

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EZETİMİB'İN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞLARININ
İNCELENMESİ VE ELEKTROANALİTİK YÖNTEMLERLE
FARMASÖTİK PREPARATLARDAN ANALİZİ

Kim. Mehmet Lütfi YOLA

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

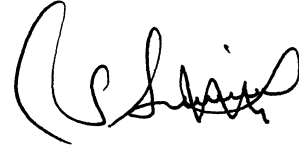
TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN

ANKARA
2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ali Osman SOLAK
Ankara Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Sedef KIR
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Semiha ÇAKIR
Gazi Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi

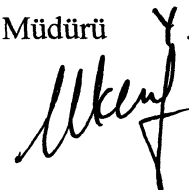


ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. ORER

Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tez danışmanım olarak bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN'a,

Teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalımızın saygıdeğer hocalarına,

Yardımları ve gösterdikleri samimiyet için çalışma arkadaşlarıma,

Etkin maddeyi sağlayan Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsüne,

Her konuda bana destek olduğu ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim sevgili Ecz. Seçil SARIKAYA'ya

Bu günlere gelmemi sağladıkları için sevgili annem, babam ve ablama teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

YOLA, M.L. Ezetimib'in elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi ve elektroanalitik yöntemlerle farmasötik preparatlardan analizi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2009. Ezetimib (EZE), kolesterol absorpsiyon inhibitörü antihiperlipidemik ajanların ilk üyesidir. Bu tez çalışmasında, EZE'nin farmasötik preparatlardan miktar tayini amacıyla kare dalga voltametrisi (SWV), kare dalga adsorptif sıyırma voltametrisi (SWAdSV) ve diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametrisi (DPAdSV) gibi basit ve güvenilir elektroanalitik yöntemler uygulanmıştır. Öncelikle EZE tayini için şartlar optimize edilmiştir. Bunun sonucunda SWV yöntemi için 50 Hz'lik frekans, 3 mV'luk adım yüksekliği, 20 mV'luk puls genişliğinde; SWAdSV yöntemi için - 800 mV'luk biriktirme potansiyeli, 4 mV'luk adım yüksekliği, 15 Hz'lik frekans, 25 mV'luk puls genişliği, 15 s biriktirme süresinde; DPAdSV yöntemi için - 850 mV'luk biriktirme potansiyeli, 20 mV / s'lik tarama hızı, 50 mV'luk puls genişliği ve 15 s'lik biriktirme süresinde en iyi pikler elde edilmiştir. Gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) sırasıyla SWV yöntemi için $0.099 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $0.298 \mu\text{g mL}^{-1}$; SWAdSV yöntemi için 11.53 ng/mL ve 31.73 ng/mL; DPAdSV yöntemi için 20.26 ng/mL ve 62.46 ng/mL olarak elde edilmiştir. Doğrusallık aralıkları SWV yöntemi için 0.33 - 6.54 $\mu\text{g/mL}$; SWAdSV yöntemi için 33 - 596 ng/mL; DPAdSV yöntemi için 66 - 400 ng/mL olarak bulunmuştur. EZE derişimine bağlı olarak SWV yönteminde $[(-1290) - (-1322)]$ mV arasında SWAdSV yönteminde $[(-1236) - (-1252)]$ mV arasında ve DPAdSV yönteminde $[(-1190) - (-1210)]$ mV arasında indirgenme piki gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemler "International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use" (ICH)'a göre valide edilmiş ve doğrusal, duyarlı, özgün, doğru, kesin, sağlam ve tutarlı bulunmuştur. Bu yöntemler EZE içeren farmasötik preparatların analizine başarıyla uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar kaynaklarda verilen UV-spektrofotometrik yöntemle karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca EZE'nin elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. Bunun için yapılan dönüşümlü voltametri (CV) ve SWV deneylerinin sonucunda indirgenme mekanizmasının 2 elektronlu ve 2 protonlu olduğu, CV,

kronoamperometri (CA) ve kronokulometri (CC) yöntemleri uygulanarak EZE'in indirgenme akımının difüzyon kontrollü ve elektrot tepkimesinin tersinmez olduğu bulunmuştur. İndirgenme tepkimesinin EC mekanizmasına göre yürüdüğü tespit edilmiş ve olası indirgenme mekanizması önerilmiştir. Elektrokimyasal tekniklerle EZE'in indirgenme tepkimesine ait difüzyon katsayısı (D), elektron aktarım hız sabiti (k_f) ve kimyasal tepkimenin hız sabiti (k) hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ezetimib, voltametri, farmasötik preparat, validasyon, dönüşümlü voltametri, kronoamperometri, kronokulometri

ABSTRACT

YOLA, M.L. Evaluation of electrochemical behaviour of ezetimibe and analysis in pharmaceutical preparations by electroanalytical methods, Hacettepe University, Health Sciences Institute, Analytical Chemistry Program, Master of Sciences Thesis, Ankara, 2009. Ezetimibe (EZE) is the first of a new class of antihyperlipidemic agents, the cholesterol – absorption inhibitors. In this thesis study, a simple and reliable electroanalytical methods such as square wave voltammetry (SWV), square wave adsorptive stripping voltammetry (SWAdSV) and diferansiyel puls adsorptive stripping voltammetry (DPAdSV) are applied to estimate the amount of EZE in tablets. Firstly, the developed methods were optimized for the determination of EZE. The well-defined peaks were observed at the frequency of 50 Hz, amplitude of 20 mV, potential increment of 3 mV for SWV; at accumulation time of 15 s, accumulation potential of – 800 mV, frequency of 15 Hz, amplitude of 25 mV, potential increment of 4 mV for SWAdSV; at accumulation time of 15 s, accumulation potential of – 850 mV, scan rate of 20 mV / s and amplitude of 50 mV for DPAdSV. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were found 0.099 µg/mL and 0.298 µg/mL for SWV, 11.53 ng/mL and 31.73 ng/mL for SWAdSV and 20.26 ng/mL and 62.46 ng/mL for DPAdSV respectively. The linearity ranges of EZE for SWV, SWAdSV and DPAdSV were found 0.33 - 6.54 µg/mL, 33 - 596 ng/mL and 66 - 400 ng/mL respectively. EZE gave rise to a single voltammetric peak in the potential interval from - 1290 to -1322 mV for SWV, from - 1236 to - 1252 mV for SWAdSV and from - 1190 to - 1210 mV for DPAdSV depending on EZE concentration. The developed methods were validated according to the “International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use” (ICH) guideline and found to be linear, sensitive, specific, accurate, precise, accurate, robust and rugged. The methods were applied successfully for the determination of EZE in tablet dosage form. The data were compared with ones obtained from the UV-spectrophotometric method given in the literature and no significant difference was found statistically.

Also electrochemical behaviours of EZE were investigated. As a results of cyclic voltammetry (CV) and SWV experiments, the reduction mechanism included 2

electrons and 2 protons, and further more, reduction current of EZE was diffusion controlled and the electrode reaction was found to be irreversible by using CV, chronoamperometry (CA) and chronocoulometry (CC) methods. It was found out that the reduction reaction occurred according to EC mechanism and possible reduction mechanism was proposed. Using electrochemical techniques diffusion coefficient (D), rate constant for electron transfer (k_f) and rate constant of chemical reaction (k) relating to EZE's reduction reaction was calculated.

Key words: Ezetimibe, voltammetry, pharmaceutical preparation, validation, cyclic voltammetry, chronoamperometry, chronocoulometry

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antihiperlipidemik İlaçlar	3
2.2. Ezetimib	6
2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	6
2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri	6
2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri	7
2.3. Ezetimib'in Analiz Yöntemleri	9
2.3.1. Kromatografik Analiz Yöntemleri	9
2.3.2. Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri	13
2.3.3. Kapiler Elektroforez Analiz Yöntemleri	16
2.4. Elektroanalitik Yöntemler	16
2.4.1. Polarografi	20
2.4.2. Dönüşümlü Voltametri ve Doğrusal Taramalı Voltametri	33
2.4.3. Kare Dalga Voltametrisi	43
2.4.4. Sıyırma Voltametrisi	47
2.4.5. Kronoamperometri	52
2.4.6. Kronokulometri	54
3. GEREÇ ve YÖNTEM	57
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	57
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	57
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	57
3.1.3. Kullanılan Cam Malzemeler	57
3.1.4. Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar	58

3.2.	Kullanılan Standart Maddenin Saflığının Araştırılması	58
3.3.	Çözeltilerin Hazırlanması	58
3.4.	Kullanılan Malzeme ve Maddelerin Temizliği	59
3.4.1.	Civanın Temizlenmesi	59
3.4.2.	Cam Malzemelerin Temizlenmesi	59
3.4.3.	Elektrokimyasal Hücrenin Temizlenmesi	60
3.5.	Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi	60
3.5.1.	Elektrokimyasal Hücre Düzenegi	60
3.5.2.	Deneyin Yapılışı	60
3.5.3.	Yöntemlerin Optimizasyonu	61
3.5.4.	Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	61
3.5.5.	Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu	61
3.5.6.	Geri Kazanım	64
3.5.7.	Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	64
3.5.8.	Karşılaştırma Yöntemi ile Analiz	65
3.6.	Ezetimib'in Elektrokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	65
3.6.1.	Dönüşümlü Voltametri Deneyleri	65
3.6.2.	Kronoamperometri Deneyleri	66
3.6.3.	Kronokulometri Deneyleri	66
4.	BULGULAR	67
4.1.	Saflık Kontrolü Bulguları	67
4.1.1.	Erime Noktası	67
4.1.2.	EZE'in UV Spektrumu	67
4.1.3.	EZE'in IR Spektrumu	67
4.2.	Geliştirilen Elektroanalitik Yöntemlere Ait Analiz Bulguları	69
4.2.1.	Destek Elektrolitin Belirlenmesi	69
4.2.2.	Elektroanalitik Yöntemlerin Optimizasyonu	71
4.2.2.1.	SWV Bulguları	71
4.2.2.2.	SWAdSV Bulguları	73
4.2.2.3.	DPAdSV Bulguları	76
4.3.	Elektroanalitik Yöntemlerin Validasyonu	80
4.3.1.	Kararlılık	80
4.3.2.	Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları	81

4.3.3.	Duyarlılık	85
4.3.4.	Kesinlik ve Doğruluk	85
4.3.5.	Tekrarlanabilirlik	89
4.3.6.	Sağlamlık ve Tutarlılık	91
4.3.7.	Özgünlük (Seçicilik)	94
4.4.	Geri Kazanım	96
4.5.	Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları	97
4.6.	EZE'in Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	99
4.6.1.	CV Yönteminde Pik Akımları üzerine Tarama Hızının Etkisi	99
4.6.2.	CV Yönteminde Pik Potansiyelleri Üzerine Tarama Hızının Etkisi	100
4.6.3.	Kronoamperometri Bulguları	101
4.6.4.	Kronokulometri Bulguları	102
5.	TARTIŞMA	104
5.1.	Destek elektrolit seçimi	105
5.2.	Cihaz parametrelerinin optimizasyonu	105
5.3.	Yöntemlerin Validasyonu	106
5.4.	Geri Kazanım	110
5.5.	Farmasötik Preparatlara Uygulanması	111
5.6.	EZE'in Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi	111
5.6.1.	Akımın Karakterinin İncelenmesi	111
5.6.2.	Elektrot Tepkimesinin Tersinirliğinin İncelenmesi	112
5.6.3.	Aktarılan Elektron Sayısının Bulunması	113
5.6.4.	Proton Sayısının Bulunması	116
5.6.5.	Difüzyon Katsayısının Bulunması	117
5.6.6.	Elektron Aktarım Hız Sabitinin Bulunması (k_f)	118
5.6.7.	CV Yöntemi ile Adsorpsiyon Varlığının İncelenmesi	120
5.6.8.	EZE'in İndirgenmesine Ait Elektrot Mekanizması	120
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	125
	KAYNAKLAR	127
	EKLER	134
	ÖZGEÇMİŞ	142

SİMGELER ve KISALTMALAR

AUC	Eğri Altındaki Alan
BH	% Bağlı Hata
BSS	Bağıl Standart Sapma
C	Coulomb
CA	Kronoamperometri
CC	Kronokulometri
CE	Elektron Aktarım Basamağından Önce Kimyasal Tepkime Olması
CV	Dönüşümlü Voltametri
DC	Doğru Akım
dk	Dakika
DPAdSV	Diferansiyel Puls Adsorptif Sıyırma Voltametrisi
DPP	Diferansiyel Puls Polarografisi
EC	Elektron Aktarım Basamağını Kimyasal Tepkime Takip Etmesi
EZE	Ezetimib
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
IDL	Orta Dansiteli Lipoprotein
IR	İnfrared
LC-ESI-MS	Sıvı Kromatografisi - Tandem Kütle Spektrometrisi
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
LSV	Doğrusal Taramalı Voltametri
M	Molar
MEKC	Miseller Elektrokinetik Kapiler Kromatografisi
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ms	Milisaniye

N	Normal
NaOH	Sodyum hidroksit
NPP	Normal Puls Polarografisi
ng	Nanogram
r	Korelasyon katsayısı
R^2, r^2	Tanımlayıcılık katsayısı
RP-HPLC	Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
SWAdSV	Kare Dalga Adsorptif Sıyırma Voltametrisi
SWV	Kare Dalga Voltametrisi
UV	Ultraviyole
UV/GB	Ultraviyole/Görünür Bölge
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
μC	Mikro coulomb
μL	Mikrolitre
$\bar{X}$	Aritmetik ortalama

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. EZE molekülünün kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.2. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması	17
Şekil 2.3. Voltametrik ölçümlerde kullanılan bir hücrenin sistematik diyagramı...	19
Şekil 2.4. Doğru akım polarogramları (a) Elektroaktif maddenin polarogramı (b) Destek elektrolit polarogramı	21
Şekil 2.5. Normal puls polarografisi için a) uyarma sinyalleri b) elde edilen polarogram.....	31
Şekil 2.6. Diferansiyel puls polarografisi için a) uyarma sinyalleri b) elde edilen polarogram	32
Şekil 2.7. Dönüşümlü voltametri de a) uyarma sinyali b) elde edilen voltamogram..	34
Şekil 2.8. Tersinir bir sisteme ait CV voltamogramı	37
Şekil 2.9. Dönüşümlü voltametri de pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi	40
Şekil 2.10. a) Reaktantın kuvvetli adsorpsiyonunda gözlenen dönüşümlü voltamogramlar b) Ürünün kuvvetli adsorpsiyonunda gözlenen dönüşümlü voltamogramlar	41
Şekil 2.11. Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu	45
Şekil 2.12. SWV’de tersinir bir tepkime için net akım.....	46
Şekil 2.13. Anodik sıyırma voltametrisinde uygulanan basamaklar ve elde edilen voltamogramlar	50
Şekil 2.14. Adsorptif sıyırma voltametrisinde uygulanan basamaklar ve elde edilen voltamogramlar.....	51
Şekil 2.15. CA’de a) çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel programı, b) elde edilen akım-zaman eğrisi.....	53
Şekil 2.16. CA’de E_1 ve E_2 potansiyellerinin seçimi a) DC yönteminden b) CV yönteminden.....	54
Şekil 2.17. Kronokulometri ile elektrot yüzeyine adsorbe olan bir maddenin derişiminin bulunması.....	56
Şekil 4.1. 25 µg/mL EZE’in MeOH içinde UV-GB spektrumu	67
Şekil 4.2. EZE’in IR spektrumu	68
Şekil 4.3. 1.64 µg/mL EZE’in farklı tamponlardaki kare dalga voltamogramları..	69

Şekil 4.4.	1.64 µg/mL EZE'in $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tampon sistemindeki kare dalga voltamogramlarına ait pH – İp grafiği	70
Şekil 4.5.	SWV yönteminde EZE pik akımına frekans değişiminin etkisi	71
Şekil 4.6.	SWV yönteminde EZE pik akımına adım yüksekliği değişiminin etkisi	71
Şekil 4.7.	SWV yönteminde EZE pik akımına puls genliği değişiminin etkisi	72
Şekil 4.8.	EZE'in kare dalga voltamogramları	72
Şekil 4.9.	SWAdSV yönteminde EZE pik akımına biriktirme potansiyeli değişiminin etkisi	73
Şekil 4.10.	SWAdSV yönteminde EZE pik akımına adım yüksekliği değişiminin etkisi	73
Şekil 4.11.	SWAdSV yönteminde EZE pik akımına frekans değişiminin etkisi...	74
Şekil 4.12.	SWAdSV yönteminde EZE pik akımına puls genliği değişiminin etkisi	74
Şekil 4.13.	SWAdSV yönteminde EZE pik akımına biriktirme süresi değişiminin etkisi.....	75
Şekil 4.14.	EZE'in kare dalga adsorptif sıyırma voltamogramları	76
Şekil 4.15.	DPAdSV yönteminde EZE pik akımına biriktirme potansiyeli değişiminin etkisi	77
Şekil 4.16.	DPAdSV yönteminde EZE pik akımına tarama hızı değişiminin etkisi.77	
Şekil 4.17.	DPAdSV yönteminde EZE pik akımına puls genliği değişiminin etkisi	77
Şekil 4.18.	DPAdSV yönteminde EZE pik akımına biriktirme süresi değişiminin etkisi	78
Şekil 4.19.	EZE'in diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltamogramları	79
Şekil 4.20.	EZE'in SWV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	81
Şekil 4.21.	EZE'in SWAdSV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	81
Şekil 4.22.	EZE'in DPAdSV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	81
Şekil 4.23.	EZE'in SWV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği	84
Şekil 4.24.	EZE'in SWAdSV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği..	84
Şekil 4.25.	EZE'in DPAdSV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği..	85

Şekil 4.26. 1.64 µg/mL EZE içeren standart, tablet ve sentetik numune çözeltilerine ait SWV voltamogramları	94
Şekil 4.27. 228.00 ng/mL EZE içeren standart, tablet ve sentetik numune çözeltilerine ait SWAdSV voltamogramları	95
Şekil 4.28. 210.00 ng/mL EZE içeren standart, tablet ve sentetik numune çözeltilerine ait DPAdSV voltamogramları	95
Şekil 4.29. 8.26 µg/mL EZE'in pH 9.0'da farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları	99
Şekil 4.30. 8.26 µg/mL EZE'in pH 9.0'da $\dot{I}_p - v^{1/2}$ grafiği	99
Şekil 4.31. 8.26 µg/mL EZE'in pH 9.0'da $\log \dot{I}_p - \log v$ grafiği	100
Şekil 4.32. 8.26 µg/mL EZE'in farklı pH değerlerinde kaydedilen dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen $E_p - \log v$ grafikleri	100
Şekil 4.33. 63.00 µg/mL EZE'in kronoamperometrik voltamogramı ($\dot{I} - t$)	101
Şekil 4.34. 63.00 µg/mL EZE'in kronoamperometrik voltamogramı ($\dot{I} - t^{1/2}$)....	102
Şekil 4.35. 63.00 µg/mL EZE'in kronokulometrik voltamogramı ($Q - t$)	103
Şekil 4.36. 63.00 µg/mL EZE'in kronokulometrik voltamogramı ($Q - t^{1/2}$)	103
Şekil 5.1. CA'da uygulanan E_2 potansiyeline göre akım – zaman ilişkisi.....	112
Şekil 5.2. 4.76 µg mL ⁻¹ EZE'in SWV voltamogramlarına ait pH – E_p grafiği	116
Şekil 5.3. CA yönteminde EZE'in küçük zaman değerlerindeki $\dot{I} - t^{1/2}$ grafiği....	119
Şekil 5.4. CC yönteminde EZE'in küçük zaman değerlerindeki $Q - t^{1/2}$ grafiği....	119
Şekil 5.5. Çift potansiyel kronoamperometride a) potansiyel-zaman b) akım-zaman ilişkisi.....	121
Şekil 5.6. 118.00 µg / mL EZE'in çift potansiyelli kronoamperometrik voltamogramı.....	122
Şekil 5.7. Çift potansiyelli kronoamperometride ($\dot{I}_b / \dot{I}_f$) oranının $k\tau$ ile değiştiği çalışma grafiği.....	123

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Sınır akımı çeşitleri ve farklı parametreler ile değişimi.....	25
Tablo 2.2. Elektrot mekanizmalarının belirlenmesinde kullanılan kriterler	43
Tablo 4.1. EZE'in farklı derişimlerdeki pH 9.0 $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tamponları ile elde edilen pik akımları	70
Tablo 4.2. EZE için uzun dönem kararlılık bulguları	80
Tablo 4.3. EZE için kısa dönem kararlılık bulguları	80
Tablo 4.4. EZE'in SWV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar	82
Tablo 4.5. EZE'in SWAdSV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar	82
Tablo 4.6. EZE'in DPAdSV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar	83
Tablo 4.7. Önerilen elektroanalitik yöntemlere ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri.....	83
Tablo 4.8. SWV yönteminin gün içi ve arası kesinlik ve doğruluk bulguları	86
Tablo 4.9. SWAdSV yönteminin gün içi ve arası kesinlik ve doğruluk bulguları..	87
Tablo 4.10. DPAdSV yönteminin gün içi ve arası kesinlik ve doğruluk bulguları..	88
Tablo 4.11. Cihaz tekrarlanabilirliği bulguları	89
Tablo 4.12. Yöntem tekrarlanabilirliği bulguları	90
Tablo 4.13. SWV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları	91
Tablo 4.14. SWAdSV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları	91
Tablo 4.15. DPAdSV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları	92
Tablo 4.16. SWV yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları	92
Tablo 4.17. SWAdSV yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları	93
Tablo 4.18. DPAdSV yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları	93
Tablo 4.19. Sentetik preparatların analiz bulguları	96
Tablo 4.20. Ezetrol [®] tablete ait kalibrasyon grafiği yöntemi ile analiz bulguları .	97
Tablo 4.21. Ezetrol [®] tablete ait standart ekleme yöntemi ile analiz bulguları.....	98

Tablo 4.22. 8.26 µg/mL EZE'in pik potansiyellerinin logv ile değişimi ve doğru denklemleri	101
Tablo 5.1. EZE molekülüne ait IR spektrumunun değerlendirme sonuçları	104
Tablo 5.2. 4.76 µg/mL EZE'in SWV yönteminde yarı pik genişliği teorisi kullanılarak farklı pH değerlerinde hesaplanan α değerleri	114
Tablo 5.3. 8.26 µg/mL EZE için CV yöntemiyle farklı pH'larda hesaplanan α değerleri.....	115
Tablo 5.4. 8.26 µg/mL EZE'in CV yönteminde farklı pH değerlerinde ($E_p - E_{p/2}$)'den hesaplanan α değerleri.....	115
Tablo 5.5. 8.26 µg/mL EZE için CV yönteminde değişik tarama hızlarında hesaplanan difüzyon katsayısı değerleri	117
Tablo 5.6. 63.00 µg/mL EZE'in CA yöntemiyle hesaplanan difüzyon katsayıları.....	117
Tablo 5.7. 63.00 µg/mL EZE'in CC yöntemiyle hesaplanan difüzyon katsayıları.....	118
Tablo 5.8. 8.26 µg/mL EZE'nin CV yönteminde farklı tarama hızlarında akım fonksiyonları.....	120

1. GİRİŞ

Genel olarak yüksek plazma lipid derişimlerinin (hiperlipidemiler) tedavisinde uygulanan ilaçlar dokuların lipoprotein sentezinin azaltılması, plazmada lipoprotein katabolizmasının arttırılması ya da vücuttan kolesterol atılımının arttırılması amacıyla kullanılır (1). Koroner arter hastalığı (KAH) çoğu ülkede ölümlerin yaklaşık yarısının nedenidir. KAH'ın kolesterol ve/veya triaçilgliserol içeren lipoprotein partiküllerinin plazma derişimleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Atherogeneizde anahtar rolü oynayan bu partiküller, bağırsak mukozası ve karaciğerde sentezlenirler ve plazma içerisinde yoğun bir şekilde metabolize edilirler. Bu partiküller dokular arasında lipid taşınmasında da önemli rol oynarlar.

Bir antihiperlipidemik ilaç olan ezetimib (EZE), 1- (4 - florofenil) - 3(R) - 3- (4 -florofenil) – 3 - ((S) - hidroksipropil) - 4(S) - (4 - hidroksifenil) – 2 - azetidinon kimyasal yapısında olup, trigiseritlerin veya yağda çözünen vitaminlerin artmasını etkilemeksizin kolesterol absorpsiyonunu engelleyen kolesterol absorpsiyon inhibitörlerinin yeni bir üyesi sayılmaktadır (2) .

Kaynaklarda EZE'nin kromatografı (3-20) , UV-GB spektrofotometrisi (21-31) ve miseller elektrokinetik kapiler kromatografisi (MEKC) (32) yöntemleriyle farmasötik preperatlardan ve biyolojik materyallerden tek başına ve/veya karışım halinde analizleri bulunmaktadır. Ancak kaynaklarda adı geçen maddenin elektroanalitik yöntemlerle analizine rastlanmamıştır. Kaynaklardaki bu boşluğu doldurmak amacıyla EZE'nin farmasötik preperatlardan analizi için elektroanalitik yöntemlerin geliştirilmesi ve valide edilmesi planlanmıştır.

Bu tez çalışmasında EZE etkin maddesinin farmasötik preperatlardan analizi için SWV, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri uygulanacaktır. Bu yöntemlerle EZE'in tayini için optimize edilen şartlarda analizler gerçekleştirilecek ve geliştirilen yöntemler doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, özgünlük, sağlamlık ve tutarlılık gibi parametreleri değerlendirilerek valide edilecektir. Geliştirilen ve valide edilecek yöntemler EZE içeren farmasötik preparatların analizine uygulanacaktır. Elde edilen sonuçlar kaynaklardaki UV-spektrofotometrik yöntem sonuçları ile karşılaştırılacak ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilecektir. Ayrıca CV, CA ve CC yöntemleriyle EZE'nin elektrokimyasal davranışları incelenektir. Akımın karakteri ve elektrot tepkimesinin tersinirliği

incelendikten sonra difüzyon katsayısı, aktarılan elektron sayısı, proton sayısı, elektron aktarım hız sabiti (k_f), kimyasal tepkimenin hız sabiti (k) hesaplanacak ve elektrot yüzeyinde meydana gelen indirgenme için olası mekanizma önerilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antihiperlipidemik İlaçlar

Antilipidemik ilaçların tarihi, 1953 yılında Cottet ve arkadaşlarının 2-etil-2-fenilasetik asit ve bunun amit türevinde antilipidemik etki gözlemesiyle başlamıştır. İnsan plazmasındaki bütün lipitler gerçekte proteinlere bağlı kompleksler halinde taşınırlar. Başlıca albumine bağlı olan yağ asitleri bir tarafa bırakılırsa lipidler *lipoprotein* denilen özel makromoleküler kompleksler içinde taşınır. Bundan dolayı plazma lipoproteinlerinin de yükseldiği birçok metabolik bozukluklara *hiperlipoproteinemi* denir. Plazmada trigliserit düzeyinin artışına yol açan durumlar için *hiperlipidemi* terimi kullanılır. Hiperlipidemi, birçok kalp-damar hastalıklarına yol açar. Hiperlipidemisinin ortaya çıkışında; metabolik bozukluklar, yağ metabolizmasındaki genetik bozukluklar, sistematik lupus eritematosus, hipotroidizm, nefrotik sendrom, gut, *Cushing* sendromu, kortikosteroid tedavisi, şişmanlık, diyet, alkolizm, esterojen tedavisi, böbrek fonksiyon bozuklukları yol oynamaktadır.

Hiperlipoproteinemilerin en önemli iki klinik komplikasyonu akut pankreatit ve aterosklerozdur. Akut pankreatit aşırı hiperlipemisi olan hastalarda meydana gelir. Bu gibi hastalarda trigliserid düzeylerinin kontrol altına alınması, hayatı tehdit eden bu hastalığın tekrarlayan nöbetlerini önleyebilir.

Ateroskleroz ABD ve diğer batılı ülkelerde ölüme yol açan bir nedendir. Plazma lipoproteinlerinden bazıları aterojenezi hızlandırır. Kolesterolü damar duvarına taşıyan *apolipoprotein (Apo) B-100* içeren taşıyıcı lipoproteinler saptanmıştır. Bu aterojenik lipoproteinler *düşük dansiteli*, *orta dansiteli*, *çok düşük dansiteli* ve *Lp(a) lipoproteinlerdir*. Ateromdaki köpük hücrelerinde ve hücre dışı matrikste bulunan kolesterol esterleri fibroblastlar tarafından kollajen yapımını uyarır. Makrofajlar ve düz kas hücreleri aterojenezde kilit rol oynarlar. Lipoproteinlerin üzerindeki özel reseptörler (çöpçü reseptörler) tarafından alınmalarına neden olur ve içinde kolesterol esterlerinin biriktiği köpük hücreleri meydana gelir. Aterom oluşumunda diğer faktörlerin de katkısı vardır. Bu faktörler hipertansiyon, ateromdan kolesterolün uzaklaşmasında rol oynar gibi görünen *yüksek dansiteli lipoprotein (HDL)* düzeyinin düşük olması, sigara ve diyabettir.

Birçok hiperlipidemik durumlarda ksantomalar gelişir. Tendonlarda veya deride lipidlerin depolanması ile meydana gelen bu lezyonlar hastanın estetik olarak kabul edemeyeceği lezyonlar olabilir. Ksantomlar lipid düşürücü tedavi ile azaldığından tedavi için bir diğer endikasyondur.

Lipoproteinlerin biyolojisini ve çeşitli hiperlipidemik durumların fizyopatolojisinin anlaşılması uygun bir tedavi şemasının seçilmesi için gereklidir (33) .

Lipoproteinler santrifüj ve elektroforezdeki davranışlarına göre şu gruplarda toplanır:

a) *Şilomikronlar*, en büyük lipoproteinlerdir, bağırsakta oluşur ve diyetle alınan trigliseridleri taşır. Ağırlık olarak % 2'si proteindir. Bazı kolesterol esterleri şilomikron yapısında bulunurlar. Trigliserit yüzdesi en fazla olan bileşendir. Elektroforezde göç etmezler. İnce bağırsakta yağ absorpsiyonu sırasında oluşturulur ve lenf yoluyla kana geçerler. Yapısındaki trigliseritler lipoprotein lipaz ile yağ asitlerine parçalanırlar.

b) *Çok düşük dansiteli Lipoproteinler (VLDL)*, karaciğerden salgılanır ve burada sentez edilen trigliseridleri taşır. VLDL'ler ApoB-100 ve bir miktar ApoC içerir. Apo-C'nin çoğu plazmadaki yüksek yoğunluklu lipoproteinlerden gelir. Karaciğeri terkettikten sonra lipoprotein lipaz ile hidrolize olan trigliseridlerden serbest yağ asitleri serbestleşir, serbestleşen yağ asitleri yağ dokusundan depo edilir ya da iskelet kası veya kalp kası gibi dokularda oksidasyona uğrar. Trigliseridlerin azalması sonucu meydana gelen daha küçük partiküllere ya da kalıntılara orta dansiteli lipoproteinler (IDL) denir. IDL partiküllerin bir kısmı doğrudan doğruya endositoz ile karaciğere alınır. Geri kalanı da trigliseridlerin daha da ayrılması ile düşük dansiteli lipoproteinlere (LDL) çevrilir. Bu olay 'beta kayması' denilen klinik bir olayı açıklar; yani serumda LDL (beta-lipoprotein) artarken hipertrigliseridemik durum azalır. Plazmada LDL'lerin artışı bunların öncüsü olan VLDL salgılanmasının artışı kadar LDL katabolizmasının azalması sonucu da olabilir.

c) *Düşük Dansiteli Lipoproteinler (LDL)*, Hepatosit ve diğer çekirdekli hücrelerde LDL'lerin başlıca yıkım yolu yüksek afiniteli reseptör aracılığı ile gerçekleştirilen endositozdur. Bundan sonra çekirdekteki LDL kolesterol esterleri hidrolize edilerek hücre zarlarının sentezi için serbest kolesterol sağlanır. Hücreler

kolesterolü HMG-KoA redüktaz asit'in meydana geldiği reaksiyon üzerinden de sağlayabilirler. Bu enzimin ve LDL reseptörlerinin oluşumu, hücredeki kolesterol içeriği tarafından transkripsiyonal düzeyde düzenlenir.

d) *Yüksek Dansiteli Lipoproteinler (HDL)*, HDL'lerin apolipoproteinleri karaciğer ve bağırsaktan salgılanır. HDL'lerdeki lipidlerin çoğu şilomikronların yüzeyindeki tek katlı tabakadan ve lipoliz sırasında VLDL'den gelir. HDL'ler kolesterolü aynı zamanda periferik dokularda hücrelerin kolesterolü yeniden elde etme homeostazını koruyan yolla alır. Bu olayda hücre zarından absorbe olan serbest kolesterol prebeta HDL'ler denilen ufak partikül tarafından alınır. Alınan kolesterol sonra lesitin:kolesterol asit transferaz (LKAT) ile esterleştirilerek daha büyük HDL türleri oluşur. Kolesterol esterlerin kolesterol esteri transfer eden protein (KETP) aracılığı ile VLDL, IDL, LDL ve şilomikron kalıntılarına taşınır. Böylece taşınan kolesterol esterlerinin çoğu akseptör (alıcı) lipoproteinlerin endositozu ile karaciğere ulaşır (34) .

Hiperlipidemi tedavisinde, lipitçe zengin beslenmenin kısıtlanmasının yanı sıra çeşitli kimyasal yapılara sahip bileşikler de kullanılmaktadır.

Antilipidemik ilaçlar etki mekanizmalarına göre şöyle sınıflandırılır;

a) Lipoprotein sentezini azaltan ilaçlar;

- Statinler
- Gemfibrozil
- Klofibrat
- Nikotinik asit
- Probukol

b) Lipoprotein katabolizmasını arttıran ilaçlar;

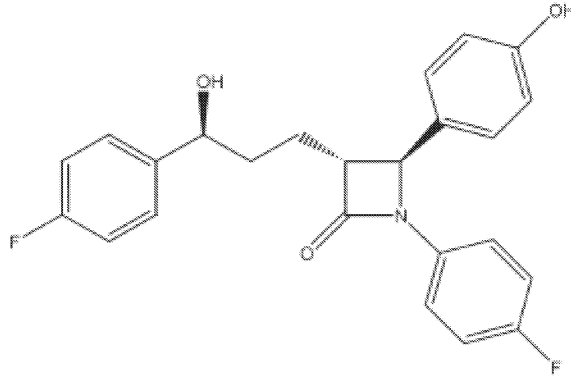
- Kolestiramin
- Neomisin
- Dekstrotiroxin
- Estrojenler

c) Diğerleri;

- Ezetimib
- Avasimibe
- Orlistat

2.2 Ezetimib

2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2.1. EZE molekülünün kimyasal yapısı

EZE'nin molekül formülü $C_{24}H_{21}F_2NO_3$ ve molekül ağırlığı 409.4 dür. Kimyasal adı 1-(4-florofenil)-(3R)-[3-(4-florofenil)-(3S)-hidroksipropil]-(4S)-(4-hidroksifenil)-2-azetdion'dur. EZE erime noktası $163^{\circ}C$ olup oda sıcaklığında karardır. Beyaz renkte kristalimsi bir tozdur. Metanol ve etanolde iyi çözünürken, suda ve asetonitrilde kısmen çözünür (35). EZE'nin muhtemel pKa değeri 9.72 ± 0.30 ' dir (36).

2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri (37)

EZE trigliseritlerin veya yağda çözünen vitaminlerin artmasını etkilemeksizin kolesterol absorpsiyonunu engelleyen kolesterol absorpsiyon inhibitörlerinin yeni bir üyesidir. EZE ince bağırsağın tüylü çeperinde toplanarak kolesterol emilimini azaltır ve bu şekilde bağırsak kolesterolünün karaciğere gitmesini azaltır. Karaciğer kolesterol depolarında azalma ve kandan kolesterol klerensinde artış olur. EZE safra asidi salgısını artırmaz ve karaciğerde kolesterol sentezini inhibe etmez.

2 haftalık klinik bir çalışmada 18 hiperkolesterolemik hastada EZE bağırsaktan kolesterol emilimini plaseboya göre % 54 oranında inhibe etmiştir. Kolesterolün bağırsaktan emilimini inhibe ederek, kolesterolün karaciğere geçişini

azaltır. Statinler gibi karaciğerde kolesterol sentezini azaltır. Bu özgün mekanizmalar bir arada, tamamlayıcı olarak kolesterolü düşürür.

2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri (37)

i. Emilimi

Oral uygulamadan sonra, EZE hızla emilir ve farmakolojik bakımdan fenolik glukoronide (EZE-glukuronid) konjuge olur. Ortalama maksimum plazma yoğunlukları EZE-glukuronid için 1-2 saat içinde, EZE için 4-12 saat içinde meydana gelir. EZE'nin mutlak biyoyararlanımı tayin edilemez, çünkü bu bileşik injeksiyona uygun sulu ortamda çözünmez. EZE aç ya da tok karnına alınabilir.

ii. Dağılımı

İnsan proteinlerine EZE-glukuronid % 99.7 ve EZE % 92 oranında bağlanır.

iii. Metabolizması (38)

EZE ince bağırsakta ve karaciğerde EZE-glukuronid konjugasyonu (faz II reaksiyonu) ile metabolize olur.

iv. Eliminasyonu

EZE ve EZE-glukuronid önemli enterohepatik geri dolaşım belirtisi vererek plazmadan yavaş elimine olurlar. EZE ve EZE -glukuronid yarı ömrü 22 saattir. 10 günlük toplama dönemi boyunca adsorbe edilen dozun yaklaşık % 90 feçes, % 10'u idrarda tespit edilmiştir.

v. Klinik Kullanım Şekli ve Dozu

Hasta mutlaka lipit düşürücü bir diyet uygulamalıdır ve EZE ile tedavi sırasında diyete devam etmelidir. Günde 10 mg EZE önerilir, tek başına ya da statinle birlikte kullanılabilir.

Erişkinler, kalp yetmezliği ve böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlanması gerekmez. 10 yaşından küçük çocuklar için klinik veri bulunmadığından dolayı EZE ile tedavi önerilemez.

vi. Yan Etkileri (39)

Klinik çalışmalarda EZE tek başına veya bir statinle verildiğinde istenmeyen etkiler genellikle hafif ve geçici olmuştur. Tek başına EZE verildiğinde baş ağrısı, karın ağrısı ve diyare gibi etkiler görülmüştür. Bir statinle birlikte verildiğinde baş ağrısı, karın ağrısı, yorgunluk, kabızlık, diyare, gaz ve bulantı gibi etkiler görülmüştür.

vii. İlaç Etkileşimleri

Preklinik çalışmalarda, EZE'nin sitokrom P450 ilaç metabolize eden enzimleri indüklediği gösterilmiştir. Sitokrom P450 1A2, 2D6, 2C8, 2C9 ve 3A4 ya da N-asetiltransferaz ile metabolize olduğu bilinen ilaçlarla EZE arasında klinik olarak anlamlı farmakokinetik etkileşim görülmemiştir. EZE statinle verildiğinde dapsonun, dekstrometorfanın, digoksinin, oral kontraseptiflerin (etinil östradiol ve levonorgestrel), glipizidin, tolbutamidin, midazolamın ve varfarinin farmakokinetiğini etkilemez. EZE ile birlikte simetin verildiğinde, EZE'in biyoyaralanımı üzerinde etki oluşturmaz.

Antasitler : EZE antasitle verildiğinde, EZE'nin emilim hızı azalmış ancak EZE'in biyoyaralanımı üzerinde bir etki oluşmamıştır. Emilim hızının azalması klinik olarak anlamlı kabul edilmemiştir.

Kolestiramin : EZE'nin kolestiramin ile uygulanışı, toplam EZE'in (EZE + EZE-glukuronid) ortalama AUC'sini yaklaşık % 55 azaltmıştır. EZE'in kolestiramine eklenmesine bağlı LDL-K azalmasındaki artış, bu etkileşimle hafifleyebilir.

Fibratlar : EZE fenofibrat ya da gemfibrozil birlikte verildiğinde toplam EZE yoğunluğunu sırasıyla yaklaşık 1.5 ve 1.7 kat arttırmıştır, ancak bu artışlar klinik bakımdan anlamlı kabul edilmemiştir. Fibratlarla EZE uygulananının yararı ve güvenilirliğini kanıtlanmamıştır. Fibratlar, safraya kolesterol salgılanmasını artırarak kolelitiazise yol açabilir. Köpeklerde preklinik çalışmada, EZE safra kesesi safrasında kolesterolü artırmıştır.

Statinler : EZE ile atorvastatin, simvastatin, pravastatin, lovastatin, fluvastatin arasında klinik olarak anlamlı farmakokinetik etkileşim görülmemiştir.

2.3. Ezetimib'in Analiz Yöntemleri

2.3.1. Kromatografik Analiz Yöntemleri

Pawar ve diğ. (3) , EZE ve fenofibrat'ın sentetik çözeltilerden analizi için ters – faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu analiz için 253 nm dalga boyunda C18 kolon, hareketli faz olarak asetonitril – amonyum asetat (85:15, h/h), akış hızı 1.3 mL / dk. seçilmiştir. Alıkonma zamanları EZE için 2.41, fenofibrat için 6.03 dk. bulunmuştur. EZE ve fenofibrat için sırasıyla 2 – 20 µg/mL ve 16 -80 µg/mL aralığında doğrusallık ve % 99 – 101 aralığında geri kazanımlar elde edilmiştir.

Neelima ve diğ. (4), Simvastatin ve EZE'nin kombine farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem UV dedektör ile 240 nm dalga boyunda RP-C18 kolonu ve asetonitril-metil alkol-pH 3.0 trietilamin tamponu (15:45:40, h/h/h) hareketli faz kullanılarak uygulanmıştır. Simvastatin ve EZE için 0.5 – 20 µg /mL doğrusallık aralığı elde edilmiştir. Gün içi ve günler arası çalışmaların bağıl standart sapmaları simvastatin için % 1.02 – 1.43 ve EZE için % 0.24 – 1.29 olarak bulunmuştur.

