



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



İKİLİ İLAÇ ETKİN MADDE KARIŞIMLARININ ELEKTROKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Barış Tolga DEMİRCİGİL

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

2010- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İKİLİ İLAÇ ETKİN MADDE KARIŞIMLARININ
ELEKTROKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Barış Tolga DEMİRCİGİL

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

2010- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

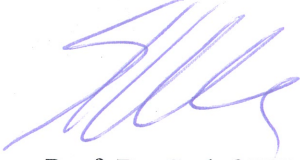
Analitik Kimya Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 03/02/2010



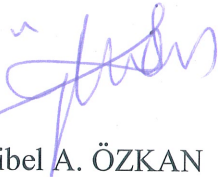
Prof. Dr. Feyyaz ONUR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



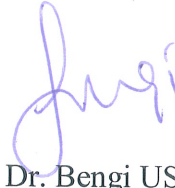
Prof. Dr. Sedef KIR
Hacettepe Üniversitesi



Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
(Raportör)

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	x
Simgeler ve Kısaltmalar	xii
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Parkinson Hastalığı Tedavisi	2
1.2. Levodopa Hakkında Genel Bilgi	3
1.2.1. Levodopa'nın Fiziksel Özellikleri	3
1.2.2. Levodopa'nın Kimyasal Yapısı	4
1.2.3. Levodopa'nın Farmakolojik Özellikleri	4
1.2.4. Levodopa'nın Farmakokinetik Özellikleri	5
1.2.5. Levodopa'nın Terapötik Kullanımı	5
1.3. Karbidopa Hakkında Genel Bilgi	6
1.3.1. Karbidopa'nın Fiziksel Özellikleri	6
1.3.2. Karbidopa'nın Kimyasal Yapısı	6
1.3.3. Karbidopa'nın Farmakolojik Özellikleri	7
1.3.4. Karbidopa'nın Farmakokinetik Özellikleri	7
1.3.5. Karbidopa'nın Terapötik Kullanımı	8
1.4. Benserazid Hakkında Genel Bilgi	8
1.4.1. Benserazid'in Fiziksel Özellikleri	8
1.4.2. Benserazid'in Kimyasal Yapısı	8
1.4.3. Benserazid'in Farmakolojik Özellikleri	9

1.4.4.	Benserazid'in Farmakokinetik Özellikleri	9
1.4.5.	Benserazid'in Terapötik Kullanımı	10
1.5.	Hipertansiyon Hastalığı Tedavisi	10
1.6.	Hidroklorotiazid Hakkında Genel Bilgi	14
1.6.1.	Hidroklorotiazid'in Fiziksel Özellikleri	14
1.6.2.	Hidroklorotiazid'in Kimyasal Yapısı	14
1.6.3.	Hidroklorotiazid'in Farmakolojik Özellikleri	15
1.6.4.	Hidroklorotiazid'in Farmakokinetik Özellikleri	15
1.7.	Amilorid Hakkında Genel Bilgi	15
1.7.1	Amilorid'in Fiziksel Özellikleri	15
1.7.2.	Amilorid'in Kimyasal Yapısı	16
1.7.3.	Amilorid'in Farmakolojik Özellikleri	16
1.7.4.	Amilorid'in Farmakokinetik Özellikleri	17
1.8.	Levodopa ve Benserazid İçin Analiz Yöntemleri	17
1.8.1.	Elektrokimyasal Yöntemler	17
1.8.2.	Spektrofotometrik Yöntemler	18
1.8.3.	Diğer Yöntemler	20
1.9.	Levodopa ve Karbidopa İçin Yapılmış Analiz Yöntemleri	21
1.9.1.	Kromatografik Yöntemler	21
1.9.2.	Spektrofotometrik Yöntemler	22
1.10.	Hidroklorotiazid ve Amilorid İçin Yapılmış Analiz Yöntemleri	22
1.10.1.	Kromatografik Yöntemler	22
1.10.2.	Spektrofotometrik Yöntemler	24
1.10.3	Kemometrik Yöntemler	25
2.	GEREÇ ve YÖNTEM	27
2.1.	Ölçme Yöntemi	27
2.1.1.	Voltametri	27
2.1.1.1.	Camsı Karbon Elektrot	31
2.1.1.2.	Voltametride Kullanılan Elektrotlara Yapılan Ön İşlemler	32

2.1.1.3.	Voltametrinin Kuramı	33
2.1.1.4.	Elektrokimyasal Taşınma Yolları	39
2.1.1.5.	Voltamogram Oranları Türev Voltametrisi	55
2. 2.	Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlik Testleri)	61
2. 2. 1.	Validasyonun Genel İşlemleri	61
2.2.2.	Tipik Validasyon Parametreleri	62
2.2.2.1.	Doğruluk (Accuracy)	63
2.2.2.1.1.	Referans bir yöntemle karşılaştırmak	64
2.2.2.1.2.	Kör matriks ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek	64
2.2.2.1.3	Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi	65
2.2.2.2.	Kesinlik (Precision)	65
2.2.2.2.1	Tekrarlanabilirlik	66
2.2.2.2.2	Orta-Kesinlik	66
2.2.2.2.3	Tekrar Elde Edilebilirlik	66
2.2.2.3.	Seçicilik (Selectivity, specificity)	67
2.2.2.4.	Teşhis Sınırı (LOD)	67
2.2.2.5.	Tayin Sınırı (LOQ) veya tayin alt sınırı (LLOQ)	68
2.2.2.6.	Doğrusallık (Linearity)	70
2.2.2.6.1	Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği)	70
2.2.2.7.	Duyarlılık (sensitivity)	71
2.2.2.8.	Çalışma Aralığı (Range)	72
2.2.2.9.	Sağlamlık (Robustness)	72
2.2.2.10.	Tutarlılık (Ruggedness)	72
2.2.2.11.	Stabilite (Stability)	73
2.2.2.11.1.	Dondurma çözme stabilitesi: (Freeze and Thaw Stability)	73
2.2.2.11.2.	Kısa süreli stabilite (Short-term temperature stability)	74
2.2.2.11.3.	Uzun süreli stabilite (Long-term stability)	74
2.2.3.	Yöntem Validasyonu İle İlgili Çalışmaların Sunumu	74
2.3	Kullanılan Araç ve Gereçler	75
2.3.1.	Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler	75
2.3.1.1.	Bas 100 W Elektrokimyasal Analizör	76

2.3.1.2.	Deney Elektrotları	79
2.3.1.2.1	Deney Elektrotlarının Ön İşlemleri	79
2.3.1.3.	Deney Hücresi	80
2.4.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	81
2.4.1.	Standart Maddelerin Saflık Kontrolleri	82
2.4.2.	Voltametrik Analizlerde Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması	82
2.4.2.1.	Standart Maddenin Stok Çözeltisi	82
2.4.2.2.	Destek Elektrolitleri	83
2.4.2.3.	Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları	83
2.4.2.4.	Voltametrik Yöntemin Tablet Dozaj Formlarına Uygulanması	84
2.4.2.5.	Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları	84
3.	BULGULAR	86
3.1.	Standart Maddenin Saflık Kontrolleri	86
3.2.	Etkin Maddeler Üzerindeki İncelemeler	91
3.2.1.	Karbidopa Üzerindeki Voltametrik çalışmalar	92
3.2.1.1.	Karbidopa'nın Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DVT) Çalışmaları	93
3.2.1.1.1.	Karbidopa'nın Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	93
3.2.1.1.2.	Karbidopa'nın Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	97
3.2.1.1.3.	Karbidopa'nın BR Tampon Çözeltileri İle Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	99
3.2.2.	Benserazid Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar	109

3.2.2.1.	Benserazid'in Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DVT) Çalışmaları	109
3.2.2.1.1.	Benserazid'in Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	109
3.2.2.1.2.	Benserazid'in Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	114
3.2.2.1.3.	Benserazid'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	116
3.2.3.	Levodopa Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar	126
3.2.3.1.	Benserazid'in Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DVT) Çalışmaları	126
3.2.3.1.1.	Levodopa'nın Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	126
3.2.3.1.2.	Levodopa'nın Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	130
3.2.3.1.3.	Levodopa'nın BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	134
3.2.4.	Hidroklorotiazid Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar	143
3.2.4.1.	Hidroklorotiazid'in Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DVT) Çalışmaları	143
3.2.4.1.1.	Hidroklorotiazid'in Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	143
3.2.4.1.2.	Hidroklorotiazid'in Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	147
3.2.4.1.3.	Hidroklorotiazid'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan	151

	Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	
3.2.5.	Amilorid Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar	161
3.2.5.1.	Amilorid'in Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DVT) Çalışmaları	161
3.2.5.1.1.	Amilorid'in Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	161
3.2.5.1.2.	Amilorid'in Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	166
3.2.5.1.3.	Amilorid'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları	169
3.2.6.	Karbidopa ve Levodopa'nın DPV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları	179
3.2.7.	Karbidopa ve Levodopa Karışımı İçin Geliştirilen DP Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları	189
3.2.8.	Benserazid ve Levodopa'nın DPV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları	195
3.2.9.	Benserazid ve Levodopa Karışımı İçin Geliştirilen DP Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları	205
3.2.10.	Amilorid ve Hidroklorotiazid'in DPV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları	211
3.2.11.	Amilorid ve Hidroklorotiazid Karışımı İçin Geliştirilen DP Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları	221

3.2.12.	Karbidopa ve Levodopa'nın KDV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları	227
3.2.13.	Karbidopa ve Levodopa Karışımı İçin Geliştirilen KD Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları	237
3.2.14.	Benserazid ve Levodopa'nın KDV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları	243
3.2.15.	Benserazid ve Levodopa Karışımı İçin Geliştirilen Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları	253
3.2.16.	Amilorid ve Hidroklorotiazid'in KDV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları	259
3.2.17.	Amilorid ve Hidroklorotiazid Karışımı İçin Geliştirilen Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları	269
4.	TARTIŞMA	276
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	287
	ÖZET	289
	SUMMARY	291
	KAYNAKLAR	293
	ÖZGEÇMİŞ	304

ÖN SÖZ

Levodopa- karbidopa ve Levodopa-benserazid ikili karışımları Parkinson hastalığının tedavisinde ve amilorid ve Hidroklorotiazit ikili karışımı da yüksek tansiyonun tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlardır. Bu ilaç etken maddelerinin birlikte kullanımı daha etkin bir tedaviyi sağlamaktadır. Tez kapsamında her iki grupta yer alan bu ikili ilaç karışımının aynı anda analizi için en uygun ortam ve elektrokimyasal yöntemler incelenmiş, yeni, basit, hızlı, duyarlı ve herhangi bir ayırma işlemine gerek duyulmayan seçici analiz yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaca ulaşabilmek için son zamanlarda büyük gelişme kaydeden elektrokimyasal teknikler kullanılmıştır. Çalışmalarımızda elektrokimyasal analizler temel alınmış ve ölçülen değerler voltamogram oranları türev voltametrisi teknikleri ile değerlendirilerek karışım içerisindeki etkin maddelerin hiçbir ayırma işlemi gerekmeksizin miktar tayinlerini yapılmıştır. Geliştirilen yöntemlerin bu ikili etken madde karışımlarını aynı anda içeren ilaç dozaj formlarından etken maddelerin aynı anda analizine uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Doktora eğitimim boyunca başta saygı değer hocalarıma olmak üzere Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D.'nin tüm personeline teşekkür ederim.

Öncelikle, danışman hocam sayın Prof.Dr.Sibel A. Özkan'a doktora eğitimim boyunca göstermiş olduğu yakın ilgisinden, tezimin başından sonuna, her aşamasında yararlandığım tecrübesinden, engin bilgisinden ve sabrından ötürü sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Değerli hocalarım, Prof.Dr.Feyyaz Onur'a, Prof.Dr.Bengi Uslu'ya ve Anabilim Dalının bütün hocalarına doktoram süresince vermiş oldukları bilgiler için teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, her zaman, her yardım istediğimde bana özveri ile yardımcı olduğu için başta Uzm.Ecz.Burcu Doğan'a olmak üzere,

Uzm. Ecz. Burçin Bozal’a, Uzm.Ecz.İ.Murat Palabıyık’a ve Uzm.Ecz.Özgür Üstündağ’a da teşekkür ederim.

Ve, her zaman yanımda olup bana güven ve destek veren, ideallerimin gerçekleşmesi için bana güç ve enerji veren hayat arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Ecz. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL’E çok teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

DV	Dönüşümlü Voltametri
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
DP	Diferansiyel Puls
KDV	Kare Dalga Voltametrisi
KD	Kare Dalga
AA (AC)	Alternatif Akım
DA (DC)	Doğru Akım
UV	Ultraviole
IR	Infrared
DTV	Doğrusal Taramalı Voltametri
TS	Teşhis Sınırı
TAS	Tayin Alt Sınırı
SS	Standart Sapma
BSS	Bağıl Standart Sapma
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

	SAYFA
1.1. Levodopa'nın açık formülü	4
1.2. Karbidopa'nın açık formülü	6
1.3. Benserazid'in açık formülü	8
1.4. Hidroklorotiazid'in açık formülü	14
1.5. Amilorid'in açık formülü	16
2.1. Camsı Karbon Elektrodun Yapısı	32
2.2. Yavaş Potansiyel Değişiminde Katı Elektrot voltamogramı	34
2.3. Potansiyel Tarama Tekniğinde Elde Edilen Potansiyel – Zaman Eğrisi.	37
2.4. Farklı Potansiyel Tarama Hızlarında Elde Edilen Akım – Potansiyel Eğrisi	38
2.5. Geri Dönüşümlü Bir Olayın Dönüşümlü Voltamogramı	43
2.6. Geri Dönüşümlü Bir Olayın Hızla Değişimini Gösteren Dönüşümlü Voltamogram.	45
2.7. Geri dönüşümsüz bir sistem için çeşitli hızlarda üst üste kaydedilmiş dönüşümlü voltamogramı	47
2.8. Diferansiyel puls polarografisinde uygulanan potansiyel dalgasının şekli	50
2.9. Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu	53
2.10. Geri dönüşümlü bir reaksiyon için kare dalga voltamogramı	54
2.11. Teşhis Sınırının Hesaplanmasında Kullanılan Sinyal/Gürültü Oranı	68
2.12. Tayin Alt Hesaplanmasında Kullanılan Sinyal/Gürültü Oranı Şekli	69
2.13. Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği) ve Eşitliği	71

2.14.	BAS 100 W Elektrokimyasal Analiz Cihazının Şeması	78
2.15.	Kullanılan deney elektrotlarının şekli	79
2.16.	BAS 100 W elektrokimyasal analizör deney hücresi	80
3.1.a	5×10^{-5} M derişimdeki Levodopa'nın 0.1 M HCl ortamdaki UV spektrumu	86
3.1.b	5×10^{-5} M derişimdeki Karbidopa'nın 0.1 M HCl ortamdaki UV spektrumu	87
3.1.c	5×10^{-5} M derişimdeki Benserazid'in 0.1 M HCl ortamdaki UV spektrumu	87
3.1.d	5×10^{-5} M derişimdeki Amilorid'in 0.1 M HCl ortamdaki UV spektrumu	88
3.1.e	5×10^{-5} M derişimdeki Hidroklorotiazid'in 0.1 M HCl ortamdaki UV spektrumu	88
3.2.a.	KBr diskine basılmış Levodopa'nın IR Spektrumu	89
3.2.b.	KBr diskine basılmış Karbidopa'nın IR Spektrumu	89
3.2.c.	KBr diskine basılmış Benserazid'in IR Spektrumu	90
3.2.d.	KBr diskine basılmış Amilorid'in IR Spektrumu	90
3.2.e.	KBr diskine basılmış Hidroklorotiazid'in IR Spektrumu	91
3.3a.	5×10^{-5} M karbidopa'nın pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,16	94
3.3b.	1×10^{-5} M karbidopa'nın pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH6,80; 2) pH8,00	95
3.4	1×10^{-5} M karbidopa'nın pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları İçerisindeki dönüşümlü voltamogramları 1) pH3,65; 2) pH4,64; 3) pH 5,70	98

3.5a.	5x10 ⁻⁵ M karbidopa'nın BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. pH 2,00; 2)pH 3,00;3)pH 4,00; 4)pH 5,00 5)pH 6,00; 6)pH 7,00	101
3.5b.	5x10 ⁻⁵ M karbidopa'nın BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00; 2) pH 9,00; 3) pH 10, 00; 4) pH 11,00	102
3.6a	5x10 ⁻⁵ M karbidopa'nın bütün pH değerleri içerisinde elde edilen Ep-pH eğrisi	105
3.6b	5x10 ⁻⁵ M karbidopa'nın bütün pH değerleri içerisinde elde edilen İp-pH eğrisi	105
3.7.	5x10 ⁻⁵ M karbidopa'nın pH 5,00 BRT içerisinde 5 – 200 mVs ⁻¹ tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a) v ^{1/2} – ip ve b) logv – log i grafikleri	108
3.8a.	1x10 ⁻⁴ M benserazid'in pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,16	111
3.8b.	1x10 ⁻⁴ M benserazid'in pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları İçerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH6,80; 2) pH8,00	112
3.9	1x10 ⁻⁴ M benserazid'in pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları İçerisindeki dönüşümlü voltamogramları 1) pH3,65; 2) pH4,64; 3)pH 5,70	115
3.10a.	1x10 ⁻⁴ M benserazid'in BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. pH 2,00; 2)pH 3,00;3)pH 4,00; 4)pH 5,00 5)pH 6,00; 6)pH 7,00	118
3.10b.	1x10 ⁻⁴ M benserazid'in BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00; 2) pH 9,00; 3) pH 10, 00; 4) pH 11,00	119
3.11a.	1x10 ⁻⁴ M benserazid'in bütün pH değerleri içerisinde elde edilen Ep-pH eğrisi	122
3.11.b	1x10 ⁻⁴ M benserazid'in bütün pH değerleri içerisinde elde edilen İp-pH eğrisi	122

3.12.	1×10^{-4} M benserazid'in pH 5,00 BRT içerisinde 5 – 200 mVs ⁻¹ tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a) $v^{1/2} - i_p$ ve b) $\log v - \log i$ grafikleri	125
3.13a.	1×10^{-4} M levodopa'nın pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,16	128
3.13b.	1×10^{-4} M levodopa'nın pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 6,80; 2) pH 8,00	129
3.14	1×10^{-4} M levodopa'nın pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları 1) pH 3,65; 2) pH 4,64; 3) pH 5,70	132
3.15a.	1×10^{-4} M levodopa'nın BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. pH 2,00; 2) pH 3,00; 3) pH 4,00; 4) pH 5,00 5) pH 6,00; 6) pH 7,00	135
3.15b.	1×10^{-4} M levodopa'nın BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00; 2) pH 9,00; 3) pH 10, 00; 4) pH 11,00	136
3.16a.	1×10^{-4} M levodopa'nın bütün pH değerleri içerisinde elde edilen Ep-pH eğrisi	139
3.16.b	1×10^{-4} M levodopa'nın bütün pH değerleri içerisinde elde edilen İp-pH eğrisi	139
3.17.	1×10^{-4} M levodopa'nın pH 5,00 BRT içerisinde 5 – 200 mVs ⁻¹ tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a) $v^{1/2} - i_p$ ve b) $\log v - \log i$ grafikleri	142
3.18a.	1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,16	145
3.18b.	1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 6,80; 2) pH 8,00	146
3.19	1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları 1) pH 3,65; 2) pH 4,64;	

	3)pH 5,70	149
3.20a.	1x10 ⁻⁴ M hidroklorotiazid'in BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. pH 2,00; 2)pH 3,00;3)pH 4,00; 4)pH 5,00 5)pH 6,00; 6)pH 7,00	152
3.20b.	1x10 ⁻⁴ M hidroklorotiazid'in BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00; 2) pH 9,00; 3) pH 10, 00; 4) pH 11,00	153
3.21a.	1x10 ⁻⁴ M hidroklorotiazid'in bütün pH değerleri içerisinde elde edilen Ep-pH eğrisi	156
3.21.b	1x10 ⁻⁴ M hidroklorotiazid'in bütün pH değerleri içerisinde elde edilen İp-pH eğrisi	156
3.22.	1x10 ⁻⁴ M hidroklorotiazid'in pH 2,00 BRT içerisinde 5 – 200 mVs ⁻¹ tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a) v ^{1/2} – ip ve b) logv – log i grafikleri	160
3.23a.	1x10 ⁻⁴ M amilorid'in pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,16	163
3.23b.	1x10 ⁻⁴ M amilorid'in pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH6,80; 2) pH8,00	164
3.24	1x10 ⁻⁴ M amilorid'in pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları 1) pH3,65; 2) pH4,64; 3)pH 5,70	167
3.25a.	1x10 ⁻⁴ M amilorid'in BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. pH 2,00; 2)pH 3,00;3)pH 4,00; 4)pH 5,00 5)pH 6,00; 6)pH 7,00	170
3.25b.	1x10 ⁻⁴ M amilorid'in BR tamponu içerisinde dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00; 2) pH 9,00; 3) pH 10, 00; 4) pH 11,00	171
3.26a.	1x10 ⁻⁴ M amilorid'in bütün pH değerleri içerisinde elde edilen Ep-pH eğrisi	174
3.26.b	1x10 ⁻⁴ M amilorid'in bütün pH değerleri içerisinde elde edilen	

	İp-pH eğrisi	174
3.27.	1×10^{-4} M amilorid'in pH 2,00 BRT içerisinde $5 - 200 \text{ mVs}^{-1}$ tarama hızlarında elde edilen DV'lara ait a) $v^{1/2} - i_p$ ve b) $\log v - \log i$ grafikleri	178
3.28.	2×10^{-5} M levodopa, 6×10^{-5} M karbidopa ile 2×10^{-5} M levodopa ve 6×10^{-5} M karbidopa karışımının pH 5,00 BRT içerisinde DP Voltamogramı	180
3.29a.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın DP oran voltamogram eğrileri. 1) 1×10^{-5} M; 2) 6×10^{-5} M; 3) 1×10^{-4} M Karbidopa ve bölücü derişimi 2×10^{-5} M Levodopa.	181
3.29b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın DP oran voltamogram türev eğrileri. 1) 1×10^{-5} M; 2) 6×10^{-5} M; 3) 1×10^{-4} M Karbidopa ve bölücü derişimi 2×10^{-5} M Levodopa	181
3.30a.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın DP oran voltamogram eğrileri. 1) 2×10^{-5} M; 2) 4×10^{-5} M; 3) 8×10^{-5} M Levodopa ve bölücü derişimi 6×10^{-5} M Karbidopa.	182
3.30b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın DP oran voltamogram türev eğrileri. 1) 2×10^{-5} M; 2) 4×10^{-5} M; 3) 1×10^{-8} M Levodopa ve bölücü derişimi 6×10^{-5} M Karbidopa	182
3.31a.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın DP oran voltamogram türev ile elde edilen kalibrasyon 8×10^{-6} M - 4×10^{-4} M Karbidopa ve bölücü derişimi 2×10^{-5} M Levodopa	185
3.31b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın DP oran voltamogram türev ile elde edilen kalibrasyon 1×10^{-5} M - 8×10^{-5} M Levodopa ve bölücü derişimi 6×10^{-5} M Karbidopa	185
3.32.	2×10^{-5} M benserazid, 6×10^{-5} M levodopa ile 2×10^{-5} M benserazid ve 6×10^{-5} M levodopa karışımının pH 5,00 BRT içerisinde DP Voltamogramı	196
3.33a.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın DP oran voltamogram eğrileri. 1) 1×10^{-5} M; 2) 6×10^{-5} M; 3) 2×10^{-4} M	

	Karbidopa ve bölücü derişimi $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa.	197
3.33b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın DP oran voltamogram türev eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $6 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa	197
3.34a.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Benserazid'in DP oran voltamogram eğrileri.1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Benserazid.	198
3.34b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Benserazid'in DP oran voltamogram türev eğrileri.1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $1 \times 10^{-8} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Benserazid	198
3.35a.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın DP oran voltamogram türev ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Benserazid ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa	201
3.35b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Benserazid'in DP oran voltamogram türev ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Benserazid	201
3.36	$2 \times 10^{-5} \text{M}$ Amilorid, $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid ve $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Amilorid ve $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid karışımı	212
3.37a.	pH 2,00 BR Tamponu (%20 MeOH) içerisinde Amilorid/Hidroklorotiazid'in DP oran voltamogram eğrileri.1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $1 \times 10^{-4} \text{M}$; 3) $6 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid.	213
3.37b.	pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Amilorid/Hidroklorotiazid'in DP oran voltamogramı türev eğrileri 1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $1 \times 10^{-4} \text{M}$; 3) $6 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid	213
3.38a	pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid'in DP oran voltamogram eğrileri. 1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $1 \times 10^{-4} \text{M}$; 3) $6 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid.	214

- 3.38b. pH 2,00 BR Tamponu (%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid'in DP oran voltamogramı türev eğrileri 1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $1 \times 10^{-4} \text{M}$; 3) $6 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid. 214
- 3.39a pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Amilorid/Hidroklorotiazid'in KD oran voltamogram türevi ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $1 \times 10^{-3} \text{M}$ Amilorid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid. 217
- 3.39b pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid'in KD oran voltamogram türevi ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $1 \times 10^{-3} \text{M}$ Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid. 217
- 3.40 $2 \times 10^{-5} \text{M}$ levodopa, $6 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa ile $2 \times 10^{-5} \text{M}$ levodopa ve $6 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa karışımının pH 5,00 BRT içerisinde KD Voltamogramı 228
- 3.41a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın KD oran voltamogram eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa. 229
- 3.41b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın KD oran voltamogram türev eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa 229
- 3.42a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın KD oran voltamogram eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa. 230
- 3.42b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın KD oran voltamogram türev eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $1 \times 10^{-8} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa 230
- 3.43a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın KD oran voltamogram türev ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $4 \times 10^{-4} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-5} \text{M}$

	Levodopa	233
3.43b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın KD oran voltamogram türev ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa	233
3.44	$6 \times 10^{-5} \text{M}$ benserazid, $2 \times 10^{-5} \text{M}$ levodopa ile $6 \times 10^{-5} \text{M}$ benserazid ve $2 \times 10^{-5} \text{M}$ levodopa karışımının pH 5,00 BRT içerisinde KD Voltamogramı	244
3.45a.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın KD oran voltamogram eğrileri.1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa.	245
3.45b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın KD oran voltamogram türev eğrileri.1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa	245
3.46a.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Benserazid'in KD oran voltamogram eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Benserazid.	246
3.46b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Benserazid'in KD oran voltamogram türev eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Benserazid	246
3.47a.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın KD oran voltamogram türev ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Benserazid ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa	249
3.47b.	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Benserazid'in KD oran voltamogram türev ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Benserazid	249
3.48	$2 \times 10^{-5} \text{M}$ Amilorid, $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid ve $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Amilorid ve $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid karışımı	260
3.49a.	pH 2,00 BR Tamponu (%20 MeOH) içerisinde Amilorid/Hidroklorotiazid'in KD oran voltamogram eğrileri.	

	1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-4} \text{M}$; 3) $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid.	261
3.49b.	pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Amilorid/Hidroklorotiazid'in KDP oran voltamogramı türev eğrileri 1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-4} \text{M}$; 3) $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid	261
3.50a	pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid'in KD oran voltamogram eğrileri. 1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid.	262
3.50b.	pH 2,00 BR Tamponu (%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid'in KD oran voltamogramı türev eğrileri 1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid.	262
3.51a	pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Amilorid/Hidroklorotiazid'in KD oran voltamogram türevi ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $4 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid.	265
3.51b	pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid'in KD oran voltamogram türevi ile elde edilen kalibrasyon $1 \times 10^{-5} \text{M}$ - $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Amilorid.	265

ÇİZELGELER

	SAYFA
2.1. Kullanılan Standart Maddeler	81
2.2. Tayinlerde Üzerinde Çalışılan İlaç Dozaj Formu ve Birim Doz İçeriği	81
2.3. Çözeltilerin Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler	82
3.1. Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen $5 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa'nın değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	96
3.2. Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen $5 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa'nın değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	99
3.3. BR Tamponu çözeltileri içerisinde kaydedilen $5 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa'nın değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	103
3.4. $5 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa'nın 5 BRT çözeltisi içerisinde $5-200 \text{mVs}^{-1}$ tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p) değerleri	107
3.5. Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen $1 \times 10^{-4} \text{M}$ benzerazid'in değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	113
3.6. Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen $1 \times 10^{-4} \text{M}$ benzerazid'in değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	116
3.7. BR Tampon çözeltileri içerisinde kaydedilen $1 \times 10^{-4} \text{M}$ benzerazid'in değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	120
3.8. $1 \times 10^{-4} \text{M}$ benzerazid'in 5 BRT çözeltisi içerisinde $5-200 \text{mVs}^{-1}$ tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p)	

	değerleri	124
3.9.	Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M levodopa'nın değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	130
3.10.	Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M levodopa'nın değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	133
3.11.	BR Tampon çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M levodopa'nın değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	137
3.12.	1×10^{-4} M levodopa'nın 5 BRT çözeltisi içerisinde $5-200 \text{ mVs}^{-1}$ tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p) değerleri	141
3.13.	Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	147
3.14.	Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	150
3.15.	BR Tampon çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	154
3.16.	1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in 5 BRT çözeltisi içerisinde $5-250 \text{ mVs}^{-1}$ tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p) değerleri	158
3.17.	Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M amilorid'in değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	165
3.18.	Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M amilorid'in değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	168

3.19.	BR Tampon çözeltileri içerisinde kaydedilen $1 \times 10^{-4} \text{M}$ hidroklorotiazid'in değişik pH değerlerinde DV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	172
3.20.	$1 \times 10^{-4} \text{M}$ amilorid'in 5 BRT çözeltisi içerisinde $5-250 \text{mVs}^{-1}$ tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p) değerleri	176
3.21.	Karbidopa'nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 304 mV 'da okunan akım değerleri.	183
3.22.	Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 226 mV 'da okunan akım değerleri.	184
3.23a	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri ($n=3$).	187
3.23b	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri ($n=3$).	188
3.24	Karbidopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	191
3.25	Karbidopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen geri kazanım sonuçları	192
3.26	Levodopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	193
3.27	Levodopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve	

	Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen geri kazanım sonuçları	194
3.28.	Benserazid'in pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 326 mV'da okunan akım değerleri.	199
3.29.	Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 226 mV'da okunan akım değerleri.	200
3.30a	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid'in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).	203
3.30b	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).	204
3.31	Benserazid içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	207
3.32	Benserazid içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen geri kazanım sonuçları	208
3.33	Levodopa içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	209
3.34	Levodopa içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	210
3.35	Amilorid'in pH 2,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen	

	derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 1240 mV’da okunan akım değerleri	215
3.36.	Hidroklorotiazid’in pH 2,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 1226 mV’da okunan akım değerleri.	216
3.37a	pH 2,00 BR Tamponu içerisinde Amilorid’in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).	219
3.37b	pH 2,00 BR Tamponu içerisinde Hidroklorotiazid’in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).	220
3.38	Hidroklorotiazid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	223
3.39	Hidroklorotiazid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen geri kazanım sonuçları	224
3.40	Amilorid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	225
3.41	Amilorid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	226
3.42.	Karbidopa’nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 324 mV’da okunan akım değerleri.	231
3.43.	Levodopa’nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen	

	derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 316 mV’da okunan akım değerleri.	232
3.44a	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa’nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).	235
3.44b	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa’nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).	236
3.45	Karbidopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	239
3.46	Karbidopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen geri kazanım sonuçları	240
3.47	Levodopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	241
3.48	Levodopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen geri kazanım sonuçlar	242
3.49.	Benserazid’in pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 362 mV’da okunan akım değerleri.	247
3.50.	Levodopa’nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 340 mV’da okunan akım değerleri.	248
3.51a	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid’in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli	

	validasyon parametreleri (n=3).	251
3.51b	pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).	252
3.52	Benserazid içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	255
3.53	Benserazid içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen geri kazanım sonuçları	256
3.54	Levodopa içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	257
3. 55	Levodopa içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	258
3.56	Amilorid'in pH 2,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 1240 mV'da okunan akım değerleri	263
3.57.	Hidroklorotiazid'in pH 2,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 1226 mV'da okunan akım değerleri.	264
3.58a	pH 2,00 BR Tamponu içerisinde Amilorid'in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).	267
3.58b	pH 2,00 BR Tamponu içerisinde Hidroklorotiazid'in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).	268

3.59	Amilorid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	271
3.60	Amilorid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen geri kazanım sonuçları	272
3.61	Hidroklorotiazid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	273
3.62	Hidroklorotiazid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.	274

1. GİRİŞ

Genellikle orta yaş hastalığı olan Parkinson hastalığı, beynin alt kısımlarındaki gri cevher çekirdeklerinin bozukluğuna bağlı bir sinir sistemi hastalığıdır. Adını hastalığı ilk defa 1817'de *titremeli felç* olarak tanımlayan James Parkinson'dan almıştır. Binde bir sıklıkla görülen, müzmin, ilerleyici, tedavisiz iyileşmeyen bir hastalıktır.

Koordineli hareketleri düzenleyen beyin bölümlerinden ortaya çıkan bozukluklar ile ilişkilidir. Bu bozukluğu yapan sebep tam bilinmiyorsa *idiyopatik Parkinson hastalığı*, sebebin belli olduğu durumlarda ise *Parkinsonien sendromlar* adı verilir. Bunlar: Geçirilmiş beyin enfeksiyonları, bazı ilaçlar, arteroskleroz, ailevi sebepler, travma, zehirlenmeler, tümörler, kandaki kırmızı hücrelerin aşırı yükselmesi gibi durumlardır.

Titreme, sertlik ve hareketlerin yavaşlaması temel belirtiler olarak ortaya çıkmaktadır. Bu belirtiler içinde titreme ilk ortaya çıkanı olup, genellikle başlangıçta tek eldedir. Zamanla aynı tarafta bulunan bacağı ve karşı taraftaki ele geçebilir. Sıklıkla hastalıktan vücudun bir yarısı baskın olarak etkilenir. Titreme dinlenme sırasında görülüp, uyuma anında kaybolur; sinirlilik halinde ve yorgunluğun artması durumunda titremenin arttığı görülür. Sertlik veya katılık boyun kaslarından başlar ve başın gövdeden önde tutulmasına sebep olur. Diz, kalça ve kol eklemlerinin bükük bir hal aldığı bu hastalıkta bel hafif öne eğilir. Hastalar çoğunlukla küçük hızlı adımlarla yürürler ve yürürken sendelerler. Sıklıkla hantallaşma görülür (Goodman&Gilman, 1990).

Günümüzün en yaygın hastalıklarından birisi de Hipertansiyondur. Kan basıncının (tansiyon) normalden yüksek olması haline hipertansiyon denmektedir. Dokuların canlı kalabilmesi için gereken kan kalp tarafından belirli periyotlarda ve ritmik hareketler ile pompalanır. Bu hareketler kasılma ve gevşeme hareketleridir. Kalbin kasılması sırasında kan atardamar sistemine doğru gönderilir. Hemen

ardından kalbin gevşeme hareketi başlar. Gevşeme ile birlikte kalp tekrar kan ile dolar. Herhangi bir sırada kanın atardamar duvarına yapmış olduğu basınç tansiyon olarak adlandırılmaktadır. Kasılma anında ölçülen basınç sistolik basınç iken gevşeme anında ölçülen basınç ise diastolik basınçtır. Bahsi geçen bu basınç değerleri egzersiz sırasında veya heyecanlanma gibi duygusal tepkilerde artar, uyurken ise azalır. Belirli sınırlar dahilinde yaşamımızın günlük faaliyetlerine bağlı olarak bu basınç değerlerinin değişiklik göstermesi doğaldır. Ancak bu değerlerin devamlı olarak yüksek seyretmesine hipertansiyon denir.

1.1. Parkinson Hastalığı Tedavisi

Bugün Parkinson hastalığı'nın esas tedavisi olarak ele alınan tedavi ilaçla tedavidir. Beyinde sinir hücrelerinin uyarılabilme özelliğini arttıran asetilkolinle bunun aksini yapan dopamin arasında belli bir denge vardır. Parkinsonda bu denge asetilkolin lehine bozulmuş olup, tedavide dopamin açığının yerine konması gerekmektedir. Sentetik dopamin kan ile beyin arasındaki bariyeri aşamamaktadır. Bu problem kan-beyin engelini aştıktan sonra dopamine dönüşen, Levodopa'nın bulunması ile çözümlenmiştir (Goodman&Gilman, 1990).

Levodopa (L-Dopa) dopamine metabolize olan aromatik amindir. Oral yolda kullanılan antiparkinson etkili bir ilaçtır. Tedaviye ilk sunulduğu 1960 yılında Parkinson hastalığının tedavisinde bir devrim yaratmıştır ve Parkinson hastalığının tedavisi bakımından halen bir altın standart olarak kabul edilmektedir. Araştırmalar Parkinson hastalığı belirtilerinin corpus striatum'da dopamin tükenmesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Dopamin kan-beyin engelini aşamaması nedeniyle Parkinson hastalığında dopamin tedavisi etkisizdir. Ancak, dopaminin metabolik ön maddesi levodopa kan-beyin engelini aşar ve bazal gangliyonlarda dopamine dönüşür. Levodopanin Parkinson hastalığı belirtilerine karşı bu mekanizma ile etkili olduğu düşünülmektedir. Levodopa oral olarak uygulandığında beyin dışında kalan dokularda hızla dopamine dönüştüğünden, verilen dozun ancak bir kısmı değişime uğramadan santral sinir sistemine ulaşır. Bu nedenle yeterli etki elde edebilmek için

yüksek dozlarda uygulanması gerekir. Bu dozlarda da sıklıkla bulantı ve kardiyak aritmiler gibi istenmeyen etkiler ortaya çıkar. Bu etkilerin bir bölümü periferde yani ekstraserebral dokularda oluşan dopamine bağlıdır. Levodopa bu nedenle karbidopa veya benserazid gibi aromatik amino asit dekarboksilaz inhibitörü bir ilaçla kombine preparatları şeklinde kullanılır.

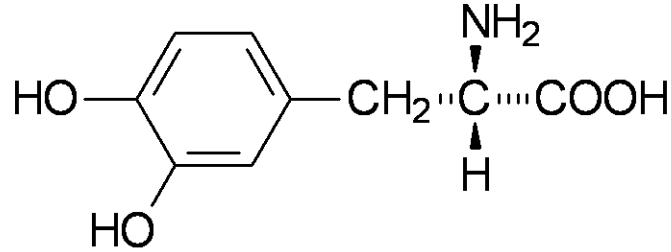
1.2. Levodopa Hakkında Genel Bilgi

Levodopa, kimyasal yapı olarak kateşolaminlerin sınıflandırıldığı grubun içine giren bir 3-4 dihidroksifeniletılamin türevidir. Formülasyonu 50 mg, 100 mg ve 200 mg Levodopa (Karbidopa, Benserazid ve Entekapon ile kombine) ihtiva eden tabletler halindedir. Formülasyonda boyar madde olarak demir oksit (E172) kullanılmıştır. (Ommaty.R., Vademecum 2009)

1.2.1. Fiziksel Özellikleri

Levodopa beyaz veya açık krem renkli, kokusuz, kristalize bir tozdur. Nemli ortamda havadaki oksijenden etkilenecek hızla okside olur ve kararır. Suda hafifçe çözünür; 1 M HCl çözeltisinde serbestçe çözünür; pratik olarak alkol, kloroform ve eterde çözünmez. Karbon dioksit'ten arındırılmış sudaki % 1'lik çözeltisinin pH'sı 4,5 – 7,0 arasındadır.

1.2.2. Levodopa'nın Kimyasal Yapısı:



Şekil 1.1. Levodopa'nın açık formülü

Okunuşu: (-)-3-(3,4-Dihidroksifenil)-L-alanin

Kapalı formülü: $C_9H_{11}NO_4$ 'dir.

Molekül Ağırlığı :197.2 g/mol

1.2.3.Farmakolojik Özellikleri

Beyinde nörotransmitter olarak rol alan dopamin, parkinsonlu hastalarda bazal gangliyonlarda yeterli miktarda bulunmamaktadır. Dopamin'in kan-beyin bariyerini geçebilme yeteneği çok sınırlı olduğundan, yerine koyma tedavisi Dopamin'in metabolik prekürsörü olan levodopa uygulanarak gerçekleştirilir. Uygulama sonrası, levodopa vücutta gerek serebral gerekse ekstraserebral dokularda hızla dopamine dekarboksile olur. Verilen dozun ancak çok az bir kısmı değişime uğramadan santral sinir sistemine ulaşır. Bu nedenle yeterli etki elde edebilmek için yüksek dozlarda uygulanması gerekir. Bu dozlarda da sıklıkla bulantı ve kardiyak aritmiler gibi istenmeyen etkileri ortaya çıkar. Bu etkilerin bir bölümü periferde yani ekstraserebral dokularda oluşan dopamine bağlıdır. Sonuç olarak, uygulanan levodopa'nın ekstraserebral dekarboksilasyonunun inhibe edilmesi özellikle istenir. Levodopa bu

nedenle karbidopa veya benserazid gibi aromatik amino asit dekarboksilaz inhibitörü bir ilaçla kombine preparatları şeklinde kullanılır.

1.2.4. Farmakokinetik Özellikleri:

Levodopa oral yoldan verilir. Oral yoldan alındığında amino asit taşıma mekanizması Levodopa'nın gastrointestinal kanal membranını aşmasını sağlar. Yaklaşık % 30-50'si sistemik dolaşıma girer. Gastrointestinal kanalda amino asit konsantrasyonunun yüksek olması Levodopa'nın absorpsiyonunu olumsuz yönde etkileyebilir. Bu açıdan protein bakımından zengin bir diyetle alınması absorpsiyon üzerinde olumsuz etki yapar. Diğer yandan amino asitler ve levodopa arasında kan-beyin engeli arasındaki taşınma için de bir yarışma söz konusudur ve bunun gastrointestinal kanaldaki yarışmadan daha önemli olduğuna dair bulgular vardır.

Levodopa tüm vücuda dağılır, fakat periferde metabolize olması nedeniyle %1'den daha az bir bölümü santral sinir sistemine geçebilir; verilen bir dozun yaklaşık % 95'i mide, bağırsaklar ve karaciğerde L-aromatik amino asit dekarboksilaz enzimi tarafından Dopamin'e metabolize edilir.

1.2.5. Terapötik Kullanımları:

Tedaviye kademeli olarak başlanmalı, doz bireysel olarak saptanmalıdır. Parkinsonizmin erken evrelerinde, günde 3-4 kere yarım doz ile tedaviye başlamak önerilir. Başlangıç doz programının tolere edilebilirliği onaylandığı zaman, hastanın cevabına göre doz yavaş yavaş arttırılmalıdır. Eğer günlük dozun daha da arttırılması

gerekirse, bu ayda bir yapılmalıdır. Ortalama günlük dozu 300 mg-600 mg arasındadır. (RxMediaRharma 2009[®] ; Goodman&Gilmann, 1990)

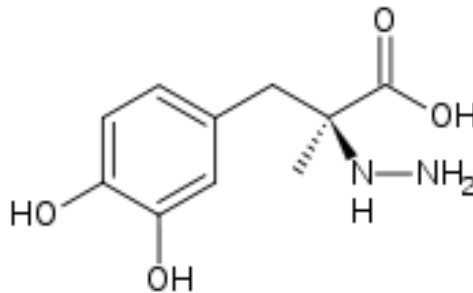
1.3. Karbidopa Hakkında Genel Bilgi

Formülasyonu 12,5 mg, 25 mg Karbidopa(Levodopa ile kombine) ihtiva eden tabletler halindedir. Formülasyonda boyar madde olarak demir oksit (E172) kullanılmıştır. (Ommaty.R.,Vademecum 2009)

1.3.1. Fiziksel Özellikleri

Karbidopa beyazdan sarımsı beyaza değişen renkte, kokusuz veya hemen hemen kokusuz bir tozdur. Su ve metil alkolde serbestçe çözünür; alkolde çok hafif çözünür ya da hiç çözünmez; 3M hidroklorik asitte serbestçe çözünür; aseton, kloroform, eter ve metilen klorürde pratik olarak çözünmez; seyreltik mineral asit çözeltilerinde çözünür.

1.3.2. Karbidopa'nın Kimyasal Yapısı:



Şekil 1.2. Karbidopa'nın açık formülü

Okunuşu: (+)-2-(3,4-Dihidroksibenzil)-2-hidrazinopropiyonik asit monohidrat

Kapalı formülü: $C_{10}H_{14}N_2O_4 \cdot H_2O$ 'dir.

Molekül Ağırlığı :244.25 g/mol

1.3.3.Farmakolojik Özellikleri

Oral Levodopa, beyin dışında kalan dokularda hızla dekarboksilasyona uğrayarak dopamine dönüştüğünden, verilen dozun yalnızca çok küçük bir bölümü santral sinir sistemine değişmeksizin ulaşabilir. Karbidopa, Levodopa'nın periferdeki dekarboksiasyonunu engeller ve beyine giden Levodopa miktarını artırır. Levodopa ile birlikte verildiğinde, plazmadaki Levodopa düzeyini yükseltir ve belirli bir terapötik cevap elde edilebilmesi için alınması gereken Levodopa dozunun yaklaşık % 75 oranında azalmasını sağlar. Karbidopa, Levodopa'nın 50 dakika olan eliminasyon yarı-ömrünü 90 dakikaya uzatır; idrardaki Dopamin miktarıyla, bunun başlıca metaboliti olan homovanilik asit miktarını azaltır.

1.3.4. Farmakokinetik Özellikleri:

Karbidopa'nın eliminasyon yarı-ömrü, 0.7-4.0 saat arasında değişmek üzere ortalama 1.6-2 saattir. Karbidopa'nın, -metil-3-metoksi-4-hidroksifenilpropiyonik asit ve – metil-3,4-dihidroki-fenilpropiyonik asit olmak üzere başlıca 2 metaboliti vardır. Bunlar değişmeden ya da glukronik asitle konjugasyon ürünü olarak, öncelikle böbrekler yoluyla vücuttan atılır. Verilen dozun idrara geçen bölümünün % 30'u, değişikliğe uğramamış Karbidopa şeklindedir.

1.3.5. Terapötik Kullanımları:

Karbidopa herhangi bir farmakolojik aktivite göstermez. Periferik bir dekarboksilaz inhibitörü olduğu için Levodopa'nın periferde Dopamin'e dönüşmesini engeller. Levodopa gibi kan-beyin bariyerini aşmaz. Günlük dozu 75 mg'a kadar çıkabilmektedir. (RxMediaRharm 2009®)

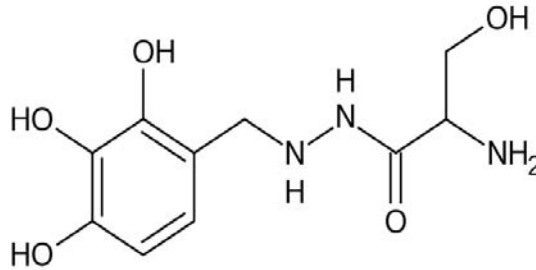
1.4. Benserazid Hakkında Genel Bilgi

Formülasyonu 25 mg ve 50 mg Benserazid ihtiva eden tabletler halindedir. Formülasyonda boyar madde olarak demir oksit (E172) kullanılmıştır. (Ommaty.R.,Vademecum 2009)

1.4.1. Fiziksel Özellikleri

Benserazide beyaz renktedir. Suda çok iyi çözünür. Nötral, alkali ve çok kuvvatli asidik ortamlarda stabilitesini koruyamaz.

1.4.2. Benserazid'in Kimyasal Yapısı:



Şekil 1.3. Benserazid'in açık formülü

Okunuşu: 2- Amino-3-hidroksi-2¹-(2,3,4-trihidroksibenzil)hidrazid klorür
Kapalı formülü:C₁₀H₁₆ClN₃O₅ dir.

Molekül Ağırlığı :293.70 g/mol

1.4.3.Farmakolojik Özellikleri

Levodopa oral olarak uygulandığında beyin dışında kalan dokularda hızla Dopamin'e dönüştüğünden, verilen dozun ancak bir kısmı değişime uğramamış şekilde santral sinir sistemine ulaşır. Bu nedenle yeterli etki elde edebilmek için yüksek dozlarda uygulanması gerekir. Bu dozlarda da sıklıkla bulantı ve kardiyak aritmiler gibi istenmeyen etkiler ortaya çıkar. Bu etkilerin bir bölümü periferde oluşan Dopamin'e bağlıdır. Bu nedenle Benserazid gibi bir aromatik amino asit dekarboksilaz inhibitörü bir ilaçla Levodopa'nın kombine kullanımı gerekmektedir. Klinik çalışmalarda ve terapötik kullanımda Levodopa ve Benserazid'in 4:1 oranındaki kombinasyonunun en iyi sonuçları sağladığı gösterilmiştir. Bu kombinasyon tek başına yüksek dozlarda uygulanan Levodopa'dan daha etkili olup çok daha iyi tolere edilebilir.

1.4.4. Farmakokinetik Özellikleri:

Büyük çoğunluğu ince bağırsağın yukarı bölümünden absorbe olur. Terapötik dozlarda kan-beyin engelini aşamaz. Benserazid ince bağırsak ve karaciğerde trihidroksibenzilhidrazin'e hidrosillenir. Levodopa'yı dekarboksilasyona karşı en fazla trihidroksibenzilhidrazin metaboliti aracılığıyla olmak üzere, başta bağırsaklar ve vücudun diğer bölümlerinde korur. Büyük bölümü ilk 6 saat içinde olmak üzere, böbreklerden hızla atılır. Üriner atılımın % 85'i 12 saat içinde gerçekleşir.

1.4.5. Terapötik Kullanımları:

Benserazid herhangi bir farmakolojik aktivite göstermez. Periferik bir dekarboksilaz inhibitörü olduğu için Levodopa'nın periferde Dopamin'e dönüşmesini engeller. Levodopa gibi kan-beyin bariyerini aşmaz. Günlük dozu 25 mg'a kadar çıkabilmektedir. (RxMediaRharm 2009®)

1.5. Hipertansiyon Hastalığı Tedavisi

Hipertansiyon, kronik seyirli bir hastalıktır. Hastalığın altında yatan hiçbir neden bulunamayan tipine “esansiyel hipertansiyon” denir ve tüm hipertansiyon hastalarının yüzde 90'ı bu kategoriye girer. “Sekonder hipertansiyon” dediğimiz diğer tip ise hastaların küçük bir bölümünü oluşturur ve diğer hastalıklar, kullanılan ilaçlar gibi bilinen nedenlere bağlı olarak gelişir. Bu durumda hastalığın altında yatan neden ve kan basıncı kontrol altına alınabilir. Ancak esansiyel hipertansiyon tam tedavi edilemeyen, hayat boyu süren, ancak uygun tedavi ve yaşam tarzı değişiklikleriyle kontrol altına alınıp ilerlemesi önlenabilen bir hastalıktır. Nedeni hakkında birçok teori geliştirilmiş olmasına rağmen henüz oluşma mekanizması tam olarak aydınlatılamadı.(Goodman&Gilmann, 1990)

Bugün kabul edilen kan basıncı değeri dinlenme halindeki normal bir yetişkinde 120/80 mmHg'dır (milimetre civa). Herhangi bir kişide kan basıncı uyku sırasında düşük, sinirli ya da heyecanlıyken yüksektir. Normal şartlarda, sürekli olarak kan basıncı 120/80 mmHg üzerinde olan kişiler hipertansiyon hastalığı adayı kabul edilmektedir. Kan basıncı sürekli olarak 140/90 mmHg ve üzerinde bir basınçla seyrediyorsa hipertansiyondan bahsedilir. Hipertansiyon kalp hastalıkları için temel bir risk faktörüdür. Eğer tedavi edilmezse beyin, dolaşım, kalp, damar, göz ve böbrek hastalıkları için temel hazırlar. Bir kez teşhis yapıp tedaviye başlanırsa

artan kan basıncı düşürülebilir, kalp ve dolaşım sistemindeki hastalık riski azaltılabilir. Sanayileşmiş ülkelerdeki yetişkin nüfusun %10-20 kadarında hipertansiyon bulunduğu hesaplanmaktadır. Kişinin yaşı, cinsiyeti ve ırkı hipertansiyon sıklığı konusunda belirleyici faktörlerdir. Kişi yaşının hipertansiyona olan katkısı öncelikle damarlarda yaşlanmaya eşlik eden anormalliklerdir. Bu durum özellikle de kanı kalpten damarlara taşıyan damarlardaki esneklik kaybı ile açıklanabilir. Ancak yaşla hipertansiyon arasındaki bu bağlantıya bazı ilkel toplumlarda hiç rastlanmamaktadır. Bu durumda etkili faktörün "uygarlaşma" ve bununla bağlantılı yaşam biçimi olduğu da söylenebilir. Tuz kullanımı, aşırı beslenme, hareketsiz yaşam, stres, vs buna neden olan faktörler arasında sayılabilir. Hipertansiyon ciddi bir durumdur. Hipertansiyon, kendi başına öldürücü değildir; fakat tedavi edilmediği zaman hipertansiyonun sonuçları öldürücü olabilir (O'Neil, 2001; Sweetman, 2007; Duplay, 2007; RxMediapharma, 2009).

Hipertansiyon kalbi zorlayarak kalp yetmezliğine de neden olabilir. Üstelik ateroskleroz ve bunun yol açabileceği iskemik kalp hastalığı (belli bir bölgede kan akımının kesilmesi nedeniyle oluşan geçici kansızlık sonucu dokuların hava alamaması) riskini de önemli ölçüde artırır. Buna ek olarak; hipertansiyonlu hastalar kanama ve beyindeki kan damarlarının pıhtıyla tıkanması olayına diğerlerinden daha kolay yakalanırlar. Hipertansiyon ayrıca koroner arter hastalığına da büyük katkıda bulunur ki, bu hastalık sanayileşmiş toplumlarda ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Bütün bu olgular tedavi edilmeyen hipertansiyonun sonuçları olup, hipertansiyona bağlı morbidite (hastalık) veya mortalite (ölüm) büyük bir bölümünü oluşturur.

Hipertansiyon, nedenine göre 2 grupta sınıflandırılabilir.

- i. esansiyel (primer - birincil) hipertansiyon
- ii. sekonder (ikincil) hipertansiyon

Hipertansiyon vakalarının yaklaşık %90'ı, nedeni (etioloji) bilinmediğinden primer ya da "esansiyel" hipertansiyon olarak adlandırılır. Hipertansiyon vakalarının geriye kalan bölümüne, yani yaklaşık %10'una bu durumun nedeni bilindiğinden

"sekonder" hipertansiyon denir. Böbrek kökenli olan (renal) hipertansiyon bunların en yaygın olanıdır. Kan basıncının istenen seviyelerde kontrolü, tedavideki tek amaç değildir. Bunun yanı sıra yaşam kalitesinin yükseltilmesi, tedavi yan etkilerinin en azda tutulması, tedavi maliyetinin azaltılması, komplikasyonların engellenmesi, ölüm oranlarının azaltılması ve eşlik eden hastalıkların da (ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı, dislipidemi vb) önlenmesi/iyileştirilmesi, tedavi amaçları arasındadır (O'Neil, 2001; Sweetman, 2007; Duplay, 2007; RxMediapharma, 2009).

Tedavi üç grupta incelenebilir.

- i. İlaçsız tedavi (kilo verme, tuz kısıtlaması, sigaranın bırakılması, alkolden kaçınma, strese uzaklaşma, egzersiz),
- ii. İlaç tedavisi,
- iii. Cerrahi tedavi.

Günümüzde değişik gruplardan ilaçlar, birçok etki mekanizmasıyla hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Bu da hipertansiyon tedavisinde ilaç seçimini çok önemli hale getirmektedir.

Antihipertansif ilaçların sınıflaması: Antihipertansif ilaçlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir ve tedavide genellikle ilk 6 grupta yer alan ilaçlar kullanılmaktadır (O'Neil, 2001; Sweetman, 2007; Duplay, 2007; RxMediapharma, 2009).

- i. İdrar söktürücüler
- ii. β adrenerjik reseptör blokerleri
- iii. α adrenerjik reseptör blokerleri
- iv. Kalsiyum kanal blokerleri
- v. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEİ)
- vi. Angiotensin II (AT-II) reseptör blokerleri
- vii. Direkt etkili damar genişleticiler
- viii. Santral etkili sempatotik ilaçlar
- ix. Adrenerjik nöron blokerleri

x. Sadece hipertansif kriz tedavisinde kullanılan ilaçlar

Hipertansiyon tedavisinde ilk aşamada diüretik ilaç tedavisi tercih edilmektedir. Diüretikler kronik olarak alındıklarında periferik vasküler dirençte azalmaya neden olurlar. Periferik vasküler dirençte yaptıkları azalmanın kesin mekanizması bilinmemektedir; bununla birlikte, kan basıncını düşürebilmeleri için böbreklerden üriner sodyum atılımı gerekmektedir. Diüretiklerin başlangıçtaki kan basıncını düşürücü etkileri kalp debisini, plazma hacmini ve ekstraselüler sıvı hacmini düşürmelerine bağlıdır. Sonunda kalp debisi normale döner, plazma ve ekstraselüler sıvı hacim değerleri normalden hafifçe düşük düzeylerde kalır, fakat periferik vasküler direnç, kan basıncının düşük düzeyde kalmasına neden olacak şekilde düşer. Tiazid türevi diüretikler ile yapılan tedavide potasyum kaybı fazla olmaktadır. . (RxMediaRharma 2009®)

Hidroklorotiazid ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiazid yapılı diüretik bir ilaçtır. Tiazid grubu diüretikler hipertansiyonun başlangıç tedavisinde tek başlarına veya diğer ilaçlarla kombine halde kullanılırlar. Kıvrım diüretiklerinden farklı olarak, böbrek yetmezliği olan hastalarda etkinlikleri azalır. Hidroklorotiazid diabetes insipitus ve hiperkalsüriye karşı da kullanılır.

Amilorid oral yoldan kullanılan potasyum tutucu bir diüretiktir. Potasyum atılımını artıran diüretiklerin(tiazid türevleri gibi) neden olduğu hipokaleminin tedavi veya profilaksisi için kullanılır. Bundan başka ödemin çözülmesi ve hipertansiyon tedavisinde yardımcı olarak da kullanılmaktadır. Amilorid diğer diüretiklerle karşılaştırıldığında zayıf antihipertansif veya diüretik etki göstermesine rağmen, tiazid ve halka diüretiklerle kombine olarak kullanıldığında, kombine diüretik etki basit bir aditif etkileşmeden beklenene göre daha fazla olur. Başka bir ifade ile diüretik ilaçlar, amilorid'in zayıf diüretik etkisini potansiyalize ederler. Amilorid özellikle potasyum takviyesini tolere edemeyen veya potasyum takviyesine cevap vermeyen hastalarda yararlı olabilir.

Türkiye’de Hidroklorotiazid ve Amilorid’in kombine olarak kullanıldığı bir adet farmasötik preparat bulunmaktadır.

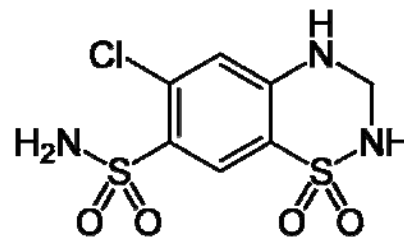
1.6. Hidroklorotiazid Hakkında Genel Bilgi

Formülasyonu 12,5 mg , 25 mg ve 50 mg Hidroklorotiazid ihtiva eden tabletler halindedir. Formülasyonda boyar madde olarak demir oksit (E172) kullanılmıştır. (Ommaty.R., Vademecum 2009)

1.6.1. Fiziksel Özellikleri

Beyaz veya beyaza yakın, kokusuz kristal yapıli bir tozdur. Suda hafifçe çözünür, etil alkol ve metil alkol içindekiözürlüğü suya göre daha azdır. Alkali hidroksitler ve aseton içinde çözünürlüğü iyidir. Eter, kloroform ve seyreltik mineral asitler içinde çözünmez.

1.6.2. Hidroklorotiazid’in Kimyasal Yapısı:



Şekil 1.4. Hidroklorotiazid’in açık formülü

Okunuşu: 6-Kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazidin-7-sülfonamid 1,1-dioksit

Kapalı formülü: $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ dir.

Molekül Ağırlığı :297.70 g/mol

1.6.3.Farmakolojik Özellikleri

Hidroklorotiazid'in etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Genellikle normal kan basıncını etkilemez. Başlangıçta kalp debisini düşürerek, plazma ve ekstraselüler sıvı hacmini azaltarak (hipovolemi) kan basıncını düşürürler. Ancak tedaviye birkaç hafta devam edildiğinde, düşen plazma hacmi yavaş yavaş normale dönmesine rağmen yaptığı hipotansiyon devam eder. Bunun nedeni periferik vasküler rezistansta yaptıkları azalmadır ve olasılıkla damar düz kas hücrelerinin noradrenalin'e karşı duyarlılıklarının azaltılmasından kaynaklanır.

1.6.4. Farmakokinetik Özellikleri:

Hidroklorotiazid'in gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu verildiği farmasötik şekle ve verilen doza bağlı olarak değişkenlik gösterir. Sistemik biyoyaralanımı yaklaşık % 50-60'tır. Etkisi oral yolla verildikten 2 saat sonra başlar ve doruk etki düzeyine 4 saatte ulaşır. Toplam etki süresi 6-12 saattir. Hidroklorotiazid plasentayı aşmasına rağmen kan-beyin engelini aşmaz. Anne sütüne geçebilir. Metabolize olmaz ve esas olarak idrarla değişmeden atılır; verilen dozun % 61'i 24 saatte elimine olur.

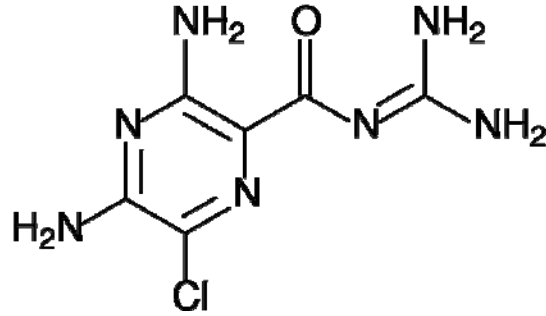
1.7. Amilorid Hakkında Genel Bilgi

Formülasyonu 5 mg Amilorid ihtiva eden tabletler halindedir. Formülasyonda boyar madde olarak demir oksit (E172) kullanılmıştır. (Ommaty.R.,Vademecum 2009)

1.7.1. Fiziksel Özellikleri

Açık sarıdan yeşile değişen renkte, kokusuz ya da çok hafif kokulu bir tozdur. Su alkolde hafifçe çözünür; eter, kloroform ve asetonda pratik olarak çözünmez; dimetilsülfoksitte serbestçe çözünür; metil alkolde az çözünür.

1.7.2. Amilorid'in Kimyasal Yapısı:



Şekil 1.5. Amilorid'in açık formülü

Okunuşu: N-Amidino-3,5-diamino-6-kloropirazin-2-karboksamid hidroklorür dihidrat

Kapalı formülü: $C_6H_9Cl_2N_7O$ dir.

Molekül Ağırlığı :266.09 g/mol

1.7.3. Farmakolojik Özellikleri

Amilorid sodyum transport mekanizmasını inhibe ederek distal tubuluslarda sodyum reabsorpsiyonunu doğrudan inhibe eder. Tubulus membranında bir potansiyel farkı yaratarak potasyumun pasif salgılanmasını bloke eder. Bu mekanizma Amilorid'in potasyum tutucu etki göstermesinin esas nedenini oluşturur.

Amilorid hipertansiyon tedavisinde nadiren tek ilaç olarak kullanılır; bu olgularda hafif hipotansif etki gösterir.

1.7.4. Farmakokinetik Özellikleri:

Oral olarak verilen Amilorid'in yaklaşık % 50'si gastrointestinal kanaldan absorbe olur. Besinler ilacın absorpsiyonunda % 50'ye varan azalmaya neden olabilir, ancak absorpsiyon hızını değiştirmezler. Etkisi genel olarak ilacın verilmesinden sonraki 2 saat içinde ortaya çıkar; doruk düzeyine ulaşması 6-10 saat sürer. Hayvanlarda yapılan deneylerde plasentayı aştığı ve süte geçtiği gösterilmesine rağmen insanlarda bu konu ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Verilen dozun yaklaşık % 50'si değişmeden idrar ile atılırken, % 40'ı da yine değişmeden feçes ile atılır. Yarı ömrü böbrek fonksiyonu normal olan hastalarda 6-9 saat arasındadır.

1.8. Levodopa ve Benserazid için Yapılmış Analiz Yöntemleri

1.8.1. Elektrokimyasal Yöntemler

Süslü ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada levodopa ve benserazidin ikili karışımından aynı anda voltametrik analizi için devamlı dalgaçık dönüşüm tekniği adı verilen kemometrik bir teknik kullanmışlardır. Bu analizi yapabilmek için pH 3 Britton-Robinson tamponu ortamında kare dalga voltametrisi yöntemi ve camı karbon elektrotla elde ettikleri voltammogramları devamlı dalgaçık dönüşüm tekniğiyle doğrusallığı $4.0-18.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralığında levodopa için ve $2.0-10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralığında da benserazid için sağlamışlardır. Ölçümlemlerini levodopa için 460 mV da ve benserazid için 320 mV da yapmışlardır. Geliştirdikleri bu yöntemi levodopa ve benserazid'i birlikte içeren kapsül dozaj formlarına uygulamışlardır. Analiz sonuçlarının gerekli bütün validasyon hesaplamalarını yapmışlardır.

Bergami ve ark (2005) levodopanin tayini için pH 3.0 asetat tamponu ortamında altın perde baskılı elektrodu dedektör olarak kullanarak durgun ve akışa enjeksiyon sisteminden analizini yapmışlardır. Tayin aralığı olarak $9.9 \times 10^{-5} - 1.2 \times$

$10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ve teşhis sınırı olarak da $6.8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ değerleri bulunmuştur. Amperometrik şartlar olarak 0.80V potansiyel değeri, 14.1 mL.dak^{-1} akış hızı kullanılarak pH 3.0 asetat tamponu ortamında $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ - $6.6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ doğrusallık aralığı ve $9.9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ teşhis sınırı saptanmıştır. Yöntem, herhangi bir ayırma işlemi yapılmaksızın levodopanin farmasötik dozaj formlarından analizi için kullanılabilmektedir.

1.8.2. Spektrofotometrik Yöntemler

Dinç ve ark (2007) levodopa ve benserazidin ikili karışımından aynı anda analizi ve çözünme hızı testlerinin hesaplaması için devamlı dalgaçık dönüşüm tekniği adı verilen kemometrik bir teknik ve klasik türev spektrofotometrik yöntemini kullanmışlardır. Devamlı dalgaçık dönüşüm tekniğini normal UV-spektrofotometrik yöntemle elde ettikleri sinyallere uygulamışlardır. Levodopa için $1-80 \text{ µg/mL}$ doğrusallık aralığı ve benserazid için de $5-240 \text{ µg/mL}$ doğrusallık aralığını yapay mide ortamında $250-310 \text{ nm}$ dalga boyları arasında çalışarak elde etmişlerdir. %99.1 ve % 104.7 geri kazanımı türev spektrofotometris yöntemi ile ve 100% ve 102.9% geri kazanımı da devamlı dalgaçık dönüşüm tekniğiyle sırasıyla levodopa ve benserazid için elde etmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemleri yapay mide sıvısından ve tablet dozaj formlarından levodopa ve benserazid'in aynı anda analizleri için kullanmışlardır.

Karpinska ve ark (2005) levodopa, benserazid ve askorbik asit üçlü karışımının aynı anda analizleri için türev spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. levodopa, benserazid ve askorbik asit üçlü karışımının aynı anda ve herhangi bir ayırma işlemi yapılmaksızın akışa enjeksiyon yöntemi ile analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Levodopanin benserazid veya askorbik asit karışımından analizi için 1. türev spektrofotometrik yöntemi, üçlü karışımın aynı anda analizi içinde 3. türev spektrofotometrik yöntemden yararlanılmıştır. Analiz yöntemini tabletlerden levodopa ve benserazidin aynı anda tayini için kullanmışlardır. Bu yöntemin akışa enjeksiyon yöntemine uygulanabilirliği de test edilmiştir.

Pistonesi ve ark (2004) geliştirdikleri akışa enjeksiyon analiz yönteminde kinetik spektrofotometrik verilerin analizi için üç yönlü çoklu kalibrasyon tekniği kullanarak levodopa ve benserazid'in aynı anda analizini yapmışlardır. Diyot dizi dedektöründen elde ettikleri spektrofotometrik verilerini kemometrik analiz teknikleri ile analizini yapmışlardır. Numune hazırlama sırasında herhangi bir ön işleme ihtiyaç duyulmadan dozaj formlarından numunelerin hazırlığı yapılmış ve analizi gerçekleştirilmiştir.

Uslu ve ark (2002) levodopa ve bensezidin aynı anda analizi için türev oranları türev spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemin gerekli bütün validasyon çalışmalarını yapıp bu ikili karışımın tabletlerden analizini aynı anda analizini gerçekleştirmişlerdir. Türev oranları 1. türev spektrofotometrik yöntemde levodopa için 287.7 nm dalga boyu ve benserazid için 251.4 nm dalga boyu ölçüm için seçilmiştir. Bu dalga boylarında yapılan analizlerde levodopa için 10-70 µg/ml ve benserazid için 5-50 µg/ml derişim aralığında doğrusallık bulunmuştur. Geliştirdikleri yöntemi sentetik karışımlardan ve farmasötik preparatlardan bu ikili karışımın analizi için başarı ile uygulamışlardır.

Coello ve ark (2000) levodopa ve benserazidin aynı anda tayini için geliştirdikleri kinetik spektrofotometrik yöntemden elde ettikleri verilerin analizi için üç yönlü çoklu kalibrasyon tekniğini kullanmışlardır. Asidik ortamda KIO₄ reaksiyonundan sonra etken maddelerin oksitlenmiş ürünlerinin 500-700 nm dalga boyu aralığında ölçümleri alınarak çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bu renklenmiş ürünlerle elde edilen analiz sonuçları kemometrik hesaplama yöntemleri ile analiz edilmiştir. Bu ikili karışımın analizi farmasötik dozaj formlarından gerçekleştirilmiştir. YPSK yöntemi ile elde ettikleri sonuçları geliştirdikleri analiz yöntemi ile karşılaştırmışlar ve uygulanabilirliğini göstermişlerdir.

Blanko ve ark (2000) alışmalarında levodopa ve benserazidin dozaj formlarından analizi için kemometrik ölçüm tekniklerini kullandıkları spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Levodopa için % 0.5, benserazid için % 0.9 oranında bir tekrar edilebilirlikle analizlerini gerçekleştirmişlerdir.

Yöntemin uygulanabilirliğini dozaj formlarından elde ettikleri sonuçlarla göstermişlerdir.

1.8.3. Diğer Yöntemler

Marques ve ark (2008) levodopa ve benserazid'in aynı anda analizi çoklu pompa akış sisteminde kemilüminesans tayin yöntemi önermişlerdir. Geliştirilen yöntem luminol kullanılarak kemilüminesans emisyonu oluşturulması ve bunun ölçülmesine dayanmaktadır. Elde edilen sonuçlar yapay sinir ağları yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. 5-30 mg.L⁻¹ doğrusallık aralığı levodopa için ve 2.5-20 mg. L⁻¹ doğrusallık aralığı da benserazid için bulunmuştur. Yöntem levodopa ve benserazid'i ikili karışımını birlikte içeren dozaj formlarına uygulanmıştır.

