğer yan etkilerinden dolayı da takip edilmelidir.

Budesonidin uygun tedavi dozunda verilmesi ve tayinleri için hassas bir yöntem gereklidir. Budesonidin insan vücudu sıvılarında ve farmasötik formülasyonlarda tayini için başlıca yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi - kütle spektrometrisi (GC-MS), yöntemleri rapor edilmiştir. HPLC yöntemlerinde maddenin izlenmesi için dedektör olarak ultraviyole, floresans, kütle ve tandem kütle (kütle/kütle) yöntemleri geliştirilmiştir. Ayrıca, spektrofotometri ve spektrofotometrik yöntemleri de geliştirilmiştir.

Budesonidin tayini için literatürde kayıtlı yöntemler pahalı enstrümantasyon ve maliyetli yöntemlerdir ve örnek hazırlama süreçlerin uzun olabilmesi, genelde türevlendirme gerekmesi ve organik çözücülerin fazla kullanılması dezavantaj oluşturmaktadır. Literatür araştırmasına göre şimdiye kadar budesonid tayini için kullanımı oldukça kolay, daha ucuz ve tespitin daha kısa sürede gerçekleştirilebileceği elektrokimyasal yöntemlerin rapor edilmediği görülmektedir. İlaç analizlerin tayininde özel yeri olan elektrokimyasal tekniklerinde voltametrik yönteminde modifiye elektrotların kullanımının, bilinen belirli elektrik potansiyellerinde azaltılan elektrokimyasal tayinlerin hassasiyetini arttırdığı ve daha hassas tayinlerin yapıldığı bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında, budesonidin kimyasal özelliklerinin döngüsel ve diferansiyel puls voltametri ile incelenmesi ve inhalasyon preparatlarında tayini için potasyum klorür içeren hidroklorik asitli ortamda karbon pasta elektrot (KPE) elektrodun kullanıldığı bir diferansiyel puls voltametri tekniği geliştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

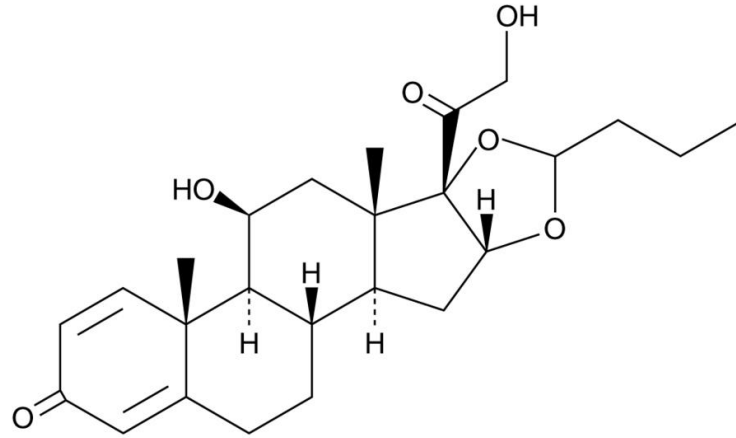
### 2.1. Budesonid Hakkında Genel Bilgi

#### 2.1.1. Kortikosteroidler

Kimyasal olarak kortikosteroidler, hormonlar ve adrenal bezlerinden salgılanan bir grup ilaçtır. Kortikosteroidler, önemli antienflamatuar ve immünosupresif etkilerinden dolayı, inflamasyon ve immün fonksiyon hastalıklarının tedavisinde çok sayıda uygulamaya sahiptir. Kortikosteroidler, çok sayıda hücrenin çekirdeğindeki çeşitli etkiler yoluyla bağışıklık fonksiyonunu modüle eder. Alerjik tepkileri veya enflamasyonu bastırmak için farmakolojik dozlarda kullanıldıklarında, bu ajanlar aşırı glukokortikoid aktivitesi ile bağlantılı çok sayıda ters etkiye neden olabilir. Kortikosteroidlerin akut doz aşımı nadirdir, ancak uzun süreli (>2 hafta) yüksek dozda kullanımında hipotalamik-hipofiz-adrenal eksenin baskılanmasına neden olabilir. Doz aşımı durumunda kortikosteroid dozunu geçici olarak azaltılması gerekir (2).

Kortikosteroidler, üç sikloheksan halkası ve bir siklopentan halkası ve bir dizi farklı gruplar içeren hidrojene bir siklopentanoperhidrofenantren halka sisteminden oluşur. Fizikokimyasal ve farmakolojik etkilerini değiştiren bu gruplar çift bağlar, metil grupları ve halojenler olabilmektedirler (3). Kortikosteroidler içerdikleri gruplara ve hastalarda oluşturdukları reaksiyonlara göre üç gruba ayrılabilirler. Bunlar metil ya da halojen içermeyen ve alerjik reaksiyon verebilenler, halojen içerenler ve halojen ve metil gruplarını içeren kortikosteroidlerdir (4).

### 2.1.2. Budesonidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



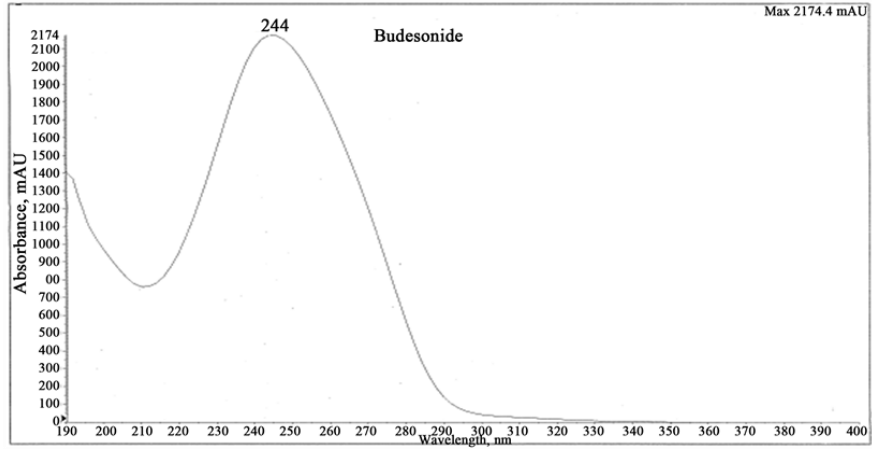
Şekil 2.1 Budesonid molekülünün kimyasal yapısı

Metil ya da halojen içermeyen gruptan olan budesonid, 17 $\alpha$  pozisyonlarında lipofilik grup ve C<sub>21</sub> pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahip glukokortikoid steroiddir (Şekil 2.1). Farmakolojik ve metabolik çalışmalar, 16 $\alpha$  ve 17 $\alpha$  pozisyonlarındaki simetrik olmayan asetal içeren topikal/sistemik aktivite oranını optimize ettiğini göstermiştir (5-7).

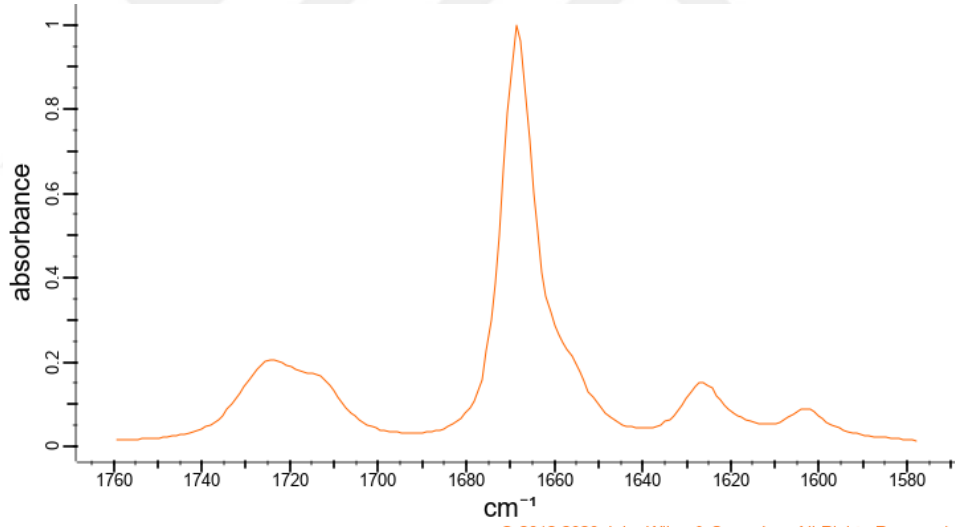
1960'larda, İsveç ilaç şirketi Bofors Nobel-Pharma ve Astra AB araştırmacıları tarafından tasarlanan budesonid, 1974'te Astra AB tarafından birincil endikasyon olarak astım olmak üzere aday ilaç olarak seçilmiştir. Pozitif ilk çalışma sonuçları, 1981'de astım için günlük idame tedavisi için budesonidin onaylanmasına yol açtı (6).

Kimyasal adı 16 $\alpha$ , 17- [butilidenbis (oksi)] - 11 $\beta$ , 21- dihidroksi- prena- 1,4- dien- 3,20- dion'dur (Şekil 2.1). Budesonidin kapalı formülü C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub> olup, molekül ağırlığı 430,53 g/mol'dür ve  $\geq 98\%$  (HPLC) saflıktadır. Kristalimsi bir katı madde olan budesonid kloroformda serbestçe çözünür; etanol içinde az çözünür; heptan içinde pratik olarak çözünmez. Erime noktası 226 °C, kaynama noktası 599.7 °C'dir. Kırılma indisi 116.11 m<sup>3</sup>/mol'dür. Sudaki çözünürlüğü < 0,1 g/L'dir (0.046 g/L) (8).

Budesonid, UV spektrumu Şekil 2.2'de (9) verilmiştir. Maddenin Fourier Dönüşümlü İnfrared (FT-IR) spektrumu Şekil 2.3'de (10), Raman spektrumu Şekil 2.4'de (11) ve Kütle spektrumu Şekil 2.5'de görülmektedir (12).

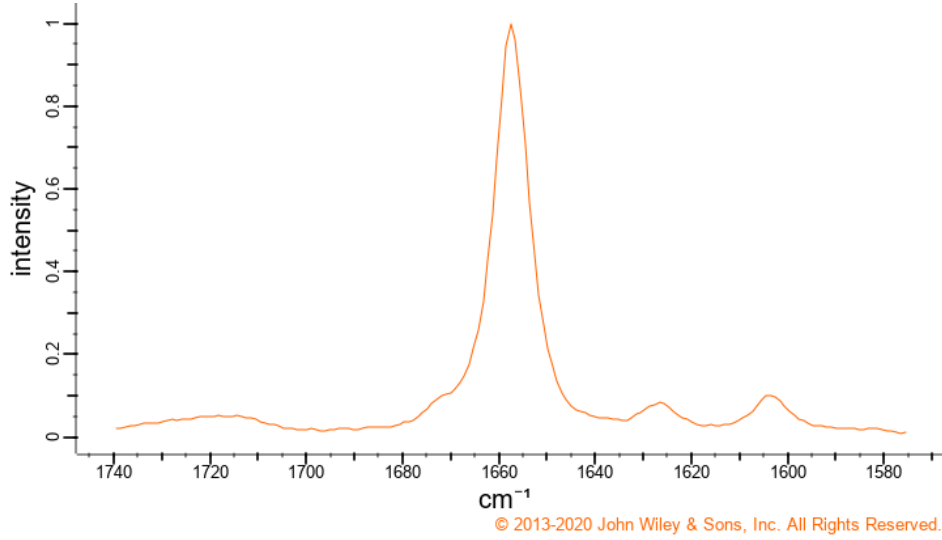


Şekil 2.2 Budesonidin UV spektrumu (asetonitril/metanol çözeltisi)

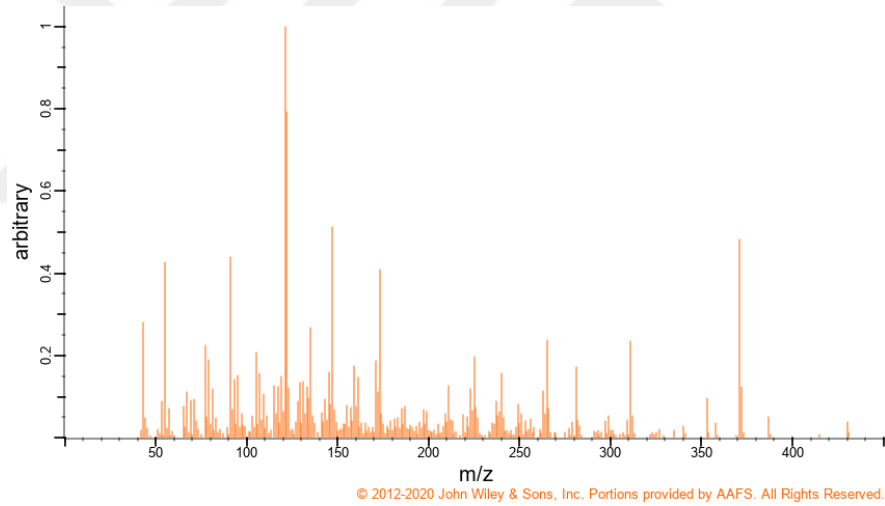


© 2012-2020 John Wiley & Sons, Inc. All Rights Reserved.

Şekil 2.3 Budesonidin KBr1 diskinde alınan FT-IR spektrumu



**Şekil 2.4 Budesonidin Raman spektrumu**



**Şekil 2.5 Budesonidin Kütle Spektrumu (MS)**

### 2.1.3. Farmakolojik Özellikleri

Budesonid anti-inflamatuar ve antialerjik etkisine sahiptir. Astım, KOAH, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan 22R ve 22S epimerinin (1:1) karışımı olan güçlü bir glukokortikoiddir. Alınan doz hastadan hastaya büyük ölçüde değiştiğinden geniş bir terapötik indekse sahiptir (13). Daha düşük dozlarda kortikosteroidler bir anti-inflamatuar etki sağlarken, daha yüksek dozlar immünosupresiftir. Uzun süre yüksek dozda glukokortikoidler, mineralokortikoid

reseptörüne bağlanarak sodyum seviyelerini yükseltir ve potasyum seviyelerini düşürür (14).

Budesonid solunduğunda yaklaşık %15 ila %30'u bronşlara ulaşır, geri kalanı büyük ölçüde yutulur. Yutulan kısım yüksek bir ilk geçiş etkisine %80-90 oranında metabolize olur. Yutulan kısım karaciğerde hızla inaktive edildiğinden, sistemik etkiler beklenmez.

Budesonidin dağılım hacmi 2,2-3,9 L/kg'dır. Plazmada yaklaşık %85 serum albümine bağlanır (13). CYP3A4, budesonidin en güçlü metabolizörüdür, bunu CYP3A5 ve CYP3A7 takip eder (15). Budesonid oksidasyon ile tam inaktive olur, CYP3A tarafından metabolize edilir ve başlıca 6-beta-hidroksibudesonid ve 16-alfa-hidroksiprednizolon metabolitleri oluşur. Bu metabolitlerin glukokortikoid aktivitesi, ana bileşiğe göre ihmal edilebilir (<1/100).

Budesonid plazma eliminasyon yarı ömrü 2 ile 3,6 saattir. 4-6 yaş arası astımlı çocuklarda terminal eliminasyon yarı ömrü 2-3 saattir (15). Budesonid metabolitleri halinde idrar ve feçesle atılır. Ağız yoluyla inhalasyonu takiben emilen dozun %32'si idrar yoluyla atılır.

Budesonidin plazma klerensi 0,9-1,8 L/dk'dır. 22R formu 1.4 L/dak'lık bir açıklığa sahipken 22S formu 1.0 L/dk'lık bir açıklığa sahiptir. 4-6 yaş arası astımlı çocuklarda klirens 0,5 L/dk'dır (16).

Budesonid yemekle birlikte veya yemeksiz alınır. Gıda, ilaç emilimini geciktirir, ancak klinik olarak önemli ölçüde değil.

Klinik çalışmalarda budesonidin astım tedavisinde diğer ilaçlarla kombine kullanılmasında bir etkileşim gözlenmemiştir. Madde ketokonazol sitokrom P450 3A'yı baskıladığı için birlikte kullanımı budesonidin plazma seviyelerini artırabilir.

CYP3A inhibitörleri ile birlikte tedavi, örn. itrakonazol, ketokonazol, HIV proteaz inhibitörleri ve kobisistat içeren ürünlerin sistemik yan etki riskini arttırması beklenmektedir. Yüksek plazma konsantrasyonları ve kortikosteroidlerin artan etkileri östrojenler ve kontraseptif steroidlerle tedavi edilen kadınlarda gözlenmiştir, ama budesonid ve eş zamanlı düşük doz oral kontraseptif kombinasyonları ile herhangi bir etki gözlenmemiştir.

Piyasada inhalyasyon, tablet, burun spreyi ve rektal formlar halinde mevcuttur (Şekil 2.6). Orijinal marka isimleri: Rhinocort (burun inhalyason), Pulmicort (oral inhalasyon), Entocort (lavman veya oral kapsül). Jenerik İsimleri: Budanase AQ, Budate, Budecort, Budez, Budvent, Buivent, Derinide. Kombinasyon İlaçları: Symbicort (Budesonid ve Formoterol). Budesonid bir MDI, DPI ve nebulizatör olarak mevcuttur. Symbicort® olarak beta2-agonisti formoterol ile kombinasyon şeklindedir. Diğer bir ürünü Pulmicort® ismiyle mevcuttur.



Şekil 2.6 Budesonid içeren ilaç çeşitleri.