Seshachalam ve Kothapally (5), EZE ve atorvastatin kalsiyum'un farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz UV dedektör ile 254 nm'de yapılmış ve hareketli faz olarak 0.01 M amonyum asetat (pH 3.0) – asetonitril (50:50, h/h) kullanılmıştır. Alıkonma zamanları EZE ve atorvastatin kalsiyum için sırasıyla 15.50 dk. ve 19.30 dk. ; doğrusallık aralığı EZE ve atorvastatin kalsiyum için sırasıyla 5 – 500 µg/mL ve 4 – 400 µg / mL olarak bulunmuştur. Atorvastatin için LOD değeri 1.25 µg/mL, EZE için LOD değeri 1.48 µg/mL olarak bulunmuştur.

Oliveria ve diğ. (6), EZE ve simvastatin'in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem için C18 kolon, 0.6 mL / dk. akış hızında hareketli faz olarak 0.03 M fosfat tamponu – pH 4.5 asetonitril (35:65, h/h) ve foto diyot dedektör kullanılarak 234 nm'de analiz yapılmıştır. Her iki madde için 0.5 – 200 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir.

Rao ve diğ. (7), EZE'nin tablet formlarından analizi için izokrotik ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem için C18

kolon, 1.0 mL / dk. akış hızında hareketli faz olarak asetonitril – su (70:30, h/h) ve UV dedektör kullanılarak 230 nm’de analiz yapılmıştır. EZE için 0.5 – 200 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir.

Özaltın ve Uçaktürk (8), EZE ve simvastatin’in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için dual – mode gradient sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Optimum ayırım C8 kolonu kullanılarak 10 dk.’dan daha az bir sürede gerçekleşmiş ve gradient elüsyon uygulanarak yapılmıştır. Analiz dizi diyot dedektör kullanılarak 240 nm’de yapılmıştır. EZE ve simvastatin için LOQ sırasıyla 0.2 ve 3 µg /mL, LOD sırasıyla 0.05 ve 0.5 µg /mL olarak bulunmuştur.

Chaudhari ve diğ. (9), EZE ve simvastatin’in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi ve validasyonu için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem için C18 kolon, 1.5 mL / dk. akış hızında hareketli faz olarak asetonitril- su – metil alkol (60:25:15, h/h/h) ve UV dedektör kullanılarak 238 nm’de analiz yapılmıştır. Maddelerin kombine ilaç formu termal, fotolitik, hidrolitik ve oksidatif koşullara maruz bırakılmış, önerilen yöntemle analiz edilmiş ve hiçbir girişimin olmadığı görülmüştür. Önerilen yöntem ile simvastatin için 1.0 – 80 µg/mL aralığında, EZE için 3.0 – 80 µg /mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Ayrıca simvastatin ve EZE için sırasıyla % 99.17 ve % 100.43 geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Qutab ve diğ. (10), EZE ve atorvastatin kalsiyum’un farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz fenil kolon kullanılarak UV dedektör ile 242 nm’de yapılmış ve hareketli faz olarak 0.1 M amonyum asetat (pH 6.5) – asetonitril (28:72, h/h) kullanılmıştır. Her iki madde için 12 – 52 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiş ve toplam analiz 5 dk.’dan daha az sürede gerçekleşmiştir.

Shivshanker ve diğ. (11), EZE ve simvastatin’in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem C18 kolon, 1.0 mL / dk. akış hızında hareketli faz olarak asetonitril- tampon (55:45, h/h) ve UV dedektör kullanılarak 210 nm’de analiz yapılmıştır. Alıkonma zamanları EZE için 12.06 dk. ve simvastatin için 18.97 dk. olarak bulunmuştur. Her iki madde için 25 – 125 µg/mL aralığında doğrusallık elde

edilmiş ve EZE için % 99.8 ve simvastatin için % 100 geri kazanım sonuçları elde edilmiştir. Bu çalışmada atorvastatin kalsiyum iç standart olarak kullanılmıştır.

Basha ve diğ. (12), EZE, faz-I metaboliti ezetimib keton (EZM-K) ve faz-II metaboliti ezetimib glukoronit'in (EZM-G) birkaç matrislerden aynı anda analizi için gradient yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. 1.0 mL / dk. akış hızında hareketli faz olarak 0.05 M formik asit-asetonitril-metil alkol ve UV dedektör kullanılarak 250 nm'de analiz yapılmıştır. İç standart olarak tiyofenilin kullanılmıştır. İç standartın, EZM-G, ezetimib keton glukoronit (EZM-KG), EZM ve EZM-K nominal alıkonma zamanları sırasıyla 9.39, 24.23, 27.82, 29.04 ve 30.56 dk. olarak bulunmuştur. EZM, EZM-K ve EZM-G için LOQ 0.02 µg/mL olarak bulunmuştur. EZM-KG'in referans maddesinin eksikliğinden dolayı bu metabolitin LOQ değeri bulunamamıştır. Önerilen yöntem EZM, faz-I metaboliti EZE keton (EZM-K) ve faz-II metaboliti EZE glukoronit'in (EZM-G) *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarında aynı anda analizi için uygun bulunmuştur.

Rajkondawar (13), EZE ve rosuvastatin'in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz C18 kolon kullanılarak UV dedektör ile 235 nm'de yapılmış ve hareketli faz olarak 0.05 M potasyum dihidrojen fosfat – asetonitril (55:45, h/h) kullanılmıştır.

Doshi ve diğ. (14) , EZE'nin tabletlerden analizi için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Hareketli faz olarak fosforik asit – asetonitril (50:50, h/h) kullanılmıştır. Yöntemin seçiciliği plasebo ve tablet çözeltileri kullanılarak belirlenmiştir ve 20 – 80 µg/mL ($r = 0.9999$) aralığında doğrusallık bulunmuştur. Ayrıca yöntemin gün içi ve günler arası çalışmaları yapılmış ve doğruluğun % 100.8 – 102.7 arasında değiştiği bulunmuştur.

Mahadik ve Dhaneshwar (15), EZE'nin bulk ve farmasötik preparatlardan analizi için yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde sabit faz olarak silika jel hareketli faz olarak toluen – etil asetat (7:3, h/h) kullanılmıştır. EZE asit ve alkali hidroliz, oksidasyon, kuru ısı ve foto bozulma olaylarına maruz bırakılmıştır. Ayrıca EZE analizi için 254 nm'de densitometrik yöntem geliştirilmiş ve 200 – 1200 ng / mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Korelasyon katsayısı, eğim ve kesişim değerleri sırasıyla 0.9994, 5.41 ve 483.6 olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem valide edilmiş, LOD ve LOQ sırasıyla

50 ng/mL ve 100 ng/mL olarak bulunmuştur. İstatistiksel veriler yöntemin tekrarlanabilir ve EZE analizi için yüksek bir seçicilikte olduğunu göstermektedir.

Dixit ve diğ. (16), EZE ve simvastatin analizi için yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz için sabit faz olarak silika jel, hareketli faz olarak n – hekzan – aseton (6:4, h/h) kullanılmıştır. Her iki madde için 234 nm’de densitometrik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu sistemde simvastatin için $RF = 0.39$ EZE için $RF = 0.50$ bulunmuştur. Her iki madde için 200 – 1600 ng/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Tayin ve gözlenebilme sınırları her bant için sırasıyla 25 ve 100 ng olarak bulunmuştur.

Dhaneshwar ve diğ. (17), EZE ve atorvastatin kalsiyum’un tablet formlarından aynı anda analizi için yüksek performanslı ince tabaka sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Maddelerin kromatografik ayırımı için alüminyum plakalı silika jel ve hareketli faz olarak toluen-metil alkol (8:2, h/h) kullanılmıştır. Densitometrik değerlendirme 240 nm’de gerçekleştirilmiştir. Atorvastatin kalsiyum ve EZE için RF değerleri sırasıyla 0.23 ve 0.39 olarak bulunmuştur. Her iki madde için 0.4 – 2.4 µg/zone aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Atorvastatin kalsiyum için gün içi BSS değerleri % 1.16 – 1.25 ve günler arası BSS değerleri % 1.16 – 1.44; EZE için gün içi BSS değerleri % 0.47 – 0.63 ve günler arası BSS değerleri % 0.47 – 0.88 olarak bulunmuştur. Doğruluk değerleri Atorvastatin kalsiyum için % 98.51, EZE için % 99.01 olarak bulunmuştur.

Sonawane ve diğ. (18), EZE’nin tablet formlarından analizi için yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem için hareketli faz olarak toluen - asetonitril (60:40, h/h) ve UV dedektör kullanılarak 233 nm’de analiz yapılmıştır. EZE için 300 – 2100 ng /mL aralığında doğrusallık elde edilmiş ve % 99 – 101 arasında geri kazanım sonuçları elde edilmiştir.

Li ve diğ. (19), EZE ve insan plazmasından toplam EZE analizi için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. EZE’in plazmadan ekstraksiyonu için metil ter-bütül eter kullanılarak sıvı – sıvı ekstraksiyonu prosedürü kullanılmıştır. Ekstraksiyon ürünü, C18 kolon ve 0.25 mL / dk. akış hızında 5 mmol amonyum asetat ve asetonitril kullanılarak elue edilmiştir. EZE ve insan plazmasındaki toplam EZE için sırasıyla 0.020 – 20 µg / mL ($r = 0.9994$, $n = 9$) ve 0.25 – 250 µg/mL ($r = 0.9998$, $n = 9$) doğrusallık aralığı elde edilmiştir. Gün içi ve günler arası bağıl

standart sapmalar % 12 ‘den daha az ve geri kazanım sonuçları % 97 – 104 arasında bulunmuştur. Ayrıca farmakokinetik çalışmalar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve Çinli çocuklardan elde edilen parametrelerin başka ülkelerden bulunan verilerle aynı olduğu bulunmuştur.

Uçaktürk ve diğ. (20), EZE’nin insan plazmasından analizi için elektron impakt iyonlaşma tekniği kullanılarak yeni, özgün ve hassas GC – MS yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz yapılmadan önce EZE bir trimetil silan ajanı olan N-metil-N-trimetilsilil-trifloroasetamit ile türevlendirilmiştir. Türev tepkimesi katalizör, türevlenme zamanı, sıcaklık, çözücü ve silanlanma ajanı hacmi gibi parametreler göz önüne alınarak optimize edilmiştir. Yöntem hassasiyet, kesinlik, doğruluk, doğrusallık, özgünlük, kararlılık ve geri kazanım parametrelerine göre valide edilmiştir. LOQ ve LOD değerleri sırasıyla 15 ng/mL ve 10 ng/mL olarak bulunmuştur. Doğrusallık aralığı ise 15 – 250 ng/mL’dir. 4 farklı derişim aralığında yapılan gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarının BSS değerleri % 6’dan daha az, doğruluk çalışmalarının BH değerleri % - 4.04 ve 9.71 arasında bulunmuştur. Geliştirilen yöntem başarılı bir şekilde insan plazmasındaki toplam EZE miktarının tayini için uygulanmıştır.

2.3.2. Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri

Anandakumar ve diğ. (21), Simvastatin ve EZE’nin aynı anda tabletlerden analizini absorpsiyon düzeltme yöntemi ve absorpsiyon oranlama yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin etmişlerdir. Birinci yöntem kullanılarak, metil alkolde hazırlanan simvastatin ve EZE çözeltileri sırasıyla 237.6 nm ve 260 nm’de maksimum absorpsiyon vermişlerdir. Bu yöntemde her iki madde için 4 – 24 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. İkinci yöntem kullanılarak, simvastatin ve EZE miktarları her iki madde için geçerli olan 242 nm ve simvastatin için geçerli olan 237.6 nm’de hesaplanmıştır. Bu dalga boylarında her iki madde için 4 – 24 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Her iki yöntem valide edilmiş olup sonuçlar istatistiksel olarak incelenmiştir.

Deshmukh ve diğ. (22) , EZE’nin analizini kolorimetrik, EZE ve atorvastatin kalsiyumun tabletlerden analizini spektrofotometrik olarak tayin etmişlerdir. Kolorimetrik yöntem için EZE ile patent mavi V, hidroklorik asit varlığında boyar

madde ile iyon çifti oluşturulup 636 nm’de absorbansı ölçülmüştür. Renkli kompleks için bu dalga boyunda 20 – 50 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Atorvastatin kalsiyum ve EZE’in tabletlerden analizi için multi dalga boylu yöntem kullanılmıştır. Atorvastatin kalsiyum için 245 nm’de EZE için 232 nm’de maksimum absorpsiyon gözlenmiştir. Her iki madde için 2.5 – 50 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Her iki yöntem valide edilmiş olup doğruluğu ve kesinliği yüksek bulunmuştur. Ayrıca sonuçlar istatistiksel olarak incelenmiştir.

Palabıyık ve diğ. (23) , EZE ve simvastatin’in farmasötik preparatlardan analizi için iki spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Elde edilen veriler iki farklı kemometrik teknik (PCR, PLS -1) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu tekniklerde maddeler metil alkolde hazırlandıktan sonra 240 – 300 nm dalga boyu aralığında absorbanlar ölçülmüş ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Her iki madde için 2.5 – 50 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Yöntemlerin doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapılmış ve farmasötik preparatlara uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Kothapalli ve diğ. (24), EZE ve fenofibratin sentetik preparatlardan kombine halinde analizi için hızlı ve basit iki yöntem geliştirmişlerdir. Birinci yöntem birinci türev spektroskopisi içermektedir. İkinci yöntem ise eğrinin altında kalan alanın hesaplanmasıdır. EZE için 2 – 20 µg/mL, fenofibrat için 8 – 64 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Her iki yöntem valide edilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Mishra ve diğ. (25), alkali ortamda EZE’nin Folin – Ciocalteu (FC) reaktifıyla etkileşmesiyle elde edilen mavi renkli kromojen bir maddenin temelinde basit, hızlı ve ekonomik bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Renkli maddenin 760 nm’de maksimum absorpsiyon gözlenmiş ve 4 – 22 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir.

Sankar ve diğ. (26), EZE ve sefepim’in farmasötik preparatlardan analizi için iki spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Birinci yöntemde sefepim’in ferrik klorit ile yükseltgenmesi ve bunu takiben 740 nm’de maksimum absorpsiyon verecek renkli bir kompleks oluşturmak üzere potasyum ferrisiyanit ile tepkimesi bulunmaktadır. İkinci yöntem ise EZE’in sülfirik asit varlığında

p-dimetilaminosinnamaldehyit ile kondenzasyon tepkimesi vermesidir. Bunun sonunda oluşan ürün 420 nm’de maksimum absorpsiyon vermektedir.

Imran ve diğ. (27), EZE ve karvedilol’ün farmasötik preparatlardan analizi ve validasyonu için UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Asetonitrilde hazırlanan EZE ve karvedilol için sırasıyla 232 nm ve 238 nm’de 2-50 µg/mL ve 2-20 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak EZE için $y = 0.0443x + 0.0106$ ve karvedilol için $y = 0.1080x + 0.034$ regresyon denklemleri elde edilmiştir. Ayrıca EZE için LOD ve LOQ değeri 0.4 µg/mL ve 1.3 µg/mL olarak karvedilol için LOD ve LOQ değeri 0.7 µg/mL ve 2.1 µg/mL olarak bulunmuştur.

Sankar ve diğ. (28), EZE ve etorikozip’in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. EZE ve etorikozip için sırasıyla 235 nm ve 230 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon vermiş ve bu şartlar altında analizler yapılmıştır. Geliştirilen yöntemler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Shrivastava ve diğ. (29), standart kalibrasyon grafiği ve türev spektrofotometrisi yöntemleri kullanarak EZE analizini tablet formundan yapmışlardır. Standart kalibrasyon grafiği için 248.1 nm ve türev spektrofotometrisi için 265.9 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar valide edilerek doğru ve kesin bulunmuştur.

Sankar ve diğ. (30), EZE ve repaglinid’in farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem her iki maddenin alkali koşullar altında Folin-Ciocalteu reaktifiyle indirgenmesiyle oluşan ürünlerin sırasıyla 755 nm ve 750 nm’de maksimum absorpsiyon vermesi esasına dayanır. Her iki madde için de 2.5-15 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir.

Baraka ve diğ. (31) , EZE’nin tabletlerden analizi için 3 ayrı kolorimetrik yöntem geliştirmişlerdir. Birincisinde optimum koşullar altında Fe (III) ‘ün Fe(II)’ye EZE tarafından indirgenmesiyle oluşan kararlı turuncu – kırmızı renkli kompleksin 510 nm’de absorpsiyonu ölçülmüş ve 10 – 90 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. İkinci yöntemde, oda sıcaklığında EZE’in potasyum permanganat çözeltisi ile yükseltgenmesiyle oluşan ürünün 610 nm’de absorpsiyonu ölçülmüş ve 10 – 830 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Üçüncü yöntemde, Co(II)

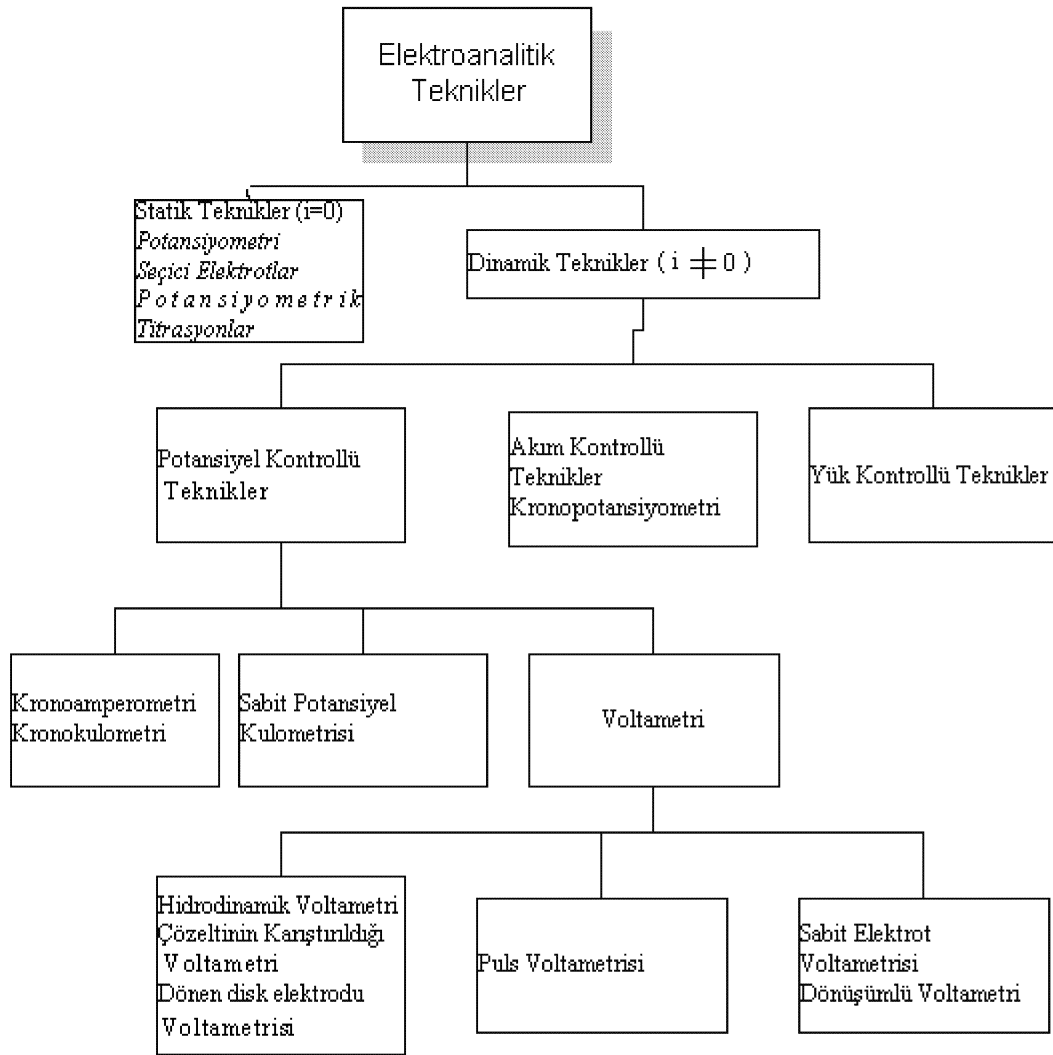
tuzu varlığında şelat oluşumuyla birlikte EZE'nin fenolik grubunun nitrolanması sonucunda oluşan renkli şelatın 510 nm'de absorpsiyonu ölçülmüş ve 10 -130 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Analiz sonuçları valide edilmiş ve çalışmaların yüksek derecede doğruluk ve kesinlik gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca önerilen yöntemlerin kalite kontrol uygulaması için uygun olduğu bulunmuştur.

2.3.3. Kapiler Elektforez Analiz Yöntemleri

Dalmora ve diğ. (32), EZE'nin analizi için miseller elektrokinetik kapiler kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem valide edilmiştir. Bu yöntem silika kapiler kolon kullanılarak yapılmıştır. Çalışma elektroliti olarak 25 mM borat tamponu ve 25 mM anyonik deterjan SDS (pH 9.75) : metil alkol (90:10, h/h) kullanılmıştır. Analiz, 232 nm dalga boyunda kapiler sıcaklığı 35 °C, uygulanan voltaj 30 kV; her 5 saniye için 50 mbar'lık enjeksiyon uygulanarak yapılmıştır. 2 – 150 µg/mL aralığında doğrusallık elde edilmiştir ($R^2 = 0.9999$). LOQ ve LOD sırasıyla 2 ve 0.41 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem EZE içeren farmasötik preparatlara uygulanmış ve elde edilen sonuçlar diğer sıvı kromatografisi yöntemleriyle karşılaştırılmıştır.

2.4. Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik yöntemlerde, elektrot-çözelti sistemine bir elektriksel etki yapılarak (bağımsız değişken) sistemin verdiği cevap (bağımlı değişken) ölçülür. Bu cevaptan, sistemin özellikleri hakkında bilgi edinilir. Elektroanalitik yöntemlerin çok çeşitli sınıflandırma yolları vardır. En yaygın olan sınıflandırma yöntemi Şekil 2.2'de verilmiştir (40).



Şekil 2.2. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması

Şekil 2.2’den görüldüğü gibi elektroanalitik yöntemler genelde net akımın sıfır olduğu denge durumundaki *statik yöntemler* ve denge durumundan uzakta net akımın gözlemlendiği *dinamik yöntemler* olmak üzere ikiye ayrılır. Tekniklerin çok büyük bir kısmında akım gözlenir ve bunlar da çoğunlukla ya *potansiyel kontrollü* veya *akım kontrollüdür*. Potansiyel veya akımın kontrol edildiği tekniklerde bu parametreler *büyük genlikli* veya *küçük genlikli* olarak uygulanır. Büyük genlikli teknikler diğerlerine göre daha yaygın olarak kullanılır.

Potansiyel kontrollü tekniklerden voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden yararlanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup analitik yöntemi kapsar.

Voltametrیده kullanılan elektrotlar;

1. Polarize edilemeyen (referans) elektrotlar; potansiyeli dış etkilerle değişmeyen elektrotlar (doymuş kalomel elektrot (DKE) ve gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrot gibi).

2. Polarize edilebilen (çalışma) elektrotlar; potansiyeli dış etkilerle değiştirilebilen elektrotlar (cıva, platin, altın, grafit elektrotlar).

3. Karşıt elektrotlar; elektriğin güç kaynağından çözeltinin içinden geçerek çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan elektrotlardır (41, 42).

Genel olarak voltametrیده kullanılan çalışma elektrotları, polarizasyonu artırmak için, yüzey alanları birkaç milimetre kare ve bazı uygulamalarda ise birkaç mikrometre kare veya daha küçük olan mikroeletrotlardır.

Üçlü elektrot sisteminde, potansiyel, çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına uygulanır ve çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki akım ölçülür. Çalışma ile referans elektrot arasında akım ölçülmez, çünkü referans elektrodun potansiyeli küçük akımlarda sabittir ancak akım arttığında potansiyel sabit kalmaz. Üçlü elektrot sisteminin kullanılması ile aynı sistemde hem potansiyel uygulanabilir hem de oluşan akım ölçülebilir.

Eğer bir voltametrik yöntemde çalışma elektrodu damlayan cıva elektrodu ise yöntem *polarografi* adını alır. Asılı duran cıva damlası veya bir katı elektrot kullanılırsa yöntem *sabit elektrot voltametrisidir*.

CV yönteminde asılı duran cıva elektrodu veya başka bir katı elektroda uygulanan potansiyel kontrol edilir ve hücreden küçük bir akım geçer. Bu nedenle CV, potansiyel kontrollü sabit elektrot voltametri yöntemidir. Kronopotansiyometride akım kontrol edildiği için bu yöntem akım kontrollü elektroanalitik yöntemler grubuna girer.

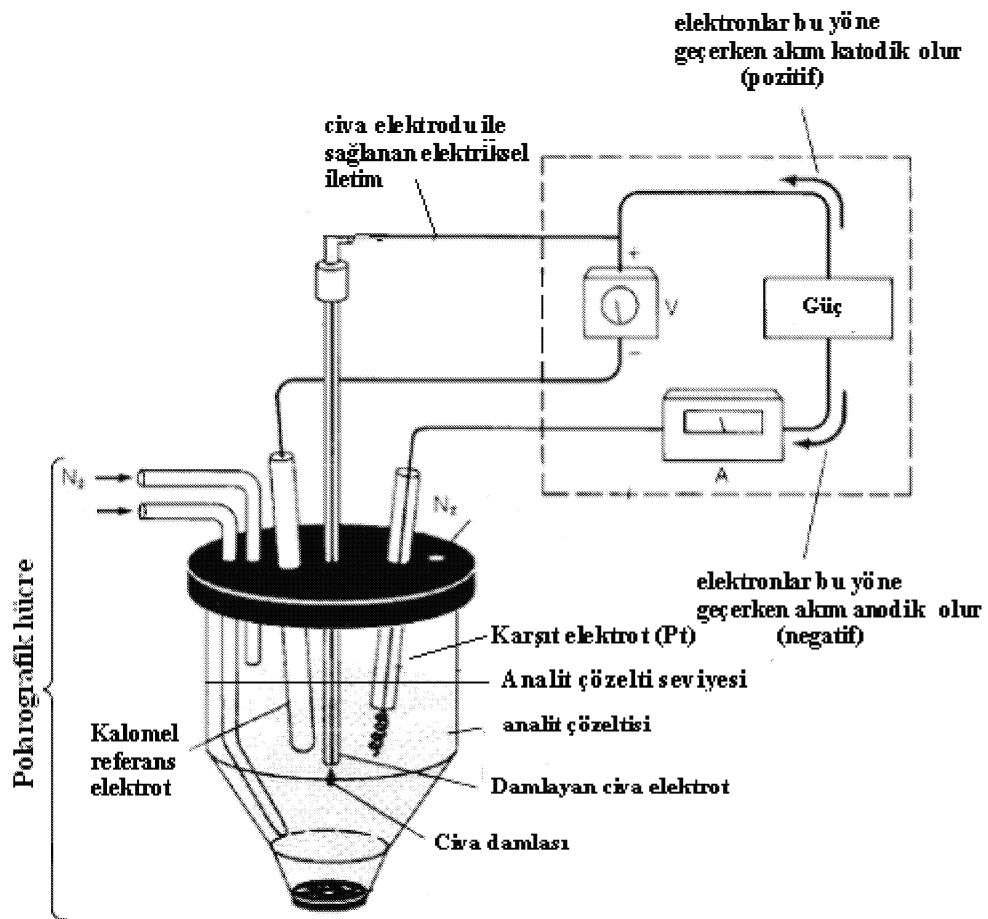
İyon seçici elektrotların kullanıldığı yöntemler akımın sıfır olduğu statik elektroanalitik yöntemlerdir.

Elektrot tepkimelerinin mekanizmalarının belirlenmesi, kinetiklerinin incelenmesi ve maddelerin miktar tayinlerinin yapılmasında çok başvurulmuş elektroanalitik yöntemlerin bir kısmı aşağıda listelenmiştir.

- Polarografi , doğru akım polarografisi, puls polarografisi ve diferansiyel puls polarografisi

- Dönüşümlü voltametri
- Kare dalga voltametrisi ve polarografisi
- Sıyırma voltametrisi
- Kronoamperometri
- Kronokulometri
- Sabit Potansiyel kulometrisi

Çeşitli elektroanalitik yöntemlerde kullanılan cihaz düzeneği Şekil 2.3'de görülmektedir.



Şekil 2.3. Voltametrik ölçümlerde kullanılan bir hücrenin sistematik diyagramı

Elektroanalitik yöntemler kimyanın pek çok alanında kullanılmaktadır. Bu kullanım alanları aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

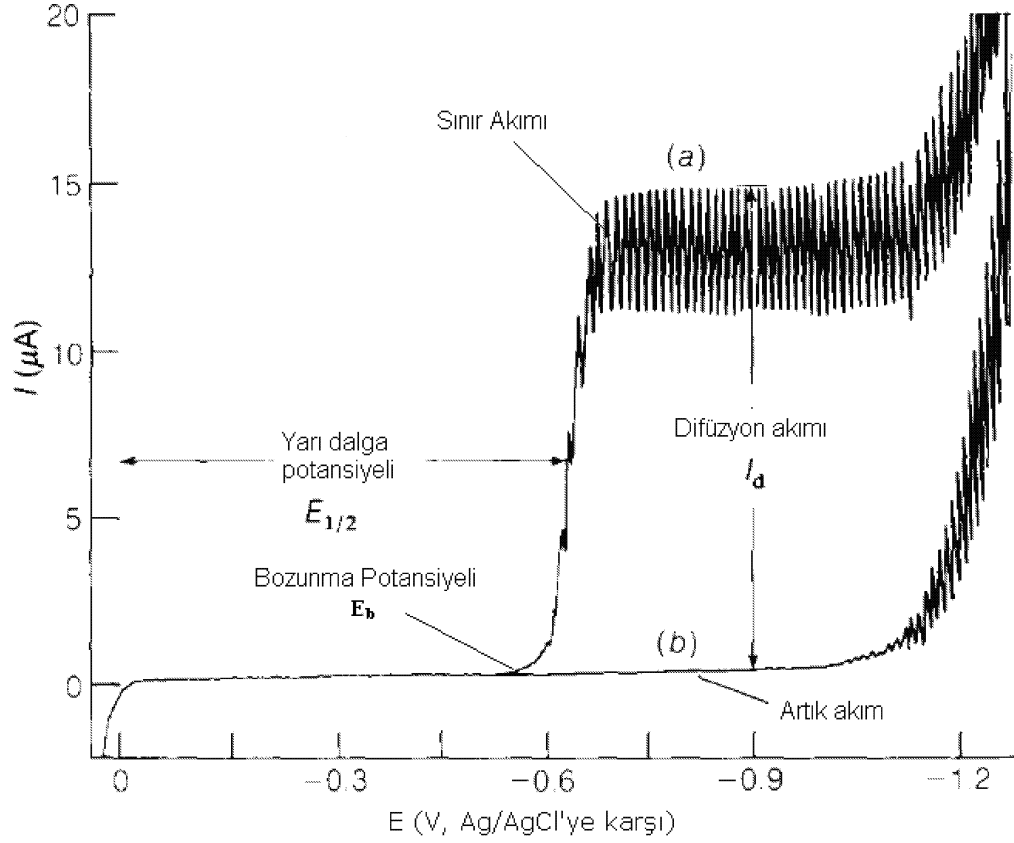
- Nicel analizler
- Nitel analizler

- Elektrot tepkimelerinin mekanizmalarının belirlenmesi
- Elektrokimyasal ve kimyasal tepkimelerin kinetiklerinin incelenmesi
- Adsorpsiyon olaylarının incelenmesi
- Standard indirgenme potansiyellerinin belirlenmesi
- Denge sabitlerinin bulunması
- Difüzyon katsayısının bulunması

2.4.1. Polarografi

Polarografi, 1927 yılında Çek bilim adamı J. Heyrovsky tarafından geliştirilmiş ilk voltametrik yöntemdir. Bundan 40 yıl öncesine kadar doğru akım polarografisi (DC, normal polarografi) ile sınırlı kalan bu yöntem, son gelişmelerle çok başvurulan duyarlı ve güvenilir bir duruma gelmiştir. Önemli bir eser analiz yöntemi olan polarografi ile periyodik cetvelde yer alan elementlerin büyük bir kısmı ile indirgenebilen veya yükseltgenebilen fonksiyonel gruba sahip elektroaktif olan organik moleküllerin doğrudan analizi yapılabilmektedir. Elektroaktif olmayan organik moleküller ise kompleks oluşturma, nitrolama, nitrozolama, N veya S oksitleme, kondenzasyon ve katılma tepkimeleri ile dolaylı yolla polarografi ile analiz edilebilirler (43).

Polarografide çalışma elektrodu olarak damlayan cıva elektrodu (DCE) kullanılır (44). Bu elektrot 0.05 - 0.08 mm iç çaplı bir kılcal cam borudur. Bu kılcalın ucu 1 - 50 mL kadar çözelti bulundurulmuş bir hücreye daldırılır. DCE'nin potansiyeli, bir referans elektrota karşı değiştirilir. Referans elektrot genellikle Ag /AgCl veya doymuş kalomel elektrottur (DKE). DCE ile referans elektrot arasına bir potansiyometre yardımıyla potansiyel uygulanır. Akım, çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında akar. Karşıt elektrot olarak genellikle platin tel kullanılır. Hücreden geçen akım bir galvanometre ile ölçülür. Ölçülen akımın uygulanan potansiyele karşı grafiği polarogram adını alır. Doğru akım polarografisinde gözlenen akım-potansiyel eğrisi Şekil 2.4'de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.4. Doğru akım polarogramları (a) Elektroaktif maddenin polarogramı (b) Destek elektrolit polarogramı

Polarografide akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgemediğinden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir. Katodik akımın işareti pozitif, anodik akımın işareti ise negatif olarak kabul edilmiştir. Şekil 2.4.a'da verilen polarogramdan görüldüğü gibi yükseltgenmenin veya indirgenmenin başladığı potansiyele *bozunma potansiyeli* (E_b) denir. Bozunma potansiyelinden sonra çok az bir potansiyel değişmesine karşılık oluşan akımda hızlı bir artış gözlenir. Belli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı bir plato bölgesine ulaşılmaktadır. Bu akıma *sınır akım* denir. Elektrot üzerinde henüz tepkime olmadığı zaman küçük de olsa bir akım gözlenir. Bu akıma *artık akım* denir. Bu akımın iki nedeni vardır:

1. Çözelti içinde analiz edilecek maddeden daha elektroaktif safsızlıkların indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan faradaik akım,

2. Elektrot yüzeyine adsorbe olan maddenin elektrot-elektrolit ara yüzeyindeki (cıva damlasının yüklenmesi) elektriksel çift tabakanın kapasitansına etki etmesi sonucu oluşan kapasitif akımdır.

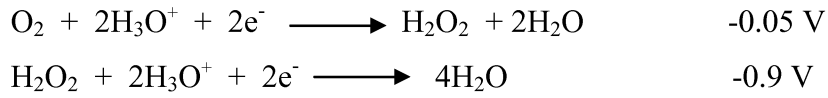
Sınır akım ile artık akım arasındaki akım farkı dalga yüksekliğidir. Bu dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin derişimi ile doğrusal olarak artar. Polarografide akımın artmaya başladığı ilk potansiyel bozunma potansiyelidir. İndirgenme bozunma potansiyelinden sonra başlar. İlk önce elektrot yüzeyindeki maddeler indirgenir ve akım artmaya başlar. Çözeltideki maddeler derişimin “0” olduğu elektrot yüzeyine difüzyonla gelmeye başlar, indirgenir ve akım artar. Elektrot tepkimesinin hızı çözeltideki maddenin difüzyon hızına eşit oluncaya kadar akım artar. Belli bir potansiyelden sonra elektrot tepkimesinin hızını maddenin difüzyon hızı sınırlar. Buna difüzyon sınır akımı denir. Bu özelliği nedeniyle polarografi nicel analizlerde kullanılabilmektedir (45). Akımın sınır akımı değerinin yarısına eşit olduğu potansiyel *yarı dalga potansiyelidir*. Yarı dalga potansiyeli $E_{1/2}$ ile gösterilmektedir. $E_{1/2}$ değeri genellikle elektroaktif maddenin derişimine bağlı değildir ve standart yarı hücre potansiyeli ile yakından ilişkilidir. Yarı dalga potansiyelinin her madde için karakteristik olması özelliğinden dolayı polarografi nitel analizlerde kullanılabilmektedir (46).

Cıva mikroelektrotları polarografi ve voltametriye birkaç nedenden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenlerden biri, cıvanın hidrojen iyonunun indirgenmesine gösterdiği aşırı gerilimin büyük olmasından dolayı oldukça negatif potansiyellerde çalışılabilmesidir. Bir başka nedeni, her damla ile yeni bir elektrot yüzeyi oluşturulmasıdır. Böylece elektrodun davranışı daha önceki durumdan bağımsızdır. Ayrıca oda sıcaklığında sıvı olduğundan homojen yüzeye sahiptir ve yüzey alanı kolayca hesaplanabilir.

Damlayan cıva elektrodun en büyük eksikliği, cıvanın kolayca yükseltgenmesidir. Yaklaşık + 0.4 V’tan daha büyük potansiyellerde, cıva (I) oluşumu, diğer yükseltgenebilir türlerin dalgalarını kapatan büyük bir dalga verir. Cıva (I) ile kompleks veya çökelek oluşturan iyonlar varsa, bu dalga daha düşük potansiyellerde görülebilir. Damlayan cıva elektrodun başka bir önemli sakıncası,

klasik DC polarografisi yönteminin duyarlılığını yaklaşık 10^{-5} M'a sınırlayan faradayik olmayan artık akımın veya yükleme akımının oluşmasıdır. Daha düşük derişimlerde artık akım, difüzyon akımını aşabilir ki bu da difüzyon akımının doğru ölçümünü engeller.

Polarografik deneyler oksijensiz ortamlarda gerçekleştirilmelidir. Çünkü bütün çözücülerde oksijen az veya çok çözünür. 25 °C'de suda çözünmüş oksijenin derişimi 10^{-3} M'dır. Çözünmüş oksijen molekülü DCE üzerinde indirgenir. Bu indirgenme iki basamaklıdır. Birincisi -0.05 V'da oksijenin peroksida indirgenmesi, ikincisi ise -0.9 V'da gözlenen peroksidin suya indirgenme tepkimesidir. Bu potansiyeller ortamın pH'sı ile değişir. Asidik ortam için bu tepkimeler aşağıdaki gibidir.



Bu tepkimelerin oluşumu ile polarografide 0.0 ve -1.0 V arası gibi bir çok indirgenme tepkimesinin gözleendiği bölge kapatılmış olur. Bunu önlemek için deney öncesinde çözeltiden azot veya argon gibi bir inert gaz geçirilerek çözünmüş oksijen ortamdan uzaklaştırılır.

Tersinir elektrot tepkimelerinde polarogramın yükselen kısmında akım-potansiyel ilişkisi için kullanılan eşitlik Nernst eşitliğidir.

$$E = E_{1/2} - (RT / nF) \cdot \ln [(i - i_{\text{da}}) / (i_{\text{dk}} - i)] \quad (2.1)$$

E = Uygulanan potansiyel (volt)

$E_{1/2}$ = Yarı dalga potansiyeli (volt)

R = Gaz sabiti ($8.315 \text{ joule mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

T = Mutlak sıcaklık (°K)

n = Aktarılan elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96485 coulomb)

i = Uygulanan potansiyeldeki akım (μA)

i_{da} = Anodik sınır akımı (μA)

i_{dk} = Katodik sınır akımı (μA)

Bir maddenin elektroda göçü üç şekilde olabilir (47, 48).

1. *Konveksiyon (mekanik karıştırma) ve ısısal karıştırma*: Karıştırma veya elektrodun yüzeyinden geçen çözeltinin akışı sonucunda mekanik hareketi kapsamaktadır. Çözeltinin sabit hız ve sıcaklıkta homojen olarak karıştırılmasıdır.

2. *Elektrostatik çekim (iyonik göç)*: Uygulanan potansiyelin elektrotları yüklemesi sonucu, elektrotların çözeltideki iyonları elektrostatik kuvvet uygulayarak çekmesi veya itmesidir.

3. *Difüzyon*: Maddenin derişik olduğu bölgeden (ana çözeltiden), seyreltik olduğu bölgeye (elektrot yüzeyine) hareketidir.

Analiz durgun bir ortamda yapılırsa konveksiyon, sabit sıcaklıkta yapılırsa ısısal karışım önlenabilir. İyonik göçü önlemek için ise elektroaktif maddenin aktarım sayısını azaltmak gerekir. Çözeltiye incelenecek madde derişiminin en az yüz katı fazla ve eşdeğer iletkenliğı yüksek olan bir tuz çözeltisi eklenirse, elektroaktif maddenin aktarım sayısı sıfıra yaklaşır. Eklenen bu tuz çözeltisine *destek elektrolit* adı verilir. Bunlar tuz, asit veya bazların uygun çözeltileri olabilir. Destek elektrolit eklenmesinin bir diğeryararı da çözeltinin direncini düşürerek IR potansiyelini azaltmaktır.

Polarografide konveksiyon ve iyonik göç yok edilerek veya etkileri en aza indirilerek maddenin elektrotta difüzyonla ulaşması sağlanır.

Faradaik ve Kapasitif (Yük) Akımlar

Elektroliz, elektrot yüzeyindeki tepkimeleri içerir. Her bir tepkimenin hızı ve dolayısıyla akım, kısmen elektron taşıma tepkimeleri, kısmen de çözeltinin elektrot yüzeyine taşıma hızı ile kontrol edilir. Elektron taşıma hızının, kütle taşıma hızından çok az olduğu durumlarda çözelti homojen bir görünümde olup ana çözelti ile elektrot yüzeyindeki elektroaktif madde derişimi aynıdır. Elektron aktarım hızı, elektroaktif maddenin tipine, derişimine, elektrotun tipine ve potansiyeline bağlıdır. Analizi istenilen elektroaktif maddenin elektrot-elektrolit ara yüzeyinde, taşınan elektron tarafından oluşturulan akıma “faradaik akım” denir.