He ve ark (2007) geliştirdikleri kapiler elektroforez yöntemi ile levodopa ve benserazid'in aynı anda analizini gerçekleştirmişlerdir. Kapiler elektroforez yönteminde dedektör olarak kemilüminesans dedeksiyonu kullanmışlardır. Teşhis limiti olarak benserazid için 1.85 µg/mL ve levodopa için 0.12 µg/mL bulunmuştur. Yöntemi Medopar® tablet dozaj formlarından analiz levodopa ve benserazid'in aynı anda analizleri için kullanmışlardır. Geliştirdikleri yöntem sonuçlarının literatürde yer alan sonuçlarla uyumlu bulunduğunu belirtmişlerdir.

He ve ark (2006) geliştirdikleri kapiler elektroforez-kemilüminesans dedeksiyonu yöntemi ile levodopa ve benserazid'in aynı anda analizini tablet dozaj formundan ve idrar numunelerinden gerçekleştirmişlerdir. Teşhis limiti olarak benserazide için 1.85 µg/mL ve levodopa için 0.12 µg/mL bulunmuştur. Geliştirdikleri bu yöntemle doğrusallık aralığını levodopa için 1.0-100.0 µg mL⁻¹ ve benserazid için ise 10.0 - 1000 µg mL⁻¹ olarak bulmuşlardır. Geliştirdikleri yöntemin uygunluğunu ve uygulanabilirliğini göstermişlerdir.

1.9. Levodopa ve Karbidopa için Yapılmış Analiz Yöntemleri

1.9.1. Kromatografik Yöntemler

Karimi ve ark (2006) yaptıkları YPSK yönteminde elektrokimyasal dedektör kullanarak levodopa, metabolitleri ve karbidopanin aynı anda plazmadan analizlerini gerçekleştirmişlerdir. İnsan plazmasından gerçekleştirdikleri bu çalışmada % 77 ile % 107 geri kazanımla analizini yaptıkları maddeleri tayin edebilmişlerdir.

Sagar ve ark (2000) YPSK yönteminde elektrokimyasal dedektör kullanarak levodopa, karbidopa ve metabolitlerinin insan plazma ve idrarından aynı anda analizleri için bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Karbon fiber mikro elektrodu +0.8V potansiyelde ve ters faz kolonda maddeleri ayırarak analizlerini yapmışlardır. Levodopa, karbidopa için teşhis sınırı olarak sırasıyla 5 ve 8 ng ml⁻¹ değerleri ve tayin aralığı olarak da 5 and 8 ng ml⁻¹ bulunmuştur. Geliştirdikleri yöntemin gerekli validasyon verilerini de hesaplayarak sunmuşlardır.

Tolokan ve ark (1997) yaptıkları çalışmada levodopa, karbidopa'nın köpek plazmasından aynı anda tayinini YPSK- elektrokimyasal dedektör yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Köpek plazmasının gerekli ayırma işlemlerini yaptıktan sonra aynı anda analizini yapmışlardır. Bu çalışmada akışa enjeksiyon analiz ünitesini YPSK cihazı ile kombine halde kullanmışlar ve Duellin® isimli levodopa, karbidopa karışımını içeren anti-parkinson ilacı verilmiş köpek plazmasından bu maddelerin aynı anda analizini yapmışlardır.

1.9.2. Spektrofotometrik Yöntemler

Talebpour ve ark (2004) NMR spektroskopi yöntemi ile levodopa, karbidopa ve metildopa'nın insan serumundan ve farmasötik dozaj formlarından aynı anda analizini yapmışlardır. Maddelerin aynı anda kalitatif ve kantitatif analizleri, 500 MHz proton NMR spektrometri yöntemi ile rezonans karakterleri yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Levodopa, karbidopa ve metildopa için sırasıyla teşhis sınırı 4.2, 1.7 and 1.6 μgml^{-1} olarak bulunmuştur. İnsan serumundan analizleri % 82 ile % 96 geri kazanım aralığında tayin edilebilmiştir.

1.10. Hidroklorotiazid ve Amilorid için Yapılmış Analiz Yöntemleri

1.10.1. Kromatografik Yöntemler

Elshanawane ve ark (2009) amilorid HCL ve hidroklorotiazid'in aynı anda analizini gerçekleştirmek için klortalidon'un iç standart olarak kullanıldığı spektrofotometrik dedektörlü bir YPSK yönetimi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem bir ters-faz kromatografidir. Hareketli faz 10 mM KH_2PO_4 çözeltisi (pH 4.5): metanol (70 :30, v/v) karışımı ve akış hızı 1 mL/dk.dır. Dedektör 215 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi 10 dk.dır. Geliştirilen yöntem doğruluk, kesinlik, tekrar edilebilirlik ve stabilite açısından valide edilmiştir. Yöntem herhangi bir ön işlem gerektirmeden idrar numunelerine uygulanabilmektedir.

Song ve ark. (2007), amilorid ve hidroklorotiazid'in aynı anda saptanabilmesi için elektrosprey tandem kütle spektrometrik saptamaya dayanan bir sıvı kromatografik yöntem geliştirip validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Numune hazırlanması sırasında proteinleri çöktürmek amacıyla asetonitril kullanmışlardır. Ayırma işlemi gradient elüsyon yöntemi ile Phenomenex Curosil-PFP (250 x 4.6 mm, 5 μm) kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz % 0.23 amonyum

asetat içeren % 0.15 formik asit çözeltisi ve metanol den oluşmuş ve akış hızı 1.0 mL.dk⁻¹ olarak belirlenmiştir. İç standart olarak Rizatriptan kullanılmıştır. Pozitif m/z 230 → 171 amiloridi, m/z 270 → 158 rizatriptanı ve negatif m/z 296 → 205 hidroklorotiazidi göstermektedir. Amilorid ve Hidroklorotiazid için tayin sınırı sırasıyla 0.1 ve 1.0 ng·mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Bu değerler bu iki madde için daha önce yayınlanan ultraviyole, florometrik ve kütle spektrometrik yöntemlere göre daha düşük değerlerdir. Gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmaları farklı konsantrasyonda yapılmış ve % 15'in altında bulunmuştur. Bu basit ve duyarlı LC/MS/MS yöntemi amilorid ve hidroklorotiazid tabletlerinin sağlıklı Çinli gönüllü erkeklerde farmokinetik çalışmasında başarıyla kullanılmıştır.

Lu ve ark. (2007), on iki adet diüretik etkili ilaç için hızlı, yüksek çözünürlüklü ve etkili bir kütle spektrometrik dedektörlü kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. İki adet nötral bileşik dışında on adet diüretik bileşik kapiler elektroforez yöntemiyle 20 kV voltaj uygulamak suretiyle 50 µm çapında ve uzunluğu 48.5 cm olan silika kapiler içinde 40 mM amonyum fosfat tamponu (pH 9.40) içerisinde 6 dakika içinde ayrılmışlardır. Kapiler elektroforez bir ortogonal elektrosprey ara yüzeyi yardımıyla bir kütle spektrometresine bağlanmıştır. Optimize edilmiş koşullar altında oniki adet diüretik için LOD değerleri ve tanımlayıcılık katsayısı sırasıyla, 13-2.7 µmol/L olarak ve 0.9921 - 0.9978 değerleri arasında belirlenmiştir. Geri kazanım değerleri ise % 72.4 ile % 118 arasında değişmektedir. İdrar numuneleri 0.22 µm membran filtrelerden geçirildikten sonra doğrudan enjekte edilebilmektedir.

Goebel ve ark. (2004), atletlerden alınan idrar numunelerinde diüretiklerin rutin analizi için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde katı faz tüketme ile elde edilen ekstreler elektrosprey iyonlaşmalı tandem kütle spektrometri dedektörlü kromatografi cihazına enjekte edilmektedir. Yöntemde her bir örnek tek bir enjeksiyonla ayrılmakta ve yöntem 35 adet diüretik ve ilgili bileşikler saatte beş numune saptayacak şekilde ayarlanmıştır. İdrar numunelerindeki 100ng/ml derişimin altındaki bileşikler saptanabilmektedir ve geri kazanımları % 80 ve üzerindedir.

1.10.2. Spektrofotometrik Yöntemler

Abdel-Hay ve ark. (2008) Amiloride HCl (AMD), Hidroklorotiazit (HCT) ve Timolol maleat (TIM)'in aynı anda ayrılabilmesi için iki adet basit ve hızlı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Birinci yöntem zero-crossing teknik ile birlikte türev spektrofotometrisini içermektedir. Sıfırıncı ve birinci türev kullanılarak 365 ve 385 nm'de AMD, üçüncü derece türev kullanılarak 265 nm'de HCT ve birinci derece türev kullanılarak 315.4 nm'de TIM saptanmıştır. İkinci yöntem ise spektrum oranları, birinci ve ikinci türev eğrilerinin ölçüm tekniğini içermektedir. Bu yöntemde her bir maddenin miktar tayini iki noktada yapılmaktadır. HCT bölücü olarak kullanıldığında AMD/HCT oranının birinci ve ikinci türevleri alınarak 299.4 ve 311 nm'de AMD saptanmıştır. Bölücü olarak TIM kullanılıp ikinci türev alındığında elde edilen değerler 264.2 ve 290 nm de HCT konsantrasyonu ile orantılıdır. Bölücü spektrum olarak AMD'nin spektrumu kullanıldığında 289.8 nm de alınan birinci türev yardımıyla ve bölücü olarak HCT kullanıldığında 314.8 nm de alınan birinci türev yardımı ile TIM araştırılmıştır. Önerilen yöntem, laboratuvar ortamında hazırlanan tabletler ve farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışım üzerinde uygulanmış, doğruluk ve tekrar edilebilirlik açısından iyi sonuçlar alınmıştır.

Kartal ve ark. (1999), amilorid ve hidroklorotiazid'in eş zamanlı miktar tayini için hızlı, doğru, kesin ve özel bir metod olan spektrum oranları türev spektrofotometrisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemlerini tanımlanmışlardır. Karışım için yapılan spektrum oranları türev spektrofotometrisinde 285.7 nm'de hidroklorotiazid için 302.5 nm'de de amilorid için ölçüm yapılmıştır. İkinci yöntem ise LiChrosorb RP-C₁₈ kolonunun kullanıldığı (5 µm, 20 cm x 4.6 mm) HPLC yöntemidir. 0.025 M o-fosforik asid (pH 3.0'a trietilamin (TEA) ile ayarlanmış), asetonitril (84:16 v/v) hareketli faz olarak 1.2 ml dk⁻¹ akış hızında kullanılmıştır. Saptama işlemi 278.0 nm'de UV detektör ile sağlanmıştır. Geliştirilen yöntemler farklı oranlarda bu bileşikler içeren piyasa preparatlarından ve laboratuvar ortamında hazırlanmış karışımlardan elde edilen numunelere uygulanmıştır.

1.10.3. Kemometrik Yöntemler

Ferraro ve ark. (2004), Amilorid HCl, Hidroklorotiazid ve Timolol maleat'ın aynı anda miktar tayininin yapılabilmesi için CLS, PCR ve değiştirilebilir PLS yöntemlerini bu maddelerin UV spektrumlarına (^0D) ve bu spekturumun (^1D) birinci türevlerine uygulamışlardır. Bu yöntemlerin etkinliği ANOVA testi kullanılmak yoluyla birbirleriyle karşılaştırılmıştır. ^0D -PCR, ^0D -PLS-1, ^1D -PCR ve ^1D -PLS-1 yöntemleri ile tekrar edilebilir ve istatistiksel olarak benzer sonuçları elde edilmiştir. Dört adet farklı istatistiksel eşdeğerlik basamağı analitlerin sentetik karışımlarına başarıyla uygulanmıştır. İşlem Amilorid HCL ve Hidroklorotiazid'i tek başına içeren tabletlere ve Atenolol ve Timolol maleat ile karışım haldeki tabletlerine de başarıyla uygulanmıştır.

Ferraro ve ark. (2002), çok değişkenli spektrofotometrik kalibrasyon yöntemini kullanarak Amilorid HCl, Hidroklorotiazid içeren sentetik karışımların ve tablet numunelerinin miktar tayinini eş zamanlı olarak gerçekleştirmişlerdir. Analitin içerisinde 10:1 oranında bulunan bileşiklerin elektronik absorpsiyon verilerinin hızlı ve doğru ayırımı en küçük kareler (PLS-1) yöntemi ile sağlanmıştır. Bu ayırım sırasında herhangi bir ön işlem gerekmemiş ve herhangi bir maddenin girişimi oluşmamıştır. Yöntem, her iki bileşiğin sentetik karışımları yardımıyla, doğrusal çalışma aralığının doğruluğu ve gün-içi günler-arası kesinlik çalışmaları yapılarak valide edilmiştir. Doğrusal aralık Hidroklorotiazid için 21.7-30.4 mg l⁻¹ ve Amilorid için 1.8-3.0 mg l⁻¹ olarak belirlenmiştir. Önerilen yöntem bu bileşikleri içeren farklı farmasötik dozaj formlarından miktar tayininde kullanılmış ve HPLC yöntemi ile oldukça uyumlu sonuçlar vermiştir. İlaç çözünürlük çalışmalarında kullanılan metanol:su ortamında bu maddelerin stabilitesinin nasıl olduğunun anlaşılması için yapılan çalışmaya da başarıyla uygulanmıştır.

Dinc ve ark. (2002), Amilorid ve Hidroklorotiazid içeren farmasötik preparatların absorpsiyon ve türeve dayalı spektrofotometrik çalışmalarına dört farklı kemometrik yöntem olan klasik en küçük kareler (CLS), ters en küçük kareler (ILS),

temel parça regresyonu (PCR) ve bölgesel en küçük kareler (PLSR) yöntemini uygulamışlardır. 205-395 nm aralığında Amilorid için 2-10 µg/ml, Hidroklorotiazid için 4-28 µg/ml aralığında ve 25 karışım dizaynı noktasından 0. derece ve 1. derece türev spektrum değeri yardımıyla kemometrik kalibrasyonlar oluşturulmuştur. Her iki maddenin absorbpsiyon ve türev spektrumlarının ölçümüne dayalı önerilen yöntemin istatistiksel karşılaştırmaları yapılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Ölçme Yöntemi

Bu çalışmada dönüşümlü voltametri (DV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve kare dalga voltametrisi (KDV) kullanılmıştır. Voltametri ve polarografi ilaç analizlerinde ilk kez 1954 yılı Çekoslovak Farmakopesinde kullanılmıştır, (Patriarche ve ark., 1979; Willard ve ark., 1981). Halbuki polarografinin farmasötik preparatlara uygulanması 1930'lara kadar dayanır. Bu yöntemle saf etken maddenin yanında çok kompleks bir karışım olsa bile (çözünmeyen ilaç katkı maddeleri, serum ya da plazmada bulunan endojen maddeler, v.b.) aktif maddelerin analizi duyarlılıkla ve herhangi bir girişim olmaksızın yapılabilmektedir. Pek çok ilaç etken maddesi ve vücutta bulunan fizyolojik aktif maddeler polarografik veya voltametrik yöntemlere cevap vermektedir. Bu yöntemlerin diğer analitik yöntemlere üstünlüğü ise az miktarda maddenin analiz için yeterli olması sebebiyle ucuz olması, kolay uygulanabilirliği, analitlerin ön saflaştırma işlemlerine fazla ihtiyaç olmaması, fazla çözücü gerektirmemesi ve hassas bir yöntem olmasıdır. (Zuman ve Brezina, 1962; Kissinger ve Heineman, 1996)

2.1.1.Voltametri

Çalışmamızda uygulanan yöntem olan voltametri; yükseltgenebilen ve/veya indirgenebilen (elektroaktif, elektrot tepkimesine giren) organik ve inorganik maddelerin çeşitli ortamdaki çözeltilerinden uygun koşullarda elde edilen akım şiddeti-gerilim eğrilerinin (voltamogram) karakteristiklerini inceleyen ve değerlendiren analiz tekniğidir, (Bockris ve ark.1970; Yıldız ve Genç 1993).

Polarografi ilk olarak 1922 yılında Çek kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından bulunmuştur. Heyrovsky ilk olarak voltametrinin özel tipi olan polarografiyi bulmuş ve bu buluşundan ötürü 1959 yılında Kimya Nobel Ödülü'nü

kazanmıştır. Elektrokimyanın önemli bir dalı olan polarografide, diğer tekniklerden farklı şekilde, çalışma elektrotu olarak damlayan civa elektrotu kullanılmaktadır, (Bond, 1980).

Önceki yıllarda damlayan civa elektrot bazı üstünlükleri nedeniyle voltametrik çalışmalarda sıkça kullanılmaktaydı. Üstünlükleri, her yeni damla ile yeni ve temiz bir metal yüzeyinin yaratılıyor olması, herhangi bir gerilimde anında tekrarlanabilir akımlar oluşturmalarıdır. Bunun yanında civanın hidrojen indirgenmesine karşı gösterdiği yüksek aşırı gerilimden dolayı bağıl olarak büyük negatif gerilimlerde kullanılabilir olmasıdır.

Bütün bu üstün özelliklerine karşın bu elektrotun bazı sınırlamaları da vardır. Metalik civanın düşük pozitif gerilimde bile kolayca yükseltgenebilmesi, ($\sim +0.4V$), civa elektrotun kullanılmasını sınırlayan en önemli özelliklerden birisidir. Ayrıca kullanılan civanın temizlenmesinin oldukça zahmetli olması, damlama süresinin ayarlanmasının zorluğu, civanın damlatılmasında kullanılan kılcalların kolayca tıkanabilmesi, civa buharlarının toksik olması ve bu nedenle tekniğin doğrudan dokuya uygulanamaması bu elektrotun kullanılmasındaki başlıca sorunlardır.

Damlayan civa elektrodu yukarıda belirtilen sorunları ortadan kaldırmak için 1940'lı yılların sonunda Skobets ve arkadaşları tarafından başlatılan ve günümüze kadar süren katı elektrot çalışmaları bu yönetime geniş bir uygulama alanı sağlamıştır, (Adams ve ark. 1958; Skoog ve Leary 1996).

1960'lı yılların ortalarında klasik voltametrik tekniklerle yapılan pek çok değişiklik, yöntemin duyarlılığını ve seçiciliğini büyük ölçüde arttırmış ve özellikle tıp, eczacılık, biyokimya ve çevre çalışmalarında yönetime geniş ve giderek artan bir uygulama alanı sağlamıştır, (Patriarche ve ark 1979; Brezina ve Zuman 1958; Greef ve ark. 1990 ; Şentürk ve ark. 1996 ; Özkan ve ark. 1997; Yılmaz ve ark. 1998).

Voltametrik çalışmalarda kullanılan elektrotlar; platin, altın, rutenyum gibi inert metaller (Bishop ve Hussein 1984; Biryol ve ark.1989) pirolitik grafit ve camı karbon (Panzer 1972; Shearer ve ark. 1972 ; Tjaden ve ark 1976; Özkan ve ark.1998; Şentürk ve ark.1998), çinko oksit, iridyum oksit gibi yarı iletken elektrotlardır. Tel, levha, disk biçiminde olan katı elektrotların sabit, döner veya titreşen tipleri vardır, (Biryol ve ark. 1989).

Polarografik yöntem damlayan civanın kolayca yükseltgenmesi nedeniyle daha çok indirgenme olaylarının, voltametri ise katı elektrotlar yardımı ile yükseltgenme olaylarının incelenmesinde kullanılmaktadır. Karbon elektrotlarla yapılan voltametri ise hem yükseltgenme, hem de indirgenme bölgesinde geniş bir çalışma aralığına imkân tanımaktadır, ($\sim -1.8V - +1.8V$ (sulu ortamda)), (Tunçel ve ark., 1984).

Katı elektrot yüzeyinin deneye hazırlanmasının tekrar edilebilirlik açısından önemi büyüktür. Deney süresince elektrot yüzeyine adsorblanmış veya birikmiş safsızlıklardan dolayı katı elektrotlar son derece düzensiz davranış gösterirler. Katı elektrotlarda, civa elektrotta olduğu gibi elektrot yüzeyinin yenilenmesi söz konusu olmadığından tekrar edilebilir sonuçların alınabilmesi için katı elektrotların yüzeyinin her ölçümden önce temizlenmesi gerekir. Ön işlem adı verilen bu işlemler her metal için kendine özgü olmaktadır, (Wang ve Hutchins 1985 ; Fagan ve ark. 1985; Özkan ve ark. 1994).

Voltametride değişik tipte katı elektrotlar kullanılmaktadır. Örneğin soy metal elektrotlar, çeşitli karbon elektrotlar, modifiye elektrotlar gibi.

Yeni elektrot şekil ve tasarımı (modifiye elektrotlar) (Wang ve Luo 1985; Biryol ve ark. 1996; Biryol ve ark. 1998; Uslu ve Biryol 1999; Özkan ve ark.1993), yeni yüzey temizleme teknikleri (Özkan ve ark. 1994) ve elektroanaliz yöntemleri (puls dalga formları, adsorptif teknikler, sıyırma) (Yılmaz ve ark. 2001; Uslu ve ark. 2001; Özkan ve Uslu 2002; Uslu ve ark. 2002; Uslu 2002; Özkan ve ark. 2003a; Özkan ve ark. 2003b; Doğan ve ark.2004; Uslu ve Özkan 2004; Doğan ve ark.

2005a; Doğan ve ark. 2005b; Uslu ve ark. 2005a; Uslu ve ark. 2005b; Doğan ve ark. 2006; Uslu ve ark. 2006; Ostatna ve ark 2006) sayesinde farmasötik preparatlarda ve vücut sıvılarındaki aktif bileşenler, safsızlıklar, ara ürünler ve metabolitler oldukça geniş tayin sınırlarıyla ($\sim 10^{-11}$ M), yüksek seçicilikte ve hızlı bir biçimde doğrudan analiz edilebilmektedir.

Bu nedenle ilaç analizlerinde kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlere alternatif yöntem olarak nitelendiren modern voltametri bu yöntemlerle yarışmalı olmaktan çok onları tamamlayıcı niteliktedir. Ayrıca yöntemin yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle birleştirilmesiyle, kompleks karışımların analizinde de başarıyla uygulanması sağlanmıştır, (Wang 1988 ; Özkan ve ark. 1998).

Katı elektrotların kullanıldığı voltametri, özellikle indirgenme olaylarına oranla az incelenmiş olan yükseltgenme tepkimelerindeki rolü ile biyoloji alanında ve dolayısıyla fizyolojik önemi olan pek çok bileşiğin farmakolojik etki mekanizmalarının açıklanmasında da başarıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla geliştirilen ultramikro elektrotlar canlı organizmada *invivo* çalışmaların yapılmasına olanak sağlamaktadır, (Lane ve Hubbart, 1976 ; Tunçel ve ark. 1984).

Bu yöntemdeki en önemli gelişmelerden biri de, biyosensörlerle biyolojik ortamda reaksiyona giren ve oluşan ürünlerin analizlerinin yapılabilmesidir. Bunlara örnek olarak; glikoz elektrotu, üre elektrotu v.b. verilebilir. Son yıllarda özellikle ilaç – DNA etkileşmelerinin incelenebilmesi ve yeni elektrot tasarımlarının yapılabilmesi için elektrokimyasal DNA biyosensörleri üzerindeki çalışmalar hızla artmaktadır, (Erdem ve Özsöz, 2002; Palecek ve Jelen 2002; La-Scalea ve ark., 2002; Kerman ve ark., 2001; Ibrahim ve ark., 2002; Özkan ve ark. 2004; Rauf ve ark 2005).

Voltametrik ve polarografik yöntemlerin, eczacılık alanında ve klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmasının nedeni düşük derişimlerde farmasötik analizlerin yapılabilmesi, numunelerin kolayca ve çok kısa bir sürede hazırlanabilmesi, analiz süresinin kısa olması, ortamda bulunan katkı maddelerinin veya safsızlıkların analiz sonucunu etkilememesi ve bu tekniklerin ürün kalite

kontrolünde kullanabilmesine olanak sağlamaktadır. Tablet, kapsül, süspansiyon, şurup v.b. ilaç formülasyonlarının çözünmeyen kısımlarının veya katkı maddelerinin genelde elektroaktiviteleri bulunmadığı için herhangi bir ayırma işlemine gerek olmadan analizleri yapılabilir. Bu yöntemlerin diğer bir üstünlüğü de pahalı ve az miktardaki ilaçların analizinde de çok az miktarda numuneye ihtiyaç gösterdiği için kullanılabilmesidir, (Brezina ve Zuman,1958; Zuman ve Brezina,1962).

Katı elektrotlar grubunda yer alan karbon elektrodun birkaç değişik şekli bulunmaktadır, (Uslu ve Özkan S.A. 2007). Elmas, grafit, camsı karbon ve fullerens, (Panzer 1972). Elmas elektrik akımını iletmez. Bor ile dopa edilmiş elmas elektrodun zemin akımının düşük olması gibi üstünlükleri vardır ve ilaç analizlerinde son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Grafit, yumuşak ve gözenekli bir materyal olduğu için yüksek adsorpsiyon kapasitesi vardır. Camsı karbon ise mekanik olarak iyi bir iletkenliğe sahiptir. Camsı karbon elektrokimyasal dedektör olarak en çok kullanılan dedektör tipidir. Fullurens, camsı karbon veya grafit sp^2 tipinde hibritleşmiş karbonlardır. Bütün bu grup karbon materyalleri elektrot hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

2.1.1.1. Camsı Karbon Elektrot

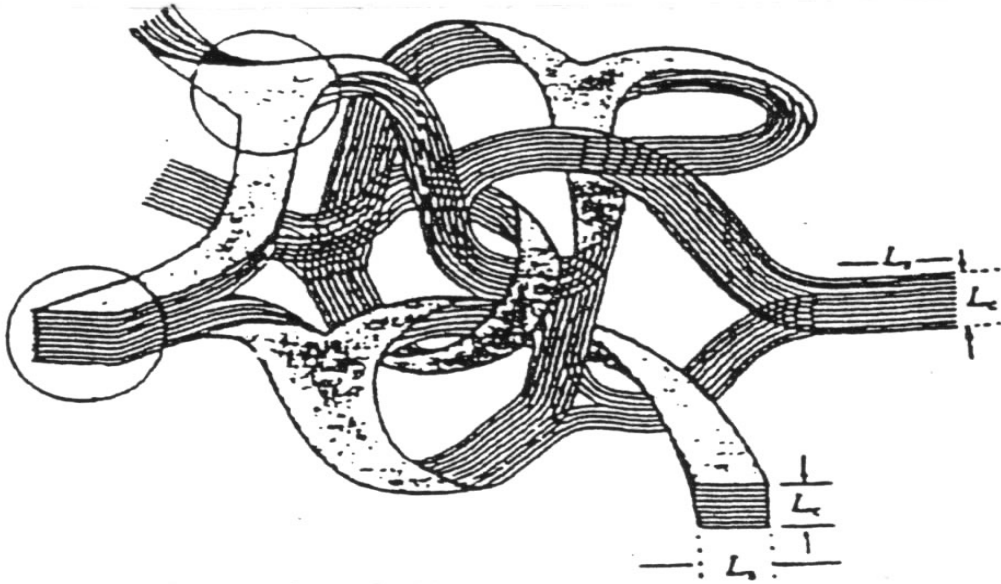
Camsı karbon diğer karbon yapılarından farklı fiziksel özellikler taşır. Yüzeyinde daha ufak gözenekler bulunur ve bu özelliğinden dolayı diğer karbon türlerine göre daha çok kullanılır.

Pek çok çalışmada camsı karbon elektrottaki elektron transferinin metal elektrottakinden daha yavaş olduğu bulunmuştur. Camsı karbon elektrodun yapısı ve özellikleri ile elektroanalitik kimyadaki kullanımı Van der Linden ve Dieker tarafından hazırlanan bir derlemede açıklanmıştır (Van Der Linden ve Dieker 1986).

Camsı karbon elektrot materyali ilk defa Yamada ve Sato tarafından 1962 yılında geliştirilmiştir. Bu araştırmacılar, camsı karbon elektrodu inert bir gaz

içerisinde fenol formaldehit reçinesini çok dikkatli bir şekilde ısıtma sonucunda elde etmişlerdir.

Elektron transferi açısından aktivasyon işleminin amacı (Hu ve ark., 1985), yüzey kirliliklerinin uzaklaştırılması, yüzeydeki fonksiyonel grupların oluşturulması ve yüzey alanının büyütülmesi, serbest keskin uçlar oluşturulması ve mikropartikül oluşumunu sağlamaktır. Yüzeydeki fonksiyonel gruplar yükseltgenme derecesine göre değişir, az oksitlenirse hidroksil, kuvvetli oksitlenirse karboksil veya kinolik yapılar oluşabilir. Şekil 2.1.'de camsı karbonun yapısı görülmektedir, (Pravda, 1998).



Şekil 2.1. Camsı karbonun yapısı

2.1.1.2. Voltametrizde Kullanılan Elektrotlara Yapılan Ön İşlemler

Elektroyükseltgenme olayları, elektroindirgenme olaylarına oranla daha az incelenmiştir. Bunun nedeni polarografide damlayan civanın daima yenilenerek temiz bir yüzey sağlaması ve bu nedenle de tekrar edilebilir sonuçlar elde edilebilmesi ve civanın pozitif potansiyellerde kendisinin yükseltgenmesi nedeniyle elektro yükseltgenme olaylarının incelenmesi için uygun değildir. Katı elektrotlar da

yüzey, adsorplanabilen maddelerle kaplandığından veya elektrotların kendileri yükseltgendiklerinden ve oksitle kaplandıklarından tekrar edilebilirliğin sağlanması için her deneyden önce aynı yüzey halinin oluşturulması gerekmektedir. Bu işleme ön işlem denilmektedir. Ön işlem hem elektrotun cinsine, hem deney çözeltisinin bileşimine bağlıdır. Kimyasal (Adams ve ark., 1958 ; Eggretsen ve Weiss, 1956 ; Fagan ve ark. 1985 ; Hershenhard ve ark. 1984 ; Kabasakalian ve Mc Glotten, 1958), elektrokimyasal (Ferret ve Philips, 1985 ; Dermiş ve Biryol, İ.,1990 ; Özkan ve ark. 1994) ve hem kimyasal hem de elektrokimyasal (Kolthoff ve Tanaka, 1954; Biryol ve ark. 1989 ; Özkan ve ark. 1994) ya da mekanik (Yılmaz ve ark 2001; Özkan ve Uslu 2002; Uslu ve Özkan 2002; Demircigil ve ark. 2003; Özkan ve ark. 2003; Doğan ve ark. 2004; Uslu ve Özkan. 2004; Doğan ve ark 2005a; Doğan ve ark 2005b; Uslu ve ark. 2006) ön işlemler olabilir.

Camsı karbon yapısının, rastgele yerleşmiş ve karışık aromatik şerit moleküllerinden oluştuğu saptanmıştır. Camsı karbon elektrotla aktivasyonu sağlamak ve tekrar edilebilir sonuçları elde edebilmek için çeşitli ön işlemler geliştirilmiştir. Bu işlemler parlatma (Rusling, 1984 ; Thornton ve ark.1985; Hu ve ark., 1985) kimyasal ve elektrokimyasal (Taylor ve Humpffay, 1973 ; Wang ve Hutchins, 1985), radyofrekans (Evans ve Kuwana, 1977), düşük basınç altında sıcaklık uygulaması (Stutts ve ark., 1983 ; Wightman ve ark., 1984) vakum-sıcaklık uygulaması (Fagan ve ark., 1985), laser ışını ile uyarılma (Hershenhart ve ark., 1984) ve metal oksit filmlerinin elektrot yüzeyinde kaplanması (Cox ve ark., 1988) olarak sınıflandırılabilir. Standart bir aktivasyon işlemi henüz saptanamamıştır. Çünkü aktivasyon işlemi kullanılan çözeltiye ve incelenecek maddeye bağlı olarak değişmektedir, (Shearer ve ark., 1972 ; Tjaden ve ark., 1976; Özkan ve ark., 1998; Şentürk ve ark., 1998 ; Yılmaz ve ark., 1998; Özkan ve ark., 2000).

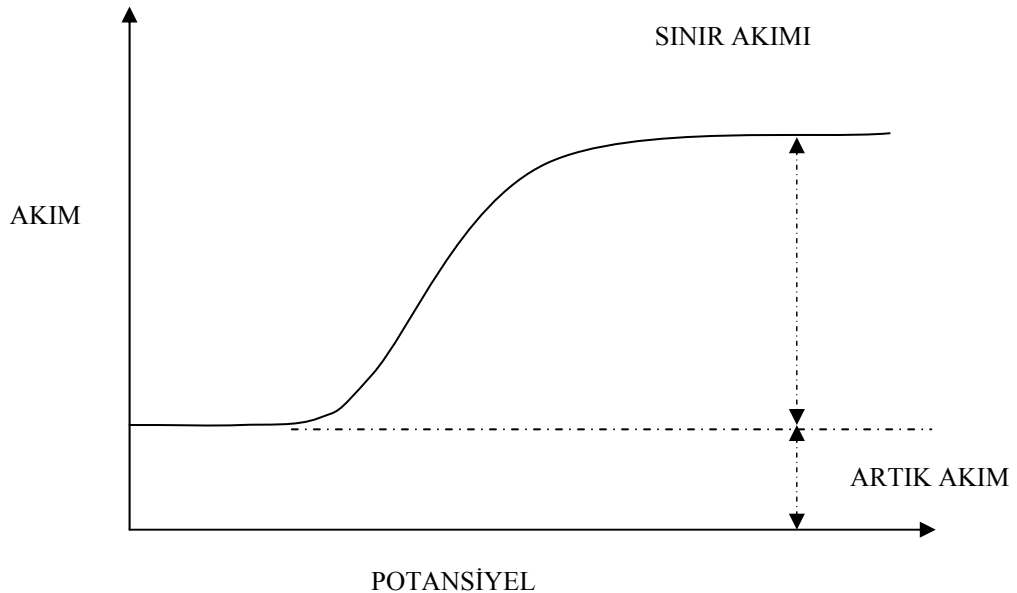
2.1.1.3. Voltametrinin Kuramı

Bu çalışma yönteminde genel prensip; elektrokimyasal hücrede bulunan, polarize olabilen bir çalışma elektrotu ile karşılaştırma elektrotu arasında değeri zamanla

değiştirilen gerilim uyarma sinyali uygulanarak üç elektrotlu hücrelerde çalışma elektrotu ile yardımcı elektrot, iki elektrotlu hücrelerde ise çalışma elektrotu ile karşılaştırma elektrotu arasındaki akımın ölçülmesine dayanır, (Yıldız ve Genç 1993; Bond 1980).

Uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine voltamogram denir. Analizi yapılacak çözelti içindeki elektroaktif maddelerin yükseltgenebilme, indirgenebilme özelliklerine göre elektroliz tepkimesi, çalışma elektroduna ait gerilim aralığının belirli bir noktasında olur. Bu yüzden voltamogram, çözeltideki elektroaktif maddelerin nitel ve nicel özelliklerini yansıtır.

Voltametrde ve onun bir kolu olan polarorafide en çok kullanılan gerilim uyarma sinyallerinden biri elektrokimyasal hücreye uygulanan gerilimin zamanın bir fonksiyonu olarak doğrusal olarak arttığı Şekil 2.2’de gösterilen bir doğrusal tarama olup, hücrede oluşan akım uygulanan gerilimin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Bu yöntemle doğrusal taramalı voltametri veya doğru akım polarorafisi denir (Yıldız ve Genç 1993)



Şekil 2.2. Yavaş potansiyel değişiminde katı elektrot voltamogramı

Voltametri;

1. Kontrol edilen potansiyelde voltametri,
2. Kontrol edilen akımda voltametri olarak iki kısımda incelenir.

Kontrol edilen potansiyelde voltametri ise;

1. Sabit potansiyelde voltametri,
 2. Sürekli değişen potansiyelde voltametri olarak iki bölümde incelenebilir,
- (Üneri,1979).

Sabit potansiyelde voltametrinde, deney hücresinden geçen akım zamanın fonksiyonu olarak ölçülür.

Sürekli değişen potansiyelde voltametrinde ise, potansiyel dışarıdan kontrol edilerek değiştirilir ve akım şiddeti buna bağlı olarak kaydedilir. Potansiyel tarama yöntemi de denilen bu yöntem potansiyel değişme hızına bağlı olarak yavaş tarama ve hızlı tarama olarak ikiye ayrılır.

Bu çalışmada uygulanan sürekli değişen potansiyelde voltametri ile analiz edilecek maddelerin elektrokimyasal davranışları incelenmektedir. Her madde için özel olan voltamogramlar bir referans elektrota karşı çalışma elektrotunun potansiyelinin değiştirilmesi ile elde edilen akım – potansiyel eğrileridir. Elektroaktif maddelerin yükseltgenme ve indirgenme özelliklerine göre uygulanan potansiyel aralığında elektroliz olayı gerçekleşir.

Potansiyel değişme hızı genellikle $1 - 100 \text{mVs}^{-1}$ arasında olduğu zaman yarı kararlı hal yöntemi olan yavaş tarama söz konusudur. Yavaş taramada safsızlıklar elektrot yüzeyine toplanarak akım – potansiyel ilişkisini etkileyebileceğinden, çalışmaların uygun bir tarama hızında yapılması gerekir.

Katı elektrotlarla yapılan voltametrik analizlerin bir kısmında yavaş gerilim tarama hızları ($\sim 1 - 20 \text{ mVs}^{-1}$) kullanılır. Ayrıca analiz çözeltisi çoğunlukla sabit ve yüksek bir hızda karıştırılır. Bu tip voltamogramlar daha çok mekanizma aydınlatma çalışmalarında kullanılmaktadır.

Sınır Akımı:

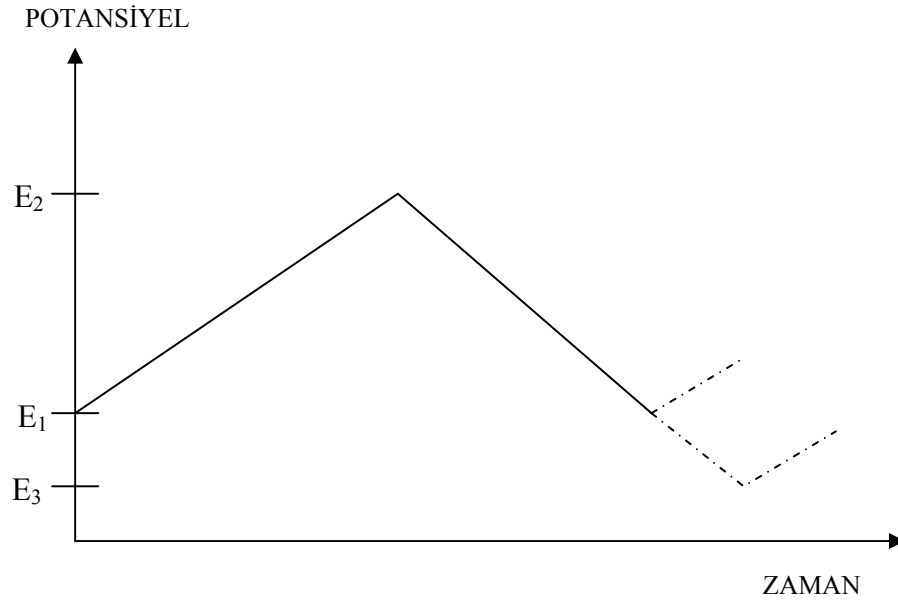
Potansiyelin yavaş değişimi halindeki akım – potansiyel eğrisi Şekil 2.2.’de görülmektedir. Burada analizi yapılan maddenin elektrot tepkimesine girmeye başlamasından sonra, potansiyelde oluşabilecek küçük bir değişikliğe karşı akımdaki artış hızlı olacaktır. Akım büyüklüğü elektroaktif maddenin elektrot yüzeyine ulaşma hızı ile sınırlanır ve bu nedenle belli potansiyel değerinden sonra akımda artış görülmez. Bu bölgedeki akım büyüklüğüne sınır akımı denir.

Artık Akım:

Elektrot ile elektroaktif maddenin reaksiyona girmeden önce küçük bir akım gözlenmektedir. Çünkü çözeltideki safsızlıklar ve elektriksel çift tabakanın yüklenmesi gibi nedenlerden oluşan bu akım büyüklüğüne artık akım denilir. (Şekil 2.2.)

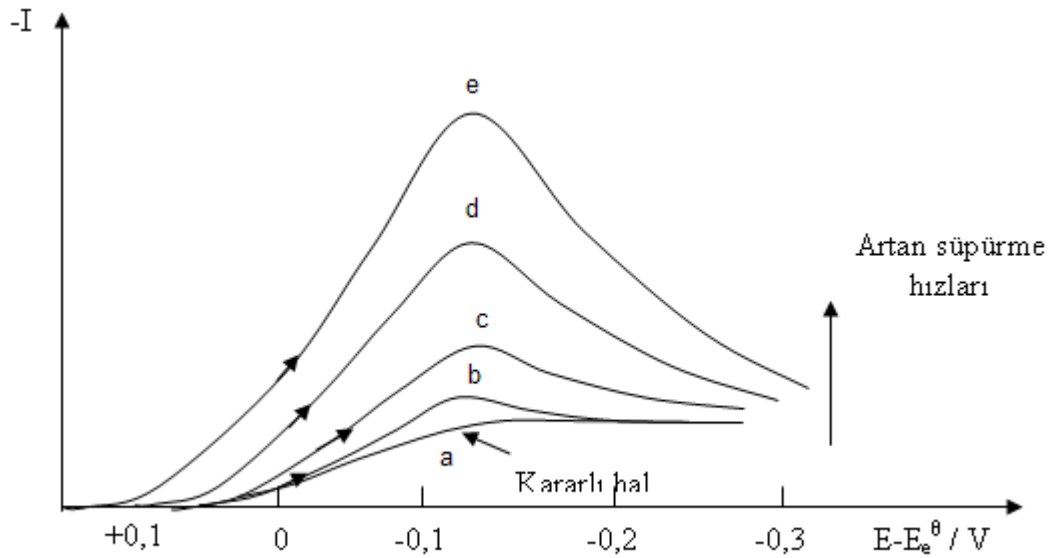
Katı elektrotlar kullanılarak yapılan voltametrik analizler, karıştırılmayan çözeltilere 20 mVs^{-1} ’den daha büyük gerilim tarama hızlarında da uygulanabilir. Gerilimin hızlı değiştiği bu tip voltametrde elektroaktif maddenin tepkimeye girmesi ile akımdaki artış hızlıdır ve bir maksimum geçtikten sonra durgun çözeltide maddenin elektrot yüzeyine difüzyonla aktarımı yeterli hızda olmadığından düşmeye başlar. Dolayısı ile, bu teknikte voltametrik dalga yerine pik görüntüsü elde edilir. Potansiyel değişme hızının 100 mVs^{-1} ’den daha büyük olduğu yöntem, hızlı tarama yöntemi olarak adlandırılır. Bu yöntemle, yük geçişi reaksiyonunda yüzeyde oluşan adsorblanmış ara ürün belirlenir. Bütün bunlara ilaveten literatürlerde yavaş ve hızlı tarama yöntemleri için değişik hız aralıklarına rastlanmaktadır. (Ross 1977)

İlk olarak Nicholson ve Shain tarafından 1964 yılında geliştirilen dönüşümlü (siklik) voltametri elektrokimyasal olayların incelenmesinde kullanılan önemli yöntemlerden birisidir. Bu yöntemde, potansiyel sabit bir hızla belli bir değere kadar çıkarılır ve sonra aynı veya değişik bir hızla ilk potansiyele döndürülür. Bu teknikle maddenin hızla reaksiyona girdiği potansiyel aralığı (elektrokimyasal spektrum), olayın hızla bağımlılığı, böylece eşleşmiş olan kimyasal reaksiyonlar kolaylıkla bulunabilmekte ve adsorbsiyon gibi bazı komplikasyonlar kolaylıkla tanınabilmekte ve elektrot reaksiyonu mekanizması açıklanabilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı dönüşümlü voltametri ilk defa çalışılan bir elektroaktif madde için tercih edilen bir teknik olmuştur. Potansiyel tarama tekniğindeki potansiyel-zaman ilişkisi Şekil 2.3.'deki gibidir. Burada potansiyel E_1 ve E_2 sınırları arasında belirli bir tarama hızıyla (mVs^{-1}) değiştirilir.



Şekil 2.3. Potansiyel tarama tekniğinde elde edilen potansiyel – zaman eğrisi.

En yaygın olarak kullanılan yöntemler dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametridir. Her iki yöntem de başlangıçta aynıdır. Yalnız dönüşümlü voltametride E_2 potansiyeline erişilince ya potansiyel bir süre burada tutulur sonra E_1 potansiyeline geri dönülür veya E_3 potansiyeline doğru devam edilir. Dönüşümlü voltametride genellikle gidiş ve dönüş hızı aynıdır. Doğrusal taramalı voltametride ise sadece belli bir hızda E_1 potansiyelinden E_2 potansiyeline ulaşılır. Hem dönüşümlü voltametride, hem de doğrusal taramalı voltametride uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Genel olarak bu deneylerde kullanılan hız birkaç mVs^{-1} 'den birkaç yüzbin mVs^{-1} 'ye kadar değişir (Şekil 2.4). Birkaç yüzbin mVs^{-1} hızları çok büyük olduğu için deneysel güçlüklerle sahiptir. Çift tabaka yüklenmesi ve IR düşüşü etkileri çok büyük olur. Yakın zamanlarda, hızlı tarama yapıldığında iyi sonuçlar alabilmek için mikroeletrotların kullanılması gerektiği bulunmuştur. Böylece yük akımı ve direnç küçültülmüş olur. Voltamogramların kaydı için bugün XY kaydedicisi veya osiloskoplar yerine bilgisayar kullanılmaktadır. Dönüşümlü voltametri bir sistemi ilk kez incelemek amacıyla kullanılıyorsa önce nitel, sonra yarı nitel ve en son nicel deneyler yapılabilir.



Şekil 2.4. Farklı potansiyel tarama hızlarında elde edilen akım – potansiyel eğrisi.

a) En düşük hız; e) En yüksek hız.

Bu sistemlere Şekil 2.3.'deki potansiyelin ikizkenar üçgen şeklindeki gerilimi uygulanırsa dönüşümlü voltamogramlar elde edilir (Şekil 2.5 ve 2.6). İleri yöndeki gerilim taraması sırasında bir yükseltgenme olmuşsa, gerilim taraması tersine

çevrildiğinde yükseltgenme sırasında oluşan ürünün elektrotta yeniden indirgenmesi ile bu yönde de bir pik gözlenebilir. Geri dönüşümlü bir elektrokimyasal tepkimede anodik pik gerilimi (E_{pa}) ile katodik pik gerilimi (E_{pk}) arasında en fazla $59/n$ mV'luk bir gerilim farkı olmalı ve aynı zamanda anodik pik akımı (I_{pa}) katodik pik akımı (I_{pk}) birbirine eşit olmalıdır. Elektrot tepkimesinin geri dönüşümlülüğü azaldıkça anodik ve katodik pikler birbirinden daha farklı gerilimlerde ve daha yayvan olarak gözlenir. Tam geri dönüşümsüz bir elektrot tepkimesinde ise ürünün çok hızlı bir şekilde tüketilmesinden dolayı geri pik tamamen kaybolur.

Nitel analiz için, değişik hızlarda eğriler çizdirilir. Değişik potansiyel aralıkları seçilir. Genel olarak pik veya dalga gözlenir ve bunların hızla nasıl değiştiği incelenir. Bu eğriler indirgenme ve yükseltgenme pik akımı ve potansiyelleri gibi elektrokimyasal parametrelerin yanında reaksiyon hızı, aktarılan elektron sayıları, derişim gibi parametrelerin bulunmasında da kullanılır. İlk ve son eğrilerin arasındaki değişimin incelenmesinden pik akımlarının hıza bağıllığı ölçülür. Buradan adsorpsiyon, difüzyon, eşleşmiş kimyasal reaksiyonlar hakkında fikir edinilebilir. Ara vermeksizin üst üste çizdirilen dönüşümlü voltametrde ilk ve son voltamogramlar arasındaki fark mekanizma hakkında bilgi verir

Dönüşümlü voltametrde anodik ve katodik tarama hızları genel olarak aynı seçilir. Hızlı kimyasal reaksiyonlar için ise, değişik hızlarda çalışılmalıdır.

2.1.1.4. Elektrokimyasal Taşınma Yolları

Elektroaktif maddeler elektrokimyasal bir olayda üç şekilde taşınabilir:

- a) Migrasyon
- b) Konveksiyon
- c) Difüzyon

Migrasyon, yüklü taneciklerin elektriksel alanın etkisi ile zıt yüklü kutuba doğru çekilmesinden kaynaklanan bir hareket türüdür. Burada anyonlar anoda,

katyonlar katoda doğru hareket ederler. Migrasyona yol açan kuvvetler sadece elektrostatik güçlerdir. Elektroaktif tür yüklü olduğu sürece zıt yüklü elektrot tarafından çekilecektir. Ancak derişime bağılı olmadığı için, ilgilenilen türün bu yolla aktarımını tümüyle sıfırlayamazsak da en aza indirmek için ortama destek elektroliti ilavesi yapılır. Bu çözeltideki iyonlar iyonik göçü önemli ölçüde üstleneceğinden analitin çok az bir miktarı migrasyonla taşınır hale gelecektir. Böylece çözeltideki yükler herhangi bir iyon tarafından taşınabilir. İyonik göç ortama destek elektroliti ilavesiyle engellenebilir.

Konveksiyon sıcaklık ve yoğunluk farkından oluşur. Konveksiyonun akım yoğunluğu üzerinde büyük etkisi vardır. Bunu önlemek için çözelti ya karıştırılır ya da elektrot hızla döndürülür.

Asıl istenen, ana çözeltideki elektroaktif maddenin elektrot yüzeyine sadece difüzyonla taşınmasıdır. Difüzyon kontrollü elektrokimyasal olaylarda madde derişiminin fazla olduğu bölgeden derişimi az olan bölgeye doğru difüzlenir. Böylece elektrolit çözeltisi ile elektrot yüzeyi arasındaki derişim farkından bir difüzyon akısı doğar. Bu akı;

$$J = - D (dc/dx)$$

formülü ile verilir. Bu ilişki Fick'in 1. yasasıdır.

Burada J, difüzyon akısı ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$); dc/dx derişim gradienti (mol m^{-4}) ve D difüzyon katsayısı (m^2s^{-1})'dir. Fick'in 1. yasasında kararlı hal difüzyonu göz önüne alınmıştır, (Bocris ve Reddy, 1970). Yani difüzlenen partiküllerin derişimi ve akı zamanla değişmemektedir. Bu yasa elektrot olaylarına uygulandığında, elektroda bitişik difüzyon tabakası denilen bir bölgede elektroaktif maddenin elektrotla ulaşmasını açıklar. Bu taktirde elektroda difüzlenen maddenin eşdeğer gram sayısı difüzyon akısına eşit olur. Yani;

$$I / nF = J = - D (dc/dx)$$

Eğer bu kavramlar değişiyorsa bu halde;

$$(\delta c / \delta t) = D (\delta^2 C / \delta x^2)$$

denklemini elde edilir. Bu denklem Fick'in 2. Yasası adını alır. Yani derişim hem zamana, hem uzaklığa bağılıdır. Böylece kısmi diferansiyel denklemle gösterilen yukarıdaki Fick'in 2. yasasının formülü elde edilir.

Geri Dönüşümlü Sistemler

$O + n e^- \rightleftharpoons R$ gibi bir geri dönüşümlü olay için çok yavaş bir tarama uygulandığı zaman, potansiyel değişme hızı arttırıldıkça eğri değişip pik şeklini alır.

O maddesinin derişim profili potansiyelin fonksiyonu olarak incelenirse, eğrinin neden sigmoidal veya pik şeklinde görüldüğü anlaşılabilir. Kararlı hal şartlarında elektrottan belirli uzaklıktaki derişimler doğal konveksiyonla sabit tutulmaktadır. Elektroda bitişik tabakada ise (Nernst Difüzyon Tabakası) derişim gradienti doğrusaldır. Nernst denkleminde potansiyelin negatif olabilmesi için O maddesinin yüzey derişiminin az olması gerekir.

$$\left[E = E_o + \frac{RT}{nF} + \ln \frac{a_o}{aR} \right]$$

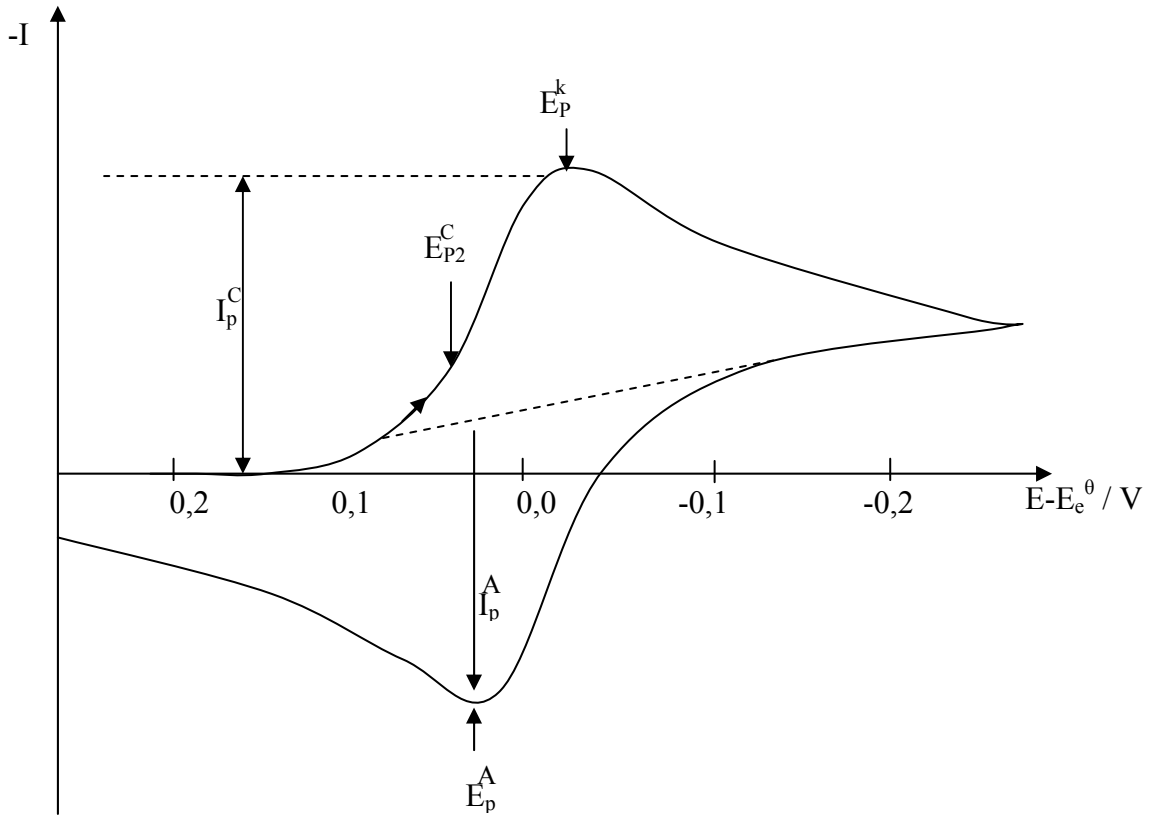
Burada a_o ve aR , O ve R maddelerinin yüzey derişimlerini göstermektedir.

Bu durumda derişim gradienti arttıkça akım artacaktır. Çünkü difüzyon hızı artar. Sonunda yüzey derişimi sifıra yaklaşır ve derişim profili artık değişmez. Bu noktada akım limit değerine ulaşmıştır. Tarama hızı arttıkça difüzyon tabakası denge durumuna ulaşmak için yeterli zaman bulamaz ve çözeltiye kadar ulaşamaz. Derişim profili de artık doğrusal değildir. Potansiyel değeri O maddesinin indirgenebileceği değere ulaştığı zaman O'nun yüzey derişimi çözelti derişiminden Nernst denkleminin gerektirdiği değere düşer, (Şekil 2.4). Sonuçta bununla orantılı olan bir akım devreden geçer. Bu gradient bir defa kurulunca sabit kalmaz, difüzyon nedeniyle düşer. Bu arada elektrot potansiyeli de değişir. Bu yüzden O maddesinin yüzey derişimi düşer, (Şekil 2.4). Sonuçta bu değer sifıra iner, (Şekil 2.4). Bu eğrilere göre herhangi bir potansiyelde yüzeydeki derişim gradienti kararlı halden daha büyük

olduğu zaman akım da büyük olur. Yüzey derişimi sıfıra erişince derişim gradienti artık azalmaya başlar. Bunun sonucunda da eğri pik şeklini alır. Bu yöntemde hız arttıkça akım da artmaktadır, (Greef ve ark. 1990).

Potansiyel ters döndüğü zaman yavaş tarama hızlarında (kararlı hale benzer değerlerde) akım aynı yolu izleyerek geri döner. Daha hızlı taramalarda ise gidiş dönüş eğrileri aynı değildir. Çünkü tarama geri çevrildiği zaman elektrot yüzeyinde ve yakınında R maddesinin önemli derişimi vardır ve R maddesi aynı zamanda oluşmaya da devam eder (denge potansiyeline ulaşıncaya kadar). E denge potansiyelinden sonra ters akım geçmeye başlar. Elektrot potansiyeli değıştikçe R maddesinin yüzey derişimi de sıfıra erişir ve oksidasyon dalındaki gibi bir pik oluşur. Böyle bir dönüşümlü voltamogram Şekil 2.5’de görölmektedir. Bu eğride ölçülebilen toplam dört parametre vardır.

1. Katodik pik potansiyeli (E_p^C)
2. Anodik pik potansiyeli (E_p^A)
3. Katodik pik akımı (I_p^K)
4. Anodik pik akımı (I_p^A)



Şekil 2.5. Geri dönüşümlü bir olayın dönüşümlü voltamogramı

Bu tip eğrilerde anodik olaydaki yük değişikliği katodik olaydakine göre daha küçüktür. Çünkü R maddesinin çoğu elektrottan difüzenmiştir. Bu yüzden yeniden yükseltgenemez (Greef ve ark. 1990). Geri dönüşümlü bir dönüşümlü voltamogramın şeklini veren matematiksel denklemi ifade etmek için;

($O + ne^- \rightleftharpoons R$) olayı ile ilgili Fick'in ikinci yasasını veren denklem uygun sınır koşulları için çözülür ve

$$I_p^C = -0,4463 nF \left[\frac{nF}{RT} \right]^{1/2} \cdot Co^? \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2}$$

(2.1) denklemi elde edilir.

25°C için denklem düzenlenirse;

$$I_p^C = - (2.69 \times 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot Co^\infty \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad \text{denklemini elde edilir.}$$

n : Reaksiyonda alınıp verilen elektron sayısı

D : Difüzyon katsayısı

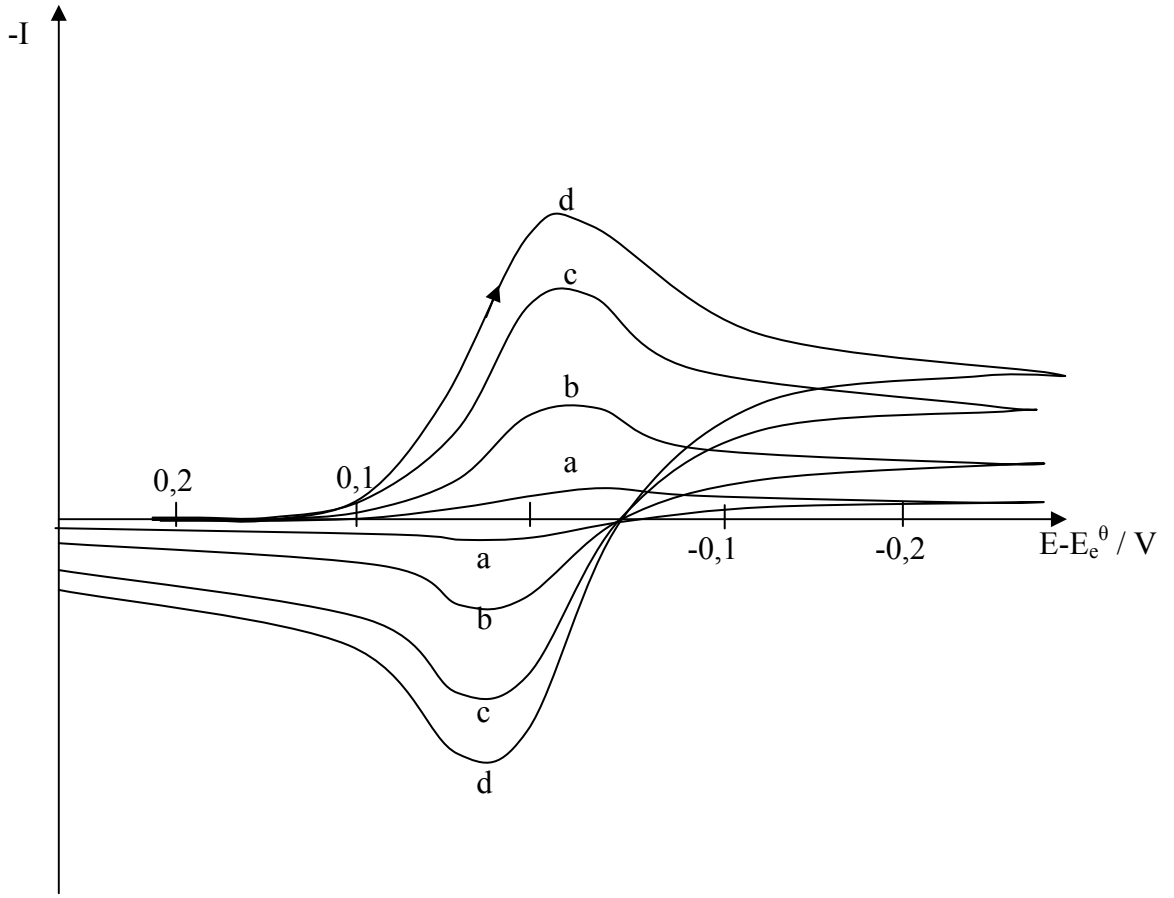
Co^∞ : O maddesinin çözelti içindeki derişimi

v : Potansiyel değışme hızı'dır.

Bu denkleme Randles – Sevcik denklemi de denir. Bu denklemden de anlaşılabilceğı gibi pik akımı hızın kareköküyle doğru orantılıdır.

$I_p - v^{1/2}$ grafiğı, bir sistemin geri dönüşümlü olup olmadığının göstergelerinden biridir. Dönüşümlü voltamogramın hızla değışimi Şekil 2.6'da görölmektedir. $I_p - v^{1/2}$ ifadesinin doğrusal oluşu aynı zamanda olayın difüzyon kontrollü olduğunu gösterir. Çünkü Randles – Sevcik denklemi olayın difüzyon kontrollü olduğu hal için çıkarılmıştır.

Geri dönüşümlü bir voltamogram ancak hem O hem de R maddeleri kararlıysa geçerlidir ve elektron transferi hızlı ise söz konusudur. Bu durumda bütün hızlarda ve potansiyellerde elektron transferi yüzeyde denge halindedir . Yani yüzey derişimi Nernst denklemine uymaktadır.



Şekil 2.6. Geri dönüşümlü bir olayın hızla değişimini gösteren dönüşümlü voltamogram.

Bir sistemin geri dönüşümlü olup olmadığı;

1. $\Delta E_p = E_p^A - E_p^C = 59 / n \text{ mV}$
2. $[E_p - E_{p/2}] = 59 / n \text{ mV}$
3. $[I_p^A / I_p^C] = 1$
4. $I_p \propto v^{1/2}$
5. E_p 'nin tarama hızı ile değişmemesinden
6. E_p 'nin üzerindeki değerlerde, $1 / \sqrt{I}$ 'nin zamanla orantılı olmasından anlaşılır.

Geri Dönüşümsüz Sistemler

Geri dönüşümlü sistemlerde elektron transfer hızı bütün potansiyellerde kütle taşıma hızından önemli ölçüde büyüktür. Bu yüzden de Nernst denklemi elektrot yüzeyinde daima geçerlidir. Eğer elektron transfer hızı yavaşsa bu durumda yüzeydeki denge sağlanamaz ve voltamogram değişir. Bu halde düşük tarama hızlarında elektron transfer hızı kütle transfer hızından fazladır. Voltamogram geri dönüşümlüdür. Tarama hızı arttığı zaman kütle taşıma hızı artar ve elektron transfer hızıyla karşılaştırılabilir büyüklüğe gelir. Bunun en güzel gözlenen etkisi pikler arasındaki ayrılığın büyümesidir. Bu tip verileri incelemek için yararlı bir yol, akımı difüzyon hızındaki değişimin kareköküne göre uyarlamaktır. Yani akım yerine $I/v^{1/2}$, birim hızdaki akım – potansiyel eğrisi çizmektir. Şekil 2.7.'de geri dönüşümsüz bir sistem için çeşitli hızlarda üstüste alınmış voltamogramlar görülmektedir. Burada anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki farkın geri dönüşümlü sistemlerden fazla olduğu ve pik yüksekliklerinin geri dönüşümlü sistemlerden daha az olduğu görülmektedir.

Geri dönüşümsüz sistemler için kullanılan bağıntı :

$$I_p = - (2.99 \times 10^5) \cdot n \cdot (\alpha_c n_\alpha)^{1/2} \cdot C_o \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad (2.2.)$$

n : Reaksiyonda alınıp verilen elektron sayısı

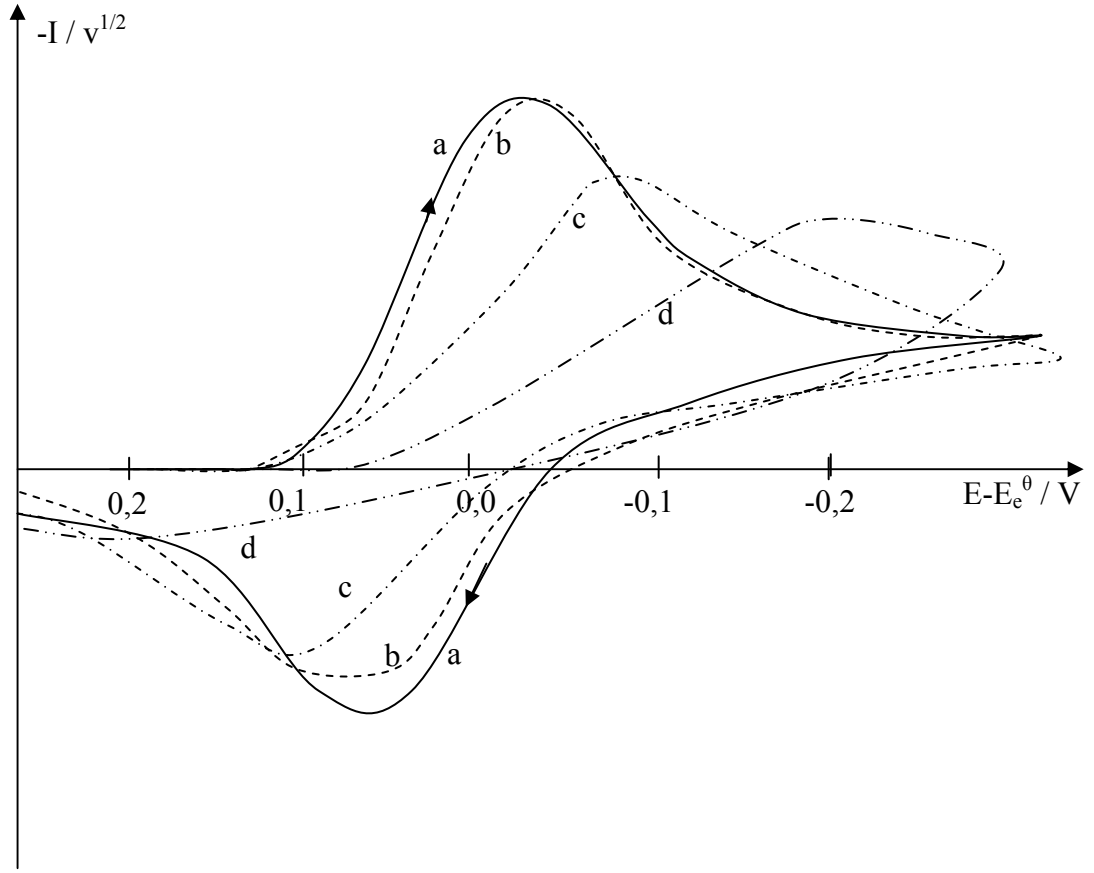
n_α : Hız tayin edici basamağa kadar alınıp verilen elektron sayısı

α_c : Transfer katsayısı

D : Difüzyon katsayısı

C_o : O maddesinin çözelti içindeki derişimi

v : Potansiyel değişme hızıdır



Şekil 2.7. Geri dönüşümsüz bir sistem için çeşitli hızlarda üst üste kaydedilmiş dönüşümlü voltamogram

Geri dönüşümsüz bir reaksiyon için belirleyici şartlar da şunlardır:

1. Ters pik yoktur.
2. $I_p \propto v^{1/2}$ ile orantılıdır.
3. E_{pc} , $-30 / \alpha_c n_\alpha$ mV kadar kayar (hızdaki her 10 kat artış için).
4. $|E_p - E_{p/2}| = 48 / \alpha_c n_\alpha$ mV'dur.

Düşük tarama hızlarında geri dönüşümlü olan sistem, tarama hızı arttığında geri dönüşümsüz hale gelir. Bu arada sistem yarı geri dönüşümlü bir halden geçmiştir. Bu geçiş elektron transfer hızı kütle transfer hızına göre yavaşladığında,

yani elektrot yüzeyinde Nernst denklemi geçersiz hale geldiğinde olur. Bütün bu tarama çeşitleri sonunda elde edilen bu eğrilere voltamogram denilmektedir. Voltamogramlar analizi yapılacak çözelti içindeki elektroaktif maddelerin (elektrot tepkimesine giren madde) sürekli değişen potansiyelde gösterdikleri davranışların kaydedilmiş şeklidir. Potansiyel taraması, referans elektroda karşı çalışma elektrodunun potansiyelinin değiştirilmesi ile gerçekleştirilecek akım – potansiyel eğrileri, yani voltamogramlar elde edilir. Her madde için karakteristik olan bu eğriler elektroaktif maddelerin nitel ve nicel özelliklerini yansıtır.

Eğer dönüşümlü voltamogramın şekli teoride beklenenden farklı çıkıyorsa bu bir yüzey olayının varlığını gösterir. Örneğin faz oluşması veya uzaklaşması reaksiyona giren maddenin veya ürünün adsorpsiyonu gibi. Değişik adsorpsiyon izotermi vardı. Henry, Virial, Langmuir, Frumkin ve Temkin gibi (Greef ve ark. 1990). Örnek olarak Langmuir izotermine uyan bir reaksiyona giren maddenin adsorpsiyonu durumunda;

$$\left| I_p^c \right| = \frac{n^2 f^2 \Gamma^0}{4RT} v \quad (2.3)$$

- Γ^0 : O maddesinin potansiyel taraması başlamadan önceki yüzey fazlası
- v : potansiyel tarama hızı
- n : transfer edilen elektron sayısı
- F : Faraday sabiti
- R : gaz sabiti
- T : mutlak sıcaklık

denklemleri ile verilen bir pik akımı gözlenir. Görüldüğü gibi adsorpsiyon kontrollü pik akımı tarama hızıyla doğru orantılıdır. $\log I_p^c - \log v$ eğrisinin eğiminin 0,5 çıkması olayın difüzyon kontrollü, 1 çıkması ise adsorbsiyon kontrollü olduğunu gösterir, (Denklemler 2.1 ; 2.2 ; 2.3).

Kararlı Hal Kinetiğinin İncelenmesi

Kararlı halde kinetik verilerin incelenmesi için Tafel denkleminde yararlanılır. (Greef ve ark. 1990) Tafel denklemi katodik bir reaksiyon için;

$$\text{Log } |I_c| = \text{Log } I_o - \frac{\alpha_c n F \eta}{2.3 RT} \quad (2.4)$$

Anodik bir reaksiyon için ise;

$$\text{Log } |I_a| = \text{Log } I_o + \frac{\alpha_a n F \eta}{2.3 RT} \quad (2.5)$$

Şeklinde verilir. Burada,

I : Akım yoğunluğu

I_o : Yük değişimi akım yoğunluğu. Bu değer dengedeki bir sistemin, yani dış çevreden akım geçmezken ileri ve geri reaksiyonların hızının ölçüsüdür.