## 2.2. Literatürde budesonidin miktar tayini yapılmış çalışmalar

**Tablo 2.1 Budesonidin miktar tayini için kayıtlı likit kromatografisi çalışmaları**

Metot	Durgun faz	Kromatografi şartları	Dedeksiyon (dalga boyu- $\lambda_{maks}$ )	Doğrusal aralık ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOD/LOQ	Farmasötik dozaj formu/ biyolojik sıvı (Matriks)	Referans
HPLC	RP-C18 (75× 4,6 mm, 3,5 $\mu\text{m}$ )	Metanol/su (69:31, v/v) Akış hızı: 0,8 mL/dk	UV- 254 nm	0,05- 5 veya 10 $\mu\text{g/mL}$	LLO Q- 0,05 $\mu\text{g/mL}$	Deri katmanları	(17)
HPLC -RIA	RP- C8 (150× 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	Metanol/su (62,5:37,5, v:v) Akış hızı: 0,8 mL/dk	UV- 254 nm	0,333– 3,33 ng mL <sup>-1</sup>	LOQ- 0,133 ng mL <sup>-1</sup>	Plazma	(18)
HPLC -IPC	C18 (100 mm x 3 mm, 3,5 $\mu\text{m}$ )	0.05 M Sodyum asetat tampon/ asetonitril (40:60, v/v) Akış hızı: 1,0 mL/dk	UV- 214 nm	0,5–50,0 $\mu\text{g/mL}$	LOD- 0,187 $\mu\text{g/mL}$ LOQ- 0,568 $\mu\text{g/mL}$	Ölçülü dozlu inhaler	(19)
HPLC	Hypersil C18, (25 sm× 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	Etanol/asetonitril fosfat tamponu pH 3,4; 25,6 mM (2:30:68, v/v/v) Akış hızı: 1,5 ml/dk	UV- 240 nm	2,5- 25,0 $\mu\text{g/mL}$	LOD- 0,30 $\mu\text{g/mL}$ L	Pulmicort Turbuhaler®	(20)

HPLC	C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm)	Asetonitril/ 0,3% formik asit	UV- 254 nm			İnhalyasyon süspansiyon	(21)
HPLC	Kromasil C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol/su (72:28, v/v) Akış hızı: 0,8 mL/dk	UV- 254 nm	0,5–10 µg/mL	LLO Q- 0,1 µg/m L	Sıçan plazması	(22)
HPLC - LC- MS/ MS	Phenomen ex Gemini ® C18, (50 × 4,6 mm, 5 µm)	Metanol/su (70:30, v/v) Akış hızı: 0,8 ml/dk		15, 375 ve 750 pg mL <sup>-1</sup>	LLO Q- 7,5 pg mL <sup>-1</sup>	İnsan plazması	(23)
UHP LC/M S/MS	C 18, (1,7 µm, 2,1 mm × 50 mm)	Su/ ammonyum format (AF) (2,5 mM); Metanol/ ammonyum format (AF) (2,5 mM) (40:60) Akış hızı: 0,2 mL/dk		3,0 ng/mL- 400 ng/mL	LLO Q- 1,0 ng/ mL	İnsan plazması	(24)
HPLC	Kromasil C8 (150 mm x 4,6 mm)	Asetonitril/ fosfat tampon (pH 3,2-0,025 M) (55:45 v/v) Akış hızı: 1,1 mL/dk	UV- 244 nm	1-50 µg/mL	LOD- 0,1 µg/m L	Farmasötik form	(25)
UHP LC- MS/ MS	Acquity® BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 50	5mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> pH 8/ metanol	MS/MS	1- 50 ng/mL	LLO Q- 1µg/ mL;	Kuru kan lekeleri	(26)

MS	mm)	(50:50 (v/v)) Akış hızı: 0,300 mL/dk			LOD- 0,25 µg/m L		
HPLC	Kromasil C18 (250 mm×4,6 mm, 5µm)	Metanol ve fosfat tamponu (10 mM, pH 7,0) 80:20 (v/v) Akış hızı: 1,2mL/ dk	Floresan - 330 nm (eksitasyo ndan sonra 500 nm)	0,2–100 ng/mL	LLO Q- 0,21 ng/ mL	İnsan plazması	(27)
HPLC	Bondapak RP- C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm)	Asetonitril/ monobazik potasyum fosfat (55:45, pH 3,2) Akış hızı: 1 ml/dk	UV- 244 nm	1-20 µg/mL	LOD- 0,05 µg/ml LOQ- 0,5 µg/m L	İlaç	(28)
HPLC	RP-C18, (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Fosfat tamponu pH 3,2:asetonitril/ etanol Akış hızı 1,7 mL/dk	UV- 240 nm			Mukozda tayini	(29)
UHP LC- MS	BEH C18 (2,1 × 1,7 µm, 10 sm)	Amonyum asetat/ asetonitril (70:30 v/v) Akış hızı: 0,35 mL/dk	LC/MS; 244 nm			İnhaler formülasyon u	(30)
HPLC - LC/M S	C18, (50 mm x 3 mm, 3 µm)	Sulu bir % 1 asetik asit / asetonitril; Akış hızı: 0,4 mL/dk	MS- İyon kaynağı voltajı 5000 V	0,5-10 ng/mL	LOQ- 0,5 ng/m L	İnsan idrarı	(31)

HPLC	Kromasil RP- C8, (150 mm x 4,6 mm)	Asetonitril/ fosfat tamponu (pH 3,2-0.025 M) (55:45 v/v) Akış hızı: 1,1 mL/dk	UV- 244 nm	1-50 µg/mL	LOD- 0,1 µg/mL	Yüklü mikro partiküller	(32)
HPLC	Spursil C18 kolonu (5 µm, 250 × 4,6 mm)	Sodyum dihidrojen fosfat/ Asetonitril Akış hızı: 1 mL/dk	UV- 246 nm			Aerozol	(33)
HPLC	Hypersil C18 (20×2,1 mm; 5 µm)	Etanol/su (43:57, v/v) Akış hızı: 500 µL/dk	MS: Seçici iyon modu: m/z 473,2 ve m/z 476,2	0,25- 10,0 ng/mL	LOQ- 0,25 ng/mL	İnsan plazması	(34)
HPLC	Supelco C18, (125 mm × 4,6 mm, 5 µm)	Asetonitril/fosfat tamponu (pH 3,2; 28,6 mM) (30:70, v/v) Akış hızı: 1,5 mL/dk	LC-MS R <sub>t</sub> -12,6 dk; 415 m/z	FT-IR; 4000 ve 600 sm <sup>-1</sup>		Tablet	(35)
HPLC	C18, (3,9 × 150 mm)	Metanol/su 65:35 (v/v) Akış hızı: 1,0 mL/dk	Çift dalga boylu absorban detektörü - 280 nm			Katı lipid mikropartikü 1	(36)
HPLC	C18, (5µm, 25sm)	Asetonitril/ sulu tampon (70:30, v:v)			LOD- 1 ng	Tablet	(37)
HPLC	Hypersil	0,02 M NaH/	UV-Vis.			Tavşanlarda	(38)

	C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm	CH <sub>3</sub> CN (68:32, v:v) Akış hızı: 1,5 mL/dk	240 nm			in vitro ve in vivo	
HPLC	C18 (5 µm, 200 mm × 4,6 mm)	Su/ etanol (57:43, v/v) Akış hızı: 1 mL/dak	UV- 245 nm			Sıçan plazması	(39)
HPLC	Spherisor b C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm)	Asetonitril-5 mM sodyum dihidrojen ortofosfat, pH 3 (60:40, v/v) Akış hızı: 1,5 ml/dk	UV- 214 nm	250–2000 µg L <sup>-1</sup>	LOD: 30 µg L <sup>-1</sup> LOQ: 120 µg L <sup>-1</sup>	Symbicort Turbuhaler	(40)
HPLC	C18 (Extract Clean; 500 mg, 6 ml)	Etanol-su (43:57, v/v) Akış hızı: 500 µl/dk	LC- APCI- MS-MS m / z 473,1	0,05–10,0 ng/mL	LOD- 0,025 ng/m L	İnsan plazması	(41)
HPLC			MS/MS		LOD- 100 pg/m L	Serum	(42)
HPLC		2 ml fosfat tamponlu salin (pH 7,4; 5-15 mM) Akış hızı: 20 ml/dk	UV- 250 nm, R <sub>t</sub> - 5,2 dak.				(43)
UHP LC	C18 (2,1mm× 100 mm, 2,5 µm)	Su içinde %0.1 formik asit/ asetonitril içinde %0.1 formik asit	MS/MS	6,72- 430,53 n g/g	LOD- 0,05 ng/m L- 0,3ng	Güvercin dışkı	(44)

		Akış hızı: 0,4 mL/dk			/mL		
UHP LC	BEH C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm)	Asetonitril/5 mM ammonium asetat/asetik asit (29:71:0,142, v/v/v) Akış hızı: 0,7 mL/dk	MRM- m/z 489 → 357	5,0-500 pg/mL	LLO Q- 5,0 pg/m L		(45)
HPLC	Hypersil C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Etanol/ asetonitril/ formik asit (pH 3,8; 0,14 mM) (2:30:68, v/v/v) Akış hızı: 1,5 mL/dk	UV- 248 nm	LC/MSm/ z-431		İlaç	(46)
HPLC	C18 (150 x 2 mm, 5 µm)	Asetonitril/ %0.1 formik asit (v/v) Akış hızı: 0,2 mL/dk				Farmasötik form	(47)
HPLC	C18 HP kolonu (3 µm, 2,1 × 50 mm)				Geri kazan ımları (% 84,7- 89,4)	Saf madde	(48)
UHP LC	C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm)	%0,1 Formik asit ile asitleştirilmiş su/ %0,1 formik asit Akış hızı: 0,5	FT-ICR	80-1000 m/z		Dopingli sporcular	(49)

		ml/dk					
HPLC			[LC- (-ESI- MS-MS]			İnsan plazması	(50)
HPLC	C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm)	%0.5 Asetonitril içeren 100 mM amonyum asetat (pH 4,25) Akış hızı: 1,2 mL/dk				Fare akciğer tümörü	(51)
HPLC				FPD 4,7µm		Ölçülü Doz İnhaler	(52)
HPLC		n-Oktanöl solüsyon (0,5 ve 2,5 mM)	LC- MS/MS	0,7-3 µg/mL		Sığır oküler dokusu	(53)
HPLC			UV- 254 nm	0,1 - 200 µg/mL	LOD- 0,1 µg/m L	Ölçülü doz inhaler	(54)
HPLC	RP- C18 (4,6 mm × 100 mm, 3 µm)					İnsan hava yolu epitel hücreleri	(55)
HPLC	C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm)	Akış hızı: 1,5 mL/dk				Ölçülü Doz İnhaler	(56)
HPLC	C18	Metanol/su	UV- 250	7,81-500	LOQ-	Bronkoalve-	(57)

	(250 × 4,6 mm, 5 µm)	tampon (69:31, v/v) Akış hızı: 1,0 ml/dk	nm	ng/mL	5 ng/mL	olar lavaj	
HPLC - SEDS	C18 (4,0 × 125 mm, 5 µm)	Su/asetonitril/tetrahidrofurana (73:15,4:11,6) Akış hızı: 0,8 ml/dk	UV- 254 nm			İnhalyasyon	(58)
HPLC	RP- C18		NRTL- SAC			Farmasötik preparat	(59)
HPLC	C(18) (3 mikrom partikül boyutu, 100 Å gözenek genişliği)		UV- 237 nm	0,3- 3 ng		Farmasötik preparat	(60)
HPLC	NovaPak C18 (5 µm, 150 mm × 3,9 mm)	Metanol/su (60:40, v/v) Akış hızı: 1 mL/dk	UV- 240 nm			Kuru toz inhalatör	(61)
HPLC		Su/etanol (60:40, v/v)				Av köpeği	(62)
HPLC			LC (µLC)- MS/MS	5-5000 pg/mL	LOQ- 5 pg/mL	İnsan plazması	(63)
HPLC	Kromasil C18 (10 sm×5 µm; 0,46 sm)	Asetonitril/su (40:60) Akış hızı: 1 mL/dk	UV- 242 nm		LOD- 0,4 µg/mL	Farmasötik preparat	(64)

HPLC	Hypersil C18 (20 mm × 2,1 mm; 5 µm)	Etanol-su (50:50, v/v) Akış hızı: 0,45 ml/dk	APCI/ MS 473,2 ve 501,2 m/x	0,2–4,0 ng/ml	LOQ- 0,2 ng/ml	İnsan plazması	(65)
------	---	---	--------------------------------------	------------------	----------------------	-------------------	------

### 2.3. Elektroanalitik Yöntemlerin Kuramsal Temelleri

Elektroanalitik yöntemler, analiti içeren bir elektrokimyasal hücredeki potansiyeli (Volt) ve/ veya akımı (Amper) ölçerek bir analiti inceleyen analitik kimya bilim dalıdır.

Farmasötik ilaçların analizi için genellikle spektroskopik ve özellikle sıvı kromatografi gibi yöntemler kullanılır. Fakat kullanılan cihazlar ekonomik olarak maliyetli ve fazla miktarda kimyasal sarfiyatı gerektiren zaman alıcı analizlerdir.

Farmasötik ilaçların geliştirilmesinde, yüksek hassasiyet, seçicilik ve numune verimine sahip biyoanalitik yöntemlere talep vardır.

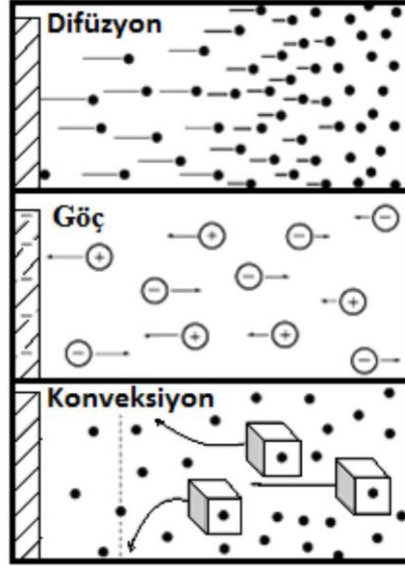
Özellikle ilaç ve biyolojik organik maddelerin analizinde yaygın teknik sınıflarından uygulanan elektroanalitik tekniklerin başında voltametri, potansiyometri, kulometri ve kondüktometri gelmektedir. Elektroanalitik teknikler yüksek duyarlılık, hızlılık, numune hazırlama kolaylığı, kısa analiz süresi, seçicilik ve ucuz olması gibi üstünlükleri nedeniyle çok kullanılmaktadır. Bu nedenle diğer modern enstrümental ve HPLC yöntemlerle yarışır hale gelmiştir.

Elektroanalitik tekniklerin çeşitli maddelerin tayinlerinde kullanılma üstünlükleri vardır. Bunlar basitlik, ekonomik olması, iyon konsantrasyonu yanında aktiviteyle ilgilidir. Bunun yanında, ön ayırma işlemesi, ön kimyasal işlemler gerektirmez ve az miktarda oldukça hassas, doğru, kesin ve seçicidirler.

#### 2.3.1. Elektrokimyasal Olaylarda Kütle Aktarım Mekanizmaları

Bir elektrot, çözeltinin sadece elektrot yüzeyindeki çok ince tabakasında etkili olabildiğinden faradayik bir akımın devamı için ana çözeltiden elektrot yüzeyine reaksiyona giren türlerin sürekli aktarımı gereklidir. Kütle aktarımı üç mekanizmayla olur: konveksiyon, göç ve difüzyon. Konveksiyon, ya karıştırma ya da elektrot yüzeyinden geçirilen çözelti akışının yol açtığı mekanik hareketin sonucudur. Difüzyon,

türlerin yüksek derişimli bölgeden düşük derişimli bölgeye yaptıkları harekettir. Göç, iyonların elektrostatik çekim nedeniyle hareketlerinden kaynaklanır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Elektrokimyasal hücrede yük aktarım şekilleri.

### 2.3.2. Elektrokimyasal hücreler

Elektrokimyasal reaksiyon, hücrede gerçekleşen yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir (Kelter ve ark., 2009).

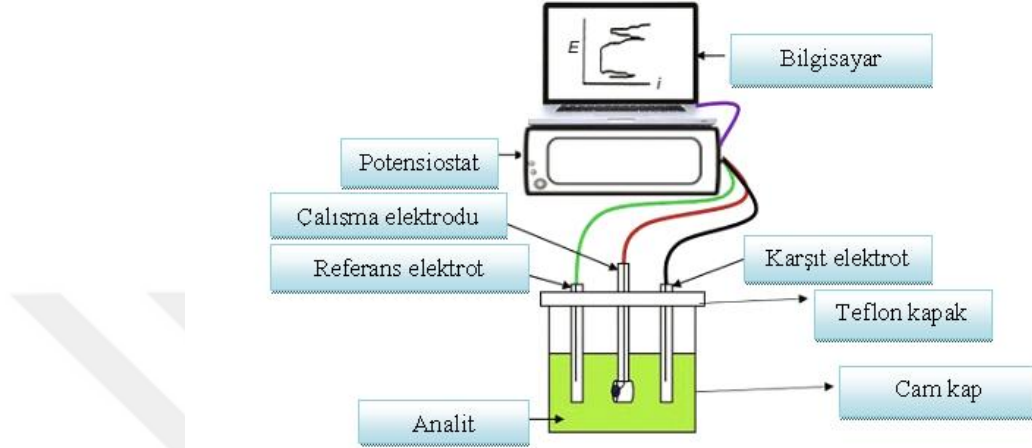
Bu reaksiyon iki tür hücre- Galvanik ve Elektrolitik hücrelerde gerçekleştirilir. Bu hücreler iletkenliği sağlayan elektrostatik çözeltiler içerir.

- Kimyasal reaksiyonlar sonucunda elektrik akımı meydana gelen galvanik hücreler;

- Dışarıdan elektrik akımı uygulanması sonucunda kimyasal reaksiyonların meydana geldiği elektrolitik hücrelerdir.

Bir galvanik ve elektrolitik hücre arasındaki başlıca fark, bir galvanik hücrede reaksiyon için dışarıdan enerji vermesine gerek kalmazken, bir elektrolitik hücreye dışarıdan enerji (gerilim) vermeye ihtiyaç vardır.

O halde bir analitin bir elektrolit çözeltisinde en az bir referans elektrodu, bir çalışma elektrodu ve yardımcı elektrot bağlı olduğu bulunduğu ortamda indirgenme ve ya yükseltgenme reaksiyonu olur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Elektrokimyasal hücre şeması

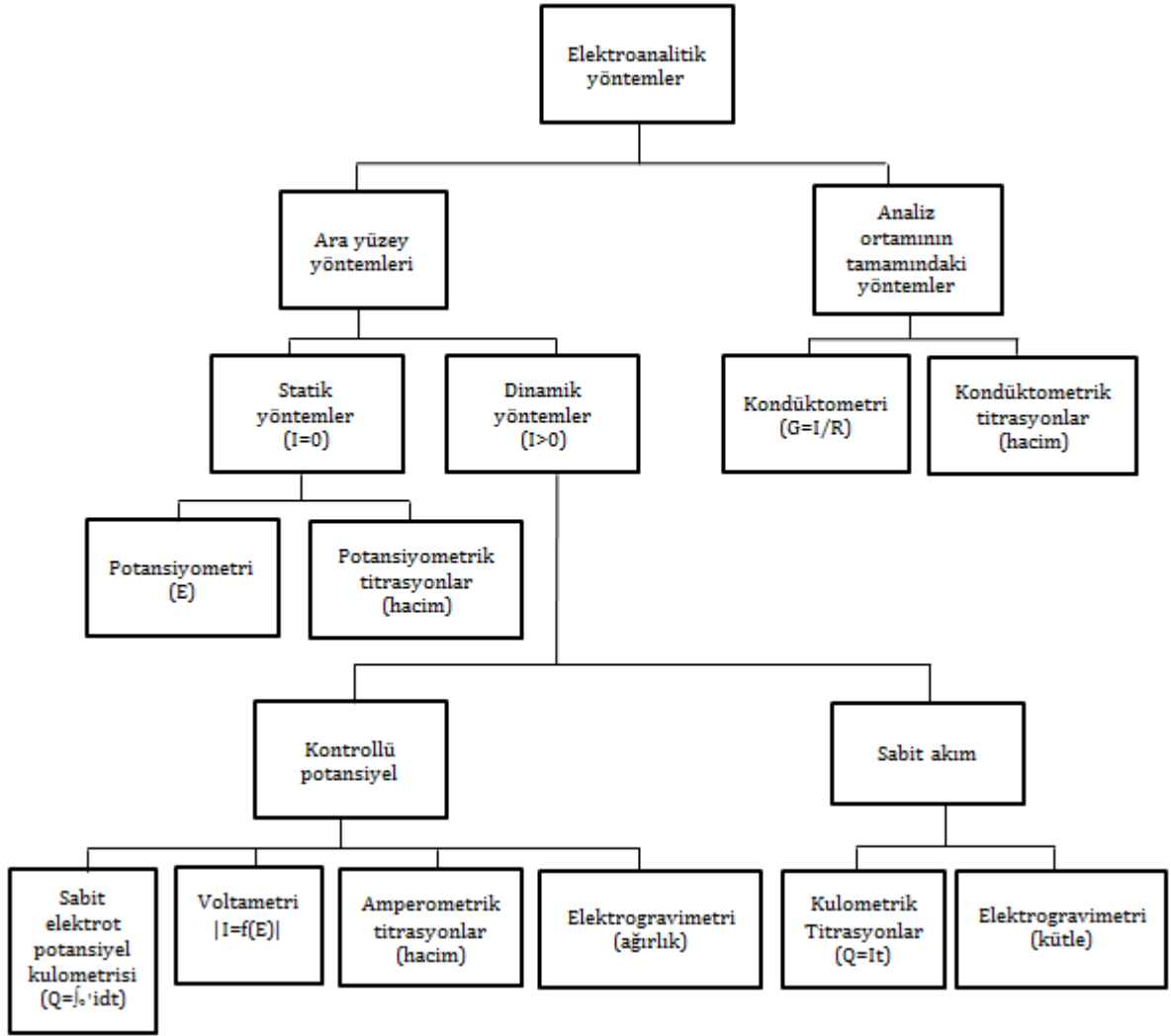
### 2.3.3. Elektrokimyasal Hücre Potansiyeli

$$E_{hücre} = E^0_{hücre} - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (2.1)$$

Bir elektrokimyasal hücre, potansiyel ile madde derişim arasındaki ilişkiyi en açıklayıcı denklem Kimya Nobel ödülü sahibi Walther Nernst'in adıyla anılan *Nernst eşitliğinin* bir formudur (Denklem 2.1). Burada  $E^0_{hücre}$ - redoks çifti için standart indirgeme potansiyeli,  $R$ - molar gaz sabiti ( $8,3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$ - mutlak sıcaklık ( $K$ ),  $n$ - aktarılan elektronların oranı sayısı,  $F$ - Faraday sabiti ( $96,485 \text{ C/ekvivalens.}$ ) ve  $Q$ - iyonların aktivite oranıdır. Elektroda uygulanan potansiyel değiştirilirse,  $Q$ - sabit olmayıp dengeye ulaşınca kadar sürekli olarak değişir.