Elektrot yüzeyinde net bir faradaik akımın yanı sıra, faradaik olmayan akımlar da bulunmaktadır. Elektrot yüzeyine adsorbe olan maddenin elektrot-elektrolit ara yüzeyindeki elektriksel çift tabakanın kapasitansına etki etmesi sonucu

oluşan akıma “kapasitif akım” denir. Kapasitif akım, elektrot potansiyeli veya elektrotun büyüklüğünün değişmesi sonucu oluşur. Bir damla süresince potansiyelde görülen değişim çok az olduğu için polarografide görülen kapasitif akımın nedeni elektrot yüzey alanındaki değişimdir.

$$i_c = 0.00569 \kappa (\phi - E) m^{2/3} t^{-1/3} \quad (2.2)$$

i_c = Kapasitif akım

κ = Çift tabakanın birim yüzey için kapasitansı (sığası)

ϕ = Sıfır yük potansiyeli (sıfır yük noktası)

E = Elektrot potansiyeli

m = Cıvanın akış hızı (mg/s)

t = Damlama süresi (damla/s)

Elektroanalitik yöntemlerde, analizin duyarlılığını sınırlayan kapasitif akım etkisinin en aza indirilmesi gerekir.

Polarografik Akımlar (48)

Sınır akımının oluşmasına neden olan olaylara göre polarografik akımlar difüzyon, adsorpsiyon, kinetik ve katalitik kontrollü sınır akımı olmak üzere çeşitlere ayrılır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Sınır akımı çeşitleri ve farklı parametreler ile değişimi

Akım (i)	Cıva sütun yüksekliği (h)	Derişim (C)	Tampon bileşimi	pH	Sıcaklık katsayısı (1/i)(d _i /d _t)
Difüzyon (i _d)	$k \cdot h^{1/2}$	$k \cdot C$	Bağımsız	Bağımsız	% 1.6
Kinetik (i _k)	$k \cdot h^0$	$k \cdot C$	Bağımlı	Bağımlı	% 5-20
Adsorpsiyon (i _a)	$k \cdot h^1$	Sınırlı	Bağımsız	Bağımsız	Değişken
Katalitik (i _{kata})	Değişken	Sınırlı	Bağımlı	Bağımlı	-

k = sabit bir terim, h = cıva sütunun yüksekliği, i = akım, d_i/d_t = akımın sıcaklıkla değişimi

Difüzyon Kontrollü Sınır Akımı :

Elektroliz, karıştırılmayan durgun ortamda ve destek elektrolit eklenerek yapılırsa, konveksiyon ve iyonik göç önleneyeceğinden akım yalnız difüzyonla gelen madde miktarına bağlı olur. DCE'ye uygulanan potansiyel, polarogramın sınır akımı bölgesinde ise ve elektron aktarım hızı elektrot yüzeyine gelen elektroaktif maddeyi hemen indirgeyecek veya yükseltgeyecek kadar büyük ise, akım elektrot yüzeyine difüzyonla gelen madde miktarı ile belirlenir. Bu durumda akım difüzyon kontrollüdür denir. Sınır akımı bölgesinde potansiyel uygulanır uygulanmaz elektrot yüzeyindeki iyon veya moleküller hemen elektrolizleneceğinden elektrot yüzeyine çok yakın bir bölgede elektroaktif madde derişimi sıfır olacaktır. Ana çözelti elektrot yüzeyindeki bu derişim farkı ile madde elektrot yüzeyine doğru difüzlenecektir.

Maddeler daha derişik oldukları bölgeden daha seyreltik oldukları bölgeye Fick kanunları ile difüzlenirler. Fick'in 1. kanuna göre birim yüzeye difüzlenen madde miktarı aşağıdaki diferansiyel eşitlikle ifade edilir.

$$Q(x,t) = D [\partial C(x,t) / \partial x] \quad (2.3)$$

x = Elektrot yüzeyinden olan uzaklık

t = zaman

ve Fick'in 2. kanunu ise:

$$\partial C(x,t) / \partial t = D [\partial^2 C(x,t) / \partial x^2] \quad (2.4)$$

şeklindedir. Elektrot yüzeyinde oluşan akım, birim yüzeye gelen madde miktarı ile orantılıdır. Akım aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir:

$$i = nFA q(0,t) \quad (2.5)$$

$q(0,t)$, elektrotun birim yüzeyine t anında gelen madde miktarıdır. Fick kanunları olarak ifade edilen diferansiyel denklemlerin genişleyen küresel elektrot için çözülüp q değerinin Eşitlik 2.5'de yerine konmasıyla aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$i = 0.732 n F (C - C_{(x=0)}) D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} \quad (2.6)$$

Bu eşitlikteki terimlerin açıklamaları aşağıdaki gibidir.

i = Damla ömrü sonundaki akım (A)

n = Aktarılan elektron sayısı

F = Faraday sabiti

C = Ana çözeltideki elektroaktif madde derişimi (mol/cm^3)

$C_{(x=0)}$ = Elektrot yüzeyindeki elektroaktif madde derişimi (mol/cm^3)

D = Difüzyon katsayısı (cm^2/s)

m = Cıvanın akış hızı (g/s)

t = damla ömrü (s)

Sınır akımı bölgesinde elektron transfer tepkimesi çok hızlı olacağından $C_{(x=0)} = 0$ 'dır. Bu değer Eşitlik 2.6'de yerine konursa aşağıdaki eşitlik elde edilir. Eşitlik 2.7, polarogramın her bölgesinde geçerlidir.

$$i_d = 0.732 n F C D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} \quad (2.7)$$

Eşitlik 2.7, İlkoviç eşitliği olarak bilinir. Bu eşitlikteki akım (i_d) damla ömrünün sonundaki difüzyon kontrollü sınır akımdır. Damla ömrü (t) sabit bir değere sahiptir. Damlanın oluşmaya başlama ve kopma zamanı arasında akım artar. Bu artış $t^{1/6}$ ile orantılıdır. Ortalama akım damla ömrü sonundaki maksimum akımın 6/7'si kadardır. İlkoviç eşitliği ortalama akım için yazılırsa katsayı 0.627 olarak değişir.

$$i_d = 0.627 n F C D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} \quad (2.8)$$

Bir polarografik deneyde cıva sütun yüksekliği (h) sabit tutulursa cıvanın akış hızı (m) ve damla ömrü (t) de sabit kalır. Deney sabit sıcaklıkta yapılırsa difüzyon katsayısı da sabit olacağından İlkoviç eşitliği aşağıdaki gibi yazılabilir.

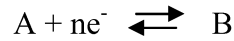
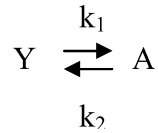
$$i_d = k C \quad (2.9)$$

Bu eşitlikte C ana çözelti derişimi olduğu için polarografi nicel analizlerde kullanılabilmektedir. Yukarıda verilen Eşitlik 2.9, koordinat sisteminin sıfır noktasından geçen bir doğru denklemidir.

Polarografide kullanılan DCE çok küçük yüzeyli bir elektrottur. Bu tür elektrotlara mikroelettrot adı verilir. Mikroelettrot üzerinde çok az miktarda madde elektrokimyasal değışikliğe uğradığı için aynı çözelti ile deney istenildiğı kadar tekrarlanabilir.

Kinetik Kontrollü Sınır Akımı:

Elektron aktarım basamağından önce kimyasal tepkime söz konusu ise ve elektroaktif A maddesi, elektroinaktif Y maddesinden oluşuyorsa aşağıdaki dengeler söz konusudur.

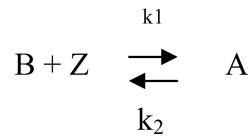
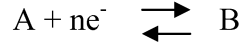


Eğer indirgenen madde (A) derişimi Y ile sınırlı ise, oluşan akım da Y derişimi ile sınırlıdır ve akım kinetik kontrollüdür. Bu durumda difüzyon ne kadar hızlı olursa olsun elektrot yüzeyindeki A derişimi, Y'nin derişimi ve k_1 (veya K denge sabiti) ile kontrol edilir.

Bu akım Y derişimi ile doğrusal olarak değışir ve k_1 ile k_2 'ye bağı olduğu için sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi faktörlerden çok etkilenir.

Katalitik Kontrollü Akım:

Bazı durumlarda elektrokimyasal değişikliğe uğrayan B maddesi ortamdaki elektroaktif Z ile tepkimeye girerek yeniden A maddesini oluşturabilir. Katalitik mekanizma adı verilen bu mekanizma aşağıdaki gibi yazılabilir.



B ürünü Z ile tepkimeye girip A'yı yeniden oluşturur. Elektroaktif A maddesi tekrar indirgeneceği için difüzyon kontrollü akımdan çok daha büyük akım gözlenecektir.

Katalitik akım ortam şartlarından çok etkilenir. Çünkü Z' nin katalitik etkisi ile k hız sabitleri ortam şartlarından çok etkilenen iki parametredir.

Normal olarak tersinmez olan ve oldukça negatif potansiyellerde gözlenen hidrojen iyonunun indirgenme dalgası bazı maddelerin katalitik etkisi ile pozitif potansiyellere kaydırılır. Katalitik hidrojen dalgası adı verilen bu dalganın akımı, katalitik akım ile aynı özellikleri gösterir. Örneğin piridin molekülleri H^+ ile birleşerek piridinyum iyonuna dönüşür. Piridinyum iyonundaki proton, serbest protondan daha kolay indirgenir ve katalitik hidrojen dalgasına yol açar. Elektrotta meydana gelen tepkime her ne kadar piridinyum iyonunun indirgenmesi gibi görünüyorsa da aslında H^+ iyonunun indirgenmesidir. Piridin sadece katalizör etkisi göstermektedir. Bu nedenle oluşan dalgaya katalitik hidrojen dalgası adı verilmiştir. Akımın büyüklüğü piridin derişimine bağlıdır.

Adsorpsiyon Akımı:

Çözeltide bulunan maddeler elektrot yüzeyine adsorbe olunca hem kapasitif akım, hem de faradaik akım etkilenir. Faradaik akımının etkilenmesi iki farklı şekilde olabilir (48).

a) Elektroaktif madde veya ürün adsorbe olabilir. Böyle bir durumda normal dalganın yanında ikinci bir dalga gözlenir. Adsorpsiyon dalgası adı verilen bu dalga reaktif ve ürünün adsorplanmasına bağlı olarak normal dalgadan sırasıyla daha negatif veya daha pozitif potansiyelde gözlenebilir. Ayrıca sınır akımı bölgesinde maksimum, minimum ve başka düzensizliklere yol açabilir.

b) Çözeltilerde reaktif ve ürünün dışında bir maddenin adsorplanması halinde dalgada kayma, bölünme ve deformasyon gibi düzensizlikler meydana gelebilir.

Adsorpsiyon akımı madde derişiminden bağımsızdır. Düşük derişimlerde elektrot yüzeyini kaplayacak kadar madde olmadığından akım difüzyon kontrollüdür. Belli bir derişimden sonra iki dalga gözlenir. Adsorpsiyon kontrollü akımlarda sıcaklık arttıkça akım azalır.

Puls Polarografisi (48)

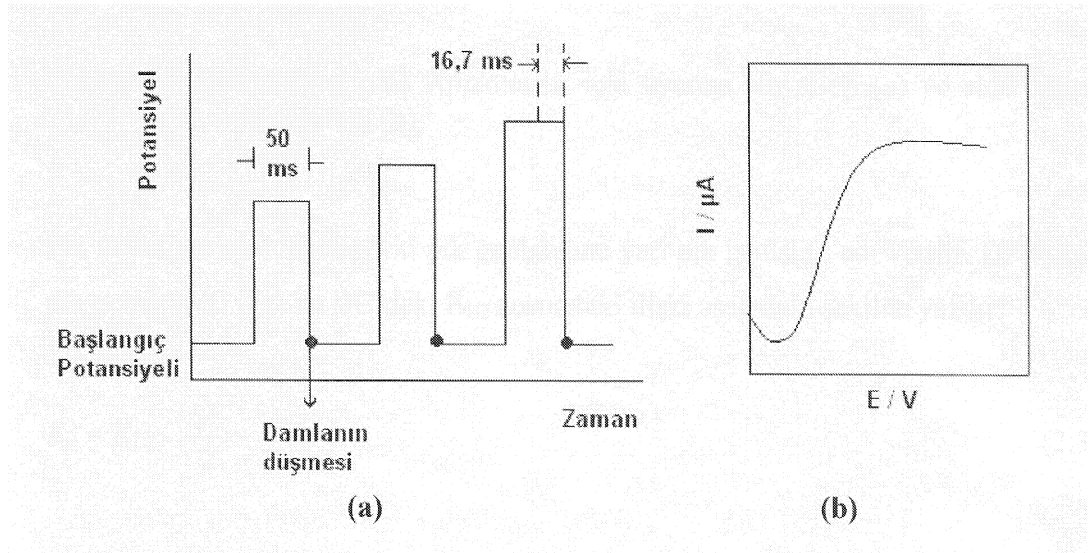
Normal polarografide, düşük derişimlerde elektrottaki elektriksel çift tabakanın yüklenmesinden oluşan kapasitif akım, faradaik akıma göre oldukça büyük olduğundan, yapılan analizlerden tayin sınırı düşüktür. Kapasitif akımın katkısı azaltılıp, daha küçük değerdeki faradaik akımlar ölçülebilirse yöntemin duyarlılığı artar. Bu yüzden puls teknikleri geliştirilmiştir.

Puls polarografisi yöntemleri Barker tarafından geliştirilmiştir. Doğru akım (DC) polarografisinde hücreye sabit bir potansiyel uygulayıp oluşan akım ölçülürken puls polarografisinde potansiyel periyodik olarak kısa zaman aralıklarında uygulanmaktadır.

Normal Puls Polarografisi

Normal puls tekniğinde zamanla genliği artan pulslar verir. Uygulanan potansiyel pulsları yaklaşık 40 – 60 ms süreyle sınırlıdır, fakat pulslar arasındaki potansiyel daima başlangıç değerine döner (Şekil 2.5.a). Damlayan civa elektrodunda elektrot yüzeyi damlama süresinde değişmesine rağmen, pulslar daima damla sonunda uygulandığında sabit elektrot yüzeyi korunmuş olur. Akım ölçümü her puls süresinin sonuna doğru (16.7 ms gibi) yapıldığından kapasitif akımın etkisi minimumdur.

Burada elde edilen polarogram normal puls tekniğinde elde edilenler gibi dalga şeklindedir (Şekil 2.5.b).



Şekil 2.5. Normal puls polarografisi için a) uyarma sinyalleri
b) elde edilen polarogram

NPP’de sınır akımı Cottrell eşitliği ile verilir.

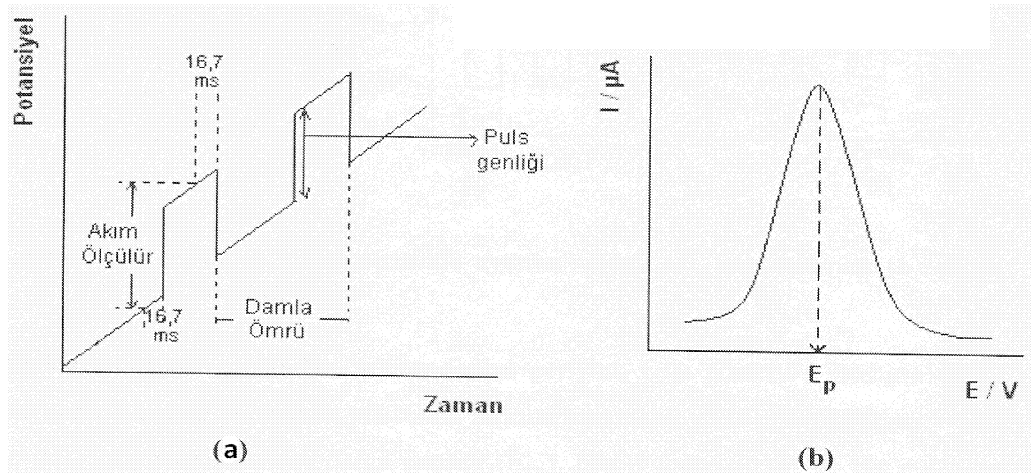
$$i_l = n F C A \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \quad (2.10)$$

Cottrell eşitliği DC polarografisindeki İlkoviç eşitliğinin karşılığıdır. Hem tersinir, hem de tersinmez sistemler için geçerlidir. Tersinmez bir sistem için normal puls polarografisinde akım – potansiyel eğrisi Heyrovski – İlkoviç eşitliği gibidir.

$$E = E_{1/2} + \frac{2.303 RT}{nF} \log \left\{ \frac{(i_l - i)}{i} \right\} \quad (2.11)$$

Diferansiyel Puls Polarografisi

DPP’de normal polarografideki artan DC voltajına, damla ömrü sonlarına doğru sabit genlikli pulslar bindirilir. Akım, puls uygulamasından önce ve puls uygulamasının sonuna doğru ölçülür. Akımlar arasındaki fark potansiyele karşı grafiğe geçirilir ve pik şeklinde bir polarogram elde edilir. Pik potansiyeli elde edilen pikin tepe noktasındaki potansiyeldir ve E_p şeklinde gösterilir. Diferansiyel puls polarografisinde uygulanan potansiyel ve elde edilen pik Şekil 2.6’da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Diferansiyel puls polarografisi için a) uyarma sinyalleri b) elde edilen polarogram

DPP’ de akım – potansiyel ilişkisi için,

$$(\Delta I)_{\max} = \frac{n^2 F^2}{RT} A C (\Delta E) \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \frac{p}{(1+p)^2} \quad (2.12)$$

eşitliği türetilmiştir. Bu eşitlikte ΔI , diferansiyel puls akımı; ΔE ise puls genliğidir.

Pik akımının yarı değerindeki pik genişliği yarı pik genişliği olarak bilinir. DPP’de yarı pik genişliği ($W_{1/2}$), $3.52 R T / n F$ ’tir ve 25°C ’de $90.4 / n \text{ mV}$ ’a eşittir. DPP’deki E_p ile $E_{1/2}$ arasındaki ilişki,

$$E_p = E_{1/2} - (\Delta E / 2) \quad (2.13)$$

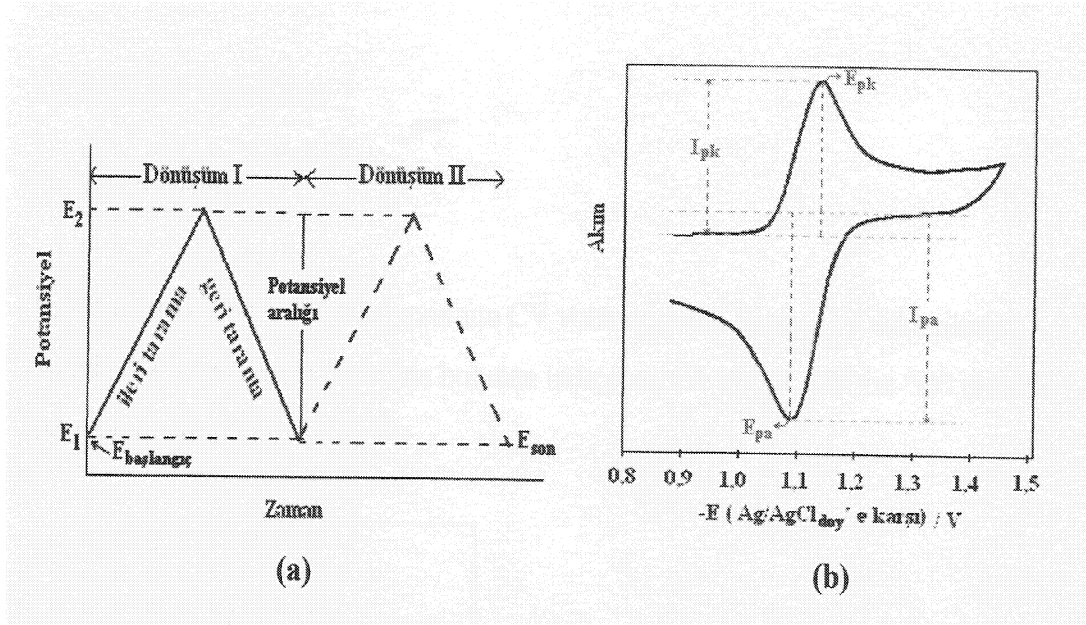
şeklidedir. Bir indirgenme için puls genliği artıkça pik potansiyeli pozitif değerlere kayar. Çünkü indirgenme için ΔE negatiftir.

DPP’de pik akımının derişimle doğrusal olarak değıştiğı bilinmektedir. DC polarografideki elektrot olayını etkileyen katalitik ve diğerk etkiler difüzyon sınır akımını ne şekilde etkilerse normal ve diferansiyel puls polarografisindeki sınır ve pik akımlarını da aynı şekilde etkiler.

2.4.2. Dönüşümlü Voltametri ve Doğrusal Taramalı Voltametri (49)

Dönüşümlü voltametri, çözeltide ve çözelti eletrot ara yüzeyinde elektroaktif türlerin incelenmesi açısından en uygun elektroanalitik tekniklerden birisidir. Bu teknikte sabit bir elektroda çok hızlı potansiyel taramaları uygulanır. Normal polarografide, potansiyel tarama hızı (v), damla ömrüne göre çok yavaştır. Örneğın 5 mV/s tarama hızında damla süresi 1 s ise bir damla ömrü esnasında potansiyeldeki değışme 5 mV kadardır. Tarama hızı bir damla ömrü için 100-200 mV/s civarında tutulursa ve belli bir potansiyelden sonra ilk tarama yönünde tarama yapılırsa bu voltametrik yöntem *dönüşümlü voltametri (CV)* adını alır.

CV’de uygulanan potansiyelin zamanla değışim grafiğı Şekil 2.7’de gösterilmiştir. Potansiyel taraması E_1 ve E_2 arasında yapılırsa yöntem *doğrusal taramalı voltametri (LSV)* adını alır. Eğer E_2 potansiyeline ulaşıldıktan sonra aynı tarama yönüne göre ters yönden tarama yapılırsa yöntemin adı dönüşümlü voltametridir.



Şekil 2.7. Dönüşümlü voltametri de a) uyarma sinyali b) elde edilen voltamogram

E_1 = indirgenmenin olmadığı potansiyel, E_2 = akımın difüzyon

kontrollü olduğu potansiyel, E_{pk} = katodik akım potansiyeli,

E_{pa} = anodik akım potansiyeli, I_{pk} = katodik akım, I_{pa} = anodik akım

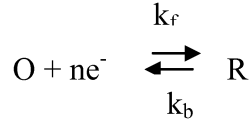
CV’de akım, potansiyele karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğriye dönüşümlü voltamogram denir.

Tarama hızı pratikte mV/s’den birkaç yüz V/s’ye kadar değiştirilebilir. Çok yüksek tarama hızlarında (birkaç bin V/s) çift tabaka yüklenmesi ve IR düşmesi problemleri ortaya çıkar. Ancak mikroelettrot kullanıldığı zaman bu tür problemler en aza iner.

CV’de tarama hızları değiştirilerek pik akımlarının tarama hızı ile değişmesinden akımın karakteri (adsorpsiyon, difüzyon) ve elektron aktarım tepkimesinden önce veya sonra kimyasal tepkimelerin olup olmadığı belirlenebilir. Ayrıca ileri ve geri tarama piklerinden tepkimenin mekanizması hakkında fikir edinebildiği gibi ileri taramadan kinetik veriler de bulunabilir. CV verileri ile bir elektrot tepkimesinin tersinirlik testi yapılabilir.

Tersinir tepkimeler : (49)

Elektrot tepkimesinin;



şeklinde tersinir indirgenme tepkimesi olduğu ve başlangıçta çözeltide yalnız O maddesinin bulunduğunu kabul edelim. Potansiyel tarama hızı çok yavaş ise $\dot{I} - E$ grafiği belli bir potansiyelden sonra sınır akımına ulaşır ve akım potansiyelden bağımsız hale gelir. Potansiyel tarama hızı artırılınca $\dot{I} - E$ grafiği pik şeklinde gözlenir ve tarama hızı arttıkça da pik yüksekliği artar.

Kararlı hal durumunda tarama hızı yavaş ise herhangi bir potansiyelde elektrot yüzeyinden belli uzaklıktaki reaktif derişimi sabittir. Diğer taraftan Nernst Difüzyon Tabakası adı verilen elektrot yüzeyine çok yakın bir tabakada derişim gradienti doğrusaldır. Bu tabakada, tersinir bir reaksiyon için $[\text{O}] / [\text{R}]$ oranı Nernst eşitliği ile potansiyele bağlıdır. Potansiyel negatifleştikçe reaktifin elektrot yüzeyindeki derişimi ($[\text{O}]$) azalır, yani derişim gradienti artar ve buna bağlı olarak akım da artar. Bu durum aşağıdaki eşitlikten kolayca görülebilir.

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{R}]}{[\text{O}]} \quad (2.14)$$

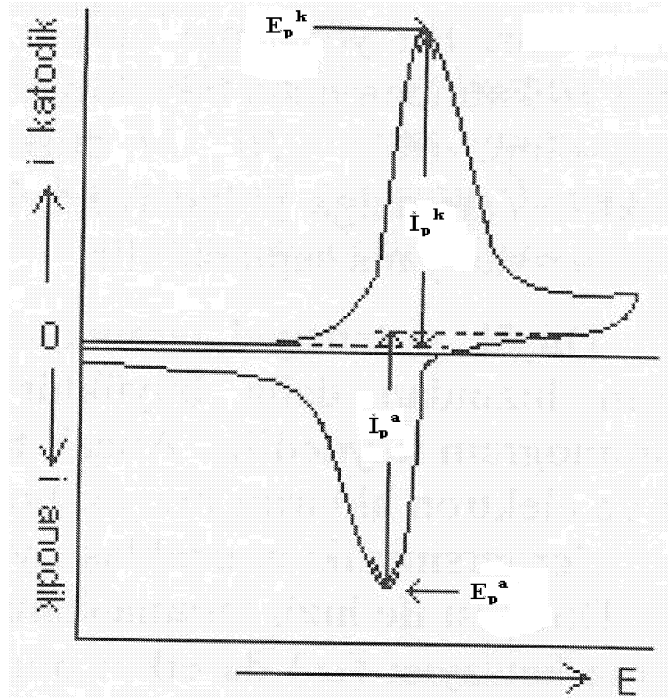
Son durumda reaktifin elektrot yüzeyindeki derişimi sıfır olur. Bu potansiyelden sonra artık derişim gradienti değişmez ve buna bağlı olarak akım sabitleşir. Tarama hızı yüksek ise difüzyon hızı denge durumuna ulaşacak kadar yüksek değildir. Dolayısıyla derişim profili doğrusal olmaz ve E ile $[\text{O}] / [\text{R}]$ ilişkisi Nernst eşitliği ile ifade edilemez. O'nun indirgenebileceği potansiyele ulaşıldığı zaman yüzey derişimi çözelti derişimine eşittir. O'nun indirgenmeye başladığı potansiyelde elektrot yüzeyi ile ana çözeltideki O derişimi arasında bir fark oluşacaktır. Bu fark sebebiyle elektrot yüzeyi ile ana çözelti arasında derişim gradienti meydana gelecektir. Bu gradient etkisi ile elektroaktif madde elektrot yüzeyine doğru difüzlenecek ve bunun sonucunda akım oluşacaktır. Potansiyel negatifleştikçe elektrot yüzeyindeki O derişimi çözeltideki değerine göre daha da

azalacaktır. Nihayet belli bir potansiyelde O'nun elektrot yüzeyindeki derişimi sıfır olacaktır.

Hızlı taramada herhangi bir potansiyeldeki yüzey derişim gradienti kararlı hal gradientinden daha büyüktür ve bu nedenle akım daha fazladır.

Elektrot yüzeyindeki O derişimi sıfır olunca derişim gradienti azalacak ve akım da buna bağılı olarak azalacaktır. Bu etkilerin toplamında $i - E$ grafiğı pik şeklinde olacaktır. Pikin yüksekliğı de tarama hızındaki artış ile artacaktır.

Potansiyel taraması geriye doğru yapıldığı zaman tarama hızlı ise elektrot yüzeyinde yeteri kadar R bulunacağından E^0 değerinden itibaren daha pozitif potansiyellerde R yükseltgenmeye başlayacaktır. Bu nedenle ters taramada akım oluşacaktır. Ters tarama esnasında E^0 değerine kadar O indirgenmeye yani R oluşmaya devam edecektir. Ters taramada potansiyel pozitifleştikçe Nernst eşitliğine göre R yüzey derişimi azalacak ve yeteri kadar pozitif değerlerde sıfıra gidecektir. İleri taramadaki düşünce şekli ile geri taramada da bir pik elde edileceğı kolayca anlaşılabilir. Ancak deney esnasında yüzeyde oluşan R, çözeltiye doğru difüzleneceğinden ters pik akımı (anodik akım) katodik akımdan biraz daha düşük oluşacaktır. Tersinir bir $O + ne^- \leftrightarrow R$ tepkimesinin dönüşümlü voltamogramı Şekil 2.8'deki gibidir.



Şekil 2.8. Tersinir bir sisteme ait CV voltamogramı

E_p^k = katodik akım potansiyeli, E_p^a = anodik akım potansiyeli, I_p^k = katodik akım, I_p^a = anodik akım

CV’ de pik akımının değeri (I_p) için sınır durumları ve tarama hızı göz önüne alınarak ve $D_0 = D_R = D$ kabul edilerek Fick’in ikinci kanunundan matematiksel olarak aşağıdaki eşitlik türetilir.

$$I_p = 0.4463 nF \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} C_0^\infty D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.15)$$

Bu eşitlik Randles – Sevcik eşitliği olarak bilinir. 25°C de Randles – Sevcik eşitliği aşağıdaki şekle dönüşür.

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.16)$$

Bu eşitlikte terimlerin anlamları aşağıdaki gibidir:

I_p	: Akım, A / cm ²
A	: Elektrot alanı, cm ²
D	: Difüzyon katsayısı, cm ² / s
v	: Tarama hızı, V / s
C_0	: O türünün ana çözelti derişimi, mol / cm ³

Görüldüğü gibi pik akımı elektroaktif maddenin derişimiyle ve tarama hızının kareköküyle doğru orantılıdır. Kullanılan elektrodun ultramikro disk elektrot olması durumunda sınır akım aşğıdaki gibidir.

$$\dot{I}_{ss} = 4 r n F C_0 D_0 \quad (2.17)$$

burada r , ultramikro elektrodun yarıçapıdır.

CV verileri ile bir reaksiyonun tersinirlik testi yapılabilir. Eğer $\dot{I}_p \propto v^{1/2}$ grafiğı doğrusal ise ve orjinden geçerse sistem tersinirdir. Buna ilaveten bir sistemin tersinir olması için diğr bazı özelliklerin de bulunması gerekir. Bu özelliklerin test edildiğı kriterler şunlardır.

1. $\Delta E_p = E_p^a - E_p^k = 59/n \text{ mV}$
2. $|E_p - E_{p/2}| = 59/n \text{ mV}$
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.

Bir sistemin tersinir olması için yukarıdaki kriterlerin hepsinin geçerli olması gereklidir. Bir veya birkaçı geçerli değilse tersinir değildir. $\dot{I}_p$ ve E_p 'nin v ile ilişkisi yeteri kadar geniş bir tarama hızı aralığında test edilmelidir. Yukarıdaki kriterlerden biri veya birkaçı geçerli değilse elektrot reaksiyonu ya tersinmez ya da kabul edilenden daha kompleks bir mekanizmaya sahiptir.

Tersinmez Tepkimeler : (49)

Tersinir sistemlerde bütün potansiyellerde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyüktür ve Nernst eşitliğı elektrot yüzeyinde geçerlidir.

Tersinmez sistemlerde ise elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından Nernst eşitliğı geçerli değildir. Bu durumda dönüşümlü voltamogramının şekli tersinir durumdan farklıdır. Tersinmez durumlarda potansiyel tarama hızı çok düşük ise elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından daha yüksektir ve sistem tersinir gibi gözlenir. Tarama hızı arttıkça kütle aktarım hızı artar ve elektron aktarım hızı ile aynı seviyeye gelir. Bu durum tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması ile kendini belli eder.

Fick'in ikinci kanunu sınır değerlerinde çözülürse tersinmez sistemin 25 °C'de pik akımı için aşağıdaki eşitlik bulunur.

$$\dot{I}_p = (2.99 \times 10^5) n (\alpha_c n_a)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (2.18)$$

Burada n_a aktarılan toplam elektron sayısı α_c elektron transfer katsayısıdır. Buna hız tayin basamağında aktarılan elektron sayısı da dahildir. Tersinir durumda olduğu gibi pik akımı derişim ve tarama hızının kare kökü ile doğru orantılıdır. İlâveten transfer katsayısının kare kökü ile doğru orantılıdır. Aktarılan elektron sayısının 1 olduğu durumda eğer $\alpha_c = 0.5$ ise tersinmez pik akımı aynı şartlardaki tersinir pik akımının % 75.8'i kadardır.

Tamamen tersinmez bir sistemin en önemli belirtisi ters tarama pikinin (anodik pikin) gözlenmemesidir. Ancak unutmamak gerekir ki bunun tersi her zaman doğru değildir. Yani anodik pikin gözlenmeyişi mutlaka elektron aktarım basamağının tersinmez olduğunu göstermez. Örneğin elektron basamağını takip eden çok hızlı bir kimyasal tepkimede oluşan ürün hızlı bir şekilde başka maddeye dönüşeceği için ters taramada yükseltgenme gözlenmeyebilir.

Tersinir durumda E_p^k , tarama hızının bir fonksiyonu olmadığı halde tersinmez durumda, v ile aşağıdaki eşitliğe göre değişir.

$$E_p^k = K - \frac{2,3RT}{2\alpha_c n_a F} \log v \quad (2.19)$$

Bu eşitlikte,

$$K = E_s^0 - \frac{RT}{\alpha_c n_a F} \left(0,78 - \frac{2,3}{2} \log \frac{\alpha_c n_a F D}{k_s^2 RT} \right) \quad (2.20)$$

Yani tersinmez bir elektron transfer reaksiyonunun katodik pik potansiyeli, tarama hızı arttıkça negatif bölgeye kayar ve bu kaymanın miktarı her 10 birimlik v artışına 25 °C 'de $30 / \alpha_c n_a$ mV'dur. Ayrıca dalganın şeklindeki değişme kriteri olarak alınan $E_p - E_{p/2}$ kayması da farklıdır.

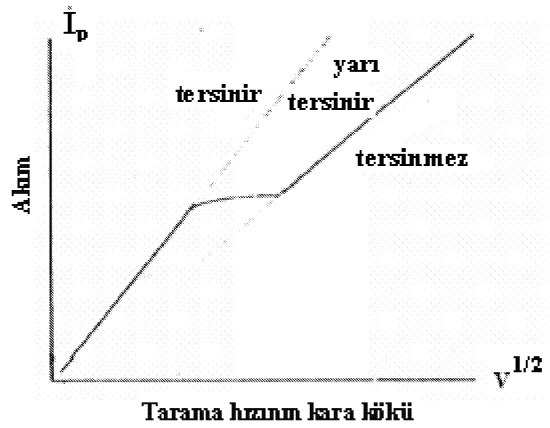
$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{48}{\alpha_c n_a} \text{ mV. (25°C'de)} \quad (2.21)$$

Dolayısıyla E_p^k ve $E_p - E_{p/2}$ kaymalarından $\alpha_C n_a$, D ve k_s sabitleri hesaplanabilir.

Özetlenecek olursa tersinmez bir dalganın aşağıdaki kriterlerin tümüne uyması gerekir.

1. Anodik pik gözlenmez (Ters tarama piki gözlenmez).
2. $I_p^k \propto v^{1/2}$
3. E_p^k kayması 25°C 'de tarama hızındaki 10 birimlik artmada $30 / \alpha_C n_a$ dir.
4. Tarama hızı 10 kat artarsa $E_p - E_{p/2} = 48 / \alpha_C n_a$ mV'dur.

Sistem yarı tersinir ise, yani akım hem elektron hem de kütle transferinin katkısıyla oluşuyor ise elektron aktarım hız sabiti (k_s) değeri : $0.3 v^{1/2} \geq k_s \geq 2.0 \times 10^{-5} v^{1/2}$ cm /s aralığındadır. Bu durumda I_p 'nin $v^{1/2}$ ile grafiği Şekil 2.9'deki gibidir.



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

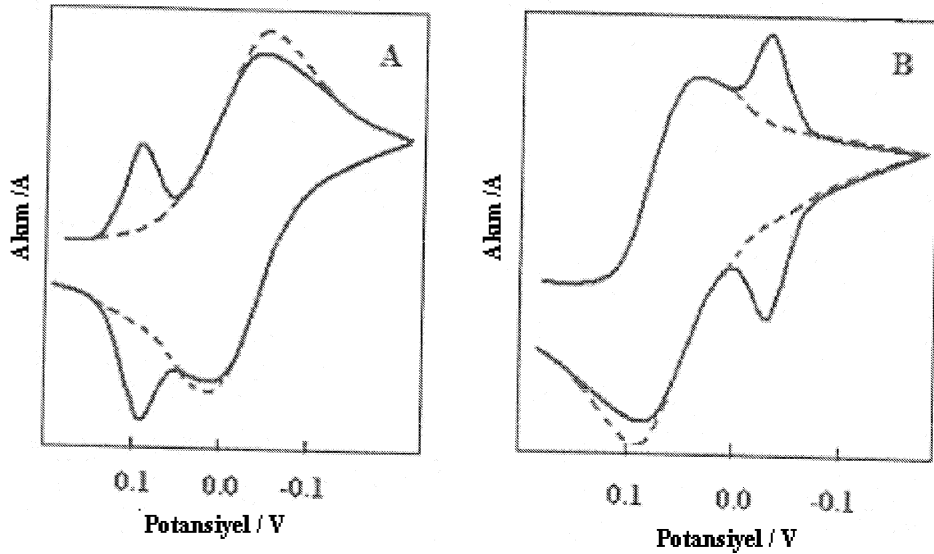
Bir tepkime aşağıdaki kriterleri sağlarsa yarı tersinirdir.

1. I_p , $v^{1/2}$ ile artar ancak doğrusal değildir.
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 ΔE_p , v ile artar.
4. E_p^k , v nin artması ile negatif değerlere kayar.

CV ile Adsorpsiyon incelenmesi

Çözelti içerisindeki iyonlar veya moleküller elektrot yüzeyine çeşitli şekillerde adsorbe olabilirler. Adsorbe olan iyon veya molekül ile elektrot yüzeyi arasında bir çeşit bağ meydana gelir. Bu bağ, anyon ve katyonlarda elektrostatik karakterli olabildiği gibi yüklü elektrot yüzeyi ile dipol özellikteki moleküller arasında yük – dipol etkileşmesi şeklinde de olabilir. Elektroaktif maddeler, ara ürünler veya nihai ürünler elektrot yüzeyine adsorplanması elektrot tepkimesini kuvvetli bir şekilde etkiler. Elektrot tepkimesinde doğrudan yer almayan iyon veya moleküllerin adsorplanması ise elektron aktarım hızını etkilediği gibi elektrot tepkimesinin mekanizmasını değiştirerek farklı ürün oluşmasına yol açabilir (50).

Elektroaktif maddenin kendisi kuvvetli bir şekilde adsorbe olduğunda, elektroaktif maddenin pikinden önce küçük bir adsorpsiyon piki gözlenirken (Şekil 2.10.a), elektroaktif maddenin ürünü yüzeyde kuvvetli bir şekilde adsorbe oluyorsa normal pikten sonra ayrı bir adsorpsiyon piki gözlenir (Şekil 2.10.b).



Şekil 2.10. a) Reaktantın kuvvetli adsorpsiyonunda gözlenen dönüşümlü voltamogramla b) Ürünün kuvvetli adsorpsiyonunda gözlenen dönüşümlü voltamogramlar

Reaktant zayıf bir şekilde adsorbe olduğunda katodik pik akımında genel olarak bir artış gözlenirken, anodik pik akımında daha az bir artış olur. Ürün zayıf adsorbe olduğunda ise katodik pik akımında hemen hemen hiç değişiklik olmazken anodik pikin akımında bir artış gözlenir (51, 52).

Dönüşümlü voltametri tekniği ile kuvvetli ve zayıf adsorpsiyonun varlığı aşağıdaki kriterlerle belirlenir .

1. CV voltamogramlarında ön pik veya arka pik gözlenmelidir.
2. $\log(\dot{I}_p) - \log(v)$ grafiğinin eğimi 0.5'ten büyük olmalıdır.
3. Akım fonksiyonu ($\dot{I}_p / C v^{1/2}$) tarama hızı ile artmalıdır.
4. Derişim artışı ile $\dot{I}_p / C$ oranı azalmalıdır.
5. $\dot{I}_p / C v - v$ değişimi sabit olmalıdır.

Kuvvetli adsorpsiyon durumunda anodik taramadaki pik, potansiyel eksenine göre katodik pik ile simetriktir. Langmuir izotermi şartlarında ideal bir tersinir reaksiyon için anodik pik potansiyeli katodik pik potansiyeline eşittir. Bu durumda anodik ve katodik piklerin yarı yüksekliğindeki genişliği Eşitlik 2.22 ile verilir.

$$\Delta E_{\frac{1}{2}} = 3,53 \frac{RT}{nF} = \frac{90,6}{n} \text{mV}(25^\circ \text{C}) \quad (2.22)$$

Böyle bir durumda pik akımını veren bağıntı Eşitlik 2.23'deki gibidir.

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_o^* \quad (2.23)$$

Bu eşitlikten yararlanılarak elektrot yüzeyine adsorbe olan madde miktarı (Γ) da hesaplanabilir.