α_a : Anodik transfer katsayısı

α_c : Katodik transfer katsayısı

n : Alınıp verilen elektron sayısı

η : Aşırı gerilim [E - E° = η]

F : Faraday sabiti

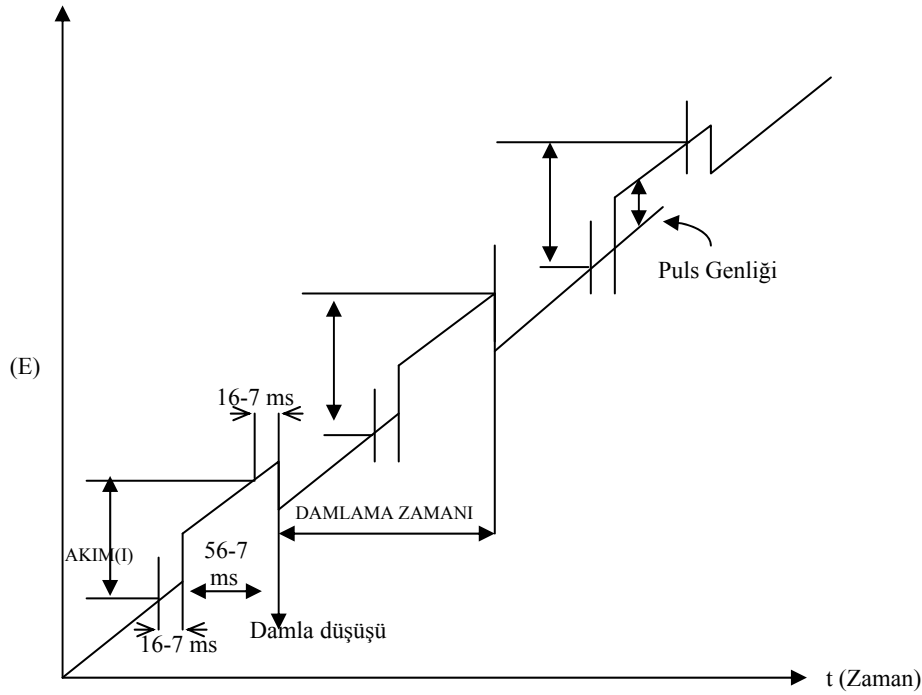
R : Gaz sabiti

T : Mutlak sıcaklık

α transfer katsayısı tek basamaklı basit reaksiyonlarda β sembolü ile gösterilir ve bu katsayı elektrot – elektrolit ara yüzeyinde yük transferi reaksiyonunun bir karakteristiğini verir. Bu kavram yüzeyin denge potansiyelinden ayrılmasıyla oluşan elektriksel enerjinin ne kadarının elektrokimyasal reaksiyonun hızını etkilediğini gösterir. Basit ve tek elektronlu reaksiyonlarda bu değer 0.5 dolayındadır, (Bocris ve Reddy, 1970).

Diferansiyel Puls Polarografisi Teorisi

Puls akımının ölçüldüğü referans düzey, puls uygulamasından önceki akımdır. Pulsun başlangıcından akımın ölçülmesine kadar geçen süre (örneğin 50 msn) içerisinde yük akımı çok küçük bir değere düşer. Kalan faradaik akım kısa bir zaman periyoduna entegre edilerek ölçülür ve fark doğru akım potansiyeline karşı grafiğe alınır. Puls uygulama süresi (≈ 50 ms) hızlı DC polarografisi veya voltametriadaki süreye eşdeğer olduğundan puls yöntemleri analitik amaçlarla kullanıldığında elektrot kinetiğine kuvvetle bağlı olması beklenmez. Sonuç olarak puls polarografisi elektrokimyasal olarak geri dönüşümsüz olan sistemler için de yüksek bir duyarlılığa sahiptir (Bond, 1980 ; Greef ve ark. 1990). Diferansiyel puls polarografisinde potansiyel-zaman profili Şekil 2.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Diferansiyel puls polarografisinde uygulanan potansiyel dalgasının şekli

Normal DC polarografisi için yazılmış olan Heyrovsky – Ilkovich denkleminin diferansiyeli alınıp bundan limit difüzyon akımı değeri çıkarılırsa;

$$\Delta_i = \frac{n^2 F^2}{RT} AC(-\Delta E) \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \frac{P}{(1+P)^2} \quad \text{denklemleri elde edilir.}$$

Burada;

Δ_i : diferansiyel puls akımı

ΔE : puls genliğidir.

Bu denklem küçük genlikler için geçerlidir. Denklem ΔE 'nin bütün değerleri için geçerli olacak şekilde çözülürse:

$$\Delta_i = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \frac{P_A \sigma^2 - P_A}{\sigma + P_A \sigma^2 + P_A + P_A^2 \sigma}$$

denkleme ulaşılır. Burada;

$$P_A = \exp \frac{nF}{RT} \left[\frac{E_1 + E_2}{2} - E^{r_{1/2}} \right]$$

$$\sigma = \exp \frac{nF}{RT} \left[\frac{E_2 + E_1}{2} \right]$$

$E_2 - E_1$: ΔE puls genliği

E_2 : Puls uygulandıktan sonraki i_2 akımının ölçüldüğü potansiyel

E_1 : Puls uygulanmadan önceki i_1 akımının ölçüldüğü potansiyel

İndirgenme için $\Delta E < 0$ 'dır. Δ_i maksimum olduğunda $P_A = 1$ 'dir.

$$(\Delta i)_{\max} = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \frac{\sigma - 1}{\sigma + 1} \quad (2.6)$$

Eğer $-\Delta_E / 2 < RT / nF$ ise bu denklem küçük genlik şeklini alır ve

$$(\Delta i)_{\max} = \frac{n^2 F^2}{4RT} AC (-\Delta E) - \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \quad \text{olur.}$$

Eğer $-\Delta_E / 2 \gg RT / nF$ ise $(\sigma - 1) / (\sigma + 1) = 1$ olur ve $(\Delta i)_{\max}$ Cottrell eşitliğindeki değerini alır.

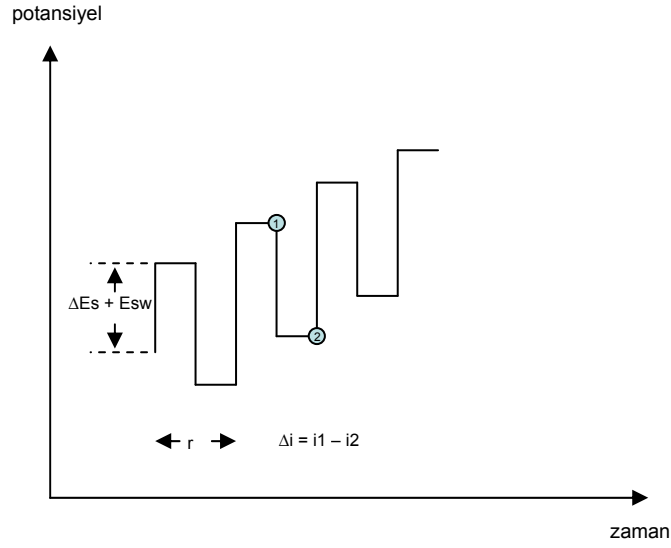
$-\Delta_E$ değeri büyüdükçe $(\Delta i)_{\max}$ büyür. Fakat puls genliği büyüdükçe elde edilen pik yayvanlaşır, bu da ayırım gücünü azaltır.

Denklem 2.6'dan anlaşıldığı gibi $(\Delta i)_{\max}$, derişimle doğru orantılıdır. Bu geri dönüşümlü olmayan haller için de geçerlidir. Ancak katalitik reaksiyonlarda ve benzeri karmaşık reaksiyonlarda bu doğrusal ilişki bozulur. Yarı geri dönüşümlü veya tamamen geri dönüşümsüz hallerde birim derişim başına düşen $(\Delta i)_{\max}$ değeri geri dönüşümlü halden daha küçüktür.

Normal puls ve diferansiyel puls polarografisi teorileri damlayan cıva elektrot için geliştirilmiş olmakla birlikte puls deneylerinde zaman eşeli puls süresi ile tayin edildiğinden durağan elektrotlara da bu teori uygulanmaktadır, (Bond,1980).

Kare Dalga Voltametrisi Teorisi

Kare dalga voltametrisi son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls polarografi tekniğidir. Voltamogramın tamamı 10 ms'den daha kısa bir sürede elde edilir. Damlayan cıva elektrodu ile tarama, bir damla ömrünün son birkaç saniyesi içinde, yükleme akımı hemen hemen sabitken gerçekleştirilir. Kare dalga voltametrisi katı elektrotlarda, asılı cıva damla elektrodunda ve bazen kromatografik elektrokimyasal dedektörlerde ile kullanılan bir puls yöntemidir.

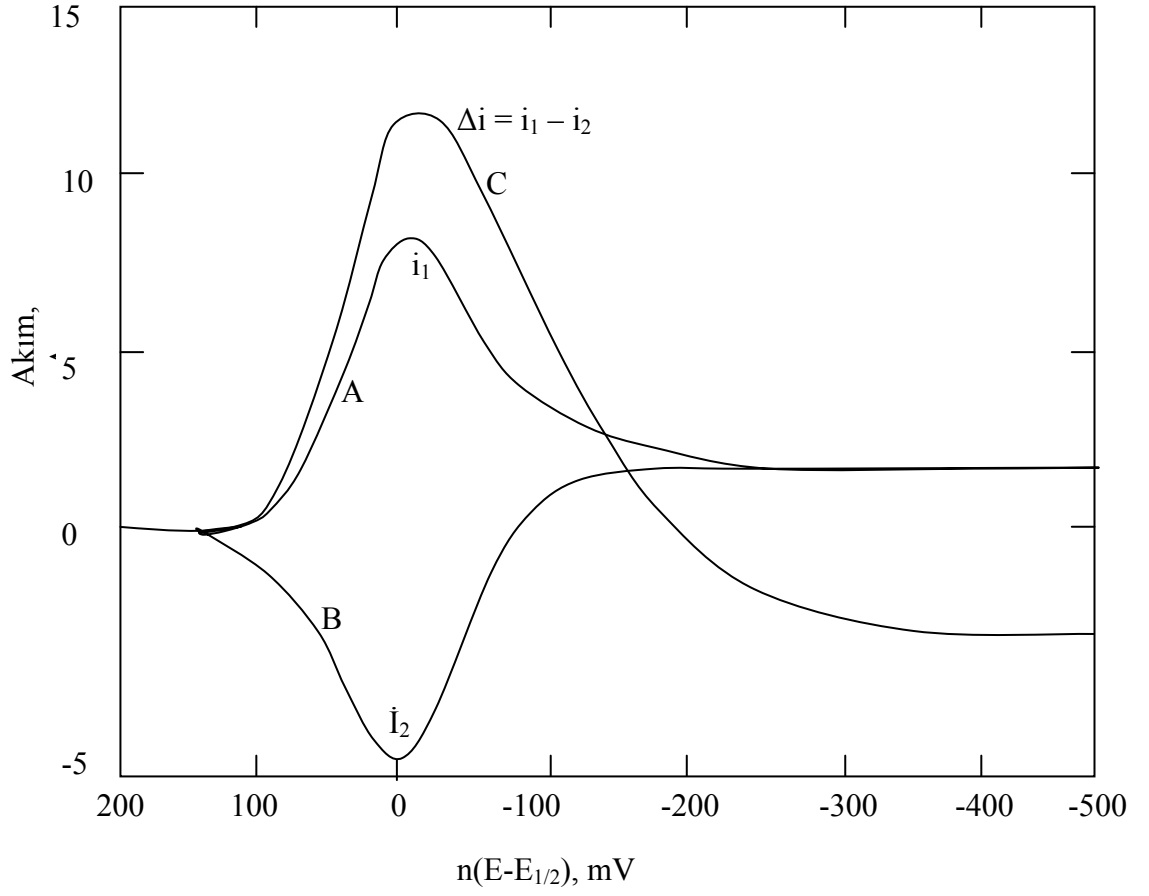


Şekil 2.9. Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu.

Akım cevabı Δi , 1 potansiyelindeki akımdan 2 potansiyelindeki akımı çıkarılarak bulunur.

Şekil 2.9.'da kare dalga voltametrisi yönteminde elde edilen basamaklı sinyal görülmektedir. Basamaklı sinyalde her basamağın boyu ve puls periyodu eşit olup, bu yaklaşık 5 ms civarındadır.

Basamaklı sinyalin potansiyel basamağı (ΔE_s) genellikle 10/n mV, pulsun büyüklüğü ($2 E_{sw}$) ise genelde 50/n mV dur. Sistemin bu şartlar altında çalıştırılması 20 Hz'lik puls frekansına karşılık gelir ve bu durumda 1V'luk bir tarama 0,5 sn'de yapılır. Yöntemde akım pulsun pozitif (1) ve negatif (2) kısmının sonuna doğru iki kez ölçülmekte ve bunların farkı alınmaktadır. Genellikle voltamogramlarda bu akımların farkı (Δi) grafiğe geçirilmektedir. Bununla ilgili voltamogram Şekil 2.10.'da görülmektedir. Bu fark derişimle doğru orantılıdır. Elde edilen pik potansiyeli de dc'deki yarı dalga potansiyeline karşılık gelir. Bu yöntemde tayin sınırları $10^{-7} - 10^{-8}$ M arasındadır, (Hart, 1990 ; Yıldız ve Genç, 1993 ; Skoog ve ark., 2000 ; Smyth ve Vos 1992).



Şekil 2.10. Geri dönüşümlü bir reaksiyon için kare dalga voltamogramı.

A : ileri doğru akım B : geriye akım C : net akım

Bu yöntemde ölçülen difüzyon sınır akımı

$$I_d = \frac{nFAD^{1/2}c}{\Pi^{1/2}}(t^1 - t_p) \text{ eşitliği ile verilir.}$$

Burada;

t^1 : Akım ölçümünün yapıldığı zaman

t_p : Pulsun uygulanmaya başladığı zaman'dır.

Kare dalga yöntemleri temel olarak üç şekilde uygulanır. Bunlar Barker, Osteryoung ve Kalousek yöntemleridir. Barker kare dalga voltametri / polarografisi kare dalga'nın en basit şeklidir. Bu formda dalga bir rampa ya da merdiven şeklinde olup simetrik bir kare dalga ile sinüzoidal alternatif akım voltametrisinin

uygulanmasıyla oluşmuştur. Kalousek kare dalga voltametrisi / polarografisi (Heyrovsky tarafından isimlendirilmiştir) kare dalganın sadece ters yarı devirlerindeki akımın ölçülmesiyle elde edilen daha küçük frekanslı (5 Hz) yöntemleri için uygulanmaktadır. En çok kullanılan kare dalga yöntemi ise Osteryoung'tır. Bu yöntem diğerlerinden, uygulanan puls periyodunun (λ), yarı puls yüksekliğinin (E_{sw}) ve uygulanan her puls sonunda potansiyelin artması ile farklılık gösterir (Christie ve ark., 1977 ; Turner ve ark., 1977 ; Yılmaz ve ark. 2001; Uslu ve Özkan, 2002 ; Demircigil ve ark., 2002; Özkan ve Uslu 2002; Uslu ve Özkan 2003; Uslu ve Özkan 2004; Doğan ve ark. 2005; Uslu ve ark. 2005; Özkan ve ark. 2006; Uslu ve ark. 2006).

2.1.1.5. Voltamogram Oranları Türev Voltametrisi

Voltamogram oranları türev voltametrisi, spektrum oranları türev spektrofotometrisinin matematiksel esaslarının Microsoft Excel yardımıyla diferansiyel puls ve kare dalga voltametrisine uyarlanması ile uygulanan yönteme önerilen bir isimdir. Bu yöntem 0. derece (zero-order veya orijinal) absorpsiyon spektrumların birbirine bölümünün türevinin alınarak karışım analizlerinin yapılması esasına dayanır. Bu yöntemi daha iyi açıklayabilmek için öncelikle 'türev spektrofotometrisinin ve spektrum oranları türev spektrofotometrisinin' esaslarını açıklamak gerekir.

Türev Spektrometrisi

Türev spektrometrisinin ilkesi, dalga boyuna karşı absorbansın birinci ya da daha fazla türevlerini almak üzerinedir. Bu yolla bir kimyasal maddenin nicel ve nitel analizi yapılabilir. Yöntemin ilk kullanımları Rutherford dönemine rastlar. Rutherford türev spektrumu alma yoluyla kütle spektrumlarını yorumlamıştır. Günümüzde ise, sözü edilen spektrofotometrik gelişmeler, farmasötik preparatlarla ilgili analizlerde de türev spektrometrisinin kullanımının yaygınlaşmasını getirmiştir.

Spektrofotometrelerin günümüzde gösterdiği gelişmeler, türev spektrumu alma işlemlerinin de daha kolay yapılması olanağını doğurmuştur.

Bir kimyasal maddenin çözeltisi üzerine UV ve görünür bölge ışığı gönderilir ve oluşan absorbans değerleri bu ışığın dalga boylarına karşı grafiğe geçirilir ise elde edilen spektrum 0. derece spektrum olarak adlandırılır. Burada absorbans değeri gönderilen ışığın dalga boyunun bir fonksiyonudur $A = f(\lambda)$. Bu fonksiyonun her bir noktasındaki türevi hesaplanabilir ($dA/d\lambda$).

Elde edilen türev değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirilir ise elde edilen spektrum *türev spektrumu* olara adlandırılır. Türev spektrumu 1'den n'e kadar derecelendirilebilir ($dA/d\lambda$, $dA^2/d\lambda^2$, $dA^3/d\lambda^3$, ..., $dA^n/d\lambda^n$).

Yöntemin Avantajları

- 1) Orijinal spektrum eğrileri kimyasal bileşikler hakkında bilgiler verir. Türev çalışmaları sayesinde spektrumların dönüm noktaları ile omuz noktaları daha belirgin hale gelirler ve ilgilendiğimiz kimyasal bileşiğin daha kolay ve kesin olarak tanımlamamıza yardımcı olur.
- 2) Bir kimyasal bileşiğin orjinal spektrumu bir çok pikin üst üste gelmesi ile oluşmuştur. Orijinal spektrumun türevinin alınması yoluyla piklerin ayrı ayrı görülmeleri sağlanabilir.
- 3) Spektrofotometrik yöntemler ile çalışılırken çözeltelerde oluşan bulanıklık, çökme ve tanecik büyüklüğü gibi faktörlerden dolayı zaman zaman hatalar oluşabilmektedir. Bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etkileri türev eğrilerinin oluşturulması ile ortadan kaldırmak mümkündür.
- 4) Birden fazla maddenin oluşturduğu bir karışımın nicel analizini yaparken çoğu zaman ekstraksiyon ve kromatografi gibi zaman alıcı ayırma

yöntemlerine başvurmak gerekebilir. Türev almak bu olumsuz etkileri de ortadan kaldıracılabilmektedir.

- 5) Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin olumsuz etkileri türev almak yoluyla azaltılabilir.

Yöntemin Dezavantajları

Kullanımı kolay olmasına karşılık pahalı aletlere ve karmaşık elektronik bir yapıya ihtiyaç duyulmaktadır.

Türev Eğrilerinin Şekilleri:

Günümüzde 1. den 4.ye kadar türev eğrisi çizilmektedir. 1. türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Burada orijinal spektrumun maksimum noktası kaybolmuştur ve buna karşılık orijinal spektrumda absorbansın yükseldiği kısımlar için pozitif, azaldığı kısımlar için ise negatif değerler almaktadır. Türev eğrisi, orijinal spektrumdaki eğri üzerinde eğimin en büyük olduğu noktalara yani eğrinin yarı yüksekliklerine karşılık bir maksimum ve bir minimum göstermekte eğimin en düşük olduğu tepe noktasında ise sıfır olmaktadır. Buna göre Gauss Eğrisindeki maksimum noktasına 1. türev eğrisinde bir “kesim noktası (zero-crossing)” karşılık gelmektedir. Bu noktanın her iki tarafında pozitif ve negatif bantta absorbans eğrinin eğim noktasında maksimum ve minimum yapar. Bu iki kutuplu fonksiyon bütün tek sayılı türevlerin karakteristiğidir. 2. türev eğrisinde ise aynı işlemler sonucunda orijinal eğrinin maksimum noktasına karşılık gelen bir minimum görülmektedir. Ayrıca ana iki pikin tarafında ve pozitif bölgede iki adet uydu pik verir. Çift sayılı türevlerin karakteristik özelliği, absorbans spektrumunun maksimum yaptığı dalga boyunda pozitif veya negatif bölgede güçlü bir maksimum veya minimum vermesidir. 3. türev eğrisinde orijinal eğrinin maksimum noktasına aynen 1. türev eğrisinde olduğu gibi bir kesim noktası karşılık gelmektedir. 4. türevde ise orijinal spektrumdaki maksimum noktaya yine bir maksimum nokta karşılık gelmektedir.

Önemli bir nokta ise, türev eğrilerinin aynı dalga boyu aralığı içerisinde alınması nedeniyle piklerin genişliğinin azalmasıdır. Bu azalma yaklaşık 1. türevde yarısına, 2. türevde üçte birine ve 4. türevde yüzde 40'ına inmektedir.

Türev spektrumlarında, kesim noktası çok önemlidir. Çünkü bu noktada pikin ait olduğu maddenin diğer madde veya maddelerin spektruma katkısı yoktur. Dolayısıyla karışım içerisinde herhangi bir ayırma işlemini gerektirmez bazı maddelerin diğerleri yanında miktar tayinlerinin yapılabilmesi mümkündür. Bu da özellikle karışım halinde maddeleri etkin maddeler olarak farmasötik preparatların analizi için yöntemin çok etkili ve kolay bir miktar tayini yöntemi olmasını sağlar.

Bu yöntem, ikili karışımlarda olduğu kadar daha fazla sayıda bileşen içeren karışımlarda da uygun kesim noktaları bulunduğunda uygulanabilir.

SPEKTRUM ORANLARI TÜREV SPEKTROFOTOMETRİSİ

Bu yöntem zero-order(orjinal) absorpsiyon spektrumların birbirine bölümünün türevinin alınarak karışım analizlerinin yapılması esasına dayanır. Yöntemde, bir karışımın spektrumu alınır ve karışımın içinde bulunan bileşiklerden birinin standart çözeltisinin spektrumuna bölünür(*oran spektrumu*). Bu yol ile elde edilen *oran spektrumunun* birinci türevi alınır. Gerekirse diğer derece türevleri de alınır. Karışımındaki diğer bileşiğin miktarı bir kalibrasyon grafiği yardımıyla hesaplanır. (Uslu B. ve Ozkan S.A., 2002; Salinas, F. ve ark 1990; Berzas-Nevado, J.J. ve ark 1992; Berzas-Nevado, J.J ve ark 1990; Corbella Tena, R. ve ark, 1997; Morelli, B. 1995; Morelli, B. 1994; Uslu, B., ve ark 2002).

Yöntemin teorisini açıklayabilmek öncelikle spektrum oranları türev spektrofotometrisinin matematiksel esaslarını değerlendirmek gerekir. Bunun için M ve N gibi iki bileşenden meydana gelmiş bir karışım varlığını ve bunlar için kullanılan dalga boyu aralığında her dalga boyu için Beer kanununun geçerli olduğunu kabul edelim. Karışımın absorpsiyonu için aşağıdaki eşitlik yazılabilir.

$$A_{\lambda 1} = \epsilon M \lambda 1.CM + \epsilon N \lambda 1.CN$$

1

Burada $A_{k\lambda 1}$ karışımın $\lambda 1$ 'deki absorpsiyonu, $\epsilon_{M\lambda 1}$ ve $\epsilon_{N\lambda 1}$ M ve N nin absorpsiyon katsayıları, C_M ve C_N ise M ve N'nin molar konsantrasyonlarıdır.

Eğer (1) eşitliği M'nin standart çözeltisinin absorpsiyon spektrumuna bölünecek olursa (C^0_M) aşağıdaki eşitlik yazılabilir.

$$A_{k\lambda 1} / \epsilon_{M\lambda 1} \cdot C^0_M = C_M / C^0_M + \epsilon_{N\lambda 1} \cdot C_N / \epsilon_{M\lambda 1} \cdot C^0_M \quad 2$$

Bu denklem aşağıdaki gibi basitleştirilebilir.

$$A_{k\lambda 1} / \epsilon_{M\lambda 1} = C_M + C_N \cdot \epsilon_{N\lambda 1} / \epsilon_{M\lambda 1} \quad 3$$

Eğer $A_{k\lambda 1} / \epsilon_{M\lambda 1}$, $\epsilon_{N\lambda 1} / \epsilon_{M\lambda 1}$ fonksiyon olarak grafiğe geçirilirse bir doğru elde edilir ki bu doğrunun eğimi C_N , kesim noktası ise C_M olur. Her dalga boyu için $\epsilon_{N\lambda 1} / \epsilon_{M\lambda 1}$ oranını bulabilmek için M ve N standart ekimolar çözeltileri hazırlanır ve bunların absorbansları ölçülerek her dalga boyu için bunların oranları hesaplanır. Sözü edilen M+N karışımında N'nin tayini için yöntem geliştirilmiştir. Bu tayinde (2) nolu eşitliğin türevi alınmaktadır.

$$d / d\lambda (A_{k\lambda 1} / \epsilon_{M\lambda 1} \cdot C^0_M) = 0 + (C_M / C^0_M) d / d\lambda \epsilon_{N\lambda 1} \cdot C_N / \epsilon_{M\lambda 1} \cdot C^0_M \quad 4$$

Böylece C_M / C^0_M değeri yok edilir. (4) eşitliği karışımın türev oran spektrumudur ve yalnızca C_N ile C^0_M e bağlıdır; fakat C_M 'nin karışımındaki konsantrasyonuna bağlı değildir. C^0_M sabit olduğuna göre karışımındaki C_N bulunabilir.

Bunun için işlem olarak saf N'nin değişik konsantrasyonlarındaki çözeltilerinin spektrumları alınır ve hafızaya kaydedilir. Sonra C^0_M konsantrasyonunda olmak üzere M'nin standart çözeltisi hazırlanır ve bunun alınan absorpsiyon spektrumuna hafızadaki N'nin spektrumları bölünür. Bu amaç için bilgisayar programı uygulanır. Böylece elde edilen 'oran spektrumun' nun türev

spektrumu çizdirilir ve belirlenen dalga boyunda türev absorbans değerleri okunur. Bu değerler C_N 'ye karşı grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon grafiği hazırlanır. Sonra işlem $M+N$ karışımına uygulanıp daha önce N için hazırlanan kalibrasyon grafiği yardımıyla karışımdaki N 'nin miktarı tayin edilir. Karışımdaki M 'nin miktarı buna analog bir işlem yardımıyla hesaplanır.

Eğer bölücü (divisor) standar konsantrasyon artırılıp eksiltirse, elde edilecek türev absorbans değerleri de buna bağlı olarak artar veya eksilir. Fakat maksimum ve minimum dalga boyları değişmez.

Bu yöntemin karışım analizlerinde kullanılabilesine ek olarak en önemli iki avantajı şunlardır.

- 1) İstenmeyen bölgelerdeki maksimum ve minimumların yerlerinin değişmesi
- 2) Okunacak türev oran absorbans değerlerinin normal türev spektrumlarındakilere göre yüksek değerlerde olmasıdır.

İkili karışımlar için oran spektrumunun 1. türevinin alınması yeterli olmaktadır. Fazla bileşenli karışımlar için daha büyük türev dereceleri gerekmektedir.

Geliştirilen voltamogram oranları türev voltametri yönteminde spektrum oranları türev spektrofotometrisinin matematiksel esaslarının Microsoft Excel® programı yardımıyla diferansiyel puls ve kare dalga voltametrisinden elde edilecek sinyallerin datalarına uyarlanarak önce voltamogramların oranları daha sonra da daha belirgin bir maksimum ve/veya minimum noktasından okuma yapabilmek için türevleri alınacaktır. Bu yöntemde orijinal voltamogramların birbirine bölümünün türevinin alınarak karışım analizlerinin yapılması amaçlanmaktadır.

2. 2. Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlik Testleri)

Analitik yöntemler, ilaç analizlerinde, biyolojik numune analizlerinde, biyoeşdeğerlik, biyoyararlanım çalışmalarında, farmakokinetik bilgilerin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında, ilaç etken maddelerinin nitel ve nicel analizlerinde, ilaç etken maddelerinin metabolitlerinin tayininde kullanılan yöntemlerdir.

Bu işlemlerin yapılabilmesi için iyi karakterize edilmiş, güvenilir sonuçların elde edilebileceği tamamen geçerli analitik yöntemlerin kullanılması veya geliştirilmesi gereklidir. Her yeni geliştirilen yöntemin validasyon sonuçları birbirinden bağımsızdır (Riley ve Rosanske 1996; Swartz ve Krull 1997; ICH 1994; Ahuya ve Scypinski 2001; Lunte ve Radzik 1996).

Yöntem validasyonu analitik işlemlerin istenilen kullanım için uygunluğunu gösteren parametrelerdir. Uygulanacak analitik işlemler için hangi tip validasyon karakteristiklerinin kullanılacağı belirlenmelidir. Geliştirilen bir yöntemin veya parametrelerinde ufak değişiklikler yapılmış bir yöntemin geçerli olabilmesi için mutlaka gerekli validasyon testlerinin ve ilgili hesapların yapılmış olması gereklidir (Riley ve Rosanske 1996; Swartz ve Krull 1997; ICH 1994; Snyder ve ark 1997; Ahuya ve Scypinski 2001; Lunte ve Radzik 1996; Adamovics 1997; Braggio ve ark 1996; Shabir 2003; Papadoyannis ve Samanidou 2004; Ermer 2001; Mc Dowell 1999; Ermer ve Miller 2005; De Bievre ve Gunzler 2005; Vessman 1996).

Amerikan Farmakopesine (The USP 24, 2000) göre validasyon, analizi yapılacak madde için geliştirilen analiz yönteminin seçilen aralıkta uygunluğunu, doğruluğunu, duyarlılığını, tekrar edilebilirliğini ve sağlamlığını belirtmektedir.

2. 2. 1. Validasyonun Genel İşlemleri

1. Cihazın kontrolü ve validasyonu, (tüm donanım ve yazılımlar için geçerlidir)

2. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için veya geliştirilmiş olan bir yöntemdeki parametrelerde yapılan değişikliklerden sonra yapılan validasyon,
3. Cihaz ve ilgili yöntem seçildikten sonra ve validasyonları yapıldıktan sonra ayırma yöntemleri için gerçekleştirilen Sistem Uygunluk Testleri (SUT). Bu testler FDA ve USP tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir.

Bir analitik yöntemin validasyonu; laboratuvar çalışmaları ile belirlenen ve istenen analitik uygulamaları için gerekli yöntem performans parametrelerinin bulunmasıdır. Bunlar analitik parametreler cinsinden ifade edilir. Bu parametreler hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalarda kullanılan yöntemler için geçerlidir (The USP 24, 2000; Riley ve Rosanske 1996; Swartz ve Krull 1997; ICH 1994; Snyder ve ark 1997; Ahuya ve Scypinski 2001; Lunte ve Radzik 1996; Adamovics 1997; Braggio ve ark 1996; Shabir 2003; Papadoyannis ve Samanidou 2004; Ermer 2001; Mc Dowell 1999; Ermer ve Miller 2005; De Bievre ve Gunzler 2005; Vessman 1996).

Biyoanalitik yöntemler; kan serum, plazma veya idrar gibi biyolojik sıvılarda etkin maddelerin veya metabolitlerinin; gaz kromatografisi (GK), sıvı kromatografisi (SK) veya bunların SK-KS, GK-KS, SK-KS-KS, GK-KS-KS gibi kütle spektrometrisi (KS) kombinasyonları ile elektrokimyasal ve radyokimyasal yöntemlerle miktar tayinlerini içerir.

2.2.2. Tipik Validasyon Parametreleri

2.2.2.1. Doğruluk

2.2.2.2. Kesinlik (Precision)

2.2.2.3. Seçicilik (Selectivity, specificity)

2.2.2.4. Teşhis Sınırı (LOD)

2.2.2.5. Tayin Sınırı (LOQ) veya tayin alt sınırı (LLOQ)

2.2.2.6. Doğrusallık (Linearity)

2.2.2.7. Duyarlılık (sensitivity)

2.2.2.8. Çalışma Aralığı (Range)

2.2.2.9. Sağlamlık (Robustness)

2.2.2.10. Tutarlılık (Ruggedness)

2.2.2.11. Stabilité (Stability)

2.2.2.1. Doğruluk

Analiz sonucu elde edilen değerin gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir.

Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Bu aynı zamanda biyolojik sıvılardan tüketmenin etkinliğini de gösterir. Kullanılan cihazlardan yapılan ölçümlere dayalı olarak hesaplanır. Biyolojik sıvılarda çalışılırken geri kazanımın % 100 olması gerekmez.

Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişim için yapılır; alçak (tayin alt sınırında veya yakın derişiminde), orta (çalışma derişim aralığının ortasında yer alan bir derişimde) ve yüksek (çalışma derişim aralığının üst sınırlarında veya yakınında yer alan bir derişimde) derişim değerleri seçilerek kullanılır. Seçilen herbir derişim için minimum 5 tayin yapılmalıdır. Bu tayinlerden minimum 3 tanesi ortalama

değerin % 15 inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki derişim için bu sapma % 20 yi geçmemelidir.

Geri kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir. Bunlar:

2.2.2.1.1. Referans bir yöntemle karşılaştırmak

Geliştirilen analiz yöntemi ile, 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Sonuçlar referans kabul edilen veya basılı olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır. Bu karşılaştırma işlemi için student-t ve Fisher (F) testleri kullanılır. Student-t testi ile iki yöntemin ortalamaları arasındaki, F testi ile de standart sapmaları arasındaki farklılık karşılaştırılır. Hesapla bulunan t ve F değerleri çizelgelarda verilen teorik t ve F değerleri ile kıyaslanır. Hesapla bulunan değerlerin çizelgede yer alan değerlerden küçük oluşu geliştirilen yöntemin enaz referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğunu gösterir. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (%BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir.

$$\% BSS = \frac{SS}{X} \times 100 \qquad \% BH = \frac{GD - \bar{X}}{GD} \times 100$$

GD: Gerçek Değer

SS: Standart Sapma

$\bar{X}$: Ortalama Değer

2.2.2.1.2. Kör matriks ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek:

Farmasötik dozaj formları gibi matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir. Analizi yapılacak madde boş matrikse değişik derişimlerde

eklenir. Bu matriks ilaç dozaj formları için (etken maddesiz) yardımcı maddelerden, pestisit kalıntıları için pestisit ile muamele edilmemiş ekinlerden oluşur.

Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% BH) ile beraber verilir.

2.2.2.1.3 Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Madde ilave edilmiş ve ilave edilmemiş bütün numuneler en az 3'er defa analiz edilir. Sonuçlar ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% BH) ile beraber verilir.

2.2.2.2. Kesinlik

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile bir numuneye aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. % BSS (Bağıl Standart Sapma) veya % VK (Varyasyon Katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan herbir derişim için minimum 5-6 tayin yapılmalıdır. Bunlardan en az 3 deney sonucunun % BSS'ı olarak teorik değerin % 15'inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki derişim için (TAS) bu sapma % BSS olarak % 20 yi geçmemelidir.

Kesinlik üç kısımda düşünölmelidir. Tekrarlanabilirlik (repeatability), orta kesinlik (intermediate precision) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility).

2.2.2.2.1 Tekrarlanabilirlik

Kısa zaman aralığı içerisinde aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltilerden en az 10 ölçüm yapılır (30-40 ölçüm tercih edilmelidir). Bu tekrar edilebilirlik gün içi veya çalışma sırasındaki kesinlik olarak da adlandırılır. Sonuçta, kesinlik elde edilen değerlerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 1.0$ olmalıdır.

2.2.2.2.2 Orta-Kesinlik

Orta kesinlik laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Farklı günlerde, farklı analizciler veya farklı cihazlar kullanılarak saptanabilen değerlerdir. Çalışmalar arası, deneyler arası veya günler arası kesinlik olarak tanımlanan bu değer çalışmanın tam anlamda kesinliğini belirtir. Bu kesinliği sağlayan çalışma diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış olur. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm, farklı günlerde ve/veya farklı analizciler tarafından ve/veya farklı cihazlarla yapılır. Sonuçta, orta kesinlik elde edilen değerlerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 2.0$ olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

2.2.2.2.3 Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik özellikle ortak çalışma yapan farklı laboratuvarların uygulamaları sonucu elde edilen ve deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik

derecesidir. Özellikle yöntem tek biçimliliği (standardizasyonu) çalışmalarında kullanılan bir kesinlik değeridir. Geliştirilecek yöntem farklı laboratuvarlarda da aynı anda kullanılacaksa bu kesinliğin hesaplanması ve değerinin raporda belirtilmesi gerekir. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı laboratuvarlarda, farklı zamanlarda ve farklı analizciler tarafından (En az bir kaç gün ara ile yapılmalıdır) hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçta, tekrar elde edilebilirlik, ölçülen değerlerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 2.0$ olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

2.2.2.3. Seçicilik

Analizi yapılacak maddenin numunede bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Bu kompleks numune karışımlarının analizinde girişim derecesinin de bir ölçüsüdür. Etken madde yanında safsızlıkların, parçalanma ürünlerinin, benzer kimyasal maddelerin veya plasebo bileşenlerin bulunduğu numune ile bulunmadıkları numunede yapılan miktar tayini analizlerde etkin maddenin bulunan derişimleri arasındaki fark olarak ifade edilir. Özellikle stabilite tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır.

Seçicilik, miktar tayini sırasında gerekli validasyon işlemleri yapılırken, teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır.

2.2.2.4. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (TS)

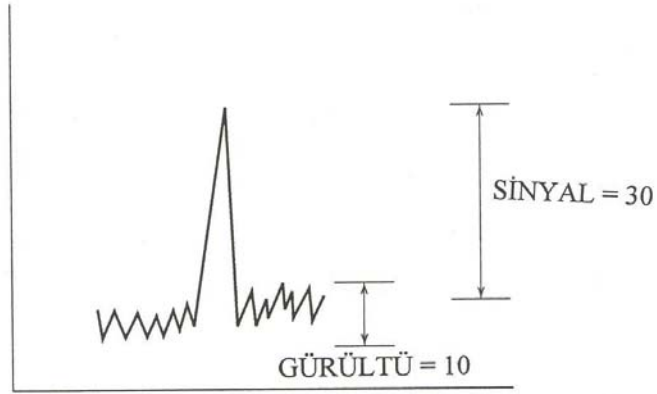
Analizi yapılan örneğin belirlediği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan

yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır.

Hesaplama yolu ile *Teşhis Sınırı* saptanmasında;

$$TS = 3.3 \times SS / m$$

eşitliği kullanılır. Bu eşitlikte SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlarının veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.



Şekil 2.11. Teşhis sınırının hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı

2.2.2.5. Tayin Alt Sınırı (TAS)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir.

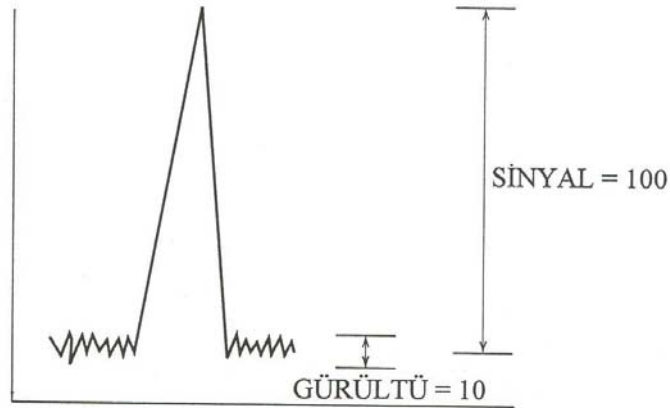
Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek TAS tesbiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır.

Hesaplama yolu ile *Tayin Alt Sınırı* saptanmasında

$$TAS = 10 \times SS / m$$

eşitliği kullanılır. SS= Kör çözümlerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

SS ve m değerleri TS eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.



Şekil 2.12. Tayin alt hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli

Biyolojik sıvılarla çalışılırken TAS'nı belirlemek için aşağıdaki şartların yerine gelmesi gerekir:

- Analitin TAS'daki derişimi için cihazdan ölçülen cevap kör için ölçülen cevabın en az 5 katı olmalıdır
- Analit için gözlenen pikin veya alınan cevabın tanımlanabilir ve diğer girişim yapma ihtimali bulunan maddelerden ayrı olması gerekir ayrıca % 20 kesinlik ve % 80-120 doğrulukta tekrar edilebilir olmalıdır.

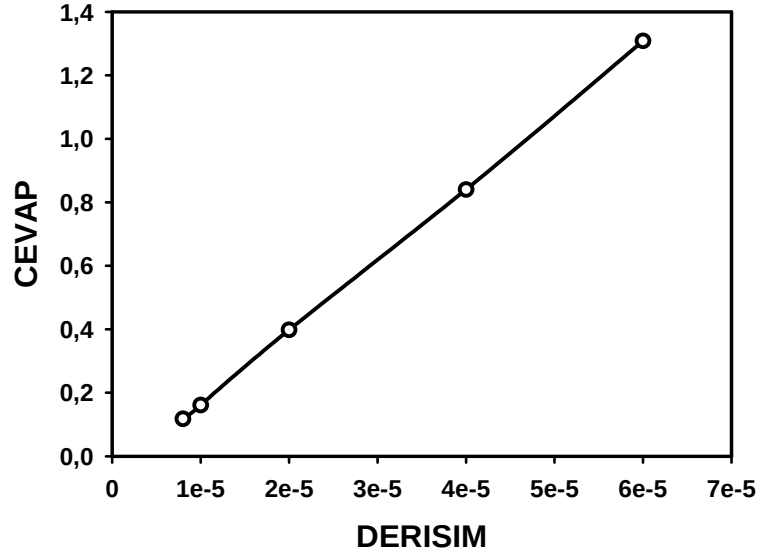
2.2.2.6. Doğrusallık

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korrelasyon katsayısı (r) doğrusallığı veren parametrelerdir. Analit derişiminin ölçülen değerlere karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısı $r = 0.999$ ve üzerinde ise ve cevap değerleri çizilen doğrunun üzerinde yer alıyorsa sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltiden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz edilmesi gerekir. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50 sinden düşük ve üst sınır da %150 sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Bu 5 değerle yapılan doğrusallığın saptanması işleminin en az 3 defa tekrarlanması gerekir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesişim değerlerinin %BSS ları veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir.

2.2.2.6.1 Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği)

Analitin bilinen derişimleri ile değişen değişkenin cevapları arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve Tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için (kör hariç) cihazdan ölçülen değerlere göre hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur.



Şekil 2.13. Kalibrasyon doğrusu (grafığı) ve eşitliğı

Biyolojik sıvılarla çalışılırken kalibrasyon eğrisi oluştururken aşağıdaki kriterlerin yerine gelmesi gerekir:

- a- Tayin alt sınırı derişiminden elde edilen cevaplar arasındaki sapma %20 den fazla olmamalıdır
- b- Tayin alt sınırı derişiminin dışında seçilen standart derişimlerden elde edilen cevaplardaki sapmalar % 15'den fazla olmamalıdır.

2.2.2.7. Duyarlılık

Duyarlılık, doğrusallığın geçerli olduğı aralıktaki doğru denkleminin eğimidir. Pek çok kitapta aynı zamanda tayin alt sınırı olarak tanımlanmıştır. Tayin alt sınırı ne kadar küçükse yöntem o derece duyarlıdır.

2.2.2.8. Çalışma Aralığı

Yeterli doğruluk ve duyarlılıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır. Derişim aralığı genellikle seçilen yöntemin tipine göre değişir. Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulunduğundan sonra belirlenir. Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın ölçülür. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50'sinden düşük ve %150'sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Hedef miktarın % 50, 75, 100, 125 ve 150 olacak şekilde aralık düzenlenebilir.

2.2.2.9. Sağlamlık

Yöntemin, analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi etkenlerdir. Kararlılık yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür ve yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken bir parametredir.

Örneğin pH 3 de ± 0.1 kadar bir değişim gösteren bir madde pH 4.5 da değişmeden aynı sonucu veriyorsa pH 4.5 ortam olarak seçilmelidir.

2.2.2.10. Tutarlılık

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın: Aynı laboratuvar da farklı analizciler tarafından; Aynı laboratuvar da farklı cihazlar tarafından; Farklı laboratuvar da gerçekleştirilmesi; Reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi; Farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi; aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir.

Orta kesinlikle de benzeşmektedir. % BSS ile ifade edilir. Uluslararası Uyum Konferansı (ICH= International Conference on Harmonization) bunu yapılması kesin olarak zorunlu işlemler gurubuna dahil etmemiştir.

2.2.2.11. Stabilite

Amerikan Farmakopesi tarafından zorunlu bir validasyon parametresi olarak verilmemekle beraber yapılması tavsiye edilir. Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için numunelerin, standart maddelerin ve kullanılan çözücülerin uygun bir süre (örn. 1 gün, 1 hafta, 1 ay veya ne kadar süreye ihtiyaç duyuluyorsa o kadar süre) stabilitesini koruması gereklidir.

Etken maddenin stabilitesi oda sıcaklığında ve en az 6 saat olarak değerlendirilmelidir. Saklama süresinin tamamlanmasından sonra stabilite taze hazırlanmış stok çözelti ile karşılaştırma yaparak tayin edilir.

Biyolojik numunelerde ilacın stabilitesi, onun saklama şartları, kimyasal yapısı, matriks ve saklama kabının bir fonksiyonudur. Stabilite olarak; numune toplama ve hazırlama sırasında, uzun süreli (belirlenen saklama sıcaklığında), kısa süreli saklamalarda (oda sıcaklığında) ve dondurma - çözme işleminden sonra geliştirilen analitik yöntem uygulanarak tayin edilir.

Tüm stabilite çalışmalarında analitin, içinde analit ve girişim olmayan biyolojik sıvı içerisinde taze hazırlanmış stok çözeltilerinden hareketle hazırlanan numune setleri kullanılır.

2.2.2.11.1. Dondurma ve çözme stabilitesi: (Freeze and Thaw Stability)

Bu yolla yapılan stabilite çalışmalarında 3 dondurma ve çözme siklusu kullanılır. Düşük ve yüksek derişimlerde en az 3 çözelti istenen sıcaklıkta 24 saat süreyle

dondurulur, sonra oda sıcaklığında kendiliğinden çözülmesi beklenir. Tamamen çözüldükten sonra numuneler aynı şartlarda 12-24 saat süreyle yeniden dondurulur. Donma-çözme işlemi 2 kez daha tekrarlanır ve 3. siklustan sonra tayin işlemi yapılır. Eğer analit istenen saklama şartlarında dayanıklı değilse; stabilite için numunenin 3 donma-çözme işlemi için – 70 °C kullanılır.

2.2.2.11.2. Kısa süreli stabilite (Short-term temperature stability)

Düşük ve yüksek derişimlerdeki numuneler oda sıcaklığında çözülür ve bu sıcaklıkta 4-24 saat aralığında tutulur (bu süre numunenin oda sıcaklığına gelmesi süresine bağlı olarak değişir). Bu sürenin tamamlanmasından sonra stabilite taze hazırlanmış stok çözelti ile karşılaştırma yaparak tayin edilir.

2.2.2.11.3. Uzun süreli stabilite (Long-term stability)

Bu stabilite, numunenin ilk toplandığı tarihten başlayarak son numune analizine kadar geçen süreyi kapsar. Bu işlemde düşük ve yüksek derişimde en az üç çözeltinin aynı koşullar altında saklanması ve sonra tayinleri yapılır. Numunelerin hacmi üç ayrı işlemde kullanıma yetecek kadar olmalıdır. Stabilite hesabında ilk toplandığı andaki derişim ile son derişim arasında kıyaslama yapılarak tayin edilir.

2.2.3. Yöntem Validasyonu İle İlgili Çalışmaların Sunumu

Bir analitik yöntemin validasyonu; labortauvar çalışmaları ile doğrulanması ve sonuçların deney validasyon raporları olarak sunulması ile tamamlanır. Müracaat sırasında hazırlanacak raporlar aşağıdaki bilgileri kapsamalıdır:

- a- Özet bilgi,
- b- Kullanılan yöntem ile ilgili bilgiler,

- c- Rutin numune analizlerine yöntemin uygulanmasıyla elde edilen biyoanalitik raporlar,
- d- Diğer bilgiler.

2.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

2.3.1. Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler

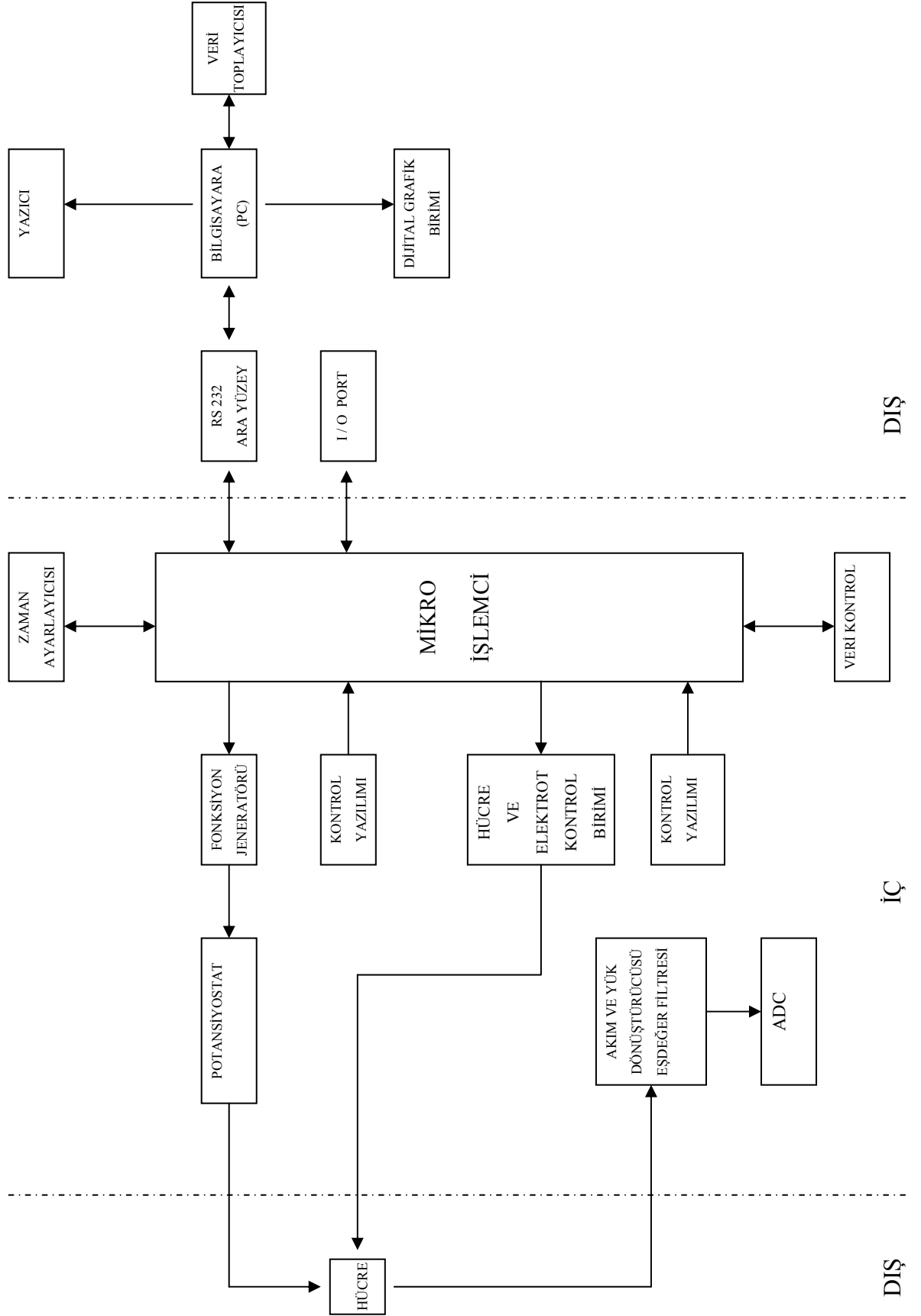
- a) Elektrokimyasal analizör : BAS 100 W
- b) Deney hücresi : Tek bölmeli voltametrik hücre
- c) Elektrotlar
 - a. Çalışma elektrodu : Camsı karbon elektrot (BAS MF 2013)
 - b. Yardımcı elektrot : Platin tel elektrot (BAS MW 1032)
 - c. Karşılaştırma elektrodu : Ag/AgCl (3M KCl) (BAS MF 2052)
- d) Manyetik karıştırıcı – ısıtıcılı : Ikamag RH (Jange and Kungel IKA-Labor Technic)
- e) Hassas terazi : Labor Alliance ve Shimadzu Libror AEG –220
- f) UV-Vis spektrometresi: Shimadzu UV 1601
- g) pH metre : Model 538 (WTW, Austria)
- h) Kombine elektrot (cam elektrot-referans elektrot)
- i) FT-IR spektrometresi: Jasco-420
- j) Santrifüj
- k) Ultrasonik banyo
- l) Çeşitli boylarda pyrex® balonjoje, kapaklı, hacmi belirli deney tüpleri, cam havan, beherler, çeşitli ölçülerde otomatik ve mikro pipetler, ön işlem için kullanılan BAS marka kahverengi yumuşak yüzeyli parlatma pedleri

2.3.1.1. BAS 100 W Elektrokimyasal Analizör

Bütün deneylerde Bioanalytical System Inc.'nin BAS 100 W elektrokimyasal analizörü kullanılmıştır. Burada potansiyostat ve fonksiyon jeneratörü genel olarak polarograflarda olduğu gibi esas kısımlardır. Bilgisayar teknolojisi ile desteklenerek verim ve kullanım kolaylığı artırılmıştır. Microsoft Windows® ile uyumlu sistem yazılımı sayesinde cihazın kontrolü, veri toplanması ve bu verilerin değerlendirilmesi kolaylıkla yapılmaktadır (Şekil 2.11). Bu cihaz, aşağıdaki tekniklerin kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

- a) Dönüşümlü Voltametri
- b) Doğrusal Taramalı Voltametri
- c) Kronoamperometri
- d) Kronokulometri
- e) Normal Puls Voltametri ve Polarografisi
- f) Diferansiyel Puls Voltametri ve Polarografisi
- g) TAST Polarografisi
- h) Barker Kare Dalga Voltametri ve Polarografisi
- i) Osteryoung Kare Dalga Voltametri ve Polarografisi
- j) Alternatif akım (AC) Voltametri ve Polarografisi
- k) Faz Selektif AC Voltametri ve Polarografisi
- l) 2. Harmonik AC Voltametri ve Polarografisi
- m) Üçgen Dalga AC Voltametri ve Polarografisi
- n) Diferansiyel Üçgen Dalga AC Voltametri ve Polarografisi
- o) AC Direnci
- p) Döner Disk Elektrotla DTV
- q) Hidrodinamik Modülasyon Voltametrisi

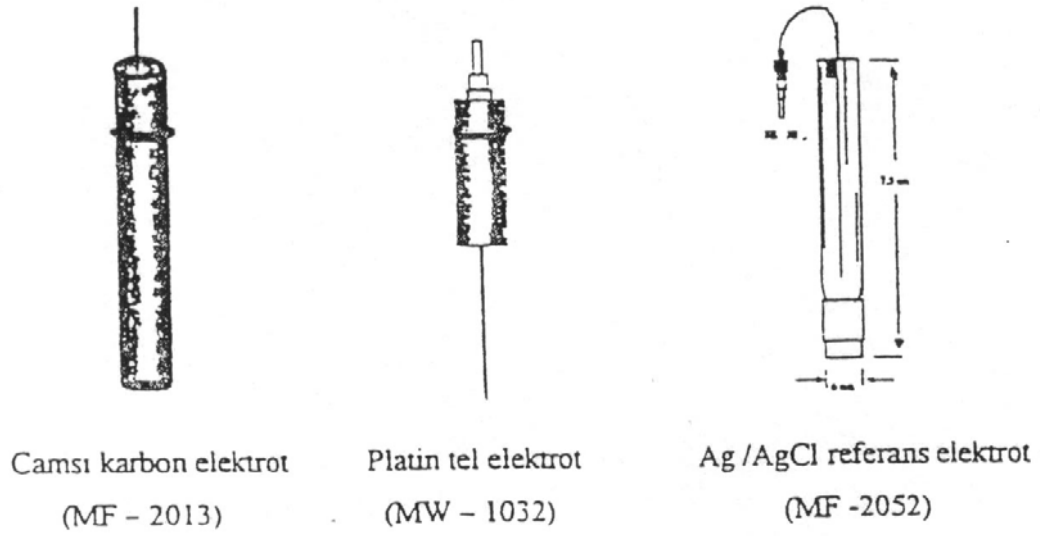
- r) Barker Kare Dalga Sıyırma Voltametrisi
- s) Diferansiyel Puls Sıyırma Voltametrisi
- t) Doğrusal Taramalı Sıyırma Voltametrisi
- u) Osteryoung Kare Dalga Sıyırma Voltametrisi
- v) Elektrokapiler Eğri Ölçümleri



Şekil 2.14. BAS 100 W elektrokimyasal analiz cihazının şeması

2.3.1.2. Deney Elektrotları

Tüm deneylerde çalışma elektrodu olarak camsı karbon disk (MF 2013) elektrot kullanılmıştır. Bu elektrodun çapı 6 mm, yüzey alanı ise $28,27 \text{ mm}^2$ 'dir. Yardımcı elektrot olarak platin tel elektrot (MW-1032) ve referans elektrodu olarak da Ag/AgCl (MF 2052 BAS) elektrot kullanılmıştır. Bu elektrotların görünümü Şekil 2.15.'de verilmiştir.



Şekil 2.15. Kullanılan deney elektrotlarının şekli

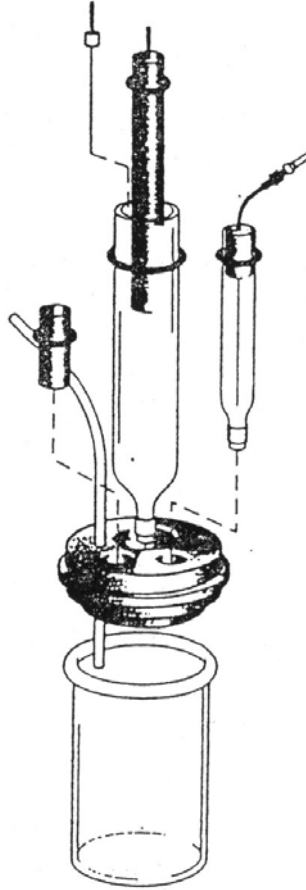
2.3.1.2.1. Deney Elektrotlarının Ön İşlemleri

Tekrar edilebilir elektrot yüzeyi oluşturabilmek amacıyla camsı karbon disk çalışma elektroduna basit bir ön işlem uygulanmıştır. Bu elektrot için özel yapılmış yumuşak yüzeyli bir parlatma malzemesi üzerine az miktarda alüminyum oksit (Al_2O_3) tozu konup, distile suyla ıslatılarak elektrot yüzeyi dairesel hareketlerle parlatılmıştır. En iyi tekrar edilebilirliği sağlamak için tüm bu ön işlem değişik sayılarda tekrar edilerek en uygun parlatma sayısı saptanmıştır. Ön işlem yapıldıktan sonra parlatılan elektrot distile suyla yıkandıktan sonra temiz bir kurutma kağıdı ile kurulanıp deney hücresine alınmıştır. Platin tel yardımcı elektrot ile Ag/AgCl referans elektrot ise her

deney sonrasında, deney hücresinden çıkarılarak distile suyla yıkanıp, kurutma kağıdı ile kurutularak deney hücresine yerleştirilmiştir.

2.3.1.3. Deney Hücresi

Yapılan tüm deneylerde BAS 100 W elektrokimyasal analizöre ait özel olarak üretilmiş olan ve Şekil 2.16.'da görülen deney hücresi kullanılmıştır. Bu sistem 2000 mVs^{-1} hıza kadar olan gerilim tarama hızlarını yapabilmektedir. Cihaz; Gateway 2000 markalı Pentium 166® işlemcili, Windows 95® işletim sistemiyle çalışan bir bilgisayarla uyumlu kullanılmaktadır.



Şekil 2.16. BAS 100 W elektrokimyasal analizör deney hücresi

2.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerden ileri gelebilecek safsızlıkların deney sonuçlarına yansımaması için kromatografik ve / veya analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanılmıştır.(Çizelge 2.1., Çizelge 2.2, Çizelge 2.3).

Çizelge 2.1 Kullanılan Standart Maddeler

Standart Madde Adı	Temin eden Firma Adı
Levodopa	Deva İlaç Sanayi
Benserazid	Deva İlaç Sanayi
Karbidopa	Merck Sharp & Dohme İlaç Sanayi
Amilorid HCl	Merck Sharp & Dohme İlaç Sanayi
Hidroklorotiyazid	Merck Sharp & Dohme İlaç Sanayi

Çizelge 2.2 Tayinlerde Üzerinde Çalışılan İlaç Dozaj Formu ve Birim Doz İçeriği

Madde Adı	Müstahzar Adı	Farmasötik Şekli	Birim Doz İçeriği
Levodopa ve Benserazid	Madopar®	Tablet	100 mg ve 25 mg
Levodopa ve Karbidopa	Sinemet®	Tablet	250 mg ve 25 mg
Amilorid HCl ve Hidroklorotiyazid	Moduretic®	Tablet	5 mg ve 50 mg

Çizelge 2.3 Çözeltilerin Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Maddenin Adı	Üretici Firma Adı
Sülfürik Asit	Merck
Metanol	Merck
Sodyum Hidroksit	Merck
Fosforik Asit	Merck
Glasiyel Asetik Asit	Merck
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck
Disodyum hidrojen fosfat	Merck
Alüminyum Oksit	Merck
Borik asit	Merck

2.4.1. Standart Maddelerin Saflık Kontrolleri

Saflık kontrolü amacıyla deneylerde kullanılan Levodopa, Benserazid, Karbidopa, Amilorid HCl ve Hidroklorotiyazid'in UV ve IR spektrumları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar, firma tarafından yollanan analiz sertifikasıyla da uyumlu olup; temin edilen standartların bu çalışmayı yürütebilecek özellikleri taşıdığı saptanmıştır.

2.4.2. Voltametrik Analizlerde Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.2.1. Standart Maddelerin Stok Çözeltileri

Deneylerde kullanılan Levodopa, Benserazid, Karbidopa, Amilorid HCl ve Hidroklorotiyazid'in gerekli olan miktarları hassas şekilde tartılıp, gerekli çözücü içerisinde 10^{-3} M derişimde stok çözelti hazırlanmıştır. Bu amaçla Levodopa,

Benserazid, Karbidopa için çözücü olarak su, Amilorid HCl ve Hidroklorotiyazid için de metanol kullanılmıştır.

2.4.2.2. Destek Elektrolitleri

Elektrokimyasal olaylarda elektroaktif olan maddenin elektrot yüzeyine taşınma basamaklarının aynı anda olmaması olayı basitleştirmektir. Bu taşıma sistemleri arasında engellenmesi en kolay olanı göç (migrasyon) olayıdır. Bunun için çalışılan ortama kolayca iyonlaşan bir tuz, elektrokimyasal özellikleri incelenen maddeninkinden çok daha yüksek derişimlerde ilave edilir. Bu tuza ya da bu tuzu içeren çözeltiye “destek elektroliti” adı verilir. Destek elektrolitinin derişimi incelenen maddenin derişiminden 100 kat daha fazla olmalıdır. Miktar tayini çalışmalarında ve kinetik incelemelerde analizi yapılacak maddeleri kolayca çözebilen, uygun pH aralığı sağlayan ve oldukça düşük akım veren çözeltiler destek elektroliti olarak seçilmiştir.

2.4.2.3. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

Deneylerde tampon çözelti olarak, asetat, fosfat ve Britton – Robinson tamponları kullanılmıştır.

Asetat tamponu için 1 M asetik asit çözeltisi hazırlanmış ve 5 M NaOH ile istenen pH değerlerine ayarlanmıştır. Asetat tamponu için pH 3,65 – 5,70 aralığında tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

Fosfat tamponu için 0,2 M H_3PO_4 , 0,2 M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve 0,2 M Na_2HPO_4 çözeltileri hazırlanmış ve istenen pH'a uygun konjuge asit veya baz çözeltileri ile ayarlanmıştır. Fosfat tamponu için pH 1,60 – 8,0 aralığında tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

Britton – Robinson tamponu için 0,04 M H_3BO_3 , 0,04 M H_3PO_4 ve 0,04 M CH_3COOH içeren 1000 mL çözelti distile su kullanılarak hazırlanmış ve 5,0 M NaOH çözeltisi ile istenen pH değerine ayarlanmıştır. Bu tamponla pH 2,00 – 12,00 aralığında tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

2.4.2.4. Voltametrik Yöntemin Tablet Dozaj Formlarına Uygulanması

Her 3 ikili karışımın dozaj formu içinde 10 adet tablet hassas olarak tartılmış ve bir havanda ince toz haline getirilmiştir. Bu tozdan çalışılan standart maddenin istenilen miktarına eşdeğer tam tartılmış ve balon jojede üzerine levodopa-karbidopa ve levodopa-benserazide ikili karışımları için su ve amilorid-hidroklorotiyazid ikili karışımı için de metanol ilave edilip ultrasonik banyoda 10 dk karıştırılmıştır. Bu karıştırma süresi sonunda balon jojenin hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra üstteki berrak çözeltiden uygun miktarda alınmış ve levodopa-karbidopa ve levodopa-benserazide ikili karışımları için seçilmiş destek elektroliti ile ve amilorid-hidroklorotiyazid ikili karışımı için de % 20 metanol oranı sabit tutularak seçilmiş destek elektroliti ile gerekli hacime tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin standart çözeltilerle aynı koşullarda voltamogramları alınmıştır.

2.4.2.5. Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları

Çalışmada kullanılan etkin maddelerin farmakopelerde bir karşılaştırma yöntemi olmadığı için tablet içerisinde yer alan katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını anlamak amacıyla tabletlerden geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

Bu amaçla belirli miktarda toz edilmiş tablet (etkin madde miktarları geliştirilen yöntemlerle önceden tayin edilen) ve belirli miktarda saf etken maddelerden oluşan karışım uygun çözücü içinde belli bir hacimde çözüldükten sonra tabletlere uygulanan işlemler aynen bu çözeltilere de uygulanmış, üstteki berrak çözeltiden kalibrasyon grafiği içerisinde yer alan bir derişime karşılık gelen hacimde çözelti alınmış ve levodopa-karbidopa; levodopa-benserazide ikili karışımları için seçilmiş

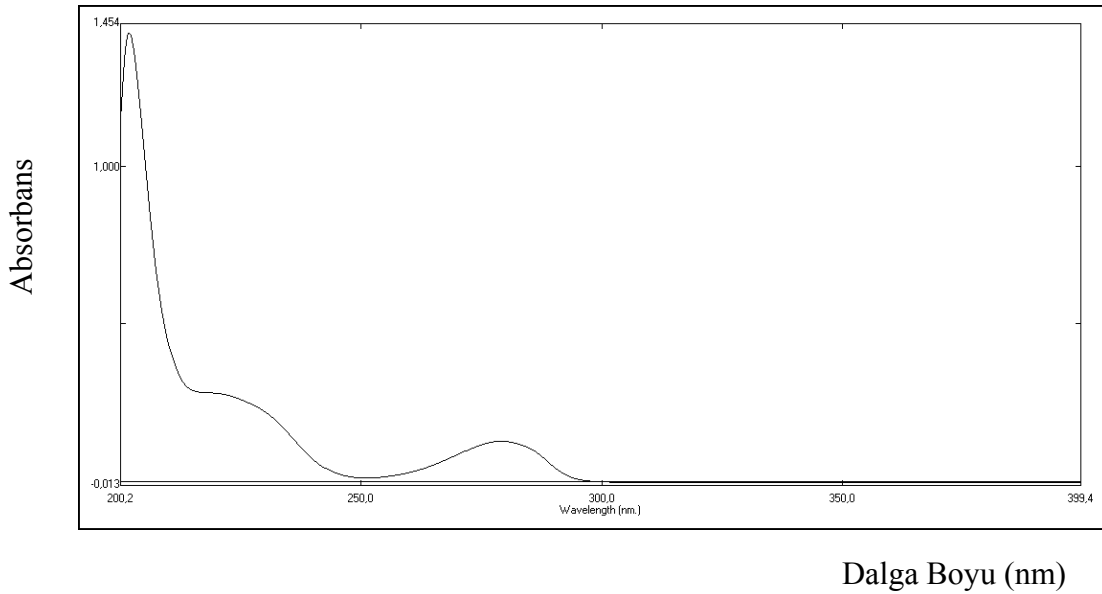
destek elektroliti ile ve amilorid-hidroklorotiyazid ikili karışımı için de % 20 metanol oranı sabit tutularak seçilmiş destek elektroliti ile gerekli hacime tamamlandıktan sonra voltamogramları kaydedilmiştir. Bu verilerden tabletlerde bulunan etken madde miktarı çıkartılarak, tartılan saf madde miktarının ne kadarının tayin edilebildiği yani ne kadarının geri kazanılabildiği hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

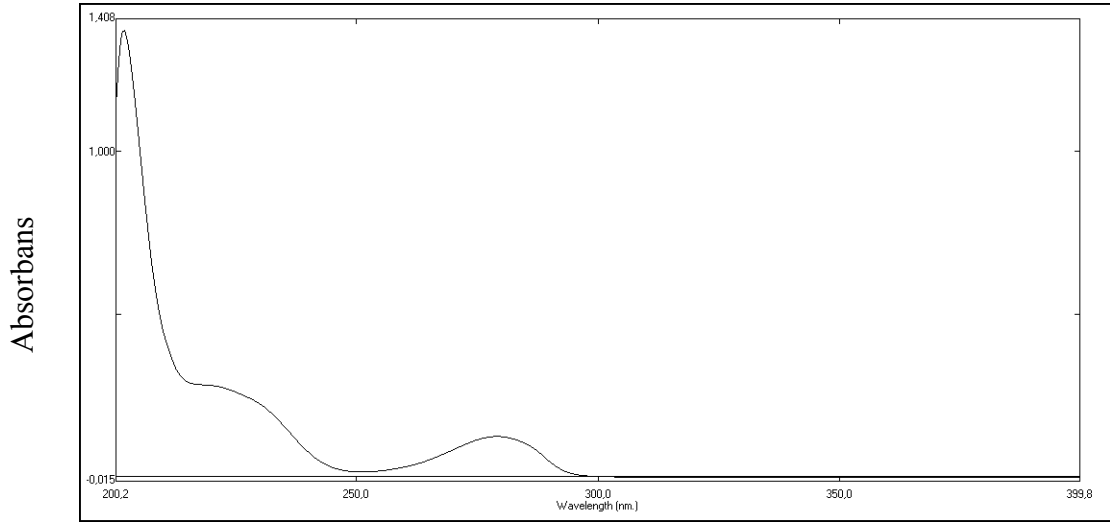
3.1. Standart Maddenin Saflık Kontrolleri

Deneylerde kullanılan levodopa, karbidopa, benserazide, hidroklorotiazid ve amilorid HCl'ün saflığı hakkında bilgi edinebilmek için UV ve IR spektrumları alınmış ve bu bölümde gösterilmiştir.