### 2.3.4. Elektroanalitik Yöntemler

Çok çeşitli elektroanalitik yöntemler geliştirilmiştir. Bunların başlıcaları voltametri, kulometri, elektrogravimetri ve başkalarıdır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Elektroanalitik yöntemlerin şematik olarak genel bir sınıflandırılması

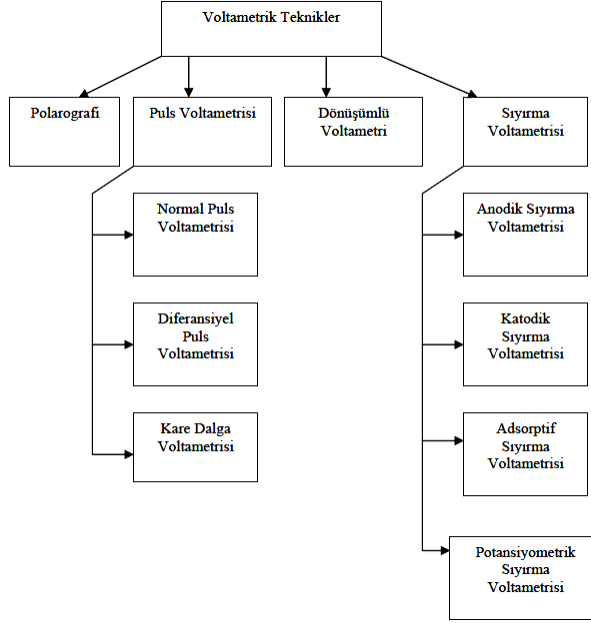
#### 2.4. Voltametri

Voltametri yönteminde bir mikro çalışma elektrodu, referans elektrot ve bir de yardımcı elektrot kullanılır ve zamanla değişen potansiyele karşı akım izlenmesidir.

1920 yılında Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovski tarafından damlayan cıva elektrodunun kullanıldığı polarografi tekniğine dayanarak voltametri yöntemini geliştirilmiştir. Polarografi (PG) çalışmalarının giderek azalması, büyük ölçüde, yalnızca laboratuvarlarda değil, aynı zamanda çevrede de büyük miktarlarda Hg kullanımına ilişkin endişelerin bir sonucudur. 1960'ların başından itibaren, PG'nin önemi azalırken, Hg dışındaki çalışma elektrotları şaşırtıcı bir hızla büyüdü.

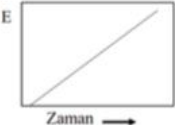
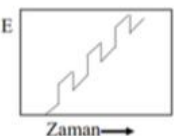
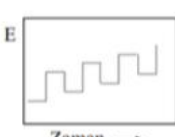
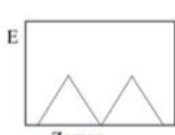
### 2.4.1. Voltametrizde uyarma sinyalleri

Voltametrizde, bir mikro çalışma elektrodu, referans elektrot ve bir yardımcı elektrot sisteminden oluşur. Burada zamanla değişen potansiyele karşı akım ölçülür. Voltametrik teknikler: Dönüşümlü voltametri (CV), Doğrusal taramalı voltametri (LSV), Kare dalga voltametri (SWV), Diferansiyel puls voltametri (DPV), Normal puls voltametri (NPV), Sıyırma voltametrisi (SV)'dir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Voltametrik tekniklerin şematik olarak genel bir sınıflandırılması

Voltametrizde en çok kullanılan uyarma sinyallerine göre sinyal şekilleri ve buna bağlı adlandırılan yöntemler Şekil 2.11’de verilmiştir.

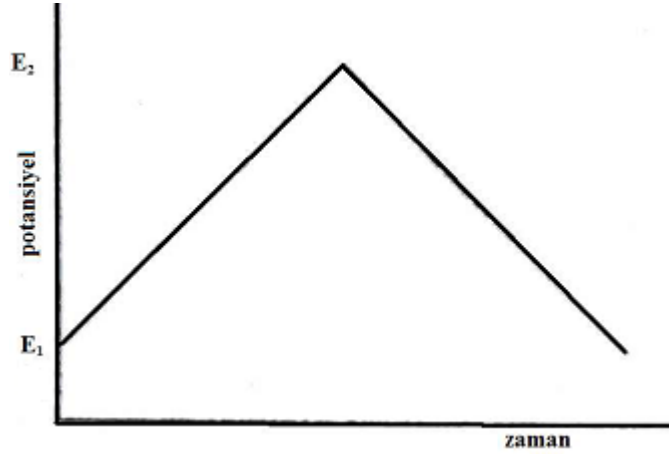
İsim	Dalga şekli	Voltametrinin tipi
Doğrusal taramalı		Polarografi Hidrokinamik voltametri
Diferansiyel puls		Diferansiyel puls polarografisi
Kare dalga		Kare dalga voltametrisi
Üçgen		Dönüşümlü voltametri

Şekil 2.11 Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri

#### 2.4.2. Dönüşümlü voltametri (CV)

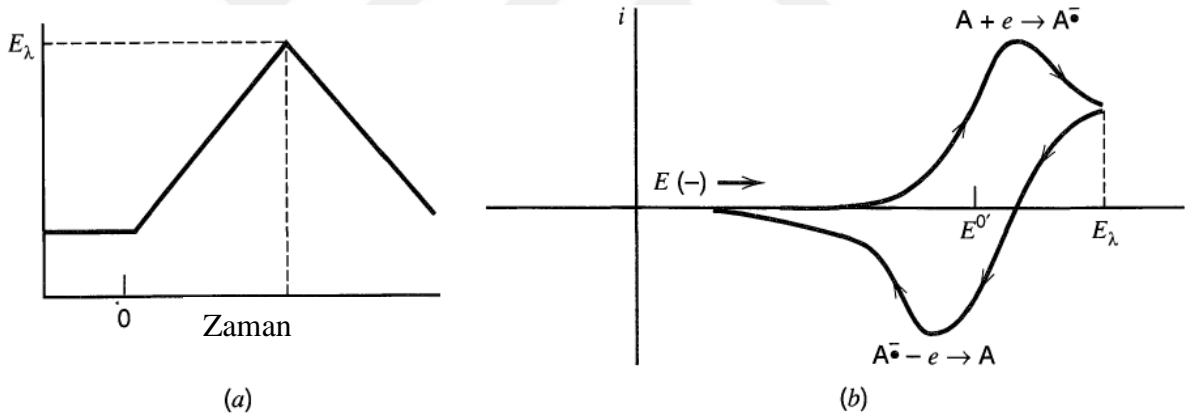
Bir çözeltideki durgun bir elektrotun akım cevabı Şekil 2.12’de gösterilen üçgen dalga formuna benzer bir potansiyel değişimi uygulanarak elde edilir. Dönüşümlü voltametri (CV), ilk elektrokimyasal çalışmalar için çok popüler bir teknik haline gelmiş, oldukça karmaşık elektrot reaksiyonları hakkında bilgi edinmede çok yararlı olduğu kanıtlanmıştır.

CV çalışma ve karşı elektrotun bir fonksiyonu olarak potansiyel arasındaki akımın ölçülmesiyle elde edilir. Döngüsel voltametrizde analit çözeltisinde bir mikroelektroda belirli tarama hızında başlangıç potansiyelinden itibaren (başlangıç potansiyel,  $E_1$ ) doğrusal olarak artan bir potansiyel uygulanır ( $E_2$ ) ve aynı hızla yine doğrusal olarak azalacak şekilde başlangıç noktasına kadar ters yönde taranır ( $E_1$ ) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Dönüşümlü voltametri uygulanan potansiyelin zamanla değişmesi:  
(E<sub>1</sub>: Başlangıç potansiyeli; E<sub>2</sub>: Tarama yönünün değiştiği potansiyel)

Redoks reaksiyonunda potansiyelle değişen akımdan elde edilen akım-potansiyel eğrisine döngüsel voltamogram denir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Redoks reaksiyonunun döngüsel voltamogramı

#### 2.4.2.1. Tersinir reaksiyonlar

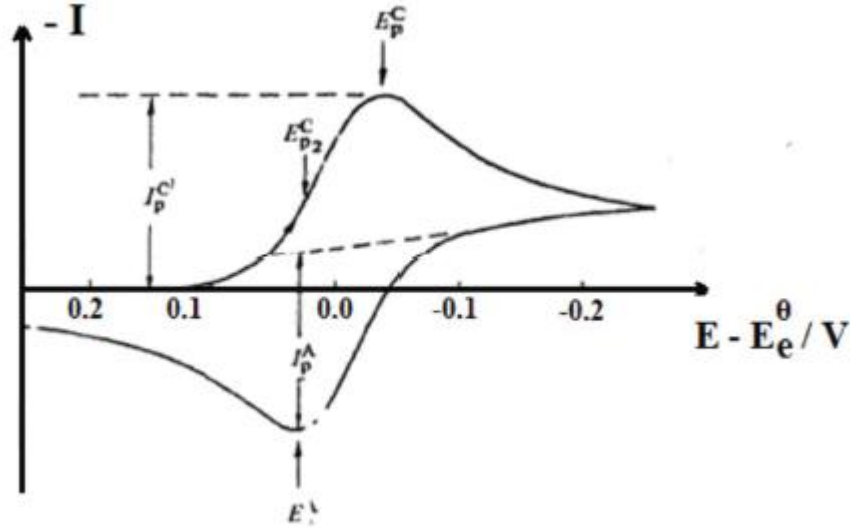
Tersinir reaksiyonlarda, analit indirgenme ve yükseltgenmeye uğrar. Elektrot reaksiyonunun;  $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$  şeklinde tersinir bir indirgenme reaksiyonudur. Başlangıçta çözeltide yalnız O maddesinin bulunduğu ve elektrot yüzeyinde adsorbsiyon olayının meydana gelmediği düşünülür. Potansiyel tarama hızı çok yavaş olduğunda  $i - E$  eğrisi belli bir potansiyelden sonra sınır akıma ulaşır. Akım

potansiyelden bağımsızdır. Potansiyel tarama hızı arttıkça  $i - E$  eğrisi pik şeklinde görünür ve bu tarama hızı ile artar.

Geriye doğru potansiyel taraması hızlı yapıldığında ise elektrot yüzeyinde yeterince R bulunacağından  $E_0$ 'ın daha yüksek potansiyellerinde R yükseltgenir. Bu geriye doğru taramada anodik pik elde edilir. Ters yönde yapılan taramada  $E_0$  değerine kadar O indirgenir, R oluşur. Yüzeyde oluşan R çözeltiye doğru difüzlendiğinden ters tarama akımı katodik tarama akımına göre daha düşük olur.  $[O] / [R]$  oranı tersinir bir reaksiyonda Nernst denkleminde uyumludur (Denklem 2.2).

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Red]}{[Ox]} \quad (2.2)$$

$Ox + ne^- \leftrightarrow Red$  tersinir tepkimesinin voltamogramı Şekil 2.14'deki gibidir.



Şekil 2.14 Tersinir bir reaksiyonun dönüşümlü voltamogramı

CV'de pik akımının değeri ( $I_p$ ) için sınır durumları ve tarama hızı göz önüne alınarak ve  $DO=DR=D$  kabul edilerek Fick'in ikinci kanunundan matematiksel olarak aşağıdaki eşitlik türetilir (Denklem 2.3).

$$I_p = 0.4463 nF \left( \frac{nF}{RT} \right)^{1/2} C_0^\infty D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.3)$$

Bu eşitlik Randles-Sevcik eşitliği olarak bilinir. 25 °C'da Randles-Sevcik eşitliği aşağıdaki şekle dönüşür (Denklem 2.4).

$$I_p = -(2,69 \times 10^5) n^{3/2} C_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.4)$$

Bu eşitliklerdeki terimlerin anlamları aşağıdaki şekildedir:

$I_p$ - Akım yoğunluğu,  $A/sm^2$ ;

$D$ - Difüzyon katsayısı,  $sm^2/s$ ;

$v$ - Tarama hızı,  $V/s$ ;

$C_o$ - Ox türünün ana çözelti konsantrasyonu,  $mol/sm^3$ ;

$n$ - Aktarılan elektron sayısı

Görüldüğü gibi pik akımı elektroaktif maddenin konsantrasyonu ve tarama hızının kareköküyle doğru orantılıdır. Kullanılan elektrodun ultramikro elektrot olması durumunda bu eşitlik aşağıdaki gibidir (Denklem 2.5).

$$i_{ss} = 4rnFC_oD_o \quad (2.5)$$

Burada  $r$ , ultramikroelektrodun yarıçapıdır.

CV verilerinden reaksiyonun tersinir olup olmadığı testi edilebilir. Eğer  $I_p$ -  $v^{1/2}$  eğrisi orijinden geçen doğrusal ise tersinirdir. Ayrıca bir sistemin tersinir olup olmadığının diğer koşulları şunlardır:

1.  $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pk} = 59/n$  mV
2.  $|E_p - E_{p/2}| = 59/n$  mV
3.  $|I_p^a / I_p^k| = 1$
4.  $I_p \propto v^{1/2}$
5.  $E_p$ ,  $v$ 'den bağımsızdır.
6.  $E_p$ 'den daha negatif (veya daha pozitif) potansiyellerde  $I^2 \propto t$ 'dir.

$I_p$  ve  $E_p$ 'nin  $v$  ile ilişkisi geniş bir tarama hızı aralığında incelenmelidir ve yukarıdaki koşulların herhangi birinin sağlanmadığı durumlarda tersinir reaksiyon olması söz konusu değildir.

#### 2.4.2.2. Tersinmez reaksiyonlar

Öncelikle organik örnekler ile çalışıldığında tersinmez reaksiyonlarla sık karşılaşılır. Ters taramada anodik veya katodik pikin görülmediği tersinmez reaksiyonların yarı-dalga potansiyelleri konsantrasyonla değişmesine rağmen, difüzyon akımlarıyla doğru orantılıdır. Tersinmez reaksiyonlar için aşağıdaki Fick kanunu geçerlidir (Denklem 2.6).

$$I_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha_c n_a)^{1/2} C_o D_o v^{1/2} \quad (2.6)$$

Burada  $n$  aktarılan toplam elektron sayısı ve  $n_\alpha$  hız tayin basamağında aktarılan elektron sayısıdır. Bu denklemde pik akımı konsantrasyon ve tarama hızının karekökü ile doğru orantılıdır.

Tersinmez durumda  $E_{pk}$ ,  $v$  ile aşağıdaki eşitliğe göre değişir (Denklem 2.7).

$$E_{pk} = K - (2.3RT) / (2 \alpha_c n_\alpha F) \log v \quad (2.7)$$

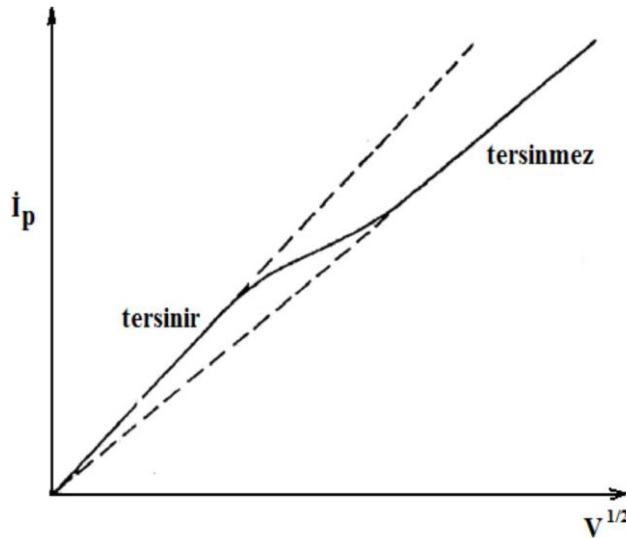
Bu denkleme göre, tersinmez bir elektron transferinde katodik pik potansiyeli, tarama hızıyla artar ve negatif bölgeye kayar. Bu kayma miktarı  $v$  artışıyla  $30 / \alpha_c n_\alpha mV$  olarak bulunur.

Tersinmez bir reaksiyonda aşağıdaki kuralların geçerli olması gerekir:

1. Anodik pik gözlenmez (Ters tarama piki gözlenmez)
2.  $I_{pk} \propto v^{1/2}$
3.  $E_{pk}$  kayması  $25^\circ C$ 'de tarama hızındaki artışta  $30 / \alpha_c n_\alpha mV$ 'dur.
4. Tarama hızı 10 kat artarsa  $|E_p - E_{p/2}| = 48 / (\alpha_c n_\alpha) mV$ 'dur.

#### 2.4.2.3. Yarı tersinir reaksiyonlar

Yarı tersinir reaksiyonlarda akım, difüzyon hızı ve elektron aktarım hızı rol alır. Şekil 2.15'de tersinir, yarı tersinir ve tersinmez reaksiyonlarda akımın tarama hızının kareköküne karşı çizilen voltamogramlar gösterilmiştir.