CV ile Elektrot mekanizmasının incelenmesi

Bir elektrot mekanizması EC (elektron aktarım basamağını kimyasal tepkime takip etmesi), CE (elektron aktarım basamağından önce kimyasal tepkime olması), ECE, $EC_{\text{katalitik}}$ şeklinde olabilir. Elektron transferine eşlik eden kimyasal tepkimelerin varlığının tespitinde CV çok önemli bir yöntemdir. Genellikle ilk mekanizma araştırmaları CV ile yapılır. CV ile mekanizma çalışmalarında mümkün olduğu kadar geniş potansiyel tarama hızı aralıklarında çalışılır. CV tekniği kullanılarak elektrot mekanizmalarının belirlenmesinde yararlanılan kriterler Tablo 2.2' de verilmiştir (48).

Tablo 2.2. Elektrot mekanizmalarının belirlenmesinde kullanılan kriterler

Mekanizma	$\dot{I}_{pk} - v$ ilişkisi	$E_p - v$ ilişkisi	$(\dot{I}_{pa} / \dot{I}_{pk}) - v$ ilişkisi
(CE) $Y \rightarrow O$ $O + ne \leftrightarrow R$	Tarama hızı arttıkça $\dot{I}_{pk} / v^{1/2}$ azalır	Tarama hızı arttıkça E_p pozitif kayar	$\dot{I}_{pa} / \dot{I}_{pk}$ oranı v ile artar ve bu oran ≥ 1 'dir
(EC) $O + ne \leftrightarrow R$ $R \leftrightarrow Y$	Tarama hızı arttıkça $\dot{I}_{pk} / v^{1/2}$ azalır	Tarama hızı arttıkça E_p negatife kayar	$\dot{I}_{pa} / \dot{I}_{pk} < 1$ 'dir. Ancak v arttıkça 1'e yaklaşır
(ECE) $O + n_1e \leftrightarrow R$ $R \leftrightarrow O'$ $O' + n_2e \leftrightarrow R'$	$\dot{I}_{pk} / v^{1/2}$ değeri tarama hızı ile değişir. $\dot{I}_{pk} / v^{1/2}$ (düşük v) $>$ $\dot{I}_{pk} / v^{1/2}$ (yüksek v)	-	$\dot{I}_{pa} / \dot{I}_{pk}$ oranı v hızı ile artar, yüksek tarama hızlarında 1'e yaklaşır
(EC _{katalitik}) $O + ne \leftrightarrow R$ $R + X \leftrightarrow O + Y$	$\dot{I}_{pk} / v^{1/2}$ değeri v artıkça azalır, $\dot{I}_{pk}$ düşük tarama hızlarında sınır değere ulaşabilir	-	$\dot{I}_{pa} / \dot{I}_{pk} < 1$ 'dir

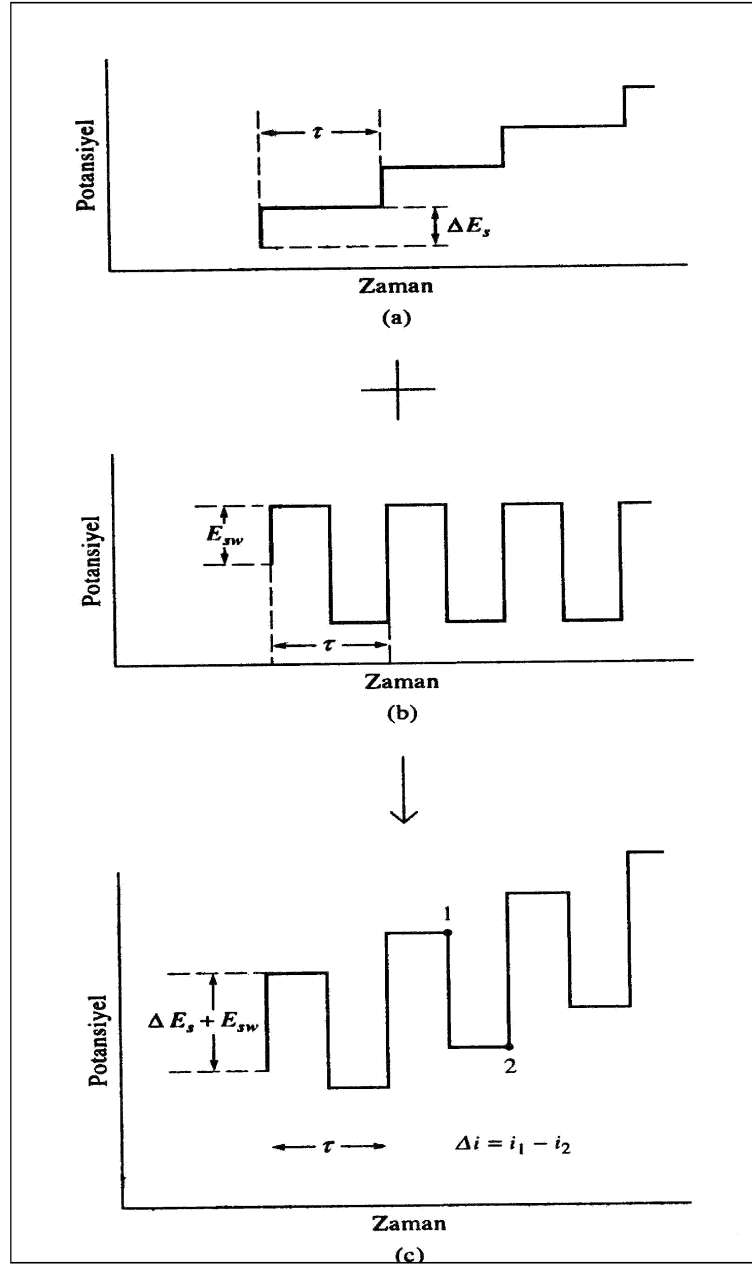
2.4.3. Kare Dalga Voltametrisi (53, 54)

Bu yöntem ilk defa 1930 yılında Kemula tarafından adsorpsiyon olaylarının incelenmesi için düşünülmüş, ancak analitik kullanımı 1952 yılında Fujinaga ve arkadaşları tarafından fark edilmiştir. SWV'ne hem teorik hem de cihaz geliştirilmesi bakımından en büyük katkı Barker tarafından yapılmıştır.

SWV'de sabit elektrotlarda teorik ve uygulama bakımından gelişimi 1985 yılında Osteryoung tarafından gerçekleştirilmiştir. SWV'nin sabit elektrotlarda potansiyel-zaman dalga şekli Şekil 2.11'de görülmektedir.

SWV'nin, Şekil 2.11.b'deki pulsun Şekil 2.11.a'daki basamak sinyali üzerine bindirilmesiyle elde edilen uyarma sinyali Şekil 2.11.c'de görülmektedir. Dalga şekli, simetrik kare dalgalardan oluşan merdiven görünüşündedir.

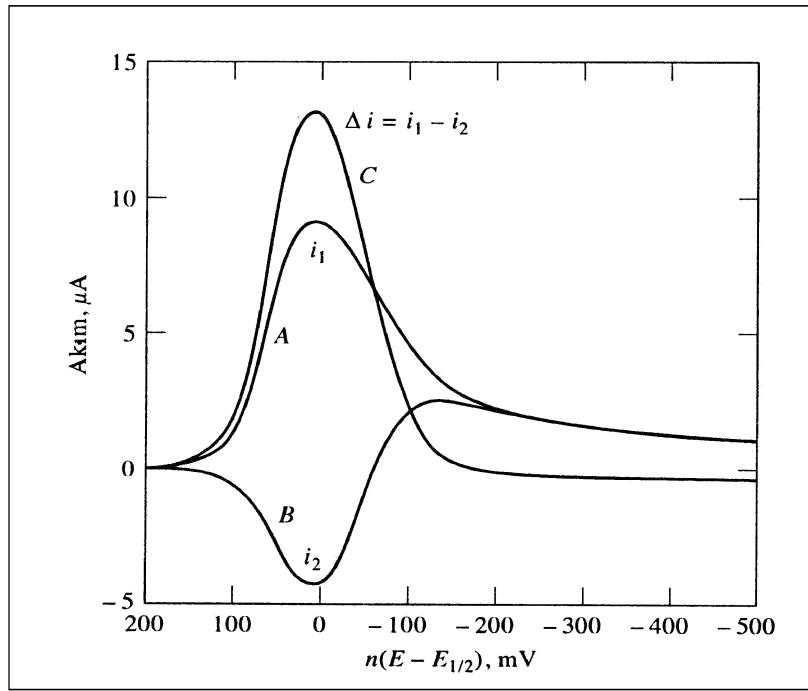
Bir kare dalga'nın tamamlanma süresi (her basamağın boyu) *periyot* adını alır ve τ ile gösterilir. Yaklaşık 5 ms civarındadır. Birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkına *adım yüksekliği* (sinyalin potansiyel basamağı) denir ve ΔE_s ile gösterilir. Genelde ΔE_s 10 mV'dur. Her bir dalga'nın alt ve üst noktaları arasındaki farkın yarısı *kare dalga yüksekliği (puls genliği)* olarak bilinir ve E_{sw} şeklinde gösterilir. Pulsun büyüklüğü 2 E_{sw} ise, genelde 50 mV'dur. Sistemin bu şartlar altında çalıştırılması 200 Hz'lik puls frekansına karşılık gelir ve bu durumda 1 V'luk bir tarama 0.5 s'de yapılır. Çoğu zaman τ yerine $1/\tau$ 'a eşit olan *frekans* kullanılır ve f ile gösterilir.



Şekil 2.11. Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu.

(a)'daki uyarma sinyali (b)'deki puls taraması ile (c)'deki kare dalga uyarma sinyalinin verecek şekilde toplanmaktadır. Akım cevabı Δi , 1 potansiyelindeki akımdan 2 potansiyelindeki akım çıkarılarak bulunur. ΔE_s : adım yüksekliği, E_{sw} : puls genliği, τ : periyot

Tersinir bir indirgenme tepkimesinde bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün, geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. SWV’de akım ölçümleri ileri ve geri pulsların sonuna doğru t_s kadar bir zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 olmak üzere her bir kare dalga pulsunun *net akımı* $\Delta i = i_1 - i_2$ ’ye eşittir ve *ileri fark akımı* olarak adlandırılır (Şekil 2.12). Genelde voltamogramları elde etmek için bu akımların farkı (Δi) grafiğe geçirilir. Bu fark derişimle doğru orantılıdır, pik potansiyeli de polarografik yarı dalga potansiyeline karşılık gelir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini artırmak mümkündür. SWV yönteminin tayin sınırları 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır.



Şekil 2.12. SWV’de tersinir bir tepkime için net akım

A : ileri tarama piki, B : geri tarama piki, C: net akım piki

SWV’de deneysel parametreler belirli aralıklarda seçilir. Frekansın artması ile veya buna bağlı olarak periyodun azalması ile kare dalga pik akımı ve dolayısıyla duyarlılığı artar. 1000 Hz’den daha yüksek frekansla yapılan çalışmalar çok büyük dikkat ve hassasiyet gerektirir. 200 Hz duyarlılık ve kararlılık açısından analitik

amaçlı çalışmalar için problemsiz bir frekans olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak frekans genellikle $10 \leq f \leq 1000$ Hz veya periyot $1 \leq \tau \leq 100$ ms aralığında seçilir. Adım yüksekliği ise aktarılan elektron sayısına (n) bağlı olarak $\Delta E_s = 10/n$ mV eşitliğinden seçilir. SWV’de tarama hızı, frekans ve periyod ile adım yüksekliğine bağlı olarak belirlenir ve *etkin tarama hızı (ETH)* olarak adlandırılır. ETH aşağıdaki eşitlikle belirlenir.

$$ETH = f \times \Delta E_s = 1 / \tau \times \Delta E_s \quad (2.24)$$

ΔE_r kadar bir potansiyel aralığında tarama yapmak için sadece τ ($\Delta E_r / \Delta E_s$) kadar bir zaman gereklidir. Uygun frekansların seçimi ile deney süreleri çok azaltılabilir. Örneğin $n=1$ iken $\Delta E_s = 10$ mV ve $f = 200$ Hz ($\tau = 1/200$) ise $ETH = 2$ V/s’dir. 500 mV’luk (ΔE_s) bir potansiyel aralığını tarayabilmek için gerekli olan süre sadece 0.25 s’dir. Bundan dolayı SWV hızlı taramalı teknik olarak tanımlanır.

2.4.4. Sıyırma Voltametrisi

Sıyırma yöntemleri başlangıç basamağı yaygın ve karakteristik olan çok sayıdaki elektrokimyasal yöntemi kapsar. Elektroanalitik yöntemler içinde en duyarlı yöntemdir.

Elektrot yüzeyine herhangi bir şekilde biriktirilen maddenin analizi için sıyırma analiz yöntemi kullanılabilir. Yöntem iki ayrı bölümden oluşmaktadır. İlk adımda analiz çözeltisi içindeki maddelerin çalışma elektrotu üzerine elektrokimyasal yolla veya adsorbe edilerek birikmesi sağlanır. Bu sırada çözelti karıştırılır. Analizi yapılacak maddenin çözeltiden indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sonucu biriktirilir (elektrokimyasal yol) veya çözeltide bulunan madde sabit potansiyelde herhangi bir kimyasal değişikliğe uğratılmadan doğrudan doğruya elektrot yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla biriktirilir. İkinci adım olan sıyırma adımı ise elektrot üzerinde biriktirilmiş olan madde voltametrik yöntemlerden biri ile sıyırılır. Bu nedenle yönteme sıyırma yöntemi denir. Sıyırma adımı sinüs dalga, puls, diferansiyel puls veya kare dalga gibi potansiyel-zaman dalga şekilleri kullanılmaktadır (55).

Sıyırma yöntemleri eser element tayininde önemli bir yer tutar, çünkü elektrolizdeki önderiştirme basamağı sayesinde eser miktardaki bir element tayin edilebilir. Bu yöntemlerle 10^{-6} - 10^{-9} M arasında analiz yapılabilir.

Elektrot üzerine biriken maddelerin miktarı, maddelerin ve çözeltinin özelliğine, elektrot materyaline ve boyutuna, potansiyele, zamana, pH'ya, iyonik güce, maddenin elektroda taşınmasına, sıcaklığa, biriktirme süresi ve çözeltinin karıştırılma hızı gibi faktörlere bağlıdır.

Biriktirme basamağı sırasında çözeltiyi karıştırmak, analiz edilecek maddenin elektrot yüzeyine ulaşma hızını artırır. Ancak karıştırmanın kontrol edilen bir hızda olması gerekir. Çözeltide ve elektrot yüzeyinde tepkimeler tersinir olduğundan dolayı elektrot yüzeyinde biriktirilen maddenin sıyırma işleminden sonra tekrar çözeltiye geçmesi gerekir. Bu ise karıştırma hızı ve biriktirme süresi ile doğrudan orantılıdır. Karıştırma, çok yavaş olursa daha az madde birikir ve ürünün geri kazanılma verimi artar. Ancak bu durum duyarlılığın azalmasına ve daha uzun bir zaman harcanmasına yol açar. Sıyırma voltametrisinde bazen çözeltiyi hiç karıştırmadan, yalnız difüzyonla madde göçü sağlanarak da biriktirme yapılabilir.

Çok hızlı bir karıştırma geri kazanma verimini düşürebilir. Ayrıca karıştırma işleminin homojenliğini bozar, çözeltinin saçılmasına neden olabilir. Karıştırma, çözeltide boşluk oluşturmayacak ve asılı duran cıva elektrotunu yerinden oynatmayacak biçimde sabit hızda tutulmalıdır. Biriktirme basamağında karıştırma hızının ve süresinin ayarlanması hem maddenin geri kazanılması hem de duyarlılıkla ilgili parametreler olduğundan bu iki parametrenin optimum değerlerinin belirlenmesi gerekir. Elektrot yüzey alanının büyütülmesi de akımı dolayısıyla duyarlılığı da artıracaktır (56).

Biriktirme süresinin belirlenmesi de sıyırma voltametrisinde en önemli parametrelerden biridir. Analizin duyarlılığı biriktirme zamanı ile doğru orantılıdır. Teorik olarak, elektrot yüzeyinde ne kadar çok madde biriktirilirse duyarlılık da o kadar yüksektir. Çözeltideki maddenin tamamının elektrot yüzeyine toplanması durumunda maksimum duyarlılık elde edilir. Ancak uzun süre madde biriktirilmesinin sakıncaları da olabilir. Elektrot yüzeyinde çok madde birikmesi sonra maddenin geri kazanılmasına engel olabilir. Uzun bekleme sonucunda elektrot

yüzeyine istenmeyen tepkimelerin meydana gelmesine neden olabilir. Ürün kararsız olabilir ve elektroinaktif bir hale dönüşebilir.

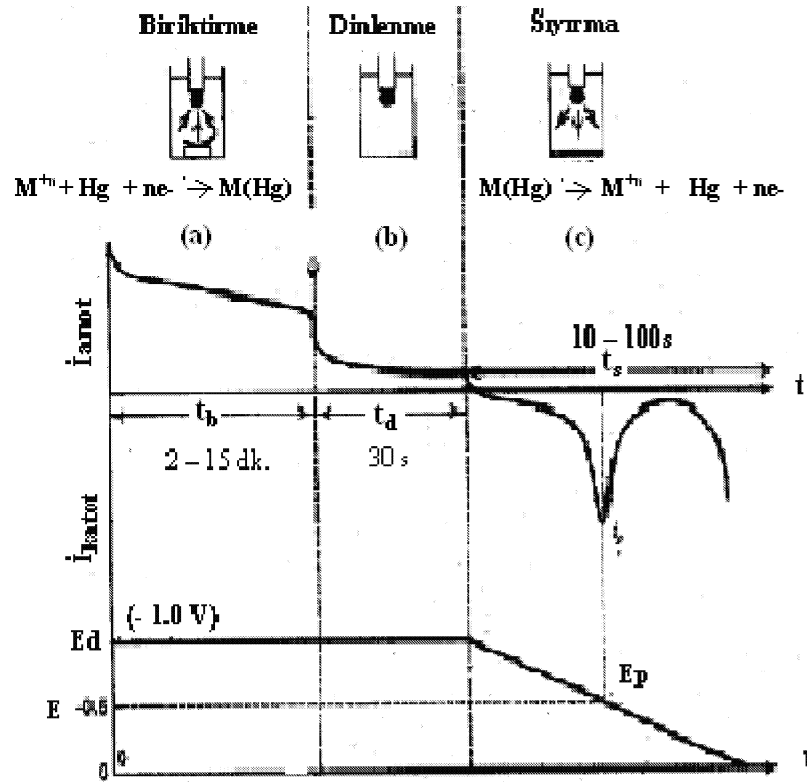
Biriktirme esnasında elektrotta uygulanan potansiyel, pik yüksekliğini etkiler. Bunun için normal sıyırma voltametrisi ile analizi yapılacak maddenin yarı dalga potansiyelinden birkaç yüz milivolt daha yüksek potansiyelin uygulanması gerekir. Çünkü normal sıyırma voltametrisinde maddeler elektrot yüzeyine bir kimyasal tepkime ile biriktirilirlir. AdSV'de ise uygulanacak potansiyelin herhangi bir kimyasal tepkimeye yol açmayacak değerde tutulması gerekir. Bu nedenle AdSV'de bu potansiyel artık akım bölgesinden seçilmelidir.

Sıyırma voltametrisinde karışımdaki maddelerin aynı anda analizi mümkündür. Biriktirme potansiyeli özellikle karışım analizlerinde önemlidir. Birkaç tane metal iyonu içeren bir çözeltiden biriktirme yapılırken sıyırma esnasında tayin edilecek maddenin pikini kapatacak maddenin biriktirilmesinin engellenmesi gerekir. Girişim yapabilecek bileşenler bilinmeli ve biriktirme potansiyeli buna göre seçilmelidir. Çok sayıda maddenin bulunduğu bir çözeltide ne kadar negatif bir biriktirme potansiyeli uygulanırsa girişim yapma ihtimali de o kadar artırılmış olur .

Sıyırma voltametrisi yöntemlerinde damlayan cıva elektrot kullanılmaz. Çünkü cıvayla amalgam halindeki metal ürün damla kopması ile çözeltiye geri taşınmış olur. Bunun için sıyırma yöntemlerinde asılı duran cıva damlası veya bir katı elektrot kullanılır.

Sıyırma voltametrisini, 1- Anodik sıyırma, 2- Katodik sıyırma, 3- Adsorptif sıyırma, 4- Potansiyometrik sıyırma olarak 4 grupta inceleyebiliriz.

Anodik sıyırma yöntemlerinde (ASV), mikroelettrot, biriktirme basamağı sırasında katot olarak; analitin ilk haline tekrar yükseltgendiği sıyırma basamağında ise, anot olarak davranır. Şekil 2.13'de anodik sıyırma voltametrisinde uygulanan basamaklar ve elde edilen voltamogramlar görülmektedir.



Şekil 2.13. Anodik sıyırma voltametrisinde uygulanan basamaklar ve elde edilen voltamogramlar a) biriktirme (çözelti karıştırılır) ; b) Dinlenme (karıştırma durdurulur); c) sıyırma

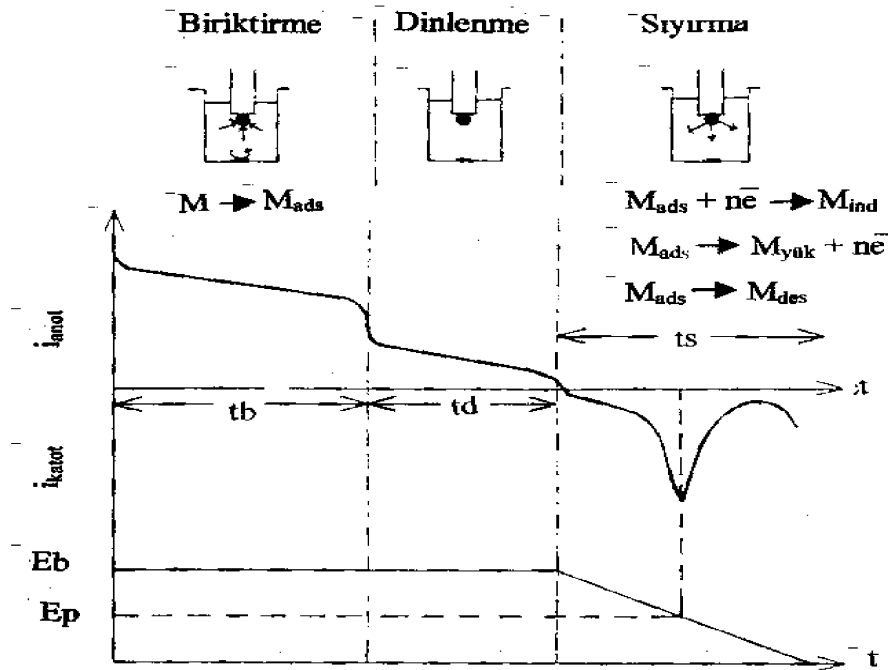
t_b = Biriktirme Süresi, t_d = Dinlenme Süresi, t_s = Sıyırma Süresi

Katodik sıyırma yöntemlerinde (KSV), mikroelettrot, biriktirme basamağı sırasında anot olarak; sıyırma basamağında da katot gibi davranır. Biriktirme basamağında, analit elektrokimyasal olarak bir önderiştirilme işlemine uğrar; yani mikroelettrot yüzeyindeki analit derişimi çözeltideki derişiminden çok daha fazladır.

Adsorptif Sıyırma Yöntemlerinde (AdSV), maddenin elektrot üzerine adsorbe edilerek biriktirilmesi adımıında, elektrot potansiyeli, analizi yapılacak organik maddenin indirgenme potansiyelinden daha pozitif potansiyelde belli bir süre sabit tutulur. Bu süre boyunca analiz edilecek organik maddeler elektrot yüzeyine adsorbe olarak birikir. Bu süre boyunca çözelti karıştırılır. Elektrot alanı küçük ve biriktirme süresi kısa olduğı için elektrot yüzeyine adsorbe edilerek biriktirme adımıında akımın değışmediğı varsayılır. Biriken organik maddelerin elektrot yüzeyine ulaşma

hızları, organik maddelerin derişimine, elektrot çözeltisinin difüzyon özelliklerine ve kullanılan elektrotun alanına bağı olarak değışir (57).

Biriktirme adımından sonra karıştırma durdurularak bir süre çözeltinin durulması beklenir. Sıyırma adımında elektrot potansiyeli düzgün değışirken elektrotta adsorbe olarak birikmiş organik maddeler tepkime potansiyellerine ulaştıklarından akım oluşturlar, sıyırma akımı elektrot potansiyelinin fonksiyonu olarak okunmaktadır. Bu akım organik maddenin elektrottaki ve çözeltideki derişimi ile doğru orantılıdır. AdSV ile analizde, maddeyi elektrot yüzeyine adsorbe ederek biriktirme, dinlenme ve sıyırma adımları izlenir. Sıyırma adımında indirgenme, yükseltgenme veya desorpsiyon oluşması söz konusudur. Şekil 2.14’de adsorptif sıyırma voltametrisinde uygulanan basamaklar ve elde edilen voltamogramlar görölmektedir.



Şekil 2.14. Adsorptif sıyırma voltametrisinde uygulanan basamaklar ve elde edilen voltamogramlar

t_b = Biriktirme Süresi, t_d = Dinlenme Süresi, t_s = Sıyırma Süresi

Potansiyometrik sıyırma yönteminde, deriştirme basamağından sonra sabit potansiyel uygulamasına son verilir ve toplanmış metaller yükseltgen bir madde ile yükseltgenir. Bu madde çözeltide bulunmaktadır veya uygun değerde bir sabit akım uygulanarak da bu işlem yapılır. Bu yükseltgenme sırasında çalışma elektrodunun potansiyeli değişir bu potansiyel zamana karşı kaydedilir. Bu eğri sıyırma platosudur. Redoks titrasyon eğrilerinde olduğu gibi iki eşdeğerlik noktası arasındaki süre bu zaman aralığında yükseltgenmiş olan maddenin derişiminin ölçüsüdür.

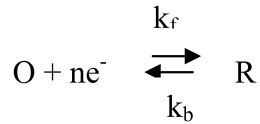
Bir maddenin sıyırma voltametrisi ile analiz edilebilmesi için aşağıdaki özellikleri taşıması gerekir:

1. Biriktirme basamağında ürünün cıva elektrotta çözünmemesi gerekir. Eğer çözünürse çözeltiye geri difüzenir.
2. Çözünmeyen bir ürün oluşuyorsa çok fazla seyrelmelerde bile çözünmemelidir. Ama yüksek dirençli bir tabaka oluşturmamalıdır.
3. Biriken madde tekrar oksitlenme kabiliyetinde olmalıdır. Böylece bir sıyırma piki oluşabilir.
4. Biriktirilen maddenin kararlı olması ve çözelti tarafından tutulması gereklidir.

2.4.5. Kronoamperometri (49)

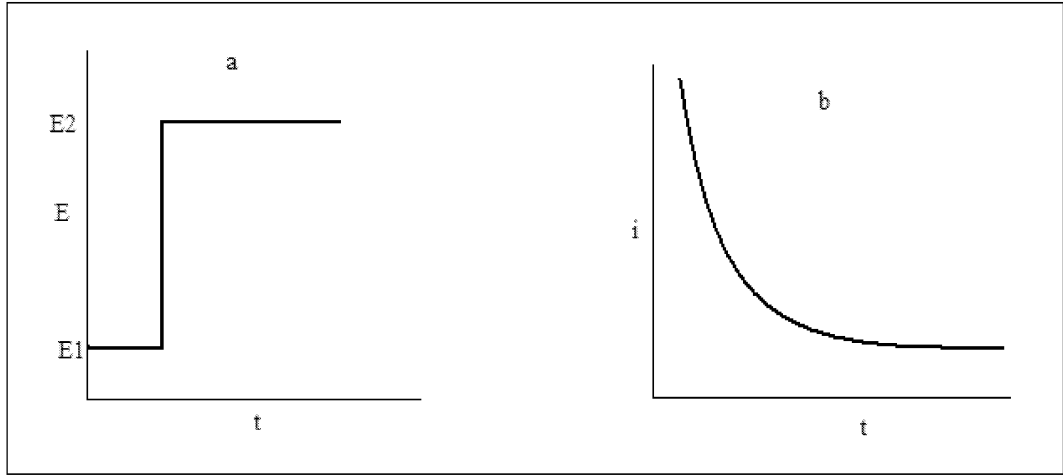
Bir potansiyel basamak tekniği olan CA'de, çalışma elektrotunun potansiyeli ani olarak değiştirilir ve durgun ortamda akım - zaman ilişkisi incelenir. Zamanın karekökü ile azalan bir akım oluşur.

Bir elektrot yüzeyinde,



tepkimesinin yürüdüğünü ve başlangıçta çözeltide yalnız O maddesinin bulunduğunu varsayalım. CA'de çözeltiye daldırılan çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel - zaman grafiği Şekil 2.15.a'da gösterildiği gibidir. Önce çalışma elektrotuna herhangi bir indirgenmenin olmadığı E_1 potansiyeli uygulanır. Sonra potansiyel ani olarak E_2 'ye değiştirilir. E_2 potansiyeli, indirgenme difüzyon

kontrollü olacak şekilde seçilir. E_2 ; difüzyon sınır akımının plato bölgesinden, E_1 ; elektroaktif maddenin indirgenmediği ve artık akımın olduğu herhangi bir potansiyel seçilir.



Şekil 2.15. CA'de a) çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel programı, b) elde edilen akım-zaman eğrisi

E_1 potansiyelinde tepkime olmaz, E_2 potansiyelinde ise akım difüzyon kontrollüdür. Şekil 2.15.b'de CA'de elde edilen akım-zaman eğrisi görülmektedir.

E_1 ve E_2 potansiyeli seçilirken önce maddenin DC polarogramı veya CV'si alınır. Akımın henüz gözlenmediği artık akım bölgesindeki potansiyel başlangıç potansiyeli (E_1) olarak seçilir. Normal polarogramın plato bölgesinde veya CV'nin pik potansiyelinin daha ötesinde bir potansiyelde E_2 potansiyeli olarak alınır. E_1 ve E_2 potansiyellerinin seçimi Şekil 2.16'da gösterilmiştir. Potansiyel E_2 değerinde belirli bir süre sabit tutulur. Bu potansiyelde oluşan akımın zamanla değişimi aşağıdaki *Cottrell* eşitliğinde verildiği gibidir.

$$I = \frac{nFAD^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (2.25)$$

I = Akım, A

n = Aktarılan elektron sayısı

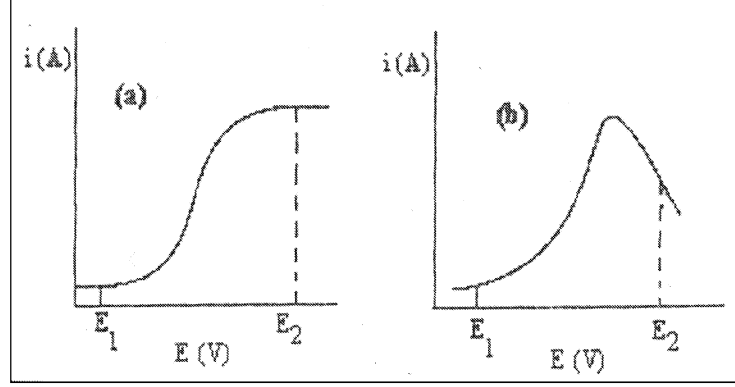
F = Faraday sabiti, C/eq

A = Elektrot alanı, cm^2

$D^{1/2}$ = Difüzyon katsayısı, cm^2/s

C_0 = Maddenin derişimi, mol/cm^3

t = zaman, s



Şekil 2.16. CA'de E_1 ve E_2 potansiyellerinin seçimi a) DC yönteminden b) CV yönteminden

Cottrell eşitliğine göre akım, $t^{-1/2}$ 'ye göre grafiğe geçirildiği zaman orijinden geçen bir doğru elde edilir. Bu grafik yardımıyla bir elektrot tepkimesinin difüzyon kontrollü olup olmadığı test edildiği gibi elektroaktif maddenin difüzyon katsayısı ve aktarılan elektron sayısı da bulunabilir. Ancak deneyin güvenilir olması için zaman aralığının geniş tutulması gerekir. 100-300 ms'lik zaman aralığı bu deney için yeterlidir. Pratikte 1 ms - 10 s arasındaki zaman aralığında tarama yapılır.

2.4.6. Kronokulometri (49)

Kronokulometri de bir potansiyel basamak tekniğidir. Deney süresince oluşan akımın zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle ve bu grafiğin elektronik olarak integralinin alınmasıyla toplam yük bulunur. Toplam yük zamana karşı grafiğe geçirilir. Eğer akım difüzyon kontrollü ise, Cottrell eşitliği ile ifade edilen akım – zaman ilişkisinin integrali alınırsa toplam yük ile zaman arasındaki ilişki için aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$|Q| = \frac{2nFAD_o^{1/2}C_o t^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (2.26)$$

$Q - t^{1/2}$ grafiğinin eğiminden elektrot tepkimesinde aktarılan elektron sayısı ve difüzyon katsayısı hesaplanabilir.

Akım, difüzyon ve kinetik akımların karışımı halinde ise katodik hız sabitinin büyük olduğu durumlarda, $k_f \gg k_b$ olması halinde $Q - t^{1/2}$ grafiği yüksek t değerlerinde doğrusal olur ve Eşitlik (2.25)'in integralinden ;

$$|Q| = \frac{4nFk_f}{\pi} C_o (t_L^{1/2} t^{1/2} - t_L) \quad (2.27)$$

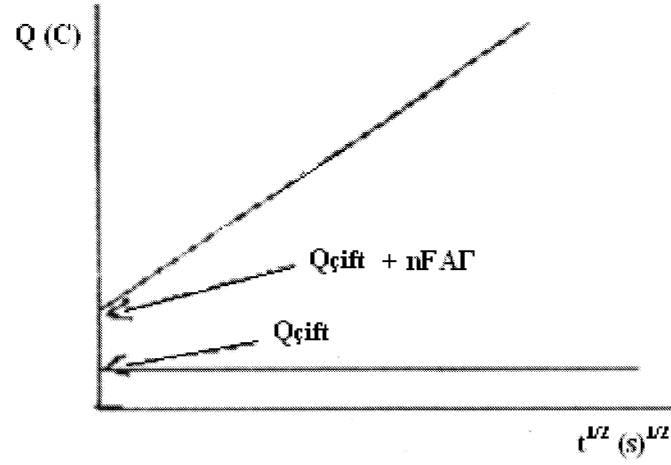
eşitliği elde edilir. Bu eşitlikten görüleceği gibi $Q - t^{1/2}$ grafiği doğrusaldır ve doğrunun $t^{1/2}$ eksenini kestiği nokta $t_L^{1/2}$ ye eşittir. Buradan elde edilen t_L değeri doğrunun eğiminde yerine konularak k_f hesaplanabilir.

$$\text{Eğim} = \frac{4nAFk_f}{\pi} C_o t_L^{1/2} \quad (2.28)$$

Eğer elektrot yüzeyine elektroaktif madde adsorplanmış ise bu durumda toplam yük eşitliği aşağıdaki şekilde olur.

$$|Q| = \frac{2nFD^{1/2}C_o t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + Q_{\text{çift}} + nFA\Gamma f \quad (2.29)$$

Bu eşitlikten $Q_{\text{çift}}$ çift tabakada biriken yük miktarı, Γ ise elektrot yüzeyine elektrot yüzeyine adsorbe olmuş maddenin mol / cm³ olarak derişimidir. Bu durumda önce ortamda elektroaktif madde yok iken yalnız elektrolitin kronokulometrik $Q - t^{1/2}$ eğrisi çizilerek çift tabakanın yük miktarı bulunur. Daha sonra elektroaktif maddenin $Q - t^{1/2}$ eğrisi çizilir. İki eğrinin Q eksenini $t = 0$ anında kestiği noktadaki farkından elektroaktif maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olan derişimi hesaplanır. Bu hesaplama yöntemi Şekil 2.17 'de gösterilmiştir.



Şekil 2.17. Kronokulometri ile elektrot yüzeyine adsorbe olan bir maddenin derişiminin bulunması

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- EZE (Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enst)
- Metanol (CH₃OH, Merck)
- Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)
- Fosforik asit (H₃PO₄, Merck)
- Dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄, Merck)
- Disodyum tetra borat (Na₂B₄O₇.2H₂O, Merck)
- Hidroklorik asit (HCl)
- Nitrik asit (HNO₃)
- Borik asit (H₃BO₃)
- Cıva (Hg, BDH, Analar)
- Azot gazı (N₂, Habaş)
- Mili- Q su (Bütün analizlerde bu su kullanılmıştır)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Voltametrik analiz cihazı (BAS 100B / W)
- IR Spektrofometre (PerkinElmer Spectra VX)
- UV Spektrofometre (Agilent 8453)
- Erime noktası cihazı (Thomas Hoover)
- pH metre (Mettler Toledo MA 235)
- Hassas terazi (Mettler Toledo AG 285)
- Ultrasonik banyo (Bandelin, Sonorex, RK 514 BH)
- Vorteks karıştırıcı (Nüve, NM 110)
- Santrifüj (Nüve, NF 1215)
- Otomatik mikropipet (Biohit 10-100 µL ve 100-1000 µL)

3.1.3. Kullanılan Cam Malzemeler

- Cam pipet (1-10 mL'lik, Pyrex)
- Balon joje (5-1000 mL'lik, Pyrex)
- Beher (Çeşitli hacimlerde, Pyrex)

- Santrifüj tüpü (Borosilikat cam)
- Havan (Agat)
- Eppendof tüp (Plastik)

3.1.4. Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar

Bu çalışmada piyasadan temin edilen Ezetrol® adlı farmasötik preparatın analizi yapılmıştır.

3.2. Kullanılan Standart Maddenin Saflığının Araştırılması

EZE'in saflığı, erime noktası tayin edilerek, UV ve IR spektrumları alınarak kontrol edilmiştir.

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Stok EZE Çözeltisi ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) : 10 mg standart EZE tartılıp 5 mL metanol ile çözüldükten sonra yine aynı çözücü ile 10 mL 'ye tamamlanmıştır ve 4°C 'de buzdolabında saklanmıştır. Standart EZE çözeltileri, bu stok çözeltinin istenen derişime metanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

0.1 M Sodyum Asetat Tamponu : 0.205 g sodyum asetat tartılıp su ile çözüldükten sonra hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

0.1 M Michaelis Fosfat Tamponu : 9.08 g KH_2PO_4 ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ayrı ayrı tartılıp su ile çözüldükten sonra bir litreye tamamlanmış ve uygun miktarlarda karıştırılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır (58).

0.1 M Michaelis Borat Tamponu : 12.4 g borik asit, 100 mL 1M NaOH çözeltisinde çözdükten sonra su ile 1 litreye tamamlanmış ve 0.1 M HCl veya 0.1 M NaOH çözeltisi kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır (58).

0.1 M K_2HPO_4 - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ Tamponu : 4.35 g K_2HPO_4 ve 9.53 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ayrı ayrı tartılıp su ile çözüldükten sonra 250 mL'ye tamamlanmış ve 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl çözeltisi ile istenilen pH'ya ayarlanmıştır

1.0 M NaOH Çözeltisi : 40.0 g NaOH tartılarak su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır. Daha seyreltik NaOH çözeltileri 1.0 M NaOH çözeltisinin su seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

0.1 M HCl çözeltisi : Balon joje içerisine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 8.44 mL HCl çözeltisi eklenmiş ve su ile bir litreye tamamlanmıştır.

2.0 F HNO₃ Çözeltisi : Balon joje içine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 138.9 mL derişik HNO₃ çözeltisi eklenmiş ve su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

3.4. Kullanılan Malzeme ve Maddelerin Temizliğı

3.4.1. Cıvanın Temizlenmesi

Cıva içerisindeki kirliliklerin elektrot tepkimesini engellemesi ve hidrojen aşırı gerilimini azaltması gibi sakıncaları olduğundan temizlenmesi gereklidir. Bu nedenle cıva alt tarafında iğne deliğı bulunan ve huniye yerleştirilmiş olan Whatman 41 nicel süzgeç kağıdı içerisinde temiz bir erlene geçirilerek, üzerindeki kaba kirler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yıkama şişesine aktarılan cıva üzerine önce su, daha sonra 2 F HNO₃ çözeltisi konulup, ikişer gün aralıksız emdirilen hava akımı ile çalkalanmıştır. Buradan alınan cıva mikron çapında platin elek içerisinde geçirilmiştir. Cam boru içine önce 2 F HNO₃, daha sonra su konulmuştur. Cıva cam borunun üstüne yerleştirilen platin elekten çok küçük parçalara ayrılarak geçer. Cam boruda ilerlerken bu küçük cıva parçalarının yüzeyi önce asit, sonra su ile temizlenmiştir.

Cıvanın yeterince temizlenip temizlenmediğini anlamak için cıva şiddetle çalkalanıp bırakılır ve çalkalama ile oluşan kabarcıkların 10-15 s kararlı kalması gerekir. Cıvanın, temizliğinin başlangıcından bu aşamaya kadar hava ile temas ederek buharlaşmasını ve oksit tabakası oluşturmasını önlemek için yüzeyinin su ile kaplı olmasına dikkat edilmiştir. Temizlenen cıva, su ile iyice yıkanıp içerisindeki asit kalmaması sağlandıktan sonra, nicel huniye yerleştirilen ve dibinde iğne deliğı bulunan süzgeç kağıdından beş kez geçirilerek kurutulmuştur. Temiz ve kuru cıvanın üzerinden azot gazı geçirilerek oksijeni uzaklaştırılmış ve teflon kaplarda ağzı kapalı olarak saklanmıştır (59).

3.4.2. Cam Malzemelerin Temizlenmesi

Kullanılan cam malzemeler deterjanlı su ile yıkandıktan sonra çeşme suyu ile durulanmıştır. Daha sonra 2 F HNO₃ çözeltisi içinde en az bir gece bekletilmiş ve tekrar distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.4.3. Elektrokimyasal Hücresinin Temizlenmesi

Elektrokimyasal hücre de cam malzemeler gibi temizlenmiştir. Analizler arasında ise sırasıyla metanol ve distile su ile yıkamalar yapılmıştır.