UV Spektrumları: 5×10^{-5} M Levodopa, Karbidopa, Benserazid, Hidroklorotiyazid ve Amilorid HCl'ün 0,1M HCl içerisinde hazırlanan çözeltilerinin 200-400 nm dalga boyları arasındaki UV spektrumları alınmış ve Şekil 3.1.a., 3.1.b., 3.1.c., 3.1.d., 3.1.e.de spektrumları gösterilmiştir.

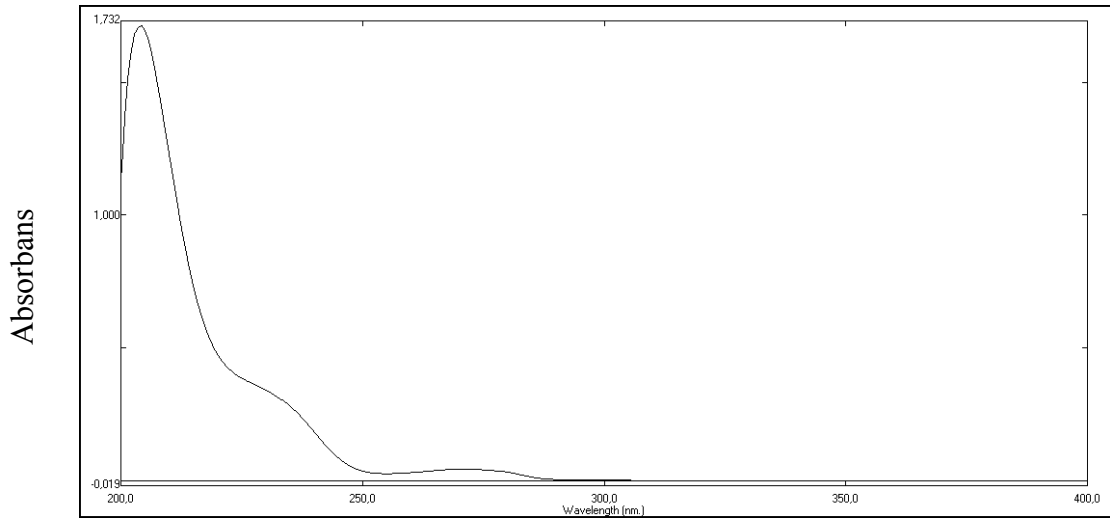


Şekil 3.1.a. 5×10^{-5} M Levodopa'nın 0,1 M HCl içerisindeki UV spektrumu



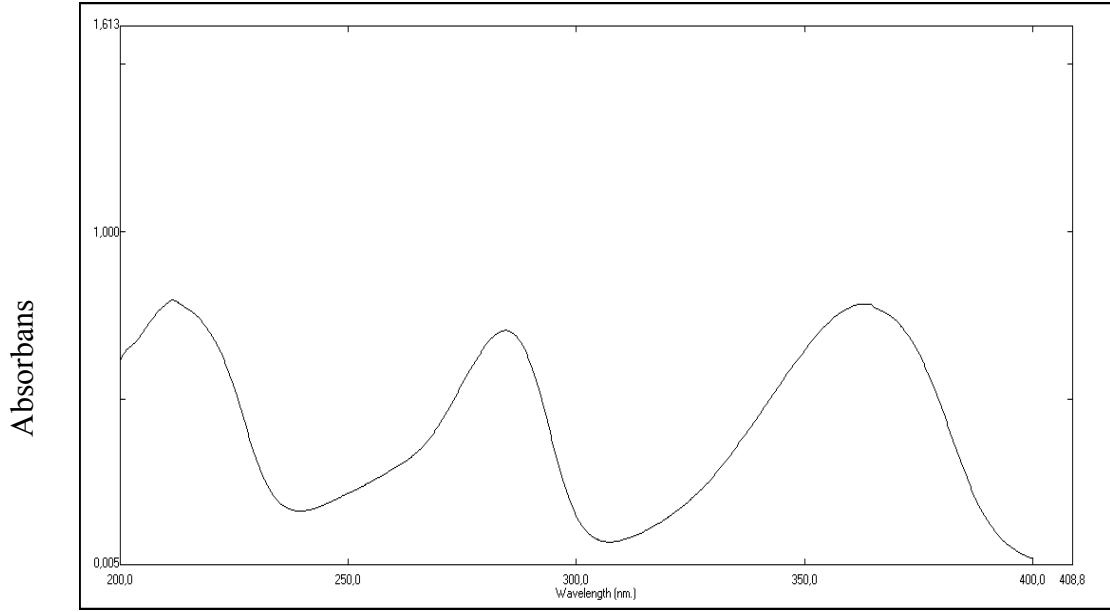
Dalga Boyu (nm)

Şekil 3.1.b. 5x10⁻⁵ M Karbidopa'nın 0,1 M HCl içerisindeki UV spektrumu



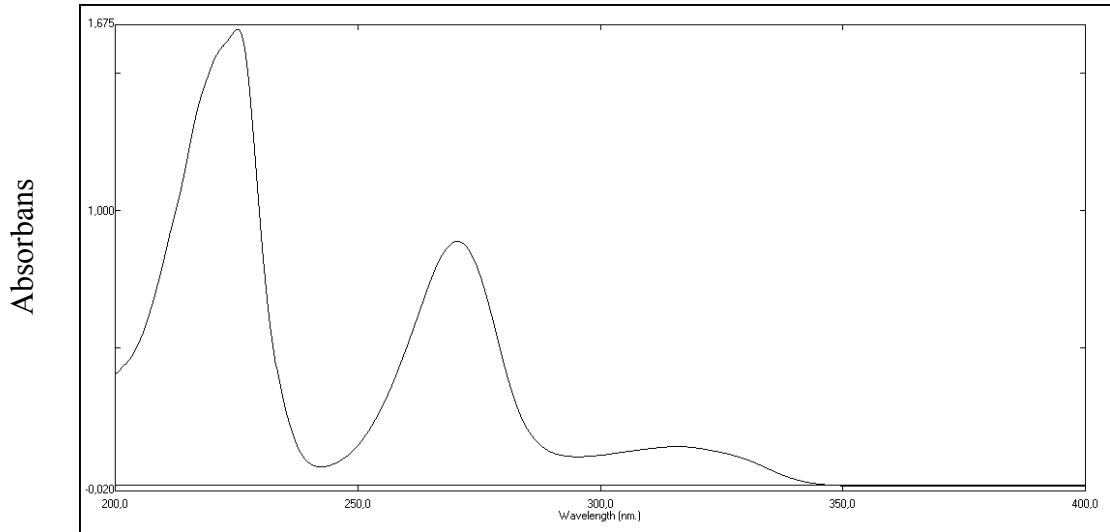
Dalga Boyu (nm)

Şekil 3.1.c. 5x10⁻⁵ M Benserazid'in 0,1 M HCl içerisindeki UV spektrumu



Dalga Boyu (nm)

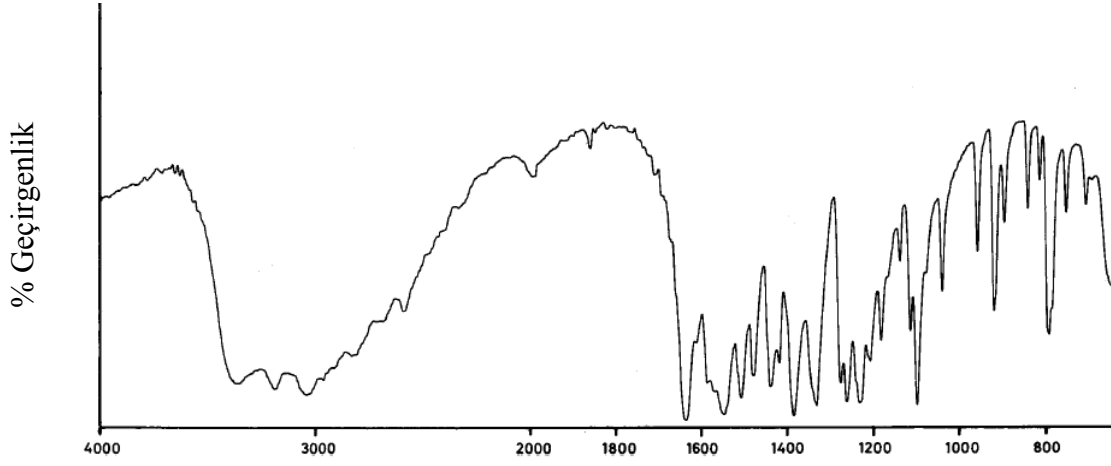
Şekil 3.1.d. 5×10^{-5} M Amilorid'in 0,1 M HCl içerisindeki UV spektrumu



Dalga Boyu (nm)

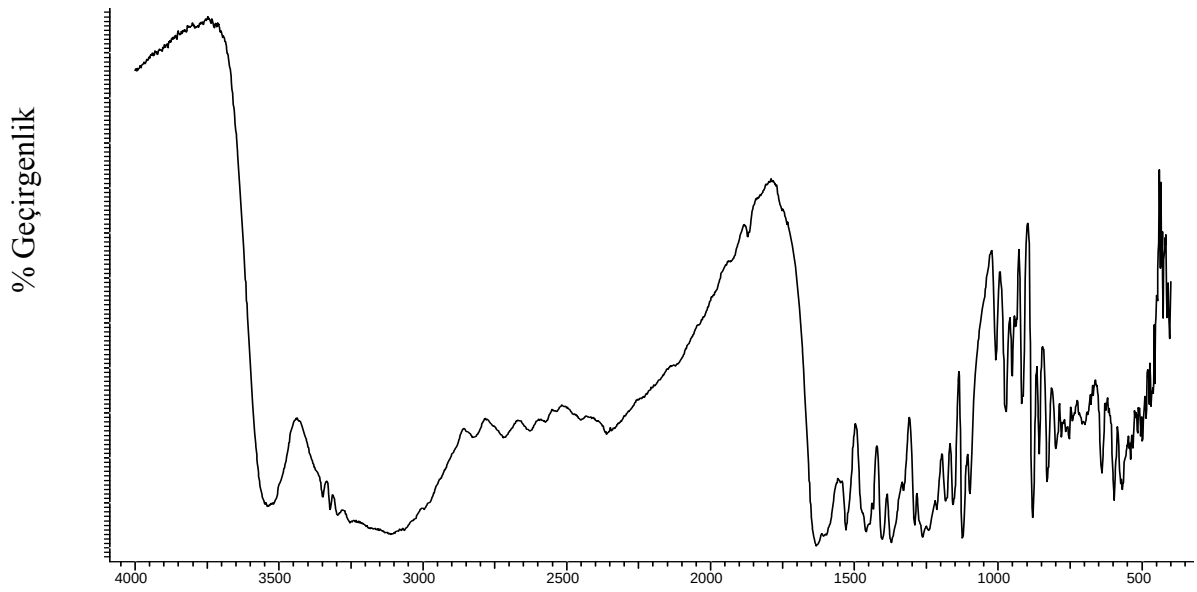
Şekil 3.1.e. 5×10^{-5} M Hidroklorotiyazid'in 0,1 M HCl içerisindeki spektrumu

IR Spektrumu: KBr diskine basılmış Levodopa, Karbidopa, Benserazid, Hidroklorotiyazid ve Amilorid HCl'ün 400– 4000 cm^{-1} arasındaki IR spektrumları Şekil 3.2.a, 3.2.b., 3.3.c., 3.4.d.,ve 3.5.e. 'de verilmiştir.



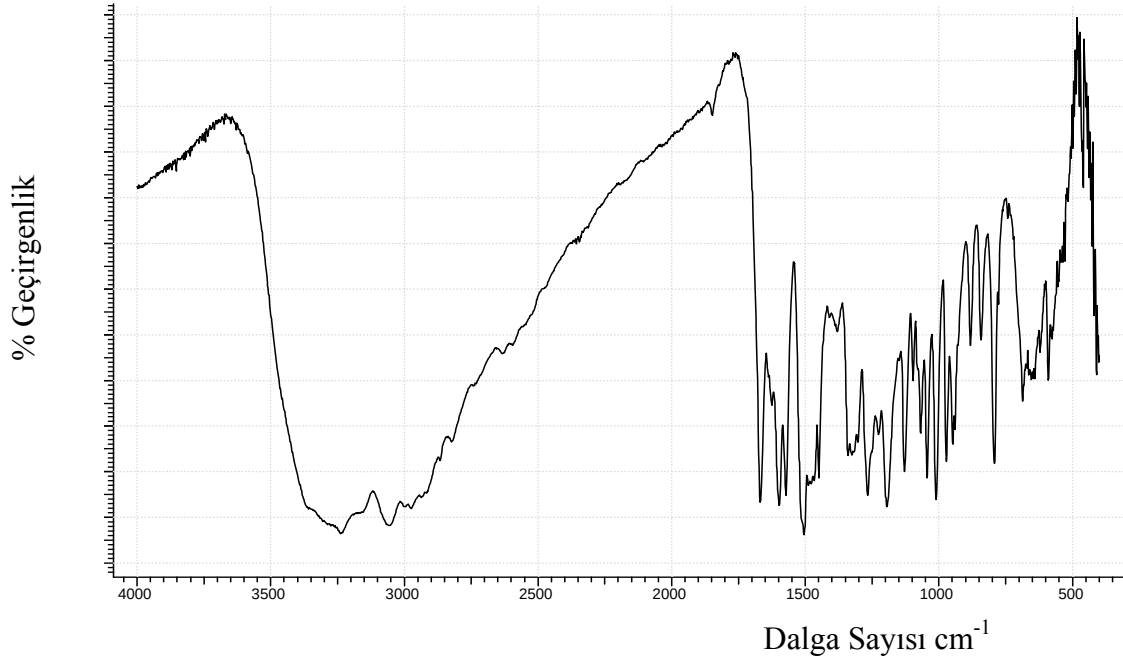
Şekil 3.2.a. Levodopa'nın IR spektrumu

Dalga Sayısı cm^{-1}

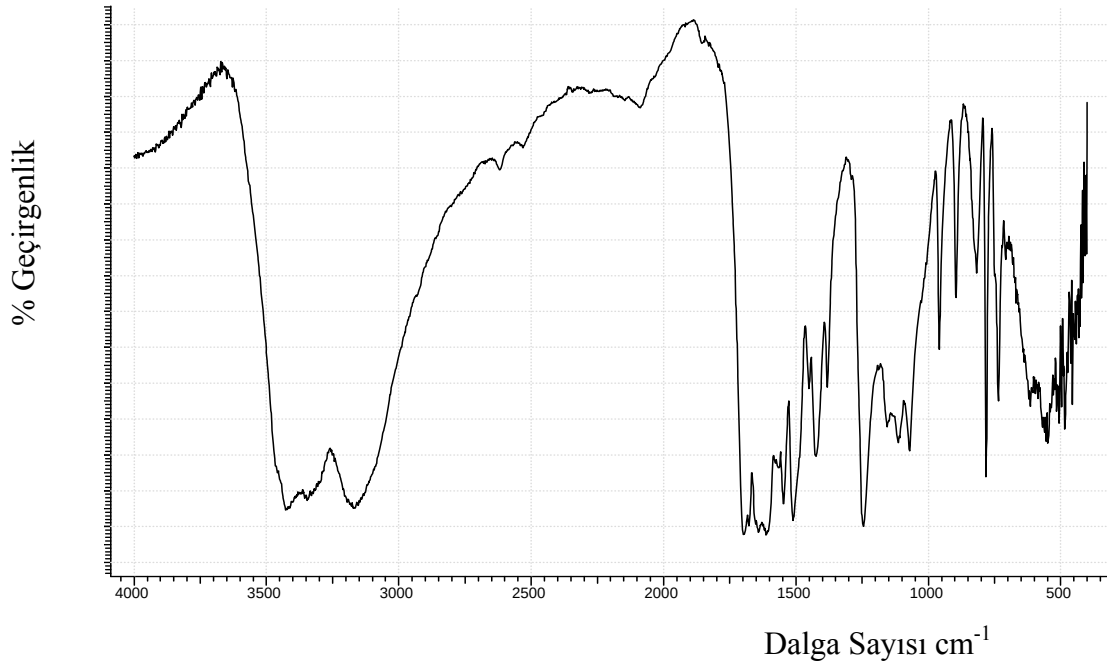


Dalga Sayısı cm^{-1}

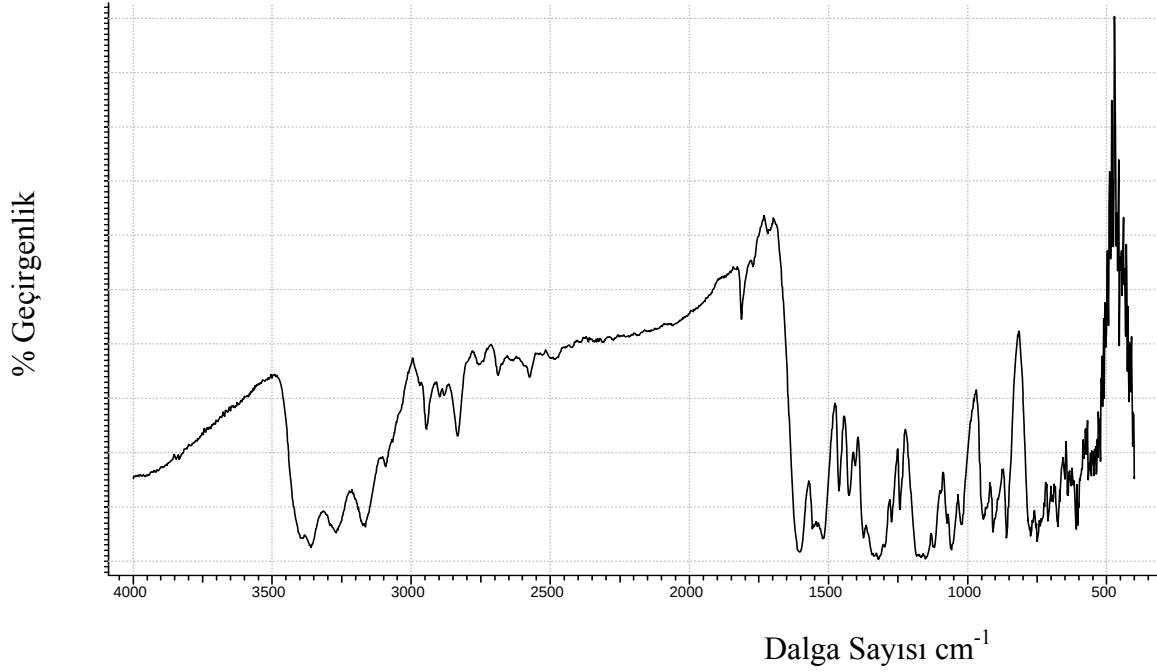
Şekil 3.2.b.Karbidopa'nın IR spektrumu



Şekil 3.2.c. Benserazid'in IR spektrumu



Şekil 3.2.d. Amilorid'in IR spektrumu



Şekil 3.2.e. Hidroklorotiazid'in IR spektrumu

3.2. Etkin Maddeler Üzerindeki İncelemeler

Çalışma maddeleri olarak belirlenen etkin maddeler üzerinde dönüşümlü voltametri (DV), doğrusal taramalı voltametri (DTV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (KDV) teknikleri kullanılarak değişik ortamlarda ve farklı pH değerlerinde kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

BAS 100 W elektrokimyasal analizörü, camısı karbon disk (MF 2013) çalışma elektrodu, platin tel (MW 1032) yardımcı elektrot ve Ag/AgCl referans elektrot (MF 2052) deneylerin tamamında kullanılmıştır.

Dönüşümlü, doğrusal taramalı, diferansiyel puls ve kare dalga voltametri teknikleri ile çalışma için en uygun ortamı seçebilmek amacıyla değişik destek elektrolitleri ve tamponlar, farklı pH değerlerinde etkin maddelerin elektrokimyasal davranışı yükseltgenme yönünde incelenmiştir.

Yapılan çalışmalarda etkin maddelerin farklı pH'lardaki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için destek elektroliti olarak pH 2,00 – 12,00 arasındaki Britton – Robinson (BRT) tamponları, pH 1,60-8,00 arasındaki fosfat tamponları, pH 3,65-5,70 arasındaki asetat tamponları kullanılmıştır.

Yukarıdaki ortamlarda, pH'larda ve değişik hızlarda saf maddelerin davranışı incelendikten ve saf maddelerin ikili karışımları ile bu maddelerin aynı anda analizleri için tayin yöntemi geliştirilip, validasyonu yapıldıktan sonra ticari tablet dozaj formları üzerindeki uygulamaya geçilmiştir. Bu amaçla Merck Sharp & Dohme ve Deva ilaç firmalarından temin edilen ilaçlardan örnekler alınıp tabletlerden miktar tayini ve % geri kazanım deneyleri yapılmıştır.

Bu ilaçlardan Sinemet® 250 mg Levodopa ve 25 mg Karbidopa; Madopar® 100 mg Levodopa ve 25 mg Benserazide ve Moduretic® 5 mg Amilorid HCl ve 50 mg Hidroklorotiyazid içermektedir. Miktar tayini deneyleri bu miktarlar esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Karbidopa Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar

Karbidopa'nın voltametrik incelenmesi, camı karbon disk elektrot ile değişik pH ve tamponlar içerisinde, dönüşümlü voltametri (DV), doğrusal taramalı voltametri (DTV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (KDV), teknikleri kullanılarak kapsamlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerden elde edilen DV eğrilerinin akım büyüklükleri belirli pH değerlerinin üzerinde okunamadığı için ilgili çizelgelarda ve E_p -pH, i_p -pH grafiklerinde verilen akım değerleri DPV yöntemi ile elde edilen verilerden oluşturulmuştur.

3.2.1.1. Karbidopa'nın Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DTV) Çalışmaları

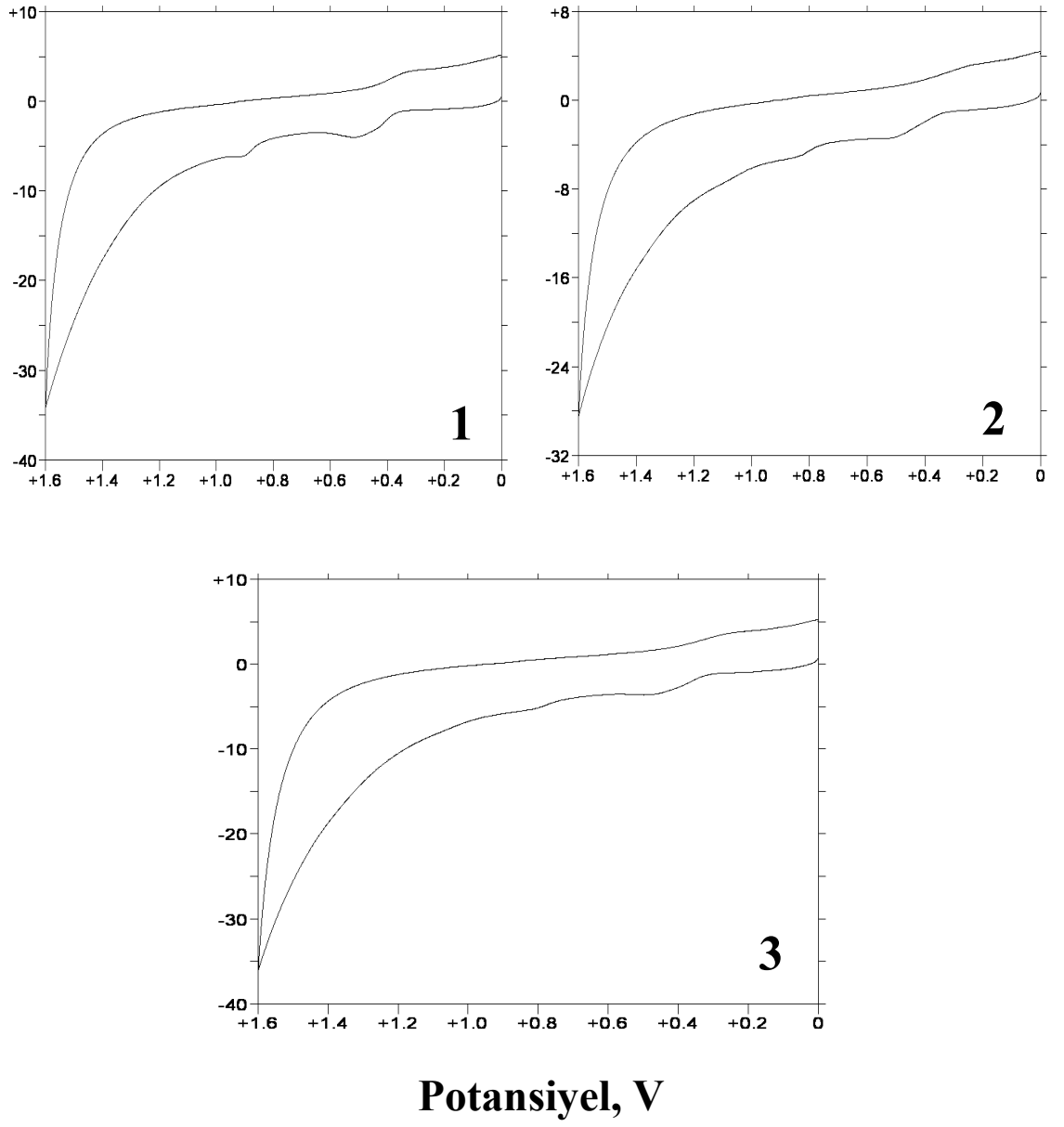
DV tekniği kullanılarak karbidopa'nın camı karbon disk elektrot ile pH 2,00 – 12,00 Britton – Robinson (BR) tamponları, pH 1,60-8,00 arasındaki fosfat tamponları, pH 3,65-5,70 arasındaki asetat tamponları, içeren destek elektroliti içerisinde pH, hız taraması ve ikili karışımdan analiz çalışmalarına yönelik incelemeler yapılmıştır.

3.2.1.1.1. Karbidopa'nın Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

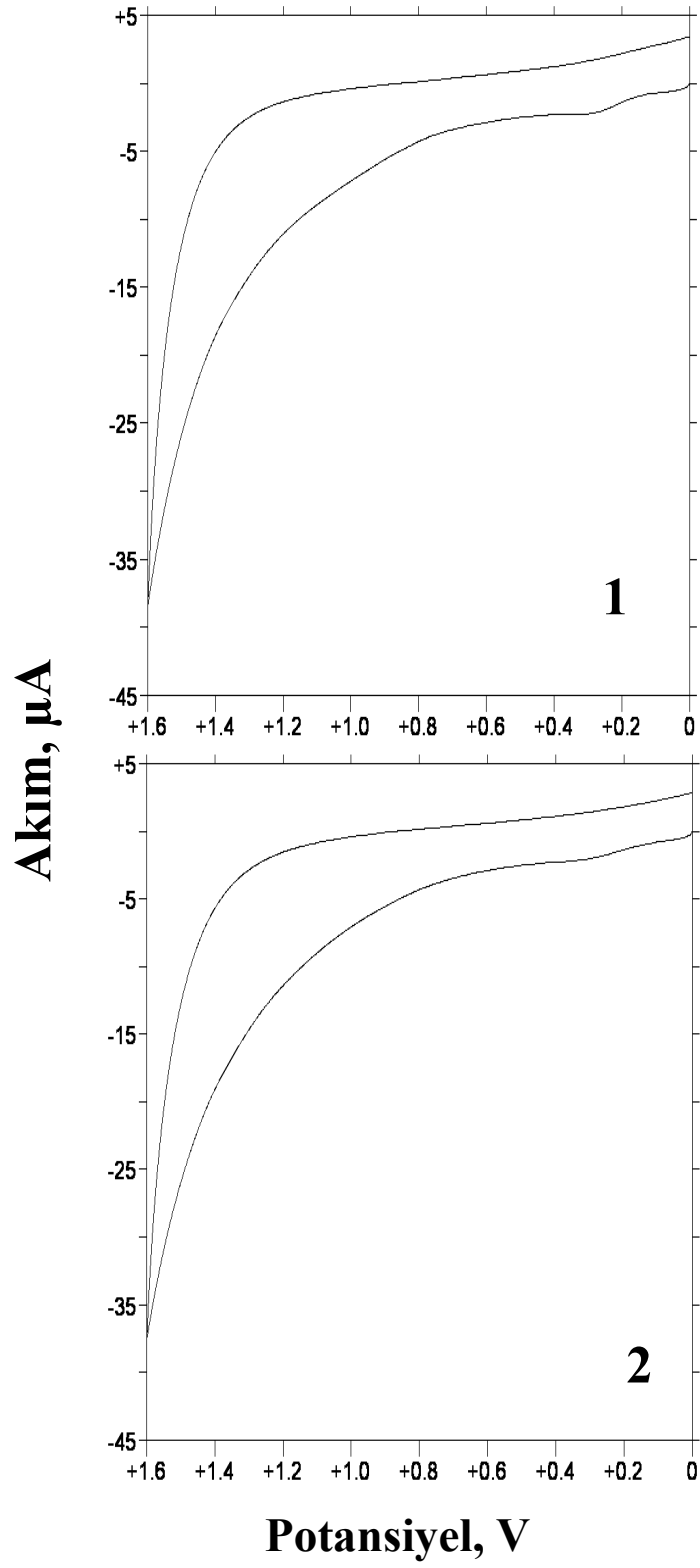
Karbidopa'nın fosfat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 1,60; 2,75; 3,19; 6,80; 8,00 fosfat tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde $5 \times 10^{-5} \text{M}$ derişimde, distile su içinde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektoliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Karbidopa'nın $5 \times 10^{-5} \text{M}$ derişimi ile pH 1,60-8,00 fosfat tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.3a ve 3.3b' de görölmektedir. pH 1,60'da 514,6 mV'da ve 925,0 mV'da iki adet anodik pik gözlenirken pH 3,19'a getirildiğinde 925,0 mV'da görülen pikin küçüldüğü saptanmıştır. pH değlerleri bazik, nötr veya hafif bazik değlere getirildiğinde, pikin daha az pozitif değlere kaydığı ve şiddetinin azaldığı görölmüştür.

Akım, μA



Şekil 3.3a. 5×10^{-5} M karbidopa'nın pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,19



Şekil 3.3b. 5×10^{-5} M karbidopa'nın pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH6,80; 2) pH 8,00

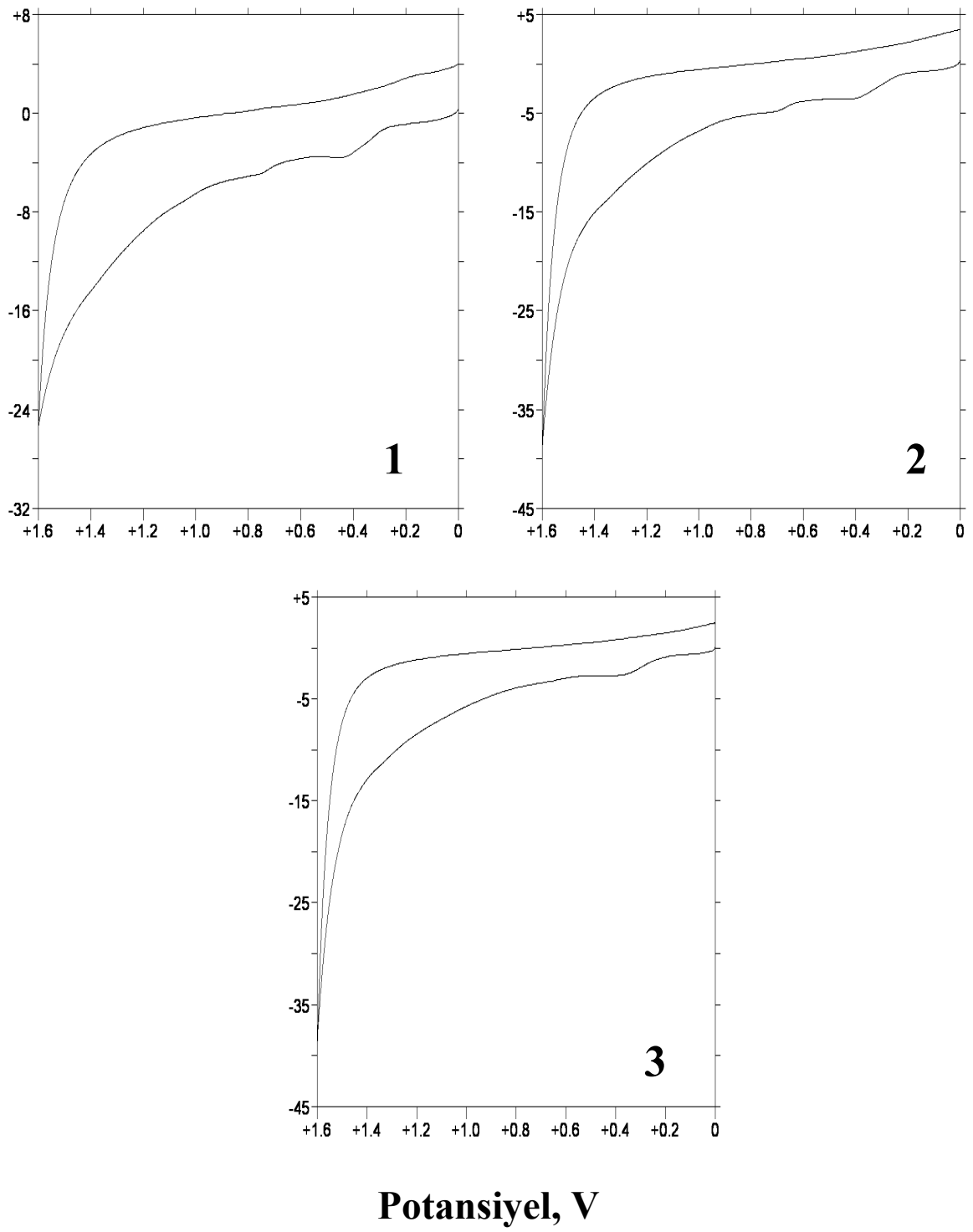
Çizelge 3.1. Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen 5×10^{-5} M karbidopa'nın değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
1,60	514	3,0040
2,75	511	2,2720
3,19	479	2,2450
6,80	356	0,6126
8,00	310	0,3238

3.2.1.1.2. Karbidopa'nın Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

Karbidopa'nın asetat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 3,65; 4,64; 5,70 asetat tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde $5 \times 10^{-5} \text{M}$ derişimde, distile su içinde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerdendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektoliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Karbidopa'nın $5 \times 10^{-5} \text{M}$ derişimi ile pH 3,65-5,70 asetat tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.4' de görölmektedir. pH 3,65'da pik 443,0 mV'da bir anodik pik gözlenirken daha yüksek potansiyel değerdlerinde de düşük şiddette bir anodik pik saptanmıştır. pH değerdleri arttıkça, pikin daha az pozitif değerdlere kaydığı ve şiddetinin azaldığı görölmüştür.



Şekil 3.4. 5×10^{-5} M karbidopa'nın pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 3,65; 2) pH 4,64; 3) pH 5,70

Çizelge 3.2. Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen 5×10^{-5} M karbidopa'nın değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

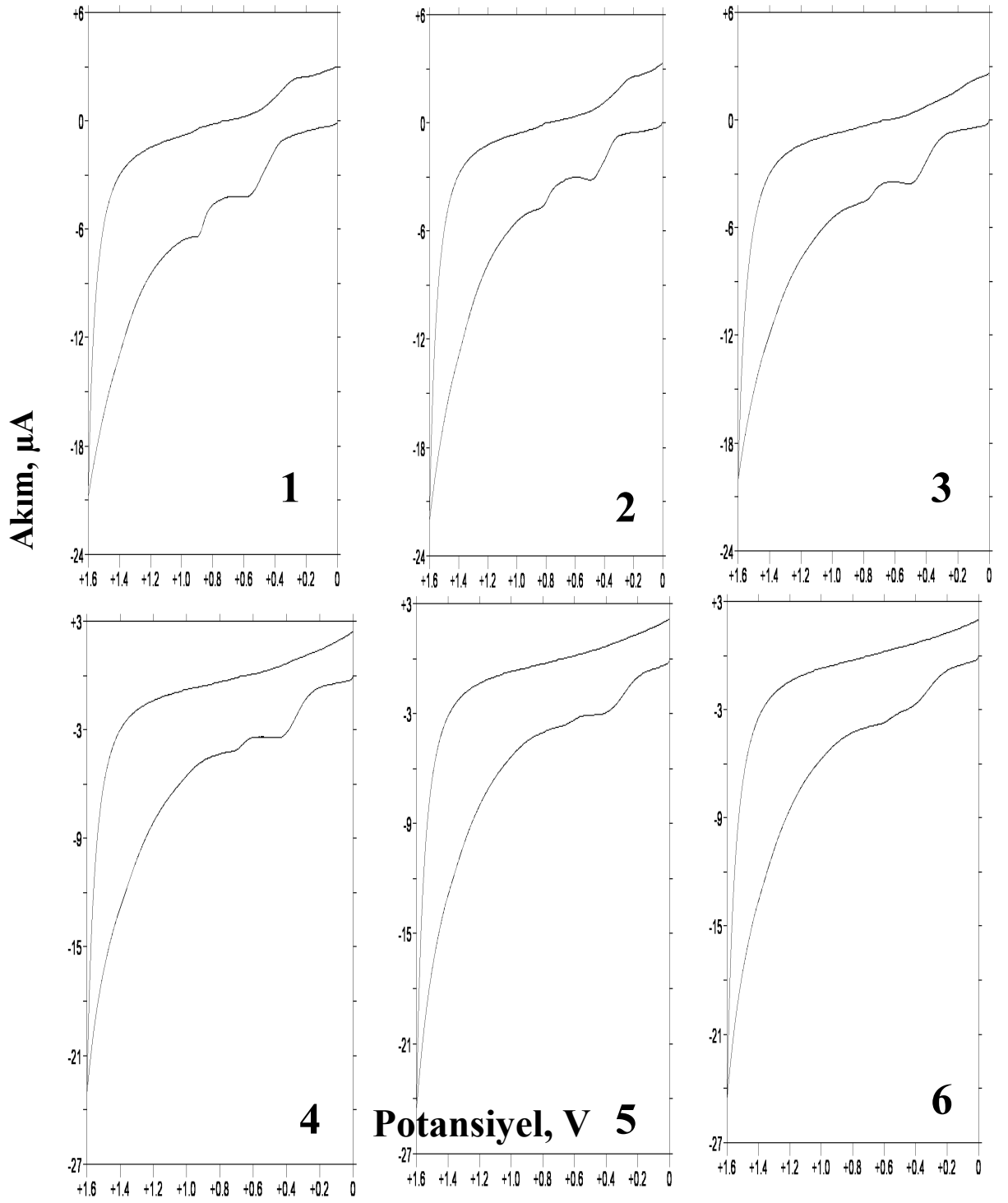
pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
3,65	443	2,2050
4,64	423	2,2740
5,70	391	1,6230

3.2.1.1.3. Karbidopa'nın BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

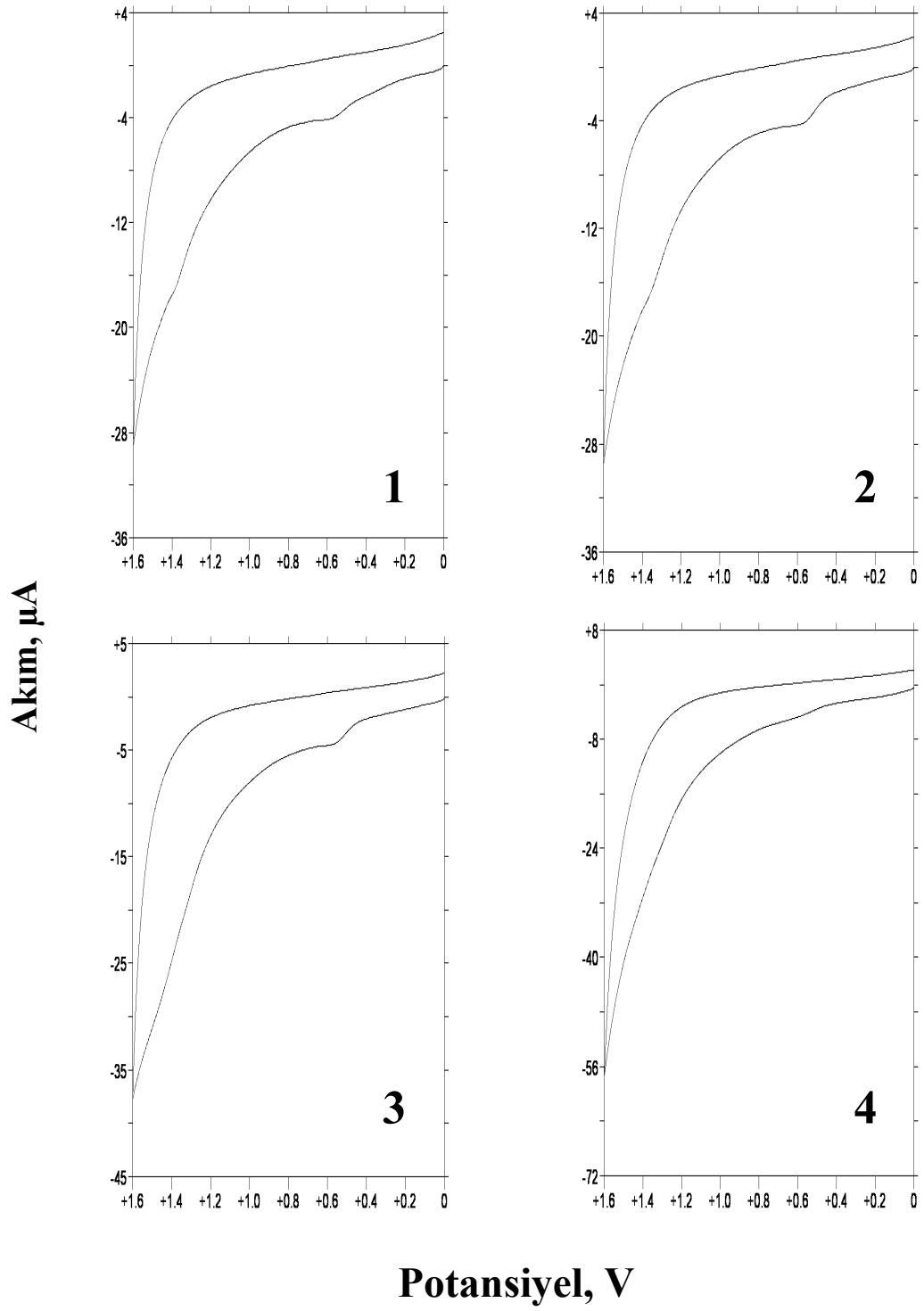
Karbidopa'nın BR tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00; 10,00; 11,00; 12,00 BR tamponları çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde 5×10^{-5} M derişimde, distile su içinde hazırlanmış karbidopa çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektolitinin cinsinin ve pH'nın reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Karbidopa'nın 5×10^{-5} M derişimi ile pH 2,00-12,00 BR tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.5a ve 3.5b'de görölmektedir.

pH 2.00'de 472 mV'da ve 930 mV'da iki adet pik gözlenirken pH arttıkça bu piklerin daha az pozitif potansiyellere kaydığı ve hafif bazik pH değerlerine geçildikçe iki pikin birleştigi saptanmıştır. pH 11,00 de ise pikin çok hafif bir dalgaya dönüştüğü görülmüştür. pH 12,00 değerinde karbidopa çözeltisi stabil olmadığı için bu noktada çalışılamamıştır.



Şekil 3.5a. 5×10^{-5} M karbidopa'nın pH 2.00 - 7.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 2,00 ; 2) pH 3,00; 3) pH 4,00; 4) pH 5,00; 5) pH 6,00; 6) pH 7,00

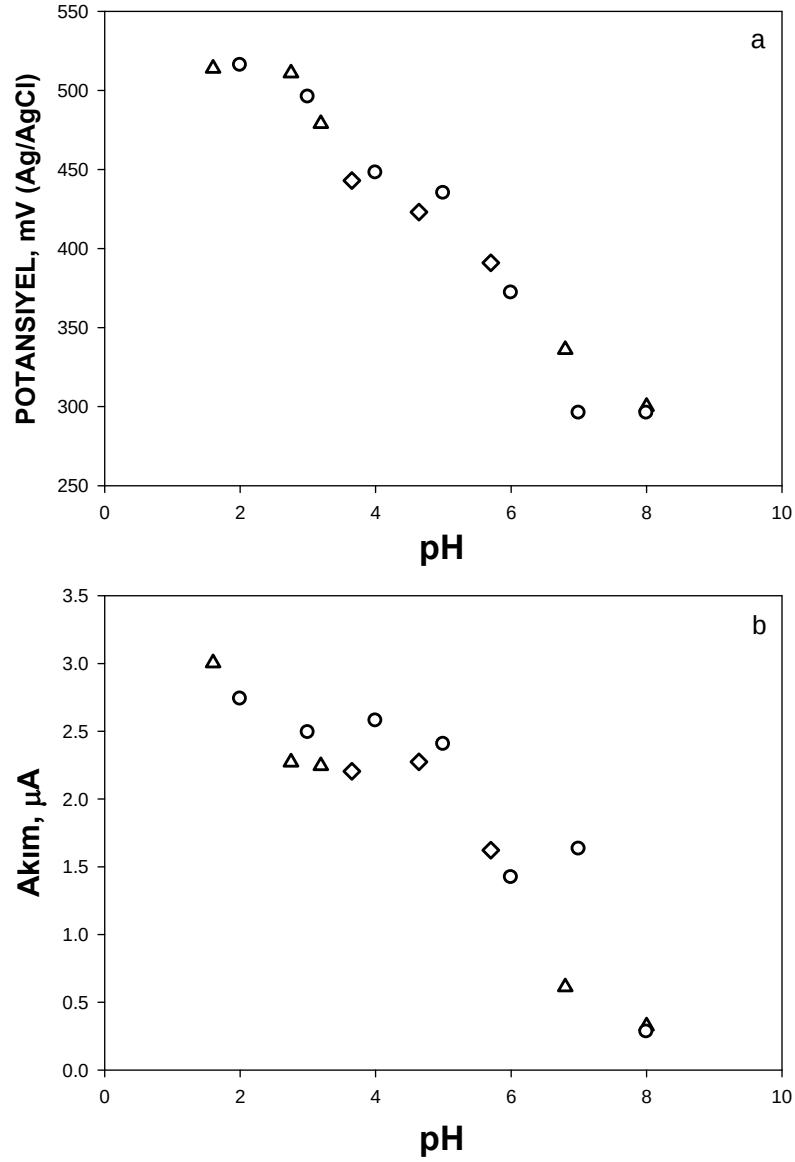


Şekil 3.5b. 5×10^{-5} M karbidopa'nın pH 8.00 - 11.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00 ; 2) pH 9,00; 3) pH 10,00; 4) pH 11,00

Çizelge 3.3. BR tamponu çözeltileri içerisinde kaydedilen 5×10^{-5} M karbidopa'nın değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
2,00	576	2,7390
3,00	496	2,4920
4,00	448	2,5780
5,00	435	2,4050
6,00	372	1,422
7,00	296	1,632
8,00	296	0,282
9,00	1. Pik gözlenemedi	1. Pik gözlenemedi
10,00	1. Pik gözlenemedi	1. Pik gözlenemedi
11,00	1. Pik gözlenemedi	1. Pik gözlenemedi

Bütün pH'larda ve değişik destek elektrolitleri içerisinde elde edilen verileri bir arada görebilmek için de ayrı bir grafik çizilmiştir. DPV ve KDV teknikleri ile birbirlerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. DPV tekniği ile çizilen I_p -pH ve E_p -pH grafikleri bu tez kapsamında verilmiş ve değerlendirilmiştir. pH'ın ve destek elektroliti cinsinin pik potansiyeli ve pik akımına etkisini daha rahat görebilmek için bütün pH'ları ve ortamları bir arada gösteren ve DPV tekniği ile elde edilen (Pik akımı - pH) I_p -pH, (Pik potansiyeli - pH) E_p -pH eğrileri Şekil 3.6 a ve b' de gösterilmiştir.



Şekil 3.6. 5×10^{-5} M karbidopa'nın bütün pH değerlerinde elde edilen (a) Ep – pH eğrileri ve (b) İp – pH eğrileri. (Δ) Fosfat; ($\circ$) BRT ; ($\diamond$) Asetat

Diferansiyel puls voltametri tekniğiyle bütün destek elektrolitlerinde ve pH 2,75-7,00 aralığında elde edilen eğrilerden potansiyel ile pH arasında bir doğrusallık elde edildiği görülmüştür.

Bu değerlere göre;

$$E_p(\text{mV}) = 604,6 - 39,19 \text{ pH} \quad r = 0,979 \quad (\text{pH: } 2,75\text{-}7,00 \text{ arası})$$

denklemleri elde edilmiştir.

Bütün bu sonuçlara göre karbidopa'nın miktar tayini için en uygun ortam asidik pH'lar görünmesine rağmen analiz için karbidopa ve levodopa eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yönteme uygun ortam olarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu seçilmiştir. Elde edilen pikin düzgün, keskin, tek oluşu, tekrarlanabilirliğin sağlanması ve levodopa ile hafif ayrılarak pik oluşturması da göz önüne alınarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu analitik çalışmalar için ortam olarak seçilmiştir.

$5 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa'nın pH 5.0 Britton-Robinson tamponu içerisinde farklı tarama hızlarındaki eğrileri $5\text{-}200 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında kaydedilmiştir. Hız deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman $5\text{-}200 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında hızın karekökü ile akımın doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Bu deneylerden elde edilen veriler izelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. $5 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa pH 5.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde 5-200 mVs^{-1} tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p) değerleri.

Tarama hızı (mVs^{-1})	$v^{1/2}$	i_p (μA)	$\log v$	$\log i_p$
5	2,236	0,841	0,699	-0,08
10	3,162	1,117	1	0,048
25	5	1,705	1,398	0,232
50	7,071	2,467	1,699	0,3921
75	8,660	3,429	1,875	0,532
100	10	3,823	2	0,582
150	12,25	4,625	2,18	0,665
200	14,14	5,647	2,30	0,7517

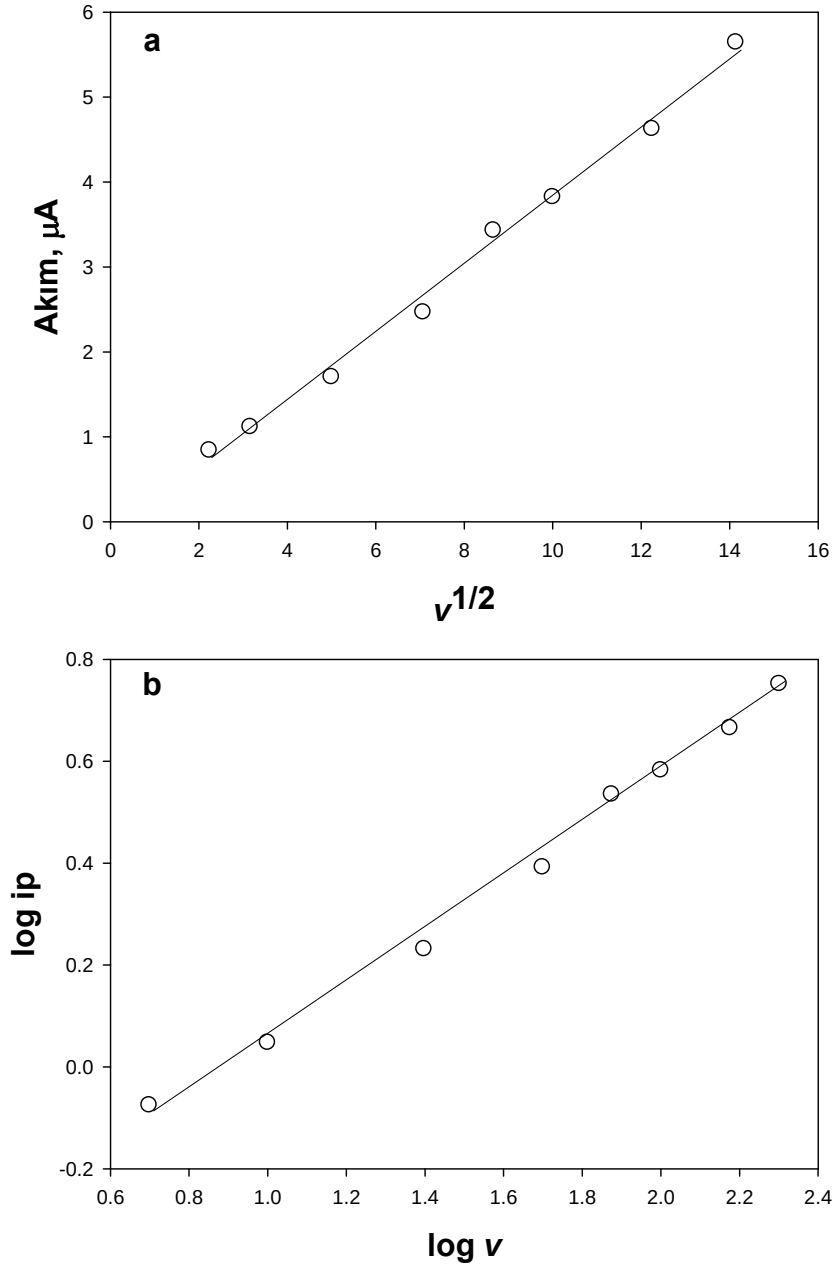
Hızın karekökünün akım ile doğrusal olarak değiştiği 5 – 200 mVs^{-1} tarama hızlarında gerekli hesaplamalar yapıldığı zaman doğru denklemi;

$$i_p (\mu\text{A}) = 0,4031 v^{1/2} (\text{mVs}^{-1}) - 0,1932 \quad (r = 0,9971 ; n = 8)$$

olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 3.7a). Aynı hız aralığındaki $\log v - \log i$ grafiği (Şekil 3.7b) ve elde edilen denklem incelenince bulunan eğim değerinin 0,52 olması reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğu bir sistemi göstermektedir (Laviron, E., ve ark. 1980 ; Greef, R. ve ark. 1990). (Saf difüzyon kontrollü olduğu zaman ve çözeltinin bu madde için ideal olduğu durumlarda eğim 0,5, saf adsorbsiyon kontrollü olduğu zaman ve kullanılan elektrodun o olay için ideal olduğu durumlarda 1 olur) (Laviron, E., 1980) Elde edilen doğru denklemi;

$$\text{Log } i_p (\mu\text{A}) = 0,52 \log v (\text{mVs}^{-1}) - 0,468 \quad (r = 0,9972 ; n = 8)$$



Şekil 3.7. $5 \times 10^{-5} M$ karbidopa pH 5.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde $5-200 mVs^{-1}$ tarama hızları arasında elde edilen DV'lara ait a) $v^{1/2} - i_p$ ve b) $\log v - \log i$ grafikleri

3.2.2. Benserazid Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar

Benserazid'in voltametrik incelenmesi, camı karbon disk elektrot ile değişik pH ve tamponlar içerisinde, dönüşümlü voltametri (DV), doğrusal taramalı voltametri (DTV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (KDV), teknikleri kullanılarak kapsamlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerden elde edilen DV eğrilerinin akım büyüklükleri belirli pH değerlerinin üzerinde okunamadığı için ilgili çizelgelarda ve E_p -pH, i_p -pH grafiklerinde verilen akım değerleri DPV yöntemi ile elde edilen verilerden oluşturulmuştur.

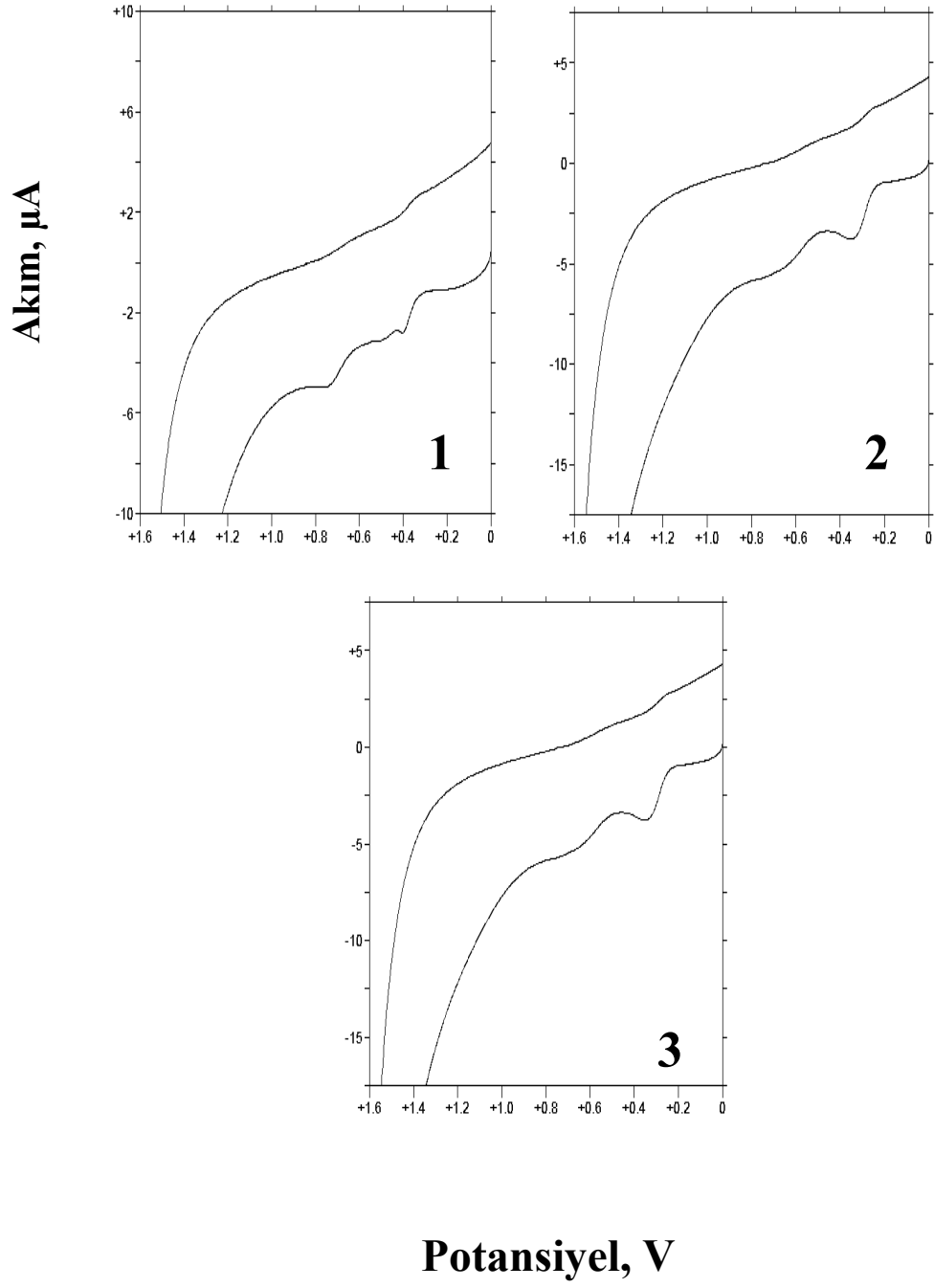
3.2.2.1. Benserazid'in Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DTV) Çalışmaları

DV tekniği kullanılarak benserazid'in camı karbon disk elektrot ile pH 2,00 – 12,00 Britton – Robinson (BR) tamponları, pH 1,60-8,00 arasındaki fosfat tamponları, pH 3,65-5,70 arasındaki asetat tamponları içeren destek elektroliti içerisinde pH, hız taraması ve mekanizma çalışmalarına yönelik incelemeler yapılmıştır.

3.2.2.1.1. Benserazid'in Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

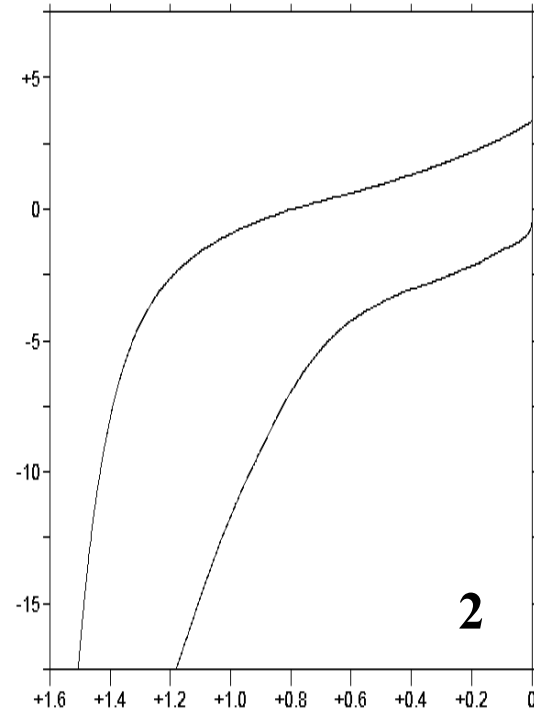
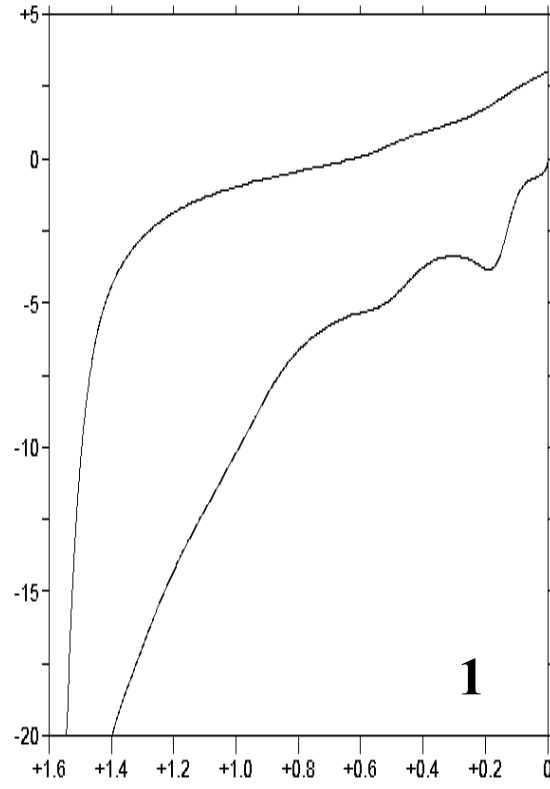
Benserazid'in fosfat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 1,60; 2,75; 3,19; 6,80; 8,00 fosfat tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, distile su içinde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektroliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Benserazid'in 1×10^{-4} M derişimi ile pH 1,60-8,00 fosfat tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.8a ve 3.8b' de görölmektedir. pH 1,60'da pik 404,4 mV'da ve 739,2 mV'da iki adet anodik pik gözlenirken pH 3,19'a getirildiğinde 739,2 mV'da görülen pikin küçüldüğü saptanmıştır. pH değerleri bazik nötr ve hafif bazik değerlere getirildiğinde, pikin daha az pozitif değerlere kaydığı ve şiddetinin azaldığı görölmüştür.



Şekil 3.8a. 1×10^{-4} M benserazid'in pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,19

Akım, μA



Potansiyel, V

Şekil 3.8b. 1×10^{-4} M benserazid'in pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 6,80; 2) pH 8,00

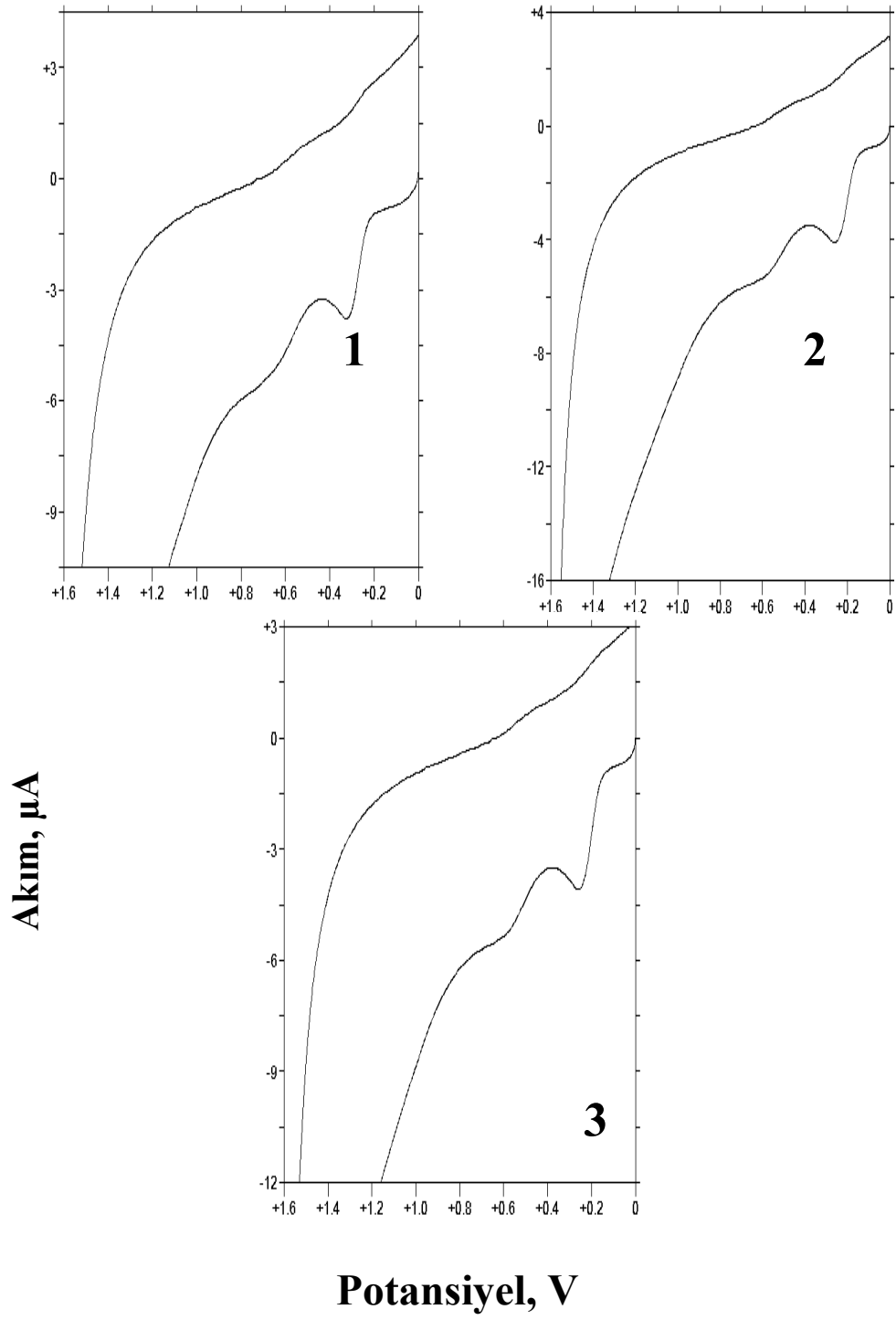
Çizelge 3.5. Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M benserazid'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
1,60	356	2,5940
2,75	300	2,7430
3,19	272	2,2540
6,80	56	1,2450
8,00	Pik gözlenmedi	Pik gözlenmedi

3.2.2.1.2. Benserazid'in Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

Benserazid'in asetate tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 3,65; 4,64; 5,70 asetate tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, distile su içinde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerdendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektoliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Benserazid'in 1×10^{-4} M derişimi ile pH 3,65-5,70 asetate tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.9'de görölmektedir. pH 3,65'da pik 325,5 mV'da bir anodik pik gözlenmiştir. pH değerdeleri arttıkça, pikin daha az pozitif değerdelere kaydığı ve şiddetinin azaldığı görölmüştür.



Şekil 3.9. 1×10^{-4} M benseraid'in pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 3,65; 2) pH 4,64; 3) pH 5,70

3.6. Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M benserazid'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

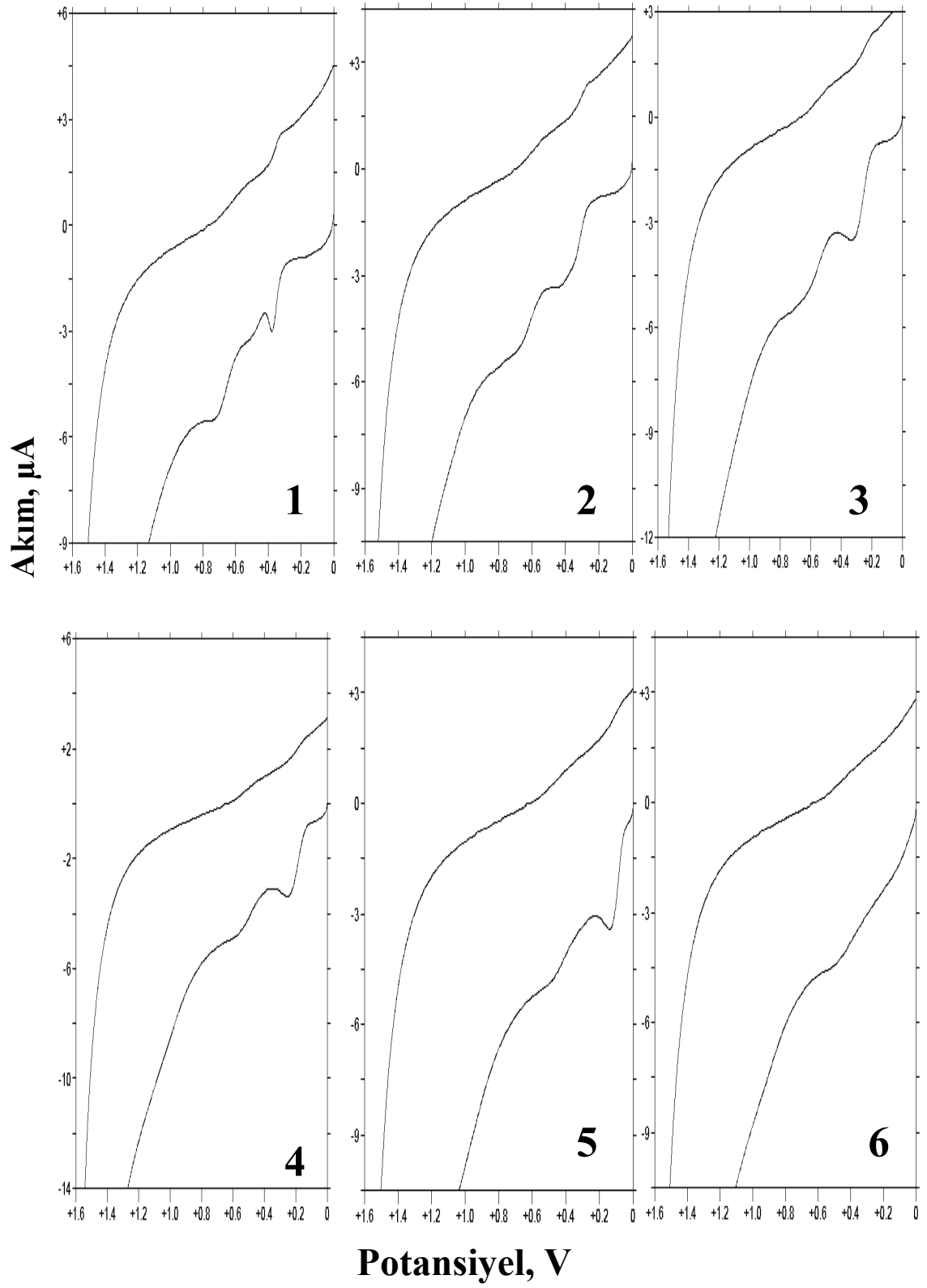
pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
3,65	252	2,8400
4,64	180	1,9880
5,70	104	1,8440

3.2.2.1.3. Benserazid'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

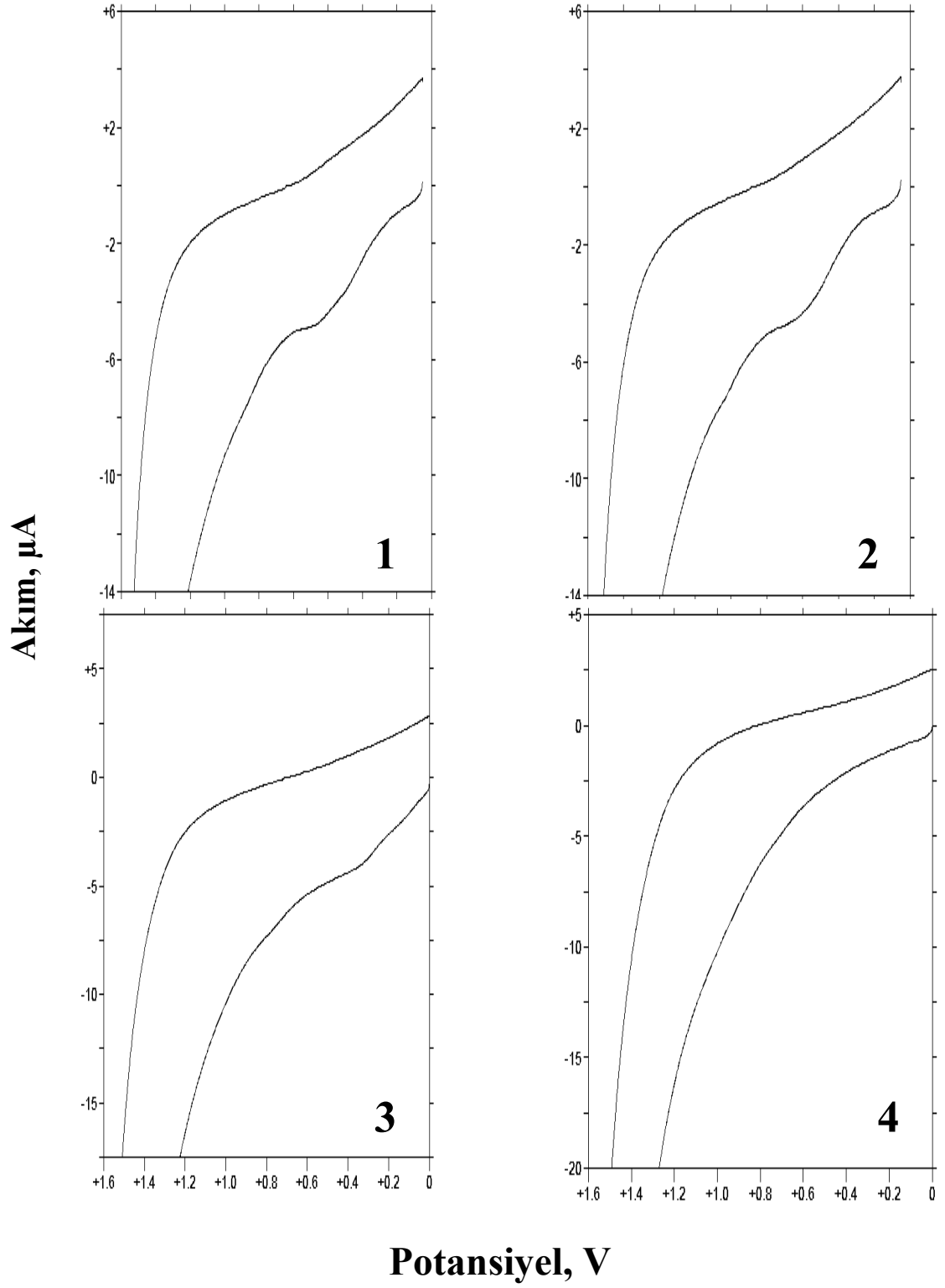
Benserazid'in BR tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00; 10,00; 11,00; 12,00 BR tamponları çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, distile su içinde hazırlanmış benserazid çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektolitinin cinsinin ve pH'nın reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Benserazid'in 1×10^{-4} M derişimi ile pH 2,00-12,00 BR tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.10a ve 3.10b'de görülmektedir.

pH 2.00'de 336 mV'da ve 734 mV'da iki adet pik gözlenirken pH arttıkça bu piklerin daha az pozitif potansiyellere kaydığı ve pH 8,00 değeriine geçilindiğinde birinci pikin ortadan kaybolduğu ikinci pikin ise şiddetini azaltarak daha pozitif potansiyellere kaydığı saptanmıştır.