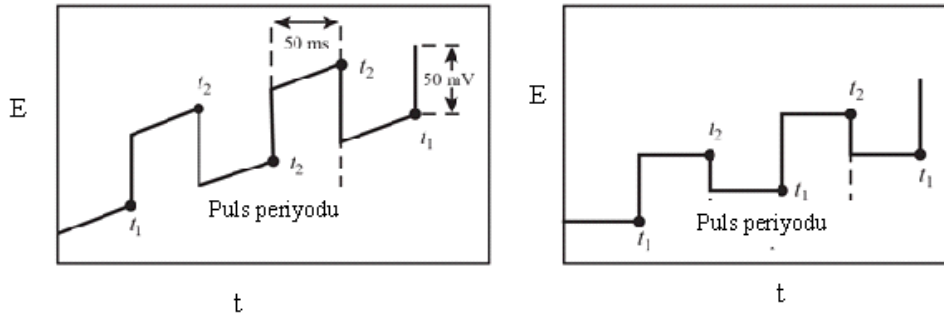
Şekil 2.15 Yarı tersinir bir elektrot reaksiyonunda pik akımının tarama hızının kareköküne oranı

Yarı tersinir bir reaksiyonda aşağıdaki koşulların geçerli olması gerekir:

1.  $I_p$ ,  $v^{1/2}$  ile doğrusal olmayan bir artış gösterir.
2.  $I_p^a / I_p^k = 1$ 'dir. (Eğer  $\alpha_c = \alpha_a = 0,5$  ise).
3.  $\Delta E_p > 59/n$  mV ve  $\Delta E_p$ ,  $v$  ile artar.
4.  $E_{pk}$ ,  $v$ 'nin artması ile negatife doğru kayar.

### 2.4.3. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Diferansiyel puls voltametri cihazlarından elde edilen uyarma sinyalleri Şekil 2.16'da verilmiştir. Analog sistemlerde birinci sinyal doğrusal tarama voltajları üzerine periyodik pulsler eklenerek oluşturulur. İkinci dalga formu dijital sistemlerde gözlenir ve basamaklı sinyal üzerine puls verilir. Her iki sistemde de, uyarma sinyali periyodunun son 50 ms'de 50 mV'luk bir puls uygulanır. Tersinir bir reaksiyonda pik potansiyeli, yarı-reaksiyonun standart potansiyeline yaklaşık eşittir.



Şekil 2.16 Diferansiyel puls voltametri için uyarma sinyalleri

Diferansiyel puls voltamogramın üstünlüğü, yarı-dalga potansiyelleri arasındaki farkın küçük olması nedeniyle ayrı pik maksimumları elde edilebilmesidir.  $\Delta i$  akımları nanoamper seviyelerindedir. Diferansiyel puls voltametrimin gözlenebilme sınırı  $10^{-7} - 10^{-8}$  M aralığındadır.

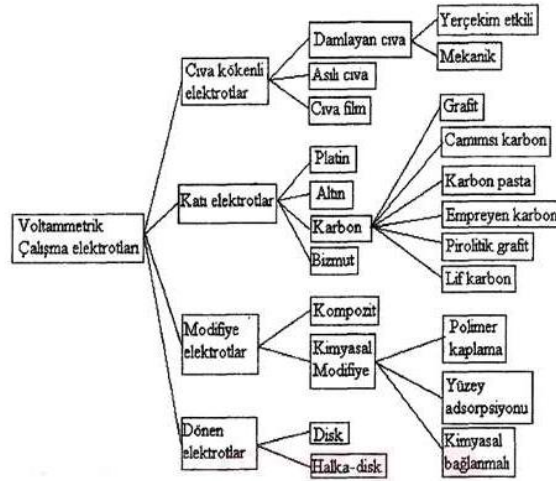
Elektrot potansiyeli boş çözültide ilk uygulandığında yük arttığı için, faradayik olmayan akımda ani bir artış olur ancak bu akım, zamanla üstel olarak azalır ve sıfıra yaklaşır. Böylece akımın bu evrede ölçülmesiyle faradayik olmayan artık akım azalır, sinyal miktarı artar ve duyarlı ölçümler yapılabilir.

Diferensiyel puls voltametri son zamanlarda en yaygın kullanılan analitik voltametrik yöntemlerden biri haline gelmiş ağır metal iyonlarının eser derişimlerinin tayininde özellikle yararlıdır.

## 2.5. Voltametri Tekniğinde Kullanılan Çalışma Elektrotları

Voltametrik hücrede üç elektrotndan biri, potansiyeli zamanla doğrusal olarak değişen ve analit iyonun aktivitesindeki değişimlere hızlı ve tekrarlanabilir cevaplar veren çalışma elektrotudur. Potansiyeli deney boyunca değişmeyen elektrot referans elektrottur. Bir diğer elektrot ise, elektriğin, sinyal kaynağından çözeltilinin içinden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlayan karşıit elektrottur.

Voltametrik analizler cam, kuartz veya teflon gibi temizlenmesi kolay olan kaplarda yürütülür. Voltametride kullanılan çalışma elektrotları çeşitli tip ve şekillerde olur. Bunlar inert bir malzemedan yapılmıştır ve iletken bir elektrot olan çubuğun oyuk kısmına düzgün bir şekilde yerleştirilmesiyle elde edilir. Bu iletkenler platin, altın; pirolitik grafit, camsı karbon, elmas, karbon nanotüpü, karbon pastası, karbon elyaf; ya da, kalay veya indiyum oksit gibi bir yarı-iletken maddelerden oluşur. Voltametride kullanılan elektrot türlerinin sınıflandırılması Şekil 2.17’de verilmektedir.

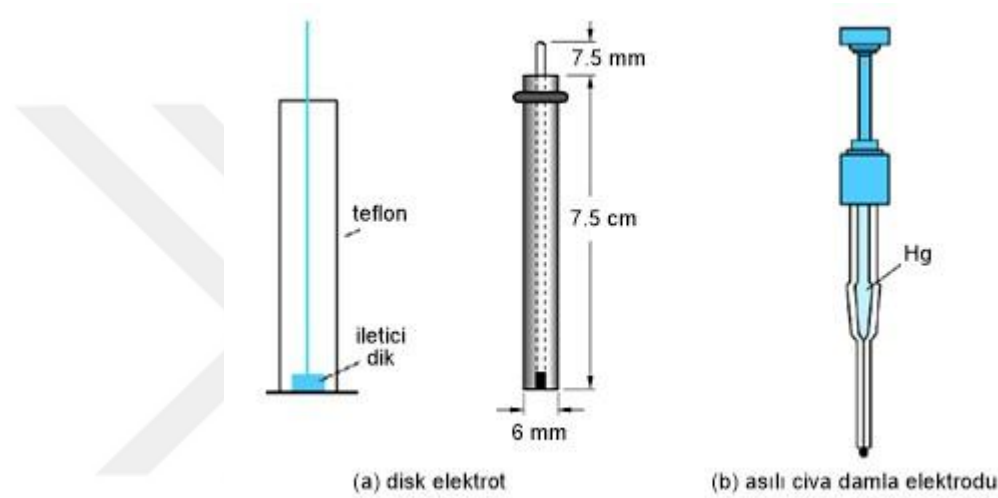


Şekil 2.17 Voltametride kullanılan elektrotlarının sınıflandırılması

### 2.5.1. Cıva elektrotlar

Cıva elektrotlar, damlayan cıva, asılı cıva ve cıva film elektrotlar gibi çeşitleri vardır. Damlayan cıva elektrodun (Şekil 2.18) avantajları şunlardır: Ortamda hidrojen oluşması kolaylaştığı için asidik çözeltilerden pek çok maddenin indirger. Sürekli olarak yeni bir metal yüzeyi olduğundan, elektrodun eskimesi veya geçmişi deneyi etkilemez; bu sayede tekrarlanabilir akım-voltaj eğrileri alınır.

Damlayan cıva elektrodunda cıvanın yükseltgenmesi dezavantajdır; bundan dolayı anodik akıma uygun değildir.



Şekil 2.18 Cıva elektrotlar

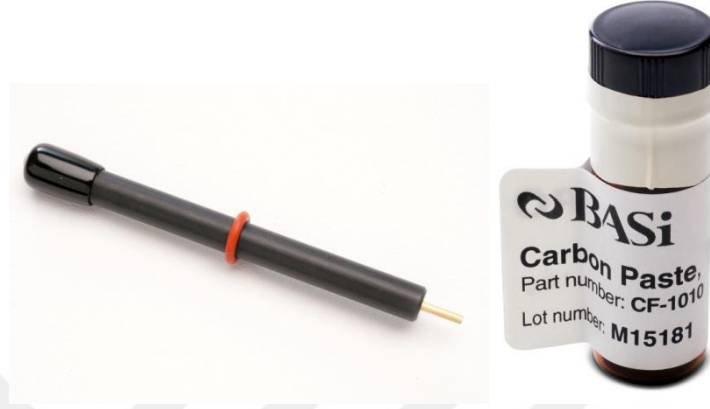
### 2.5.2. Platin, altın ve diğer soy metal elektrotlar

Bu tür soy metal elektrotlardan en çok kullanılanı Pt ve Au'dır. Bunlar oksitlenmeye karşı dayanıklı olmaları, çok yüksek saflıkta ve kolay hazırlanmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Pt elektrodun hidrojeni absorbe etmesinden dolayı sulu ortamda çalışmada dezavantaj oluşturmaktadır.

### 2.5.3. Karbon elektrotlar

“Grafit, camsi karbon, siyah karbon ve karbon nanotüpler” ve elmas gibi karbon bazlı elektrotlar elektriksel iletkenlik, geniş yüzeye sahip olmaları, termal iletkenlik ve dayanıklılık, sıkıştırılabilme, esnek olmaları ve organik, inorganik maddelerle kolaylıkla modifiye edilebilmeleri dolayısıyla oldukça yaygın kullanılırlar. Toz karbon

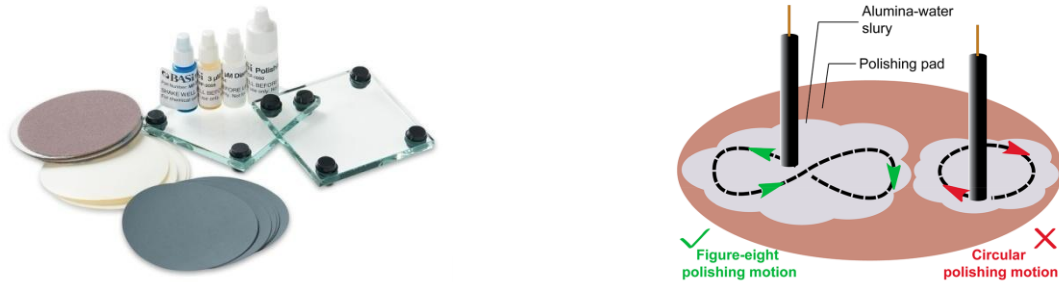
materyallerin kullanımında bağlayıcı olarak parafin ve mineral yağlar kullanılır. Bunlardan en çok kullanılanlar kolaylıkla grafitin parafin likit veya mineral yağla karıştırılarak hazırlanan karbon pasta elektrotlar (KPE) ve camsi elektrotlar (GCE) gelmektedir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Karbon pasta elektrot (MF-2010) ve Karbon pasta (CF-1010)

### 2.5.3.1. Elektrotların temizlenmesi

Karbon pasta elektrot kullanılarak yapılan çalışmalarda, test sırasında elektrodun yüzeyinde biriken ürünlerini uzaklaştırmak için temizlemek gerekmektedir. KPE'lerin temizlenmesinde yavaşça yüzeyini silmek veya sıyırarak değiştirilebilir. GCE ve elmas gibi elektrotların temizlenmesinde ise 1 mm elmas veya 0,05 mm alümina gibi ince bir malzeme ile hafifce cilalanarak temizlenebilir. Bunun için alümin ile parlatma bezi üzerinde ovalanır. Daha sonra elektrot yüzeyi su ve metanol ile iyice durulanır ve havada kurutulur (Şekil 2.20) (66).



Şekil 2.20 GCE ve elmas elektrotların temizleme malzemeleri ve yöntemi

#### 2.5.4. Voltametri Tekniğinde Kullanılan Referans Elektrotlar

İdeal bir referans elektrot, tam olarak bilinen, sabit ve incelenen çözeltinin bileşiminden hiç etkilenmeyen bir potansiyele sahiptir. Ayrıca, bir referans elektrodun, kolay hazırlanabilmesi ve dayanıklı olması; hücreden küçük akımlar geçerken bile sabit potansiyelini belli bir düzeyde koruması gerekir.

##### 2.5.4.1. Kalomel referans elektrot

Doğgun kalomel elektrot (saturated calomel electrode- SCE), kolay hazırlanabilmesi nedeniyle, analitik kimyacılar tarafından yaygın olarak kullanılır. (“Doğgun” terimi KCl derişimini (yaklaşık 4.6 M) ifade eder; Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> derişimini değil. Bütün kalomel elektrotlar Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bakımından doygundur).

##### 2.5.4.2. Gümüş-gümüş klorür referans elektrot

Gümüş/gümüş klorür referans elektrotu, potasyum klorür ve gümüş klorür ile doyurulmuş bir çözeltiye daldırılmış, bazen bir katı gümüş klorür tabakasıyla kaplanmış bir gümüş telden oluşur.



Ag/AgCl referans elektrotları (Şekil 2.21), zamanla veya sıcaklıkla değişmeyen kararlı yarı hücre potansiyelleri sunar. Ek olarak, buharlaşmaya elektrolit kaybı, çözeltinin doygun doğasını veya potansiyelini değiştirmez. Yarım hücrelerin temas bağlantılarının, doğası gereği, dolgu solüsyonunu içinde buldukları harici solüsyona yavaş yavaş sızdirdığının farkında olunmalıdır.



Şekil 2.21 Gümüş / Gümüş klorür (Ag/AgCl) referans elektrodu

Referans elektrot olarak kullanılan Ag/AgCl referans elektrodu kullanılmadığı zaman 3,0 M KCl çözeltisinde bekletilerek referans elektrodun dengede kalması sağlanır.

### 2.5.5. Voltametri Tekniğinde Kullanılan Yardımcı (Karşıt) Elektrotlar

Çalışma elektroduna bir potansiyel uygulandığında analitin indirgenmesi (veya oksidasyonu) meydana gelebilir ve akım akmaya başlar. Yardımcı elektrot amacı elektrik devresini tamamlamayı sağlamaktır. Akım, çalışma elektrot ve yardımcı elektrot arasındaki elektron akışı olarak kaydedilir. Karşı elektrotta meydana gelen reaksiyonun kinetiğinin, çalışma elektrotunda meydana gelenleri engellememesini sağlamak için, karşı elektrotun yüzey alanı, çalışma elektrotunun yüzey alanından daha büyüktür. Karşı elektrot olarak tipik olarak platin tel (Şekil 2.22) veya disk kullanılır, ancak karbon bazlı karşı elektrotlar da mevcuttur (67).



Şekil 2.22 Platin tel yardımcı elektrot

### 2.6. Modifiye Elektrotlar

Elektrokimyasal bilim alanındaki ilerlemeler, alandaki bilim adamları araştırmalarına devam etmek için çıplak yüzeylerin kullanımını yetersiz bulup kimyasal modifikasyona gitmişlerdir. Bunun nedeni, elektrotları içeren araştırmaların, elektrik iletkeni olarak kullanılan malzemelerde doğal olarak bulunmayan bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri gerektirmesidir. Atomlar, moleküller ve nano parçacıklar, elektronik ve yapısal özelliklerini değiştirmek için malzemelerin yüzeyine eklenir ve bu da işlevselliklerinin değişmesine yol açar. Bunlardan en çok karbon, altın ve platin kullanılarak daha kararlı, daha secici ve daha duyarlı elektrotlar elde etmek için modifiye elektrot hazırlanmıştır. Bunların yanında enzim, antikor, antijen gibi biyolojik materyaller de modifikasyonda kullanılmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2019-2021 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yapılmıştır.

#### 3.1. Aletler ve Gereçler

Elektrokimyasal çalışmalar için kısımları aşağıda verilen bilgisayar kontrollü BASi Epsilon-EC versiyon 2 (Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN) potansiyostat sistemi kullanıldı (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).

##### 1. Üç elektrotlu sistem için BASi C-3 Hücre Standı

- Çalışma, referans ve yardımcı elektrot olarak:
  - Çalışma elektrot olarak 3 mm çapında karbon pasta elektrodu (KPE) (BASi MF-2010, CF-1010) (Şekil 2,19),
  - Referans elektrot olarak 3M KCl içerisinde tutulan Ag/AgCl referans elektrodu (BASi MF-2052 RE-5B) (Şekil 2,21)
  - Karşıt elektrot olarak Pt tel (BASi MW-1032) (Şekil 2,22) kullanılmıştır.
  - Software BASi Epsilon-EC - Ver. 2.13.77
  - 15 mL pyrex cam hücreler

##### 2. Ultra saf su cihazı (Purelab Option)

##### 3. Terazı (Denver Instrument)

##### 4. Ultrasonik banyo (Elma Ultrasonic LC 30H)

##### 5. pH iyonmetre (Mettler Toledo)

##### 6. Hassas teraziler ( Denver Instruments)

##### 7. Vorteks Mikser (Tetra)

##### 8. Otomatik pipetler (Eppendorf 100 µL ve 1000 µL)

##### 9. Pipet Uçları (Eppendorf 100µL ve 1000 µL)

##### 10. Balonjojeler (5, 10, 25, 50 ve 100 ml) ve diğer cam malzemeler



**Şekil 3.1 BASi Epsilon markalı elektrokimyasal çalışma cihazı**



**Şekil 3.2 BASi C3 elektrot hücre standı ünitesi**

### 3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Kullanılan kimyasallar, saflıkları ve temin edildiği firmalar Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, onların saflıkları ve temin edildiği firmalar**

Madde	Saflık derecesi, %	Firma
Budesonid	Saf	DEVA Holding ilaç firması
Metanol	99,7	Riedel de Haen
Etanol	96	Alkokim
Hidroklorik asit	37	Merck
Asetik asit	100	Merck
Sülfirik asit	95-97	Merck
Fosforik asit	85	Carlo Erba
Borik asit	99,5-100,5	Merck
Sodyum hidroksit	99-100,5	Riedel de Haen

Potasyum klorür	99-100,5	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat	99,5-100,5	Merck
AgNO <sub>3</sub>	Saf	Merck
Grafit tozu (< 20 µm)	Saf	Sigma-Aldrich
Grafen (çapı 5-10 µm, 750 m <sup>2</sup> /g)	Saf	Nanografi Company (Ankara)
Parafin (56-58)	Saf	Merck
MWCNT (çok duvarlı karbon nanotüp)	Saf	Nanografi Company (Ankara)
Silikon yağı	Saf	Zag Kimya

### 3.3. Hazırlanan Çözeltiler

#### 3.3.1. Budesonid Stok Çözeltisi

Budesonid stok I çözeltisi için 10,0 mg tartıldı ve 10 mL'lik balonjojede metanol ile hacmine tamamlandı (1,0 mg/mL;  $2,33 \times 10^{-3}$  M). 0,1 ve 0,01 mg/mL standart çözeltiler stok I çözeltisinden alınarak uygun seyreltmelerle hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

### 3.3.2. Tampon Çözeltiler

#### *Britton Robinson (BR) Tampon Çözeltisi*

pH 2-9 arasında Britton Robinson (BR) tampon çözeltisi için 12,4 g borik asit ( $H_3BO_3$ ) suda çözündürüldükten sonra, 11,6 mL %100,0'lük asetik asit ( $CH_3COOH$ ) ve 13,4 mL %85,0'lik  $H_3PO_4$ 'in karıştırılarak saf su ile 2 L'ye tamamlanmasıyla 0,1 M BR tampon çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu stok tampon çözeltisinden 200 mL alındı ve 0,1 M NaOH çözeltisi kullanılarak istenilen pH'ya (pH=2-12) pH metre ile ayarlandı.