3.5. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

3.5.1. Elektrokimyasal Hücre Düzenegi

Voltametrik çalışmalar BAS 100B/W Model cihaz ile yapılmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodu (DCE), karşıt elektrot olarak platin elektrot kullanılmıştır.

Polarografik deneylerde hücre içindeki çözünmüş oksijenin damlayan civa üzerinde indirgeneceğinden ortamdaki oksijenin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle hücreye ince, uzun, küçük bir teflon boru daldırılıp hücreden azot gazı geçirilmiştir. Nicel analizlerde hücre içerisindeki çözeltinin buharlaşmasını önlemek için azot gazının hücreye gelmeden önce içerisindeki destek elektrolit çözeltisi bulunan yıkama şişesinden geçirilerek oksijenin yeniden çözelti içerisinde çözünmesi engellenmiştir.

3.5.2. Deneyin Yapılışı

Destek elektrolit olarak seçilen pH 9.0 0.1 M $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tamponundan 3.0 mL alınarak elektrokimyasal hücreye konulmuş ve 10 dakika azot gazı geçirilmiştir. Deney esnasında azot gazı çözelti üzerine gönderilmiştir. SWV yöntemi için başlangıç potansiyeli -1000 mV uygulanarak destek elektrolitin voltamogramı alınmıştır. SWAdSV ve DPAdSV için sırasıyla -800 mV ve -850 mV'luk biriktirme potansiyelleri uygulanmış ve her iki yöntem için 15 s süre boyunca çözelti devamlı karıştırılarak civa damlası üzerinde maddenin birikmesi sağlanmıştır. Daha sonra karıştırma işlemi durdurulup 10 s beklenerek çözeltinin dengeye gelmesi sağlanmış ve SWAdSV ve DPAdSV yöntemi için destek elektrolitin voltamogramları kaydedilmiştir. Hücreye mikropipet yardımıyla μL düzeyinde standart EZE çözeltisinden eklenmiş ve bir dakika N_2 gazı geçirildikten sonra artan derişimlerde EZE eklenerek deney tekrarlanmış ve voltamogramlar kaydedilmiştir.

3.5.3. Yöntemlerin Optimizasyonu

EZE'in elektroanalitik yöntemlerle analizi için SWV, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri uygulanmıştır. Bu yöntemlerde deneysel ve cihaza ait parametreler değiştirilerek uygun şartlar araştırılmıştır. Bu amaçla ilk önce uygun tampon tipi ve pH'sı denenmiştir. Cihaza ait optimum parametreler araştırılırken, SWV yönteminde, frekans, adım yüksekliği ve puls genliği, SWAdSV yönteminde biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi, frekans, adım yüksekliği ve puls genliği, DPAdSV yönteminde ise biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi, tarama hızı ve puls genliği değiştirilmiştir. Bu cihaza ait parametrelerin denenmesinde EZE derişimi, SWV yöntemi için 1.64 µg/mL, SWAdSV yöntemi için 300.00 ng/mL ve DPAdSV yöntemler için 200.00 ng/mL olarak alınmıştır.

3.5.4. Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Çözeltiler, EZE stok çözeltisinden (1000 µg/mL) uygun miktarlarda alınıp metanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Doğrusallık aralığını saptamak için polarografik hücreye artan derişimlerde standart çözeltilerden eklenmiş ve voltamogramlar kaydedilmiştir. Derişime karşı pik akımı değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Gözlenebilen en küçük derişim ve kalibrasyon grafiklerinden miktar tayini yapılabilecek derişim aralıkları saptanarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.5.5. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu

Yöntem validasyonu için kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, sağlamlık, tutarlılık, cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliği, özgünlük ve geri kazanım parametreleri değerlendirilmiştir.

Kararlılık

EZE'in metanoldeki çözeltisinin (1000 µg/mL) kararlılık çalışması yapılmıştır. Bunun için buzdolabında ve oda sıcaklığında saklanan EZE çözeltilerinden 100 µg/mL'lik standart EZE çözeltileri hazırlanmıştır. Uzun dönem kararlılık çalışması için buzdolabında saklanan standart EZE çözeltisinin 1 ay boyunca kare dalga voltamogramları alınmıştır. Kısa dönem kararlılık çalışması için

oda sıcaklığında saklanan standart EZE çözeltisinin 12 saat boyunca kare dalga voltamogramları alınmıştır.

Doğrusallık

SWV, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için sırasıyla 0.33 – 6.54 µg/mL , 33.00 – 596.00 ng/mL ve 66.00 – 400.00 ng/mL aralığında olacak şekilde standart EZE çözeltileri, stok çözeltiden (1000 µg/mL) uygun miktarlarda alınıp metanol ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Doğrusallık aralığını saptamak için içinde destek elektrolit bulunan elektrokimyasal hücreye artan miktarlarda standart çözeltilerden eklenmiş ve her bir eklemenden sonra voltamogramları kaydedilmiştir. Derişime karşı pik akımları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri günlük hazırlanmış ve analiz sırasında 7 ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğruların doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılmıştır (Bkz. Ek 1).

Geliştirilen her bir yöntemin doğrusallığı; nominal (olması gereken) derişimlere karşı, kalibrasyon verileri kullanılarak bulunan derişimlerin grafiğe geçirilmesiyle ve ayrıca istatistiksel olarak korelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü yapılarak kontrol edilmiştir. (Bkz.Ek 2).

Duyarlılık

LOD değerinin hesaplanması için aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Eşitlik 3.1) (60).

$$LOD = 3.3 \left(\frac{SS}{S} \right) \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte, SS, oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin y eksenini kestiği noktanın standart sapması, S ise oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin ortalamasıdır. LOQ değerinin hesaplanması için ise aşağıdaki verilen formül kullanılmıştır (Eşitlik 3.2).

$$LOQ = 10 \left(\frac{SS}{S} \right) \quad (3.2)$$

Kesinlik ve Doğruluk

Kesinlik ve doğruluk çalışmaları için gün içi ve günler arası olmak üzere ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu amaçla doğrusallık aralığına giren üç farklı derişim seviyesinde (alt tayin sınırına yakın, orta ve üst tayin sınırına yakın) EZE'in tekrarlı analizleri yapılmıştır. SWV yönteminde 0.66, 2.28, 4.76 $\mu\text{g/mL}$, SWAdSV yönteminde 66.00, 228.00, 446.00 ng/mL, DPAdSV yönteminde ise 115.00 , 212.00 , 360.00 ng/mL derişiminde çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda; üç derişim seviyesinde ve her derişim için altı ayrı çözelti hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda; ard arda altı ayrı günde ve üç derişimde yeni hazırlanan çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Kesinlik, bulunan değerlerin ortalaması, standart hatası (SH), standart sapması (SS) ve % bağıl standart sapması (BSS) ile verilmiştir. Doğruluk ise, eklenen EZE miktarı ile bulunan EZE miktarının karşılaştırılması ve bulunan % bağıl hatası ile verilmiştir (Bkz. Ek 2).

Cihaz Tekrarlanabilirliği

EZE'in elektroanalitik yöntemlerle analizinde cihaz tekrarlanabilirliği, SWV için 1.96 $\mu\text{g/mL}$, SWAdSV ve DPAdSV için 164.00 ng/mL EZE içeren çözeltinin on ayrı kez voltamogramlarının kaydedilmesiyle elde edilen EZE'ye ait pik akımlarının ortalama değerleri hesaplanarak bulunmuştur.

Yöntem Tekrarlanabilirliği

Yöntemlerin tekrarlanabilirlik çalışmaları için geliştirilen yöntemlerde doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (SWV için 1.96 $\mu\text{g/mL}$, SWAdSV ve DPAdSV için 164.00 ng/mL) on ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde tekrarlı analizleri yapılmıştır.

Sağlamlık ve Tutarlılık

Yöntemlerin sağlamlık çalışmaları için belirlenen optimum deney koşullarında küçük değişiklikler yapılarak analizler tekrarlanmıştır. Bu amaçla SWV yönteminde destek elektrolitin pH'sı ve ilk potansiyel; SWAdSV ve DPAdSV yöntemlerinde ise destek elektrolitin pH'sı, biriktirme potansiyeli ve süresinde küçük değişiklikler yapılmıştır. Tutarlılık çalışmasında ise farklı analizci tarafından çözeltilerin

analizleri yapılmıştır. Farklı iki analizcinin sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bunun için geliştirilen yöntemlerde doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (SWV için 1.96 µg/mL, SWAdSV ve DPAdSV için 164.00 ng/mL) yedi ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde farklı iki analizci tarafından analizleri yapılmıştır.

Özgünlük (Seçicilik)

Yöntemlerin özgünlüğünü belirlemek amacıyla aynı derişimde EZE içeren sentetik preparat, tablet ve standart çözeltileri hazırlanarak voltamogramları kaydedilmiştir.

3.5.6. Geri kazanım

Geri kazanım çalışmaları sentetik preparat çözeltiler hazırlanarak yapılmıştır. Bu amaçla, 10 adet tablet ağırlığı kadar kroskarmeloz sodyum, mikrokristalin selüloz, laktoz, magnezyum stearat, povidon ve sodyum lauril sülfattan belirli bir miktardan tartılıp, bu karışıma 100 mg EZE (bir tablet 10 mg EZE içermektedir) eklenerek sentetik preparat oluşturulmuştur. Bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz, 50 mL’lik balon jojeye alınarak 25 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlandıktan sonra hacim metanol ile 50 mL’ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden belli bir miktar tüpe alınarak santrifüj edilmiştir. Üstteki berrak çözeltilerden doğrusallık sınırı içinde uygun seyreltmeler yapılarak, elektrokimyasal hücredeki destek elektrolit üzerine bu çözeltilerden belirli bir derişimde µL düzeyinde eklemeler yapılmış ve voltamogramlar kaydedilmiştir.

3.5.7. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

i. Kalibrasyon Grafiği Yöntemi ile Analiz

10 adet tablet tartılıp havanda toz haline getirilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz, 50 mL’lik balon jojeye alınarak 25 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilip çözünmesi sağlanarak hacim metanol ile 50 mL’ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden belli bir miktar tüpe alınıp santrifüj edilmiştir. Üstteki berrak çözeltilerden doğrusallık sınırı içinde uygun seyreltmeler yapılmıştır. Elektrokimyasal hücredeki destek elektrolit üzerine bu

çözeltiden doğruluk ve kesinliğin en iyi olduğu derişimi sağlamak üzere μL düzeyinde eklemeler yapılmış ve voltamogramlar kaydedilmiştir.

ii. Standart Ekleme Yöntemi ile Analiz

Destek elektrolit çözeltisine Bölüm 3.5.7.i'de anlatıldığı şekilde hazırlanan tablet çözeltisinden belli bir miktar ekleme yapıp voltamogram kaydedildikten sonra $100 \mu\text{g/mL}$ 'lik standart EZE çözeltisinden doğrusallık sınırları içerisinde olacak şekilde artan derişimlerde üç ekleme yapılarak voltamogramlar kaydedilmiştir. Ölçülen pik akımı değerleri eklenen EZE derişimlerine karşı grafiğe geçirilip doğrunun x eksenini kestiği noktadaki derişim bulunmuştur. Yapılan seyreltmeler göz önünde bulundurularak preparatlardaki EZE miktarı hesaplanmıştır.

3.5.8. Karşılaştırma Yöntemi ile Analiz (29)

EZE'in MeOH içindeki 10, 25, 40 $\mu\text{g/mL}$ içeren standart çözeltileri hazırlanmıştır. Spektrofotometre sıfırlandıktan sonra kör çözelti olarak etkin maddenin çözücüsü olan MeOH kullanılmıştır. Standart maddelerin UV/GB spektrumları kaydedilmiş ve 248.1 nm'de absorbanslar okunarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Bölüm 3.5.7.i 'de anlatıldığı şekilde hazırlanan tablet çözeltileri uygun derişimlere seyreltildikten sonra absorbanslar okunmuştur.

3.6. Ezetimib'in Elektrokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.6.1. Dönüşümlü Voltametri Deneyleri

Bu yöntemde çalışma elektrodu olarak asılı duran cıva elektrotu, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücreye pH 4.0 -10.0 aralığında 3.0 mL pH 9.0, 0.1 M K_2HPO_4 - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (1:1) tamponu konup, çözeltiden 10 dk. azot gazı geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda azot gazı çözeltinin üzerine gönderilmeye başlanmıştır. 10-1000 mV/s tarama hızlarında $8.76 \mu\text{g/mL}$ derişiminde EZE çözeltisinin dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir. Her tarama öncesinde cıva damlası yenilenmiştir.

3.6.2. Kronoamperometri Deneyleri

Bu yöntemde çalışma elektrodu olarak asılı duran cıva elektrotu, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücreye 3.0 mL pH 9.0, 0.1 M K₂HPO₄- Na₂B₄O₇ (1:1) tamponu konup, çözeltiden 10 dk azot gazı geçirilmiştir. [(-1070) – (-1300)] mV'luk potansiyel aralığında 63.00 µg/mL derişiminde EZE çözeltisinin kronoamperometrik voltamogramları tek yönlü ve çift yönlü olarak kaydedilmiştir.

3.6.3. Kronokulometri Deneyleri

Bu yöntemde çalışma elektrodu olarak asılı duran cıva elektrotu, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücreye 3.0 mL pH 9.00 0.1 M K₂HPO₄- Na₂B₄O₇ (1:1) tamponu konup, çözeltiden 10 dk azot gazı geçirilmiştir. [(-1070) – (-1300)] mV'luk potansiyel aralığında 63.00 µg/mL derişiminde EZE çözeltisinin kronokulometrik voltamogramları kaydedilmiştir.

4. BULGULAR

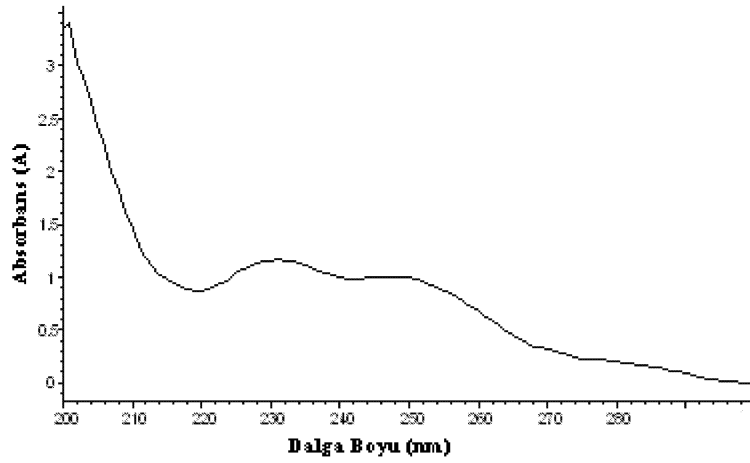
4.1. Saflık Kontrolü Bulguları

4.1.1. Erime Noktası

Yapılan tayin sonucu EZE'in erime noktasının $161 - 162^{\circ}\text{C}$ olduğu gözlenmiştir.

4.1.2. EZE'in UV Spektrumu

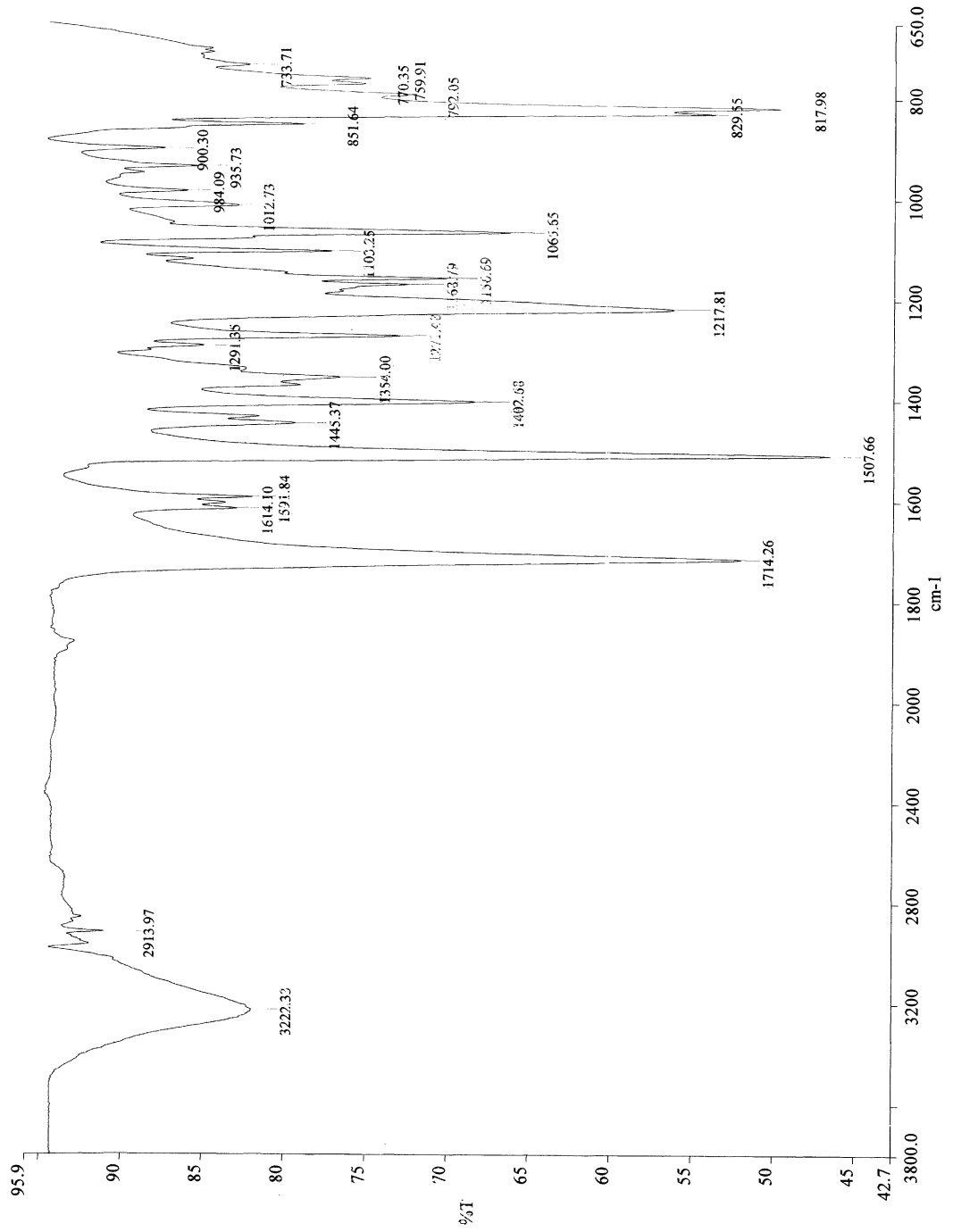
MeOH'de hazırlanan EZE'in UV spektrumu Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. 25 µg/mL EZE'in MeOH'deki UV spektrumu

4.1.3. EZE' in IR Spektrumu

EZE'in 3800 cm^{-1} ile 650 cm^{-1} arasındaki IR spektrumu Şekil 4.2 'de görülmektedir.



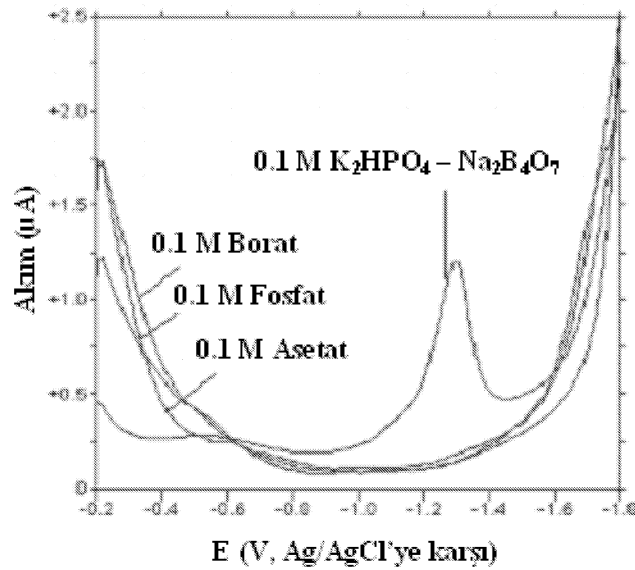
Şekil 4.2. EZE'nin IR spektrumu

4.2. Geliştirilen Elektroanalitik Yöntemlere Ait Analiz Bulguları

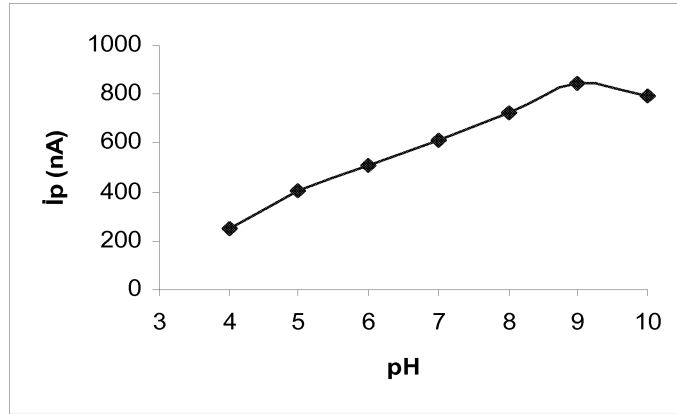
EZE metanol, asetonitril gibi çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğü incelenmiş ve en uygun çözücü olarak metanol seçilmiştir. Bu nedenle stok EZE çözeltisi metanol ile hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler metanol ile yapılmıştır.

4.2.1. Destek Elektrolitin Belirlenmesi

SWV yöntemi ile yapılan çalışmalarda, ilk olarak en uygun destek elektrolit araştırılmıştır. Bunun için belirli bir derişim aralığında destek elektrolite EZE'den eklemeler yapılarak 0.1 M fosfat, 0.1 M asetat, 0.1 M borat ve 0.1 M $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tamponları denenmiştir. Bu tampon sistemlerinde EZE'in $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tampon sisteminde indirgendiği belirlenmiştir (Şekil 4.3). $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tampon sisteminde farklı pH değerlerinde (pH 4.0 – 10.0) (Şekil 4.4) ve farklı tampon derişimlerinde EZE'in pik akımı değerleri ölçülmüştür (Tablo 4.1).



Şekil 4.3. 1.64 µg/mL EZE'in farklı tamponlardaki kare dalga voltamogramları (frekans 50 Hz, adım yüksekliği 3 mV, puls genliği 20 mV)



Şekil 4.4. 1.64 µg/mL EZE'in 0.1 M $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tampon sistemindeki kare dalga voltamogramlarına ait pH – I_p grafiği

Tablo 4.1. EZE'in farklı derişimlerdeki pH 9.0 $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tamponları ile elde edilen pik akımları

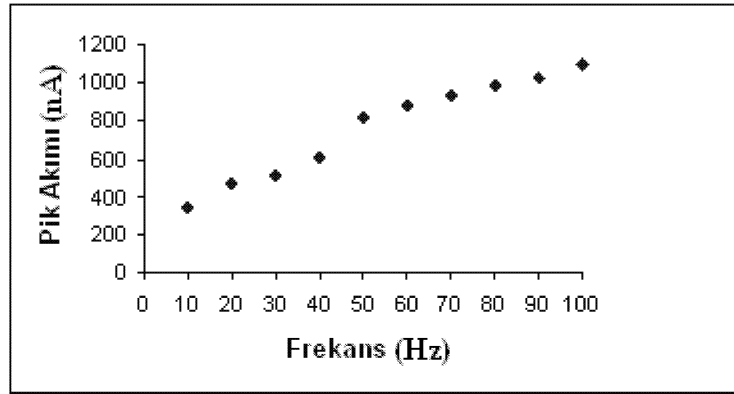
EZE Derişimi (µg / mL)	pH 9.0 $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tampon derişimi			
	0.025 M	0.05 M	0.10 M	0.20 M
	(nA)	(nA)	(nA)	(nA)
0.33	133.18	197.13	253.12	241.36
0.66	167.29	287.56	352.81	303.18
0.99	224.39	451.32	538.80	651.49
1.64	412.97	648.36	743.72	758.79
2.28	648.87	871.48	907.66	1061.19
3.23	808.73	1032.82	1187.00	1137.96
4.76	1076.58	1403.94	1589.48	1493.56
6.54	1339.83	1968.64	2103.33	2063.12

Şekil 4.4 ve Tablo 4.1'den görüldüğü gibi en uygun destek elektrolit olarak pH 9.0, 0.1 M $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tamponu seçilmiştir.

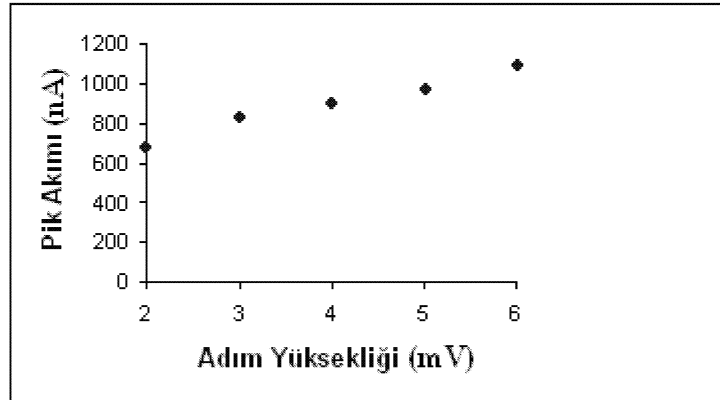
4.2.2. Elektroanalitik Yöntemlerin Optimizasyonu

4.2.2.1. SWV Bulguları

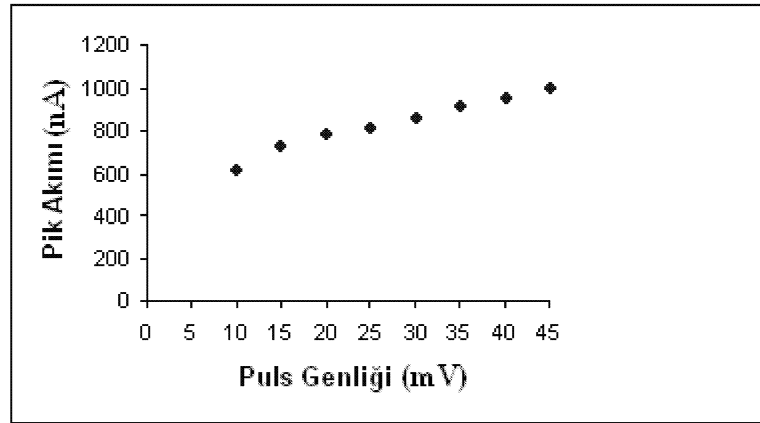
Bu yöntemde optimum cihaz parametrelerinin bulunması için seçilen destek elektrolitte belirli bir EZE derişiminde frekans, adım yüksekliği ve puls genliği değişiminin EZE'in pik akımı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.5 – Şekil 4.7).



Şekil 4.5. SWV yönteminde EZE pik akımına frekans değişiminin etkisi
(adım yüksekliği = 3 mV, puls genliği = 20 mV)
(EZE derişimi : 1.64 µg /mL)



Şekil 4.6. SWV yönteminde EZE pik akımına adım yüksekliği değişiminin etkisi
(frekans = 50 Hz, puls genliği = 20 mV)
(EZE derişimi : 1.64 µg /mL)

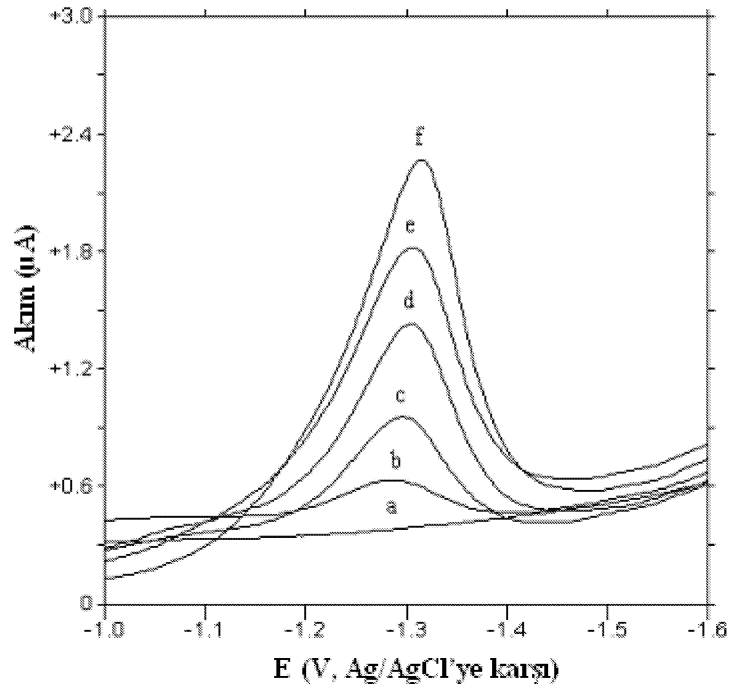


Şekil 4.7. SWV yönteminde EZE pik akımına puls genliği değişiminin etkisi

(frekans = 50 Hz, adım yüksekliği = 3 mV)

(EZE derişimi : 1.64 $\mu\text{g/mL}$)

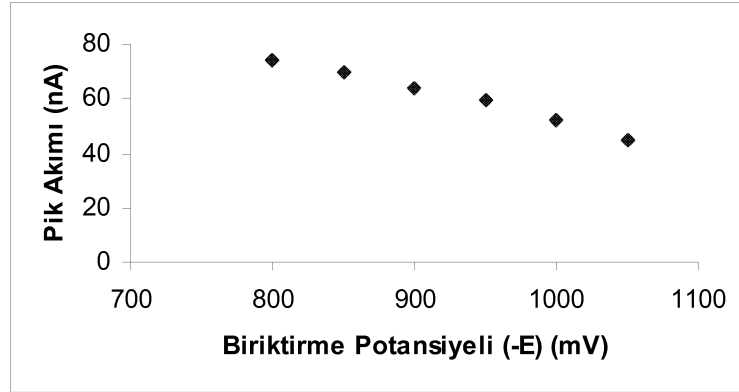
Pik şekli ve akım değerleri dikkate alınarak en uygun parametreler; frekans için 50 Hz, adım yüksekliği için 3 mV ve puls genliği için 20 mV olarak seçilmiştir. Belirlenen cihaz parametrelerinde ve 0.1 M, pH 9.0 $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (1:1) tampon sisteminde EZE'ye ait kare dalga voltamogramları Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



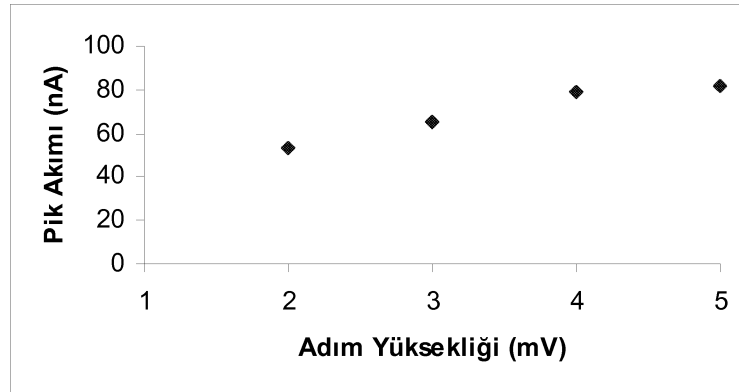
Şekil 4.8. EZE'in kare dalga voltamogramları a) Destek elektrolit, b) 0.33 $\mu\text{g/mL}$, c) 0.99 $\mu\text{g/mL}$, d) 3.23 $\mu\text{g/mL}$, e) 4.76 $\mu\text{g/mL}$, f) 6.54 $\mu\text{g/mL}$ EZE (frekans 50 Hz, adım yüksekliği 3 mV, puls genliği 20 mV)

4.2.2.2. SWAdSV Bulguları

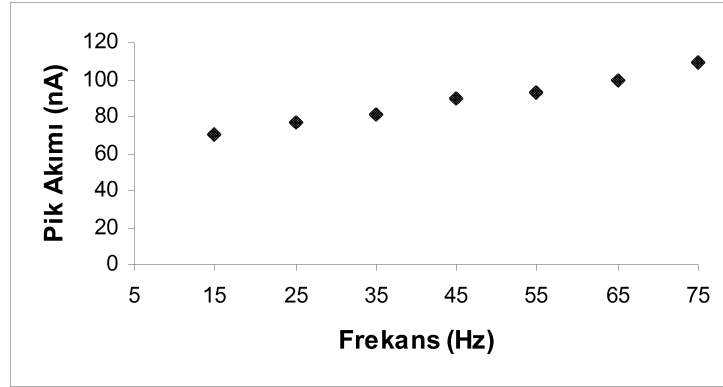
Bu yöntemde optimum cihaz parametrelerinin bulunması için seçilen destek elektrolitinde belirli bir EZE derişiminde biriktirme potansiyeli, adım yüksekliği, frekans, puls genliği ve biriktirme süresi değişiminin EZE'ye ait pik akımları üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.9 – Şekil 4.13).



Şekil 4.9. SWAdSV yönteminde EZE pik akımına biriktirme potansiyeli değişiminin etkisi (adım yüksekliği = 4 mV, frekans = 15 Hz, puls genliği = 25 mV, biriktirme süresi = 15 s)
(EZE derişimi : 300.00 ng /mL)



Şekil 4.10. SWAdSV yönteminde EZE pik akımına adım yüksekliği değişiminin etkisi (biriktirme potansiyeli = - 800 mV, frekans = 15 Hz, puls genliği = 25 mV, biriktirme süresi = 15 s)
(EZE derişimi : 300.00 ng /mL)

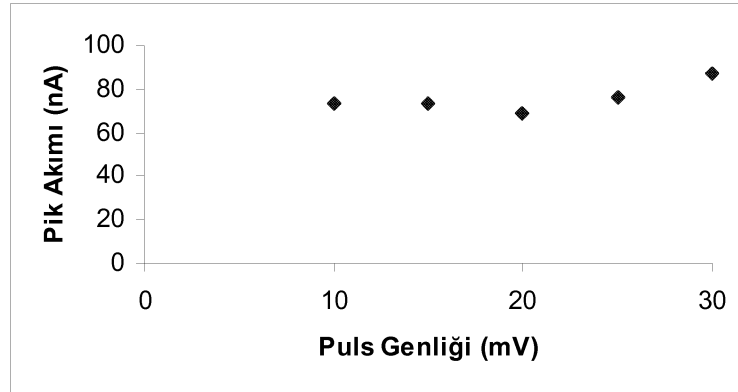


Şekil 4.11. SWAdSV yönteminde EZE pik akımına frekans değişiminin etkisi

(biriktirme potansiyeli = - 800 mV, adım yüksekliği = 4 mV,

puls genliği = 25 mV, biriktirme süresi = 15 s)

(EZE derişimi : 300.00 ng /mL)

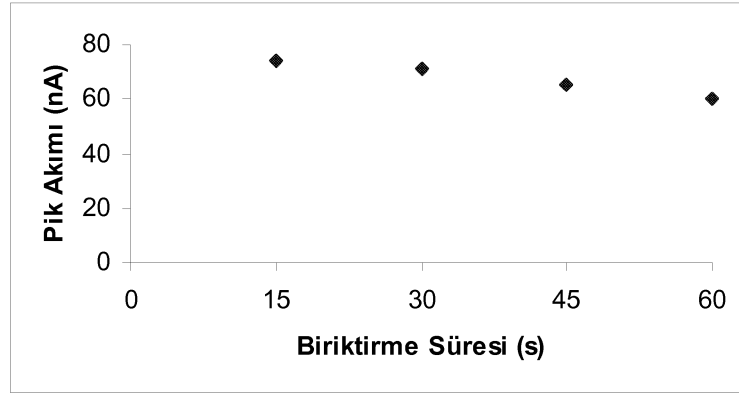


Şekil 4.12. SWAdSV yönteminde EZE pik akımına puls genliği değişiminin etkisi

(biriktirme potansiyeli = - 800 mV, adım yüksekliği = 4 mV,

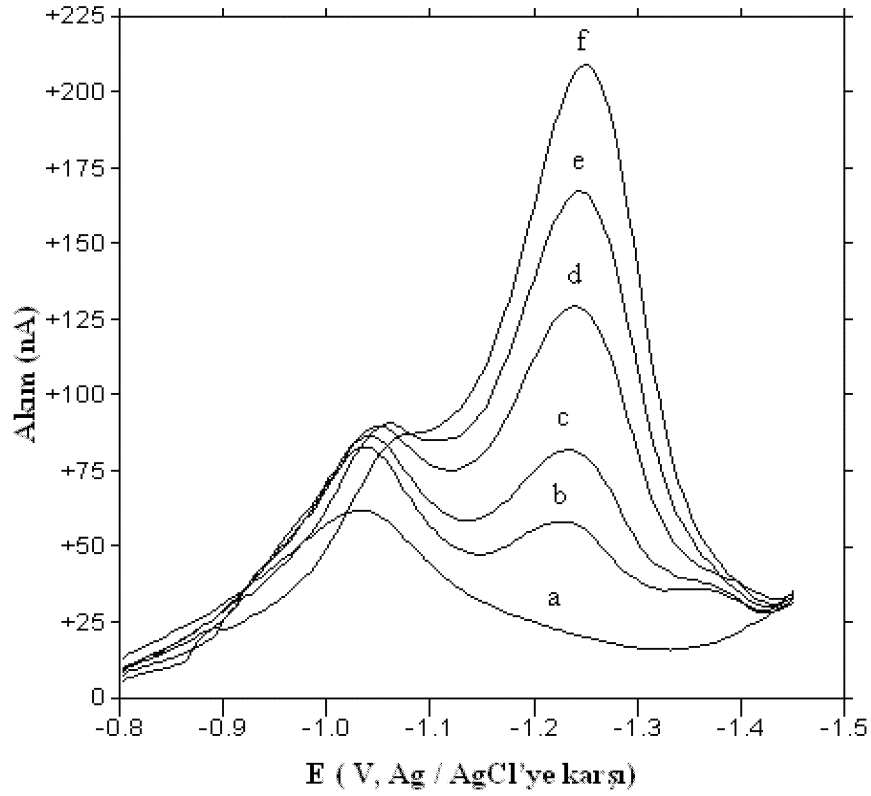
frekans = 15 Hz, biriktirme süresi = 15 s)

(EZE derişimi : 300.00 ng /mL)



Şekil 4.13. SWAdSV yönteminde EZE pik akımına biriktirme süresi değişiminin etkisi (biriktirme potansiyeli = - 800 mV, adım yüksekliği = 4 mV, frekans = 15 Hz, puls genliği = 25 mV)
(EZE derişimi : 300.00 ng /mL)

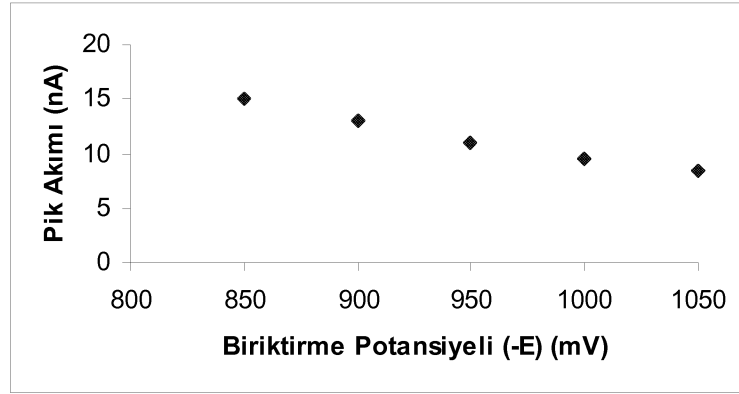
Pik şekli ve akım değerleri dikkate alındığında en uygun parametreler; biriktirme potansiyeli için -800 mV, adım yüksekliği için 4 mV, frekans için 15 Hz, puls genliği için 25 mV ve biriktirme süresi için 15 s olarak seçilmiştir. Belirlenen cihaz parametrelerinde ve 0.1 M, pH 9.0 $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tampon sisteminde EZE'ye ait kare dalga adsorptif sıyırma voltamogramları Şekil 4.14 de gösterilmiştir. Ayrıca -1.0 V'da gözlenen pik destek elektrolite aittir.



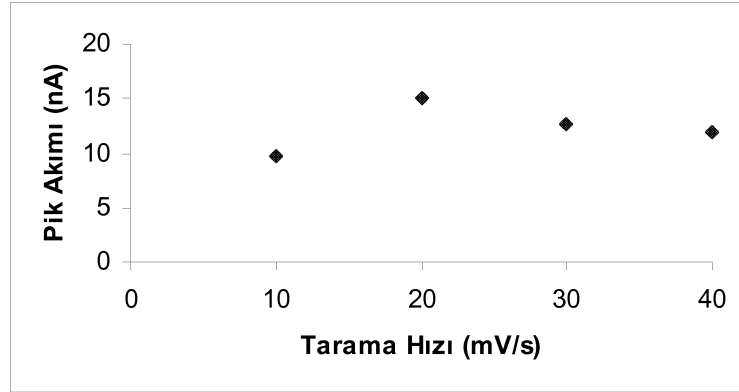
Şekil 4.14. EZE'in kare dalga adsorptif voltamogramları a) Destek elektrolit b) 66.00 ng/mL, c) 99.00 ng/mL, d) 323.00 ng/mL, e) 446.00 ng/mL f) 596.0 ng/mL EZE (biriktirme potansiyeli -800 mV, adım yüksekliği 4 mV, frekans 15 Hz, puls genliği 25 mV, biriktirme süresi 15 s)

4.2.2.3. DPAdSV Bulguları

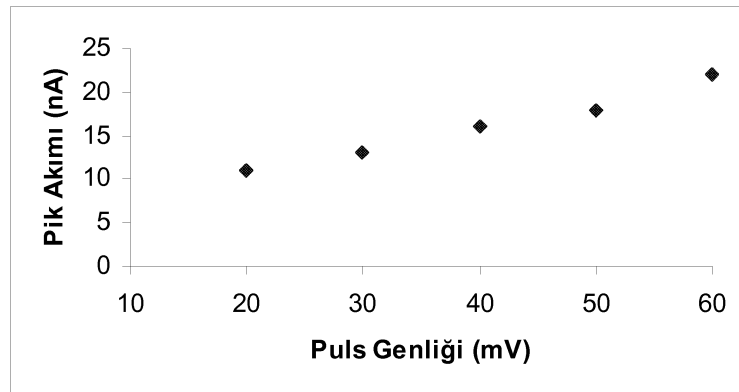
Bu yöntemde optimum cihaz parametrelerinin bulunması için seçilen destek elektrolitte belirli bir EZE derişiminde biriktirme potansiyeli, tarama hızı, puls genliği ve biriktirme süresi değişiminin EZE ait pik akımları üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.15 – Şekil 4.18).