Şekil 3.10a. 1×10^{-4} M benzerazid'in pH 2.00 - 7.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 2,00 ; 2) pH 3,00; 3) pH 4,00; 4) pH 5,00; 5) pH 6,00; 6) pH 7,00

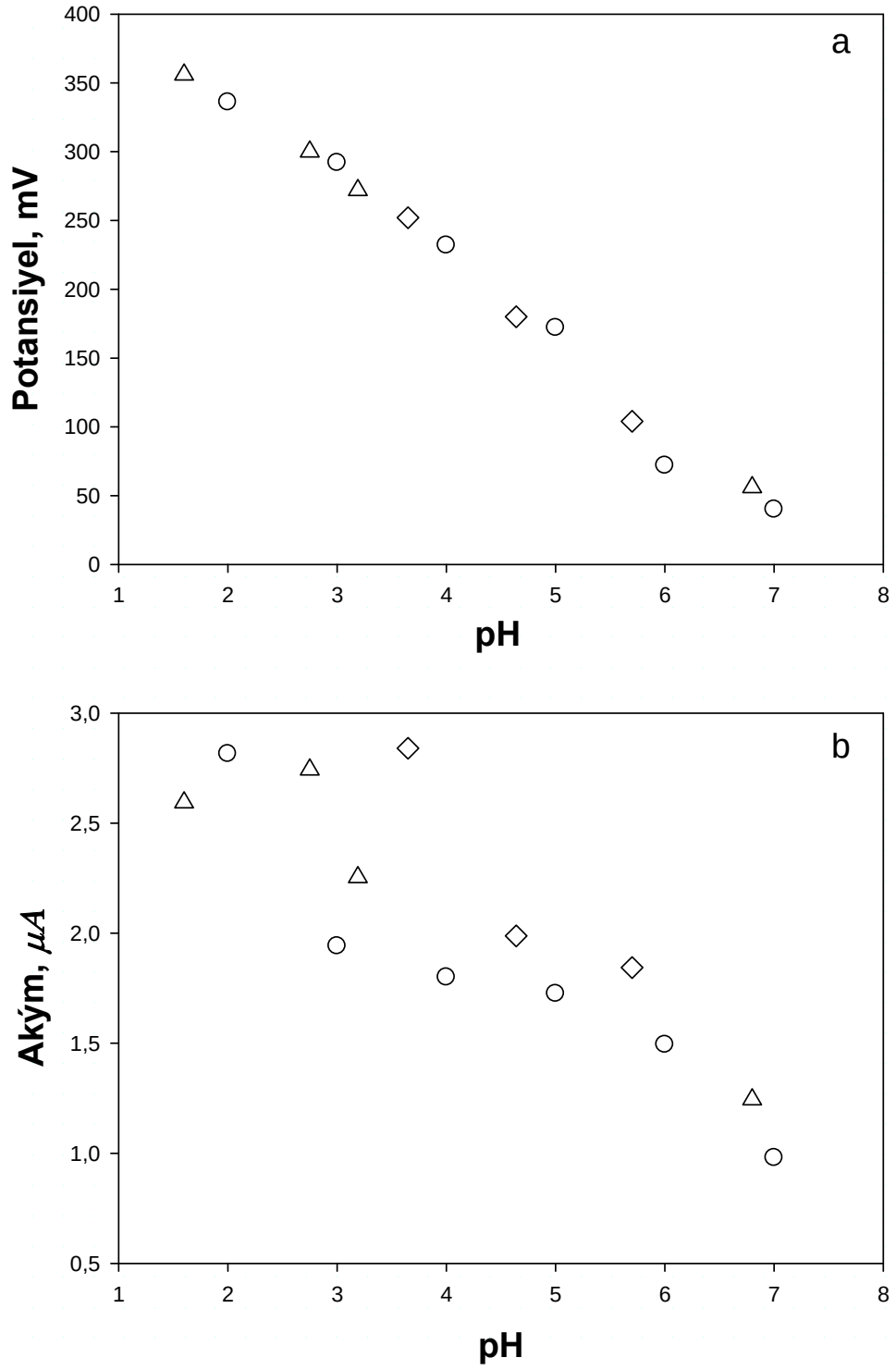


Şekil 3.10b. 1×10^{-4} M benserazid'in pH 8.00 - 11.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00 ; 2) pH 9,00; 3) pH 10,00; 4) pH 11,00

Çizelge 3.7. BR tamponu çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M benserazid'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
2,00	336	2,8150
3,00	292	1,9420
4,00	232	1,8000
5,00	172	1,7250
6,00	72	1,4940
7,00	40	0,9800
8,00	1. Pik gözlenemedi	1. Pik gözlenemedi
9,00	1. Pik gözlenemedi	1. Pik gözlenemedi
10,00	1. Pik gözlenemedi	1. Pik gözlenemedi
11,00	1. Pik gözlenemedi	1. Pik gözlenemedi

Bütün pH'larda ve değişik destek elektrolitleri içerisinde elde edilen verileri bir arada görebilmek için de ayrı bir grafik çizilmiştir. DPV ve KDV teknikleri ile birbirlerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. DPV tekniği ile çizilen I_p -pH ve E_p -pH grafikleri bu tez kapsamında verilmiş ve değerlendirilmiştir. pH'ın ve destek elektroliti cinsinin pik potansiyeli ve pik akımına etkisini daha rahat görebilmek için bütün pH'ları ve ortamları bir arada gösteren ve DPV tekniği ile elde edilen (Pik akımı - pH) I_p -pH, (Pik potansiyeli - pH) E_p -pH eğrileri Şekil 3.11 a ve b' de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. 1×10^{-4} M benzerazid'in bütün pH değerlerinde elde edilen (a) Ep – pH eğrileri ve (b) İp – pH eğrileri. (Δ) Fosfat; ($\circ$) BRT ; ($\diamond$) Asetat

Diferansiyel puls voltametri tekniğiyle bütün destek elektrolitlerinde ve pH 1,60-7,00 aralığında elde edilen eğrilerden potansiyel ile pH arasında bir doğrusallık elde edildiği görülmüştür.

Bu değerlere göre;

$$E_p(\text{mV}) = -61,505 + 466,7 \text{ pH} \quad r = 0,9945 \quad (\text{pH: } 1,60-7,00 \text{ arası})$$

denklemini elde edilmiştir.

Bütün bu sonuçlara göre benserazid'in miktar tayini için en uygun ortam asidik pH'lar görünmesine rağmen analiz için benserazid ve levodopa eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yönteme uygun ortam olarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu seçilmiştir. Elde edilen pikin düzgün, keskin, tek oluşu, tekrarlanabilirliğin sağlanması ve levodopa ile hafif ayrılarak pik oluşturmaları da göz önüne alınarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu analitik çalışmalar için ortam olarak seçilmiştir.

$1 \times 10^{-4} \text{ M}$ benserazid'in pH 5.0 Britton-Robinson tamponu içerisinde farklı tarama hızlarındaki eğrileri $5-200 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında kaydedilmiştir. Hız deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında zaman $5-200 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında hızın karekökü ile akımın doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Bu deneylerden elde edilen veriler Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. $1 \times 10^{-4} \text{M}$ benserazid pH 5.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde 5-200 mVs^{-1} tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p) değerleri.

Tarama hızı (mVs^{-1})	$v^{1/2}$	i_p (μA)	$\log v$	$\log i_p$
5	2,236	0,74	0,699	-0,13
10	3,162	0,95	1	-0,02
25	5	1,38	1,398	0,14
50	7,071	2,12	1,699	0,33
75	8,660	2,95	1,875	0,47
100	10	3,25	2	0,51
150	12,25	3,98	2,18	0,60
200	14,14	4,91	2,30	0,69

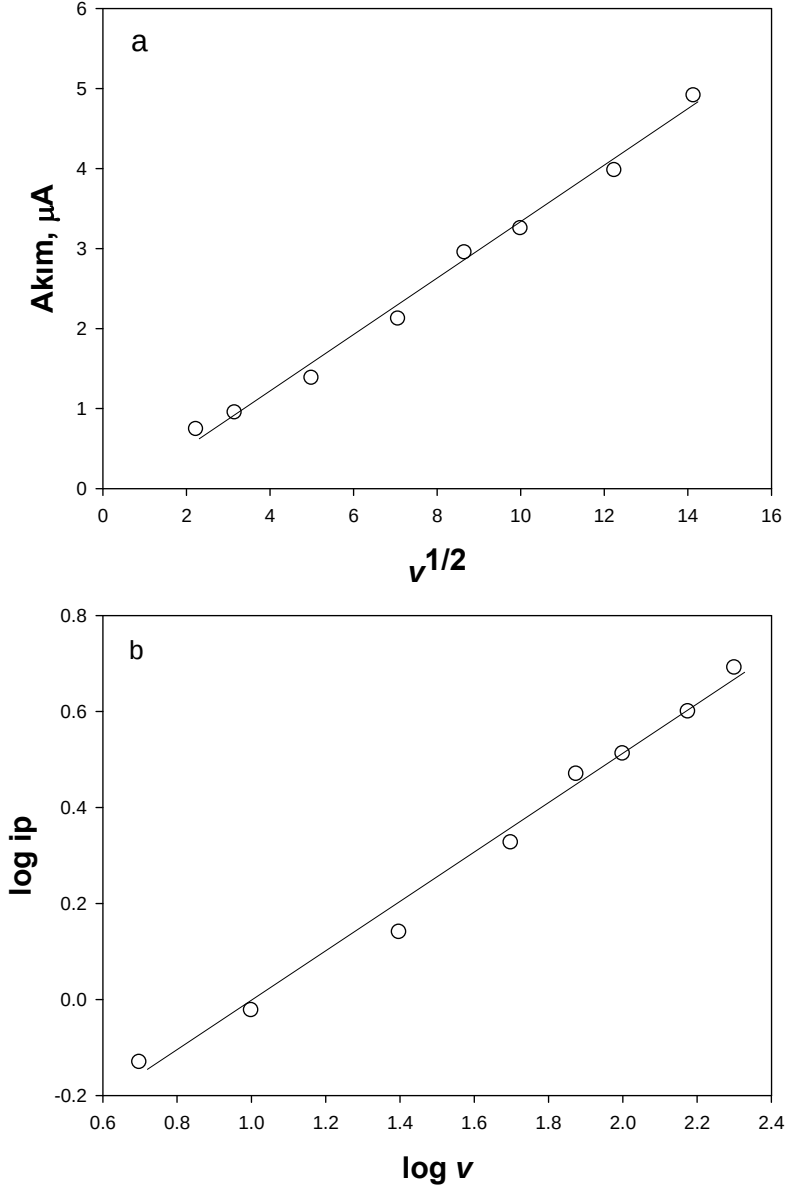
Hızın karekökünün akım ile doğrusal olarak değiştiği 5 – 200 mVs^{-1} tarama hızlarında gerekli hesaplamalar yapıldığı zaman doğru denklemi;

$$i_p (\mu\text{A}) = 0,3504v^{1/2} (\text{mVs}^{-1}) - 0,203 \quad (r = 0,9957 ; n = 8)$$

olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 3.12a). Aynı hız aralığındaki $\log v - \log i$ grafiği (Şekil 3.12b) ve elde edilen denklem incelenince bulunan eğim değerinin 0,52 olması reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğu bir sistemi göstermektedir (Laviron, E., ve ark. 1980 ; Greef, R. ve ark. 1990). (Saf difüzyon kontrollü olduğu zaman ve çözeltinin bu madde için ideal olduğu durumlarda eğim 0,5, saf adsorbsiyon kontrollü olduğu zaman ve kullanılan elektrodun o olay için ideal olduğu durumlarda 1 olur) (Laviron, E., 1980) Elde edilen doğru denklemi;

$$\text{Log } i_p (\mu\text{A}) = 0,52 \log v (\text{mVs}^{-1}) - 0,5373 \quad (r = 0,9947 ; n = 8)$$



Şekil 3.12. $1 \times 10^{-4} M$ benserazid pH 5.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde 5-200 mVs^{-1} tarama hızları arasında elde edilen DV'lara ait a) $v^{1/2} - i_p$ ve b) $\log v - \log i$ grafikleri

3.2.3. Levodopa Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar

Levodopa'nın voltametrik incelenmesi, camı karbon disk elektrot ile değişik pH ve tamponlar içerisinde, dönüşümlü voltametri (DV), doğrusal taramalı voltametri (DTV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (KDV), teknikleri kullanılarak kapsamlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerden elde edilen DV eğrilerinin akım büyüklükleri belirli pH değerlerinin üzerinde okunamadığı için ilgili çizelgelarda ve E_p -pH, i_p -pH grafiklerinde verilen akım değerleri DPV yöntemi ile elde edilen verilerden oluşturulmuştur.

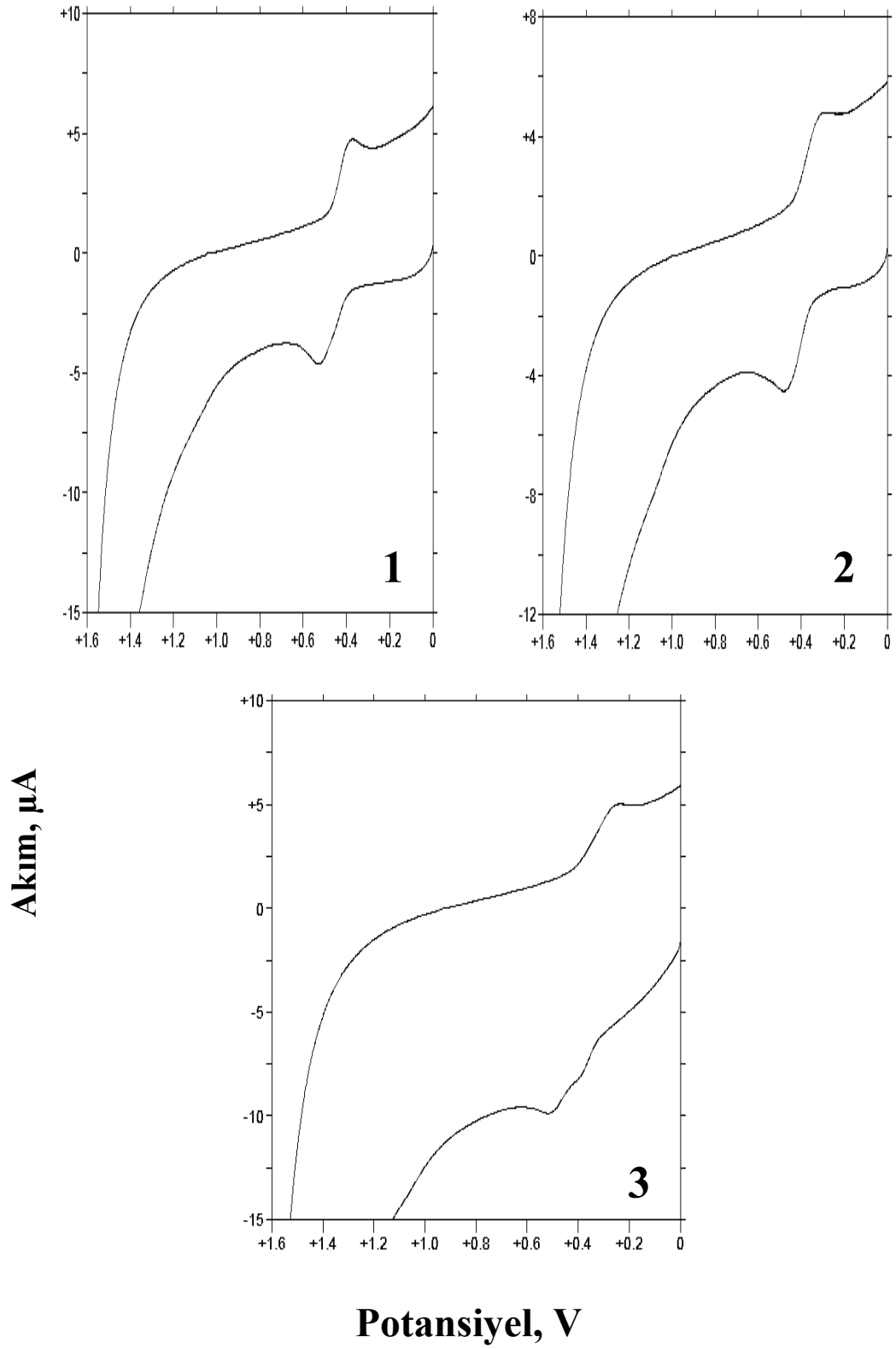
3.2.3.1. Levodopa'nın Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DTV) Çalışmaları

DV tekniği kullanılarak levodopa'nın camı karbon disk elektrot ile pH 2,00 – 12,00 Britton – Robinson (BR) tamponları, pH 1,60-8,00 arasındaki fosfat tamponları, pH 3,65-5,70 arasındaki asetat tamponları içeren destek elektroliti içerisinde pH, hız taraması ve ikili etken maddenin aynı anda analiz çalışmalarına yönelik incelemeler yapılmıştır.

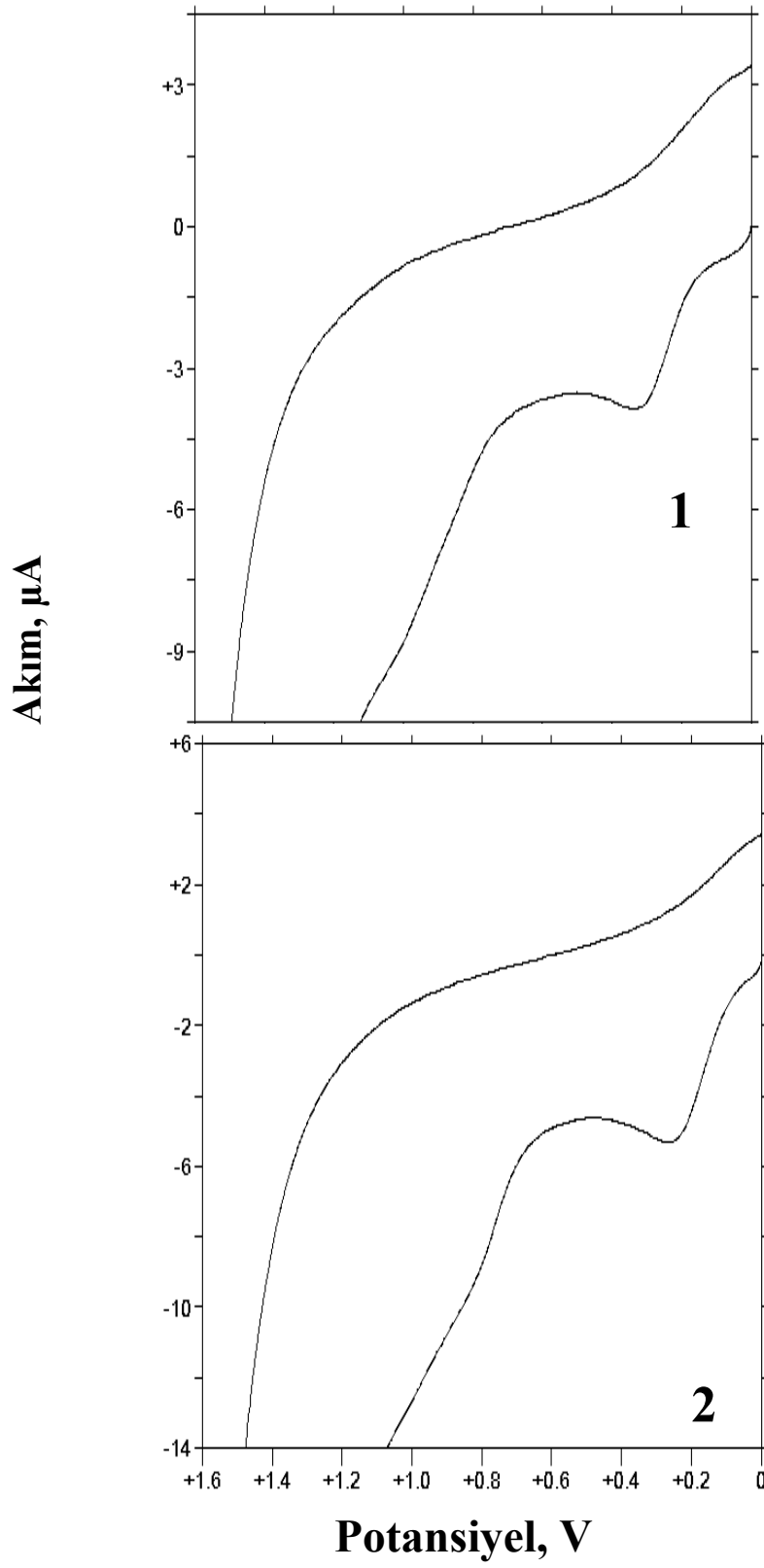
3.2.3.1.1. Levodopa'nın Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

Levodopa'nın fosfat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 1,60; 2,75; 3,19; 6,80; 8,00 fosfat tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, distile su içinde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektoliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Levodopa'ının 1×10^{-4} M derişimi ile pH 1,60-8,00 fosfat tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.13a ve 3.13b' de görölmektedir. pH 1,60'da pik 520,4 mV'da bir adet anodik pik gözlenmektedir. Tarama yönü tersine çevrildiğinde 380 mV değerinde bir adet dönüş piki saptanmıştır. pH 3,19'a getirildiğinde pikin yayıldığı ve şiddetinin azaldığı saptanmıştır. pH değerleri bazik nötr ve hafif bazik değerlere getirildiğinde, pikin daha az pozitif değerlere kaydığı ve şiddetinin azaldığı görölmüştür.



Şekil 3.13a. 1×10^{-4} M levodopa'nın pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,19



Şekil 3.13b. 1×10^{-4} M levodopa'nın pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH6,80; 2) pH 8,00

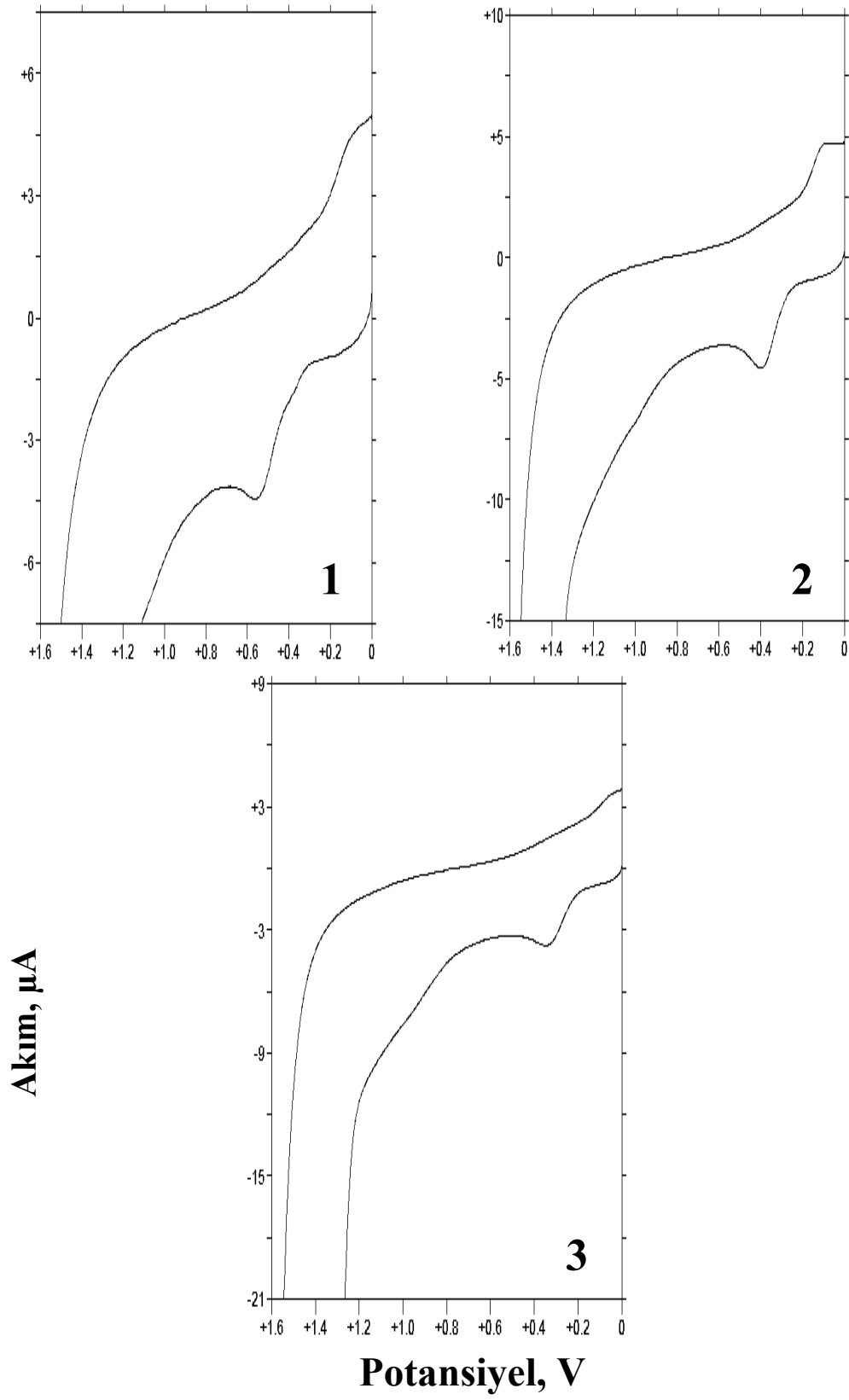
Çizelge 3.9. Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M levodopa'nın değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
1,60	424	1,7820
2,75	388	3,4560
3,19	368	3,6900
6,80	280	1,4340
8,00	144	1,6640

3.2.3.1.2. Levodopa'nın Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

Levodopa'nın asetate tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 3,65; 4,64; 5,70 asetate tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, distile su içinde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerdendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektroliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Levodopa'nın 1×10^{-4} M derişimi ile pH 3,65-5,70 asetat tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.14'da görölmektedir. pH 3,65'da pik 558 mV'da bir anodik pik gözlenmiştir. Tarama yönü tersine çevrildiğinde 40 mV civarında bir geri dönüş piki saptanmıştır. pH değerleri arttıkça, pikin daha az pozitif değerlere kaydığı şiddetinin ise hemen hemen aynı düzeyde kaldığı görölmüştür.



Şekil 3.14. 1×10^{-4} M levodopa'nın pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 3,65; 2) pH 4,64; 3) pH 5,70

Çizelge 3.10. Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M levodopa'nın değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

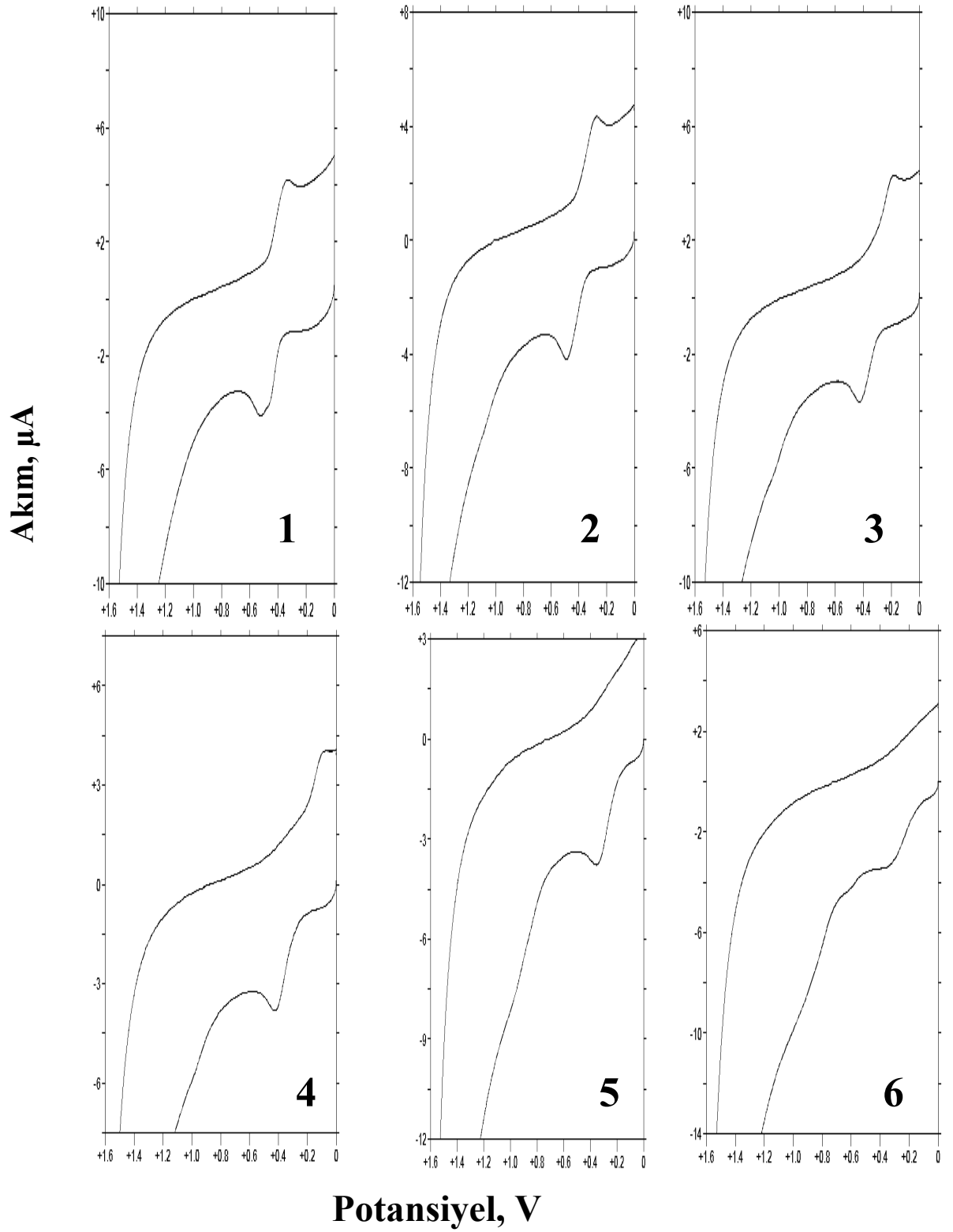
pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
3,65	380	1,8380
4,64	312	1,5970
5,70	260	1,1970

3.2.3.1.3. Levodopa'nın BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

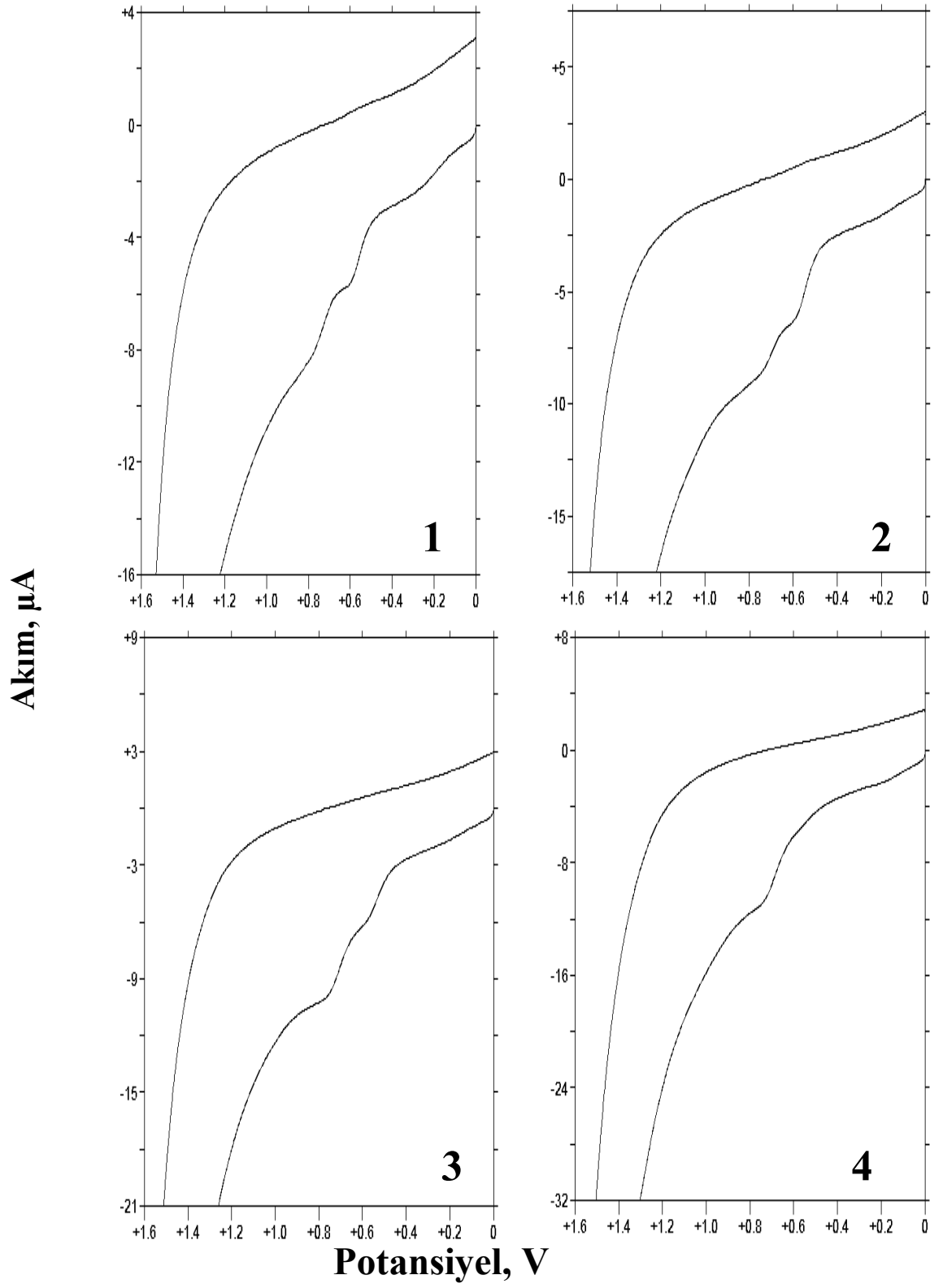
Levodopa'nın BR tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00; 10,00; 11,00; 12,00 BR tamponları çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, distile su içinde hazırlanmış levodopa çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerdendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektolitinin cinsinin ve pH'nın reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Levodopa'nın 1×10^{-4} M derişimi ile pH 2,00-12,00 BR tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.15a ve 3.15b'de görölmektedir.

pH 2.00'de 514 mV'da bir adet pik gözlenirken pH arttıkça bu piklerin daha az pozitif potansiyellere kaydığı ve pH 8,00 değeriine gelindiğinde pik yarılmaları göröldüğü saptanmıştır.



Şekil 3.15a. 1×10^{-4} M levodopa'nın pH 2.00 - 7.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 2,00 ; 2) pH 3,00; 3) pH 4,00; 4) pH 5,00; 5) pH 6,00; 6) pH 7,00

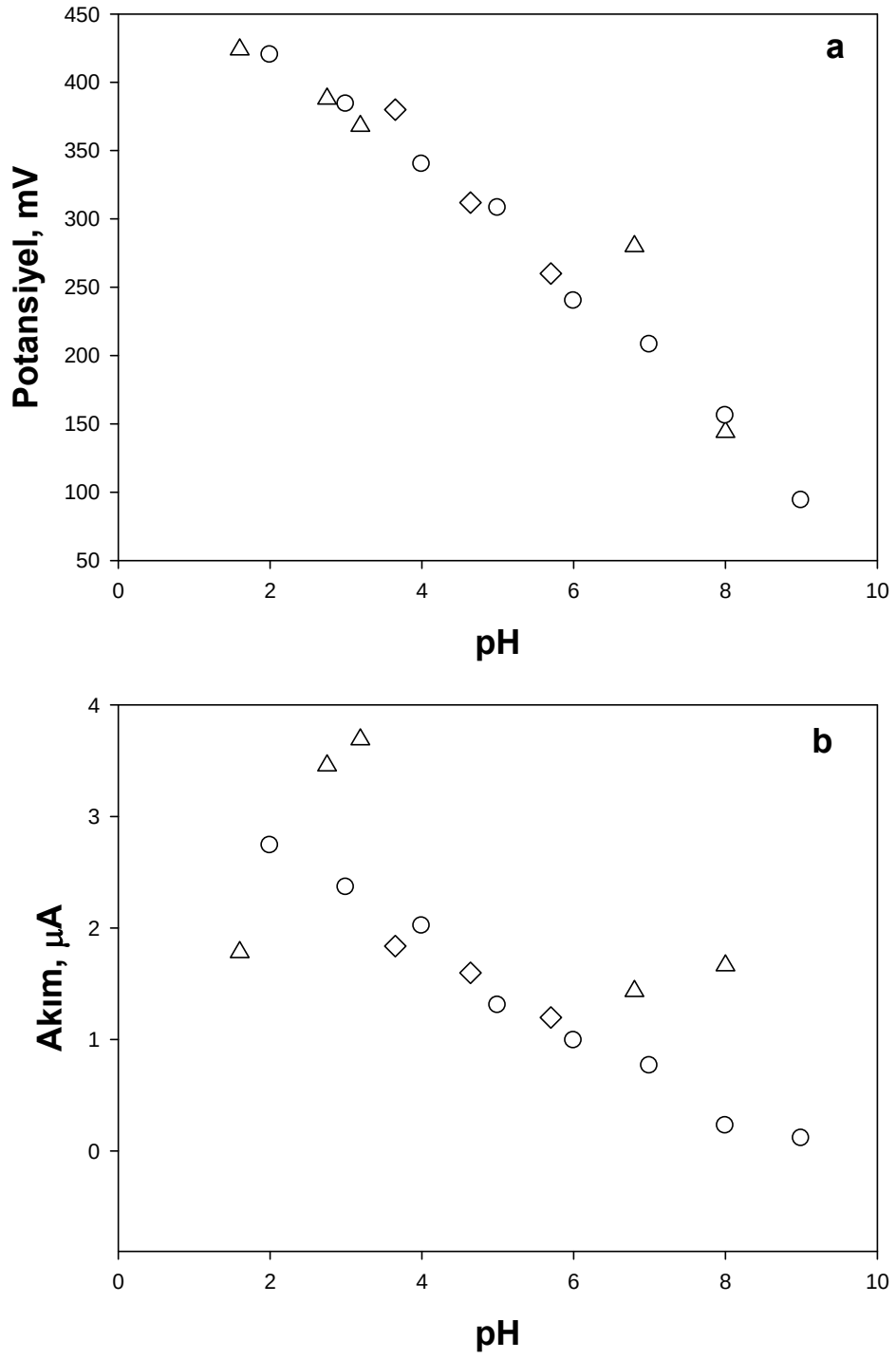


Şekil 3.15b. 1×10^{-4} M levodopa'nın pH 8.00 - 11.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00 ; 2) pH 9,00; 3) pH 10,00; 4) pH 11,00

Çizelge 3.11. BR tamponu çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M levodopa'nın değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
2,00	420	2,7590
3,00	384	2,3640
4,00	340	2,0180
5,00	308	1,3070
6,00	240	0,9894
7,00	208	0,7642
8,00	156	0,2270
9,00	94	0,1134
10,00	Pik yarıldı	Pik yarıldı
11,00	Pik yarıldı	Pik yarıldı

Bütün pH'larda ve değişik destek elektrolitleri içerisinde elde edilen verileri bir arada görebilmek için de ayrı bir grafik çizilmiştir. DPV ve KDV teknikleri ile birbirlerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. DPV tekniği ile çizilen İp-pH ve Ep-pH grafikleri bu tez kapsamında verilmiş ve değerlendirilmiştir. pH'ın ve destek elektroliti cinsinin pik potansiyeli ve pik akımına etkisini daha rahat görebilmek için bütün pH'ları ve ortamları bir arada gösteren ve DPV tekniği ile elde edilen (Pik akımı - pH) İp-pH, (Pik potansiyeli - pH) Ep-pH eğrileri Şekil 3.16 a ve b' de gösterilmiştir.



Şekil 3.16. 1×10^{-4} M levodopa'nın bütün pH değerlerinde elde edilen (a) Ep – pH eğrileri ve (b) İp – pH eğrileri. (Δ) Fosfat; ($\circ$) BRT ; ($\diamond$) Asetat

Diferansiyel puls voltametri tekniğiyle bütün destek elektrolitlerinde ve pH 2,00-9,00 aralığında elde edilen eğrilerden potansiyel ile pH arasında bir doğrusallık elde edildiği görülmüştür.

Bu değerlere göre;

$$E_p(\text{mV}) = -46,987 + 526,91 \text{ pH} \quad r = 0,9939 \quad (\text{pH: } 2,00-9,00 \text{ arası})$$

denklemini elde edilmiştir.

Bütün bu sonuçlara göre levodopa'nın miktar tayini için en uygun ortam asidik pH'lar görünmesine rağmen analiz için karbidopa - levodopa ve benserazid-levodopa eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yöntemle uygun ortam olarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu seçilmiştir. Elde edilen pikin düzgün, keskin, tek oluşu, tekrarlanabilirliğin sağlanması ve karbidopa ve benserazid ile hafif ayrılarak pik oluşturmaları da göz önüne alınarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu analitik çalışmalar için ortam olarak seçilmiştir.

$1 \times 10^{-4} \text{ M}$ levodopa'nın pH 5.0 Britton-Robinson tamponu içerisinde farklı tarama hızlarındaki eğrileri $5-200 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında kaydedilmiştir. Hız deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında $5-200 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında hızın karekökü ile akımın doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Bu deneylerden elde edilen veriler Çizelge 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. $1 \times 10^{-4} \text{M}$ levodopa pH 5.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde 5-200 mVs^{-1} tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p) değerleri.

Tarama hızı (mVs^{-1})	$v^{1/2}$	i_p (μA)	$\log v$	$\log i_p$
5	2,236	0,5411	0,699	-0,27
10	3,162	0,7546	1	-0,12
25	5	1,144	1,398	0,059
50	7,071	1,558	1,699	0,19
75	8,660	1,803	1,875	0,256
100	10	2,020	2	0,305
150	12,2475	2,37	2,176	0,375
200	14,1421	2,532	2,301	0,403

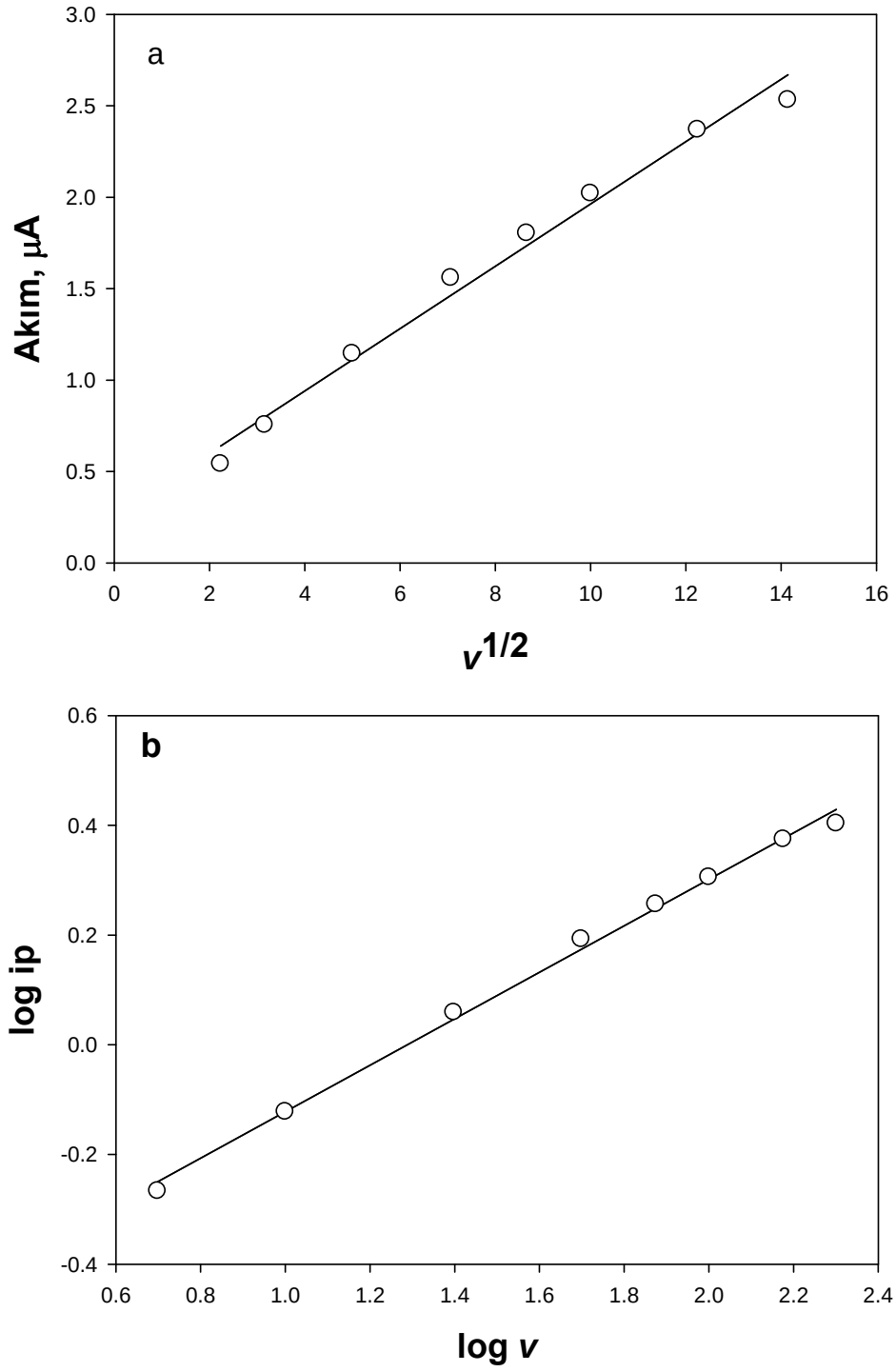
Hızın karekökünün akım ile doğrusal olarak değiştiği 5 – 200 mVs^{-1} tarama hızlarında gerekli hesaplamalar yapıldığı zaman doğru denklemi;

$$i_p (\mu\text{A}) = 0,1705v^{1/2} (\text{mVs}^{-1}) + 0,2581 (r = 0,9934 ; n = 8)$$

olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 3.17a). Aynı hız aralığındaki $\log v - \log i$ grafiği (Şekil 3.17b) ve elde edilen denklem incelenince bulunan eğim değerinin 0,42 olması reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğu bir sistemi göstermektedir (Laviron, E., ve ark. 1980 ; Greef, R. ve ark. 1990). (Saf difüzyon kontrollü olduğu zaman ve çözeltinin bu madde için ideal olduğu durumlarda eğim 0,5, saf adsorbsiyon kontrollü olduğu zaman ve kullanılan elektrodun o olay için ideal olduğu durumlarda 1 olur) (Laviron, E., 1980) Elde edilen doğru denklemi;

$$\text{Log } i_p (\mu\text{A}) = 0,42 \log v (\text{mVs}^{-1}) - 0,5458 (r = 0,9981 ; n = 8)$$



Şekil 3.17. $1 \times 10^{-5} \text{M}$ levodopa pH 5.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde 5-200 mVs^{-1} tarama hızları arasında elde edilen DV'lara ait a) $v^{1/2} - i_p$ ve b) $\log v - \log i$ grafikleri

3.2.4. Hidroklorotiazid Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar

Hidroklorotiazid'in voltametrik incelenmesi, camı karbon disk elektrot ile değişik pH ve tamponlar içerisinde, dönüşümlü voltametri (DV), doğrusal taramalı voltametri (DTV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (KDV), teknikleri kullanılarak kapsamlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerden elde edilen DV eğrilerinin akım büyüklükleri belirli pH değerlerinin üzerinde okunamadığı için ilgili çizelgelarda ve E_p -pH, i_p -pH grafiklerinde verilen akım değerleri DPV yöntemi ile elde edilen verilerden oluşturulmuştur.

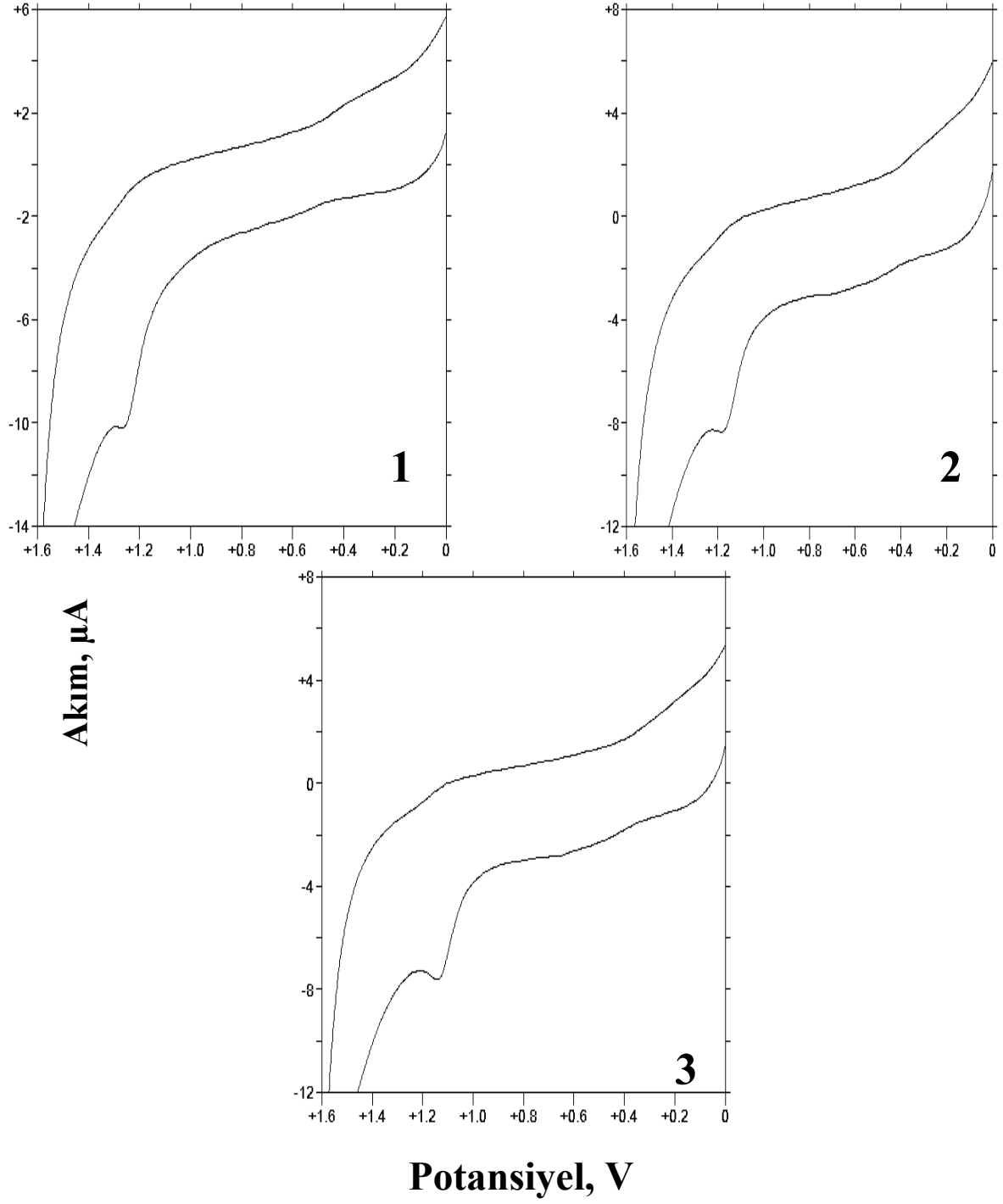
3.2.4.1. Hidroklorotiazid'in Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DTV) Çalışmaları

DV tekniği kullanılarak hidroklorotiazid'in camı karbon disk elektrot ile pH 2,00 – 12,00 Britton-Robinson (BR) tamponları, pH 1,60-8,00 arasındaki fosfat tamponları, pH 3,65-5,70 arasındaki asetat tamponları içeren destek elektroliti içerisinde pH, hız taraması ve mekanizma çalışmalarına yönelik incelemeler yapılmıştır. Bütün çalışmalarda deney çözeltilerinde metanol oranı %20 olacak şekilde sabit tutulmuştur.

3.2.4.1.1. Hidroklorotiazid'in Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

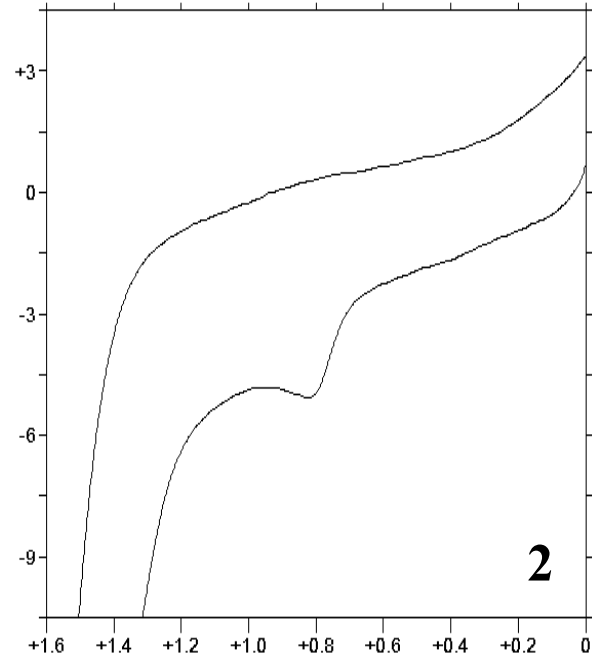
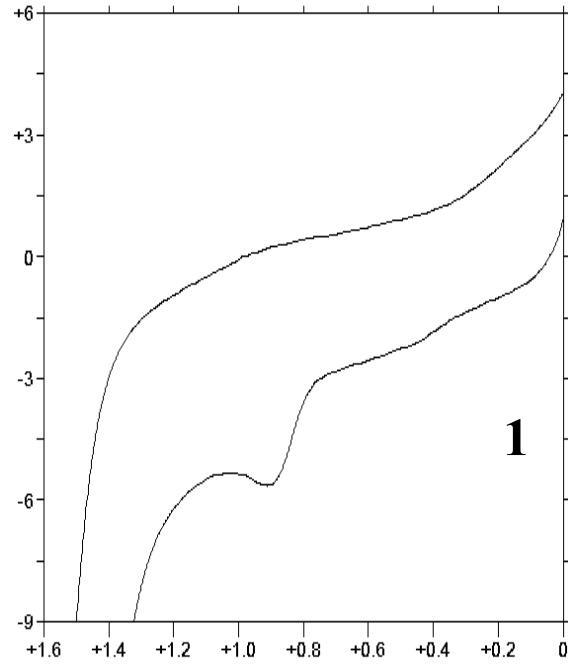
Hidroklorotiazid'in fosfat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 1,60; 2,75; 3,19; 6,80; 8,00 fosfat tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, metanol içinde çözüldükten sonra metanol oranı % 20 olacak şekilde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektoliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Hidroklorotiazid'in 1×10^{-4} M derişimi ile pH 1,60-8,00 fosfat tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.18a ve 3.18b' de görölmektedir. pH 1,60'da pik 1262,4 mV'da bir adet anodik pik gözlenmektedir. pH değeri arttırıldıkça pikin şiddetinde değışiklik olmamıştır ancak daha az pozitif bölgelere kaymıştır. pH değeri nötr ve hafif bazik değeriye getirildiğinde, pikin daha az pozitif değeriye kaymaya devam ettiğı ve şiddetinin azaldığı görölmüştür.



Şekil 3.18a. 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,19

Akım, μA



Potansiyel, V

Şekil 3.18b. 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 6,80; 2) pH 8,00

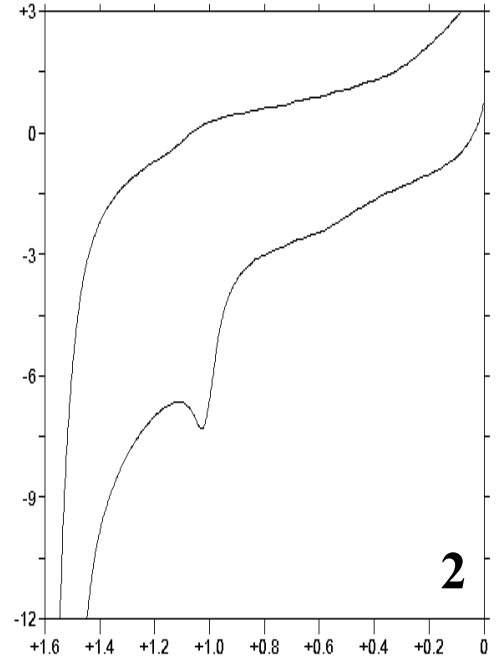
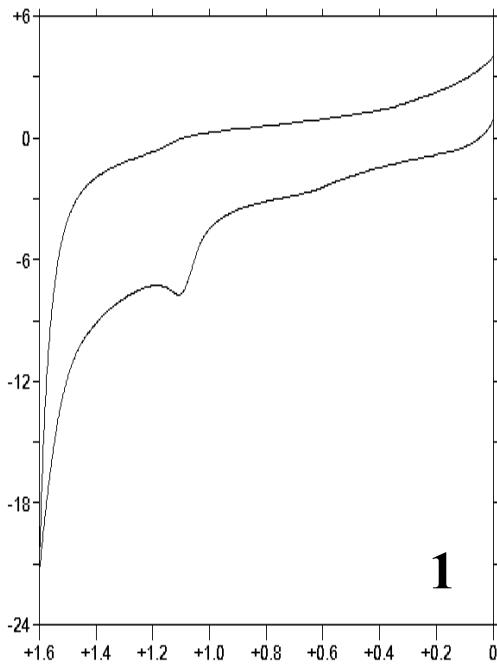
Çizelge 3.13. Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
1,60	1208	2,3160
2,75	1116	2,1550
3,19	1088	2,2100
6,80	836	1,5900
8,00	732	1,5910

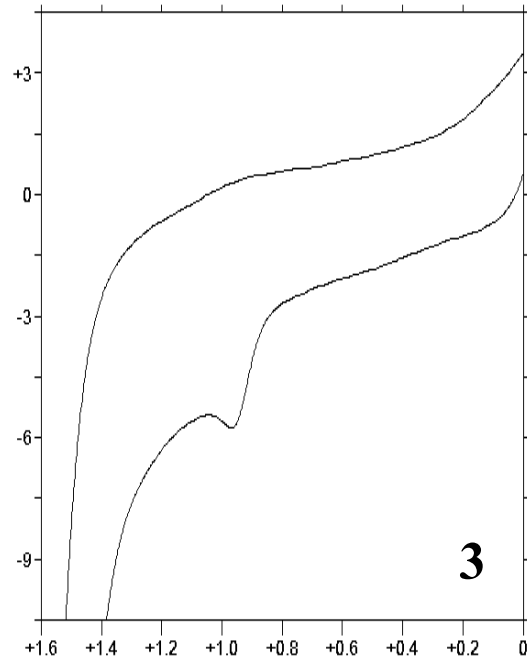
3.2.4.1.2. Hidroklorotiazid'in Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

Hidroklorotiazid'in asetat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 3,65; 4,64; 5,70 asetat tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, metanol içinde çözüldükten sonra metanol oranı % 20 olacak şekilde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektoliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Hidroklorotiazid'in 1×10^{-4} M derişimi ile pH 3,65-5,70 asetat

tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.19’da görülmektedir. pH 3,65’da pik 1107 mV’da bir anodik pik gözlenmiştir. pH değerleri arttıkça, pikin daha az pozitif değerlere kaydığı şiddetinin ise hemen hemen aynı düzeyde kaldığı görülmüştür.



Akım, μA



Potansiyel, V

Şekil 3.19. 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 3,65; 2) pH 4,64; 3) pH 5,70

Çizelge 3.14. Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'nın değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

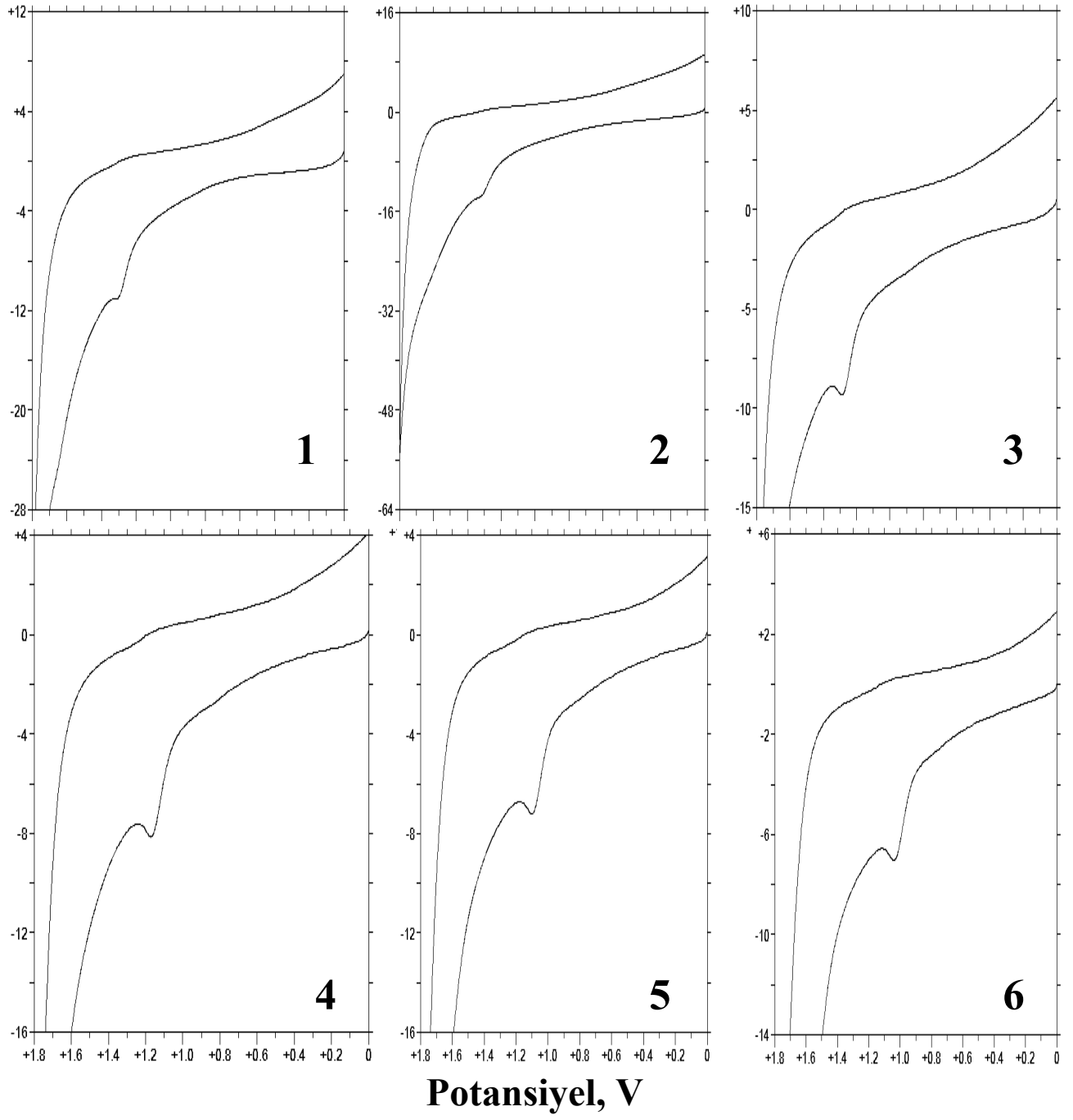
pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
3,65	1044	2,5490
4,64	968	2,6080
5,70	896	2,1480

3.2.4.1.3. Hidroklorotiazid'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

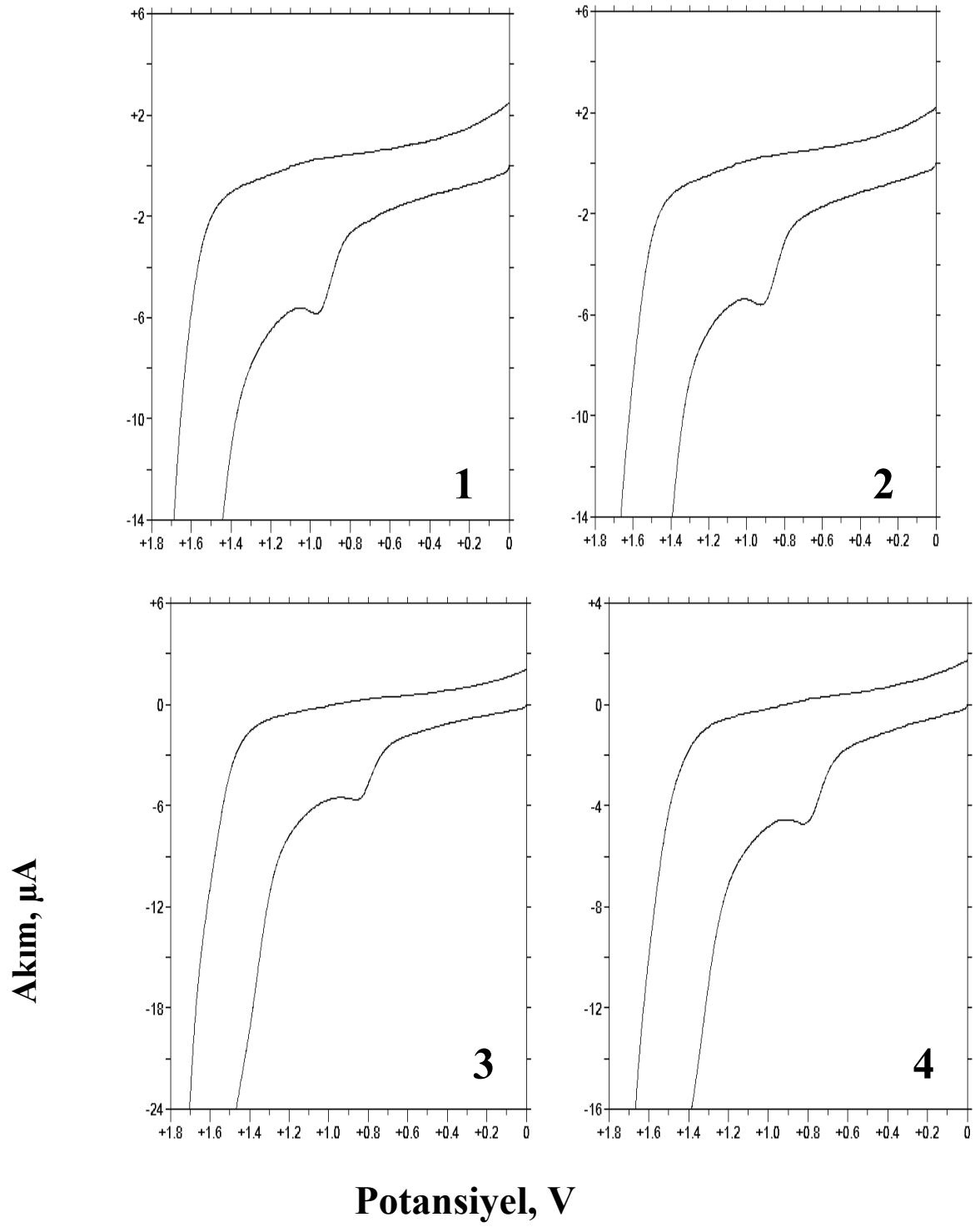
Hidroklorotiazid'in BR tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00; 10,00; 11,00; 12,00 BR tamponları çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, metanol içinde çözüldükten sonra metanol oranı % 20 olacak şekilde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerdendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektolitinin cinsinin ve pH'nın reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Hidroklorotiazid'nin 1×10^{-4} M derişimi ile pH 2,00-12,00 BR tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.20a ve 3.20b'de görölmektedir.

pH 2.00'de 1310 mV'da bir adet pik gözlenirken pH arttıkça bu piklerin daha az pozitif potansiyellere kaydığı, pik akımı değerdlerinin azaldığı saptanmıştır.