#### *Fosfat tamponu Çözeltisi*

Tampon çözeltiyi hazırlamak için  $KH_2PO_4$  maddesinden 54,436 gr tartılıp 2 L'e saf suyla hacminin tamamlanmasıyla 0,2 M çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra bu tampon çözelti NaOH ve  $H_3PO_4$  yardımıyla pH 2-8 aralığında 200 ml'lik çözeltiler halinde ayarlandı.

#### *HCl Çözeltisi*

Yüzdesi %37, yoğunluğu 1,19 g/mL olan derişik hidroklorik asit çözeltisinden 8,3 mL alınarak bir miktar saf su bulunan 1 L'lik balonjojeye alınmış ve su ile hacmine tamamlanarak 0,1 M HCL çözeltisi hazırlanmıştır.

#### *KCl çözeltisi*

KCl maddesinden 0,7455 g tartılarak 100 mL'lik balonjoje alınmış ve distile su ile hacmine tamamlanarak 0,1 M KCl çözeltisi hazırlandı.

#### *HCl, KCl ve Metanol çözeltisi*

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan 0,1 M HCl çözeltisinden 790 mL, 0,1 M KCl çözeltisinden 130 mL alınarak karıştırıldı ve üzerine 80 mL metanol çözeltisi eklenerek 1 L'ye tamamlandı. Maddenin voltametrik analizlerinde bu çözelti kullanıldı.

#### *0,1 M $H_2SO_4$ çözeltisi*

%96'lik ve 1,84 yoğunluğundaki derişik çözeltisinden 1 L'lik balon jojeye asit ilave etmeden önce bir miktar su koyulur. Daha sonra 55,5 mL  $H_2SO_4$  çözeltisi 1 L'lik balonjojeye alındı ve su ile hacmine tamamlanır.

#### *NaOH Çözeltisi*

Katı maddeden 4 g tartılarak üzerine bir miktar saf su ekleyerek çözülmüş, ardından 1 L'ye tamamlanarak 0,1 M NaOH çözeltisi hazırlanmıştır.

### **3 M KCl çözeltisi**

11,1825 g KCl maddesi tartılarak 50 mL'lik balon joje içerisine aktarılır ve su ile 50 mL'ye tamamlanır. Elde edilen 3 M KCl çözeltisinde referans elektrot saklanır.

## **3.4. Etken Madde ve İlaç**

### **3.4.1. Karbon pasta elektrotların hazırlanması**

Budesonidin tayininde kullanılmak üzere çalışma elektrodu olarak KPE ve farklı modifiye karbon pasta elektrotlar hazırlanmıştır. Çalışmada ön denemelerde KPE için ticari olarak hazır alınan pasta ile başlandı ve daha sonra laboratuvarında hazırlanan KPE ile devam edildi. KPE hazırlamak için genel olarak % 70 grafit %30 silikon yağı ile 25 mL'lik bir beherde yaklaşık 10 dakika karıştırarak homojen bir pasta elde edilmiştir. Modifiye elektrotlar için ise kitosan (%10 ve %20), grafen (GR) (%10, %20 ve %25), çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT- %10) ve  $\beta$ -Dextrin (%3) nanopartikülleri ile %50-60 grafit tozunun bir tamamen karıştırılmasından sonra %30 silikon yağı ile 25 mL'lik bir beherde tamamen homojen bir pasta oluncaya kadar karıştırarak elde edilmiştir. Hazırlanan pastalar kapaklı cam şişelerde saklanmıştır. Pastalar elektrot gövdesinin uç kısmında bulunan 3,0 mm derinliğindeki deliğe yerleştirilmiş ve kağıt üzerinde yüzeyi homojen ve düzgün hale getirilmiştir.

Hazırlanan farklı modifiye elektrotlar, etken maddenin hangi modifiye elektrotta daha iyi sonuç verdiğini değerlendirmek üzere hazırlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda modifiye KP elektrotları ile daha hasas analizin elde edilmediği görülmüş ve sade KPE ile devam edilmiştir.

## **3.5. Budesonidin tayini**

### **3.5.1. Elektrokimyasal deneylerin yapılışı**

Budesonidin tayini için geliştirilen voltametrik yöntemde üç elektrot sisteminde gerçekleştirilmiştir. Burada elektrokimyasal sisteme bağlı BASi C3 elektrot hücre standı ve 10 mL'lik pyrex hücrelerde gerçekleştirildi. Çalışma elektrodu için KPE kullanıldı. Deneylerde platin tel yardımcı elektrot, Ag/AgCl referans elektrot olarak kullanılmıştır.

### 3.5.2. Döngüsel Voltametrik (CV) Deneyleerin Yapılışı

Öncelikle, destek elektrolit olarak değişik pH'lardaki BR tamponu, fosfat tamponu, 0,1 M HCl, 0,1 M HCl-KCl-metanol ve 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltilerin 10'ar mL hücrelere alındı ve 3 dakika azot gazı geçirildi. Sonra, çalışmanın yapılabileceği ve en yüksek pik akımının hangi çözeltide olabileceği ve potansiyel penceresi aralığı döngüsel voltametri yöntemiyle araştırıldı. Çalışma potansiyel aralığı olarak başlangıç sıfır (0) ve bitiş potansiyeli -1400 aralığının uygun olduğu tespit edildi. Belli miktardaki budesonid maddesi elektrolit çözeltisine eklendi ve karıştırıldıktan sonra kullanılan pH'ların ve tarama hızının pik akımı üzerindeki etkisi döngüsel voltametri yöntemiyle incelenmiştir. Ayrıca, çalışmada belirli miktarlarda madde ilavesi ile CV ile pik akımında artışlar araştırılmıştır. CV ile tarama hızı deneylerinde 20 mV/s ile 200 mV/s arasındaki voltamogramlar alınmıştır (Şekil 4.6).

### 3.5.3. DPV'nin Yapılışı ve Ölçü Eğrisi

CV deneysel bulgularla belirlenen çalışma potansiyel aralığında budesonidin diferansiyel puls tekniği ile tayin koşulları optimize edilmiş, tarama hızı olarak 20 mV/s ve puls genliği olarak 50 mV değerlerinde ölçümler alınmıştır.

Ölçü eğrisi için belirlenen 0,1 M HCl-KCl ve metanol çözücü karışımdan 10 mL cam hücreye alınmış ve azot gazı geçirilmiştir. Çalışma elektrot olarak KPE'un kullanıldığı DPV analizlerinde potansiyel penceresi başlangıç sıfır ve sonu -1400 mV arası seçilmiştir. Voltamogramda -812 mV ile -936 mV arasında indirgenme akım pik değerleri kaydedilmiştir. Önce boş çözeltinin DPV'leri alınmış ve kaydedilmiştir. Daha sonra 1,65 ile 35,35 µg/mL aralığında farklı beş konsantrasyondaki budesonid maddesinden ilave edilmiş karıştırıldıktan sonra pik akımları ölçülmüştür. Daha sonra alınan madde konsantrasyonlarına karşı pik akımları kaydedilmiş ve kalibrasyon eğrisi çizilerek regresyon denklemi bulunmuştur. Herbir konsantrasyon için en az 6 analiz yapılmıştır. Geliştirilen yöntem daha sonra maddenin ampulde tayinlerine uygulanmıştır.

### 3.5.4. DPV'nin ilaç formülasyonunun uygulanması

Budesonid ilaç etken maddesi içeren Astra Zeneca Firmasının ithal ruhsatna sahip olduğu 1 mg/ 2 mL'lik Pulmicort Respules (budesonide inhalation suspension) (nebülizer süspansiyon, 5 tek dozlu respules ampul) preparatı kullanıldı. Her bir ampul

tek kullanımlık olup açıldıktan sonra 12 saat içinde kullanılmalıdır. Sadece 1 mL kullanılırsa geri kalan hacmin sterilliği bozulur.

1 mg/ 2 mL'lik her tek dozluk plastik PULMICORT Nebülizer Süspansiyon ampülü ile belli miktarlarda madde otomatik pipet yardımı ile alınarak çalışılmıştır. Çalışmalarda, 2 farklı süspansiyon ampülü ile ayrı ayrı 3'er analiz yapılmış ve ortalamaları alınmıştır. Çıkan pik akım değerleri standart madde için bulunan regresyon denkleminde yerine konularak miktarı hesaplanmıştır.

### **3.6. Elektrokimyasal Yöntemlerde Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi**

Bu tez çalışmasında, geliştirilen yöntemin validasyonu için doğrusallık, doğrusal aralık, doğruluk, kesinlik, teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) açısından valide edilmiştir. Validasyonda kılavuz olarak İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, *International Conference Harmonization Q2(R1)*) alındı (68).

#### **3.6.1. Doğrusallık ve doğrusal aralık**

Budesonid içeren metanol çözeltisinin ve süspansiyon ampul örneklerinin doğrusallığını belirlemek için sulu çözeltilerde bölüm 3.5.3. ve 3.5.4. bölümlerinde anlatıldığı gibi 1,65 ile 35,35 µg/mL aralığında 5 farklı konsantrasyonda çalışıldı. Maddenin pik akımları konsantrasyona karşı çizilerek kalibrasyon eğrisi, regresyon denklemi ve korelasyon katsayıları bulundu. Değerler bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

#### **3.6.2. Doğruluk ve Kesinlik**

Üç farklı konsantrasyonda (3, 10, 20 µg/mL) budesonid çözeltileri alındı ve bölüm 3.5.3.'deki gibi çalışıldı. Analizler aynı gün (gün içi) ve 2 hafta içinde 5 farklı günde (günler arası) yapıldı. Her konsantrasyon için 5 ayrı analiz yapıldı. Bulunan akım değerleri regresyon denkleminde yerine konularak konsantrasyonları ve ortalama, standart sapma (SD) ve yüzde relatif standart sapmaları (%RSD) hesaplanmıştır. % RSD değerleri (SD x100)/ konsantrasyonların ortalaması ile formalize edilmektedir. Sonuçlar bölüm 4.2.3'te verilmiştir.

#### **3.6.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin sınırları (LOQ)**

Metoda ait teşhis sınırı (Limit of Detection, LOD) analitin tespit edilebildiği en düşük analit konsantrasyonudur. LOD hesaplaması için farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan metotta budesonid konsantrasyonu kalibrasyon

eğrisinin formülünden hesaplandığı için kalibrasyon eğrisinin eğimi ve regresyon doğrusundaki b kesişim noktasının standart sapması kullanılarak LOD değeri hesaplanmıştır. LOD için  $3.3 \times SD/m_{ort}$  ve LOQ için  $10 \times SD/m_{ort}$  förmülleri kullanılarak hesaplanmıştır. Değerler bölüm 4.2.2’de verilmiştir.

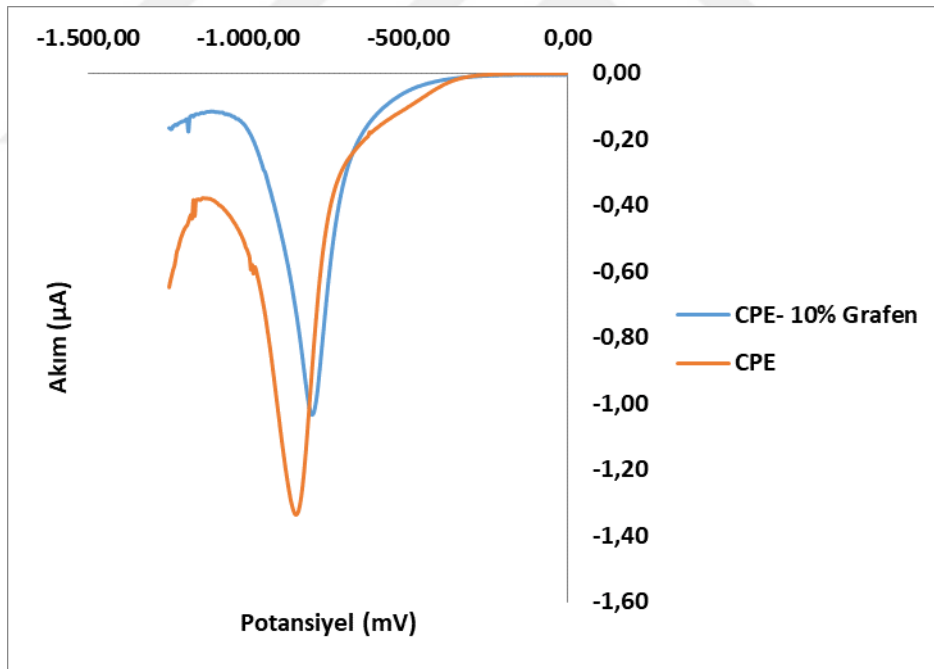


## 4. BULGULAR

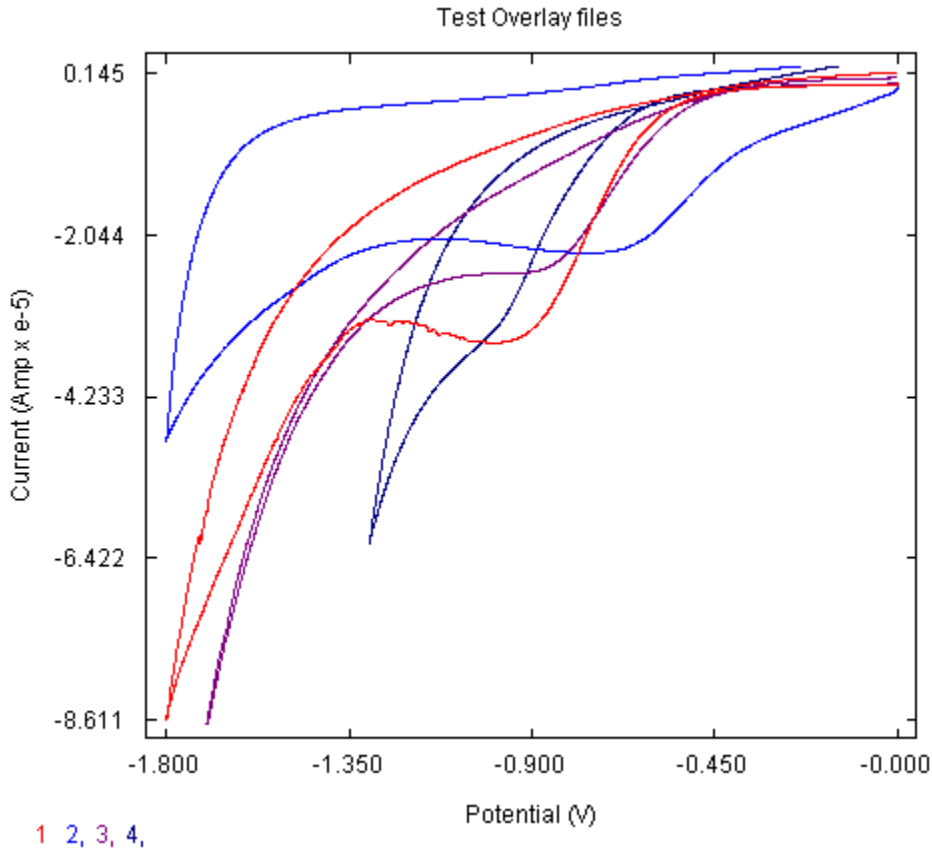
### 4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

#### 4.1.1. Denenen Çalışma elektrotları

Budesonidin elektrokimyasal yöntemle hassas ve duyarlı tayini için başlıca KPE, GCE, %10 grafen modifiye KPE ve %10 MWCN modifiye KPE elektrotları denendi. Bunun yanında platin ve gümüş metal elektrotları da çalışma elektrodu olarak denendi. Denemelerde maddenin 10  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonundaki metanol çözeltisi kullanıldı. Elektrolit çözeltisi olarak pH 2 ve pH 7 çözeltileri asidik ve bazik ortam olarak seçildi. Fakat Şekil 4.2’de görüldüğü gibi KPE elektrot bunların arasında en yüksekti. Bu nedenle bu çalışmada çalışma elektrodu olarak herhangi bir modifikasyona gidilmedi ve KPE ile devam edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Budesonidin (2  $\mu\text{g/mL}$ ) çalışma elektrodu olarak KPE ve %10 grafen modifiye KPE ile 0,1 M HCl çözeltisinde alınmış döngüsel voltamogramları



**Şekil 4.2** 10 µg/ mL Budesonid çözeltisinin KPE (1), GCE (2), MWCN (3) ve %25 Gr (4) ile CV voltamogramları (v: 0,1 V/s)

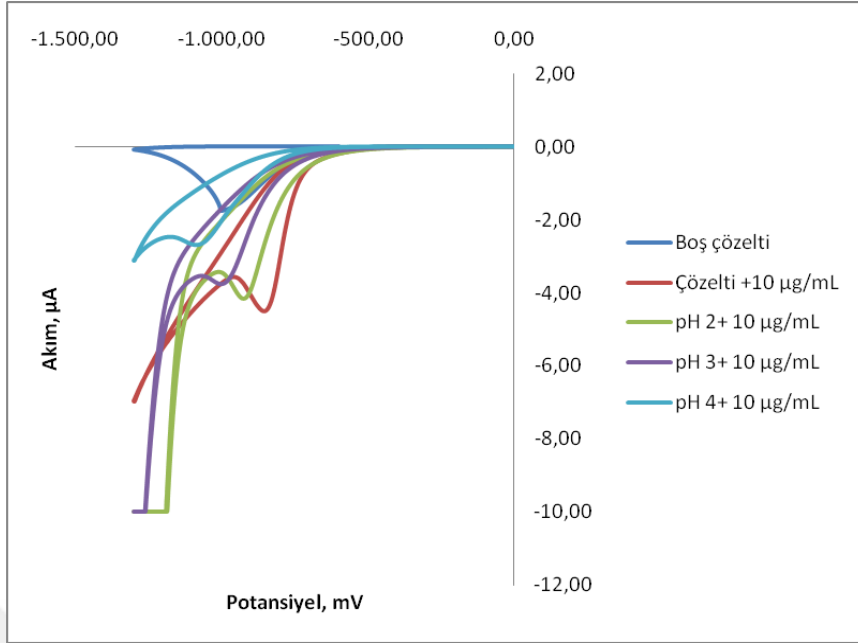
#### 4.1.2. Elektrolit Çözeltisinin Seçimi ve pH etkisi

Budesonidin CV ve DPV yöntemleriyle elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve miktar tayini için öncelikle farklı BR ve fosfat tamponları (pH=2-9), 0,1 M HCl ve 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltileri denendi. Elektrolitin ve pH'nın potansiyel ve akım üzerindeki etkisi CV ve DPV yöntemleriyle incelenmiş ve yapılan denemelerde 10 µg/mL sabit madde çözeltisi ile çalışılmıştır. 100 mV/s gerilim tarama hızı ile elde edilen döngüsel voltametri ile denemelerde pozitif potansiyel penceresinde (0-1400 mV aralığı) herhangi bir pik akımı gözlenmedi. Negatif potansiyel tarama penceresinde (0-1400 mV) ise -854 ile -1088 potansiyel aralığında bir tersinmez indirgenme piki elde edildi (Şekil 4.2). Maddeden ileri gelen bu indirgenme pikinin ise pH=4'den sonra oldukça azaldığını ve pikin pH=5'de oldukça az olduğunu gösterdi. Daha sonra maddenin çözünürlük problemlerinden dolayı ortama belli oranlarda metanol ilave edildi

ve CV ve DPV voltamogramları alındı. 0,1 M HCl çözeltisinde diğerlerine oranla daha iyi pik akımı elde edildi. Sonra, 0,1 M HCl çözeltisine %13 oranında 0,1 M KCl elektrolit çözeltisi ve %8 oranında metanol ilave edilerek yapılan analizlerde çok daha uygun akım pikleri elde edildiği gözlemlendi ve bundan sonraki çalışmamızda bu çözelti ile devam edildi.