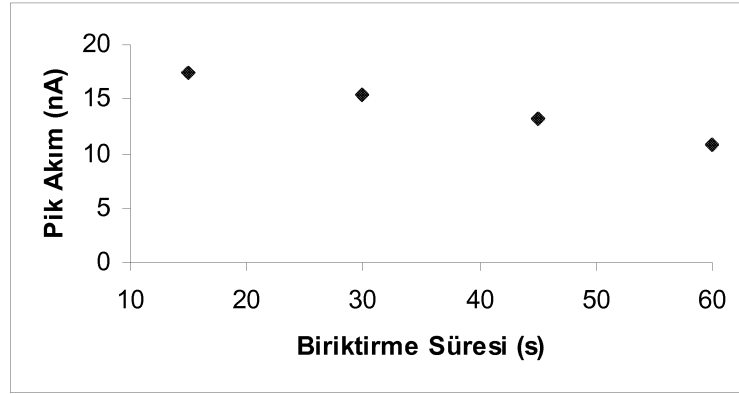
Şekil 4.15. DPAdSV yönteminde EZE pik akımına biriktirme potansiyeli değişiminin etkisi (tarama hızı = 20 mV/s, puls genliği = 50 mV, biriktirme süresi = 15 s) (EZE derişimi : 200.00 ng/mL)



Şekil 4.16. DPAdSV yönteminde EZE pik akımına tarama hızı değişiminin etkisi (biriktirme potansiyeli = - 850 mV, puls genliği = 50 mV, biriktirme süresi = 15 s) (EZE derişimi : 200.00 ng/mL)

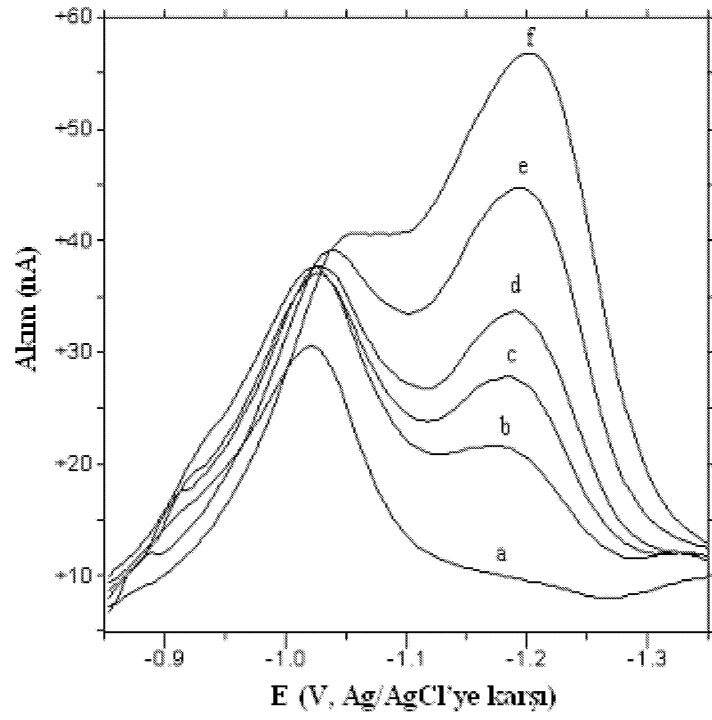


Şekil 4.17. DPAdSV yönteminde EZE pik akımına puls genliği değişiminin etkisi (biriktirme potansiyeli = - 850 mV, tarama hızı = 20 mV/s, biriktirme süresi = 15 s) (EZE derişimi : 200.00 ng/mL)



Şekil 4.18. DPAdSV yönteminde EZE pik akımına biriktirme süresi değişiminin etkisi (biriktirme potansiyeli = - 850 mV, tarama hızı = 20 mV/s, puls genliği = 50 mV) (EZE derişimi : 200.00 ng/mL)

Pik şekli ve akım değerleri dikkate alındığında en uygun parametreler; biriktirme potansiyeli için -850 mV, tarama hızı için 20 mV/s , puls genliği için 50 mV ve biriktirme süresi için 15 s olarak seçilmiştir. Belirlenen cihaz parametrelerinde ve 0.1 M, pH 9.0 $K_2HPO_4 - Na_2B_4O_7$ (1:1) tampon sisteminde EZE'ye ait diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltamogramları Şekil 4.19'de gösterilmiştir. Ayrıca -1.0 V'da gözlenen pik destek elektrolite aittir.



Şekil 4.19. EZE'in diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltamogramları a) Destek elektrolit b) 66.00 ng/mL, c) 115.00 ng/mL, d) 148.00 ng/mL, e) 212.00 ng/mL f) 400.00 ng/mL EZE (biriktirme potansiyeli – 850 mV, tarama hızı 20 mV / s, puls genliği 50 mV, biriktirme süresi 15 s)

4.3. Elektroanalitik Yöntemlerin Validasyonu

4.3.1. Kararlılık

EZE'in uzun ve kısa dönem kararlılık bulguları Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.2. EZE için uzun dönem kararlılık bulguları (Eklenen EZE derişimi SWV yöntemi için 1.32 µg/mL)

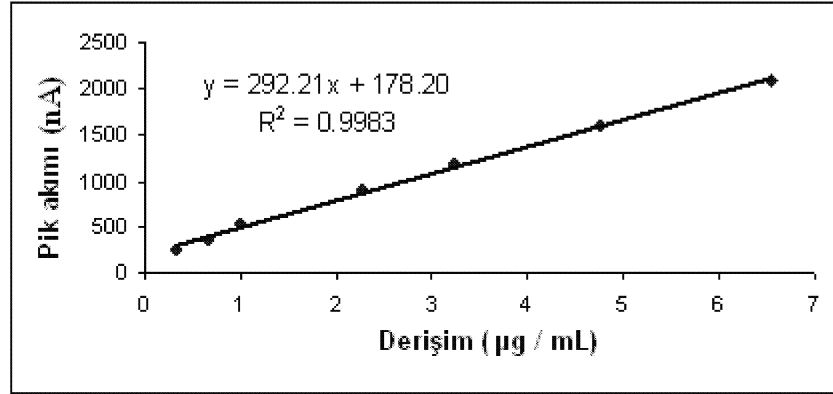
	1 saat	8 saat	24 saat	10 gün	20 gün	30 gün
Pik Potansiyeli (mV)	-1300	-1298	-1297	-1298	-1301	-1304
Pik Akımı (nA)	562.12	563.28	565.19	564.41	562.87	565.68
Bulunan miktar (µg/mL)	1.31	1.32	1.32	1.32	1.32	1.33
Geri Kazanım (%)	99.24	100.00	100.00	100.00	100.00	100.75

Tablo 4.3. EZE için kısa dönem kararlılık bulguları (Eklenen EZE derişimi SWV yöntemi için 1.32 µg mL⁻¹)

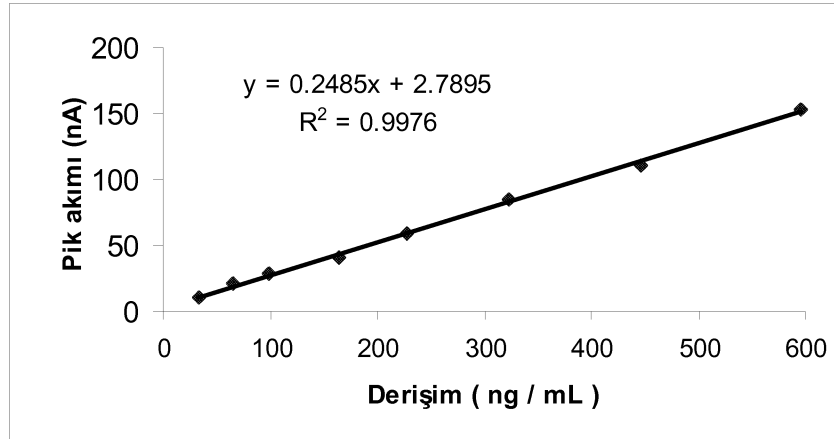
	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (nA)	Bulunan miktar (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
12 saat	-1299	563.67	1.32	100.00

4.3.2. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları

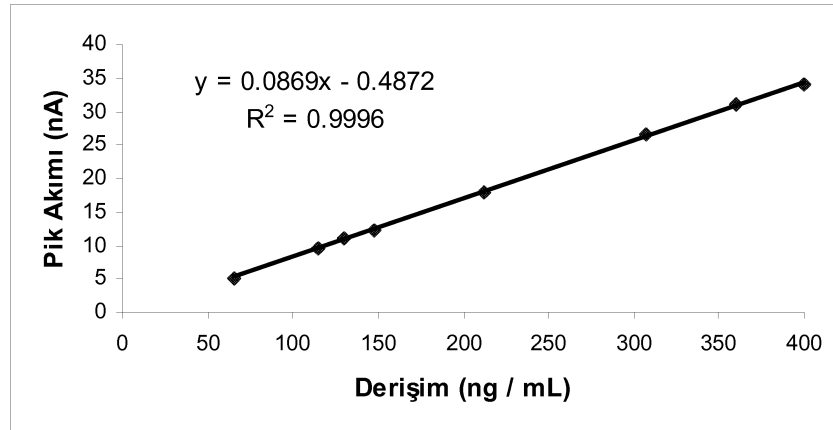
Her üç yöntemde EZE derişimine karşı pik akımları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil 4.20 - Şekil 4.22).



Şekil 4.20. EZE'in SWV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (n = 7)



Şekil 4.21. EZE'in SWAdSV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (n = 7)



Şekil 4.22. EZE'in DPAdSV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (n = 7)

Bu eğrilerin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları ise Tablo 4.4 – Tablo 4.6’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. EZE’in SWV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar

Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü						
n	r	Sr	t_H	t_T		
7	0.9991	9.129×10^{-3}	109.50	2.48		
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F_H	F_T
944708.47	945229.27	520.8	86.8	944708.47	10883.74	5.59

* Terimler Ek 1’de açıklanmıştır

Tablo 4.5. EZE’in SWAdSV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar

Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü						
n	r	Sr	t_H	t_T		
8	0.9987	14.10×10^{-3}	70.88	2.48		
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F_H	F_T
53931.53	53997.74	66.21	11.03	53931.53	4887.32	5.59

* Terimler Ek 1’de açıklanmıştır

Tablo 4.6. EZE'in DPAdSV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar

Korelasyon Katsayısının Önem Kontrolü						
n	r	Sr	t _H	t _T		
8	0.9998	17.79 x 10 ⁻³	5.62	2.48		
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
2291.45	2295.85	4.4	0.73	2291.45	3124.70	5.59

* Terimler Ek 1'de açıklanmıştır

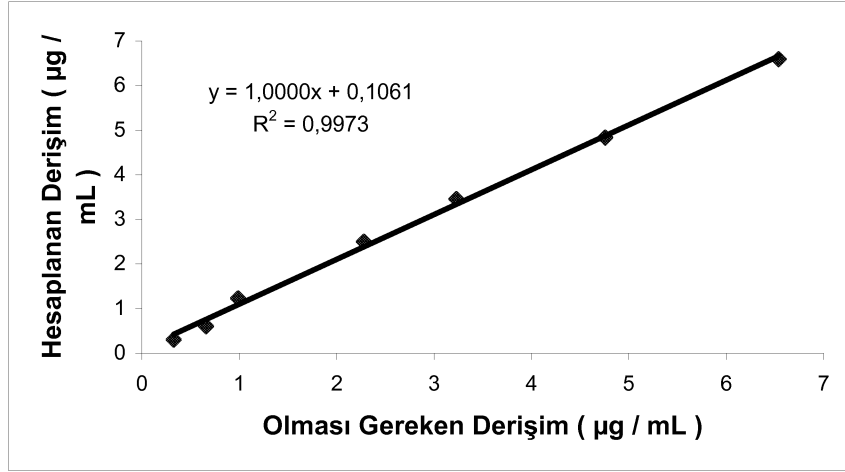
Geliştirilen her üç yöntem için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Önerilen elektroanalitik yöntemlere ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri (n = 7)

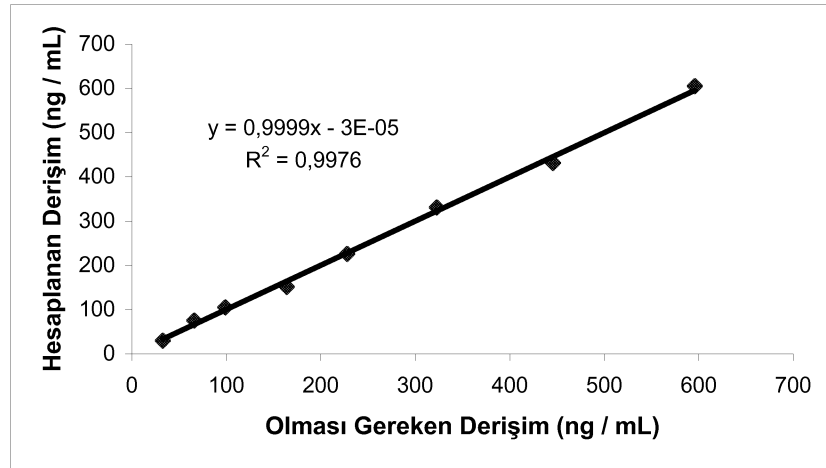
	SWV yöntemi	SWAdSV yöntemi	DPAdSV yöntemi
Regresyon Denklemi	$y^* = 292.21x + 178.20$	$y^* = 0.2485x + 2.7895$	$y^* = 0.0856x - 0.4872$
Eğimin standart hatası	0.85	0.54	0.37
Kesişimin standart hatası	1.04	0.63	0.23
Korelasyon katsayısı (r)	0.9991	0.9987	0.9998
Tanımlayıcılık katsayısı (R ²)	0.9983	0.9976	0.9996
Doğrusallık aralığı (ng/mL)	330.00 - 6540.00	33.00 - 596.00	66.00 - 400.00
LOD (ng/mL)	99.00	11.53	20.26
LOQ (ng/mL)	298.00	31.73	62.46

*y = ax + b; x: ng/mL biriminde derişim, y: Pik akımı (nA), a: Kesişim, b: Eğim.

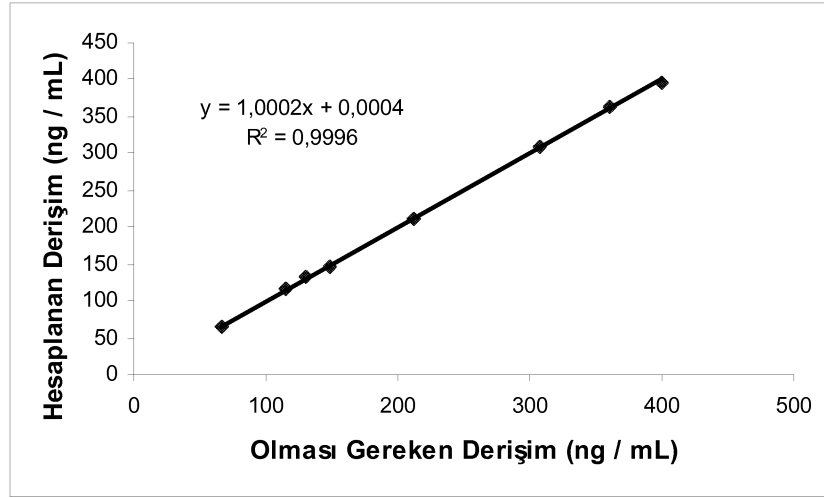
Yöntemlerin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrilerini oluşturan derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin analizleri yapıp kalibrasyon eğrileri denklemleri ile sonuçlar hesaplanmış ve olması gereken (nominal) derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.23 – Şekil 4.25).



Şekil 4.23. EZE'in SWV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği



Şekil 4.24. EZE'in SWAdSV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği



Şekil 4.25. EZE'in DPAdSV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği

4.3.3. Duyarlılık

EZE'in her üç voltametrik yöntemde LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

4.3.4. Kesinlik ve Doğruluk

EZE'in voltametrik yöntemlerle doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo 4.8 – Tablo 4.10'de verilmiştir.

Tablo 4.8. SWV yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları
(n = 6)

EZE miktarı (µg/mL)	Gün İçi ¹		Günler Arası ²	
	Bulunan miktar	% Bağlı hata	Bulunan miktar	% Bağlı hata
0.66	0.67	- 1.52	0.67	-1.52
	0.67	- 1.52	0.65	1.52
	0.67	- 1.52	0.66	0
	0.65	- 1.52	0.65	1.52
	0.67	1.52	0.65	1.52
	0.67	- 1.52	0.67	-1.52
$\bar{X}$	0.67 ± 0.003		0.66 ± 0.005	
SS	0.008		0.012	
BSS (%)	1.23		1.84	
2.28	2.29	-0.44	2.29	-0.44
	2.29	-0.44	2.27	0.44
	2.28	0	2.27	0.44
	2.27	0.44	2.30	-0.88
	2.30	-0.88	2.26	0.88
	2.28	0	2.27	0.44
$\bar{X}$	2.29 ± 0.004		2.28 ± 0.006	
SS	0.010		0.015	
BSS (%)	0.46		0.66	
4.76	4.77	-0.21	4.77	-0.21
	4.79	-0.63	4.78	-0.42
	4.77	-0.21	4.76	0
	4.75	0.21	4.77	-0.21
	4.78	-0.42	4.74	0.42
	4.77	-0.21	4.74	0.42
$\bar{X}$	4.77 ± 0.005		4.76 ± 0.004	
SS	0.013		0.007	
BSS (%)	0.28		0.35	

¹Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

²Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

$\bar{X}$: Ortalama ± Standart hata, SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

Tablo 4.9. SWAdSV yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları (n = 6)

EZE miktarı (ng/mL)	Gün İçi ¹		Günler Arası ²	
	Bulunan miktar	% Bağlı hata	Bulunan miktar	% Bağlı hata
66.00	67.12	-1.69	66.34	-0.52
	65.12	1.33	64.92	1.64
	65.87	0.20	66.49	-0.74
	66.71	-1.08	67.12	-1.69
	65.78	0.33	65.04	1.45
	66.46	-0.70	65.89	0.17
$\bar{X}$	66.34 $\pm$ 0.39		65.80 $\pm$ 0.46	
SS	0.95		1.13	
BSS (%)	1.43		1.72	
228.00	225.71	1.00	227.73	0.12
	225.15	1.25	229.66	-0.73
	229.12	-0.49	227.97	0.01
	227.40	0.26	232.48	-1.96
	227.34	0.29	229.77	-0.78
	228.89	-0.39	226.50	0.66
$\bar{X}$	227.28 $\pm$ 0.66		229.02 $\pm$ 0.86	
SS	1.61		2.10	
BSS (%)	0.71		0.92	
446.00	439.59	1.44	444.46	0.35
	447.49	-0.33	449.34	-0.75
	445.12	0.20	442.08	0.88
	446.12	-0.03	447.15	-0.26
	444.11	0.42	444.78	0.27
	446.36	-0.08	442.30	0.83
$\bar{X}$	444.80 $\pm$ 1.14		445.02 $\pm$ 1.15	
SS	2.80		2.82	
BSS (%)	0.62		0.63	

¹Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

²Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata, SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

Tablo 4.10. DPAdSV yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları (n = 6)

EZE miktarı (ng/mL)	Gün İçi ¹		Günler Arası ²	
	Bulunan miktar	% Bağlı hata	Bulunan miktar	% Bağlı hata
115.00	116.74	-1.51	115.14	-0.12
	115.58	-0.51	115.16	-0.14
	114.95	0.04	114.21	0.69
	113.05	1.70	116.00	-0.87
	115.11	-0.09	116.74	-1.51
	115.42	-0.37	114.53	0.41
$\bar{X}$	115.14 $\pm$ 0.49		114.96 $\pm$ 0.63	
SS	1.20		1.55	
BSS (%)	1.05		1.35	
212.00	212.67	-0.32	211.20	0.38
	211.98	0.94	215.78	-1.78
	210.97	0.49	214.78	-1.31
	212.45	-0.21	212.67	-0.32
	214.56	-1.21	211.04	0.45
	213.78	-0.84	210.54	0.69
$\bar{X}$	212.74 $\pm$ 0.52		212.96 $\pm$ 0.93	
SS	1.28		2.85	
BSS (%)	0.60		1.07	
360.00	362.45	-0.68	358.12	0.52
	359.12	0.24	359.34	0.18
	358.67	0.37	361.74	-0.48
	362.89	-0.80	364.07	-1.13
	363.19	-0.89	361.71	-0.48
	358.13	0.52	357.98	0.56
$\bar{X}$	360.74 $\pm$ 0.95		360.49 $\pm$ 0.98	
SS	2.33		2.41	
BSS (%)	0.65		0.67	

¹Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

²Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata, SS:Standart sapma, BSS:Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2)

4.3.5. Tekrarlanabilirlik

Önerilen her üç yöntem için tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.11 – Tablo 4.12’ de verilmiştir.

Cihaz Tekrarlanabilirliği

Tablo 4.11. Cihaz tekrarlanabilirliği bulguları (Eklenen EZE derişimi SWV yöntemi için 1.96 µg/mL , SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için 164.00 ng/mL) (n = 10)

SWV Yöntemi		SWAdSV Yöntemi		DPAdSV Yöntemi	
İp (nA)	Ep (mV)	İp (nA)	Ep (mV)	İp (nA)	Ep (mV)
750.76	-1305	43.12	-1244	13.71	-1198
748.98	-1304	42.48	-1247	13.97	-1200
752.56	-1300	43.13	-1246	14.12	-1201
754.75	-1306	42.87	-1246	14.24	-1199
751.09	-1300	42.46	-1247	13.56	-1202
752.61	-1303	43.89	-1248	13.87	-1200
753.78	-1306	43.91	-1245	14.19	-1198
746.14	-1307	42.05	-1244	14.04	-1199
748.43	-1305	42.76	-1243	13.85	-1201
750.18	-1301	42.69	-1245	13.87	-1199
$\bar{X} = 750.93 \pm 0.83$ SS = 2.62 BSS = % 0.76 GA = 752.45 – 749.41		$\bar{X} = 42.94 \pm 0.21$ SS = 0.60 BSS = % 0.98 GA = 43.43 – 42.45		$\bar{X} = 13.94 \pm 0.066$ SS = 0.21 BSS = % 0.96 GA = 14.11- 13.77	

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı
(α :0.05) (Bkz. Ek 2)

Yöntem Tekrarlanabilirliği

Tablo 4.12. Yöntem tekrarlanabilirliği bulguları (Eklenen EZE derişimi SWV yöntemi için 1.96 µg/mL , SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için 164.00 ng/mL) (n = 10)

SWV Yöntemi	SWAdSV Yöntemi	DPAdSV Yöntemi
Bulunan değer (µg/mL)	Bulunan değer (ng/mL)	Bulunan değer (ng/mL)
1.93	162.89	164.47
1.95	162.47	163.75
1,97	162.78	163.08
1.99	166.21	165.73
1.94	164.18	164.69
1.95	162.38	165.18
1.97	165.35	166.10
1.95	164.25	164.31
1,96	165.18	164.79
1.94	164.37	162.04
$\bar{X} = 1,96 \pm 0.006$ SS = 0.02 BSS = % 0.91 GA = 1.97 – 1.95	$\bar{X} = 164.01 \pm 0.42$ SS = 1.33 BSS = % 0.81 GA = 164.96 – 163.06	$\bar{X} = 164.41 \pm 0.38$ SS = 1.21 BSS = % 0.74 GA = 165.27 – 163.55

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı (α :0.05) (Bkz. Ek 2)

4.3.6. Sağlamlık ve Tutarlılık

Sağlamlık ve Tutarlılık çalışmalarına ait sonuçlar ve istatistiksel olarak karşılaştırma sonuçları Tablo 4.13 – Tablo 4.18 de verilmiştir.

Tablo 4.13. SWV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)

	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	BSS (%)	Karşılaştırma Sonuçları
pH = 9.00 Başlangıç Potansiyeli = -0.7 V (1.96 $\mu\text{g/mL}$)	1.95 ± 0.011	1.46	-
pH 8.90	1.96 ± 0.011	1.52	$T_H = 7.5$
pH 9.10	1.93 ± 0.011	1.37	$T_H = 5.0$
Başlangıç potansiyeli (-0.6 V)	1.94 ± 0.012	1.42	$T_H = 8.0$
Başlangıç potansiyeli (-0.8 V)	1.95 ± 0.007	0.87	$T_H = 8.5$

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla karşılaştırılmıştır. (Wilcoxon Testi)

T tablo = 2.0 (p > 0.05) Sonuçlar arasında fark yoktur.

Tablo 4.14. SWAdSV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)

	Bulunan (ng/mL)	BSS (%)	Karşılaştırma Sonuçları
pH = 9.00 Biriktirme potansiyeli = -0.8 V Biriktirme Süresi = 15 s (164.00 ng/mL)	163.38 ± 0.84	1.36	-
pH 8.90	162.41 ± 0.79	1.28	$T_H = 9.0$
pH 9.10	162.23 ± 0.62	1.00	$T_H = 7.0$
Biriktirme potansiyeli (-0.9 V)	163.01 ± 0.59	0.95	$T_H = 12.0$
Biriktirme potansiyeli (-0.7 V)	162.14 ± 0.69	1.13	$T_H = 12.0$
Biriktirme Süresi (10 s)	162.59 ± 0.67	1.09	$T_H = 12.0$
Biriktirme Süresi (20 s)	162.25 ± 0.41	0.67	$T_H = 9.0$

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla karşılaştırılmıştır. (Wilcoxon Testi)

T tablo = 2.0 (p > 0.05) Sonuçlar arasında fark yoktur.

Tablo 4.15. DPAdSV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)

	Bulunan (ng/mL)	BSS (%)	Karşılaştırma Sonuçları
pH = 9.00 Biriktirme potansiyeli = -0.8 V Biriktirme Süresi = 15 s (164.00 ng/mL)	164.04 ± 0.65	1.04	-
pH 8.90	163.21 ± 0.77	1.26	T _H = 9.5
pH 9.10	165.11 ± 0.49	0.79	T _H = 6.0
Biriktirme potansiyeli (-0.9 mV)	164.31 ± 0.94	1.51	T _H = 11.0
Biriktirme potansiyeli (-0.7 mV)	164.82 ± 0.83	1.33	T _H = 8.0
Biriktirme Süresi (10 s)	163.92 ± 1.01	1.64	T _H = 12.0
Biriktirme Süresi (20 s)	164.00 ± 0.74	1.19	T _H = 13.0

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla karşılaştırılmıştır. (Wilcoxon Testi)

T tablo = 2.0 (p > 0.05) Sonuçlar arasında fark yoktur.

Tablo 4.16. SWV yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları

SWV yöntemi (n = 7)		
	1. Analizci	2. Analizci
Eklenen miktar	Bulunan miktar (µg/mL)	Bulunan miktar (µg/mL)
EZE 1.96 µg/mL	1.94	1.95
	1.95	1.96
	1.97	1.98
	1.96	1.95
	1.97	1.95
	1.98	1.94
	1.96	1.94
$\bar{x}$	1.96 ± 0.004	1.95 ± 0.004
SS	0.01	0.01
BSS	0.66	0.74
GA	1.97 – 1.95	1.96 – 1.94
T _{Hesap} : 7.5 > T _{Tablo} : 2.0, p > 0.05 (Wilcoxon Testi)		

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı
(α :0.05) (Bkz. Ek 2)

Tablo 4.17. SWAdSV yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları

SWAdSV yöntemi (n = 7)		
	1. Analizci	2. Analizci
Eklenen miktar	Bulunan miktar (ng/mL)	Bulunan miktar (ng/mL)
EZE 164.00 ng/mL	162.87	163.90
	162.20	162.96
	163.25	164.08
	163.34	163.61
	163.43	163.48
	163.00	163.57
	163.41	164.13
$\bar{x}$	162.21 ± 0.079	163.68 ± 0.35
SS	0.21	0.41
BSS	0.13	0.25
GA	162.40 – 162.02	164.54 – 162.82
$T_{Hesap} : 5.0 > T_{Tablo} : 2.0, p > 0.05$ (Wilcoxon Testi)		

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı
($\alpha : 0.05$) (Bkz. Ek 2)

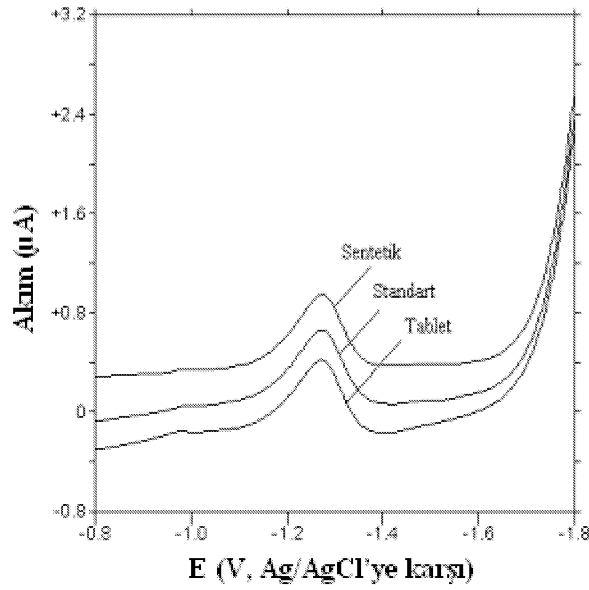
Tablo 4.18. DPAdSV yönteminin tutarlılığına ait analiz bulguları

DPAdSV yöntemi (n = 7)		
	1. Analizci	2. Analizci
Eklenen miktar	Bulunan miktar (ng/mL)	Bulunan miktar (ng/mL)
EZE 164.00 ng/mL	164.05	164.58
	163.00	164.68
	166.16	163.63
	164.16	165.11
	165.84	166.47
	162.37	164.26
	165.95	164.05
$\bar{x}$	164.50 ± 0.57	164.68 ± 0.35
SS	1.51	0.92
BSS	0.92	0.56
GA :	165.97 – 163.03	165.58 – 163.78
$T_{Hesap} : 13.0 > T_{Tablo} : 2.0, p > 0.05$ (Wilcoxon Testi)		

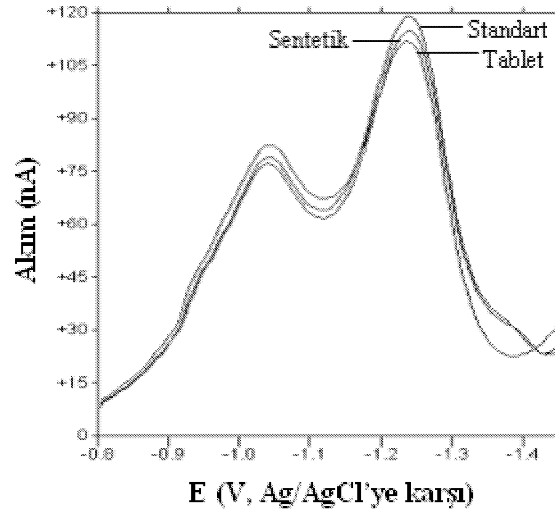
$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı
($\alpha : 0.05$) (Bkz. Ek 2)

4.3.7. Özgünlük (Seçicilik)

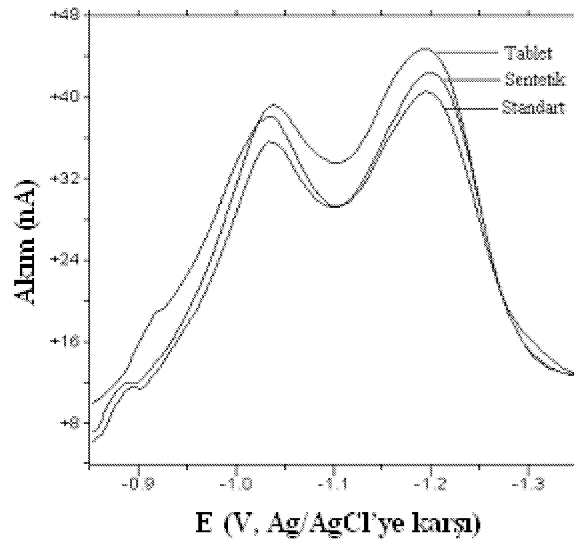
Yöntemlerin özgünlük çalışmalarının SWV, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için sırasıyla 1.64 $\mu\text{g/mL}$, 228.00 ng/mL ve 210.00 ng/mL EZE içeren standart, tablet ve sentetik preparat çözeltilerinin kaydedilen voltamogramları Şekil 4.26 – Şekil 4.28’de görülmektedir.



Şekil 4.26. 1.64 $\mu\text{g/mL}$ EZE içeren standart, tablet ve sentetik numune çözeltilerine ait SWV voltamogramları
(frekans 50 Hz, adım yüksekliği 3 mV, puls genliği 20 mV)



Şekil 4.27. 228.00 ng/mL EZE içeren standart, tablet ve sentetik numune çözeltilerine ait SWAdSV voltamogramları
(biriktirme potansiyeli -800 mV, adım yüksekliği 4 mV, frekans 15 Hz, puls genliği 25 mV, biriktirme süresi 15 s)



Şekil 4.28. 210.00 ng/mL EZE içeren standart, tablet ve sentetik numune çözeltilerine ait DPAdSV voltamogramları
(biriktirme potansiyeli – 850 mV, tarama hızı 20 mV/s, puls genliği 50 mV, biriktirme süresi 15 s)

4.4. Geri Kazanım

10 mg EZE içeren sentetik tablet çözeltisine ait geri kazanım değerleri Tablo 4.19'de verilmiştir.

Tablo 4.19. Sentetik preparatların analiz bulguları

(Eklenen EZE miktarı :10 mg / tablet) (n = 7)

SWV yöntemi		SWAdSV yöntemi		DPAdSV yöntemi	
Bulunan (mg)	% Geri Kazanım	Bulunan (mg)	% Geri Kazanım	Bulunan (mg)	% Geri Kazanım
9.91	99.1	10.04	100.4	10.18	101.8
10.04	100.4	10.23	102.3	9.95	99.5
10.13	101.3	10.17	101.7	9.87	98.7
10.09	100.9	9.94	99.4	10.21	102.1
9.96	99.6	9.91	99.1	10.15	101.5
9.91	99.1	9.98	99.8	10.17	101.7
10.08	100.8	10.14	101.4	10.09	100.9
$\bar{X} : 10.02 \pm 0.03$		$\bar{X} : 10.06 \pm 0.05$		$\bar{X} : 10.09 \pm 0.05$	
SS : 0.09		SS : 0.13		SS : 0.13	
BSS : 0.90		BSS : 1.28		BSS : 1.28	
GA : 10.09 – 9.95		GA : 10.18 – 9.94		GA : 10.21 – 9.97	

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı (α :0.05) (Bkz. Ek 2)

4.5. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları

10 mg EZE içeren Ezetrol® tabletlerin analizleri geliştirilen üç voltametrik yöntemle ve karşılaştırma yöntemi (29) ile yapılmış olup veriler Tablo 4.20’de gösterilmiştir.

Tablo 4.20. Ezetrol® tablete ait kalibrasyon grafiği yöntemi ile elde edilen analiz bulguları (10 mg EZE / tablet) (n = 7)

SWV Yöntemi	SWAdSV Yöntemi	DPAdSV Yöntemi	Karşılaştırma Yöntemi (29)
Bulunan (mg)	Bulunan (mg)	Bulunan (mg)	Bulunan (mg)
9.87	10.09	10.11	10.22
10.04	9.98	10.02	10.15
10.13	10.27	9.87	10.02
10.04	10.08	9.96	10.04
10.26	10.06	10.12	10.20
10.09	9.95	9.84	10.06
10.03	9.89	10.07	10.17
$\bar{X} : 10.07 \pm 0.05$ SS : 0.12 BSS : 1.17 GA : 10.19 – 9.95	$\bar{X} : 10.05 \pm 0.05$ SS : 0.12 BSS : 1.23 GA : 10.17 – 9.93	$\bar{X} : 10.00 \pm 0.04$ SS : 0.11 BSS : 1.12 GA : 10.10 – 9.90	$\bar{X} : 10.12 \pm 0.03$ SS : 0.08 BSS : 0.79 GA : 10.19 – 10.05
Kruskal Wallis varyans analizi $KW_T = 7.815 > KW_H = 3.71, p < 0.05$			

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma. GA: Güven Aralığı ($\alpha : 0.05$) (Bkz. Ek 2)

Tablo 4.21. Ezetrol® tablete ait standart ekleme yöntemi ile elde edilen analiz bulguları (10 mg EZE / tablet) (n = 7)

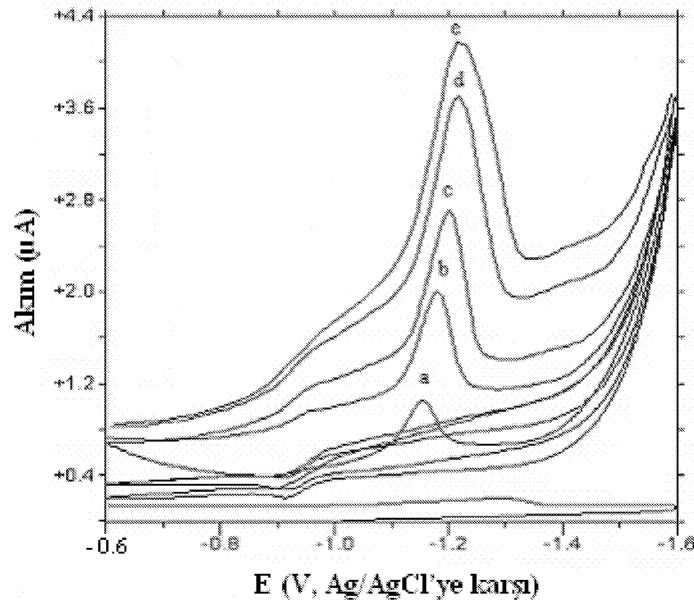
SWV Yöntemi	SWAdSV Yöntemi	DPAdSV Yöntemi	Karşılaştırma Yöntemi (29)
Bulunan (mg)	Bulunan (mg)	Bulunan (mg)	Bulunan (mg)
10.09	9.93	10.10	9.89
10.02	10.02	10.06	9.96
9.91	10.07	10.02	10.05
9.96	10.14	9.96	10.11
10.03	9.87	9.98	10.18
10.09	9.98	10.03	9.93
10.05	10.04	10.09	9.95
$\bar{X} : 10.02 \pm 0.02$ SS : 0.06 BSS : 0.66 GA :10.07 – 9.97	$\bar{X} : 10.00 \pm 0.03$ SS : 0.09 BSS : 0.90 GA :10.07 – 9.93	$\bar{X} : 10.03 \pm 0.02$ SS : 0.05 BSS : 0.53 GA :10.08 – 9.98	$\bar{X} : 10.01 \pm 0.04$ SS : 0.11 BSS : 1.06 GA :10.11 – 9.91
Kruskal Wallis varyans analizi $KW_T = 7.815 > KW_H = 2.19, p < 0.05$			

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata. SS: Standart Sapma. BSS: % Bağlı Standart Sapma. GA: Güven Aralığı ($\alpha :0.05$) (Bkz. Ek 2)

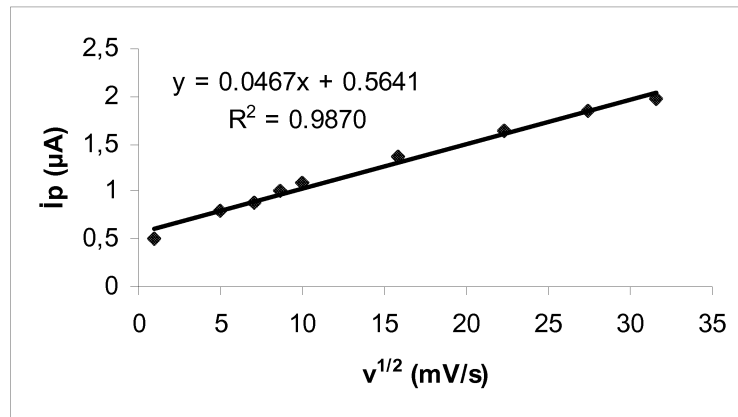
4.6. EZE'in Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

4.6.1. CV Yönteminde Pik Akımları üzerine Tarama Hızının Etkisi

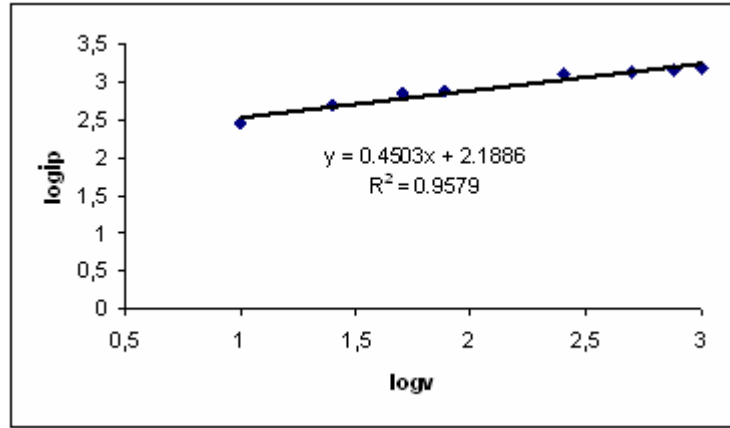
CV yöntemi uygulanarak EZE'in pik akımlarının ($\dot{I}_p$) tarama hızı (v) ile ilişkisi incelenmiştir. Farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.29). Şekil 4.30'de $\dot{I}_p - v^{1/2}$ ve Şekil 4.31'da $\log \dot{I}_p - \log v$ grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.29. 8.26 µg/mL EZE'in pH 9.0'da farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları a) 25 mV /s b) 50 mV /s c) 100 mV /s d) 250 mV /s e) 500 mV /s



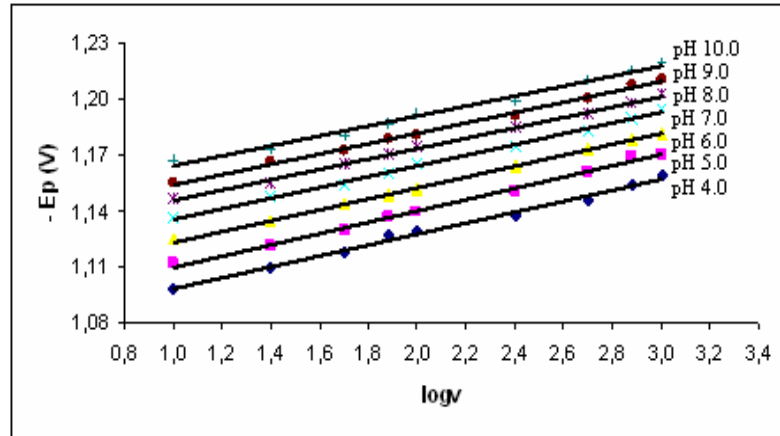
Şekil 4.30. 8.26 µg/mL EZE'in pH 9.0'da $\dot{I}_p - v^{1/2}$ grafiği



Şekil 4.31. 8.26 µg/mL EZE'in pH 9.0'da logİp – logv grafiği

4.6.2. CV Yönteminde Pik Potansiyelleri Üzerine Tarama Hızının etkisi

EZE'in indirgenme pikinin potansiyeline farklı pH değerlerinde tarama hızının etkisi CV yöntemi ile incelenmiştir. Tarama hızının logaritmasına karşı pik potansiyelleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.32). Elde edilen doğruların denklemleri Tablo 4.22'de verilmiştir.