Şekil 3.20a. 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in pH 2.00 - 7.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 2,00 ; 2) pH 3,00; 3) pH 4,00; 4) pH 5,00; 5) pH 6,00; 6) pH 7,00

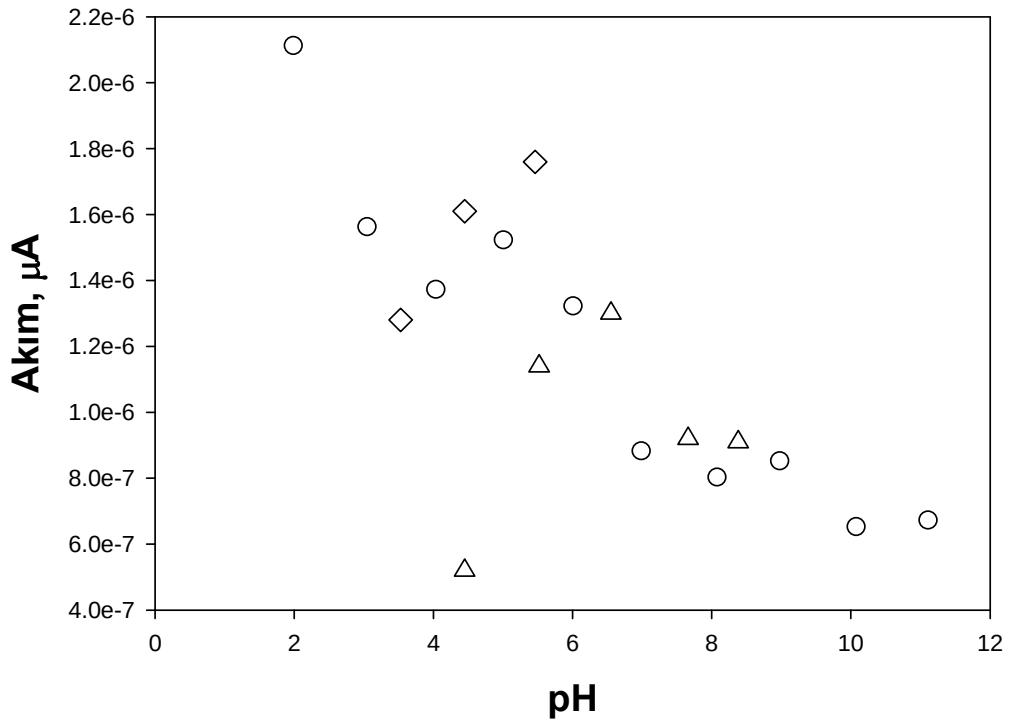
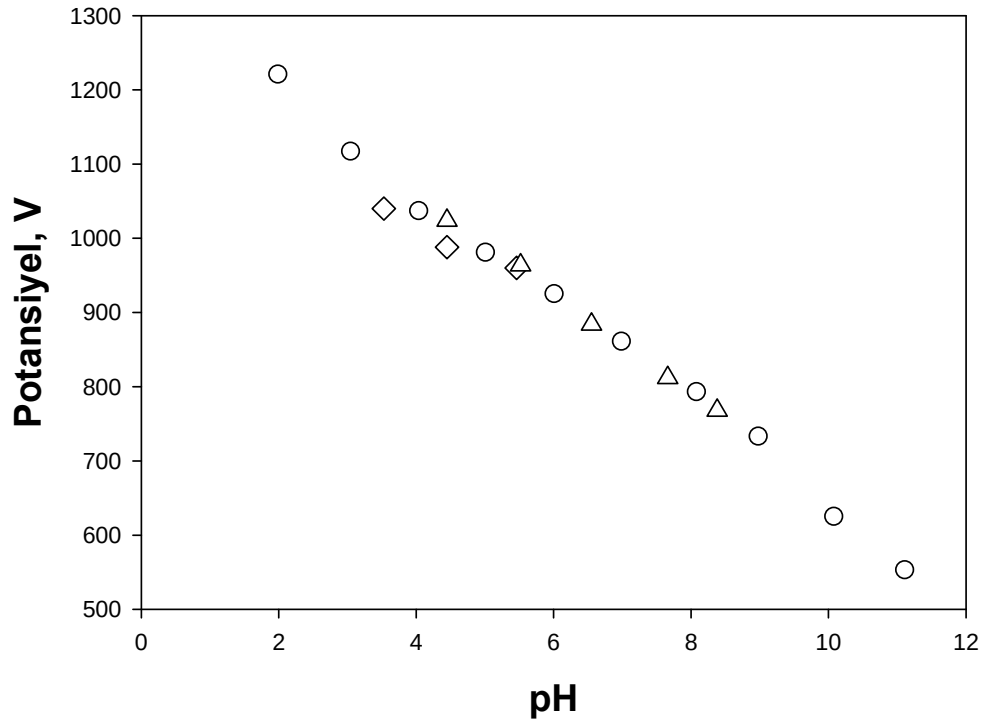


Şekil 3.20b. 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in pH 8.00 - 11.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00 ; 2) pH 9,00; 3) pH 10,00; 4) pH 11,00

Çizelge 3.15. BR tamponu çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
2,00	1280	2,3100
3,00	1284	2,2540
4,00	1116	2,3010
5,00	1036	2,2550
6,00	980	2,1350
7,00	1164	1,5170
8,00	924	1,3680
9,00	792	1,660
10,00	732	0,9809
11,00	624	1,276

Bütün pH'larda ve değişik destek elektrolitleri içerisinde elde edilen verileri bir arada gorebilmek için de ayrı bir grafik çizilmiştir. DPV ve KDV teknikleri ile birbirlerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. DPV tekniği ile çizilen I_p -pH ve E_p -pH grafikleri bu tez kapsamında verilmiş ve değerlendirilmiştir. pH'ın ve destek elektroliti cinsinin pik potansiyeli ve pik akımına etkisini daha rahat gorebilmek için bütün pH'ları ve ortamları bir arada gösteren ve DPV tekniği ile elde edilen (Pik akımı - pH) I_p -pH, (Pik potansiyeli - pH) E_p -pH eğrileri şekil 3.21 a ve b' de gösterilmiştir.



Şekil 3.21. 1×10^{-4} M hidroklorotiazid bütün pH değerlerinde elde edilen (a) Ep – pH eğrileri ve (b) İp – pH eğrileri. (Δ) Fosfat; (○) BRT ; (◇) Asetat

Diferansiyel puls voltametri tekniğiyle bütün destek elektrolitlerinde ve pH 2,00-11,00 aralığında elde edilen eğrilerden potansiyel ile pH arasında bir doğrusallık elde edildiği görülmüştür.

Bu değerlere göre;

$$E_p(\text{mV}) = 1325,5 - 68,03 \text{ pH} \quad r = 0,995 \quad (\text{pH: } 2,00-11,00 \text{ arası})$$

denklemini elde edilmiştir.

Bütün bu sonuçlara göre hidroklorotiazid'in miktar tayini için en uygun ortam asidik pH'lar görünmesine rağmen analiz için amilorid ve hidroklorotiazid eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yöntem uygun ortam olarak pH 2.0 Britton-Robinson tamponu seçilmiştir. Elde edilen pikin düzgün, keskin, tek oluşu, tekrarlanabilirliğin sağlanması ve amilorid ile hafif ayrılarak pik oluşturmaları da göz önüne alınarak pH 2.0 Britton-Robinson tamponu analitik çalışmalar için ortam olarak seçilmiştir.

$1 \times 10^{-4} \text{ M}$ hidroklorotiazid pH 2.0 Britton-Robinson tamponu içerisinde farklı tarama hızlarındaki eğrileri $5-250 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında kaydedilmiştir. Hız deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında $5-250 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında hızın karekökü ile akımın doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Bu deneylerden elde edilen veriler Çizelge 3.16'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.16. $1 \times 10^{-5} \text{M}$ hidroklorotiazid pH 2.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde $5\text{-}250 \text{mVs}^{-1}$ tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p) değerleri.

Tarama hızı (mVs^{-1})	$v^{1/2}$	i_p (μA)	$\log v$	$\log i_p$
5	2,2361	0,8673	0,6990	-0,062
10	3,1623	1,163	1,0000	0,066
25	5,0000	1,795	1,3979	0,254
50	7,0711	2,543	1,6990	0,405
75	8,6603	3,464	1,8751	0,540
100	10,0000	3,862	2,0000	0,587
150	12,2474	4,768	2,1761	0,678
200	14,1421	6,071	2,3010	0,783
250	15,8114	7,203	2,3979	0,858

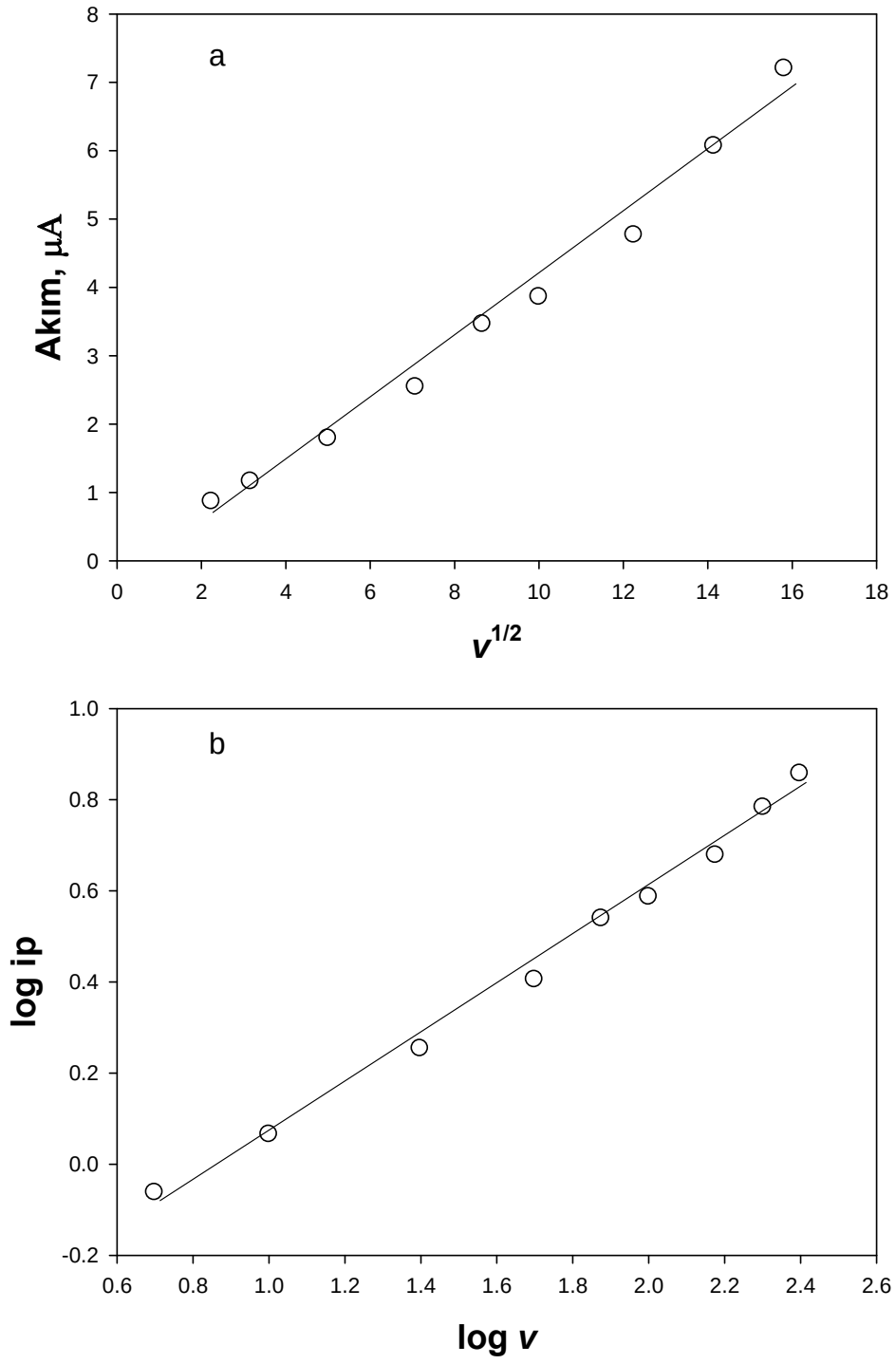
Hızın karekökünün akım ile doğrusal olarak değiştiği $5 - 250 \text{mVs}^{-1}$ tarama hızlarında gerekli hesaplamalar yapıldığı zaman doğru denklemi;

$$i_p (\mu\text{A}) = 0,4536v^{1/2} (\text{mVs}^{-1}) - 0,4214 (r= 0,9925 ; n= 9)$$

olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 3.22a). Aynı hız aralığındaki $\log v - \log i$ grafiği (Şekil 3.22b) ve elde edilen denklem incelenince bulunan eğim değerinin 0,54 olması reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğu bir sistemi göstermektedir (Laviron, E., ve ark. 1980 ; Greef, R. ve ark. 1990). (Saf difüzyon kontrollü olduğu zaman ve çözeltinin bu madde için ideal olduğu durumlarda eğim 0,5, saf adsorbsiyon kontrollü olduğu zaman ve kullanılan elektrodun o olay için ideal olduğu durumlarda 1 olur) (Laviron, E., 1980) Elde edilen doğru denklemi;

$$\text{Log } i_p (\mu\text{A}) = 0,54 \log v (\text{mVs}^{-1}) - 0,4714 \quad (r= 0,9964 ; n= 9)$$



Şekil 3.22. $1 \times 10^{-4} \text{M}$ hidroklorotiazid pH 2.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde $5\text{-}250 \text{mVs}^{-1}$ tarama hızları arasında elde edilen DV'lara ait a) $v^{1/2} - i_p$ ve b) $\log v - \log i$ grafikleri

3.2.5. Amilorid Üzerindeki Voltametrik Çalışmalar

Amilorid'in voltametrik incelenmesi, camı karbon disk elektrot ile değişik pH ve tamponlar içerisinde, dönüşümlü voltametri (DV), doğrusal taramalı voltametri (DTV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (KDV), teknikleri kullanılarak kapsamlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerden elde edilen DV eğrilerinin akım büyüklükleri belirli pH değerlerinin üzerinde okunamadığı için ilgili çizelgelarda ve E_p -pH, i_p -pH grafiklerinde verilen akım değerleri DPV yöntemi ile elde edilen verilerden oluşturulmuştur.

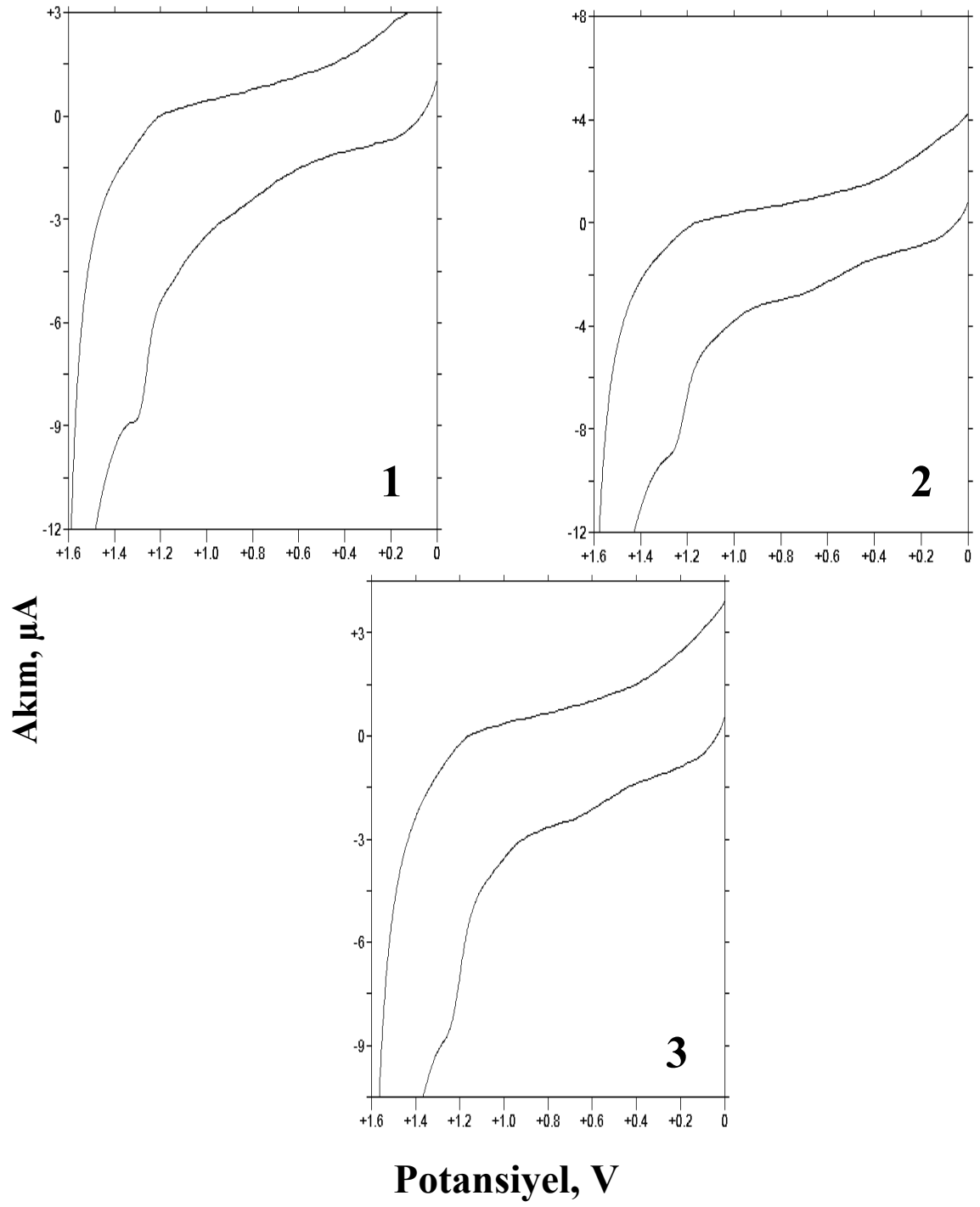
3.2.5.1. Amilorid'in Dönüşümlü Voltametri (DV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (DTV) Çalışmaları

DV tekniği kullanılarak amilorid'in camı karbon disk elektrot ile pH 2,00 – 12,00 Britton – Robinson (BR) tamponları, pH 1,60-8,00 arasındaki fosfat tamponları, pH 3,65-5,70 arasındaki asetat tamponları içeren destek elektroliti içerisinde pH, hız taraması ve mekanizma çalışmalarına yönelik incelemeler yapılmıştır.

3.2.5.1.1. Amilorid'in Fosfat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

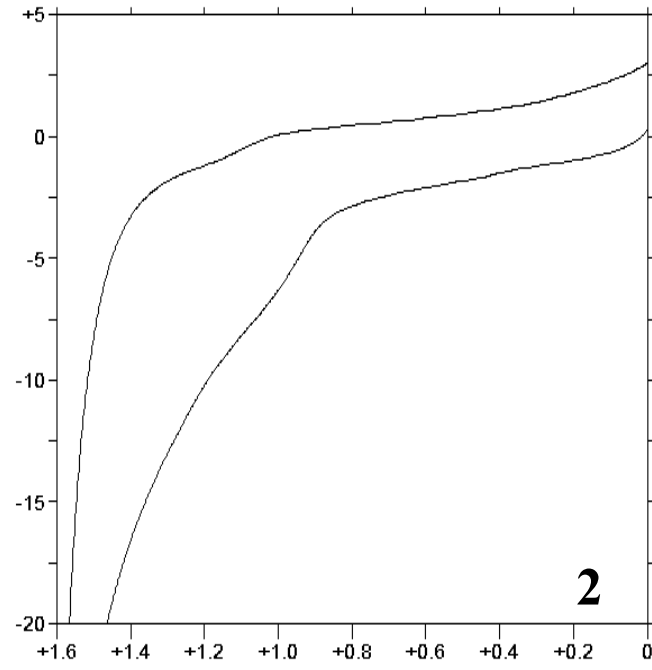
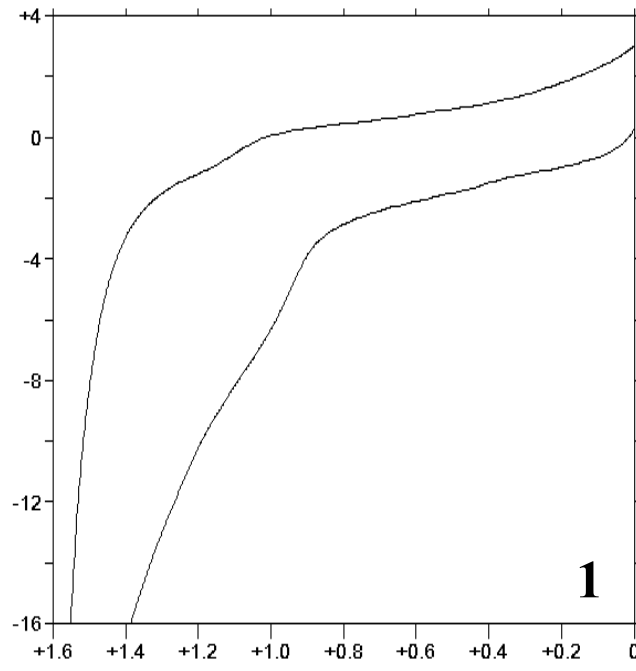
Amilorid'in fosfat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 1,60; 2,75; 3,19; 6,80; 8,00 fosfat tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, metanol içinde çözüldükten sonra metanol oranı % 20 olacak şekilde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektoliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Amilorid'in 1×10^{-4} M derişimi ile pH 1,60-8,00 fosfat tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.23a ve 3.23b' de görölmektedir. pH 1,60'da pik 1310,9 mV'da bir adet anodik pik gözlenmektedir. pH değeri arttırıldıkça pikin daha az pozitif bölgelere kaydığı saptanmıştır. pH değeri nötr ve hafif bazik değeri getirdiğinde, pikin daha az pozitif değeri kaymaya devam ettiğı, şiddetinin azaldığı ve yayıldığı görölmüştür .



Şekil 3.23a. 1×10^{-4} M amilorid'in pH 1,60 – 3,19 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 1,60; 2) pH 2,75; 3) pH 3,19

Akım, μA



Potansiyel, V

Şekil 3.23b. 1×10^{-4} M amilorid'in pH 6,80 – 8,00 arası fosfat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH6,80; 2) pH 8,00

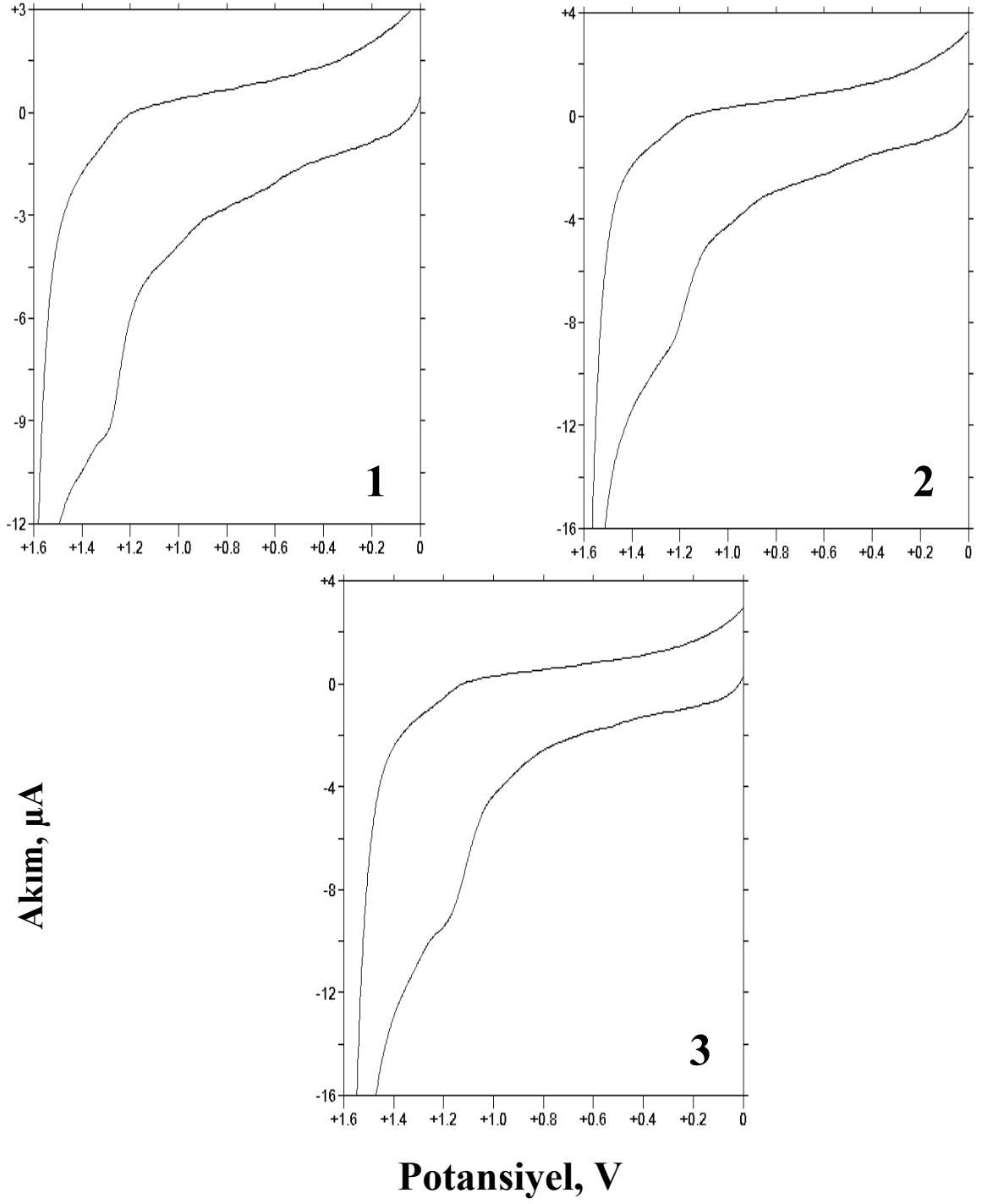
Çizelge 3.17. Fosfat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M amilorid'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
1,60	1252	2,9730
2,75	1212	1,7640
3,19	1196	1,5590
6,80	1012	0,9970
8,00	900	0,7890

3.2.5.1.2. Amilorid'in Asetat Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

Amilorid'in asetat tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 3,65; 4,64; 5,70 asetat tamponları kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, metanol içinde çözündükten sonra metanol oranı % 20 olacak şekilde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektoliti cinsinin ve pH'ın reaksiyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Amilorid'in 1×10^{-4} M derişimi ile pH 3,65-5,70 asetat tamponlarındaki dönüşümlü voltamogramları Şekil 3.24'de görölmektedir. pH 3,65'da pik 1107 mV'da bir anodik pik gözlenmiştir. pH değerleri arttıkça, pikin daha az pozitif değerlere kaydığı şiddetinin ise hemen hemen aynı düzeyde kaldığı görölmüştür.



Şekil 3.24. 1×10^{-4} M amilorid'in pH 3,65 – 5,70 arası asetat tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 3,65; 2) pH 4,64; 3) pH 5,70

Çizelge 3.18. Asetat çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M amilorid'nın değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

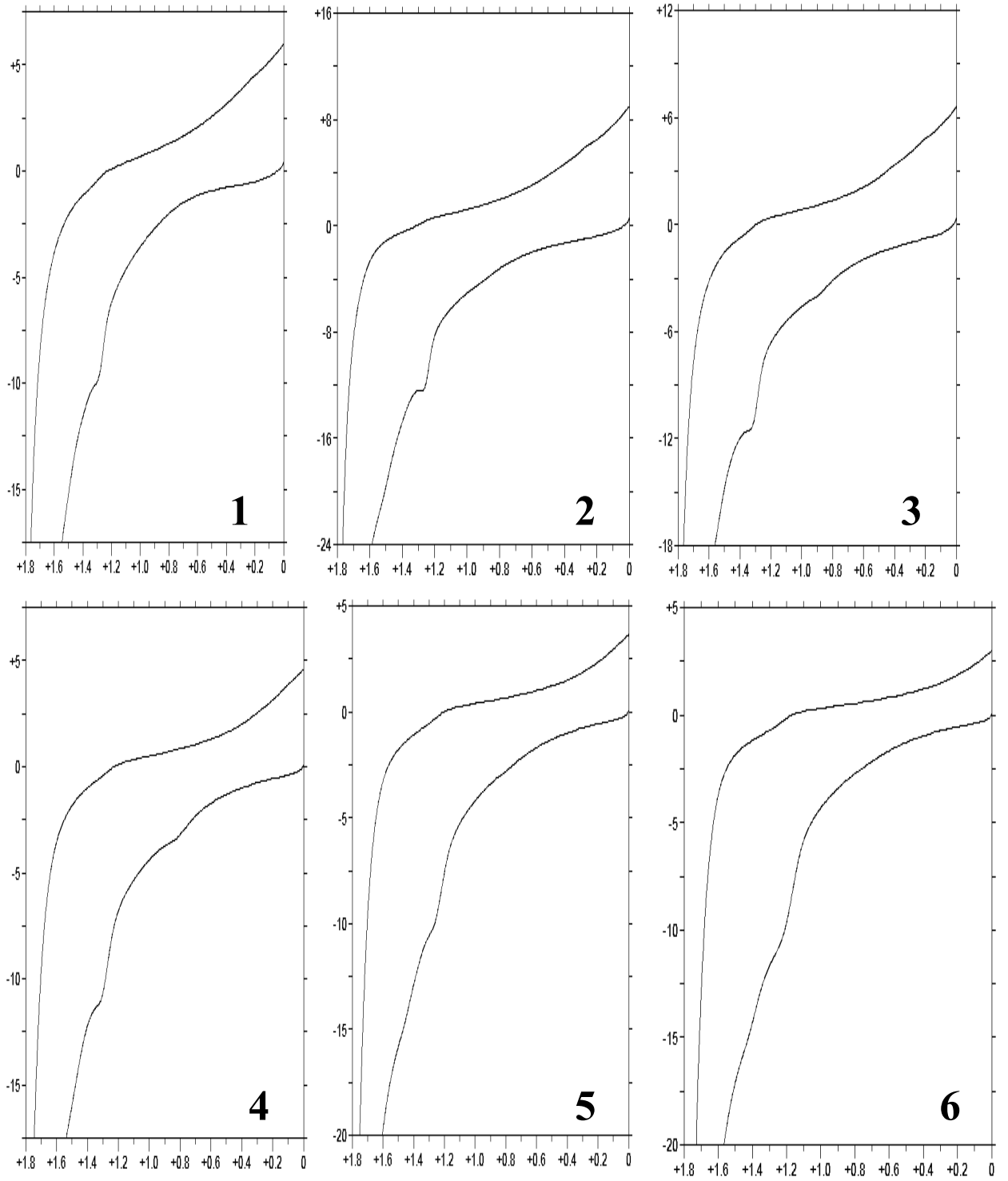
pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
3,65	1228	1,9630
4,64	1172	1,7770
5,70	1116	1,5830

3.2.5.1.3. Amilorid'in BR Tampon Çözeltileri İçerisinde Yapılan Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

Amilorid'in BR tamponları içerisindeki elektrokimyasal davranışlarını incelemek için pH 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00; 10,00; 11,00; 12,00 BR tamponları çözeltileri kullanılmıştır. pH incelemelerinde 1×10^{-4} M derişimde, metanol içinde çözüldükten sonra metanol oranı % 20 olacak şekilde hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır. Bu ortamlarda pH taraması yapılarak analitik değerlendirmeler için uygun koşulların saptanması ve destek elektrolitinin cinsinin ve pH'nın reaksiyon üzerinde etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

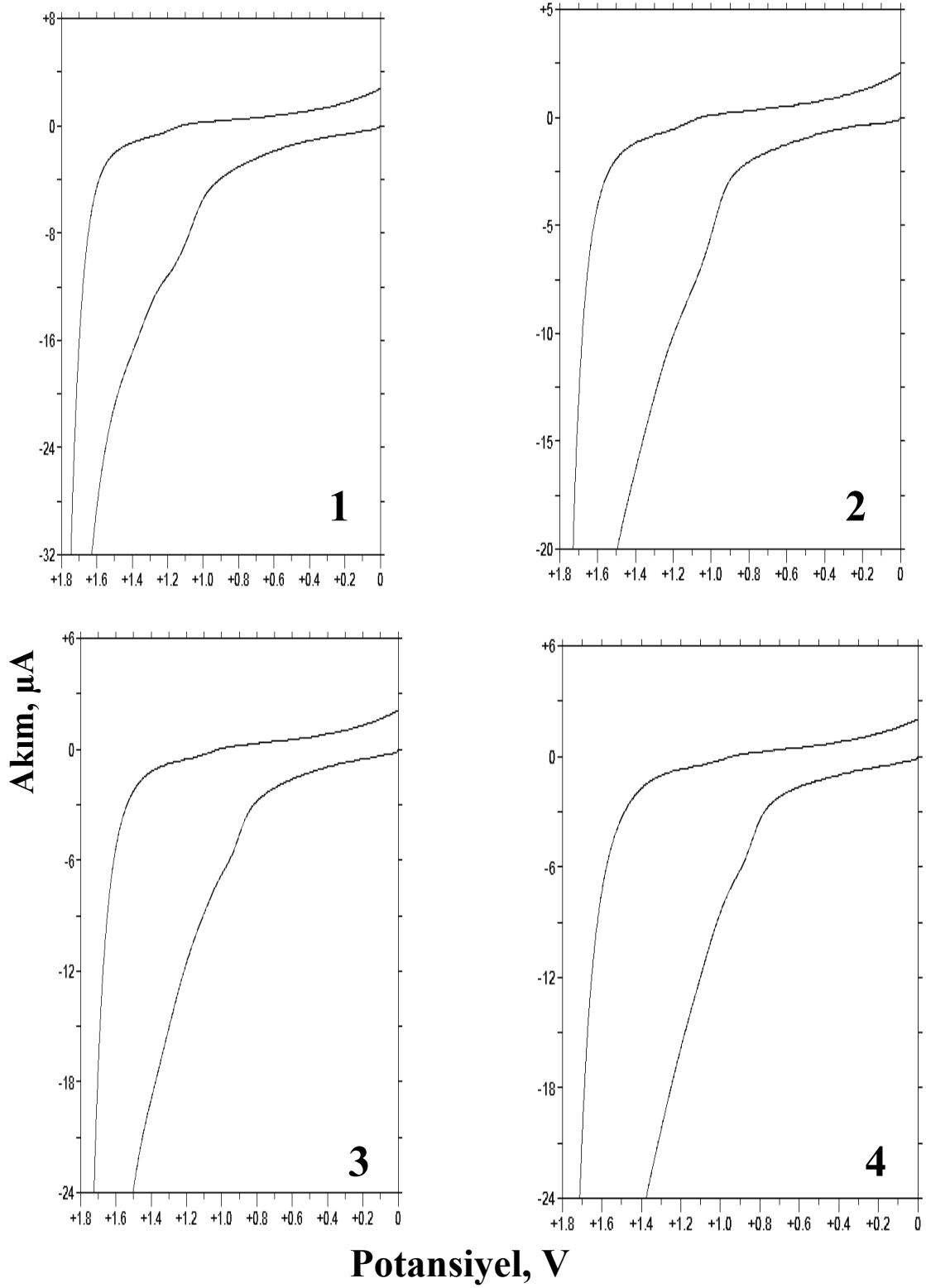
Amilorid'in 1×10^{-4} M derişimi ile pH 2,00-12,00 BR tamponlarındaki voltamogramları Şekil 3.25a ve 3.25b'de görölmektedir.

pH 2.00'de 1420 mV'da bir adet pik gözlenirken pH arttıkça bu piklerin daha az pozitif potansiyellere kaydığı, pik akımı değerlerinin azaldığı saptanmıştır. Pik pH 6,00 değerinden itibaren dalga şeklini almıştır.



Potansiyel, V

Şekil 3.25a. 1×10^{-4} M amilorid'in pH 2.00 - 7.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 2,00 ; 2) pH 3,00; 3) pH 4,00; 4) pH 5,00; 5) pH 6,00; 6) pH 7,00

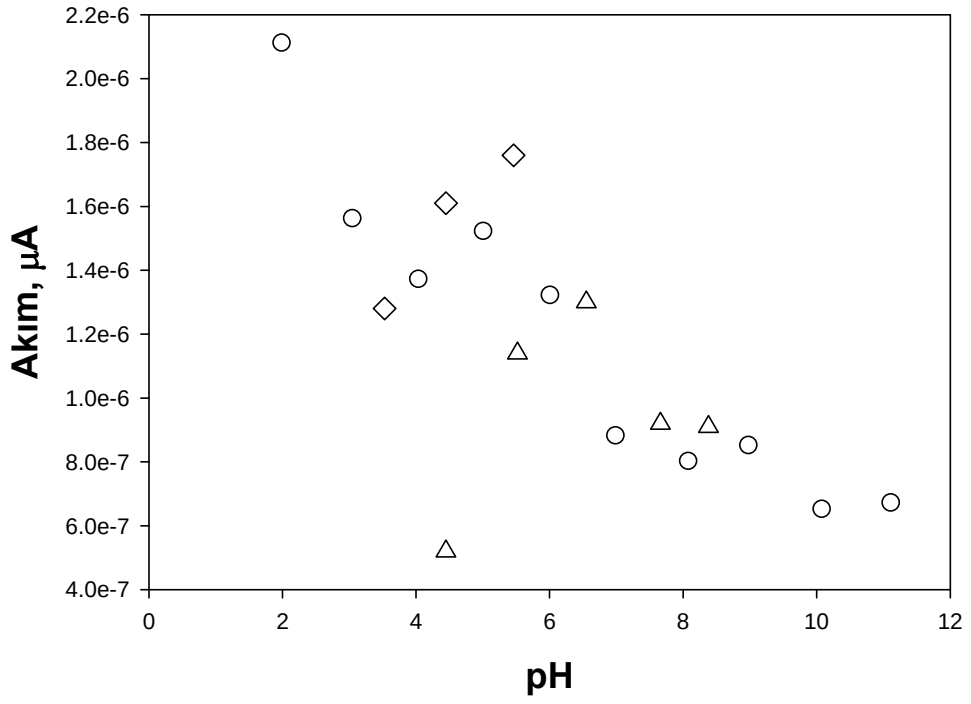
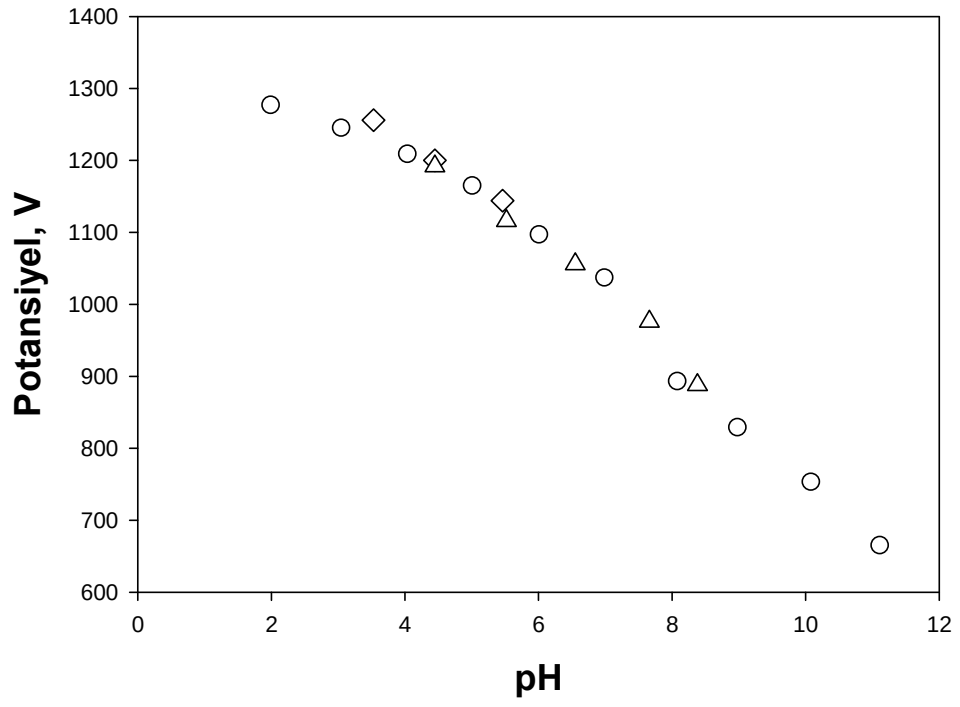


Şekil 3.25b. 1×10^{-4} M amilorid'in pH 8.00 - 11.00 arası BR tamponları içerisindeki dönüşümlü voltamogramları. 1) pH 8,00 ; 2) pH 9,00; 3) pH 10,00; 4) pH 11,00

Çizelge 3.19. BR tamponu çözeltileri içerisinde kaydedilen 1×10^{-4} M amilorid'in değişik pH değerlerinde DPV ile kaydedilen eğrilerinden elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri.

pH	Pik Potansiyeli (mV)	Pik Akımı (μ A)
2,00	1232	2,1070
3,00	1208	2,6760
4,00	1276	2,1060
5,00	1244	1,5570
6,00	1208	1,3670
7,00	1164	1,5170
8,00	1096	1,3150
9,00	1036	0,8828
10,00	Pik yarıldı	Pik yarıldı
11,00	Pik yarıldı	Pik yarıldı

Bütün pH'larda ve değişik destek elektrolitleri içerisinde elde edilen verileri bir arada görebilmek için de ayrı bir grafik çizilmiştir. DPV ve KDV teknikleri ile birbirlerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. DPV tekniği ile çizilen İp-pH ve Ep-pH grafikleri bu tez kapsamında verilmiş ve değerlendirilmiştir. pH'ın ve destek elektroliti cinsinin pik potansiyeli ve pik akımına etkisini daha rahat görebilmek için bütün pH'ları ve ortamları bir arada gösteren ve DPV tekniği ile elde edilen (Pik akımı - pH) İp-pH, (Pik potansiyeli - pH) Ep-pH eğrileri Şekil 3.26 a ve b' de gösterilmiştir.



Şekil 3.26. 1×10^{-4} M amilorid'in bütün pH değerlerinde elde edilen (a) Ep – pH eğrileri ve (b) İp – pH eğrileri. (Δ) Fosfat; (○) BRT ; (◇) Asetat

Diferansiyel puls voltametri tekniğiyle bütün destek elektrolitlerinde ve pH 3,53-11,12 aralığında elde edilen eğrilerden potansiyel ile pH arasında bir doğrusallık elde edildiği görülmüştür.

Bu değerlere göre;

$$E_p(\text{mV}) = 1557,4 - 79,32 \text{ pH} \quad r = 0,994 \quad (\text{pH: } 3,53-11,12 \text{ arası})$$

denklemini elde edilmiştir.

Bütün bu sonuçlara göre amilorid'in miktar tayini için en uygun ortam asidik pH'lar görünmesine rağmen analiz için amilorid ve hidroklorotiazid eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yönteme uygun ortam olarak pH 2.0 Britton-Robinson tamponu seçilmiştir. Elde edilen pikin düzgün, keskin, tek oluşu, tekrarlanabilirliğin sağlanması ve hidroklorotiazid ile hafif ayrılarak pik oluşturması da göz önüne alınarak pH 2.0 Britton-Robinson tamponu analitik çalışmalar için ortam olarak seçilmiştir.

$1 \times 10^{-4} \text{ M}$ amilorid'in pH 2.0 Britton-Robinson tamponu içerisinde farklı tarama hızlarındaki eğrileri $5-250 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında kaydedilmiştir. Hız deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman $5-250 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında hızın karekökü ile akımın doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Bu deneylerden elde edilen veriler Çizelge 3.20'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.20. $1 \times 10^{-4} \text{M}$ amilorid pH 2.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde 5-250 mVs^{-1} tarama hızları arasında elde edilen potansiyel (E_p) ve akım (i_p) değerleri.

Tarama hızı (mVs^{-1})	$v^{1/2}$	i_p (μA)	$\text{Log}v$	$\text{log}i_p$
5	2,2361	0,3732	0,6990	-0,4281
10	3,1623	0,5429	1,0000	-0,2653
25	5,0000	0,8061	1,3979	-0,0936
50	7,0711	1,0820	1,6990	0,0342
75	8,6603	1,2350	1,8751	0,0917
100	10,0000	1,3560	2,0000	0,1323
150	12,2474	1,5800	2,1761	0,1987
200	14,1421	1,7830	2,3010	0,2512
250	15,8114	1,8500	2,3979	0,2672

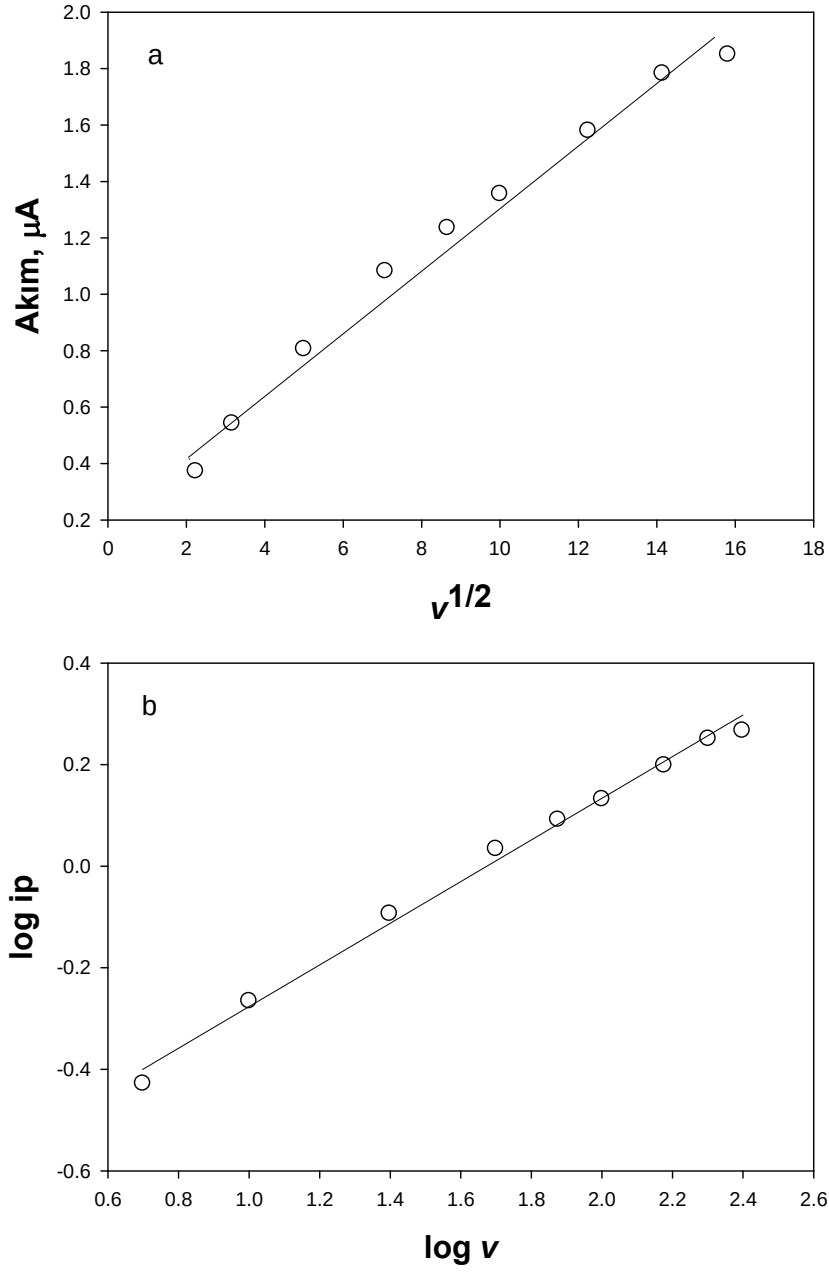
Hızın karekökünün akım ile doğrusal olarak değiştiği 5 – 250 mVs^{-1} tarama hızlarında gerekli hesaplamalar yapıldığı zaman doğru denklemi;

$$i_p (\mu\text{A}) = 0,109v^{1/2} (\text{mVs}^{-1}) + 0,2299 (r= 0,992 ; n= 9)$$

olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu doğrusallık da bize reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 3.27a). Aynı hız aralığındaki $\log v - \log i$ grafiği (Şekil 3.27b) ve elde edilen denklem incelenince bulunan eğim değerinin 0,41 olması reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğu bir sistemi göstermektedir (Laviron, E., ve ark. 1980 ; Greef, R. ve ark. 1990). (Saf difüzyon kontrollü olduğu zaman ve çözeltinin bu madde için ideal olduğu durumlarda eğim 0,5, saf adsorbsiyon kontrollü olduğu zaman ve kullanılan elektrodun o olay için ideal olduğu durumlarda 1 olur) (Laviron, E., 1980) Elde edilen doğru denklemi;

$$\text{Log } i_p (\mu\text{A}) = 0,4058 \log v (\text{mVs}^{-1}) - 0,6801 \quad (r= 0,997 ; n= 9)$$



Şekil 3.27. $1 \times 10^{-4} M$ amilorid pH 2.0 Britton-Robinson tamponu çözeltisi içerisinde $5-250 mVs^{-1}$ tarama hızları arasında elde edilen DV'lara ait a) $v^{1/2} - i_p$ ve b) $\log v - \log i$ grafikleri

3.2.6. Karbidopa'nın ve Levodopa'nın DPV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları

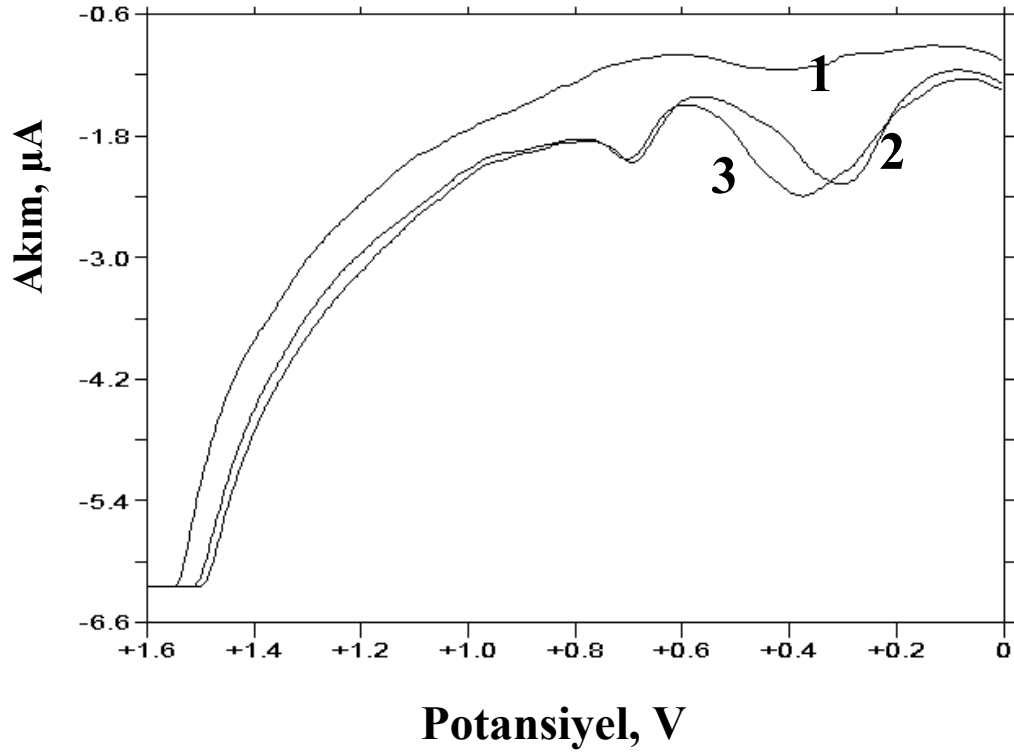
DPV tekniği ile çalışabilmek için önce en uygun koşullar saptandı. Bunun için yapılan tampon çözelti ve pH taramalarında en uygun ortam olarak pH 5,00 BR tamponu seçilmiştir. Bütün çalışmalarda pH 5.0 BR tamponu içerisindeki $5 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa ve $1 \times 10^{-4} \text{M}$ levodopa çözeltileri kullanılmıştır. Tarama hızı $10\text{-}50 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında, puls yüksekliği $25\text{-}75 \text{ mV}$ aralığında değiştirilerek voltamogramlar elde edilmiştir. Elde edilen uygun parametreler aşağıdaki gibi belirlenmiştir;

Puls genliği: 50 mV ; Tarama hızı: 25 mVs^{-1} Örnek genişliği: 17 ms ; Puls periyodu: 200 ms .

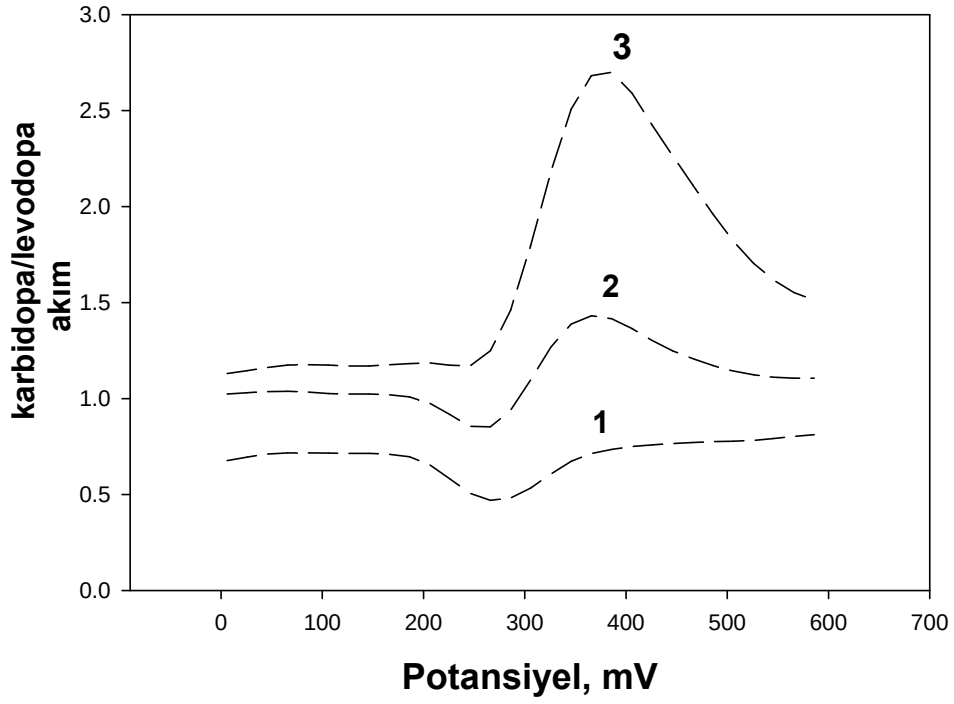
Karbidopa'yı tek başına içeren pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde $8 \times 10^{-6} \text{M} - 4 \times 10^{-4} \text{M}$ derişim aralığında 25 mVs^{-1} tarama hızı ile DPV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan en uygun bölücü derişimi olarak saptanan $2 \times 10^{-5} \text{M}$ levodopa'nın DPV voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türevi eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.29'da verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 304 mV bulunmuş ve karbidopa'nın analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{karbidopa}}/dI_{\text{levodopa}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.21'de kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.31a.'da verilmiştir.

Benzer bir şekilde levodopa'yı tek başına içeren pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde $1 \times 10^{-5} \text{M} - 8 \times 10^{-5} \text{M}$ derişim aralığında 25 mVs^{-1} tarama hızı ile DPV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan $6 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa'nın DP voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türev eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.30'da verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 296 mV bulunmuş ve levodopa'nın analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı

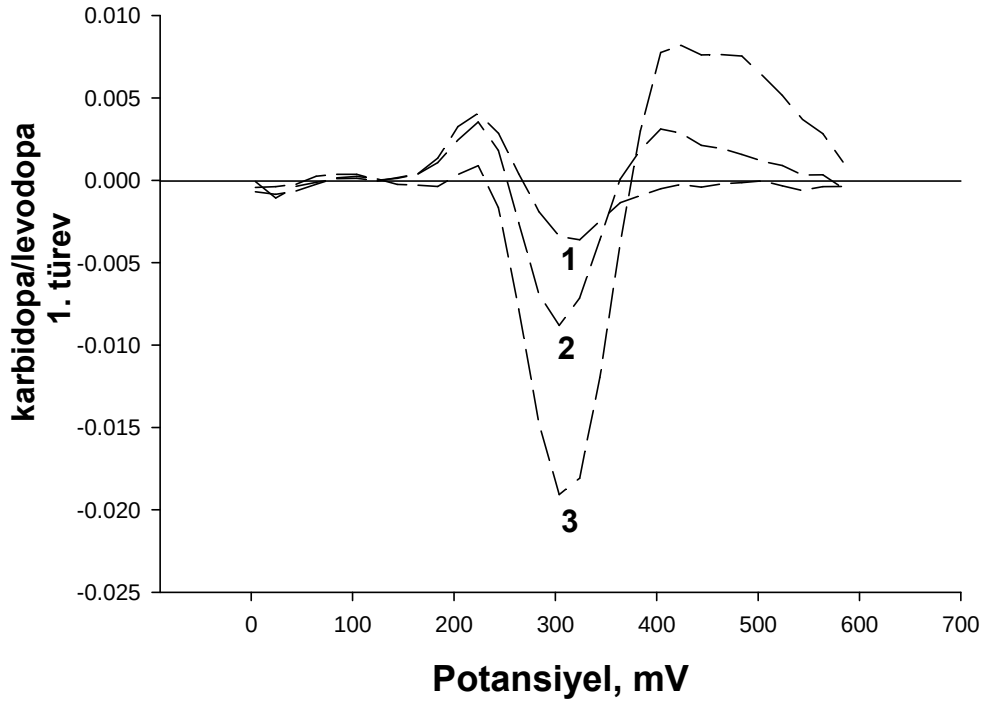
derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{karbidopa}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi izelge 3.22’de kalibrasyon grafiği ise şekil 3.31b.’de verilmiştir.



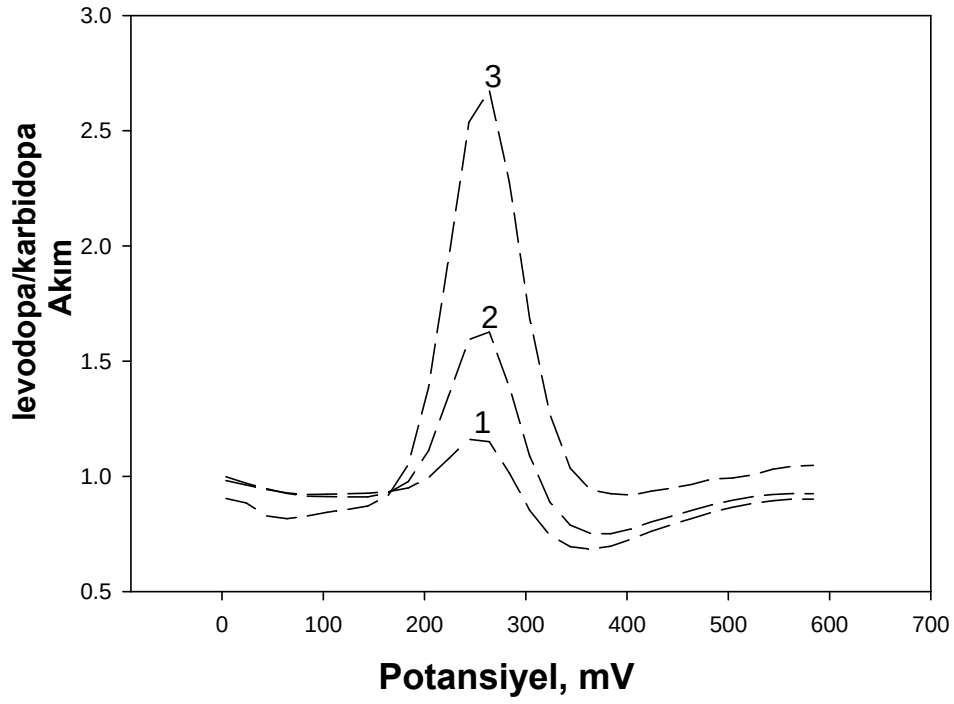
şekil 3.28. pH 5,00 BR tamponu içerisinde 1) 2×10^{-5} M levodopa 2) 6×10^{-5} M karbidopa 3) 2×10^{-5} M levodopa ve 6×10^{-5} M karbidopa içeren DP voltamogramları



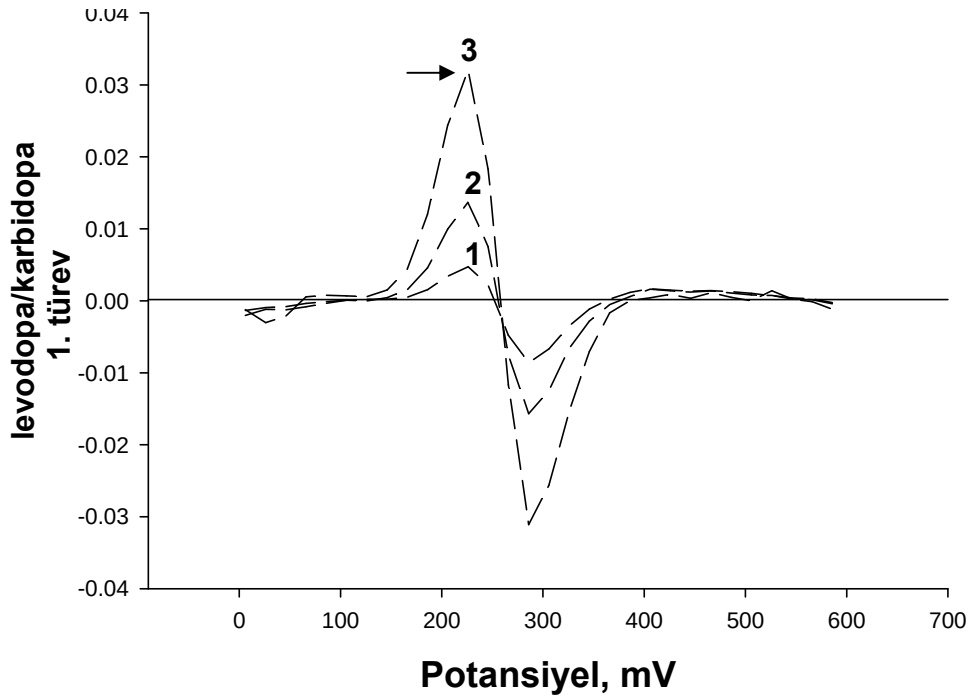
Şekil 3.29a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın DP oran voltamogram eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $6 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa.



Şekil 3.29b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın DP oran voltamogram türev eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $6 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa.



Şekil 3.30a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın DP oran voltamogram eğrileri. 1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa.



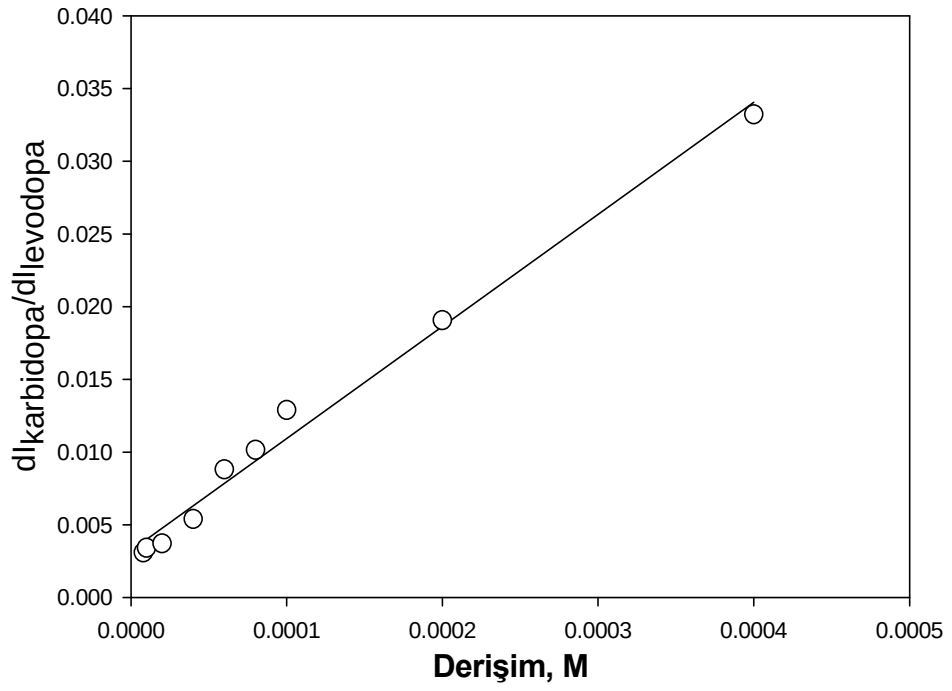
Şekil 3.30b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın DP oran voltamogramı birinci türev eğrileri. 1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa.

Çizelge 3.21. Karbidopa'nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 304 mV'da okunan akım değerleri.

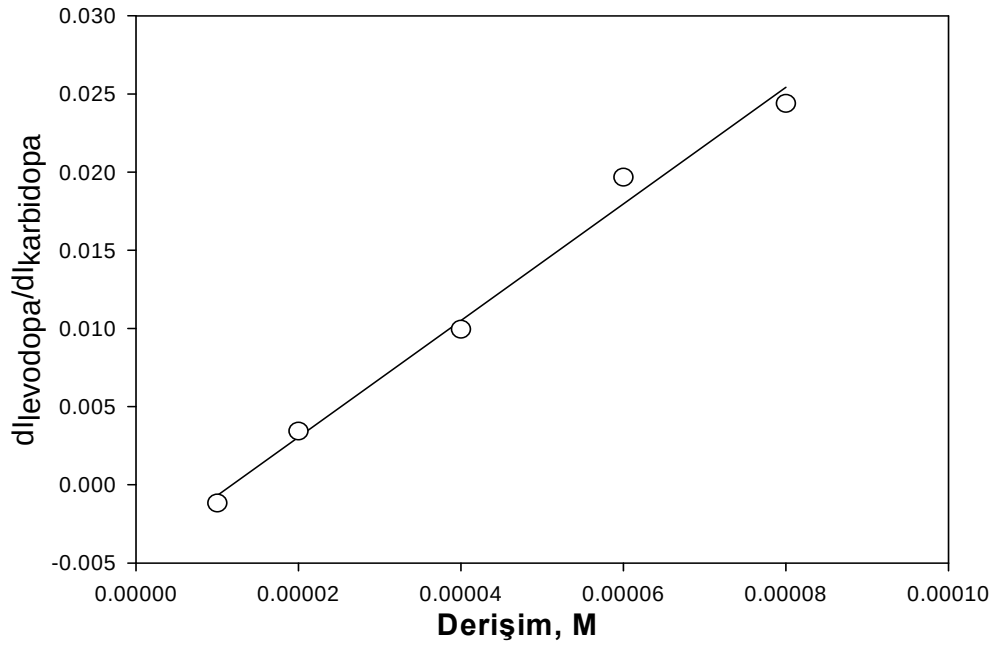
Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{karbidopa}}/dI_{\text{levodopa}}$)
8×10^{-6}	0,0031
1×10^{-5}	0,00341
2×10^{-5}	0,00372
4×10^{-5}	0,00540
6×10^{-5}	0,00881
8×10^{-5}	0,01016
1×10^{-4}	0,0129
2×10^{-4}	0,01907
4×10^{-4}	0,03322

Çizelge 3.22. Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 296 mV'da okunan akım değerleri.

Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{karbidopa}}$)
1×10^{-5}	-0,0012
2×10^{-5}	0,0034
4×10^{-5}	0,0099
6×10^{-5}	0,0197
8×10^{-5}	0,0244



Şekil 3.31a. $8 \times 10^{-6} \text{ M} - 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığında Karbidopa'nın pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde DP voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.



Şekil 3.31b. $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ derişim aralığında Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde DP voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.

Elde edilen doğru denklemleri ise :

$$dI_{\text{karbidopa}}/dI_{\text{levodopa}} = 77,06 \text{ C(M)} + 0,0032 ,$$

$$dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{karbidopa}} = 373,7 \text{ C(M)} - 0,0045 \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Çizelge 3.21 ve Çizelge 3.22'deki DPV tekniği ile elde edilen verileri kullanarak analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.23'de gösterilmiştir. Çizelge 3.23'de verilen yakalama sınırı (YS) ve tayin alt sınırı (TAS);

$$YS = 3,3 \times SS/m \quad ; \quad TAS = 10 \times SS/m$$

formüllerinden bulunmuştur. (Riley ve Rosanske,1996 ; Swartz,Krull,1997; Ermer ve Miller, 2005)

Bu formüllerde s, kalibrasyondaki en düşük derişimin bir üst derişiminde tekrarlanan sonuçların standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir.

Çizelge 3.23a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	DPV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	304
Doğrusallık Aralığı (M)	$8 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-4}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$)	77,06
Kesişim (μA)	0,0032
Korelasyon Katsayısı	0,994
Eğimin Standart Hatası	3,18
Kesişimin Standart Hatası	$4,99 \times 10^{-4}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$1,21 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$3,67 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,46
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,66
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,25
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,54

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $1 \times 10^{-5} \text{M}$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Çizelge 3.23b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	DPV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	296
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$)	373,7
Kesişim (μA)	-0,0045
Korelasyon Katsayısı	0,997
Eğimin Standart Hatası	22,12
Kesişimin Standart Hatası	$1,09 \times 10^{-3}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$3,14 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$9,51 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,38
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,47
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,88
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,18

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5} \text{M}$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin (diferansiyel puls voltamogram oranları türev voltametrisi) tekrar edilebilirlik düzeyini anlayabilmek için pik akımları ve potansiyelleri için gün içi ve günler arası (3 gün için) tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.23’de % BSS cinsinden gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar pik akımları ve pik potansiyelleri için tekrar edilebilirliğin iyi olduğunu kanıtlamaktadır. Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde iyi sonuçların elde edilmesi, karbidopa ve levodopa’yı aynı anda içeren ticari preparatlardan karbidopa’nın ve levodopa’nın hiçbir ayırma işlemi yapılmadan miktar tayininin bu yöntemle gerçekleştirilebileceği göstermiştir.

3.2.7. Karbidopa-Levodopa Karışımı için Geliştirilen Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları

Karbidopa’nın tayini için geliştirilen DP Voltamogram oranları türev voltametrik tekniklerin piyasa preparatlarına uygulanabilirliği araştırılmıştır. Karbidopa için farmakopelerde herhangi bir analiz yöntemi önerilmediği ve tablet katkı maddelerinin yönteme bir etkisinin olup olmadığını anlamak için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Karbidopa içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf karbidopa çözeltileri ile aynı şartlarda voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler $2 \times 10^{-5} \text{M}$ levodopa’nın voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{karbidopa}}/dI_{\text{levodopa}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği karbidopa miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.24’de gösterilmiştir.