Test edilen pH'lardaki (Şekil 4.3) pik potansiyelleri ve pik akım değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir. CV tekniği ile HCl-KCl-metanol (analizde seçilen elektrolit çözelti) çözeltisi ve fosfat tamponlarında elde edilen  $I_p$ -pH ve  $E_p$ -pH, grafikleri sırasıyla Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de verilmiştir. Pik potansiyeli mV, pik akımı ise  $\mu A$  cinsinden verilmiştir.

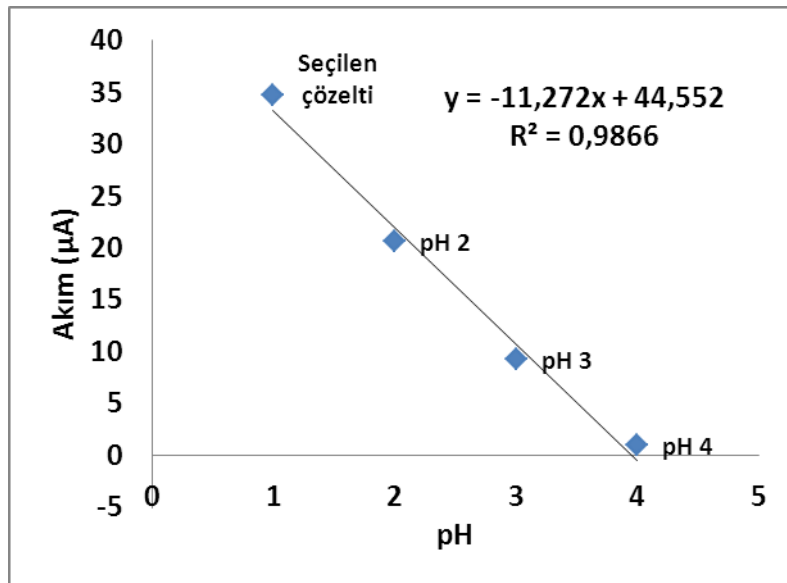
Pik potansiyelin (pH 1,0 (HCl içeren elektrolit çözeltisi) ve fosfat tamponu pH 2-4 aralığında) pH'nın artışıyla daha negatif alana kayması budesonidin indirgenmesinin pH'ya bağlı olduğunu ve elektron transferi reaksiyonunda hidrojenin etkili olduğunu göstermektedir. Pik potansiyelinin çözeltinin pH'sına karşı çizilen eğrinin regresyon denkleminde [ $E_p(mV) = -76,6pH - 772,5$ ] eğimin negatif olması da reaksiyonda proton girdiğini göstermektedir. Bununla beraber, denklemdeki eğimin 76,6 olması teorik değer olan 59 mV'a yakın olduğu için de maddenin elektrot yüzeyindeki reaksiyonda yer alan elektron ve proton sayısının eşit olduğunu göstermektedir.



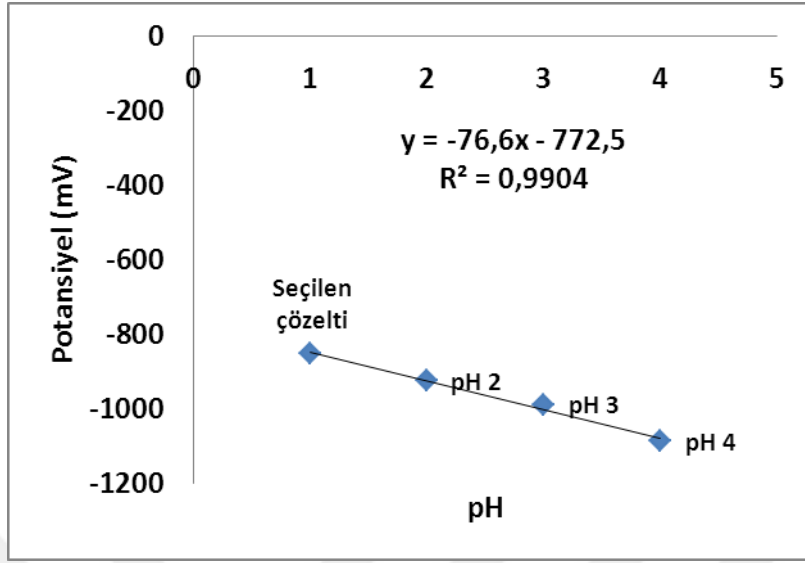
**Şekil 4.3 Budesonidin 0.0 mV ile -1400 mV aralığında 10 µg/mL konsantrasyonda farklı pH'lardaki döngüsel voltamogramları**

**Tablo 4.1 Budesonid standart çözeltinin (10 µg/mL) KPE üzerinde değişik elektrolit çözeltilisindeki potansiyel ve akım değerleri (N=3)**

Elektrolit Çözeltisi	Potansiyel (Ep, mV)	Akım (Ip, µA)
9mL HCl- KCl- 1mL MeOH (Seçilen çözelti)	-854	34,7265
BR pH 2	-974	9,8543
BR pH 3	-998	8,0895
BR pH 4	-1024	4,123
BR pH 5	-1014	3,8544
BR pH 6	Pik gözlenemedi	Pik gözlenemedi
BR pH 7	Pik gözlenemedi	Pik gözlenemedi
BR pH 8	Pik gözlenemedi	Pik gözlenemedi
BR pH 9	Pik gözlenemedi	Pik gözlenemedi
Fosfat pH 2	-925	20,6027
Fosfat pH 3	-989	9,2073
Fosfat pH 4	-1088	0,9522
Fosfat pH 5	Pik gözlenemedi	Pik gözlenemedi
Fosfat pH 6	Pik gözlenemedi	Pik gözlenemedi
Fosfat pH 7	Pik gözlenemedi	Pik gözlenemedi
Fosfat pH 8	Pik gözlenemedi	Pik gözlenemedi
0.1 M HCl	-922	14,5998
0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-914	17,7584



**Şekil 4.4 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin pH'ına karşı Ip grafiği**



Şekil 4.5 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin pH'ına karşı Ep grafiği

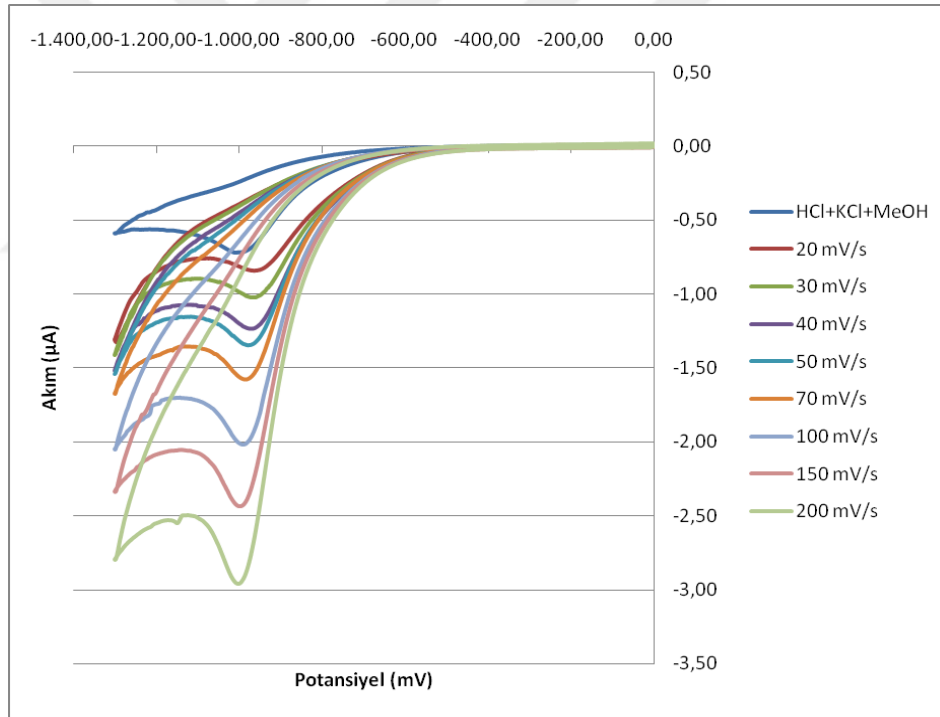
#### 4.1.3. Tarama hızı etkisi

Maddenin 10 µg/mL konsantrasyonundaki çözeltisinin tarama hızı çalışması seçilen elektrolit çözeltisinde 20 mV/s ile 200 mV/s arasındaki CV (Şekil 4.6) ve DPV voltamogramları alınmıştır. Bu çalışma için 3 ayrı test yapılmış ve ortalamaları alınmıştır. Tablo 4.2'de çalışılan tarama hızlarına karşı  $E_p$  ve  $I_p$  değerleri yer almaktadır.

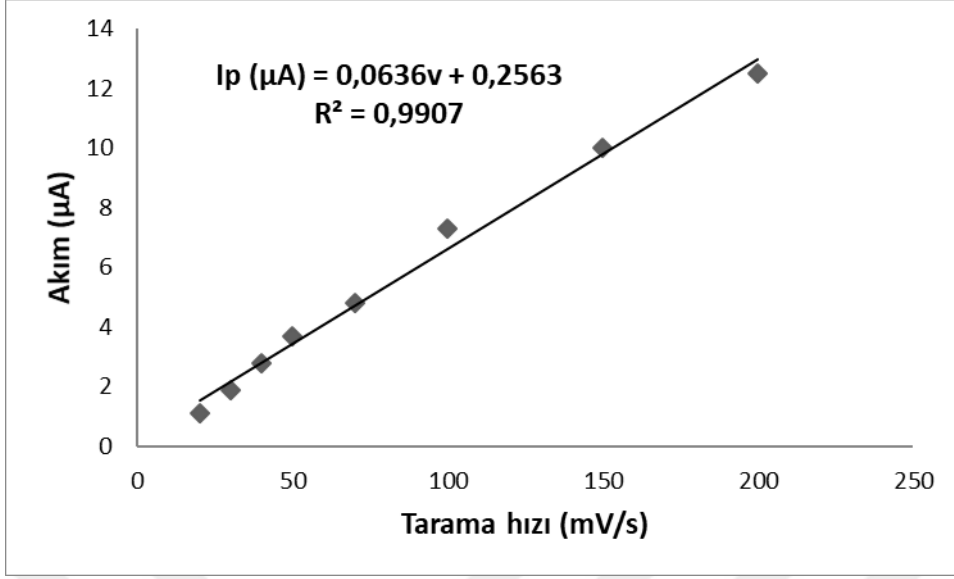
İlaç maddesinin indirgenme pik akımının tarama hızıyla doğru orantılı olarak arttığı belirlendi (Şekil 4.7). Pik potansiyelinin artan tarama hızıyla negatif bölgeye kaydığı görüldü (Şekil 4.8). Bu da reaksiyonun tersinmez olduğunu göstermektedir. Madde çözeltisinin elektrokimyasal reaksiyonun adsorpsiyon ve difüzyon kontrollü olup olmadığını anlamak için tarama hızı değerlerinden  $\log v - \log I_p$  grafiği ve  $I_p - v^{1/2}$  grafikleri hazırlanmış ve regresyon denklemleri hesaplanmıştır. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi  $\log v - \log I_p$  grafiğinde eğimin 1,0412 olduğu görülmektedir. Bunun yanında, Şekil 4.10'da  $I_p - v^{1/2}$  grafiğinin eğiminde 1,198 olarak bulunmuştur. Bu grafiklerde eğiminin 1 olması elektrokimyasal reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

**Tablo 4.2 0,1 M HCl- %13 KCl-%8 metanol çözeltisinde budesonidin elektrot değiştirilmeden test edilen artan tarama hızındaki Ep ve Ip değerleri (N=3).**

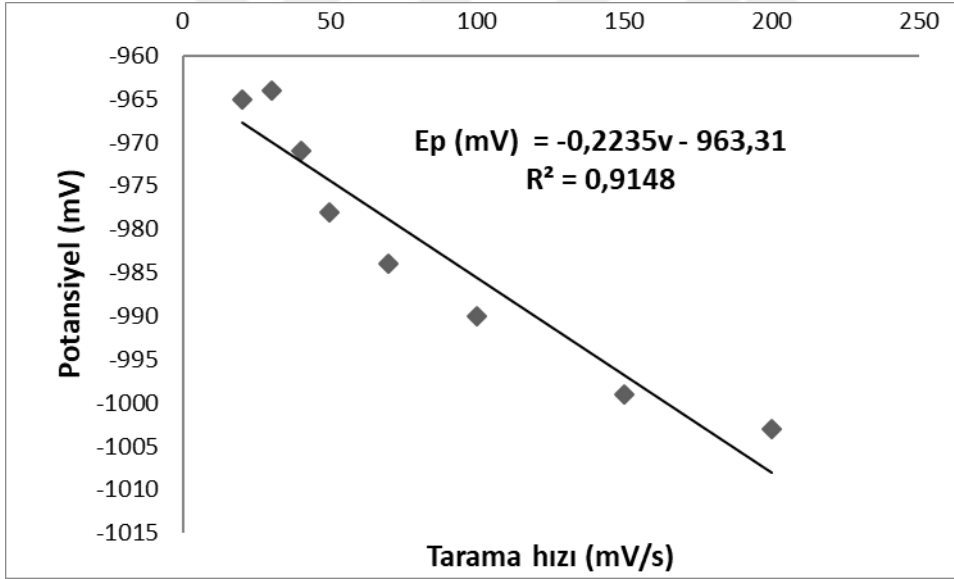
Tarama Hızı (mV/s)	Ep (mV)	Ip ( $\mu$ A)
20	-965	1,1078
30	-964	1,8891
40	-971	2,768
50	-978	3,6896
70	-984	4,7974
100	-990	7,2999
150	-999	9,9977
200	-1003	12,4819



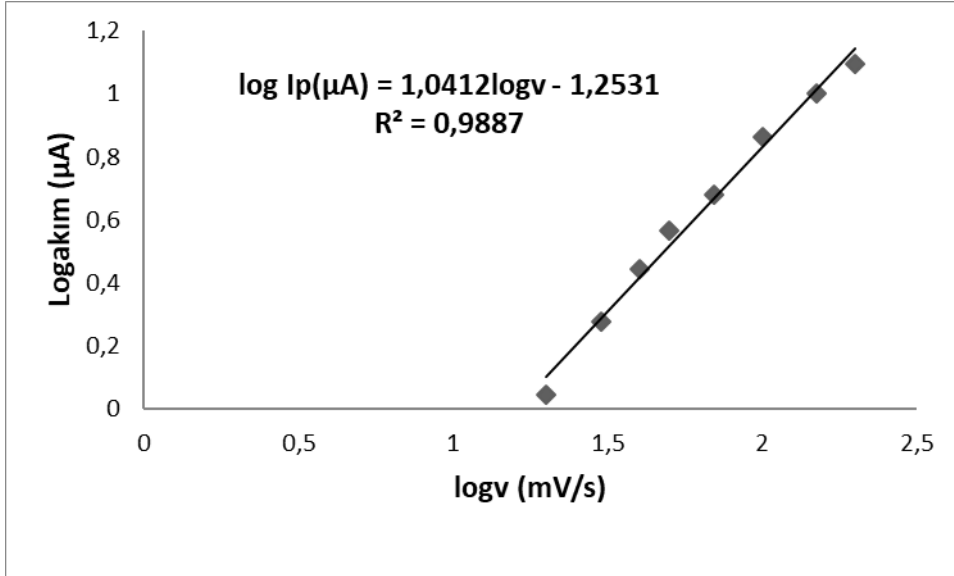
**Şekil 4.6 10  $\mu$ g/ mL budesonid çözeltisinin 0,0 mV ile -1400 mV aralığında seçilen çözeltide 20-200 mV/s aralığında tarama hızları.**



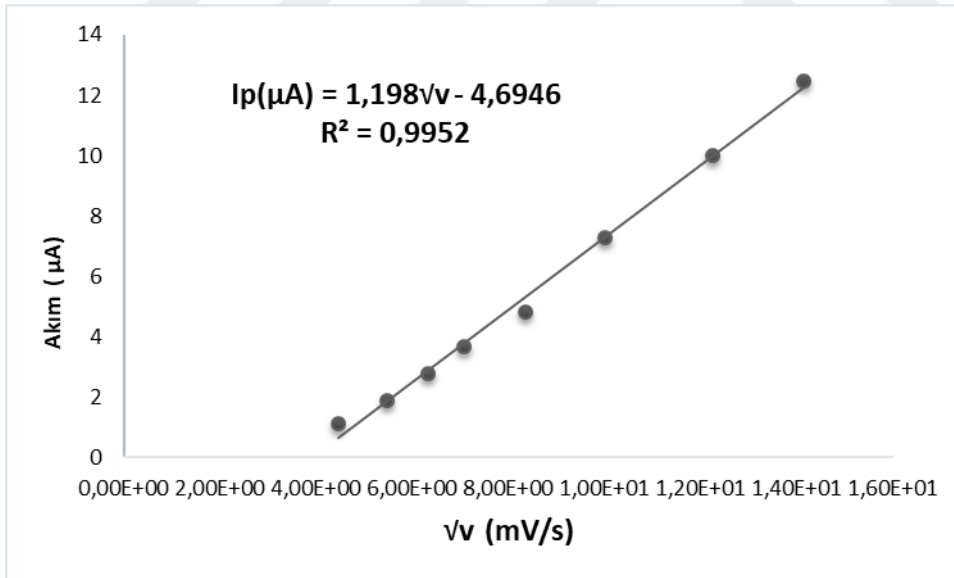
Şekil 4.7 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin akıma karşı tarama hızı grafiği



Şekil 4.8 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin pik potansiyeline karşı tarama hızı grafiği



Şekil 4.9 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin akımın logaritmasının karşı tarama hızının logaritmasına olan grafiği