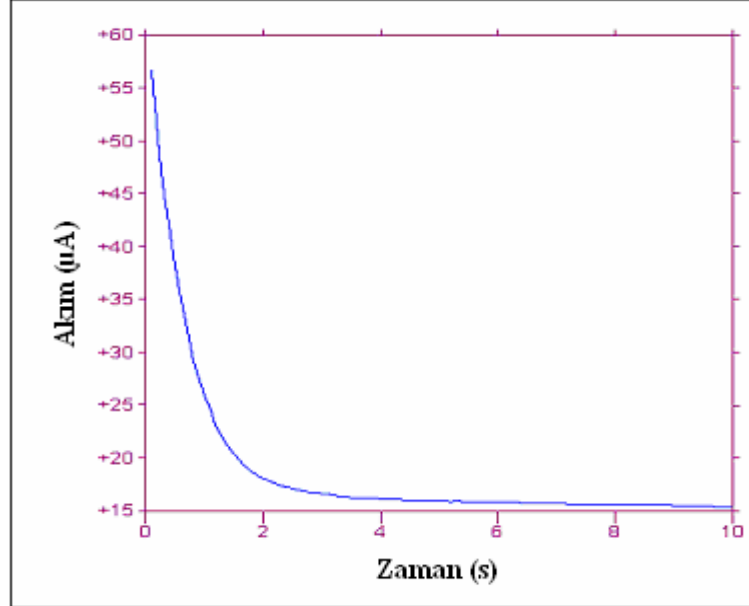
Şekil 4.32. 8.26 µg mL⁻¹ EZE'in farklı pH değerlerinde kaydedilen dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen Ep – logv grafikleri

Tablo 4.22. 8.26 $\mu\text{g/mL}$ EZE'in pik potansiyellerinin $\log v$ ile değişimlerinin doğru denklemleri

pH	Eşitlik
4.0	$E_p (\text{V}) = - 0.0303 \log v - 1.0950$
5.0	$E_p (\text{V}) = - 0.0295 \log v - 1.1025$
6.0	$E_p (\text{V}) = - 0.0291 \log v - 1.1175$
7.0	$E_p (\text{V}) = - 0.0286 \log v - 1.1250$
8.0	$E_p (\text{V}) = - 0.0280 \log v - 1.1398$
9.0	$E_p (\text{V}) = - 0.0274 \log v - 1.1480$
10.0	$E_p (\text{V}) = - 0.0259 \log v - 1.1561$

4.6.3. Kronoamperometri Bulguları

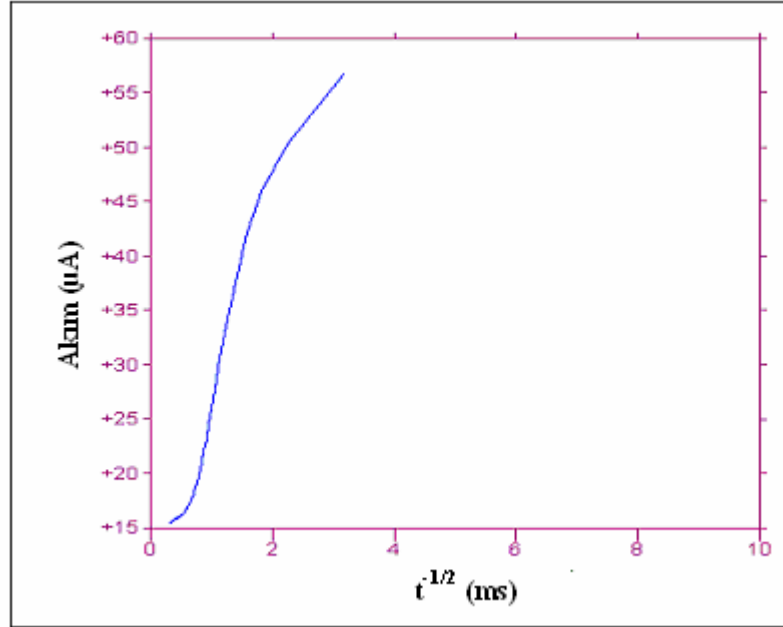
EZE çözeltisinin $[(-1070) - (-1300)]$ mV'luk potansiyel aralığında CA çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Akımın zamanla değişim grafiği Şekil 4.33'da, akımın zamanın kareköküyle değişim grafiği Şekil 4.34'de verilmiştir.



Şekil 4.33. 63.00 $\mu\text{g/mL}$ EZE'in kronoamperometrik voltamogramı ($\dot{I} - t$)

Başlangıç potansiyeli $E_1 = - 1070$ mV,

İndirgenmenin olduğu potansiyel $E_2 = - 1300$ mV



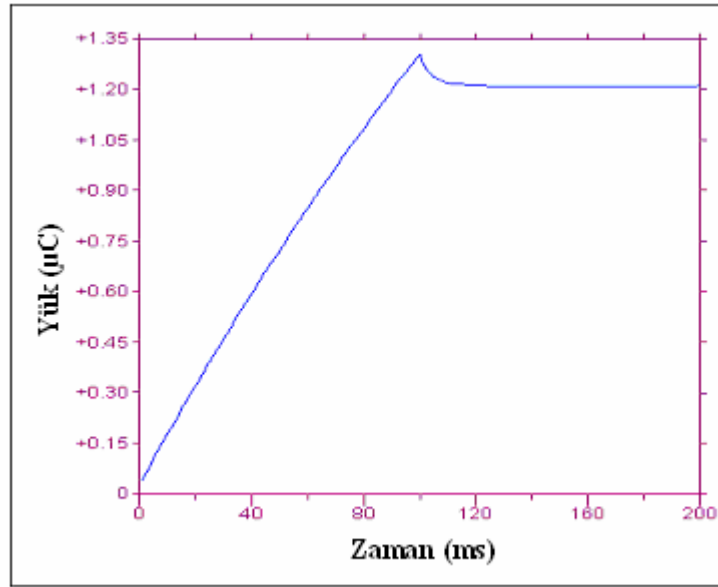
Şekil 4.34. 63.00 $\mu\text{g/mL}$ EZE'in kronoamperometrik voltamogramı ($I - t^{1/2}$)

Başlangıç potansiyeli $E_1 = -1070$ mV,

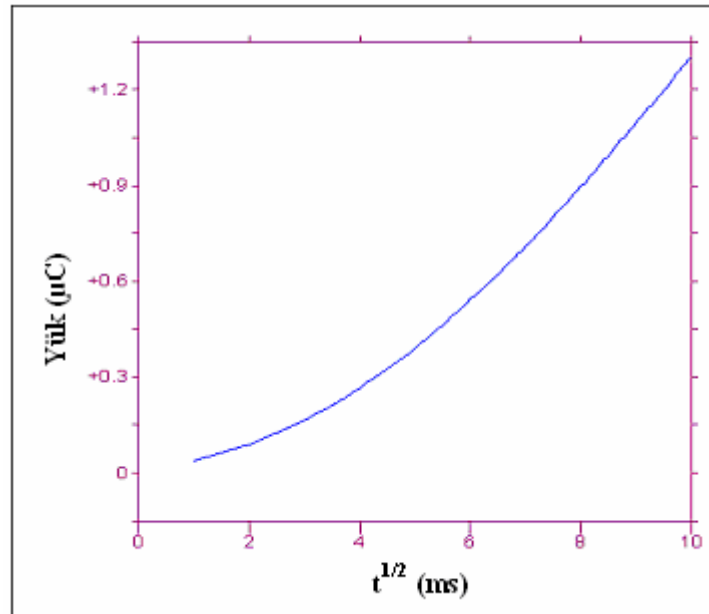
İndirgenmenin olduğu potansiyel $E_2 = -1300$ mV

4.6.4. Kronokulometri Bulguları

EZE çözeltisinin $[(-1070) - (-1300)]$ mV'luk potansiyel aralığında CC çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elektrot tepkimesi sonucu oluşan yükün zamanla değişim grafiği Şekil 4.35'de, yükün zamanın kareköküyle değişim grafiği Şekil 4.36'da verilmiştir.



Şekil 4.35. 63.00 µg/mL EZE'in kronokulometrik voltamogramı (Q – t)
 Başlangıç potansiyeli $E_1 = -1070$ mV,
 İndirgenmenin olduğu potansiyel $E_2 = -1300$ mV



Şekil 4.36. 63.00 µg/mL EZE'in kronokulometrik voltamogramı (Q – $t^{1/2}$)
 Başlangıç potansiyeli $E_1 = -1070$ mV
 İndirgenmenin olduğu potansiyel $E_2 = -1300$ mV

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında kolesterol tedavisinde kullanılan ve lipit düşürücü bir madde olan EZE'in farmasötik preparatlardan analizi için SWV, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri geliştirilmiştir. Ayrıca CV, CA ve CC yöntemleri ile EZE'in elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. Geliştirilen elektroanalitik yöntemlerin validasyon çalışmaları yapıldıktan sonra farmasötik preparatlara uygulanabilirliği gösterilmiştir.

EZE'in çeşitli çözücülerdeki çözünürlükleri incelenmiş, su ve asetonitril gibi organik çözücülerde kısmen, MeOH'da ise tamamen çözündüğü görülmüştür. Sonuçta çözücü olarak MeOH seçilmiştir. Stok EZE çözeltileri MeOH'da hazırlanmış, gerekli seyreltmeler MeOH ile yapılmıştır.

EZE'in saflığının araştırılması amacıyla erime noktası tayini yapılmış (161 - 162 °C), UV ve IR spektrumları alınmıştır (Bkz. Şekil 4.1- Şekil 4.2) EZE yeni bir madde olduğu için kaynaklarda IR spektrumuna rastlanmamıştır. Bu nedenle kaydedilen IR spektrumundan elde edilen piklerin kaynaklardaki grup frekans tablolarından yararlanılarak hangi gruplara ait olduğu belirlenmiştir (61-63). EZE'in IR spektrumundaki piklerin değerlendirilmesi Tablo 5.1'de görülmektedir.

Tablo 5.1. EZE molekülüne ait IR spektrumunun değerlendirme sonuçları

Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Grup
3222.33	O – H gerilme (Alifatik, Aromatik)
3000.00	C – H gerilme (Aromatik)
2913.97	C – H gerilme (Alifatik)
1714.26	C = O gerilme
1614.00 – 1400.00	C = C gerilme (Aromatik)
1354.00	O – H eğilme
1217.81	C – F gerilme (Aromatik)
1065.65	C – OH gerilme
1012.73 – 900.30	C – OH eğilme
829.55 – 817.98	p-substite benzen eğilme
792.05 – 770.35	C = C eğilme
733.31	C – H eğilme (Alifatik)

Elde edilen verilere göre kullanılan standartın bu çalışmayı yürütebilecek saflıkta bir madde olduğu sonucuna varılmıştır (35,29).

5.1. Destek Elektrolit Seçimi

Çalışmalarda ilk olarak en uygun destek elektrolitin belirlenebilmesi amacıyla EZE'in belirli bir derişim aralığında (0.33 – 6.54 $\mu\text{g/mL}$) fosfat, asetat, borat ve $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (1:1) tampon sistemleri denenmiştir. EZE'in $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (1:1) tampon sisteminde indirgenme piki verdiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.3). Tampon tipi belirlendikten sonra tampon derişimi etkisi incelenmiştir. Pikin yüksekliği ve pikin şekli göz önüne alındığında tampon derişimi olarak 0.1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (1:1) tampon sistemi seçilmiştir (Bkz. Tablo 4.1). Bu tampon sisteminde değişik pH değerlerinde (pH 4.0 – pH 10.0) EZE'in pik akımı değerleri ölçülmüştür.

Bu çalışmalar daha hızlı bir yöntem olduğu için SWV yöntemi ile yapılmış ve EZE'e ait pik akımının en yüksek olduğu ve pik şeklinin en düzgün olduğu destek elektrolit seçilmiştir. pH 4.0, pH 5.0 ve pH 6.0' da denenilen tampon sisteminde EZE'e ait piklerin simetrik olmadığı ve küçük derişimlerde pik görülmediği belirlenmiştir. pH 7.0 ve pH 8.0'deki tampon sisteminde ise pH 4.0, pH 5.0 ve pH 6.0 ye göre küçük derişimlerin gözlenebildiği fakat piklerin çok simetrik olmadığı tespit edilmiştir. pH 9.0 ortamında elde edilen EZE'e ait pik akımlarının pH 7.0, pH 8.0 ve pH 10.0 ortamındakine göre daha yüksek (Bkz. Şekil 4.4) ve piklerin daha simetrik olduğu görülmüştür. Bu nedenle destek elektrolit olarak 0.1 M, pH 9.0 $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (1:1) tampon sistemi seçilmiştir.

5.2. Cihaz parametrelerinin optimizasyonu

SWV yönteminde belli bir derişimde (1.64 $\mu\text{g/mL}$ EZE) frekans (10 – 100 Hz), adım yüksekliği (2 – 6 mV) ve puls genliği (5 – 45 mV) değişiminin EZE'in pik akımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.5 – Şekil 4.7). Pik akımı ile birlikte pik şeklinin düzgünlüğü de göz önüne alınarak optimum cihaz parametreleri olarak; frekans için 50 Hz, adım yüksekliği 3 mV ve puls genliği 20 mV seçilmiştir.

SWAdSV yöntemi için ise belirli bir derişimde (300.00 ng/mL EZE) biriktirme potansiyeli [-800 – (-1050 mV)], adım yüksekliği (2 – 5 mV), frekans

(15 – 75 Hz), puls genliği (10 – 30 mV) ve biriktirme süresi (15 – 60 s) değişiminin EZE'in pik akımı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.9 – Şekil 4.13). Pik akımı yanında pik şeklinin düzgünlüğü de göz önüne alınarak optimum cihaz parametreleri; -800 mV'luk biriktirme potansiyelinde, frekans 15 Hz, adım yüksekliği 4 mV, puls genliği 25 mV ve biriktirme süresi 15 s seçilmiştir.

DPAAdSV yöntemi için ise belirli bir derişimde (200.00 ng/mL EZE) biriktirme potansiyeli [-850 – (-1050 mV)], tarama hızı (10 – 40 mV/s), puls genliği (20 – 60 mV) ve biriktirme süresinin (15 – 60 s) değişiminin EZE'in pik akımı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.15 – Şekil 4.18). Pik akımı ile birlikte pik şeklinin düzgünlüğü de göz önüne alınarak optimum cihaz parametreleri; -850 mV'luk biriktirme potansiyelinde, tarama hızı 20 mV/s, puls genliği 50 mV ve biriktirme süresi 15 s seçilmiştir.

5.3. Yöntemlerin Validasyonu

Geliştirilen yöntemlerin validasyonu için kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, doğruluk, kesinlik, özgünlük (seçicilik), sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları yapılmıştır.

Kararlılık

Çalışılan maddenin 1000 µg/mL derişimindeki stok çözeltilerin oda sıcaklığında ve buzdolabındaki kararlılığının belirlenmesi amacıyla SWV voltamogramları incelenmiştir. Bu çözeltilerden 100 µg/mL'lik çözeltiler hazırlanarak SWV voltamogramları alınmış ve taze hazırlanmış çözeltilerin voltamogramları ile karşılaştırılmıştır. Voltamogramlarda elde edilen sinyallerde herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Çalışılan maddenin stok çözeltilerinin buzdolabında minimum bir ay kararlı, oda sıcaklığında ise 12 saat olduğu söylenebilir (Bkz. Tablo 4.2 – Tablo 4.3).

Doğrusallık

Her üç yöntemde de kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması ve doğrusallık aralıklarının belirlenmesi için EZE'in derişimine karşı gözlenen pik akımları grafiğe geçirilmiştir. SWV yöntemi ile 0.33 – 6.54 µg/mL, SWAdSV yöntemi ile 33.00 – 596.00 ng/mL, DPAdSV yöntemi ile 66.00 – 400.00 ng/mL aralığında doğrusal olan kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.20 – Şekil 4.22). Her üç yöntem için doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü yapılmıştır (Bkz. Tablo 4.4 - Tablo 4.6). SWV yöntemi için $F_H = 10883.74 > F_T = 5.59$; SWAdSV yöntemi için $F_H = 4887.32 > F_T = 5.59$; DPAdSV yöntemi için $F_H = 3124.70 > F_T = 5.59$ ($p < 0.05$) değerleri elde edilmiş ve bu sonuçlara göre doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu bulunmuştur. Ayrıca korelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak bu katsayıların istatistiksel olarak önemli değerler olduğu bulunmuştur. (SWV yöntemi için $t_H = 109.50 > t_T = 2.48$, SWAdSV yöntemi için $t_H = 70.88 > t_T = 2.48$, DPAdSV yöntemi için $t_H = 5.62 > t_T = 2.48$, $p < 0.05$).

Önerilen voltametrik yöntemlere ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Yöntemlerin doğrusallığı için kontrol grafikleri çizilmiştir. Grafik yönteminde standart çözeltilerin olması gereken derişimlerine karşı kalibrasyon denkleminde bulunan derişimleri grafiğe geçirilmiştir. (Bkz. Şekil 4.23 – Şekil 4.25). Bu grafiklerde tanımlayıcılık katsayıları (R^2) , SWV, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için sırasıyla 0.9973, 0.9976 ve 0.9996 olarak eğimler sırasıyla 1.0000, 0.9999 ve 1.0002 olarak bulunmuştur. Eğimlerin ve tanımlayıcılık katsayılarının yaklaşık olarak 1.0000 bulunması, çizilen kalibrasyon eğrilerinin bir doğru olduğunu göstermektedir.

Duyarlılık

LOD ve LOQ Bölüm 3.7'de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır (60). Buna göre EZE'in LOD değerleri SWV yönteminde 99.00 ng/mL, SWAdSV yönteminde 11.53 ng/mL, DPAdSV yönteminde 20.26 ng/mL olarak bulunmuştur ($n = 7$). LOQ değerleri SWV yönteminde $298.00 \text{ ng mL}^{-1}$, SWAdSV yönteminde 31.73 ng mL^{-1} , DPAdSV yönteminde 62.46 ng/mL olarak bulunmuştur ($n = 7$) (Bkz. Tablo 4.7).

Bulunan LOD ve LOQ değerlerinin düşük olması geliştirilen her üç voltametrik yöntemin oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir.

Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, ölçülen ve doğru kabul edilen değerler arasındaki uyumun bir ölçüsüdür ve % bağıl hata (BH) ile belirlenmektedir. Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için bilinen numunelerde en az 3 farklı derişimde her derişim için en az 3 analiz sonucu bulunmalıdır.

Kesinlik, sonuçların tekrarlanabilirliğinin göstergesidir. Hazırlanan standart numunelerin yapılan tekrarlı analizleri sonucunda saptanan BSS terimi ile tanımlanır. BSS, standart sapmanın ortalamaya göre yüzde kaçlık bir değişim gösterdiğini belirtir.

EZE'in voltametrik yöntemlerle tayininde SWV yöntemi için 0.66, 2.28 ve 4.76 µg/mL, SWAdSV yöntemi için 66.00, 228.00 ve 446.00 ng/mL ve DPAdSV yöntemi için 115.00, 212.00 ve 360.00 ng/mL derişimlerde gün içi ve günler arası tekrarlı analizler yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda 3 farklı derişim seviyesinde altı tane hazırlanan standart çözeltilerin analizleri aynı gün yapılmış, elde edilen bulguların SWV yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 0.28 – 1.23 arasında, % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak % 0 – 1.52 arasında; SWAdSV yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 0.62 – 1.43 arasında, % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak % 0.03 – 1.69 arasında ve DPAdSV yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 0.60 – 1.05 arasında; % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak % 0.04 – 1.70 arasında bulunmuştur. Günler arası çalışmalar ise; üç farklı derişim seviyesinde ardışık altı ayrı günde hazırlanan çözeltilerin analizi ile yapılmış ve elde edilen bulguların SWV yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 0.35 – 1.84 arasında, % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak % 0 – 1.52 arasında; SWAdSV yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 0.63 – 1.72 arasında, % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak % 0.01 – 1.96 arasında ve DPAdSV yöntemi için bağıl standart sapma değerleri % 0.67 – 1.35 arasında, % bağıl hata değerleri de mutlak değer olarak % 0.12 – 1.78 arasında bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.8 - Tablo 4.10).

Geliştirilen her üç yöntemde de gün içi ve günler arası için % bağıl hata değerlerinin % 2'den az olması yöntemlerin doğruluğunu göstermektedir. Bağıl standart sapmanın her üç yöntemde de % 2'in altında olması yöntemlerin kesinliğinin oldukça iyi olduğunu belirtir (64).

Tekrarlanabilirlik

Cihaz tekrarlanabilirliği; SWV yönteminde 1.96 µg/mL, SWAdSV ve DPAdSV yöntemlerinde 164.00 ng/mL EZE içeren çözeltinin tekrarlı analizleri ile gerçekleştirilmiştir. EZE'in SWV, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için pik akımlarının BSS değerleri sırasıyla % 0.76, % 0.98, % 0.96 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.11). Bağıl standart sapmalarının % 1'den düşük olması cihaz tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir (65) .

Geliştirilen yöntemlerin tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla, doğrusallık aralığına giren bir derişim değerinde hazırlanan (SWV yöntemi için 1.96 µg/mL, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için 164.00 ng/mL) 10 çözelti analiz edilip EZE için miktar tayini yapılmıştır (Bkz. Tablo 4.12). BSS değerlerinin SWV yöntemi için % 0.91 SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için sırasıyla % 0.81 ve % 0.74 bulunması yöntemlerin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir (64).

Sağlamlık

Sağlamlık çalışmaları için optimum şartlarda küçük değişiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalar SWV yöntemi için 1.96 µg/mL, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için 164.00 ng/mL derişimlerde gerçekleştirilmiştir. Her bir değişiklikte yapılan analiz sonuçları optimum şartlarda bulunan analiz sonuçları ile Wilcoxon testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Tüm karşılaştırmalarda T_H değeri T_T değerinden büyük olduğu için analizler arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Bkz. Tablo 4.13 – Tablo 4.15). Bu sonuçlar EZE analizi için geliştirilen yöntemlerin sağlam olduğunu göstermektedir.

Tutarlılık

Tutarlılık çalışmaları için farklı analizci etkisi araştırılmış ve bulunan değerler Wilcoxon testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalar SWV yöntemi

için 1.96 µg/mL, SWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için 164.00 ng/mL de gerçekleştirilmiştir. Farklı iki analizci tarafından elde edilen bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması yöntemlerin tutarlı olduğunu göstermektedir (SWV yöntemi için $T_H = 7.50 > T_T = 2.00$, SWAdSV yöntemi için $T_H = 5.00 > T_T = 2.00$, DPAdSV yöntemi için $T_H = 13.00 > T_T = 2.00$; $p > 0.05$) (Bkz. Tablo 4.16 - Tablo 4.18).

Özgünlük (Seçicilik)

Özgünlük (Seçicilik), yöntemin diğer maddeler varlığında analizi yapılan maddenin miktarını doğru olarak tayin edebilme yeteneğidir. Geliştirilen yöntemlerin özgünlüğü; sentetik preparat, tablet ve standart çözeltilerin voltamogramlarının karşılaştırılması ile gösterilmiştir. Sentetik preparat ve tablet çözeltilerindeki EZE'in pik akımlarının standard çözeltinin pik akımlarına eşit olduğu şekillerde görülmektedir (Bkz. Şekil 4.26 – Şekil 4.28). Buna göre yöntemin özgün olduğu söylenebilir.

Ayrıca her üç yöntem için yöntemin özgünlüğü, standart ekleme yönteminin tablet çözeltilerine uygulanması ile gösterilmiştir. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri SWV yöntemi için $y = 291.39x + 315.17$, SWAdSV yöntemi için $y = 0.2512x + 11.62$ ve DPAdSV yöntemi için $y = 0.0904x + 2.3160$ şeklindedir. Bu denklemlerin eğimlerinin oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerine yakın olması farmasötik preparat içindeki katkı maddelerinin girişim yapmadığını ve geliştirilen yöntemlerin özgün olduğunu göstermektedir.

5.4. Geri Kazanım

Geri kazanım sonuçları, 10 mg EZE içeren sentetik preparatların geliştirilen her üç voltametrik yöntemle analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Kaynaklarda geri kazanım sonuçlarının 100 ± 2 olması gerektiği belirtilmiştir (64). Tablo 4.19'da görüldüğü gibi geliştirilen yöntemlerin geri kazanım sonuçları bu aralığa girmektedir, ayrıca sonuçlar arasındaki BSS değerleri düşüktür. Bu sonuçlar, geliştirilen yöntemlerin doğruluğunun diğer bir kanıtıdır.

5.5. Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve validasyon parametreleri değerlendirilen yöntemler EZE içeren Ezetrol® farmasötik preparatın analizine başarıyla uygulanmıştır (Bkz. Tablo 4.20- Tablo 4.21).

Geliştirilen yöntemin geçerli olabilmesi için diğer bir yol, yöntemin preparatlara uygulanması ile elde edilen sonuçların kaynaklarda geçerli olan başka bir yöntemin sonuçları ile karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadığının gösterilmesidir. Bu nedenle aynı numunenin analizi kaynakta bildirilen bir UV-spektrofotometrik yöntemle (29) yapılarak analiz sonuçları geliştirilen yöntemlerin sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Kruskal Wallis testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede dört yöntemin bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Böylece geliştirilen yöntemlerin doğruluğu ve farmasötik preparatların analizine uygulanabilirliği gösterilmiştir.

5.6. EZE'in Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi

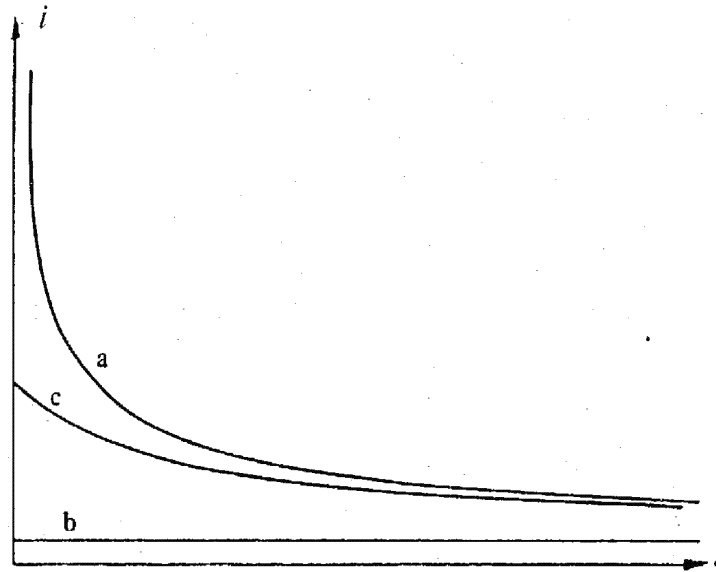
5.6.1. Akımın Karakterinin İncelenmesi

a) CV Yöntemi ile;

Akımının karakterini belirlemek amacıyla CV deneylerinde Şekil 4.31'de de görüldüğü gibi tarama hızının logaritmasına ($\log v$) karşı pik akımının logaritması ($\log I_p$) grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun eğimi 0.5'e çok yakın bir değer bulunmuştur. Bu da EZE'in indirgenmesi sonucu oluşan akımın difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

b) CA Yöntemi ile;

Şekil 5.1'de CA yönteminde akım – zaman ilişkileri görülmektedir (49). EZE'in kronoamperometrik voltamogramında elde edilen akım – zaman eğrisi Şekil 5.1.a'ya benzemektedir (Bkz. Şekil 4.33). Bu bulgu da EZE'in indirgenmesi sonucu oluşan akımın difüzyon kontrollü olduğunu desteklemektedir.



Şekil 5.1. CA’da uygulanan E_2 potansiyeline göre akım – zaman ilişkisi

- a) Difüzyon Kontrollü akım
- b) Kinetik Kontrollü akım
- c) Hem Difüzyon Hem de Kinetik Kontrollü Akım

5.6.2. Elektrot Tepkimesinin Tersinirliğinin İncelenmesi

Tersinir sistemlerde bütün potansiyellerde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyüktür ve Nernst eşitliği elektrot yüzeyinde geçerlidir. Tersinmez sistemlerde ise elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından Nernst eşitliği geçerli değildir.

EZE’in indirgenme tepkimesi için tersinirlik testleri CV yöntemi ile yapılmıştır.

Ters taramada anodik pikin gözlenmemesi, tersinmez bir sistemin en önemli göstergesi olduğundan, EZE’e ait indirgenme tepkimesinin tersinir olmadığını düşündürmüştür. Tersinmez elektrot tepkimesinde katodik pik potansiyeli tarama hızı arttıkça negatif bölgeye kayar (48). Şekil 4.29 incelendiğinde tarama hızı arttıkça pik potansiyelinin negatif değerlere kaydığı görülmektedir. EZE’in pik akımının tarama hızının kare kökü ile değişim grafiği (Bkz. Şekil 4.30) Şekil 2.9’daki grafiğin tersinmez şekline uymaktadır. Şekil 2.9 ’deki grafiğin tersinmez bölgesinde akım tarama hızının kare köküyle Eşitlik 2.18 ’e göre doğrusal olarak artar. Ancak tersinmez kısmın eğimi tersinir kısmının eğiminden küçüktür. Şekil 4.30 incelendiğinde tersinir sistem için geçerli olan doğru eğiminden daha düşük

eğimli bir doğru elde edilmiştir. Bu durumda elektrot tepkimesinin tersinmez olduğu söylenebilir.

Ayrıca kare dalga voltamogramında pik potansiyelinin artan derişimle negatif değerlere kayması da tersinmezlik göstergesidir (Bkz. Şekil 4.8) (54).

5.6.3. Aktarılan Elektron Sayısının Bulunması

SWV ve CV yöntemleri kullanılarak elde edilen verilerden 3 farklı şekilde aktarılan elektron sayısı bulunmuştur.

i. Kare dalga voltamogramında net akımın yarı yüksekliğindeki voltamogramın genişliği ‘Yarı-pik genişliği ($w_{1/2}$)’ olarak tanımlanır.

Tersinir sistemler için;

$$W_{1/2} = 90.6 / n \quad (5.1)$$

Tersinmez sistemler için;

$$W_{1/2} = 62.4 / \alpha n \quad (5.2)$$

olarak verilmektedir (54).

‘Yarı-pik genişliği ($w_{1/2}$)’ teorisi kullanılarak aktarılan elektron sayısı hesaplanmıştır.

Bilindiği gibi tersinmez sistemlerde α değerleri 0.5’e yakın çıkmalıdır (66).

Elde edilen yarı pik genişliklerinden αn değerleri hesaplanarak α ’ın 0.5’e yakın olduğu durumda aktarılan elektron sayısı 2 olarak bulunmuştur (Tablo 5.2).

Tablo 5.2. 4.76 µg/mL EZE’in SWV yönteminde yarı pik genişliği teorisi kullanılarak farklı pH değerlerinde hesaplanan α değerleri

pH	$W_{1/2}$	α (n = 1)	α (n = 2)
4.0	61.78	1.01	0.51
5.0	58.86	1.06	0.53
6.0	57.25	1.09	0.55
7.0	55.71	1.12	0.56
8.0	55.22	1.13	0.57
9.0	53.79	1.16	0.58
10.0	51.15	1.22	0.61

ii. CV yöntemi ile farklı pH değerlerinde EZE’in indirgenme pikinin potansiyeline tarama hızının etkisi incelenmiştir. Tersinir durumda E_p^k , tarama hızının bir fonksiyonu olmadığı halde tersinmez durumda, v ile Eşitlik 2.19’a göre değişir. Farklı pH’larda EZE’in pik potansiyeline karşı $\log v$ grafikleri çizilmiştir (Bkz. Şekil 4.32). Elde edilen doğrularının eğiminden Eşitlik 2.19’dan yararlanılarak αn değerleri bulunmuştur. Tablo 5.3’de görüldüğü gibi α ’ın 0.5’e yakın olduğu değerler transfer edilen elektron sayısının (n) 2 olduğu değerlerdir. Böylece EZE’ in tersinmez piki için elektrot tepkimesinde aktarılan elektron sayısı 2 olarak bulunmuştur.

Tablo 5.3. 8.26 µg/mL EZE için CV yöntemiyle farklı pH’larda hesaplanan α değerleri

pH	α (n = 1)	α (n = 2)
4.0	0.97	0.49
5.0	1.00	0.50
6.0	1.01	0.51
7.0	1.03	0.52
8.0	1.05	0.53
9.0	1.08	0.54
10.0	1.14	0.57

iii. CV yönteminde tersinmez sistemler için geçerli olan Eşitlik 2.21 kullanılarak α n değerleri hesaplanabilir.

Eşitlik 2.21 kullanılarak $E_p - E_{p/2}$ kaymalarından α n değerleri hesaplanarak α ’ın 0.5’e yakın olduğu durumda aktarılan elektron sayısı 2 olarak bulunmuştur (Tablo 5.4).

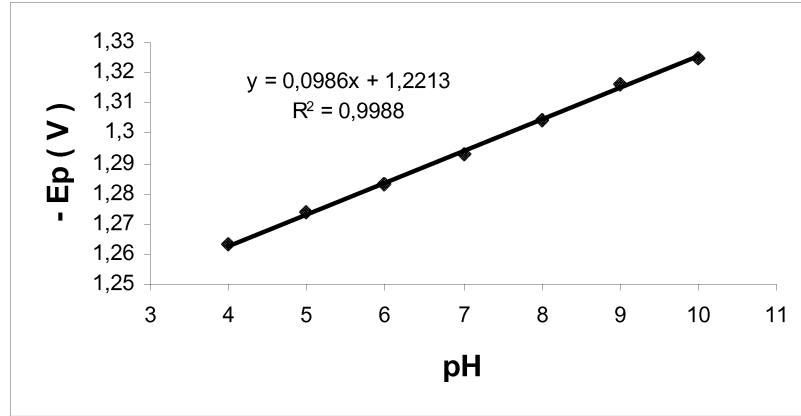
Tablo 5.4. 8.26 µg/mL EZE’in CV yönteminde farklı pH değerlerinde ($E_p - E_{p/2}$)’den hesaplanan α değerleri (tarama hızı = 250 mV s⁻¹)

pH	α (n = 1)	α (n = 2)
4.0	1.14	0.57
5.0	1.07	0.53
6.0	1.09	0.55
7.0	1.08	0.54
8.0	1.02	0.51
9.0	1.00	0.50
10.0	0.96	0.48

Her üç şekilde elde edilen bulgulardan EZE’in indirgenmesi sırasında aktarılan elektron sayısının 2 olduğu bulunmuştur.

5.6.4. Proton Sayısının Bulunması

EZE'in pH 4.0 – 10.0 aralığında kaydedilen kare dalga voltamogramlarında gözlenen piklerin potansiyelleri pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 5.2'de görüldüğü gibi EZE'in indirgenme piki artan pH ile daha negatif potansiyellere kaymaktadır. Bu durum söz konusu pike ait indirgenme tepkimesinde protonun yer aldığını gösterir (44).



Şekil 5. 2. 4.76 µg/mL EZE'in SWV voltamogramlarına ait pH – Ep grafiği

Pik potansiyelinin pH ile değişimi ile ilgili olarak tersinir sistemler için Eşitlik (5.3) ve tersinmez sistemler için Eşitlik (5.4)'de verilen bağıntılar geçerlidir.

$$E_p = E^0 - 2.303 pRT / nF \text{ pH} \quad (5.3)$$

$$E_p = E^0 - 2.303 pRT / \alpha nF \text{ pH} \quad (5.4)$$

- E_p : Pik potansiyeli, V
 E^0 : Standart hücre potansiyeli, V
 R : İdeal gaz sabiti, $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
 T : Sıcaklık, K
 α : Elektron transfer katsayısı
 n : Transfer edilen elektron sayısı
 F : Faraday sabiti

Şekil 5.2'deki $E_p - pH$ ilişkisini gösteren grafiğin doğru denkleminin eğimi 0.059 p /  n değerine eşitlenerek proton sayısı 1.74 bulunmuştur. Bu değer 2'ye yakın bir değer olduğu için EZE'in indirgenme mekanizmasında 2 protonun yer aldığı söylenebilir .

5.6.5. Difüzyon Katsayısının Bulunması

Seçilen destek elektrolitte üç ayrı voltametrik yöntemle EZE'in indirgenmesine ait farklı şartlarda difüzyon katsayıları hesaplanmıştır.

a) CV Yöntemi ile;

EZE'in dönüşümlü voltamogramlarından tersinmez indirgenme piki için Eşitlik 2.18'de verilen Randles-Sevcik eşitliği kullanılarak farklı tarama hızlarında difüzyon katsayısı hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 5.5'de görülmektedir.

Tablo 5.5. 8.26 $\mu\text{g/mL}$ EZE için CV yönteminde değişik tarama hızlarında hesaplanan difüzyon katsayısı değerleri (pH 9.0)

$v, (\text{mv} / \text{s})$	$D (\text{cm}^2 / \text{s})$
50	2.06×10^{-4}
100	3.58×10^{-4}
500	8.44×10^{-5}
750	6.69×10^{-5}
1000	5.29×10^{-5}

b) CA Yöntemi ile;

CA yöntemi ile elde edilen akıma karşı zamanın karekökünün değişimi grafiğinin doğrusal bölgesinin (Şekil 4.34) eğiminden Eşitlik 2.25 kullanılarak elde edilen difüzyon katsayıları Tablo 5.6'da verilmiştir.

Tablo 5.6. 63.00 $\mu\text{g/mL}$ EZE'in CA yöntemiyle hesaplanan difüzyon katsayıları

τ (puls genişliği)	R^2	$D (\text{cm}^2 / \text{s})$
10	0.9985	3.39×10^{-4}
100	0.9984	3.46×10^{-4}
250	0.9986	4.52×10^{-4}

c) CC Yöntemi ile;

CC yöntemi ile elde edilen yüke karşı zamanın karekökünün değişimi grafiğinin (Şekil 4.36) eğiminden Eşitlik 2.26 kullanılarak elde edilen difüzyon katsayıları Tablo 5.7 'de verilmiştir.

Tablo 5.7. 63.00 µg/mL EZE'in CC yöntemiyle hesaplanan difüzyon katsayıları

τ (puls genişliği)	R^2	D (cm ² / s)
10	0.9950	2.91×10^{-4}
100	0.9934	3.19×10^{-4}
250	0.9967	3.26×10^{-4}

Tablo 5.4 – Tablo 5.6 incelendiğinde her üç yöntemle hesaplanan difüzyon katsayılarının birbirine yakın olduğu görülmektedir. CV yönteminde tarama hızı ile difüzyon katsayısı ve akım değiştiğinden diğer çalışmaların yapıldığı 100 mV/s tarama hızındaki difüzyon katsayısı CA ve CC yöntemlerinden bulunan değerlere yakındır. CV'de düşük tarama hızlarında difüzyon hızı elektron aktarım hızından daha etkili olduğu için difüzyon katsayısı düşük tarama hızlarında ölçülür.

5.6.6. Elektron Aktarım Hız Sabitinin Bulunması (k_f)

a) CA Yöntemi ile;

CA yöntemi kullanılarak bir elektron aktarım tepkimesinin hız sabiti hesaplanabilir. Kronoamperometrik voltamogramda zamanın küçük olduğu durumda akım Eşitlik 5.5 ile ifade edilir (49).