Benzer bir şekilde Levodopa içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf

levodopa çözeltileri ile aynı şartlarda voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 6×10^{-5} M karbidopa'nın voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{karbidopa}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği levodopa miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.26'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.24. Karbidopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	DPV
1	24,87
2	24,85
3	24,82
4	25,11
5	25,07
X_{ort}	24,94
SS	0,135
% BSS	0,542
% BH	0,32

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan karbidopa-levodopa karışımını içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf karbidopa ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.25’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.25. Karbidopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tablet numunelerinde pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen % geri kazanım sonuçları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
DPV	25,00	25,23	100,92
	25,00	25,39	101,56
	25,00	25,13	100,52
	25,00	24,98	99,92
	25,00	24,91	100,26
			X _{ort} : 100,57
			SS : 0,70
			% BSS : 0,69
			%BH: -0,57

Çizelge 3.26. Levodopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen voltamogram oranları türev DP Voltametrisi yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	DPV
1	247,48
2	247,08
3	245,33
4	248,08
5	245,43
X_{ort}	246,68
SS	0,49
% BSS	0,50
% BH	1,33

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve levodopa ve karbidopa’yı aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf levodopa ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.27’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.27. Levodopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tablet numunelerinde pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen % geri kazanım sonuçları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
DPV	100,00	102,00	102,00
	100,00	101,77	101,77
	100,00	101,45	101,45
	100,00	100,73	100,73
	100,00	100,53	100,53
			X _{ort} : 101,30
			SS : 0,64
			% BSS : 0,63
			%BH: -1,30

3.2.8. Benserazid ve Levodopa'nın DPV Tekniği ile Analiz Çalışmaları

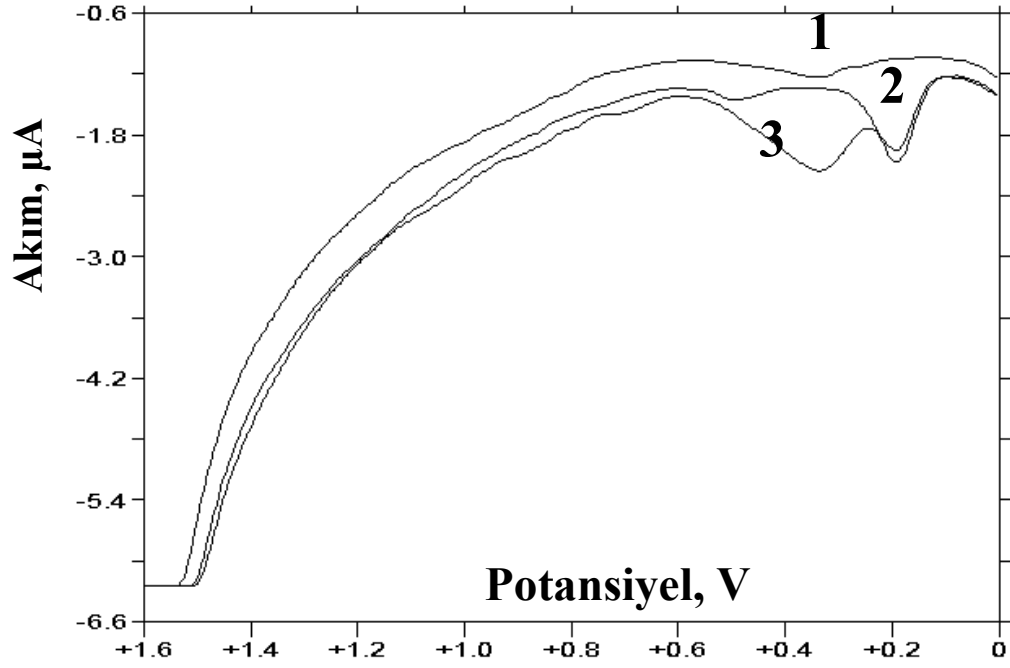
DPV tekniği ile çalışabilmek için önce en uygun koşullar saptandı. Bunun için yapılan tampon çözelti ve pH taramalarında en uygun ortam olarak pH 5,00 BR tamponu seçilmiştir. Bütün çalışmalarda pH 5.0 BR tamponu içerisindeki 1×10^{-4} M benserazid ve 1×10^{-4} M levodopa çözeltileri kullanılmıştır. Tarama hızı $10-50 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında, puls yüksekliği $25-75 \text{ mV}$ aralığında değiştirilerek voltamogramlar elde edilmiştir. Elde edilen uygun parametreler aşağıdaki gibi belirlenmiştir;

Puls genliği: 50 mV ; Tarama hızı: 25 mVs^{-1} Örnek genişliği: 17 ms ; Puls periyodu: 200 ms .

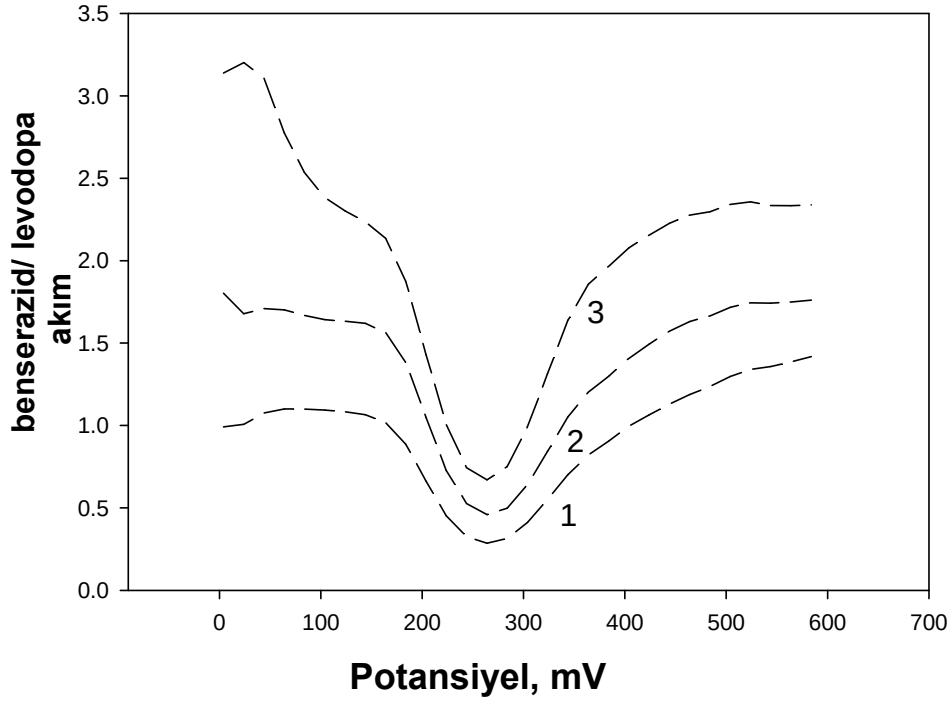
Benserazid'i tek başına içeren pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığında 25 mVs^{-1} tarama hızı ile DPV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ levodopa'nın DPV voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türevi eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.33'da verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 326 mV bulunmuş ve benserazid'in analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{benserazid}}/dI_{\text{levodopa}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.28'de kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.35a.'da verilmiştir.

Benzer bir şekilde levodopa'yı tek başına içeren pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ derişim aralığında 25 mVs^{-1} tarama hızı ile DPV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ benserazid'in DPV voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türev eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.34'da verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 304 mV bulunmuş ve levodopa'nın analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{benserazid}}$ değerlerinin,

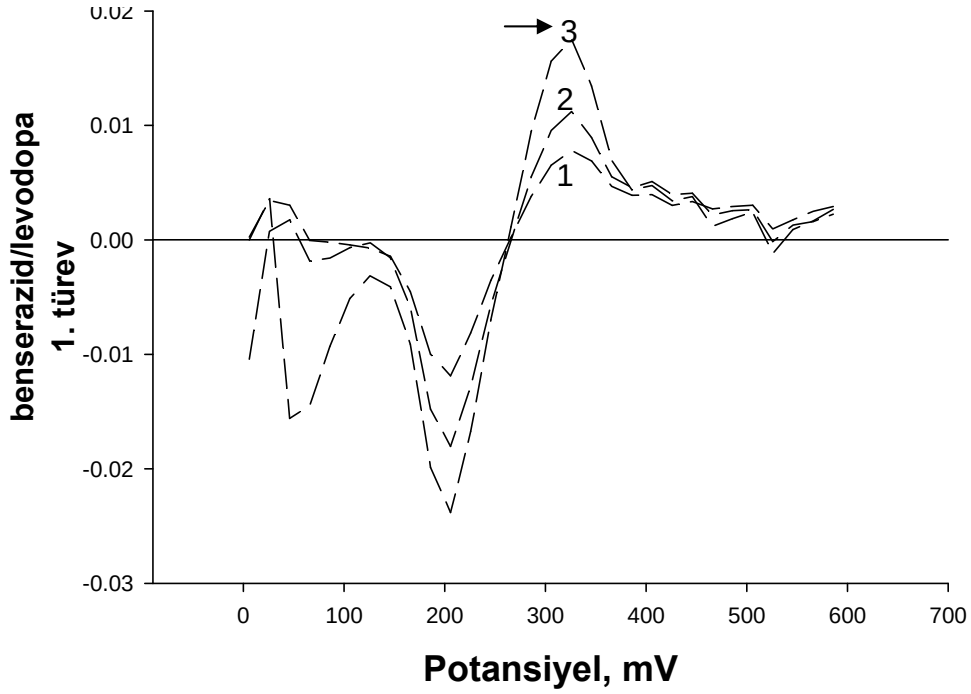
derişimle (C) değişimi izelge 3.29’de kalibrasyon grafiği ise şekil 3.35b.’de verilmiştir.



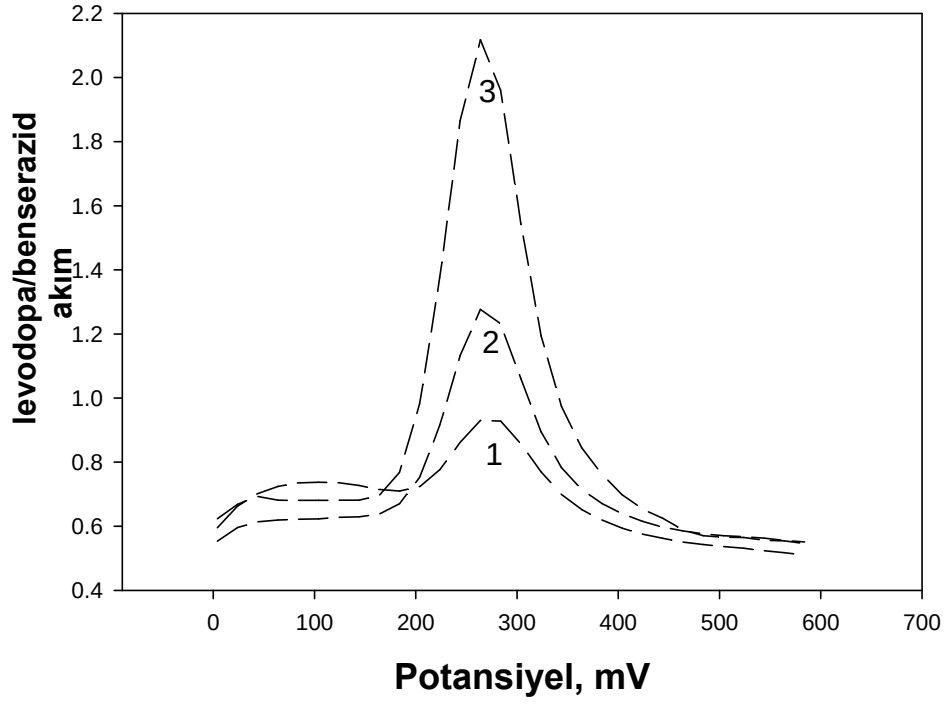
şekil 3.32. pH 5,00 BR tamponu ierisinde 1) 2x10⁻⁵ M levodopa 2) 6x10⁻⁵ M benserazid 3) 6x10⁻⁵ M benserazid ve 2x10⁻⁵ M levodopa içeren DP voltamogramları



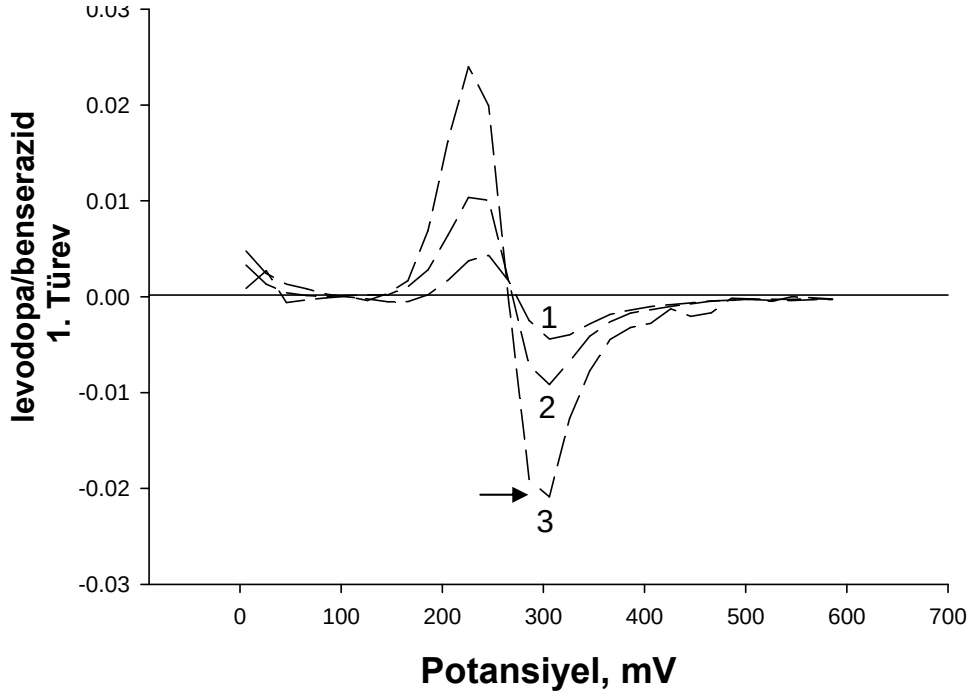
Şekil 3.33a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın DP oran voltamogram eğrileri. 1) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$; 2) $6 \times 10^{-5} \text{ M}$; 3) $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ Benserazid ve bölücü derişimi $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ Levodopa.



Şekil 3.33b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın DP oran voltamogram eğrileri. 1) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$; 2) $6 \times 10^{-5} \text{ M}$; 3) $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ Benserazid ve bölücü derişimi $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ Levodopa.



Şekil 3.34a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Benserazid'in DP oran voltamogram eğrileri. 1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$; Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Benserazid.



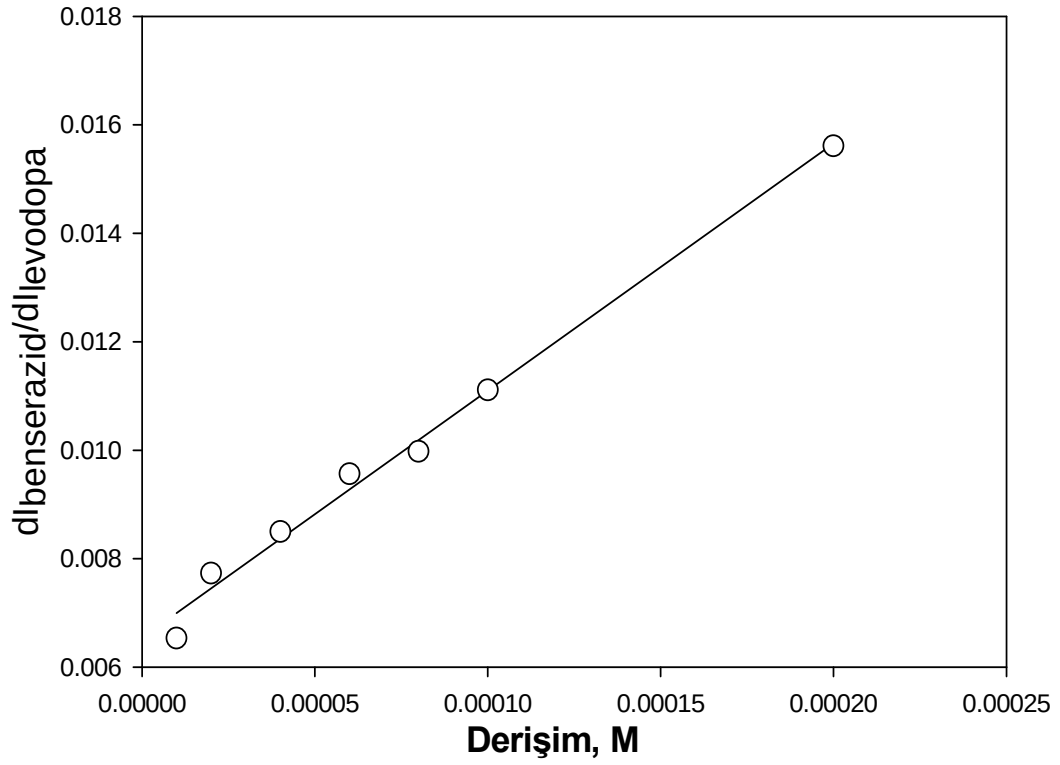
Şekil 3.34b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Benserazid'in DP oran voltamogramı türev eğrileri. 1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$; Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Benserazid.

Çizelge 3.28. Benserazid'in pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 326 mV'da okunan akım değerleri.

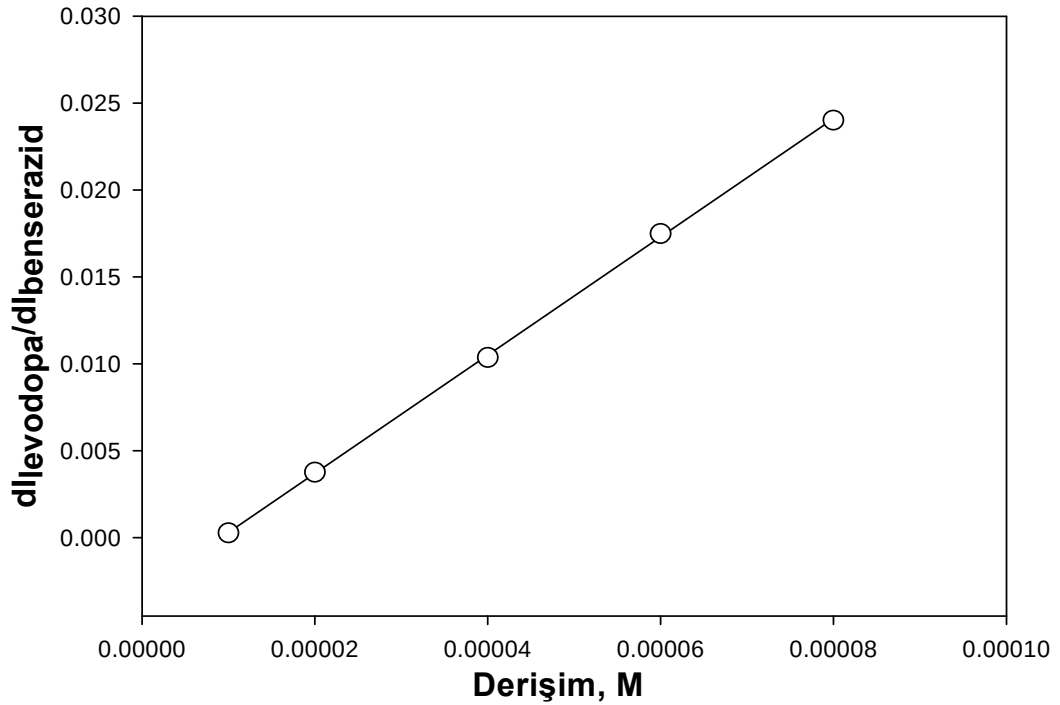
Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{benserazid}}/dI_{\text{levodopa}}$)
1×10^{-5}	0,0065
2×10^{-5}	0,0077
4×10^{-5}	0,0085
6×10^{-5}	0,0096
8×10^{-5}	0,0100
1×10^{-4}	0,0111
2×10^{-4}	0,0156

Çizelge 3.29. Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 304 mV'da okunan akım değerleri.

Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{benserazid}}$)
1×10^{-5}	0,0003
2×10^{-5}	0,0038
4×10^{-5}	0,0103
6×10^{-5}	0,0175
8×10^{-5}	0,0240



Şekil 3.35a. $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığında Benserazid'in pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde DP voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.



Şekil 3.35b. $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ derişim aralığında Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde DP voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.

Elde edilen doğru denklemleri ise :

$$dI_{\text{benserazid}}/dI_{\text{levodopa}} = 45,62 \text{ C(M)} + 0,0065 ,$$

$$dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{benserazid}} = 339,4 \text{ C(M)} - 0,0031 \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Çizelge 3.28 ve Çizelge 3.29'deki DPV tekniği ile elde edilen verileri kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.30'da gösterilmiştir. Çizelge 3.30'da verilen yakalama sınırı (YS) ve tayin alt sınırı (TAS);

$$YS = 3,3 \times SS/m \quad ; \quad TAS = 10 \times SS/m$$

formüllerinden bulunmuştur. (Riley ve Rosanske,1996 ; Swartz,Krull,1997; Ermer ve Miller, 2005)

Bu formüllerde s, kalibrasyondaki en düşük derişimin bir üst derişiminde tekrarlanan sonuçların standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir.

Çizelge 3.30a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid'in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	DPV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	326
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$)	45,62
Kesişim (μA)	0,0065
Korelasyon Katsayısı	0,996
Eğimin Standart Hatası	1,94
Kesişimin Standart Hatası	$1,83 \times 10^{-4}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$2,99 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$9,05 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,78
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,99
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,56
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,64

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $4 \times 10^{-5} \text{M}$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Çizelge 3.30b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	DPV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	304
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$)	339,4
Kesişim (μA)	-0,0031
Korelasyon Katsayısı	0,999
Eğimin Standart Hatası	3,17
Kesişimin Standart Hatası	$1,56 \times 10^{-4}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$2,52 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$7,64 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,46
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,67
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,73
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,21

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5} \text{M}$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin (diferansiyel puls voltametrisi) tekrar edilebilirlik düzeyini anlayabilmek için pik akımları ve potansiyelleri için gün içi ve günler arası (3 gün için) tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.30'da % BSS cinsinden gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar pik akımları ve pik potansiyelleri için tekrar edilebilirliğin iyi olduğunu kanıtlamaktadır. Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde iyi sonuçların elde edilmesi, benserazid ve levodopa'yı aynı anda içeren ticari preparatlardan benserazid'in ve levodopa'nın hiçbir ayırma işlemi yapılmadan miktar tayininin bu yöntemle gerçekleştirilebileceği göstermiştir.

3.2.9. Benserazid-Levodopa İkili Karışımı İçin Geliştirilen Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları

Benserazid'in tayini için geliştirilen DP Voltamogram oranları türev voltametrik tekniklerin piyasa preparatlarına uygulanabilirliği araştırılmıştır. Benserazid için farmakopelerde herhangi bir analiz yöntemi önerilmediği ve tablet katkı maddelerinin yönteme bir etkisinin olup olmadığını anlamak için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Benserazid içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.'de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf benserazid çözeltileri ile aynı şartlarda voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 8×10^{-5} M levodopa'nın voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{benserazid}}/dI_{\text{levodopa}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği benserazid miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.31'de gösterilmiştir. Benzer bir şekilde Levodopa içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.'de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf levodopa çözeltileri ile aynı şartlarda voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 6×10^{-5} M benserazid'in voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{benserazid}}$

değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdği levodopa miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.33’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.31. Benserazid içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen voltamogram oranları türev DP Voltametrisi yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	DPV
1	24,99
2	23,85
3	24,29
4	24,17
5	24,34
X_{ort}	24,33
SS	0,42
% BSS	1,71
% BH	2,68

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve levodopa ve benserazid’i aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf benserazid ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.32’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.32. Benserazid içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tablet numunelerinde pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen DP voltamogram oranları türev yöntemleriyle elde edilen % geri kazanım sonuçları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
DPV	25,00	24,12	96,48
	25,00	24,03	96,12
	25,00	23,88	95,52
	25,00	23,76	95,04
	25,00	24,08	96,32
			X _{ort} : 95,90
			SS : 0,60
			% BSS : 0,63
			%BH: 4,10

Çizelge 3.33. Levodopa içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen voltamogram oranları türev DP Voltametrisi yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	DPV
1	97,83
2	99,74
3	98,77
4	99,29
5	98,77
X_{ort}	98,67
SS	0,71
% BSS	0,72
% BH	2,33

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve levodopa ve benserazid’i aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf levodopa ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.34’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.34. Levodopa içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tablet numunelerinde pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen voltamogram oranları türev DP Voltametrisi elde edilen % geri kazanım sonuçları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
DPV	100,00	101,40	101,40
	100,00	101,27	101,27
	100,00	101,03	101,03
	100,00	100,96	100,96
	100,00	100,71	100,71
			X _{ort} : 100,57
			SS : 0,70
			% BSS : 0,69
			%BH: -0,57

3.2.10. Amilorid'in ve Hidroklorotiazid'in DPV Tekniği ile Analiz Çalışmaları

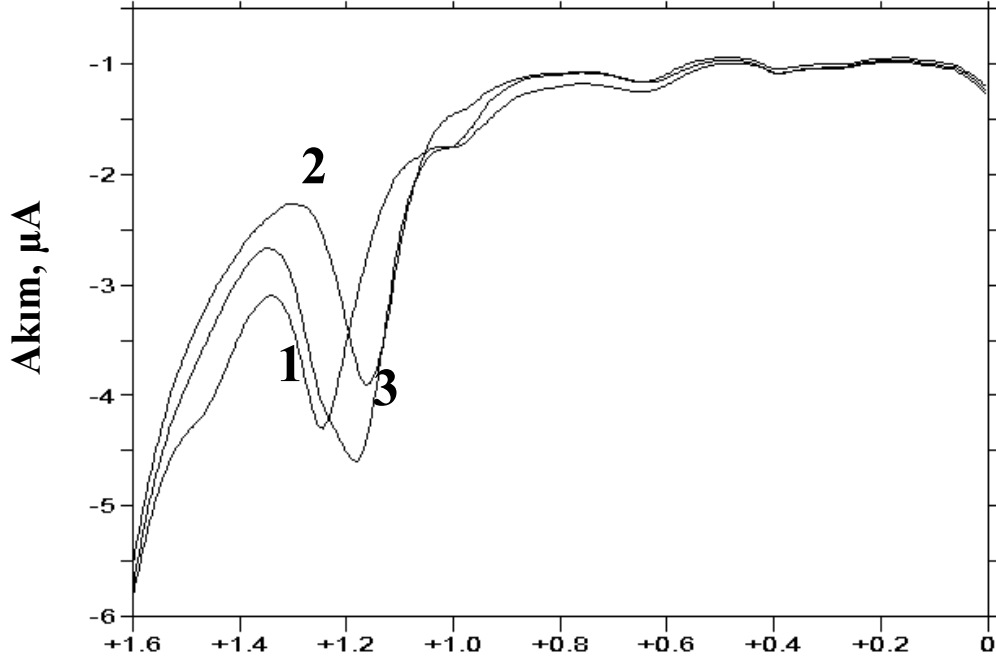
DPV tekniği ile çalışabilmek için önce en uygun koşullar saptandı. Bunun için yapılan tampon çözelti ve pH taramalarında en uygun ortam olarak pH 2,00 BR tamponu(% 20 MeOH) seçilmiştir. Bütün çalışmalarda pH 2.0 BR tamponu(% 20 MeOH) içerisindeki 1×10^{-4} M amilorid ve 1×10^{-4} M hidroklorotiazid çözeltileri kullanılmıştır. Tarama hızı $10-50 \text{ mVs}^{-1}$ aralığında, puls yüksekliği 25-75 mV aralığında değiştirilerek voltamogramlar elde edilmiştir. Elde edilen uygun parametreler aşığıdaki gibi belirlenmiştir;

Puls genliği: 50 mV; Tarama hızı: 25 mVs^{-1} Örnek genişliği: 17 ms; Puls periyodu: 200 ms.

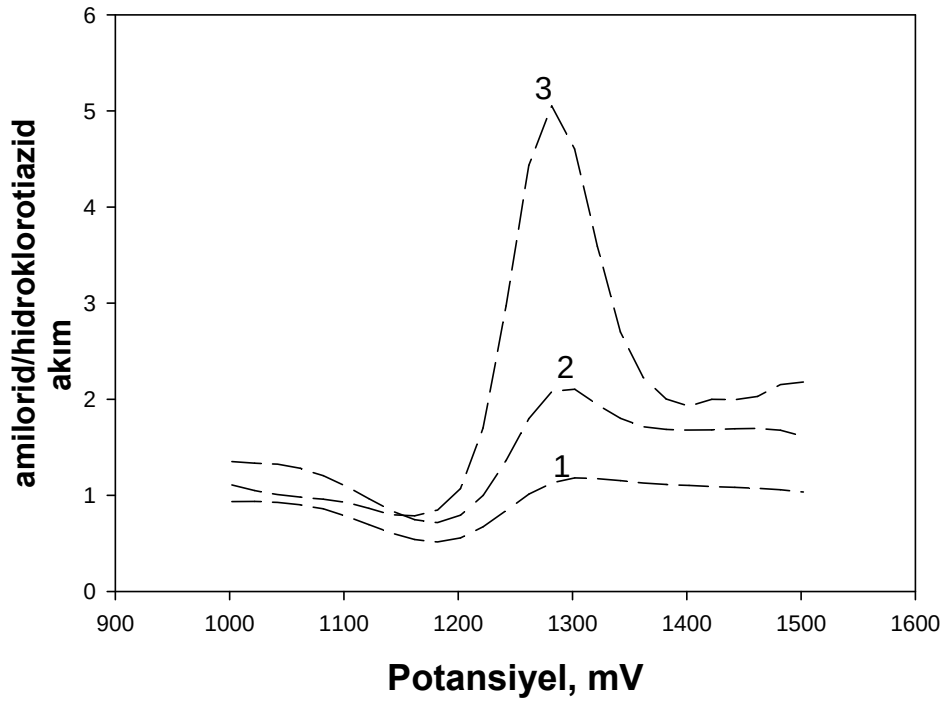
Amilorid'i tek başına içeren pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) çözeltisi içerisinde 1×10^{-5} M – 1×10^{-3} M derişim aralığında 25 mVs^{-1} tarama hızı ile DPV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan 1×10^{-4} M hidroklorotiazid'in DPV voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türevi eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.37'da verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 1250 mV bulunmuş ve amilorid'in analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{amilorid}}/dI_{\text{hidroklorotiazid}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.35'de kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.39.'da verilmiştir.

Benzer bir şekilde hidroklorotiazid'i tek başına içeren pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) çözeltisi içerisinde 1×10^{-5} M – 4×10^{-4} M derişim aralığında 25 mVs^{-1} tarama hızı ile DPV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan 2×10^{-5} M amilorid'in DPV voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türevi eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.38'da verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 1226 mV bulunmuş ve hidroklorotiazid'in analizi için türev eğrisi

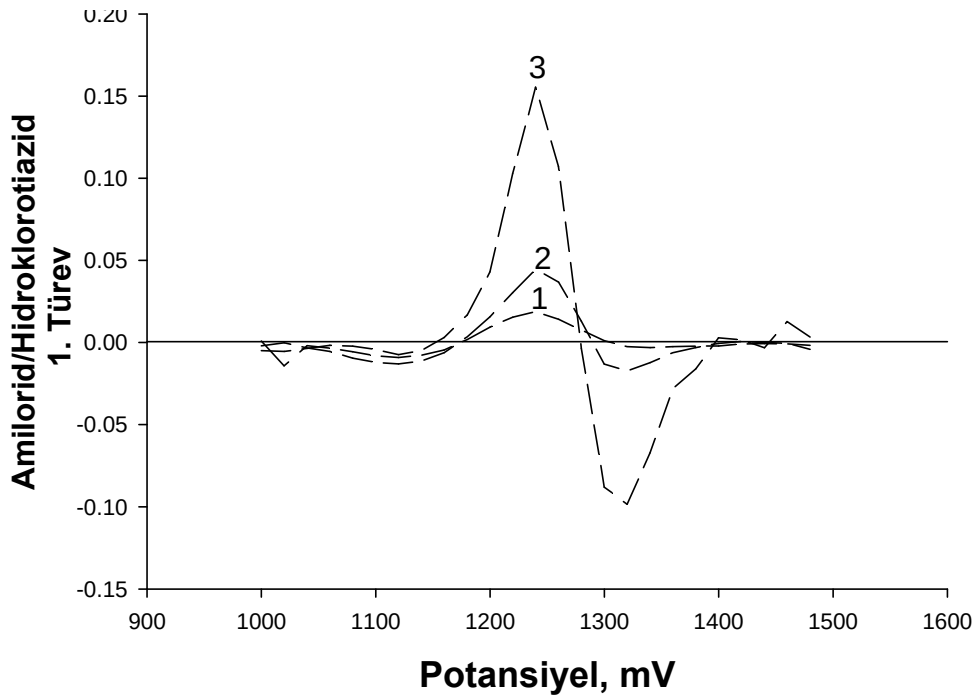
oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{hidroklorotiazid}}/dI_{\text{amilorid}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.36'de kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.39.'da verilmiştir.



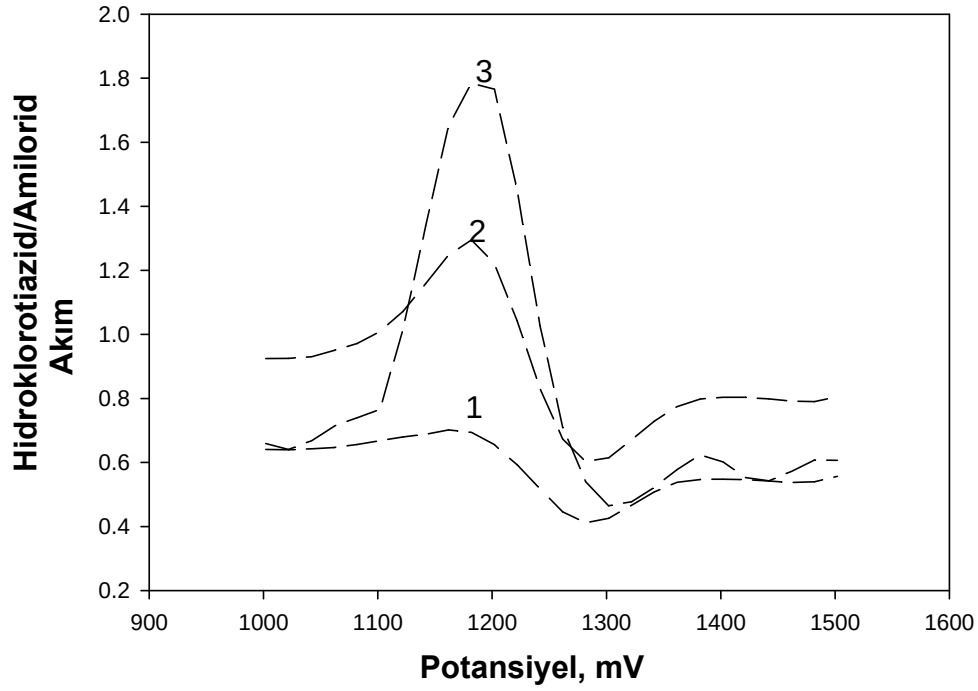
Şekil 3.36. pH 2,00 BR Tamponu (%20 MeOH) içerisinde 1) 2×10^{-5} M Amilorid; 2) 2×10^{-4} M Hidroklorotiazid; 3) 2×10^{-5} M Amilorid ve 2×10^{-4} M Hidroklorotiazid karışımı içeren DP voltamogramları



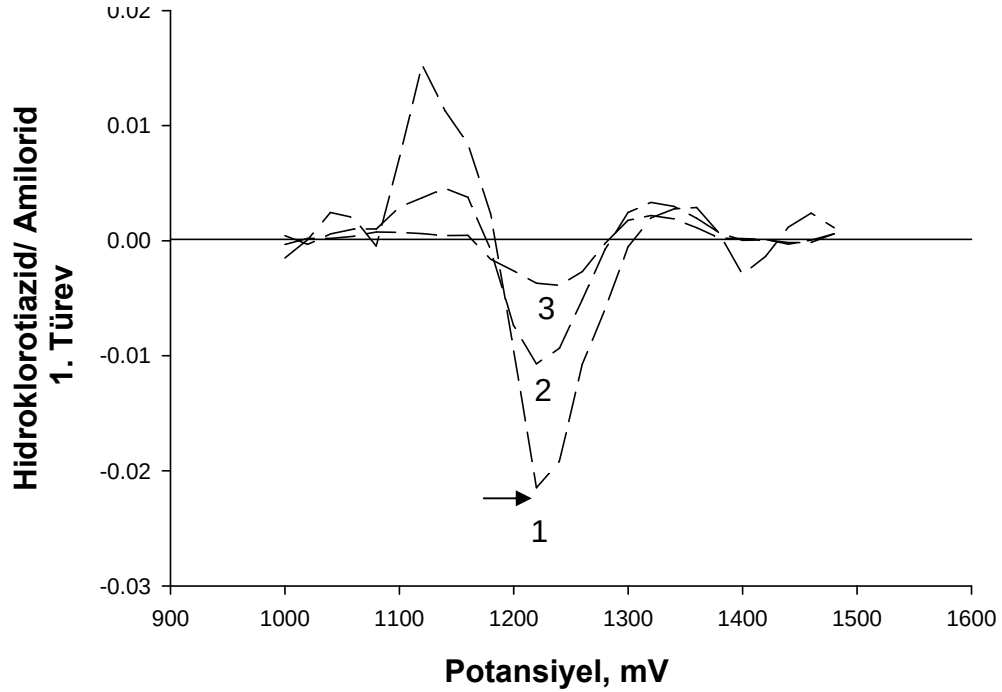
Şekil 3.37a. pH 2,00 BR Tamponu (%20 MeOH) içerisinde Amilorid/Hidroklorotiazid’in DP oran voltamogram eğrileri. 1) $2 \times 10^{-5} \text{ M}$; 2) $1 \times 10^{-4} \text{ M}$; 3) $6 \times 10^{-4} \text{ M}$ Amilorid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ Hidroklorotiazid.



Şekil 3.37b. pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Amilorid/Hidroklorotiazid’in DP oran voltamogramı türev eğrileri. 1) $2 \times 10^{-5} \text{ M}$; 2) $1 \times 10^{-4} \text{ M}$; 3) $6 \times 10^{-4} \text{ M}$ Amilorid ve bölücü derişimi $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ Hidroklorotiazid.



Şekil 3.38a. pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid’in DP oran voltamogram eğrileri. 1) 2×10^{-5} M; 2) 1×10^{-4} M; 3) 6×10^{-4} M Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi 2×10^{-4} M Amilorid.



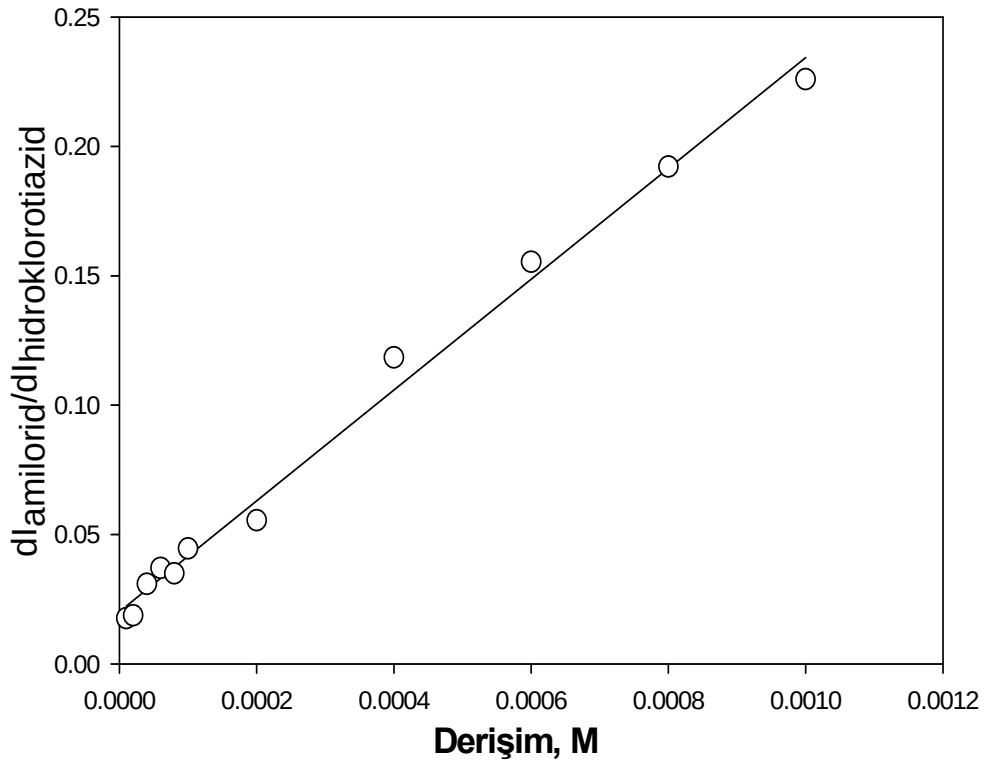
Şekil 3.38b. pH 2,00 BR Tamponu (%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid’in DP oran voltamogramı türev eğrileri. 1) 2×10^{-5} M; 2) 1×10^{-4} M; 3) 6×10^{-4} M Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi 2×10^{-4} M Amilorid.

Çizelge 3.35. Amilorid'in pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 1250 mV'da okunan akım değerleri.

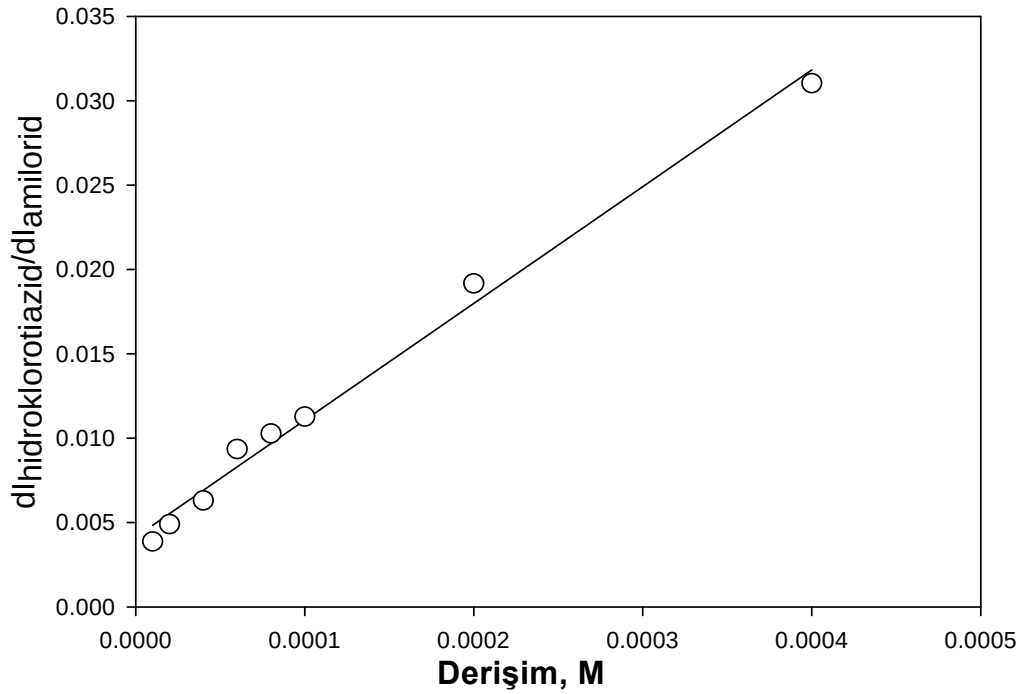
Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{amilorid}}/dI_{\text{hidroklorotiazid}}$)
1×10^{-5}	0,0177
2×10^{-5}	0,0188
4×10^{-5}	0,0310
6×10^{-5}	0,0371
8×10^{-5}	0,0350
1×10^{-4}	0,0446
2×10^{-4}	0,0555
4×10^{-4}	0,1184
6×10^{-4}	0,1554
8×10^{-4}	0,1922
1×10^{-3}	0,2259

Çizelge 3.36. Hidroklorotiazid'in pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 1226 mV'da okunan akım değerleri.

Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{hidroklorotiazid}}/dI_{\text{amilorid}}$)
1×10^{-5}	0,0039
2×10^{-5}	0,0049
4×10^{-5}	0,0063
6×10^{-5}	0,0094
8×10^{-5}	0,0103
1×10^{-4}	0,0113
2×10^{-4}	0,0192
4×10^{-4}	0,0310



Şekil 3.39a. $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ derişim aralığında Amilorid'in pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) çözeltisi içerisinde DP voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.



Şekil 3.39b. $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığında Hidroklorotiazid'in pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) çözeltisi içerisinde DP voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.

Elde edilen doğru denklemleri ise :

$$dI_{\text{amilorid}}/dI_{\text{hidroklorotiazid}} = 213,9 \text{ C(M)} + 0,0203,$$

$$dI_{\text{hidroklorotiazid}}/dI_{\text{amilorid}} = 69,09 \text{ C(M)} + 0,0042 \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Çizelge 3.35 ve Çizelge 3.36'daki DPV tekniği ile elde edilen verileri kullanarak lineer regresyon analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.37'de gösterilmiştir. Çizelge 3.37'de verilen yakalama sınırı (YS) ve tayin alt sınırı (TAS);

$$YS = 3,3 \times SS/m \quad ; \quad TAS = 10 \times SS/m$$

formüllerinden bulunmuştur. (Riley ve Rosanske,1996 ; Swartz,Krull,1997; Ermer ve Miller, 2005)

Bu formüllerde s, kalibrasyondaki en düşük derişimin bir üst derişiminde tekrarlanan sonuçların standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir.

Çizelge 3.37a. pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Amilorid'in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	DPV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	1250
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$)	213,9
Kesişim (μA)	0,0203
Korelasyon Katsayısı	0,995
Eğimin Standart Hatası	6,17
Kesişimin Standart Hatası	$2,77 \times 10^{-3}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$2,67 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$8,09 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,83
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,99
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,32
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,67

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5}\text{M}$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Çizelge 3.37b. pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid’in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	DPV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	1226
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$)	69,09
Kesişim (μA)	0,0042
Korelasyon Katsayısı	0,999
Eğimin Standart Hatası	2,77
Kesişimin Standart Hatası	$4,61 \times 10^{-4}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$2,35 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$7,11 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,67
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,79
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,65
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,87

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5}\text{M}$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin (diferansiyel puls voltametrisi) tekrar edilebilirlik düzeyini anlayabilmek için pik akımları ve potansiyelleri için gün içi ve günler arası (3 gün için) tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.37’de % BSS cinsinden gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar pik akımları ve pik potansiyelleri için tekrar edilebilirliğin iyi olduğunu kanıtlamaktadır. Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde iyi sonuçların elde edilmesi, amilorid ve hidroklorotiazid’i aynı anda içeren ticari preparatlardan amilorid’in ve hidroklorotiazid’in hiçbir ayırma işlemi yapılmadan miktar tayininin bu yöntemle gerçekleştirilebileceği göstermiştir.

3.2.11. Amilorid-Hidroklorotiazid ikili Karışımı için Geliştirilen Voltamogram Oranları Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları

Amilorid’in tayini için geliştirilen DP Voltamogram oranları türev voltametrik tekniklerin piyasa preparatlarına uygulanabilirliği araştırılmıştır. Amilorid için farmakopelerde herhangi bir analiz yöntemi önerilmediği ve tablet katkı maddelerinin yöneme bir etkisinin olup olmadığını anlamak için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Amilorid içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf Amilorid çözeltileri ile aynı şartlarda voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 1×10^{-4} M hidroklorotiazid’in voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{amilorid}}/dI_{\text{hidroklorotiazid}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği amilorid miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.38’de gösterilmiştir.

Benzer bir şekilde hidroklorotiazid içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf hidroklorotiazid çözeltileri ile aynı şartlarda voltamogramları

alınmıştır. Bu eğriler 2×10^{-5} M amilorid'in voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{hidroklorotiazid}}/dI_{\text{amilorid}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği hidroklorotiazid miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.40'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.38. Hidroklorotiazid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen voltamogram oranları türev DP Oranları Türev Voltametrisi yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	DPV
1	48,93
2	49,13
3	49,33
4	50,23
5	50,77
X_{ort}	49,68
SS	0,79
% BSS	1,58
% BH	0,64

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve amilorid ve hidroklorotiazid’i aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf hidroklorotiazid ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.39’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.39. Hidroklorotiazid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen voltamogram oranları türev DP Oranları Türev Voltametrisi yöntemleriyle elde edilen geri kazanım sonuçları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
DPV	50,00	50,40	100,80
	50,00	50,77	101,54
	50,00	50,28	100,56
	50,00	49,92	99,84
	50,00	50,63	101,26
			X _{ort} : 100,80
			SS : 0,66
			% BSS : 0,65
			%BH: -0,80

Çizelge 3.40. Amilorid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen voltamogram oranları türev DP Oranları Türev Voltametrisi yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	DPV
1	4,89
2	4,81
3	4,78
4	5,20
5	5,07
X_{ort}	4,95
SS	0,18
% BSS	3,62
% BH	1,00

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve amilorid ve hidroklorotiazid’i aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf amilorid ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.41’de gösterilmiştir.

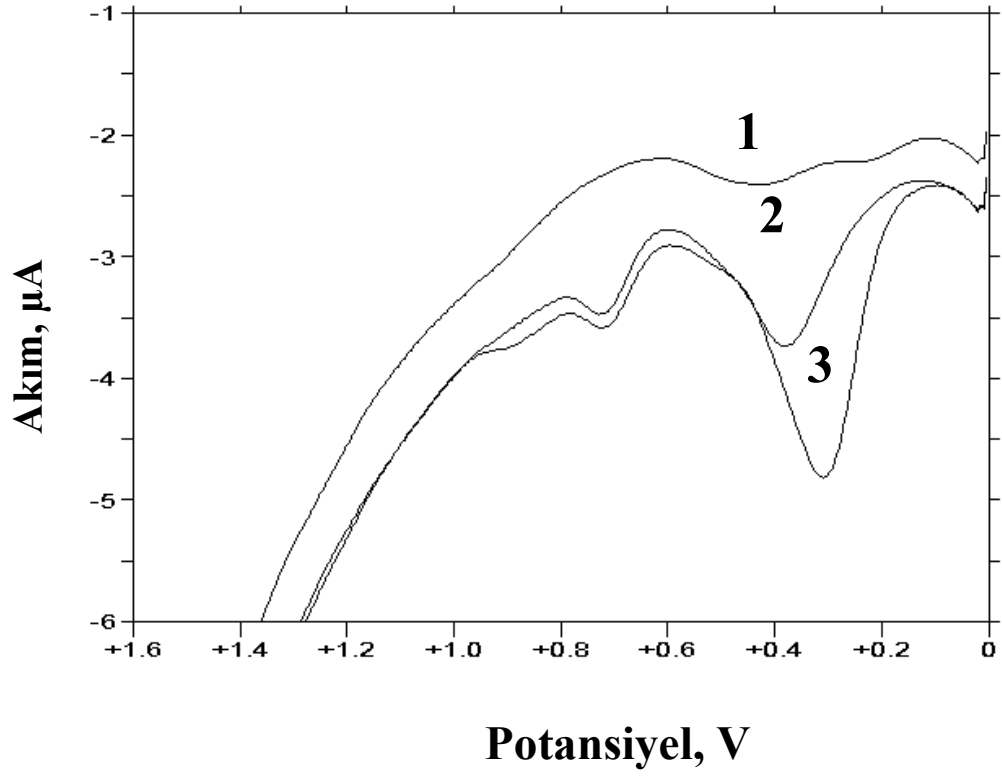
Çizelge 3.41. Amilorid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen voltamogram oranları türev DP Oranları Türev Voltametrisi yöntemleriyle elde edilen analiz bulguları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
DPV	5,00	4,92	98,40
	5,00	5,07	101,40
	5,00	5,12	102,40
	5,00	4,93	98,60
	5,00	4,89	97,80
			X _{ort} : 99,72
			SS : 2,04
			% BSS : 2,05
			%BH: 0,28

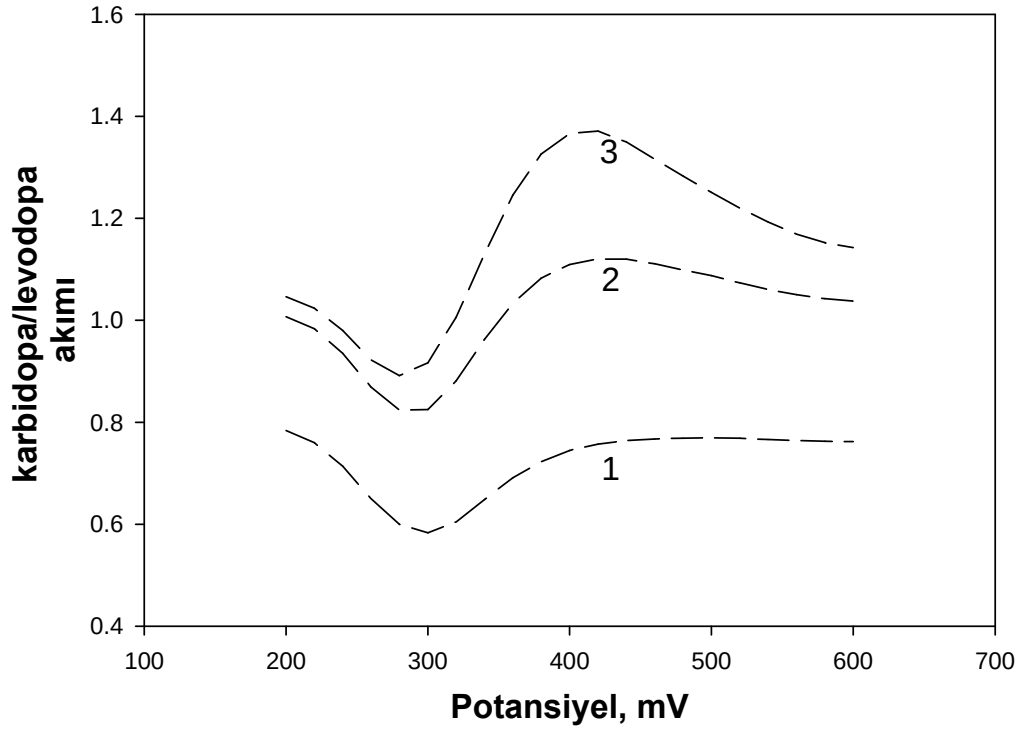
3.2.12. Karbidopa'nın ve Levodopa'nın KDV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları

Kare dalga voltametrisi tekniği ile de Karbidopa'yı tek başına içeren pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde $1 \times 10^{-5} \text{M} - 4 \times 10^{-4} \text{M}$ derişim aralığında 50 mVs^{-1} tarama hızı ile KDV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan $2 \times 10^{-5} \text{M}$ levodopa'nın KD voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türev eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.41'da verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 324 mV bulunmuş ve karbidopa'nın analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{karbidopa}}/dI_{\text{levodopa}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.42'de kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.43a'da verilmiştir.

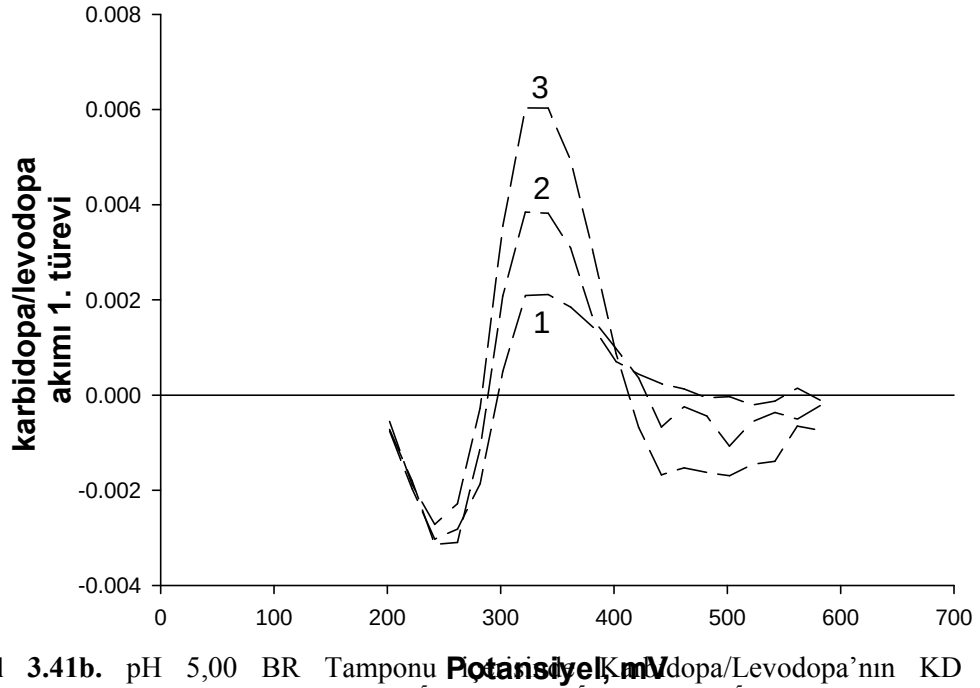
Benzer bir şekilde levodopa'yı tek başına içeren pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde $1 \times 10^{-5} \text{M} - 8 \times 10^{-5} \text{M}$ derişim aralığında 50 mVs^{-1} tarama hızı ile KDV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan $6 \times 10^{-5} \text{M}$ karbidopa'nın KD voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türev eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.42'de verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 316 mV bulunmuş ve levodopa'nın analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{karbidopa}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.43'de kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.43b.'de verilmiştir.



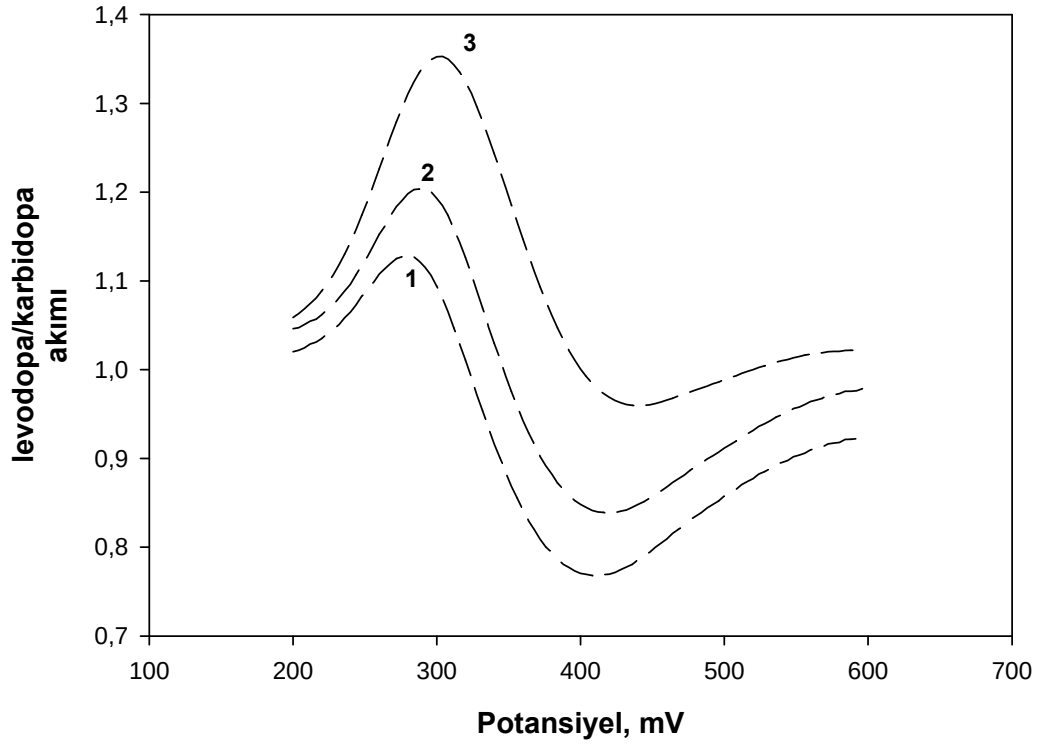
Şekil 3.40. 1) 2×10^{-5} M levodopa 2) 6×10^{-5} M karbidopa 3) 2×10^{-5} M levodopa ve 6×10^{-5} M karbidopa pH 5,00 BR tamponu içinde KD voltamogramları



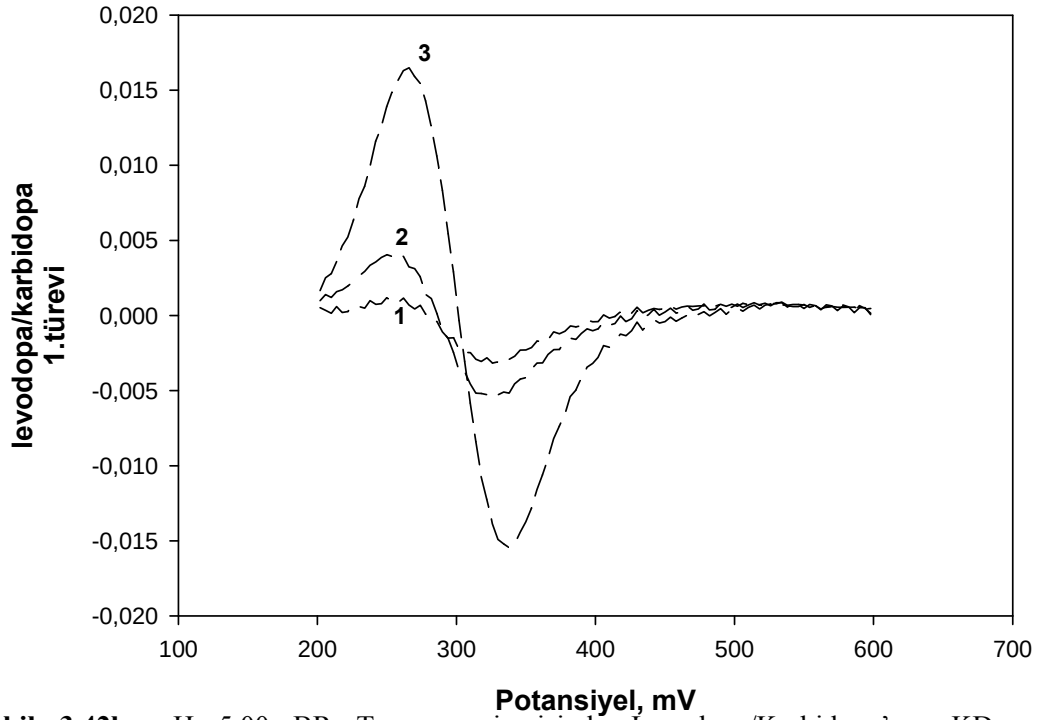
Şekil 3.41a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın KD oran voltamogram eğrileri. 1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa.



Şekil 3.41b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa/Levodopa'nın KD oran voltamogramı 1. türev eğrileri. 1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa ve bölücü derişimi $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa.



Şekil 3.42a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın KD oran voltamogram eğrileri. 1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $4 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa



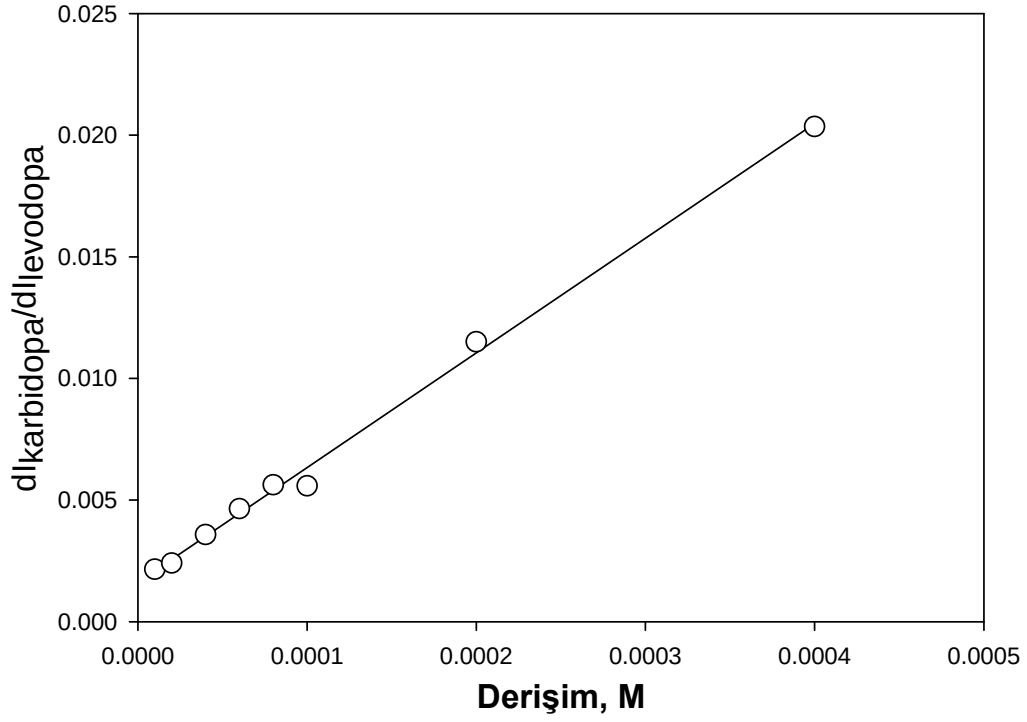
Şekil 3.42b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa/Karbidopa'nın KD oran voltamogram türev eğrileri.1) $1 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $4 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa ve bölücü derişimi $6 \times 10^{-5} \text{M}$ Karbidopa.

Çizelge 3.42. Karbidopa'nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 324 mV'da okunan akım değerleri.

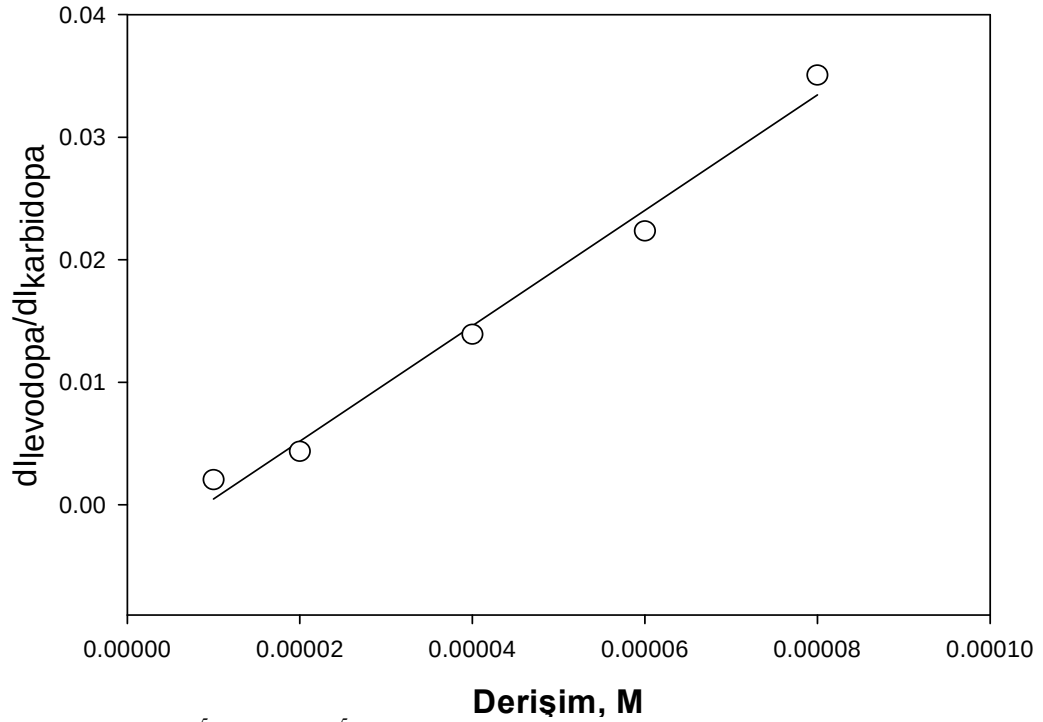
Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{karbidopa}}/dI_{\text{levodopa}}$)
1×10^{-5}	0,0022
2×10^{-5}	0,0029
4×10^{-5}	0,0041
6×10^{-5}	0,0046
8×10^{-5}	0,0065
1×10^{-4}	0,0068
2×10^{-4}	0,0115
4×10^{-4}	0,0204

Çizelge 3.43. Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 316 mV'da okunan akım değerleri.

Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{karbidopa}}$)
1×10^{-5}	0,0018
2×10^{-5}	0,0041
4×10^{-5}	0,0139
6×10^{-5}	0,0221
8×10^{-5}	0,0351



Şekil 3.43a. $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığında Karbidopa'nın pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde KD voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.



Şekil 3.43b. $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ derişim aralığında Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde KD voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.

Elde edilen doğru denklemleri ise :

$$dI_{\text{karbidopa}}/dI_{\text{levodopa}} = 46,12 \text{ C(M)} + 0.0021 ,$$

$$dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{karbidopa}} = 474,40 \text{ C(M)} + 0,0045 \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Çizelge 3.42 ve Çizelge 3.43'deki KDV tekniği ile elde edilen verileri kullanarak analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.44'de gösterilmiştir. Çizelge 3.44'de verilen yakalama sınırı (YS) ve tayin alt sınırı (TAS);

$$YS = 3,3 \times SS/m \quad ; \quad TAS = 10 \times SS/m$$

formüllerinden bulunmuştur. (Riley ve Rosanske,1996 ; Swartz,Krull,1997; Ermer ve Miller, 2005)

Bu formüllerde s, kalibrasyondaki en düşük derişimin bir üst derişiminde tekrarlanan sonuçların standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir.

Çizelge 3.44a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Karbidopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	KDV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	324
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$)	46,12
Kesişim (μA)	0,0021
Korelasyon Katsayısı	0,994
Eğimin Standart Hatası	1,06
Kesişimin Standart Hatası	$1,77 \times 10^{-4}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$2,91 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$8,81 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,39
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,48
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,17
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,24

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5} \text{M}$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Çizelge 3.44b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	KDV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	316
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$)	474,40
Kesişim (μA)	0,0045
Korelasyon Katsayısı	0,994
Eğimin Standart Hatası	31,44
Kesişimin Standart Hatası	$1,55 \times 10^{-3}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$3,08 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$9,34 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,71
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,27
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,92
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,32

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5} \text{M}$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin (kare dalga voltamogram oranları türev voltametrisi) tekrar edilebilirlik düzeyini anlayabilmek için pik akımları ve potansiyelleri için gün içi ve günler arası (3 gün için) tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.44’de % BSS cinsinden gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar pik akımları ve pik potansiyelleri için tekrar edilebilirliğin iyi olduğunu kanıtlamaktadır. Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde iyi sonuçların elde edilmesi, karbidopa ve levodopa’yı aynı anda içeren ticari preparatlardan karbidopa’nın ve levodopa’nın hiçbir ayırma işlemi yapılmadan miktar tayininin bu yöntemle gerçekleştirilebileceği göstermiştir.

3.2.13. Karbidopa-Levodopa Karışımı için Geliştirilen Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları

Karbidopa’nın tayini için geliştirilen KD Voltamogram oranları türev voltametrik tekniklerin piyasa preparatlarına uygulanabilirliği araştırılmıştır. Karbidopa için farmakopelerde herhangi bir analiz yöntemi önerilmediği ve tablet katkı maddelerinin yöneme bir etkisinin olup olmadığını anlamak için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Karbidopa içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf karbidopa çözeltileri ile aynı şartlarda KD voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 2×10^{-5} M levodopa’nın KD voltamogramlarına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{karbidopa}}/dI_{\text{levodopa}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği karbidopa miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.45’de gösterilmiştir.