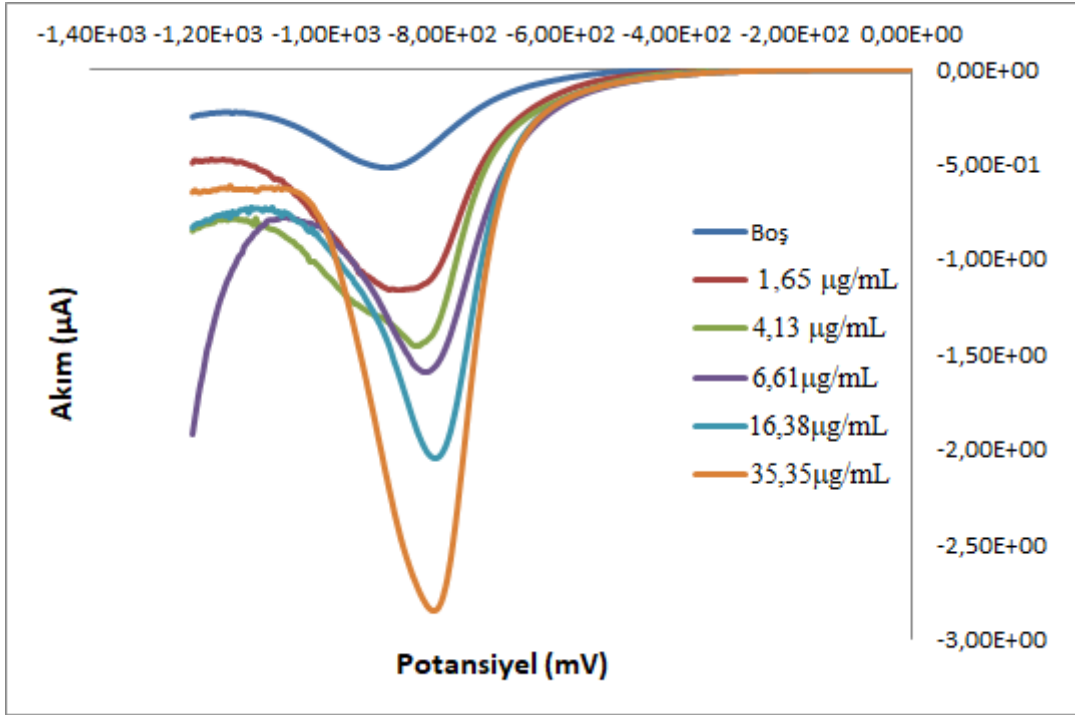
Şekil 4.10 10 µg/ mL budesonid çözeltisinin akıma karşı tarama hızının kareköküne olan grafiği

#### 4.1.4. Budesonidin muhtemel reaksiyon mekanizması

Yapılan literatür araştırmasında budesonidin elektrokimyasal özelliklerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmadı. Ancak, bu madde molekülüne çok benzerlik gösteren kortikosteroid olan deksametazon ilaç molekülleri ile yapılmış bazı voltammetrik yöntemler mevcuttur. Bu çalışmalarda modifiye GCE (69-70) ve amalgam (71) gibi çalışma elektrotların kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalar incelendiğinde, redoks sisteminde elektrot üzerinde genelde adsorpsiyon veya adsorpsiyon-diffüzyon kontrollü olduğu bildirilmiştir. Buda bizim verilerimizi doğrulamaktadır. Çifte bağa komşu karbonil grubunu içeren ketosteroidlerin izole karbonil grubu içerenlere kıyasla indirgenmeye uğradıkları bildirilmiştir (70). Bu çalışmalarda konjuge olmayan karbonil gruplarında hidroksil grupları tarafından aktivite edildikleri tespit edilmiştir (70). Bu araştırmalarda deksametazon'un C<sub>20</sub> de bulunan C=O grubunun indirgendiği bir hidroksil ve bir hidrojenin girdiği (+2H) ve aynı zamanda 2 elektronun (2e<sup>-</sup>) katıldığı bildirilmiştir (69-71). Başka bir çalışmada ise, indirgenme sonucu oluşan 2H<sup>+</sup> ve 2e<sup>-</sup>'nin C<sub>3</sub> ve C<sub>20</sub>'deki karbonil gruplarının herhangi birinde gerçekleşebileceğini göstermişlerdir (72). Bütün bu veriler ışığında, seçilen analiz koşullarında DPV yöntemiyle yapılan miktar tayini çalışmasında, budesonidin de C<sub>3</sub> ve C<sub>20</sub>'deki herhangi bir karbonil grubundan indirgendiği öngörülmektedir.

#### 4.1.5. Ölçü eğrisinin hazırlanması

Seçilen KCl ve metanol içeren 0,1 M HCl'li elektrolit çözeltisinden 10'ar mL cam hücrelere transfer edildi. Budesonid miktarı 1,65, 4,13, 6,61, 16,38 ve 35,35 µg/mL arasında 5 ayrı konsantrasyonda çalışıldı. Çalışmada belirtilen konsantrasyonlara karşılık gelen maddenin stok çözeltisinden ilaveler yapılarak DPV voltamogramları alındı. DPV analizinde pik potansiyeli yaklaşık - 859 mV potansiyelindeki indirgenme pik akımları alınmıştır. Çalışmada herbir konsantrasyon için en az 6 seri çalışma yapılmıştır. Ölçü eğrisi, konsantrasyona karşı pik akımların ortalamaları grafiğe geçirilerek elde edildi ve regresyon denklemi çıkarıldı. Konsantrasyona karşılık gelen pik akımları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmiştir ve bu değerlerle oluşturulan DPV voltamogramları üst üste Şekil 4.11'de verilmiştir.



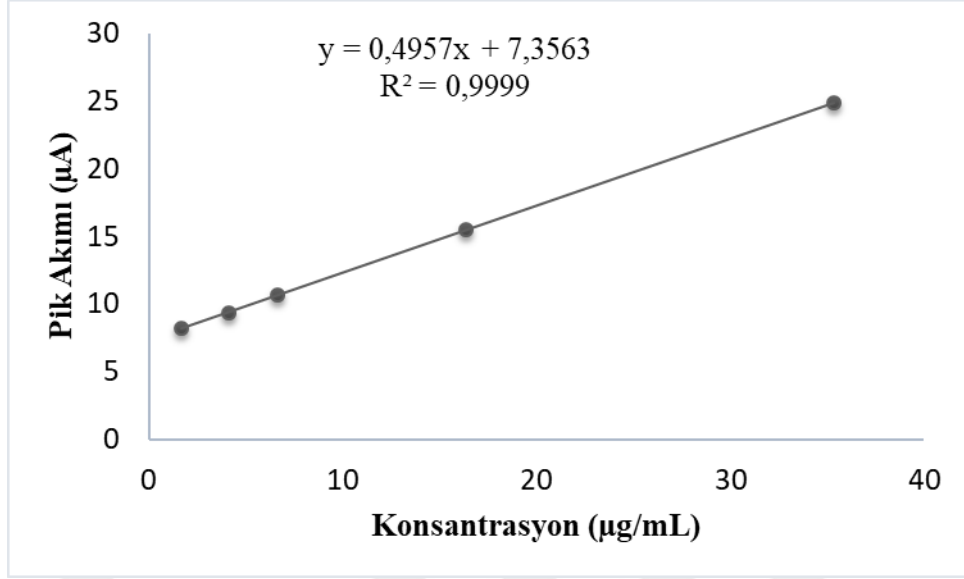
Şekil 4.11 Budesonidin değişik konsantrasyondaki diferansiyel puls voltamogramları. Çalışma elektrodu: KPE, Referans elektrot Ag/AgCl ve karşıt elektrot: Platin elektrot. Tarama hızı: 20 mV/s, 100 µA

**Tablo 4.3 Budesonid standart çözeltisinin 1,65-35,35 µg/mL konsantrasyon aralığında elde edilen ölçü eğrisine ait akım (Ip) değerleri ve istatistiksel verileri**

<b>Budesonidin DPV yöntemi ile elde edilen akım pikleri</b>									
<b>C</b> <b>µg/mL</b>	<b>Ip-1</b>	<b>Ip-2</b>	<b>Ip-3</b>	<b>Ip-4</b>	<b>Ip-5</b>	<b>Ip-6</b>	<b>Ip ORT</b>	<b>SD</b>	<b>%RSD</b>
1,65	8,1236	8,2336	8,2603	8,3336	8,2336	8,3639	8,23694	0,085	1,03
4,13	9,2835	9,2707	9,4207	9,3707	9,2835	9,5307	9,32582	0,10	1,10
6,61	10,5364	10,6332	10,6332	10,6332	10,6364	10,7267	10,61448	0,06	0,57
16,38	15,5395	15,5164	15,5029	15,5329	15,5095	15,5329	15,52024	0,015	0,095
35,35	24,8704	24,8336	24,8336	24,8336	24,9704	24,9756	24,86832	0,069	0,28

**Tablo 4.4 Tablo 4.3'teki ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>ortalama</b>	<b>SD</b>
<b>m</b>	0,4986	0,4952	0,4931	0,4926	0,499	0,4938	0,4954	0,003
<b>b</b>	7,2773	7,3473	7,4121	7,4232	7,3271	7,4934	7,3801	0,078
<p><b>Ölçü eğrisi regresyon denklemi:</b></p> $Y(\mu A) = 0,4957C(\mu g/mL) + 7,3563$ $R^2 (ORT) = 0,9999$								



Şekil 4.12 Budesonidin 1,65-35,35 µg/mL konsantrasyon aralığındaki ölçü eğrisi

## 4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

### 4.2.1. Doğrusallık ve doğrusal aralık

Budesonidin standart maddesi ile seçilen koşullarda DPV yöntemiyle ölçü eğrisi hazırlanmış ve 1,65 ile 35,35 µg/mL arasında pik akımının (µA) konsantrasyonla doğrusal olduğu bulunmuştur.

Standart madde çözeltisinden DPV yöntemiyle elde edilen ortalama ölçü eğrisinin regresyon analizi korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) değeri 0,9999 olarak bulundu. Bu da ölçü eğrisinin mükemmel doğrusal olduğunu gösterdi (Şekil 4.12).

### 4.2.2. Duyarlılık (Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ))

Teşhis ve tayin sınırları Bölüm 3.6.3'de verilen formüller yardımıyla hesaplandı. Uygulanan koşullarda LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,52 µg/mL ve 1,57 µg/mL olarak bulunmuştur.

### 4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Üç ayrı konsantrasyonda (3, 10 ve 20 µg/mL) budesonid çözeltisiyle DPV yönteminde anlatıldığı gibi analizler yapıldı. Pik akım değerleri standart budesonid madde çözeltisi için çıkarılan regresyon denkleminde yerine konularak bulundu. Güniçi (aynı gün) yapılan deneylere ait ortalama bağıl standart sapma (%RSD) değerleri % 1,31-3,18 arasında bulundu (Tablo 4.5).

Günlerarası (farklı günlerde) yapılan deneylere ait ortalama %RSD değerleri ise % 0,33-3,38 arasında bulundu (Tablo 4.6).

**Tablo 4.5 Güniçi yapılan budesonid analizlerin tekrarlanabilirliği**

<b>Alınan Konsantrasyon (µg/mL)</b>	<b>3,0</b>	<b>10,0</b>	<b>20,0</b>
<b>Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)</b>	3,01	10	20,03
	2,99	10,21	20,67
	2,89	9,93	19,93
	3,16	9,91	19,9
	3,06	9,89	20,11
<b>Ortalama</b>	3,021	9,98	20,13
<b>SD</b>	0,096	0,130843	0,314197
<b>RSD (%)</b>	3,18	1,311056	1,560841
<b>Geri Kazanım (%)</b>	100,7	99,8	100,65

**Tablo 4.6 Günlerarası yapılan budesonid analizlerin tekrarlanabilirliği**

<b>Alınan Konsantrasyon (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>3,0</b>	<b>10,0</b>	<b>20,0</b>
<b>Bulunan Konsantrasyon (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	3	10,12	20,24
	2,89	9,89	20
	3,01	10,13	20,05
	3,103	10,06	20,16
	2,9	9,95	20,06
<b>Ortalama</b>	2,9806	10,03	20,102
<b>SD</b>	0,100758	0,107819	0,06702
<b>RSD (%)</b>	3,38	1,08	0,33
<b>Geri Kazanım (%)</b>	99,33	100,30	100,51

#### 4.2.4. Seçicilik

Hazırlanan boş elektrolit çözeltisi, standart çözelti ve örnek çözeltisi ile belirlenen koşullarda CV ve DPV ile analiz edildi. Boş çözeltinin etken maddenin indirgenme potansiyelinde sadece LOD değerinin çok altında bir pik verdiği ve bu da yöntemin seçici olduğunu göstermektedir.

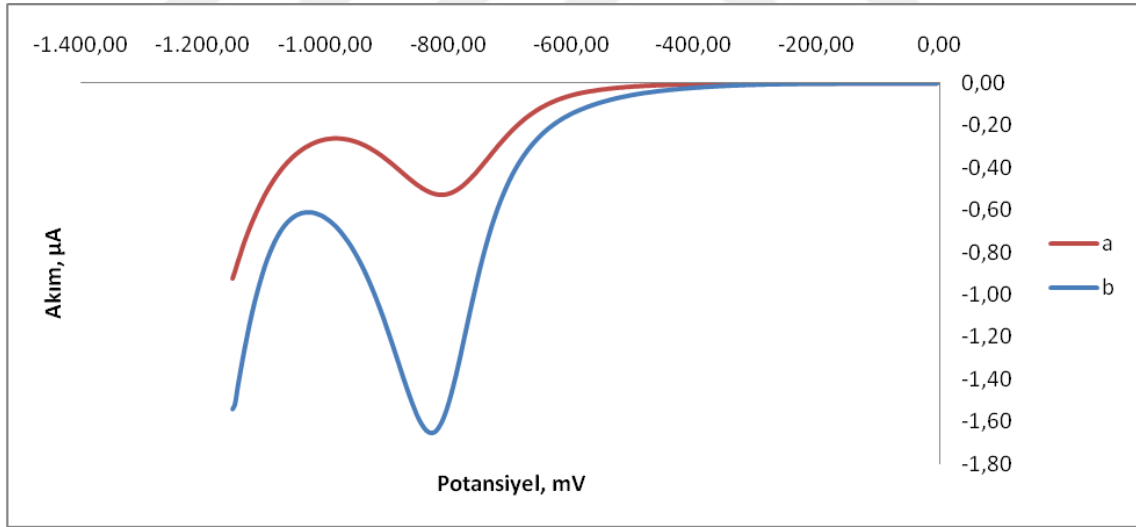
#### 4.2.5. Elektrot stabilitesi ve tekrar üretilebilirlik

Hazırlanan KPE oda sıcaklığında ağzı sıkıca kaplı cam kaplarda saklandı. Hazırlanan KPE ile en az 5 ardaşık ölçümün yapılabildiğini gösterdi. Daha fazla ölçümlerde ise elektrot yüzeyinin yenilenmesi gerektiği test edildi.

### 4.3. Budesonidin inhalasyon süspansiyon ampullerinde miktar tayini

Budesonid ilaç etken maddesi içeren Astra Zeneca Firmasının ithal ruhsatına sahip olduğu 1 mg/ 2 mL'lik Pulmicort Respules (budesonide inhalation suspension) (nebülizer süspansiyon, 5 tek dozlu Respules ampul) preparatı kullanıldı. Her bir ampul tek kullanımlık olup açıldıktan sonra 12 saat içinde kullanılmalıdır. Sadece 1 mL kullanılırsa geri kalan hacmin sterilliği bozulur.

Geliştirilen DPV yönteminin uygulanabilirliği 1 mg/ 2 mL'lik Pulmicort Respules (budesonide inhalation suspension) ilacı içeren Nebülizer Süspansiyon plastik ampullerine uygulandı (Şekil 4.13). Uygulamada bölüm 3.5.3 ve bölüm 3.5.4'de anlatıldığı gibi çalışıldı. 10 µg /mL'ye tekabül edecek örnekler alınarak çalışıldı ve okunan madde akım değerleri standart madde için hazırlanan ölçü eğrisinden yerine konularak miktarı ve % geri kazanımları hesaplandı. Tablo 4.7'de görüldüğü gibi % geri kazanım %91,1 ile %100,7 arasında ve %RSD leri ise ortalama % 3,73 bulundu. Buda geliştirilen yöntemin yeterince hassas ve seçici olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.13 Budesonidin KPE ile alınan DPV voltamogramları. Boş elektrolit çözeltisi (a) ve farmasötik preparatlarında (10 µg/ mL) (b)

**Tablo 4.7 10 µg /mL budesonid içeren süspansiyon ampullerde yapılan tayin sonuçları**

<b>Alınan miktar (µg/mL)</b>	<b>Bulunan miktar (µg/mL)</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>
10	9,11	91,1
10	10,07	100,7
10	9,97	99,7
10	9,89	98,9
10	10,07	100,7
10	9,97	99,7
<b>Ortalama</b>	9,85	98,47
<b>SD</b>		0,37
<b>% RSD</b>		3,73

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Budesonid kortikosteroid sınıfından olup, klinik olarak anlamlı aktiviteye sahip geniş bir spektruma sahip güçlü bir anti-inflamatuar ajandır ve FDA onaylı endikasyonları şöyle sıralanabilir. Alerjik rinit ve diğer üst solunum yolu alerjileri için kullanılmaktadır. Budesonid hafif ve orta dereceli Crohn hastalığının aktif fazında remisyon sağlamak ve tedavisinde kullanıldığı gibi ülseratif kolit için ikinci basamak terapötik ajan olarak da kullanılır. Bu güçlü aktiviteleri yanında bir çok istenmeyen yan etkilerinin olduğu ve uzun süreli kullanımda toksik etkisi de bilinmektedir.

Budesonidin tayini için literatürde özellikle UV, kütle ve kütle/kütle dedeksiyonlu likit kromatografisi teknikleri rapor edilmiştir. Bu yöntemlerin güçlü ayırma ve teşhis kapasiteleri olsa da her araştırma ve kalite kontrol laboratuvarında bulunamayan yüksek maliyet ve çalışılması zor ve zaman alıcı tekniklerdir. Yapılan literatür araştırmasına göre maddenin tayini için bugüne kadar herhangi bir voltammetrik yöntem rapor edilmemiştir.

Bu çalışmada, budesonidin ampullerde miktar tayini için ilk defa bir voltammetrik yöntem geliştirildi. Bunun için önce budesonidin farklı pH'a sahip elektrolit çözeltilerinde elektrokimyasal özellikleri döngüsel voltametri ve diferansiyel puls yöntemleri ile incelenmiştir. Madde çözeltisi üzerinde tarama hızının, pH'nın ve konsantrasyonun etkisi incelenmiştir. Madde suda çözünürlüğünün çok az olması dolayısıyla metanolde çözündürülmüştür.

Daha sonra ilacın farmasötik preparatında tayini için yeni bir diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemi geliştirildi ve valide edildi. Geliştirilen yöntemde çalışma elektrodu olarak herhangi bir kimyasal modifikasyona ihtiyaç duyulmadan hazırlanan karbon pasta elektrodu (KPE) kullanıldı. Çalışmada elde basitçe %70 grafit ve %30 silikon yağı ile karıştırılması ile hazırlanan KPE elektrot kullanıldı. Referans elektrot olarak Ag/AgCl (doymuş KCl) ve karşıt elektrot olarak Pt elektrot kullanıldı.

Elektrolit çözelti için birçok asidik ve bazik tampon çözeltiler (pH=2-9) denendi ve en hassas madde pik akım %13 KCl ve %8 metanol içeren 0,1 M HCl çözeltisinde elde edildiği görüldü.

Denenen bütün çözeltilerde maddenin herhangi bir indirgenme veya yükseltgenme piki pozitif potansiyel aralığında gözlenmedi.