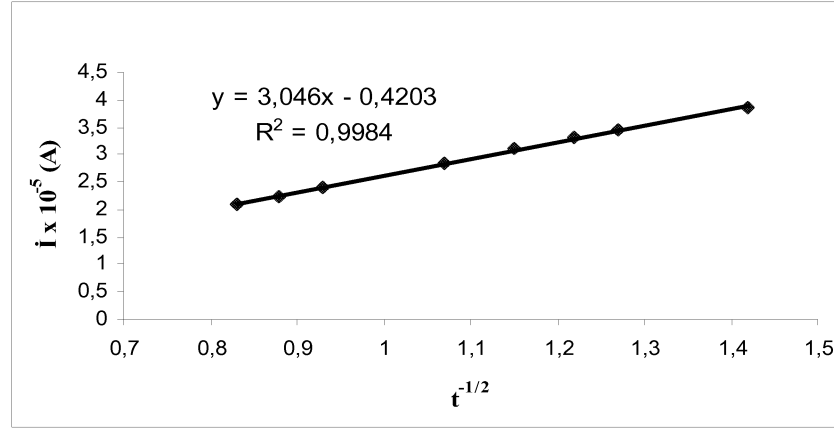
$$i = nFAk_f C_o \left(1 - \frac{(k_f + k_b)t^{1/2}}{\pi^{1/2} D_o^{1/2}} \right) \quad (5.5)$$

Eşitlik 5.5 görüldüğü gibi t 'nin küçük değerlerinde $\dot{I} - t^{1/2}$ grafiği doğrusaldır. Doğrunun ordinatı kestiği noktadaki akım Eşitlik 5.6 ile verilir.

$$i(t=0) = nFAk_f C_o \quad (5.6)$$

Bu eşitlikten k_f (elektron aktarım hız sabiti) hesaplanabilir. Şekil 5.3'de verilen EZE'in küçük zaman değerlerindeki $\dot{I} - t^{1/2}$ eğrisinin ordinatı kestiği

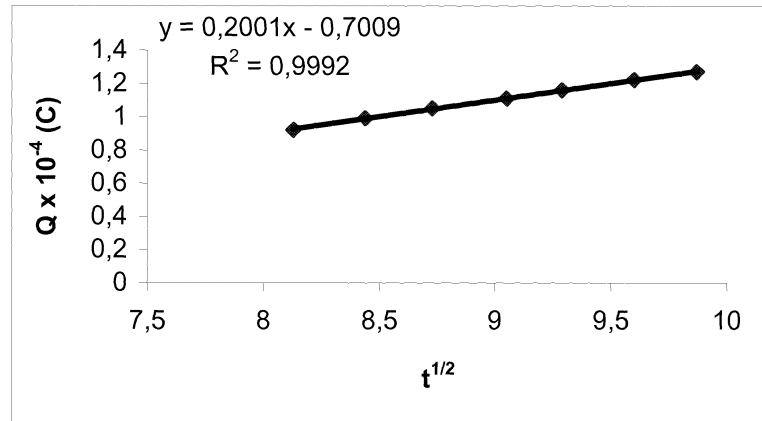
noktadan Eşitlik 5.6'dan yararlanarak elektron aktarım hız sabiti $k_f = 4.00 \times 10^{-6}$ cm/s olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.3. CA yönteminde EZE'in küçük zaman değerlerindeki $i - t^{-1/2}$ grafiği

b) CC Yöntemi ile;

CC yöntemi kullanılarak bir elektron aktarım tepkimesinin hız sabiti hesaplanabilir. Eşitlik 2.27'den görüleceği gibi $Q - t^{1/2}$ grafiği doğrusaldır ve doğrunun $t^{1/2}$ eksenini kestiği nokta $t_L^{1/2}$ ye eşittir. CC yöntemi ile EZE için $Q - t^{1/2}$ grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 5.4). Doğrunun absisi kestiği noktadan elde edilen t_L değeri doğrunun eğiminde yerine konularak (Bkz. Eşitlik 2.28) elektron aktarım sabiti $k_f = 4.30 \times 10^{-6}$ cm / s olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.4. CC yönteminde EZE'in küçük zaman değerlerindeki $Q - t^{1/2}$ grafiği

CA ve CC yöntemleri ile elektron aktarım hız sabitleri (k_f) birbirine yakın bulunmuştur. Bu değerin 4.0×10^{-6} ve 4.3×10^{-6} cm/s olarak bulunması elektrokimyasal tepkimenin yavaş ilerlediğini ve tepkimenin tersinmez olduğunu göstermektedir.

5.6.7. CV Yöntemi ile Adsorpsiyon Varlığının İncelenmesi

CV yöntemi ile kuvvetli ve zayıf adsorpsiyonun varlığının belirlenmesi amacıyla aşağıdaki kriterler değerlendirilmiştir.

1. CV voltamogramlarında ön pik veya arka pik gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.29).
2. $\log(\dot{I}_p) - \log(v)$ grafiğinin eğimi 0.5'den büyük değildir (Bkz. Şekil 4.31).
3. Akım fonksiyonu ($\dot{I}_p / C v^{1/2}$) tarama hızı ile artmamış aksine azalmıştır (Tablo 5.8).

Tablo 5.8. 8.26 $\mu\text{g/mL}$ EZE'in CV yönteminde farklı tarama hızlarında akım fonksiyonları

$v, V / s$	$\dot{I}_p^k / C v^{1/2}$
0.10	6.25
0.25	4.10
0.50	3.05
0.75	2.70
1.00	2.40

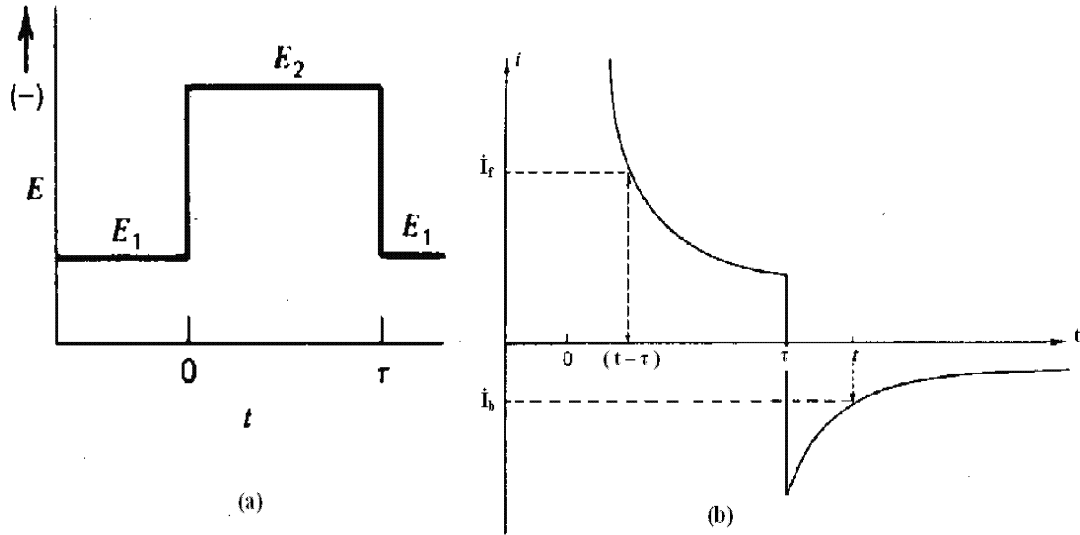
Bu verilerin ışığında EZE'in veya indirgenme ürününün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonunun söz konusu olmadığı düşünülmektedir.

5.6.8. EZE'in İndirgenmesine Ait Elektrot Mekanizması

EZE'in tersinmez indirgenme pikine ait tepkimenin mekanizması için çalışmalar yapılmış ve elektrot tepkimesi belirlenmeye çalışılmıştır. Pik potansiyelinin pH ile negatif değerlere kayması (Bkz. Şekil 5.2) indirgenme tepkimesinde protonun yer aldığını göstermektedir (44). Tarama hızı arttıkça E_p negatif değerlere kaymıştır (Bkz. Şekil 4.29). Ayrıca Tablo 5.7'de görüldüğü gibi

akım fonksiyonu ($I_p^k/Cv^{1/2}$) artan tarama hızı ile azalmıştır. Bu bulgular Tablo 2.2.'deki kriterlere göre değerlendirildiğinde, EZE'in elektrot yüzeyindeki indirgenmesinin EC mekanizmasına göre gerçekleştiği düşünülmektedir.

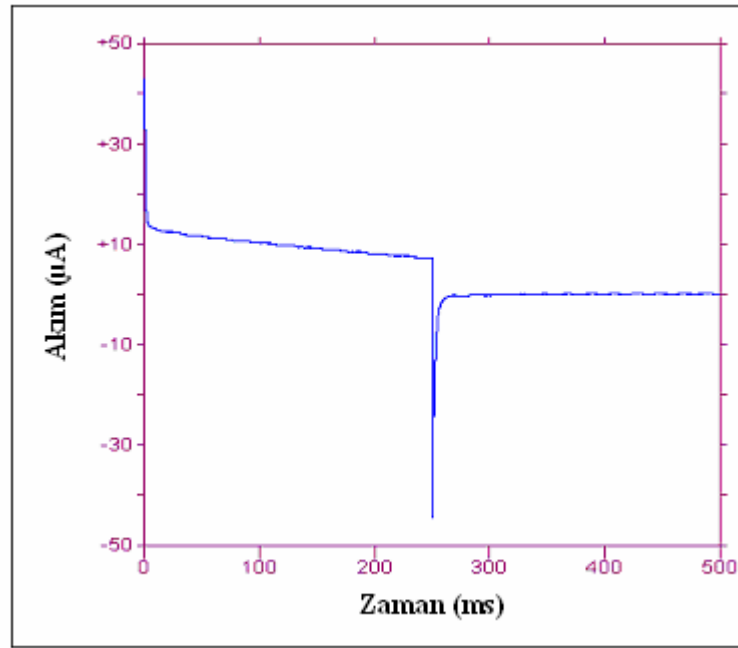
İndirgenmenin EC mekanizmasına göre olduğunu kanıtlamak amacıyla çift potansiyel tekniği ile CA yöntemi uygulanmıştır. Çift potansiyel tekniklerinde uygulanan potansiyelin zamana göre değişimi ve oluşan akımın zamana göre değişimi Şekil 5.5'de gösterilmiştir (49). E_1 potansiyeli maddenin indirgenmeye başlamadığı, yani akımın sıfır olduğu potansiyeldir. E_2 difüzyon kontrollü bölgedeki potansiyeldir. τ süresi sonunda E_1 potansiyeline (veya herhangi bir E_3 potansiyeline) geri dönülür. Geri potansiyelde gözlenen akım, elektron aktarımını takip eden kimyasal tepkimenin k hız sabitinden etkilenir. Eğer k büyükse yani kimyasal tepkimenin hızı yüksekse geri potansiyel uygulamasındaki akım beklenden daha düşük olacaktır. Şekil 5.5.b'deki grafikten elde edilen $\dot{I}_f$ ve $\dot{I}_b$ (sırayla uygulanan ileri ve geri potansiyellerdeki akımları) değerlerinin $\dot{I}_b / \dot{I}_f$ oranının t ile grafiği çizilerek takibeden kimyasal tepkimenin hız sabiti hesaplanabilir.



Şekil 5.5. Çift potansiyel kronoamperometride a) potansiyel-zaman b) akım-zaman ilişkisi

E_1 = indirgenmenin olmadığı potansiyel, E_2 = akımın difüzyon kontrollü olduğu potansiyel, $\dot{I}_f$ = İleri tarama yönündeki akım, $\dot{I}_b$ = Geri tarama yönündeki akım, τ = Tarama Süresi

Şekil 5.6’da EZE için çift potansiyel tekniği uygulanarak elde edilen akım zaman grafiği görülmektedir. 10 ms süresinde grafikten okunan $\dot{I}_b$ ve $\dot{I}_f$ değerlerinin oranı ($\dot{I}_b/\dot{I}_f$) hesaplanmıştır. Bu değer 0.089 bulunmuştur. ($\dot{I}_b/\dot{I}_f$) değerinin 1’den küçük olması geri potansiyelde gözlenen akımın küçük olduğunu, dolayısıyla indirgenme ürününün kimyasal tepkimeye girdiğini göstermektedir. Bu durum indirgenmenin EC mekanizmasına göre olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 5.6. 118.00 $\mu\text{g} / \text{mL}$ EZE'in çift potansiyelli kronoamperometrik voltamogramı

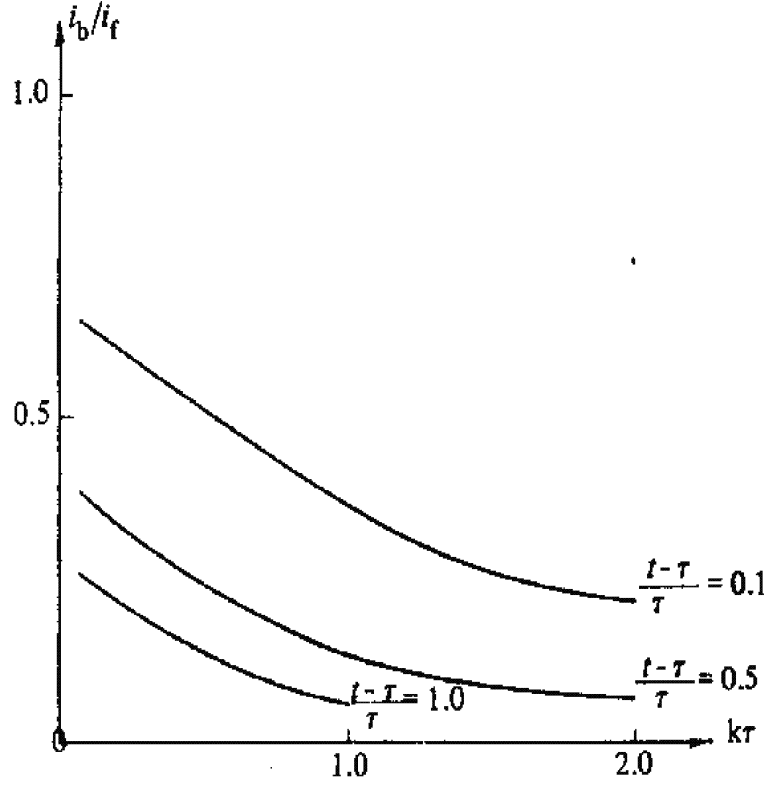
Başlangıç potansiyeli $E_1 = -1070 \text{ mV}$

İndirgenmenin olduğu potansiyel $E_2 = -1300 \text{ mV}$

Seçilen 10 ms süresinde ($\dot{I}_b / \dot{I}_f$) oranı için bulunan değer Şekil 5.7’de verilen çalışma grafiğinde (49) yerine konarak elektron aktarımını takip eden kimyasal tepkimenin hız sabiti 1.derece olduğu varsayılarak $3.14 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Takip eden kimyasal tepkimenin hız sabitinin çok küçük olmaması da elektron aktarımından sonra kimyasal tepkimenin oluştuğunun göstergesidir.

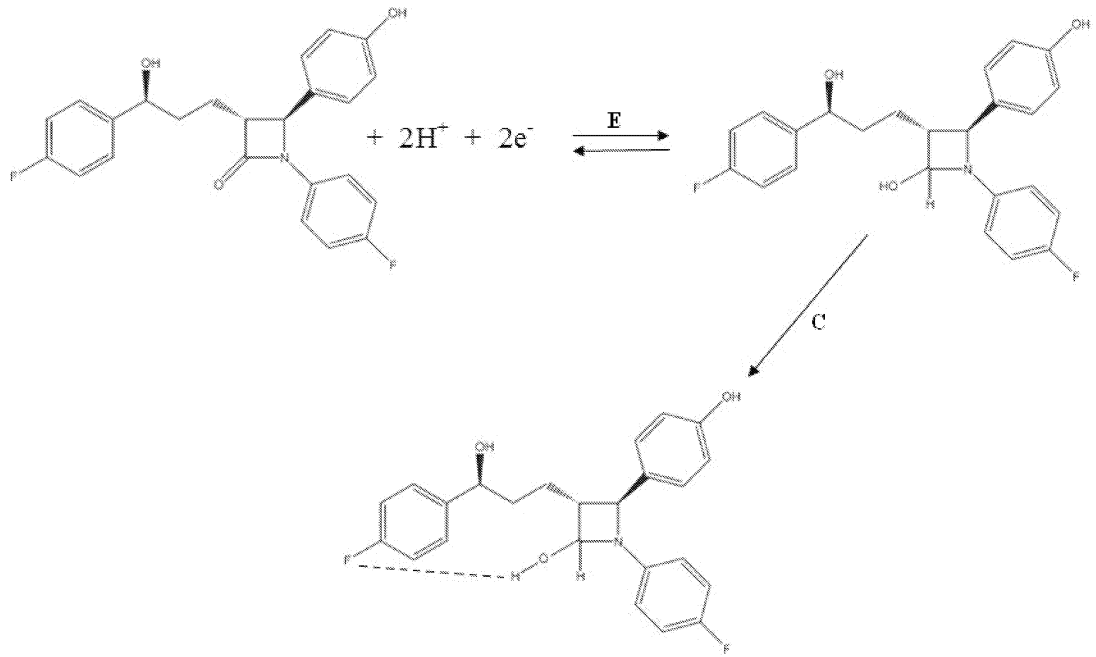
CV yönteminde düşük tarama hızlarında anodik pikin gözlenmemesi de (Bkz. Şekil 4.29) takip eden kimyasal tepkimenin varlığını gösterir.

CV ve çift potansiyelli CA yöntemlerinden elde edilen bulgular ile indirgenmenin EC mekanizmasına göre olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 5.7. Çift potansiyelli kronoamperometride ($\dot{I}_b / \dot{I}_f$) oranının $k\tau$ ile değiştiği çalışma grafiği (49)

Bölüm 5.5.3 ve Bölüm 5.5.4’de indirgenme mekanizmasında 2 elektron ve 2 protonun yer aldığı bulunmuştur. Karbonil bileşiklerinin bazik sulu ortamda civa elektrotta alkollere, asidik ortamda pinakollere indirgendiği bilinmektedir (67, 68). EZE’in yapısında bulunan azetidinon grubundaki ($-C=O$)’nun indirgenmesi sonucu $-CH(OH)$ şekline dönüştüğü düşünülmektedir. Bu durumda EZE’in indirgenmesi için aşağıdaki mekanizma önerilmektedir (69).



Elektrokimyasal basamağı takip eden kimyasal basamak (C) ise kuvvetli F $\cdots$ H hidrojen bağı oluşumu şeklinde gerçekleşebilir. Oluşan bu tür kararlı olduğu için tekrar yükseltgenme meydana gelmez. Bu nedenle CV’de ters taramada pik gözlenmez.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kolesterol tedavisinde kullanılan ve lipit düşürücü bir madde olan EZE'in farmasötik preparatlardan analizi için 3 ayrı elektroanalitik yöntem geliştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerden SWV için optimize edilmiş en uygun koşullar frekans için 50 Hz, adım yüksekliği 3 mV ve puls genliği 20 mV olarak bulunmuştur. SWAdSV için -800 mV'luk biriktirme potansiyelinde, frekans 15 Hz, adım yüksekliği 4 mV, puls genliği 25 mV ve biriktirme süresi 15 s seçilmiş, DPAdSV için -850 mV'luk biriktirme potansiyelinde, tarama hızı için 20 mV / s ve puls genliği için 50 mV ve biriktirme süresi için 15 s uygun bulunmuştur.

EZE'e ait pik potansiyel değerleri derişime bağılı olarak SWV'de $[(-1290) - (-1322)]$ mV, SWAdSV'de $[(-1236) - (-1252)]$ mV ve DPAdSV'de $[(-1190) - (-1210)]$ mV değerleri arasında gözlenmiştir.

Geliştirilen elektroanalitik yöntemlerin doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, tutarlılık ve özgünlük gibi validasyon parametreleri değerlendirilmiş ve geçerlilikleri kanıtlanmıştır.

Valide edilen yöntemler piyasalarda satılmakta olan EZE içeren Ezetrol® ticari isimli farmasötik preparatların analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Geliştirilen elektroanalitik yöntemler ve karşılaştırma yöntemi olarak kullanılan spektrofotometrik yöntem ile elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmeleri sonucunda aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması geliştirilen yöntemlerin doğru olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır.

Ayrıca EZE'in elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. Bunun için yapılan CV ve SWV deneylerinin sonucunda indirgenme mekanizmasının 2 elektronlu ve 2 protonlu olduğu CV, CA ve CC yöntemleri kullanılarak, akım karakterinin difüzyon kontrollü ve elektrot tepkimesinin tersinmez olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra bu yöntemler kullanılarak EZE'e ait difüzyon katsayısı yaklaşık 3.0×10^{-4} cm²/s, elektron aktarım hız sabiti (k_f) 4.0×10^{-6} cm/s ve kimyasal tepkimenin hız sabiti (k) 3.14×10^{-3} s⁻¹ olarak bulunmuştur. Ayrıca CV ve çift potansiyelli CA yöntemlerinden elde edilen bulgular ile indirgenmenin EC mekanizmasına göre olduğu kanıtlanmıştır.

EZE'in elektroanalitik yöntemlerle analizi ve elektrokimyasal davranışları hakkında kaynaklarda bilgi bulunmaması, yapılan tez çalışmasının literatüre katkı sağlaması açısından önemlidir. Tez kapsamında geliştirilen elektroanalitik yöntemler; validasyon parametreleri açısından iyi sonuçlar vermesine ek olarak basit, hızlı ve ucuz yöntemler olması nedeniyle kaynaklardaki EZE analizi için geliştirilen yöntemlere alternatif olarak sunulmaktadır.

HPLC yönteminin pahalı ve zaman alıcı olmasının yanı sıra, kaynaklarda EZE'in HPLC ile analizi için yapılan çalışmalarda LOQ değerlerinin geliştirilen elektroanalitik yöntemlerden daha büyük olduğu görülmektedir. UV spektrofotometrik yöntemlerin tayin sınırları da geliştirilen yöntemlere göre oldukça yüksek olup bazı spektrofotometrik yöntemlerde çeşitli reaktifler eklenerek oluşan türevin absorpsiyonu ölçülmekte bu da zaman kaybına ve kontaminasyona neden olmaktadır.

Ayrıca geliştirilen her üç yöntemin LOQ değerlerinin düşük olması bu elektroanalitik yöntemlerin biyolojik materyallerden EZE'in analizlerine uygulanabilmesini mümkün kılmaktadır. Geliştirilen SWV, SWAdSV ve DPAdSV yöntemlerinin EZE'in farmasötik preparatlardan tayini için doğru, kesin, duyarlı, seçici, tekrarlanabilir yöntemler olması nedeniyle rutin analiz laboratuvarlarında kalite kontrol amacıyla HPLC ve UV spektrofotometrik yöntemlere alternatif yöntemler olarak önerilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C. (2001). Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology (2 bs.). Çeviri Editörleri; Zergeroğlu, S., Zergeroğlu M. Ali., ANKARA: Güneş Kitabevi.
2. Sudhop, T., Bergmann, K.V. (2002) Cholesterol absorption inhibitors for the treatment of hypercholesterolaemia. *Drugs*, 62 (16), 2333-2347.
3. Pawar, H.L., Kothapalli, L., Thomas, A., Nanda, R.K., Mare, S. (2008) Simultaneous RP-HPLC method for determination of ezetimibe and fenofibrate in synthetic mixture. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 1 (1), 25-28.
4. Neelima, B., Kumar, P.R., Krishna, M.M., Bindu, V.H., Prasad, Y.R. (2008) Simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe by RP-HPLC in pure and pharmaceutical dosage form. *Oriental Journal of Chemistry*, 24 (1), 195-200.
5. Seshachalam, U., Kothapally, C.B. (2008) HPLC analysis for simultaneous determination of atorvastatin and ezetimibe in pharmaceutical formulations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31 (5), 714-721.
6. Oliveira Paulo, R., Barth, T., Todeschini, V., Dalmora Sergio, L. (2007) Simultaneous liquid chromatographic determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical products. *Journal of AOAC International*, 90 (6), 1566-1572.
7. Rao, J.V.L.N.S., Prakash, P.B., Krishna, M.M., Kumar, B.A., Srinivas, A.R.L. (2006) A RP-HPLC method for estimation of ezetimibe in tablets. *Acta Ciencia Indica, Chemistry*, 32 (2), 95-98.
8. Özaltın, N., Uçaktürk, E. (2007) Simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical formulations by dual-mode gradient LC. *Chromatographia*, 66 (Suppl.), S87-S91.
9. Chaudhari, B.G., Patel, N.M., Shah, P.B. (2007) Stability-indicating reversed-phase liquid chromatographic method for simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe from their combination drug products. *Journal of AOAC International*, 90 (5), 1242-1249.

10. Qutab, S.S., Razzaq, S.N., Khan, I.U., Ashfaq, M., Shuja, Z.A. (2007) Simultaneous determination of atorvastatin calcium and ezetimibe in pharmaceutical formulations by liquid chromatography. *Yaowu Shipin Fenxi*, 15 (2), 139-144.
11. Shivshanker, K., Sreekanth, N., Harikrishnan, N., Roosewelt, C., Rao, G.S., Gunasekaran, V. (2007) Validated simultaneous estimation of simvastatin and ezetimibe by RP-HPLC in pure and pharmaceutical dosage form. *Asian Journal of Chemistry*, 19 (6), 4303-4308.
12. Basha, S.J.S., Naveed, S.A., Tiwari, N.K., Shashikumar, D., Muzeeb, S., Kumar, T.R. ve diğerleri. (2007) Concurrent determination of ezetimibe and its phase-I and II metabolites by HPLC with UV detection: Quantitative application to various in vitro metabolic stability studies and for qualitative estimation in bile. *Journal of Chromatography, B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 853 (1-2), 88-96.
13. Rajkondawar, V.V. (2006) Simultaneous estimation of rosuvastatin and ezetimibe by reverse phase high performance liquid chromatography. *Asian Journal of Chemistry*, 18 (4), 3230-3232.
14. Doshi, A.S., Kachhadia, P.K., Joshi, H.S. (2008) Validation of a stability-indicating LC method for assay of ezetimibe in tablets and for determination of content uniformity. *Chromatographia*, 67 (1/2), 137-142.
15. Mahadik, M.V., Dhaneshwar, S.R. (2007) Application of a stability-indicating HPTLC method for the quantitative determination of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences (Hong Kong, China)*, 2 (5), 182-190.
16. Dixit, R.P., Barhate, C.R., Nagarsenker, M.S. (2008) Stability-indicating HPTLC method for simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin. *Chromatographia*, 67 (1/2), 101-107.
17. Dhaneshwar, S.S., Dhaneshwar, S.R., Deshpande, P., Patil, M. (2007) Development and validation of a method for simultaneous densitometric estimation of atorvastatin calcium and ezetimibe as the bulk drug and in tablet dosage forms. *Acta Chromatographica*, 19, 141-148.

18. Sonawane, S.S., Shirkhedkar, A.A., Surana, S.J. (2007) HPTLC method for determination of ezetimibe in tablets. *Asian Journal of Chemistry*, 19 (6), 4925-4927.
19. Li, Z., Shi, X., Wang, B., Jiao, Z., Zhong, M., Liu, G. ve diğerleri. (2007) Determination of ezetimibe and total ezetimibe in human plasma and its pharmacokinetics. *Zhongguo Yaoxue Zazhi (Beijing, China)*, 42 (7), 531-535.
20. Uçaktürk, E., Özaltın, N., Kaya, B. (2009) Quantitative analysis of ezetimibe in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 32 (11):1868 - 74.
21. Anandakumar, K., Kannan, K., Vetrichelvan, T. (2008) Simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe in solid dosage form by UV spectrophotometry. *Pharmbit*, 17 (1), 57-64.
22. Deshmukh, D.D., Bhatia, N.M., More, H.N., Bhatia, M.S. (2008) Colorimetric estimation of ezetimibe and simultaneous spectrophotometric estimation of ezetimibe with atorvastatin calcium in tablet formulation. *Asian Journal of Chemistry*, 20 (1), 155-160.
23. Palabıyık, I.M., Onur, F., Yardımcı, C., Özaltın, N. (2008) Simultaneous spectrophotometric determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical preparations using chemometric techniques. *Quimica Nova*, 31 (5), 1121-1124.
24. Kothapalli, L., Pawar, H.I., Thomas, A., Nanda, R.K., Yadav, A., Deshpande, A.D. (2008) Spectrophotometric estimation of ezetimibe and fenofibrate in bulk and mixture. *Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (1), 14-16.
25. Mishra, P., Gupta, A., Shah, K. (2007) Spectrophotometric determination of ezetimibe in pharmaceutical formulations. *Journal of the Indian Chemical Society*, 84 (9), 945-947.
26. Sankar, D.G., Latha, P.V.M., Kumar, B.A., Babu, P.J. (2006) Spectrophotometric determination of cefepime and ezetimibe. *Journal of the Institution of Chemists (India)*, 78 (5), 129-131.
27. Imran, M., Singh, R.S.P., Chandran, S. (2006) Stability indicating ultraviolet spectroscopic method for the estimation of ezetimibe and carvedilol. *Pharmazie*, 61 (9), 766-769.

28. Sankar, D.G., Kumar, D.V.S.P., Krishna, M.V.,Latha, P.V.M. (2005) UV spectrophotometric determination of etoricoxib and ezetimibe. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (4), 2812-2814.
29. Shrivastava, P.K., Basniwal, P.K., Dubey, R., Nagar, P., Jain, D.,Bhattacharya, S. (2006) Spectrophotometric estimation of ezetimibe in tablet dosage form. *Asian Journal of Chemistry*, 18 (4), 3123-3125.
30. Sankar, D.G., Pawar, A.K.M., Sumanth, S.K.,Latha, P.V.M. (2005) Spectrophotometric determination of repaglinide and ezetimibe. *Asian Journal of Chemistry*, 17 (3), 2025-2027.
31. Baraka, M.M., Khalil, H.M.,Al-Ahmary, K.M. (2008) Colorimetric determination of ezetimibe in pure form and in pharmaceuticals. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)*, 46 (1), 163-167.
32. Dalmora Sergio, L., Oliveira Paulo, R., Barth, T.,Todeschini, V. (2008) Development and validation of a stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method for the determination of ezetimibe in pharmaceutical formulations. *Analytical sciences the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 24 (4), 499-503.
33. Akgün, H., Balkan, A., Bilgin, A., Çalış, S., Dalkara, S., Erdoğan, H. ve diğerleri. (2000). "Farmasötik Kimya" (c. 2). ANKARA: Irmak Matbaası.
34. Katzung, B. (1995). Temel ve Klinik Farmakolojisi (6 bs., c. 2). Çeviri Editörü ; Özüner, Z., İSTANBUL: Barış Kitabevi.
35. Ağ sitesi : <http://www.rxlist.com/zetia-drug.htm>
36. Calculated using advanced chemistry development (ACD / Labs) Software V8. 14 for (1994 – 2009 ACD/ Labs.
37. Mauro, V.F.,Tuckerman, C.E., (2003) Ezetimibe for management of hypercholesterolemia. *Annals of Pharmacotherapy*, 37 (6), 839-848.
38. Van Heek, M.,Davis, H. (2002) Pharmacology of ezetimibe. *European Heart Journal Supplements*, 4 (Suppl. J), J5-J8.
39. Jeu, L.,Cheng Judy, W.M. (2003) Pharmacology and therapeutics of ezetimibe (SCH 58235), a cholesterol-absorption inhibitor. *Clinical therapeutics*, 25 (9), 2352-2387.

40. P.T. Kissinger, W.R. Heineman. (1984) Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Dekker, New York.
41. Skoog D.A., Holler. F.J., Nieman T.A. (2000) Enstrümental Analiz İlkeleri (1 bs.). Çeviri editörleri ; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., ANKARA: Bilim Yayıncılık.
42. Riley, T., James, A.M. (1987) Principles of electroanalytic methods, Analytical Chemistry by Open Learning John Wiley & Sons London.
43. Zuman, P. (1964) Organic Polarographic Analysis, The Macmillan Company, New York.
44. Heyrovsky, J., Kuta, J. (1966) Principles of Polarography. New York: Academic Press.
45. Meites, L. (1966) Polarographic Techniques (2nd Ed.). USA: Wiley - Sons, Inc.
46. Zuman, P. (1969) The Elucidation of Organic Electrode Processes. USA: Academic Press, Inc.
47. Wang, J. (1994) Analytical Electrochemistry (3th.Ed). USA: Wiley-VCH, Inc.
48. Bond, A.M. (1980) Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry. USA: Marcel Dekker, Inc.
49. Greef, R., Peat, R., Peter, M.L., Robinson, J. (1990) Instrumental Methods in Electrochemistry. England : Ellis Horwood.
50. Çekirdek P. (2005) Voltametrik Metotlarla Ditiyofosfonat Anyonlarının Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi (Doktora Tezi). ANKARA: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
51. Wopschall, R.H., Shain .I. (1967) Adsorption effect in Stationary Electrode Polarography with a Chemical Reaction Following Charge Transfer. *Analytical Chemistry*, 39, 1535-1540.
52. Wopschall, R. H., Shain, I. (1967) Effects of adsorption of electroactive species in stationary electrode polarography, *Analytical Chemistry*, 39, 1514 - 1527.
53. Lovric, M., Komorsky-Lovric, S., Bond, A.M. (1991) Theory of square-wave stripping voltammetry and chronoamperometry of immobilized reactants, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 319, 1 -18.

54. O'Dea, J. J., Ribes, A., Osteryoung, J.G. (1993) Square - wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 345, 287 - 301.
55. Brainina, K.Z. (1974) Stripping Voltammetry in Chemical Analysis. New York: John Wiley and Sons. Inc.
56. Bard A.J, Faulkner, L.R. (1980) Electrochemical Methods Fundamentals and Applications. New York: John Wiley and Sons. Inc.
57. Wang, J. (1985) Adsorptive Stripping Voltammetry. Am. Lab.,(c. 17) 41 - 50.
58. Dean, J.A. (1979) Lange's Handbook of Chemistry Mc Graw Hill, New York.
59. Gordon, C.L.,Wichers, E. (1957) Purification of Mercury and its Physical Properties. Annals. N.Y. Acad. Sci., 65 (369).
60. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005).
61. Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill T.C. (1974) Spectrometric Identification of Organic Compounds. New York: John Wiley and Sons. Inc.
62. Lambert, J.B., Shurvell, H.F., Verbit, L., Cooks, R.G., Stout, G.H. (1976). Organic Structural Analysis. New York: Macmillan Publishing Co., Inc.
63. Parikh, V.M. (1974) Absorption Spectroscopy of Organic Molecules. London : Addison - Wesley Publishing Company.
64. Green, J.M. (1996) A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, 68 (9), 305A-309A.
65. Shabir, G.A., Lough, W.J., Arain, S.A.,Bradshaw, T.K. (2007) Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30 (3), 311-333.
66. Adrian, W.B. (1997) A Comparison of Cyclic Voltammetry and Cyclic Staircase Voltammetry. *Current Separations, Bioanalytical Systems*, 16 (1) 23-26.
67. Rifi, M.R., Covitz, F.H. (1974) Introduction to Organic Electrochemistry. New York, Marcel Dekker, INC.
68. Kolthoff, I.M., Lingane, J.J. (1952) Polarography. Interscience Publishers New York-London.

69. Zuman, P., Perrin C.I. (1967) Organic Polarography. John Wiley & Sons, Inc.

EKLER

Ek 1. Korelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Bulunan korelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımında işlemler:

1. H_0 : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r = 0$).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r}$$

$$S_r = \left[\frac{1 - r^2}{n - 2} \right]^{1/2} \quad (\text{Korelasyon katsayısının standart hatası})$$

3. Yanılma olasılığı olarak $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi = $n - 2$
5. $\alpha = 0.05$ düzeyinde ve 4. Madde de bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri Tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: Korelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ($t = \text{Hesapla bulunan değer}$, $p < 0.05$) veya korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ($t = \text{Hesapla bulunan değer}$, $p > 0.05$).

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamları bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \right]^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı $\Rightarrow RAKT = YOAKT - RKT$

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi $\Rightarrow YOASD = n-1$

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi $\Rightarrow RASD = YOASD - RSD$

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması $\Rightarrow RKT / RSD$

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması $\Rightarrow RAKO = RAKT / RASD$

4. H_0 = Derişim ile pik cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.

6. $F = RKO / RAKO$

7. $p = 0.05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Derişim ile pik cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır (F = Hesapla bulunan, $p < 0.05$) veya doğrusal değildir (F = Hesapla bulunan, $p > 0.05$).

Kesişimin sıfırdan ayrılışının önem kontrolü

1.

$$S_{yx} = \frac{\Sigma_y^2 - (\Sigma_x)^2 / n}{n - 1} \left[\frac{(1 - r)^2 (n-1)}{n - 2} \right]^{1/2}$$

2. $S_{H(a)} = (S_{yx})^2 [(1 / n) + \bar{x} / (\Sigma_x^2 - (\Sigma_x)^2 / n)]$

3. H_0 = Kesişim değeri (a) sıfıra eşittir.

4. Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.

5. $t_H = a / S_{H(a)}$

6. $\alpha = 0.05$ düzeyinde t_T değerleri bulunur.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar: Kesişim değeri sıfıra eşittir (t_H = Hesapla bulunan, $p > 0.05$) veya Kesişim değeri sıfırdan farklıdır (t_H = Hesapla bulunan, $p < 0.05$).

Ek 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

SS: Standart Sapma

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

$$\% \text{ Bağıl Hata (\%BH)} = \left| \frac{(\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olması gereken miktar}} \right| \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n: Ölçüm sayısı

%Geri Kazanım Hesaplanması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = \bar{X} \pm S_{\bar{X}} t \quad \text{veya} \quad \bar{X} - S_{\bar{X}} < \mu < \bar{X} + S_{\bar{X}}$$

μ : Evren ortalaması

$\bar{X}$: Örneklem ortalaması

$S_{\bar{X}}$: Standart hata

t : Seçilen yanılma düzeyi (α) ve n-1 serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer.

Ek 3. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi

Aynı örneklerin değişik iki durumdaki ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde $n < 25$ ise uygulanan önemlilik testidir.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha = 0,05$ yanılma düzeyi seçilmiştir.

Test istatistiğinin hesaplanması:

İki yöntemden elde edilen sonuçlar iki sütun şeklinde yanyana yazılır. Sağda yeni bir sütuna satırlar arasındaki farklar $\pm$ işaretleriyle birlikte yazılır. Ardından farklar küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra no. verilir. Sıra no.ların önüne farklardaki $\pm$ işaretleri yazılır. + ve - işaretli sıra no. grupları arasında işareti sayıca fazla olan grup toplanır. Elde edilen değer, hesaplama bulunan T değeridir (T_H).

Ölçüm sayısı (n) serbestlik derecesindeki tablo T değerine bakılır.

Karar:

- a) $T_H > T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur (T_H = Hesaplanan T değeri, $p > 0,05$)
- b) $T_H < T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır (T_H = Hesaplanan T değeri, $p < 0,05$)

EK 4. Kruskal Wallis Varyans Analizi

Parametrik test varsayımları yerine getirilmediğinde, bir değişken yönünden ikiden fazla bağımsız grup arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde kullanılır.

Test işlemleri:

Bütün gruptaki değerler küçükten büyüğe doğru tek dizi halinde sıralanır ve her bir değere sıra numarası verilir. Aynı değerler için ortalama sıra numarası hesaplanır aynı olan değerlere verilir.

Test istatistiğinin (KW) hesaplanması:

$$KW = \frac{12}{n(n+1)} \left[\sum_{j=1}^k \frac{T_j^2}{n_j} \right] - k(n+1)$$

T_j : j. gruptaki değerlerin sıra numaraları toplamı (her bir grup için);

n_j : j. gruptaki denek sayısı (her bir grup için);

k: Grup sayısı

n: Toplam denek sayısı

H_0 : İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha = 0.05$ yanılma düzeyi için (grup sayısı – 1) serbestlik derecesindeki tablo değerine (KW_T) bakılır.

Karar : $KW_T > KW$ ise H_0 hipotezi kabul edilir.

$KW_T < KW$ ise H_0 hipotezi kabul edilir.

EK 5. Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi

Yöntemlerin karşılaştırılmasında, yöntemler arasında fark bulunup bulunmadığını kontrol etmek için Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analiz testi uygulanır.

1. Kareler toplamaları bulunur

a) Genel kareler toplamı (GnKT)

$$GnKT = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

b) Gruplar arası kareler toplamı (GAKT)

$$GAKT = \sum \left[\frac{(\sum x_j)^2}{n_j} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

c) Denekler arası kareler toplamı (DAKT)

$$DAKT = \sum \left[\frac{(\text{Her bir satır toplamı})^2}{\text{Her bir satırdaki ölçüm sayısı}} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

e) Etkileşim (hata) kareler toplamı $\Rightarrow HKT = GnKT - GAKT - DAKT$

2. Serbestlik derecelerinin bulunması

a) Genel serbestlik derecesi $\Rightarrow GnSD = n_j \times k - 1$

b) Gruplar arası serbestlik derecesi $\Rightarrow GASD = k - 1$

c) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow DASD = n_j - 1$

d) Hata serbestlik derecesi $\Rightarrow HSD = (n_j - 1) \times (k - 1)$

3. Kareler ortalamasının bulunması

a) Gruplar arası kareler ortalaması $\Rightarrow GAKO = GAKT / GASD$

b) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow DAKO = DAKT / DASD$

c) Hata kareler ortalaması $\Rightarrow HKO = HKT / HSD$

4. H_0 = Yöntemler arasında fark yoktur.
 H_1 = En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.
5. Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.
6. $F = \text{GAKO} / \text{HKO}$
7. $\alpha = 0.05$ düzeyinde GASD ve HSD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.
8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
9. Karar: Yöntemler arasında fark yoktur ($F = \text{Hesapla bulunan}, p < 0.05$) veya yöntemlerden en az biri farklıdır ($F = \text{Hesapla bulunan}, p > 0.05$).

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Ankara'da doğdum. Ankara Batıkent Lisesi'ni bitirdikten sonra 2001 yılında girdiğim Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümün'den 2006 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldum. 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım. Halen Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.