Maddeye ait ortalama 859 mV'da indirgenme (katodik pik) pikinin yukarıda belirtilen HCl'li karışım çözeltisinde elde edildiği en uygun potansiyel pencere aralığının 0,0 mV ile -1400 mV olduğu tespit edilmiştir.

Seçilen hidroklorik asitli çözelti ve fosfat pH 2 ile pH 4 aralığında döngüsel voltamogramları kayıt edilmiş ve pH'a karşı potansiyel grafiği çıkarılmıştır. Bu analize göre, pH arttıkça potansiyelin daha da negatif alana kaydığının belirlenmesi madde reaksiyonunda protonun girdiğini göstermektedir. Bunun yanında, potansiyel - pH grafiğinin regresyon denkleminde  $[E_p(\text{mV}) = -76,6\text{pH} - 772,5]$  eğimin negatif olması da indirgenme reaksiyonunda proton girdiğini göstermektedir.

Tarama hızının budesonid çözeltisi üzerindeki etkisini incelemek için döngüsel voltametri yöntemiyle tarama hızı çalışması yapılmıştır. 20 mV/s ile 200 mV/s arasında yapılan tarama hızında pik akımının tarama hızıyla doğru orantılı olarak arttığı belirlendi. Bunun yanında akımın logaritmasına karşı çizilen potansiyelin logaritması grafiğinin regresyon denklemi  $\log I_p(\mu\text{A}) = 1,0412\log v - 1,2531$  ( $R^2 = 0,9887$ ) olarak bulunmuştur. Denklemnin eğiminin 1,0412 olması reaksiyonun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermiştir.

Maddenin miktar tayini için geliştirilen DPV yöntemiyle öncelikle kalibrasyon eğrisi çalışılmıştır. Beş farklı konsantrasyonla yapılan çalışmada bunlara tekabül eden pik akımı arasında oluşturulan ölçü eğrisinde regresyon denkliği  $y = 0,4957x + 7,3563$  ( $R^2 = 0,9999$ ) olarak bulunmuştur. Yapılan ölçü eğrisinde, maddenin doğrusal olduğu aralık 1,65  $\mu\text{g/mL}$  ile 35,35  $\mu\text{g/mL}$  olduğu görüldü. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,52  $\mu\text{g/mL}$  ile 1,57  $\mu\text{g/mL}$  olarak bulunmuştur.

Geliştirilen DPV yöntemi ile budesonidin süspansiyon ampullerinde miktar tayinlerine başarı ile uygulanmıştır. Ampul süspansiyonlarında miktar tayini çalışmasında geri kazanım % 98,47 olarak bulundu.

Geliştirilen diferansiyel puls voltametri yöntemi doğrusallık, doğrusal aralık, kesinlik, LOD ve LOQ açısından valide edilmiştir. Geliştirdiğimiz yöntem var olan

pahalı ve komplike yöntemlere iyi bir alternatif olabilecektir. Bir ön işlem gerektirmeden hassas, hızlı ve doğru şekilde budesonidin taylorlerinde ve kalite kontrol laboratuvarlarında rutin analizlerinde başarı ile kullanılabilir.



## KAYNAKLAR

1. Kalola, U. K., & Ambati, S. (2020). Budesonide. *StatPearls* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563201> Erişim Tarihi: 25.11.2021
2. Williams, D. M. (2018). Clinical pharmacology of corticosteroids. *Respiratory care*, 63(6), 655-670.
3. Pedersen, S., & O'Byrne, P. (1997). A comparison of the efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. *Allergy*, 52, 1-34.
4. ÖZDEMİR, P. G., & YAZICIOĞLU, M. (2017). Kortikosteroidler ile ilişkili Alerjik Reaksiyonlar. *Çocuk Dergisi*, 17(1), 4-11.
5. Brattsand, R., Thalén, A., Roempke, K., Källström, L., & Gruvstad, E. (1982). Influence of 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. *Journal of steroid biochemistry*, 16(6), 779-786.
6. Evans, S. J., & Day, S. J. (2005). Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA)(Formerly MCA). *Encyclopedia of Biostatistics*, 5.
7. Tashkin, D. P., Lipworth, B., & Brattsand, R. (2019). Benefit: risk profile of budesonide in obstructive airways disease. *Drugs*, 79(16), 1757-1775.
8. <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0015353> Erişim Tarihi: 25.11.2021
9. Bhutnar, A., Khapare, S., Desai, A., & Dsouza, S. (2017). Isolation and characterization of photodegradation impurity in budesonide drug product using LC-MS and NMR spectroscopy. *American Journal of Analytical Chemistry*, 8(7), 449-461.)
10. FTIR-<https://spectrabase.com/spectrum/KWHuwl6gekd> Erişim Tarihi: 25.11.2021
11. Raman-<https://spectrabase.com/spectrum/D2dIMFF7QgW> Erişim Tarihi: 25.11.2021
12. MS-<https://spectrabase.com/spectrum/BLGqcv8X4ER> Erişim Tarihi: 25.11.2021

13. McKeage, K., & Goa, K. L. (2002). Budesonide (Entocort® EC Capsules). *Drugs*, 62(15), 2263-2282.
14. Yasir, M., Goyal, A., Bansal, P., & Sonthalia, S. (2018). Corticosteroid adverse effects.
15. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01222> Erişim Tarihi: 25.11.2021
16. Szeffler, S. J., Lyzell, E., Fitzpatrick, S., & Cruz-Rivera, M. (2004). Safety profile of budesonide inhalation suspension in the pediatric population: worldwide experience. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 93(1), 83-90.
17. Demurtas, A., Pescina, S., Nicoli, S., Santi, P., de Araujo, D. R., & Padula, C. (2021). Validation of a HPLC-UV method for the quantification of budesonide in skin layers. *Journal of Chromatography B*, 1164, 122512.
18. Hochhaus, G., Fröhlich, P., Hochhaus, R., Möllmann, A., Derendorf, H., & Möllmann, H. W. (1998). A selective HPLC/RIA for the determination of budesonide. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 17(8), 1235-1242.
19. Salem, Y. A., Shaldam, M. A., El-Sherbiny, D. T., El-Wasseef, D. R., & El-Ashry, S. M. (2017). Simultaneous determination of formoterol fumarate and budesonide epimers in metered dose inhaler using ion-pair chromatography. *Journal of chromatographic science*, 55(10), 1013-1020.
20. Hou, S., Hindle, M., & Byron, P. R. (2001). A stability-indicating HPLC assay method for budesonide. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24(3), 371-380.
21. Wei, W. A. N. G., Qing-Bin, L. I. U., & Wei, J. I. N. G. (2019). Astragalus membranaceus improves therapeutic efficacy of asthmatic children by regulating the balance of Treg/Th17 cells. *Chinese journal of natural medicines*, 17(4), 252-263.
22. de LT Vieira, M., Singh, R. P., & Derendorf, H. (2010). Simultaneous HPLC analysis of triamcinolone acetonide and budesonide in microdialysate and rat

- plasma: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 878(29), 2967-2973.
23. do Carmo Borges, N. C., Astigarraga, R. B., Sverdloff, C. E., Borges, B. C., Paiva, T. R., Galvinas, P. R., & Moreno, R. A. (2011). Budesonide quantification by HPLC coupled to atmospheric pressure photoionization (APPI) tandem mass spectrometry. Application to a comparative systemic bioavailability of two budesonide formulations in healthy volunteers. *Journal of Chromatography B*, 879(3-4), 236-242.
  24. Szeitz, A., Manji, J., Riggs, K. W., Thamboo, A., & Javer, A. R. (2014). Validated assay for the simultaneous determination of cortisol and budesonide in human plasma using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 90, 198-206.
  25. Gupta, M., & Bhargava, H. N. (2006). Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of budesonide. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40(2), 423-428.
  26. Rower, J. E., Anderson, D. J., Sherwin, C. M., Reilly, C. A., Ballard, P. L., McEvoy, C. T., & Wilkins, D. G. (2019). Development and validation of an assay for quantifying budesonide in dried blood spots collected from extremely low gestational age neonates. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 167, 7-14.
  27. Ahmed, S., & Atia, N. N. (2019). Controlled microwave derivatization reaction for reproducible trace analysis of budesonide in human plasma. *Analytica chimica acta*, 1048, 132-142.
  28. Varshosaz, J., Emami, J., Tavakoli, N., Minaiyan, M., Rahmani, N., Ahmadi, F., & Dorkoosh, F. (2011). Development and validation of a rapid HPLC method for simultaneous analysis of budesonide and its novel synthesized hemiesters in colon specific formulations. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 107.
  29. Casiraghi, A., Gennari, C. G., Musazzi, U. M., Ortenzi, M. A., Bordignon, S., & Minghetti, P. (2020). Mucoadhesive Budesonide Formulation for the Treatment of Eosinophilic Esophagitis. *Pharmaceutics*, 12(3), 211.
  30. Alkhateeb, F. L., Wilson, I., Maziarz, M., & Rainville, P. (2021). Ultra high-performance liquid chromatography method development for separation of

- formoterol, budesonide, and related substances using an analytical quality by design approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 193, 113729.
31. Deventer, K., Mikulčíková, P., Van Hoecke, H., Van Eenoo, P., & Delbeke, F. T. (2006). Detection of budesonide in human urine after inhalation by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 42(4), 474-479.
  32. Gupta, M., & Bhargava, H. N. (2006). Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of budesonide. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40(2), 423-428.
  33. Chen, Y., Du, S., Zhang, Z., He, W., Lu, E., Wang, R., ...& Ma, Y. (2020). Compatible Stability and Aerosol Characteristics of Atrovent® (Ipratropium Bromide) Mixed with Salbutamol Sulfate, Terbutaline Sulfate, Budesonide, and Acetylcysteine. *Pharmaceutics*, 12(8), 776.
  34. Li, Y. N. B., Tattam, B., Brown, K. F., & Seale, J. P. (1996). Determination of epimers 22R and 22S of budesonide in human plasma by high-performance liquid chromatography—atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 683(2), 259-268.
  35. Ferraboschi, P., Bertacche, V., Maccone, I., Pini, E., Ragonesi, L., Venturini, A., & Stradi, R. (2008). Estimation and characterisation of budesonide tablets impurities. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 47(3), 636-640.
  36. Mezzena, M., Scalia, S., Young, P. M., & Traini, D. (2009). Solid lipid budesonide microparticles for controlled release inhalation therapy. *The AAPS journal*, 11(4), 771-778.
  37. Kompella, U. B., Bandi, N., & Ayalasomayajula, S. P. (2003). Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(3), 1192-1201.
  38. Ricci, F., Catozzi, C., Ravanetti, F., Murgia, X., D'Aló, F., Macchidani, N., ...& Salomone, F. (2017). In vitro and in vivo characterization of poractant alfa supplemented with budesonide for safe and effective intratracheal administration. *Pediatric research*, 82(6), 1056-1063.

39. Liu, Y., & Zhou, H. (2015). Budesonide-loaded guar gum microspheres for colon delivery: preparation, characterization and in vitro/in vivo evaluation. *International journal of molecular sciences*, 16(2), 2693-2704.
40. Assi, K. H., Tarsin, W., & Chrystyn, H. (2006). High performance liquid chromatography assay method for simultaneous quantitation of formoterol and budesonide in Symbicort Turbuhaler. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(1), 325-328.
41. Li, Y. N. B., Tattam, B., Brown, K. F., & Seale, J. P. (2001). Quantification of epimeric budesonide and fluticasone propionate in human plasma by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 761(2), 177-185.
42. Geier, A., Gartung, C., Dietrich, C. G., Wasmuth, H. E., Reinartz, P., & Matern, S. (2003). Side effects of budesonide in liver cirrhosis due to chronic autoimmune hepatitis: influence of hepatic metabolism versus portosystemic shunts on a patient complicated with HCC. *World journal of gastroenterology: WJG*, 9(12), 2681.
43. Bandi, N., Wei, W., Roberts, C. B., Kotra, L. P., & Kompella, U. B. (2004). Preparation of budesonide–and indomethacin–hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPBCD) complexes using a single-step, organic-solvent-free supercritical fluid process. *European journal of pharmaceutical sciences*, 23(2), 159-168.
44. Moreira, F. X., Silva, R., André, M. B., de Pinho, P. G., Bastos, M. L., Ruivo, J., ...& Carmo, H. (2018). Quantification of doping compounds in faecal samples from racing pigeons, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1089, 33-42.
45. Lu, Y., Sun, Z., Zhang, Y., Chen, X., & Zhong, D. (2013). Simultaneous quantification of 22R and 22S epimers of budesonide in human plasma by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application in a stereoselective pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 921, 27-34.
46. Hou, S., Hindle, M., & Byron, P. R. (2005). Chromatographic and mass spectral characterization of budesonide and a series of structurally related corticosteroids

- using LC–MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39(1-2), 196-205.
47. Moore, C. D., Roberts, J. K., Orton, C. R., Murai, T., Fidler, T. P., Reilly, C. A., ...& Yost, G. S. (2013). Metabolic pathways of inhaled glucocorticoids by the CYP3A enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(2), 379-389.
48. Li, X., Tong, H., Xu, B., Deng, Y., Li, Y., Huang, J., ...&Guo, S. (2021). A sensitive and high-throughput LC-ESI-MS/MS method to detect budesonide in human plasma: application to an evaluation of pharmacokinetics of budesonide intranasal formulations with and without charcoal-block in healthy volunteers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 47(2), 329-336.
49. Kiss, A., Lucio, M., Fildier, A., Buisson, C., Schmitt-Kopplin, P., &Cren-Olivé, C. (2013). Doping control using high and ultra-high resolution mass spectrometry based non-targeted metabolomics-a case study of salbutamol and budesonide abuse. *PLoS One*, 8(9), e74584.
50. Wang, Y., Tang, Y., Moellmann, H., &Hochhaus, G. (2003). Simultaneous quantification of budesonide and its two metabolites, 6 $\beta$ -hydroxybudesonide and 16 $\alpha$ -hydroxyprednisolone, in human plasma by liquid chromatography negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 17(2-3), 158-164.
51. Li, L., Tao, L., Lubet, R. A., Steele, V. E., & Pereira, M. A. (2007). Modulation by budesonide of a CpG endonuclease in mouse lung tumors. *Carcinogenesis*, 28(7), 1499-1503.
52. Tarara, T. E., Hartman, M. S., Gill, H., Kennedy, A. A., &Weers, J. G. (2004). Characterization of suspension-based metered dose inhaler formulations composed of spray-dried budesonide microcrystals dispersed in HFA-134a. *Pharmaceutical research*, 21(9), 1607-1614.
53. Thakur, A., Kadam, R., &Kompella, U. B. (2011). Trabecular meshwork and lens partitioning of corticosteroids: implications for elevated intraocular pressure and cataracts. *Archives of ophthalmology*, 129(7), 914-920.
54. Barry, P. W., & O'Callaghan, C. (1999). The output of budesonide from spacer devices assessed under simulated breathing conditions. *Journal of allergy and clinical immunology*, 104(6), 1205-1210.

55. Aksoy, M. O., Li, X. X., Borenstein, M., Yi, Y., & Kelsen, S. G. (1999). Effects of topical corticosteroids on inflammatory mediator-induced eicosanoid release by human airway epithelial cells. *Journal of allergy and clinical immunology*, 103(6), 1081-1091.
56. Hatley, R. H., Parker, J., Pritchard, J. N., & von Hollen, D. (2017). Variability in delivered dose from pressurized metered-dose inhaler formulations due to a delay between shake and fire. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, 30(1), 71-79.
57. Faouzi, M. A., Dine, T., Luyckx, M., Brunet, C., Gressier, B., Cazin, M., ...& Cazin, J. C. (1995). High-performance liquid chromatographic method for the determination of budesonide in bronchoalveolar lavage of asthmatic patients. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 664(2), 463-467.
58. Velaga, S. P., Bergh, S., & Carlfors, J. (2004). Stability and aerodynamic behaviour of glucocorticoid particles prepared by a supercritical fluids process. *European journal of pharmaceutical sciences*, 21(4), 501-509.
59. Mota, F. L., Carneiro, A. P., Queimada, A. J., Pinho, S. P., & Macedo, E. A. (2009). Temperature and solvent effects in the solubility of some pharmaceutical compounds: measurements and modeling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3-4), 499-507.
60. Brombacher, S., Owen, S. J., & Volmer, D. A. (2003). Automated coupling of capillary-HPLC to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the analysis of small molecules utilizing a reactive matrix. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 376(6), 773-779.
61. Hoe, S., Traini, D., Chan, H. K., & Young, P. M. (2009). Measuring charge and mass distributions in dry powder inhalers using the electrical Next Generation Impactor (eNGI). *European journal of pharmaceutical sciences*, 38(2), 88-94.
62. Ryrfeldt, Å., Tönnesson, M., Nilsson, E., & Wikby, A. (1979). Pharmacokinetic studies of a potent glucocorticoid (budesonide) in dogs by high-performance liquid chromatography. *Journal of steroid biochemistry*, 10(3), 317-324.
63. Qu, J., Qu, Y., & Straubinger, R. M. (2007). Ultra-sensitive quantification of corticosteroids in plasma samples using selective solid-phase extraction and

- reversed-phase capillary high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 79(10), 3786-3793.
64. Rodríguez, M., Vila-Jato, J. L., & Torres, D. (1998). Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region. *Journal of controlled release*, 55(1), 67-77.
65. Li, Y. N. B., Tattam, B. N., Brown, K. F., & Seale, J. P. (1997). A sensitive method for the quantification of fluticasone propionate in human plasma by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 16(3), 447-452.
66. Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, 95(2), 197-206
67. Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, 95(2), 197-206.]
68. ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures
69. Goyal, R. N., Chatterjee, S., & Rana, A. R. S. (2010). Effect of cetyltrimethyl ammonium bromide on electrochemical determination of dexamethasone. *Electroanalysis*, 22(20), 2330-2338.
70. Alimohammadi, S., Kiani, M. A., Imani, M., Rafii-Tabar, H., & Sasanpour, P. (2019). electrochemical Determination of Dexamethasone by Graphene Modified Electrode: Experimental and theoretical investigations. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
71. Smajdor, J., Piech, R., & Paczosa-Bator, B. (2018). Highly sensitive voltammetric determination of dexamethasone on amalgam film electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 809, 147-152.
72. Goyal, R. N., Chatterjee, S., & Rana, A. R. S. (2010). Effect of cetyltrimethyl ammonium bromide on electrochemical determination of dexamethasone. *Electroanalysis*, 22(20), 2330-2338.

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### BUDESONİDİN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ VE VOLTAMMETRİK YÖNTEMLE MİKTAR TAYİNİ

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>15</b>	% <b>15</b>	% <b>3</b>	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://nek.istanbul.edu.tr:4444">nek.istanbul.edu.tr:4444</a> İnternet Kaynağı	% <b>3</b>
<b>2</b>	<a href="http://acikerisim.erbakan.edu.tr">acikerisim.erbakan.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>3</b>	<a href="http://dspace.ankara.edu.tr">dspace.ankara.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://acikarsiv.ankara.edu.tr">acikarsiv.ankara.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://9lib.net">9lib.net</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>7</b>	<a href="http://www.docstoc.com">www.docstoc.com</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>8</b>	<a href="http://www.tandfonline.com">www.tandfonline.com</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>9</b>	<a href="http://ijpsr.com">ijpsr.com</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>