Benzer bir şekilde Levodopa içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf

levodopa çözeltileri ile aynı şartlarda KD voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 6×10^{-5} M karbidopa'nın KD voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{karbidopa}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği levodopa miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.47'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.45. Karbidopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	KDV
1	24,61
2	24,82
3	24,90
4	25,02
5	24,77
X_{ort}	24,82
SS	0,153
% BSS	0,615
% BH	0,72

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan karbidopa-levodopa karışımını içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf karbidopa ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.46’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.46. Karbidopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tablet numunelerinde pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen % geri kazanım sonuçları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
KDV	25,00	25,09	100,36
	25,00	25,24	100,96
	25,00	25,19	100,76
	25,00	24,87	99,48
	25,00	24,99	99,96
			X _{ort} : 100,30
			SS : 0,60
			% BSS : 0,60
			%BH: -0,30

Çizelge 3.47. Levodopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	KDV
1	248,16
2	248,36
3	249,01
4	248,44
5	245,00
X_{ort}	247,80
SS	1,59
% BSS	0,64
% BH	0,88

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve levodopa ve karbidopa’yı aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf levodopa ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.48’de gösterilmiştir.

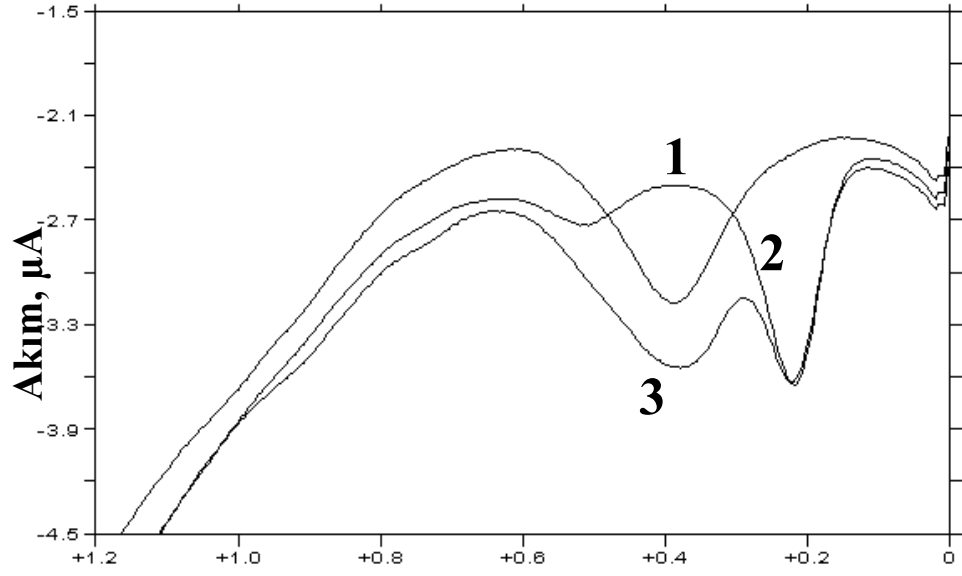
Çizelge 3.48. Levodopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tablet numunelerinde pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen % geri kazanım sonuçları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
KDV	100,00	100,48	100,48
	100,00	100,83	100,83
	100,00	100,97	100,97
	100,00	100,16	100,16
	100,00	100,49	100,49
			X _{ort} : 100,59
			SS : 0,32
			% BSS : 0,32
			%BH: -0,59

3.2.14. Benserazid'in ve Levodopa'nın KDV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları

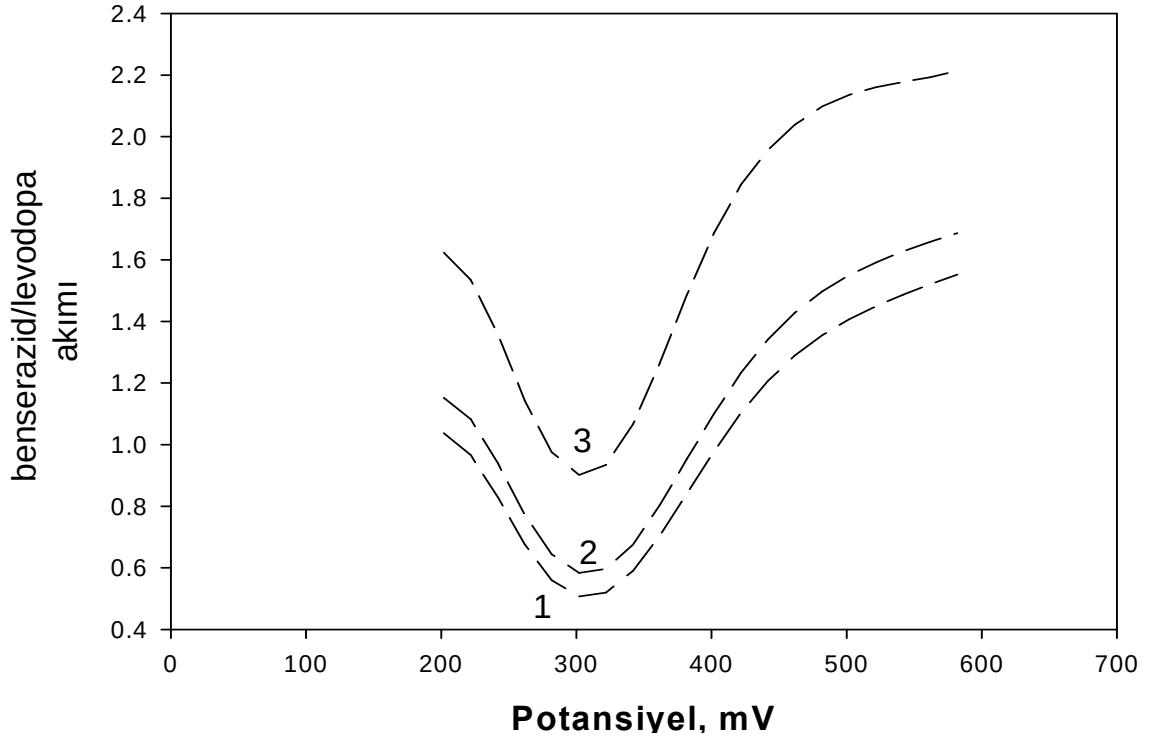
Kare dalga voltametrisi tekniği ile de Benserazid'i tek başına içeren pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde $1 \times 10^{-5} \text{M} - 2 \times 10^{-4} \text{M}$ derişim aralığında 50 mVs^{-1} tarama hızı ile KDV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan $8 \times 10^{-5} \text{M}$ levodopa'nın KD voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türev eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.45'de verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 362 mV bulunmuş ve benserazid'in analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{benserazid}}/dI_{\text{levodopa}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.49'da kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.47a'da verilmiştir.

Benzer bir şekilde levodopa'yı tek başına içeren pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde $1 \times 10^{-5} \text{M} - 8 \times 10^{-5} \text{M}$ derişim aralığında 50 mVs^{-1} tarama hızı ile KDV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan $6 \times 10^{-5} \text{M}$ benserazid'in KD voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türevi eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.46'da verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 340 mV bulunmuş ve levodopa'nın analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{benserazid}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.50'de kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.47b.'de verilmiştir.

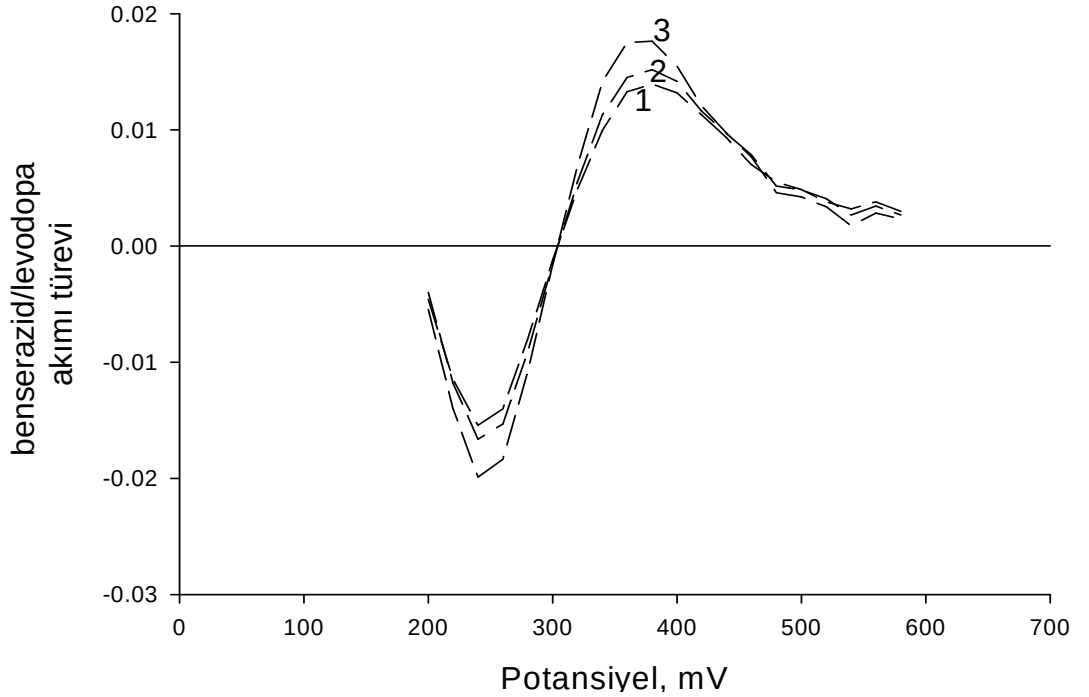


Potansiyel, V

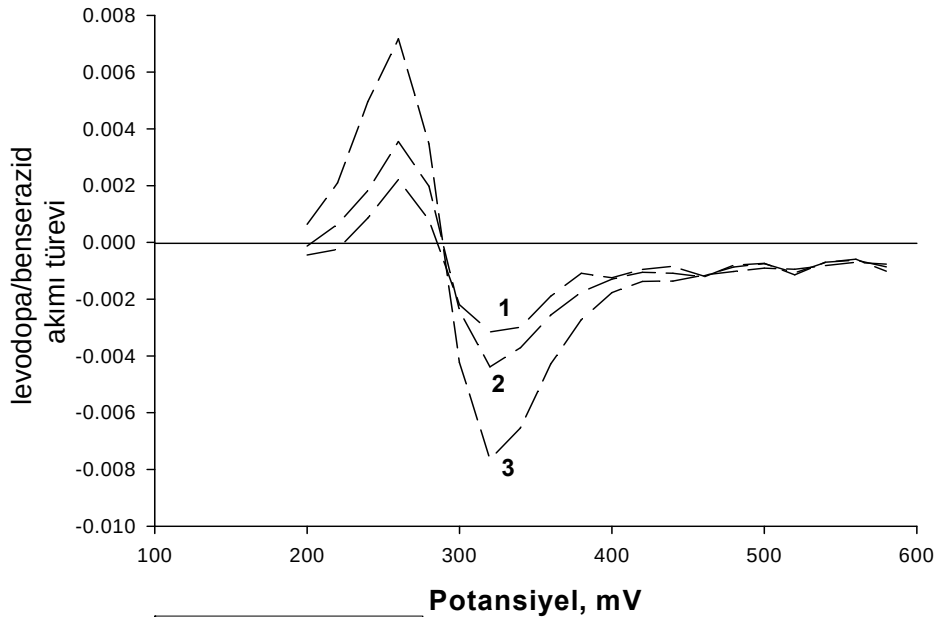
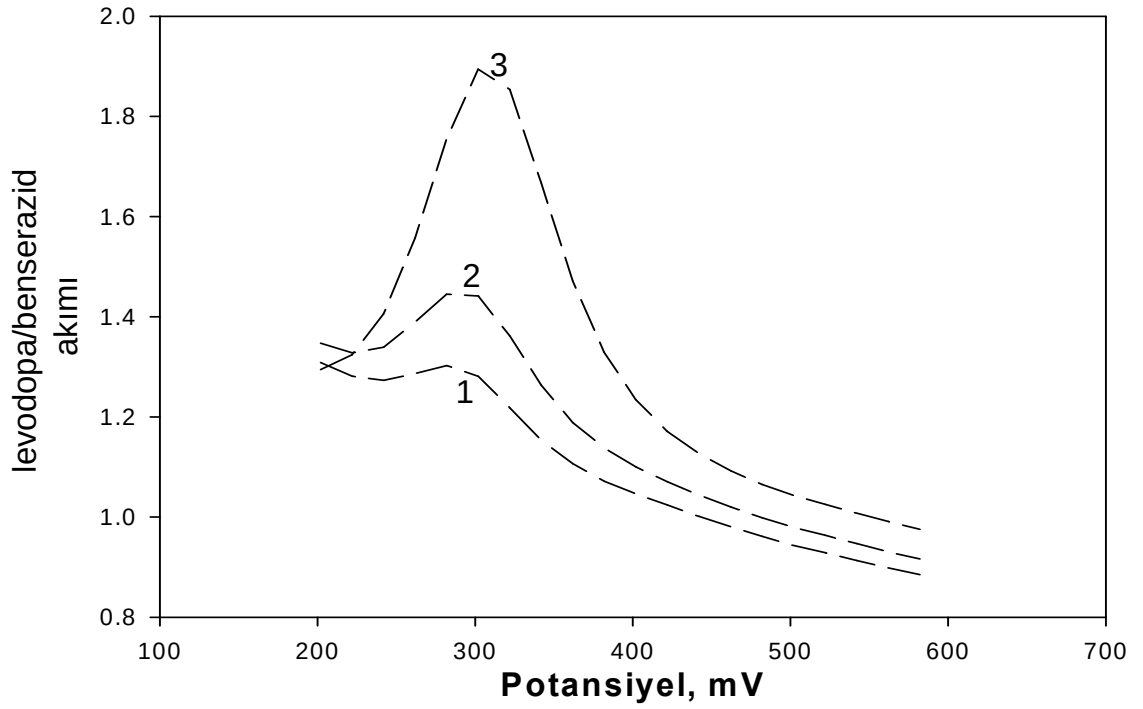
Şekil 3.44. 1) 6×10^{-5} M levodopa 2) 2×10^{-5} M benserazid 3) 6×10^{-5} M levodopa ve 2×10^{-5} M benserazid pH 5,00 BR tamponu içinde KD voltamogramları



Şekil 3.45a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın KD oran voltamogram eğrileri. 1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Benserazid ve bölücü derişimi $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa.



Şekil 3.45b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid/Levodopa'nın KD oran voltamogram türev eğrileri. 1) $2 \times 10^{-5} \text{M}$; 2) $4 \times 10^{-5} \text{M}$; 3) $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Benserazid ve bölücü derişimi $8 \times 10^{-5} \text{M}$ Levodopa.

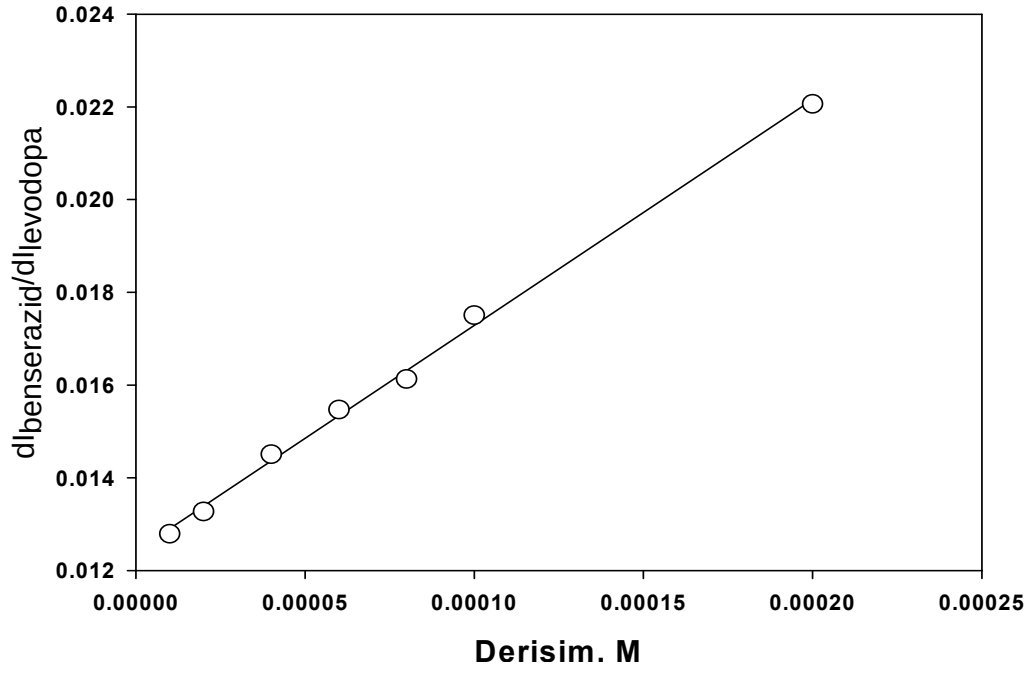


Çizelge 3.49. Benserazid'in pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 362 mV'da okunan akım değerleri.

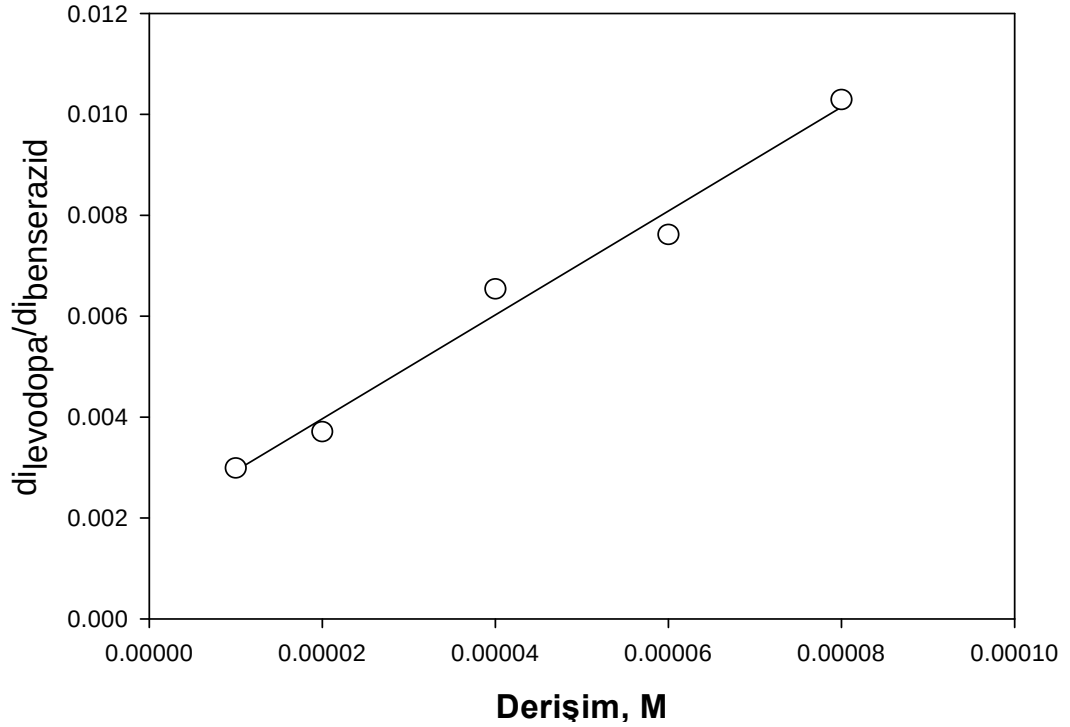
Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{benserazid}}/dI_{\text{levodopa}}$)
1×10^{-5}	0,0128
2×10^{-5}	0,0133
4×10^{-5}	0,0145
6×10^{-5}	0,0155
8×10^{-5}	0,0161
1×10^{-4}	0,0175
2×10^{-4}	0,0221

Çizelge 3.50. Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 340 mV'da okunan akım değerleri.

Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{benserazid}}$)
1×10^{-5}	0,0030
2×10^{-5}	0,0037
4×10^{-5}	0,0065
6×10^{-5}	0,0087
8×10^{-5}	0,0103



Şekil 3.47a. $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığında Benserazid'in pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde KD voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.



Şekil 3.47b. $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ derişim aralığında Levodopa'nın pH 5,00 BR Tamponu çözeltisi içerisinde KD voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiğı.

Elde edilen doğru denklemleri ise :

$$dI_{\text{benserazid}}/dI_{\text{levodopa}} = 48,77 \text{ C(M)} + 0,0124 ,$$

$$dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{benserazid}} = 109,00 \text{ C(M)} + 0,0019 \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Çizelge 3.49 ve Çizelge 3.50'deki KDV tekniği ile elde edilen verileri kullanarak analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.51'de gösterilmiştir. Çizelge 3.50'de verilen yakalama sınırı (YS) ve tayin alt sınırı (TAS);

$$YS = 3,3 \times SS/m \quad ; \quad TAS = 10 \times SS/m$$

formüllerinden bulunmuştur. (Riley ve Rosanske,1996 ; Swartz,Krull,1997; Ermer ve Miller, 2005)

Bu formüllerde s, kalibrasyondaki en düşük derişimin bir üst derişiminde tekrarlanan sonuçların standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir.

Çizelge 3.51a. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Benserazid'in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	KDV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	362
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$
Eğim ($\mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$)	48,77
Kesişim (μA)	0,0124
Korelasyon Katsayısı	0,998
Eğimin Standart Hatası	1,12
Kesişimin Standart Hatası	$1,06 \times 10^{-4}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$2,62 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$7,93 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,47
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,56
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,00
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,19

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5} \text{M}$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Çizelge 3.51b. pH 5,00 BR Tamponu içerisinde Levodopa'nın elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	KDV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	340
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5}$
Eğim ($\mu A \cdot M^{-1}$)	109,0
Kesişim (μA)	0,0019
Korelasyon Katsayısı	0,996
Eğimin Standart Hatası	6,09
Kesişimin Standart Hatası	$2,99 \times 10^{-4}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$2,89 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$8,77 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,81
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,05
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,99
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,28

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5} M$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin (kare dalga voltamogram oranları türev voltametrisi) tekrar edilebilirlik düzeyini anlayabilmek için pik akımları ve potansiyelleri için gün içi ve günler arası (3 gün için) tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.51’de % BSS cinsinden gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar pik akımları ve pik potansiyelleri için tekrar edilebilirliğin iyi olduğunu kanıtlamaktadır. Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde iyi sonuçların elde edilmesi, benserazid ve levodopa’yı aynı anda içeren ticari preparatlardan benserazid’in ve levodopa’nın hiçbir ayırma işlemi yapılmadan miktar tayininin bu yöntemle gerçekleştirilebileceği göstermiştir.

3.2.15. Benserazid-Levodopa Karışımı için Geliştirilen Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları

Benserazid’in tayini için geliştirilen KD Voltamogram oranları türev voltametrik tekniklerin piyasa preparatlarına uygulanabilirliği araştırılmıştır. Benserazid için farmakopelerde herhangi bir analiz yöntemi önerilmediği ve tablet katkı maddelerinin yönetime bir etkisinin olup olmadığını anlamak için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Benserazid içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf benserazid çözeltileri ile aynı şartlarda KD voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 8×10^{-5} M levodopa’nın KD voltamogramlarına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{benserazid}}/dI_{\text{levodopa}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği benserazid miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.52’de gösterilmiştir.

Benzer bir şekilde Levodopa içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf

levodopa çözeltileri ile aynı şartlarda KD voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 6×10^{-5} M benserazid'in KD voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{levodopa}}/dI_{\text{benserazid}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği levodopa miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.54'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.52. Benserazid içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	KDV
1	24,73
2	23,89
3	24,34
4	24,22
5	24,49
X_{ort}	24,33
SS	0,31
% BSS	1,29
% BH	2,68

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve levodopa ve benserazid’i aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf benserazid ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.53’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.53. Benserazid içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tablet numunelerinde pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen % geri kazanım sonuçları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
KDV	25,00	24,00	96,00
	25,00	24,41	97,64
	25,00	24,12	96,48
	25,00	24,63	98,52
	25,00	24,77	99,08
			X _{ort} : 97,54
			SS : 1,31
			% BSS : 1,34
			%BH: 2,64

Çizelge 3.54. Levodopa içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerin pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	KDV
1	98,42
2	99,19
3	98,92
4	99,32
5	99,18
X_{ort}	99,01
SS	0,36
% BSS	0,39
% BH	0,99

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve levodopa ve benserazid’i aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf levodopa ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.55’de gösterilmiştir.

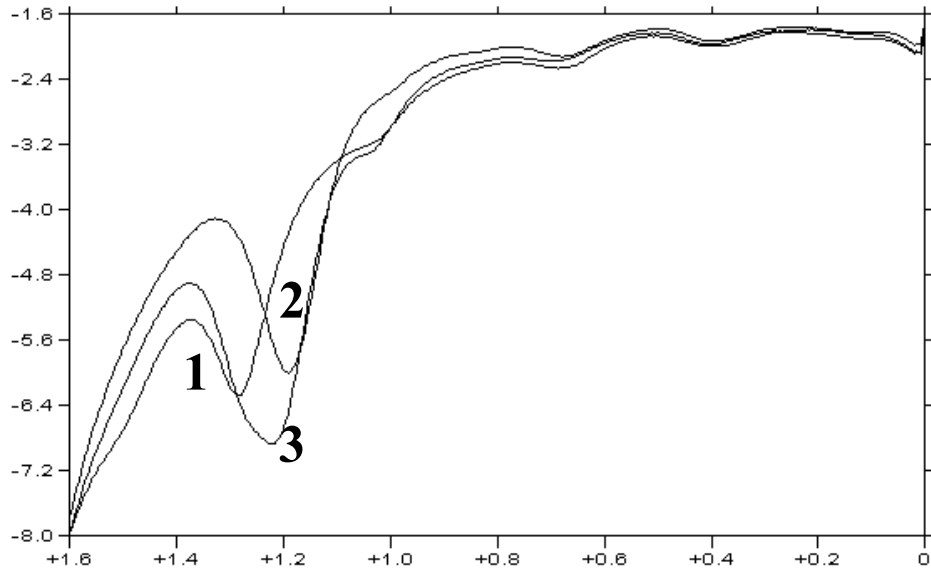
Çizelge 3.55. Levodopa içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tablet numunelerinde pH 5,00 BR Tamponu içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen % geri kazanım sonuçları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
KDV	100,00	101,86	101,86
	100,00	101,13	101,13
	100,00	101,22	101,22
	100,00	100,84	100,84
	100,00	100,84	100,84
			X _{ort} : 101,18
			SS : 0,42
			% BSS : 0,42
			%BH: -1,18

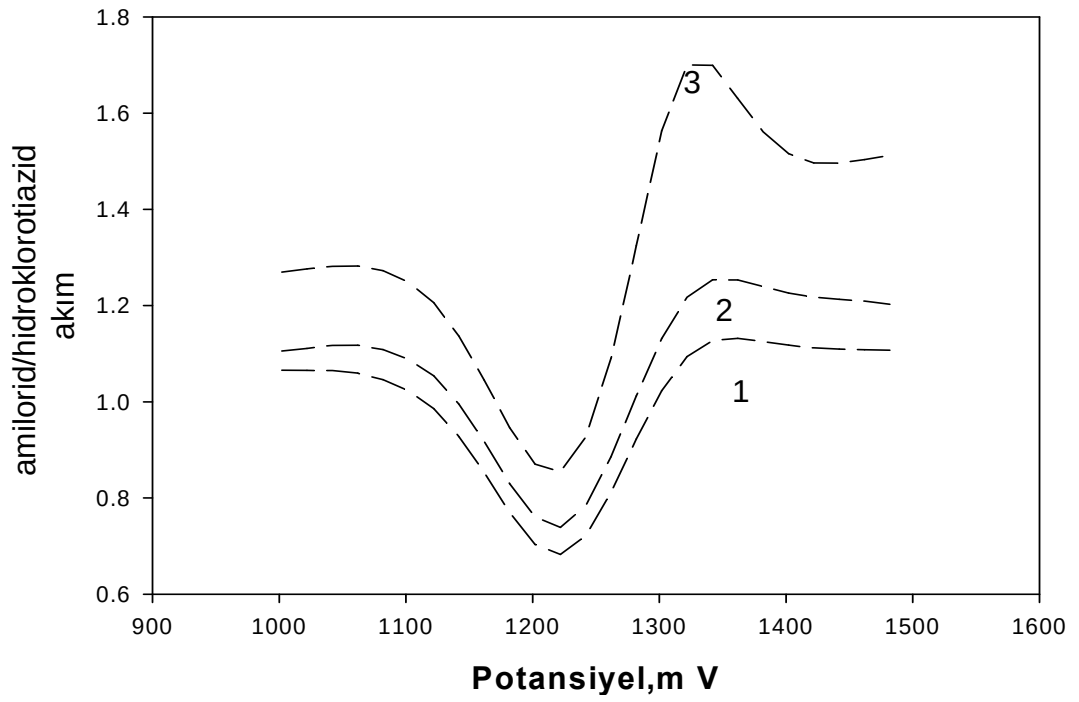
3.2.14. Amilorid'in ve Hidroklorotiazid'in KDV Tekniği ile Aynı Anda Analiz Çalışmaları

Kare dalga voltametrisi tekniği ile de Amilorid'i tek başına içeren pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) çözeltisi içerisinde $1 \times 10^{-5} \text{M} - 4 \times 10^{-4} \text{M}$ derişim aralığında 50 mVs^{-1} tarama hızı ile KDV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan $1 \times 10^{-4} \text{M}$ hidroklorotiazid'in KD voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türev eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.49'da verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 1280 mV bulunmuş ve amilorid'in analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{amilorid}}/dI_{\text{hidroklorotiazid}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.56'da kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.51a.'da verilmiştir.

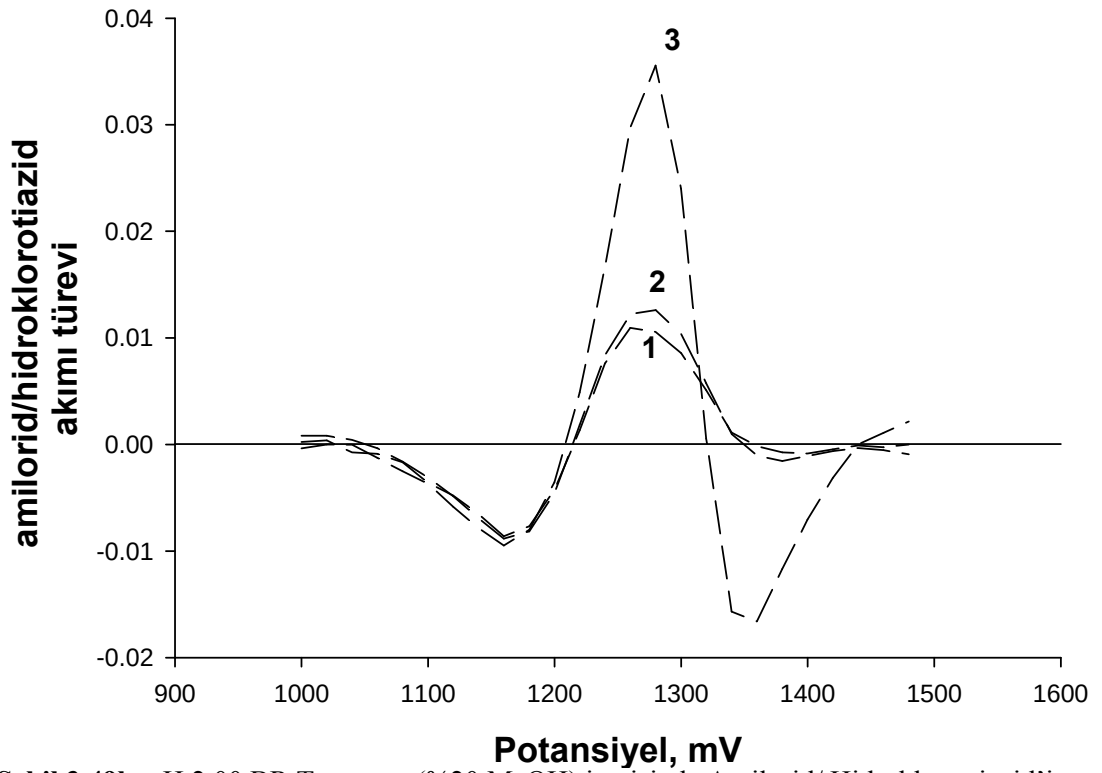
Benzer bir şekilde hidroklorotiazid'i tek başına içeren pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) çözeltisi içerisinde $1 \times 10^{-5} \text{M} - 1 \times 10^{-4} \text{M}$ derişim aralığında 50 mVs^{-1} tarama hızı ile KDV eğrileri elde edilmiştir. Daha sonra Microsoft Excel® yardımıyla daha önceden kaydedilmiş olan $1 \times 10^{-4} \text{M}$ amilorid'in KD voltamogramına bölünmüş ve yine Microsoft Excel® yardımıyla her bir derişimin birinci türevi eğrileri oluşturulmuş ve bunlar Şekil 3.50'de verilmiştir. En uygun pik potansiyeli olarak 1260 mV bulunmuş ve hidroklorotiazid'in analizi için türev eğrisi oluşturulan oran voltamogramı derişimlerinde bu pik potansiyellerinde okumalar gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Birinci türev eğrilerinden elde edilen $dI_{\text{hidroklorotiazid}}/dI_{\text{amilorid}}$ değerlerinin, derişimle (C) değişimi Çizelge 3.57'de kalibrasyon grafiği ise Şekil 3.51b.'de verilmiştir.



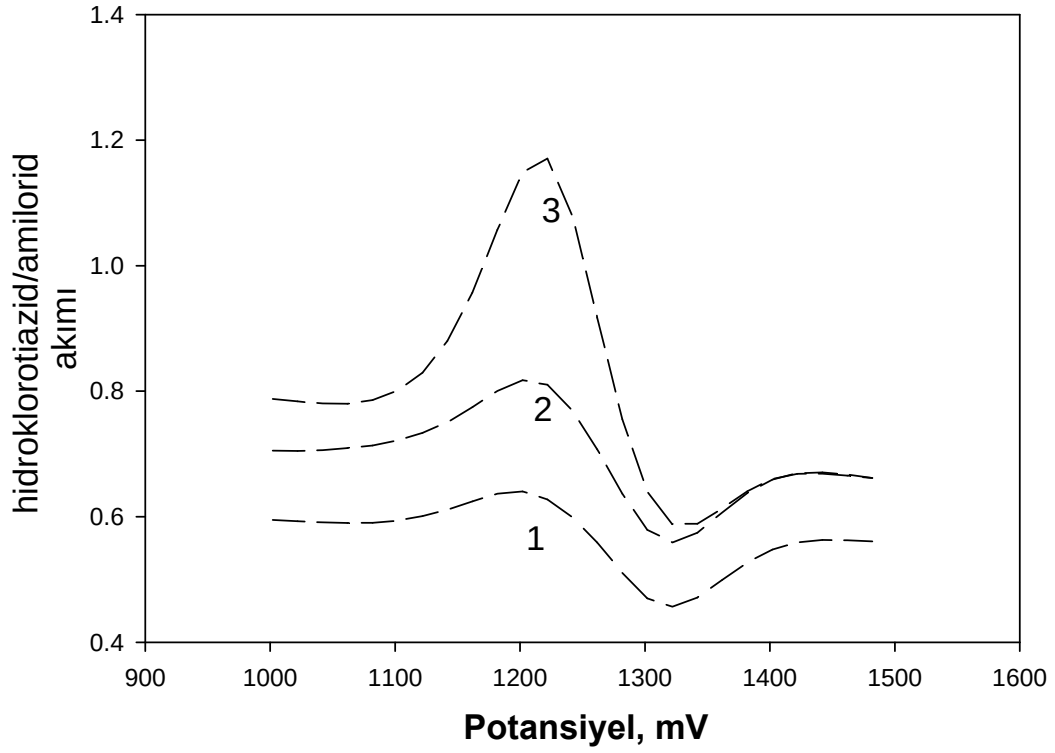
Şekil 3.48. 1) 1×10^{-4} M amilorid 2) 1×10^{-4} M hidroklorotiazid 3) 1×10^{-4} M amilorid ve 1×10^{-4} M hidroklorotiazid pH 2,00 BR tamponu(%20 MeOH) içinde KD voltamogramları



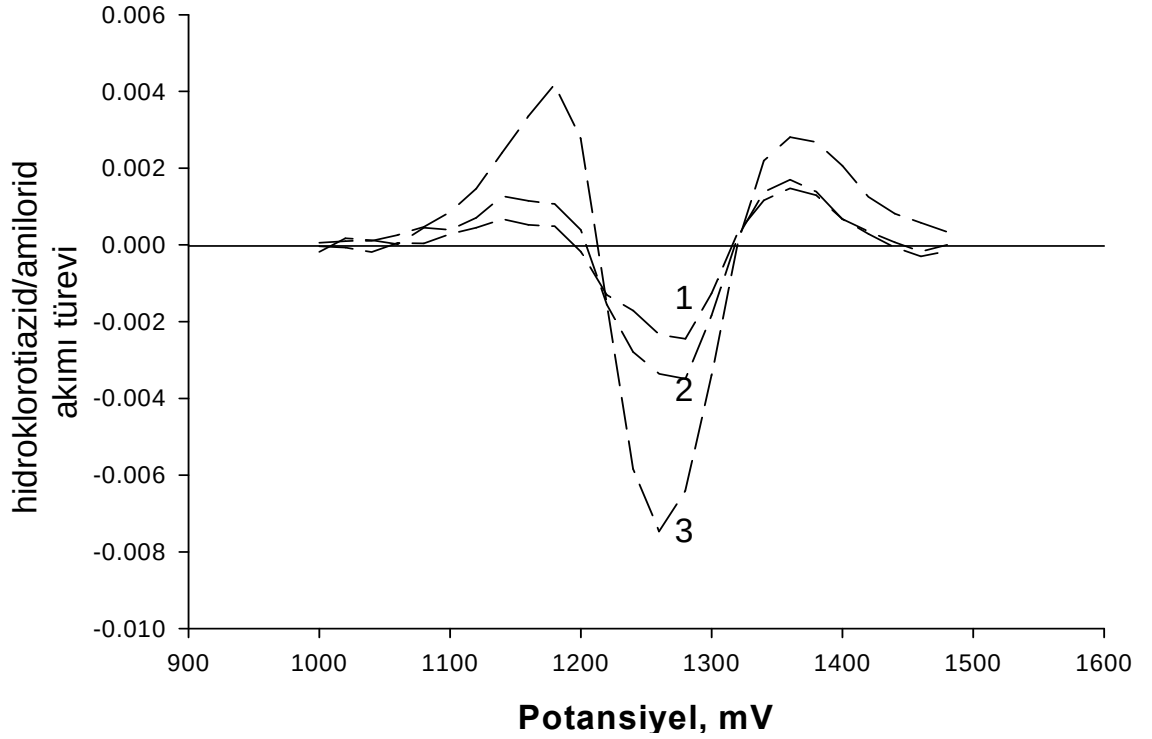
Şekil 3.49a. pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Amilorid/Hidroklorotiazid'in KD oran voltamogram eğrileri. 1) 1x10⁻⁵M; 2) 2x10⁻⁵M; 3) 2x10⁻⁴M Amilorid ve bölücü derişimi 1x10⁻⁴M Hidroklorotiazid.



Şekil 3.49b. pH 2,00 BR Tamponu (%20 MeOH) içerisinde Amilorid/ Hidrokloro-tiazid'in KD oran voltamogramı türev eğrileri. 1) 1x10⁻⁵M; 2) 2x10⁻⁵M; 3) 2x10⁻⁴M Amilorid ve bölücü derişimi 1x10⁻⁴M Hidroklorotiazid.



Şekil 3.50a. pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid'in KD oran voltamogram eğrileri. 1) 1x10⁻⁵M; 2) 2x10⁻⁵M; 3) 8x10⁻⁴M Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi 1x10⁻⁴M Amilorid.



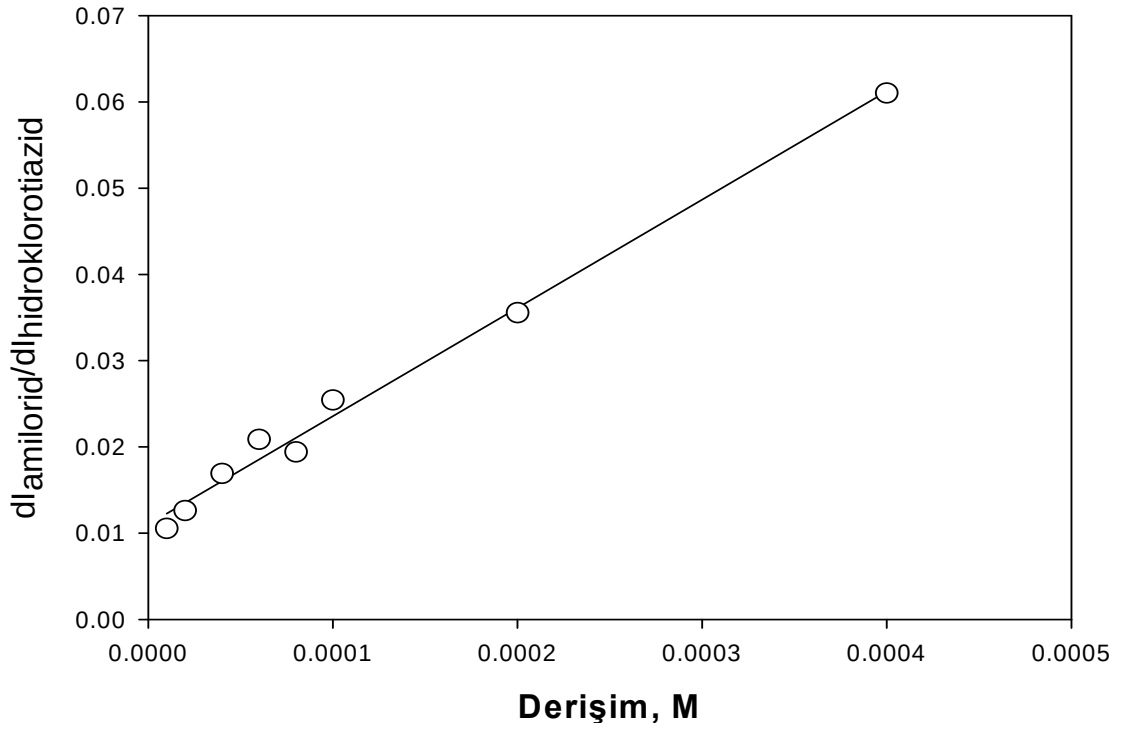
Şekil 3.50b. pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid/Amilorid'in KD oran voltamogramı türev eğrileri. 1) 1x10⁻⁵M; 2) 2x10⁻⁵M; 3) 8x10⁻⁴M Hidroklorotiazid ve bölücü derişimi 1x10⁻⁴M Amilorid.

Çizelge 3.56. Amilorid'in pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 1280 mV'da okunan akım değerleri.

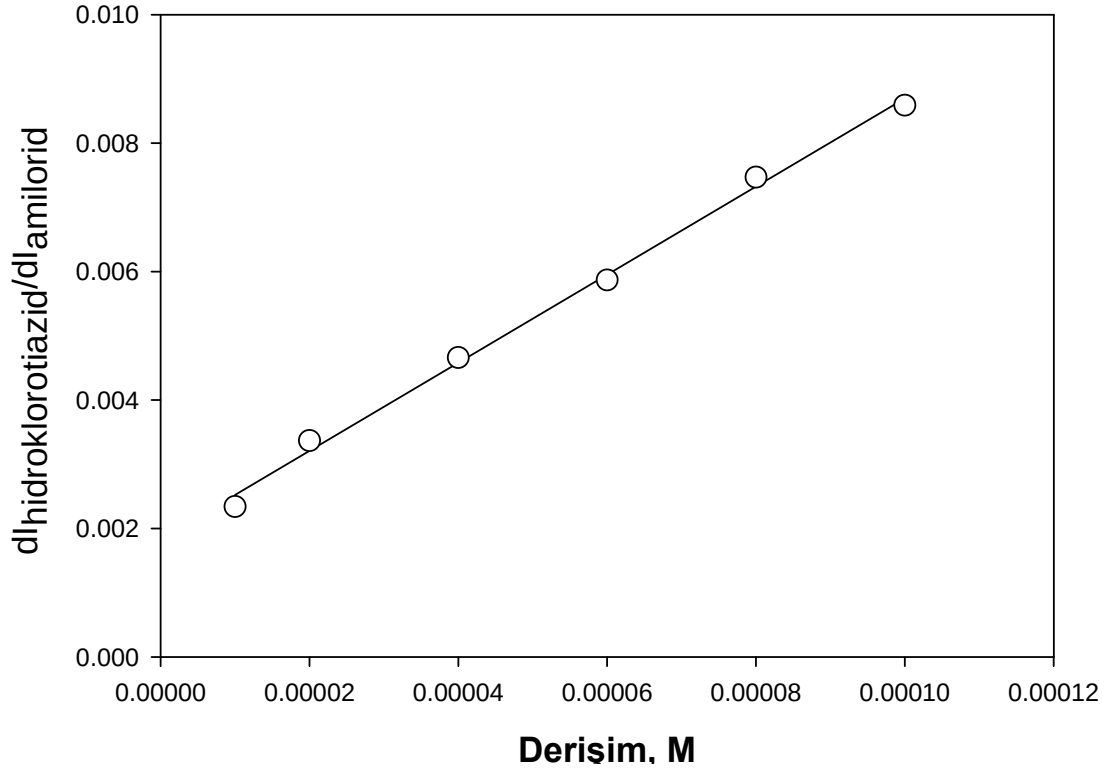
Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{amilorid}}/dI_{\text{hidroklorotiazid}}$)
1×10^{-5}	0,0105
2×10^{-5}	0,0126
4×10^{-5}	0,0169
6×10^{-5}	0,0209
8×10^{-5}	0,0194
1×10^{-4}	0,0255
2×10^{-4}	0,0356
4×10^{-4}	0,0610

Çizelge 3.57. Hidroklorotiazid'in pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde elde edilen derişim – voltamogram oranları birinci türev voltamogramında 1260 mV'da okunan akım değerleri.

Derişim (M)	Birinci Türev Voltamogram değerleri ($dI_{\text{hidroklorotiazid}}/dI_{\text{amilorid}}$)
1×10^{-5}	0,0023
2×10^{-5}	0,0034
4×10^{-5}	0,0047
6×10^{-5}	0,0059
8×10^{-5}	0,0075
1×10^{-4}	0,0086



Şekil 3.51a. $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ – $4 \times 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığında Amilorid'in pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) çözeltisi içerisinde KD voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.51b. $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ – $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığında Hidroklorotiazid'in pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) çözeltisi içerisinde KD voltamogram oranları birinci türev voltamogramı ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Elde edilen doğru denklemleri ise :

$$dI_{\text{amilorid}}/dI_{\text{hidroklorotiazid}} = 125,48 \text{ C(M)} + 0,0110 ,$$

$$dI_{\text{hidroklorotiazid}}/dI_{\text{amilorid}} = 68,88 \text{ C(M)} + 0,0018 \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Çizelge 3.56 ve Çizelge 3.57'deki KDV tekniği ile elde edilen verileri kullanarak analizi ve kalibrasyon eğrisi için gerekli validasyon parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.58'de gösterilmiştir. Çizelge 3.58'de verilen yakalama sınırı (YS) ve tayin alt sınırı (TAS);

$$YS = 3,3 \times SS/m \quad ; \quad TAS = 10 \times SS/m$$

formüllerinden bulunmuştur. (Riley ve Rosanske,1996 ; Swartz,Krull,1997; Ermer ve Miller, 2005)

Bu formüllerde s, kalibrasyondaki en düşük derişimin bir üst derişiminde tekrarlanan sonuçların standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eğrisine ait eğim değeridir.

Çizelge 3.58a. pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Amilorid'in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	KDV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	1280
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$
Eğim ($\mu A.M^{-1}$)	125,48
Kesişim (μA)	0,011
Korelasyon Katsayısı	0,996
Eğimin Standart Hatası	4,90
Kesişimin Standart Hatası	$8,16 \times 10^{-4}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$2,49 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$7,55 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,84
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	0,91
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,67
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,73

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5} M$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Çizelge 3.58b. pH 2,00 BR Tamponu(%20 MeOH) içerisinde Hidroklorotiazid'in elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri (n=3).

	KDV
Ölçüm Yapılan Potansiyel (mV)	1260
Doğrusallık Aralığı (M)	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$
Eğim ($\mu A.M^{-1}$)	68,88
Kesişim (μA)	0,0018
Korelasyon Katsayısı	0,999
Eğimin Standart Hatası	2,41
Kesişimin Standart Hatası	$1,46 \times 10^{-4}$
Yakalama (Teşhis) Sınırı (YS)(M)* (LOD)	$2,68 \times 10^{-6}$
Tayin Alt Sınırı (TAS)(M)*(LOQ)	$8,11 \times 10^{-6}$
Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,42
Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,33
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,36
Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)	1,19

(*) Yakalama ve tayin alt sınırı hesabı için gerekli standart sapma sonuçları $2 \times 10^{-5} M$ derişiminin tekrarlanan değerlerinden elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin (kare dalga voltamogram oranları türev voltametrisi) tekrar edilebilirlik düzeyini anlayabilmek için pik akımları ve potansiyelleri için gün içi ve günler arası (3 gün için) tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.58’de % BSS cinsinden gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar pik akımları ve pik potansiyelleri için tekrar edilebilirliğin iyi olduğunu kanıtlamaktadır. Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde iyi sonuçların elde edilmesi, amilorid ve hidroklorotiazid’i aynı anda içeren ticari preparatlardan amilorid’in ve hidroklorotiazid’in hiçbir ayırma işlemi yapılmadan miktar tayininin bu yöntemle gerçekleştirilebileceği göstermiştir.

3.2.17. Amilorid-Hidroklorotiazid Karışımı için Geliştirilen Voltamogram Oranları Birinci Türev Voltametrik Tekniklerin Piyasa Preparatlarına Uygulamaları ve Geri Kazanım Çalışmaları

Amilorid’in tayini için geliştirilen KD Voltamogram oranları türev voltametrik tekniklerin piyasa preparatlarına uygulanabilirliği araştırılmıştır. Amilorid için farmakopelerde herhangi bir analiz yöntemi önerilmediği ve tablet katkı maddelerinin yönteme bir etkisinin olup olmadığını anlamak için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Amilorid içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf benzerazid çözeltileri ile aynı şartlarda KD voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 1×10^{-4} M hidroklorotiazid’in KD voltamogramlarına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{amilorid}}/dI_{\text{hidroklorotiazid}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği amilorid miktarları hesaplanmıştır.

Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.59’da gösterilmiştir.

Benzer bir şekilde Hidroklorotiazid içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.4.2.4.'de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf hidroklorotiazid çözeltileri ile aynı şartlarda KD voltamogramları alınmıştır. Bu eğriler 1×10^{-4} M amilorid'in KD voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve daha sonra birinci türevleri alınmıştır. Okunan $dI_{\text{hidroklorotiazid}}/dI_{\text{amilorid}}$ değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği hidroklorotiazid miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.61'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.59. Amilorid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	KDV
1	4,79
2	4,89
3	4,75
4	4,90
5	5,15
X_{ort}	4,90
SS	0,16
% BSS	3,18
% BH	2,00

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve amilorid ve hidroklorotiazid’i aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf amilorid ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.60’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.60. Amilorid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde camı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen analiz bulguları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
KDV	5,00	4,92	98,40
	5,00	4,89	97,80
	5,00	4,83	96,60
	5,00	4,87	97,40
	5,00	5,13	102,60
			X _{ort} : 98,56
			SS : 0,23
			% BSS : 2,39
			%BH: 1,44

Çizelge 3.61. Hidroklorotiazid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde camısı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen analiz bulguları.

Numune No.	KDV
1	50,12
2	50,19
3	50,27
4	49,36
5	49,31
X_{ort}	49,85
SS	0,47
% BSS	0,95
% BH	0,30

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerinin analiz yöntemlerimiz üzerindeki etkisini anlamak için geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bölüm 2.4.2.5’de anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan ve amilorid ve hidroklorotiazid’i aynı anda içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf hidroklorotiazid ilave edilmiş ve gerekli deneyler, hesaplamalar sonucunda % geri kazanımlar bulunmuştur. % geri kazanım sonuçları Çizelge 3.61’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.62. Hidroklorotiazid içeren Moduretic® (Amilorid 5 mg ve Hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerin pH 2,00 BR Tamponu(% 20 MeOH) içerisinde camsı karbon elektrotla, geliştirilen KD voltamogram oranları 1. türev yöntemiyle elde edilen analiz bulguları.

Yöntem	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
KDV	50	49,77	99,54
	50	49,93	99,86
	50	50,18	100,36
	50	50,43	100,86
	50	50,02	100,04
			X _{ort} : 100,13
			SS : 0,01
			% BSS : 0,50
			%BH: -0,13

4. TARTIŞMA

Levodopa Parkinson hastalığında oral yolda kullanılan bir ilaçtır. Yeterli etki elde edebilmek için yüksek dozlarda uygulanması gerekir. Bu dozlarda da sıklıkla bulantı ve kardiyak aritmiler gibi istenmeyen etkiler ortaya çıkar. Levodopa bu nedenle karbidopa veya benserazid gibi aromatik amino asit dekarboksilaz inhibitörü bir ilaçla kombine preparatları şeklinde kullanılır. Tez konusu belirlendiği zaman yapılan literatür araştırması sırasında levodopa'nın karbidopa veya benserazid ile bir arada elektrokimyasal yöntemler ile miktar tayinine rastlanılmamıştır.

Hidroklorotiazid, tiazid yapılı diüretik bir ilaç olup ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılır. Amilorid oral yoldan kullanılan potasyum tutucu bir diüretiktir. Potasyum atılımını artıran diüretiklerin neden olduğu hipokaleminin tedavi veya profilaksisi için kullanılır. Bundan başka ödemin çözülmesi ve hipertansiyon tedavisinde yardımcı olarak da kullanılmaktadır. Hidroklorotiazid ve amilorid için yapılan literatür araştırması sonucunda her iki maddenin bir arada kullanıldığı preparatların elektrokimyasal yöntemler ile miktar tayinine rastlanılmamıştır.

Gerçekleştirilen çalışmaların tümü yükseltgenme yönünde ve camsı karbon çalışma elektrodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarda ilaç analizleri için sık kullanılan ve kromatografik ve optik yöntemlere alternatif bir yöntem olarak gösterilebilen son zamanlarda büyük gelişme kaydeden voltametrik analiz tekniklerinden yararlanılmıştır. Duyarlı ve oldukça hızlı olan elektrokimyasal analiz teknikleri çalışmalarımıza temel oluşturmuş, ölçülen değerler voltamogram oranları 1. türev voltametrisi tekniği ile değerlendirilmiştir. Böylece karışım içindeki etkin maddelerin herhangi bir ayırma tekniği gerektirmeksizin miktar tayinleri yapılmıştır. Doktora tezi kapsamında geliştirilen yöntemlerin ikili etkin madde karışımlarını aynı anda

içeren farmasötik dozaj formlarından eş zamanlı miktar tayinine uygulanabilirliği değerlendirilmiştir.

Voltametrik deneylere başlamadan önce levodopa, karbidopa, benserazid, amilorid ve hidroklorotiazid isimli standart maddelerin saflığını araştırmak amacıyla UV ve IR spektrumları alınmıştır. Elde edilen UV ve IR spektrumlarının incelenmesi sonucunda da maddelerin bu çalışmayı yürütmek için yeterli saflıkta olduğuna karar verilmiştir.

Araştırma konusu olan tüm etkin maddeler elektroanalitik çalışmalarda kullanılan camı karbon disk elektrot parlatma yöntemi kullanılarak mekanik ön işlemlerle temizlenmiştir. Elde edilen sonuçların tekrar edilebilirliğini gösteren %BSS değerlerine bakılarak bu ön işlemin yeterli olduğu kanaatine varılmıştır (Çizelge 3.23, 3.30, 3.37, 3.44, 3.51 ve 3.58). Tüm etkin maddelerin elektroanalitik incelenmesi sırasında, fosfat, asetat ve Britton-Robinson tamponları kullanılmıştır.

Levodopa, karbidopa, benserazid, amilorid ve hidroklorotiazid'in pH 2,0-12,0 aralığındaki BR tamponları, pH 1,60-7,74 aralığındaki fosfat tamponları ve pH 3,60-5,68 asetat tamponları içerisinde çizilen dönüşümlü, doğrusal taramalı, diferansiyel puls ve kare dalga voltamogramları yardımıyla pH'sinin ve tampon çözelti cinsinin maddelerin yükseltgenmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bütün bu deneylerde seyreltici ajan olarak seçilen tampon çözeltiler kullanılmıştır. DV, DTV, DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen i_p -pH ve E_p -pH verilerinden hareketle çalışmalarımıza konu olan ikili etkin maddelerin düzgün, keskin piklerinin ve oldukça yüksek pik akımlarının elde edildiği ortamın yanı sıra belli bir oranda ayrıldıkları destek elektroliti ortamında gerçekleştirilmiştir. Levodopa-karbidopa, levodopa-benserazid karışımları için pH 5,00 BR tamponu seçilirken hidroklorotiazid-amilorid karışımı için % 20 metanol oranı içeren pH 2,00 BR tamponu miktar tayinleri çalışmaları için uygun ortamlar olarak belirlenmiştir.

Araştırmalarımıza konu olan etkin maddelerin elektrot yüzeyine difüzyon veya adsorbsiyon yoluyla taşındığını saptamak amacıyla hız taraması deneyleri gerçekleştirilmiş ve i_p - $v^{1/2}$, $\log i_p$ - $\log v$ ilişkileri incelenmiştir.

pH 5,0 BR tamponu ile benserazid için;

$$i_p (\mu A) = 0,3504v^{1/2} (mVs^{-1}) - 0,203 \quad (r = 0,9957 ; n = 8)$$

$$\text{Log } i_p (\mu A) = 0,52 \log v (mVs^{-1}) - 0,5373 \quad (r = 0,9947 ; n = 8)$$

pH 5,0 BR tamponu ile karbidopa için;

$$i_p (\mu A) = 0,4031v^{1/2} (mVs^{-1}) - 0,1932 \quad (r = 0,9971 ; n = 8)$$

$$\text{Log } i_p (\mu A) = 0,52 \log v (mVs^{-1}) - 0,468 \quad (r = 0,9972 ; n = 8)$$

pH 5,0 BR tamponu ile levodopa için;

$$i_p (\mu A) = 0,1705v^{1/2} (mVs^{-1}) + 0,2581 \quad (r = 0,9934 ; n = 8)$$

$$\text{Log } i_p (\mu A) = 0,42 \log v (mVs^{-1}) - 0,5458 \quad (r = 0,9981 ; n = 8)$$

pH 2,0 BR tamponu(% 20 MeOH) ile hidroklorotiazid için;

$$i_p (\mu A) = 0,4536v^{1/2} (mVs^{-1}) - 0,4214 \quad (r = 0,9925 ; n = 9)$$

$$\text{Log } i_p (\mu A) = 0,54 \log v (mVs^{-1}) - 0,4714 \quad (r = 0,9964 ; n = 9)$$

pH 2,0 BR tamponu(% 20 MeOH) ile amilorid için;

$$i_p (\mu A) = 0,109v^{1/2} (mVs^{-1}) + 0,2299 \quad (r = 0,992 ; n = 9)$$

$$\text{Log } i_p (\mu A) = 0,41 \log v (mVs^{-1}) - 0,6801 \quad (r = 0,997 ; n = 9)$$

hız taraması sonuçları bulunmuştur.

Etkin madde çiftleri için belirlenen destek elektroliti ortamında gerçekleştirilen hız çalışmalarından elde edilen $i_p - v^{1/2}$ değerleri arasındaki doğrusal ilişki ve $\log i_p - \log v$ doğru denklemlerinden elde edilen eğim değerlerinin 0,5'e yakın oluşu (Laviron ve ark,1980) yükseltgenme olayının difüzyon kontrollü olduğunu kanıtlamaktadır.

Farmasötik etkin maddelerin indirgenme ve yükseltgenme davranışlarını incelemek için voltametrik yöntemler, özellikle de dönüşümlü voltametri yöntemi en uygun olanıdır. Dönüşümlü voltamogramlar sayesinde çalışmalarımızın konusu olan etkin madde çiftlerinin yükseltgenme davranışı ve miktar tayini için özel bir öneme sahip olan elektrot yüzeyine taşınma biçimi hakkında detaylı bilgiler edinilmiştir. (Oliveira Brett ve ark,2002; Uslu, Özkan, 2004; Özkan ve Uslu, 2002; Yılmaz ve ark 2001; Demircigil ve ark 2002).

Yürütülen tez kapsamında belirlenen ikili etkin maddelerin miktar tayini için doğru, duyarlı, hızlı ve seçici voltametrik analiz yöntemi geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda DV'ye oranla daha keskin, duyarlı ve iyi belirlenmiş pik şekillerinin elde edildiği DPV ve KDV yöntemlerinden yararlanılmıştır. Karbidopa - levodopa ve benserazid-levodopa eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yönteme uygun ortam olarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu seçilmiştir. Elde edilen pikin düzgün, keskin, tek oluşu, tekrarlanabilirliğin sağlanması ve karbidopa ve benserazid piklerinin birbirlerinden hafif ayrılarak oluşması da göz önüne alınarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu analitik çalışmalar için ortam olarak seçilmiştir.

Benzer bir şekilde hidroklorotiazid-amilorid eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yönteme uygun ortam olarak pH 2.0 Britton-Robinson tamponu (% 20 metanol) ortamı seçilmiştir. Elde edilen pikin düzgün, keskin, tek oluşu, tekrarlanabilirliğin sağlanması ve hidroklorotiazid ile amilorid'in birbirlerinden hafif ayrılarak pik oluşturmaları da göz önüne alınarak pH 2.0 Britton-Robinson tamponu (% 20metanol) analitik çalışmalar için ortam olarak seçilmiştir. Seçilen bu koşullar ve bulgular kısmında verilen DPV ve KDV şartları, çalışma elektrodu olarak camı karbon elektrodun doğru seçim olduğunu göstermiştir.

Tüm bunların yanı sıra etkin madde çiftlerinin DPV ve KDV çalışmalarında elektrokimyasal sinyallerinin girişim yapması voltamogram oranları türev voltametrisi çalışmalarını gündeme getirmiştir. Bu çalışma orjinal voltamogramların birbirine bölümünün türevinin alınarak karışım analizlerinin yapılması esasına

dayanmaktadır. Yöntemde, bir karışımın voltamogramı alındı ve karışımın içinde bulunan bileşiklerden birinin standart çözeltisinin voltamogramına bölünerek oran voltamogramı elde edildi. Oran voltamogramının birinci türevinin alınması ile *voltamogram oranları türev voltamogramı* elde edildi. Bu yol ile elde edilen her etkin maddeye ait akım değerleri oranının birinci türev değerleri derişimlere karşı kalibrasyon grafiğinde yerlerine konularak kalibrasyon eğrileri ve denklemleri elde edildi.

Seçilen destek elektrolitleri içerisinde ikili etkin maddeler için DP voltamogram oranları türev voltamogramları doğrusal derişim aralıkları ve yakalama sınırları aşağıdaki gibidir.

Levodopa-karbidopa'nın eş zamanlı analizi için;

Karbidopa için; $8 \times 10^{-6} \text{ M} - 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,80 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,
Levodopa için; $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $3,14 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,

Levodopa-benserazid'in eş zamanlı analizi için;

Benserazid için; $1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,99 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,
Levodopa için; $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,52 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,

Hidroklorotiazid-amilorid'in eş zamanlı analizi için;

Hidroklorotiazid için; $1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,35 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,
Amilorid için; $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,67 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı.

Seçilen destek elektrolitleri içerisinde ikili etkin maddeler için KD voltamogram oranları türev voltamogramları doğrusal derişim aralıkları ve yakalama sınırları ise aşağıdaki gibidir.

Levodopa-karbidopa'nın eş zamanlı analizi için;

Karbidopa için; $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,91 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,
Levodopa için; $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $3,08 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,

Levodopa-benserazid'in eş zamanlı analizi için;

Benserazid için; $1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,62 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,
Levodopa için; $1 \times 10^{-5} \text{ M} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,89 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,

Hidroklorotiazid-amilorid'in eş zamanlı analizi için;

Hidroklorotiazid için; $1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,68 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı,
Amilorid için; $1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ doğrusal aralık ve $2,49 \times 10^{-6}$ yakalama sınırı.

Validasyon verileri yardımıyla DP ve KD voltamogram oranları türev voltametriyi yöntemlerinin geniş derişim aralıklarında tekrar edilebilir, duyarlı ve hassas olduğu söylenebilir. Günlük arası tekrarlanabilirlik değeri de geliştirilen DP ve KD voltamogram oranları türev voltametriyi yöntemlerinin söz konusu ikili etkin madde karışımları için geniş bir zaman aralığında da aynı hassasiyet ve doğrulukla analizine izin verdiklerini göstermektedir.

Saf maddeler üzerinde yapılan voltametrik incelemeler ve elde edilen veriler ışığında, geliştirilen voltametrik tekniklerin söz konusu ikili etkin madde karışımlarının piyasa preparatlarına uygulanabilirliği araştırılmış ve başarı ile gerçekleştirildiği saptanmıştır.

Araştırmamıza konu olan ikili etkin maddeleri içeren tabletler iyice toz edilip, gerekli tartım alındıktan sonra levodopa-benserazid ve karbidopa isimli etkin maddeleri içeren toz karışımı suda, hidroklorotiazid ve amilorid isimli etkin maddeleri içeren toz karışımı metanolde çözülmüştür. Bulanık çözeltiden istenilen seyreltmeye yetecek kadar numune alınıp, destek elektroliti ile hacim yeterli miktara tamamlandıktan sonra (hidroklorotiazid ve amilorid için %20 metanol oranı sabit tutulmuştur), bulanık çözeltiden doğrudan etkin madde çiftlerinin voltamogramları

kaydedilmiştir. Herhangi bir ayırma veya süzme işlemi gerekmeksizin voltamogramlar doğrudan alınmıştır. Tablet çözeltilerinde alınan voltamogramlar hangi tablet ile çalışıyorsa o tablet ile ilgili etkin madde çiftlerinden birinin saf voltamogramına Microsoft Excel® yardımıyla bölünmüş ve elde edilen oran voltamogramının daha sonra birinci türevi alınmıştır. Okunan akım oranlarının birinci türevlerinin değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği etkin madde miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların tablet içeriğine yakınlığı, bu yöntemlerin farmasötik dozaj formları için rahatlıkla kullanılabileceğini göstermiştir.

Bununla birlikte yöntemlerin kesinliğini anlamak ve analizin tablet katkı maddelerinden etkilenmediğini göstermek için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Toz edilmiş tablet numunesinden alınan tartım üzerine, bilinen miktarda saf etkin maddeler ilave edilmiş ve geri kazanım çalışmaları için örnekler hazırlanmıştır.

Levodopa-karbidopa'nın eş zamanlı analizi için DP voltamogram oranları türev voltametrisi ile yapılan geri kazanım çalışması;

Karbidopa için; $100,57 \pm 0,70$,

Levodopa için; $101,30 \pm 0,64$,

Levodopa-benserazid'in eş zamanlı analizi için DP voltamogram oranları türev voltametrisi ile yapılan geri kazanım çalışması;

Benserazid için; $95,90 \pm 0,60$,

Levodopa için; $100,57 \pm 0,70$,

Hidroklorotiazid-amilorid'in eş zamanlı analizi için DP voltamogram oranları türev voltametrisi ile yapılan geri kazanım çalışması;

Hidroklorotiazid için; $100,80 \pm 0,66$,

Amilorid için; $99,72 \pm 2,04$.

Levodopa-karbidopa'nın eş zamanlı analizi için KD voltamogram oranları türev voltametrisi ile yapılan geri kazanım çalışması;

Karbidopa için; $100,30 \pm 0,60$,

Levodopa için; $100,59 \pm 0,32$,

Levodopa-benserazid'in eş zamanlı analizi için KD voltamogram oranları türev voltametrisi ile yapılan geri kazanım çalışması;

Benserazid için; $97,54 \pm 1,31$,

Levodopa için; $101,18 \pm 0,42$,

Hidroklorotiazid-amilorid'in eş zamanlı analizi için KD voltamogram oranları türev voltametrisi ile yapılan geri kazanım çalışması;

Hidroklorotiazid için; $101,13 \pm 0,01$,

Amilorid için; $98,56 \pm 0,23$.

Bu numunelerden alınan voltamogramlar sonucu yapılan hesaplamalarda bulunan yüksek geri kazanım değerleri tablet içerisindeki katkı maddelerinin yöntemimizi etkilemediğini göstermiştir. Böylece geliştirilen DP ve KD voltamogram oranları türev voltametrisi tekniğinin etkin maddelerin analizi için seçici olduğu sonucuna varılmıştır. Geliştirilen tekniklerin doğruluğu, duyarlılığı, kesinliği ve seçiciliğini gösterebilmek için gerekli tüm validasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlarla geliştirilen analiz yöntemlerinin tekrar edilebilirliği, doğruluğu, duyarlılığı, seçiciliği ve uygulanabilirliği gerekli validasyon parametreleri ile gösterilmiştir (Çizelge 3.23, 3.30, 3.37, 3.44, 3.51 ve 3.58).

Tarafımızdan geliştirilen bu iki yöntemin birbirleri ile uyumunu gösterebilmek için de, her iki yöntem sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bu amaçla student-t ve F testleri yapılmıştır.

Levodopa-karbidopa'nın eş zamanlı analizlerinin istatistiksel karşılaştırılması çizelge 4.1.de, levodopa-benserazid'in eş zamanlı analizlerinin istatistiksel karşılaştırılması çizelge 4.2'de , hidroklorotiazid-amilorid'in eş zamanlı analizlerinin istatistiksel karşılaştırılması çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Karbidopa ve Levodopa içeren Sinemet® (Levodopa 250 mg ve Karbidopa 25 mg) tabletlerden elde edilen analiz bulgularının karşılaştırmalı sonuçları (n=5).

	Karbidopa		Levodopa	
	DPV	KDV	DPV	KDV
Etiket Miktarı (mg)	25 mg	25 mg	250 mg	250 mg
Bulunan Madde Miktarı (mg)	24,94	24,82	246,70	247,79
% BSS	0,542	0,615	0,50	0,640
Hesaplanan t değeri		0,224		0,257
Hesaplanan F değeri		0,822		0,612

t_{tablo} değeri : 2,31 ; F_{tablo} değeri: 2,60 (p:0,05)

Çizelge 4.2. Benserazid ve Levodopa içeren Madopar® (Levodopa 100 mg ve Benserazid 25 mg) tabletlerden elde edilen analiz bulgularının karşılaştırmalı sonuçları (n=5).

	Benserazid		Levodopa	
	DPV	KDV	DPV	KDV
Etiket Miktarı (mg)	25 mg	25 mg	100 mg	100 mg
Bulunan Madde Miktarı (mg)	24,32	24,33	98,67	99,06
% BSS	1,71	1,29	0,72	0,39
Hesaplanan t değeri		0,980		0,733
Hesaplanan F değeri		0,594		0,211

t_{tablo} değeri : 2,31 ; F_{tablo} değeri: 2,60 (p:0,05)

Çizelge 4.3. Amilorid ve hidroklorotiazid içeren Moduretic® (amilorid 5 mg ve hidroklorotiazid 50 mg) tabletlerden elde edilen analiz bulgularının karşılaştırmalı sonuçları (n=5).

	Amilorid		Hidroklorotiazid	
	DPV	KDV	DPV	KDV
Etiket Miktarı (mg)	5 mg	5 mg	50 mg	50 mg
Bulunan Madde Miktarı (mg)	4,95	4,90	98,67	99,06
% BSS	3,62	3,18	1,58	0,95
Hesaplanan t değeri		0,625		0,686
Hesaplanan F değeri		0,790		0,790

t_{tablo} değeri : 2,31 ; F_{tablo} değeri: 2,60 (p:0,05)

Elde edilen verilerden hesaplanan t ve F değerleri, çizelge t ve F değerlerinden küçük çıktığı için fark anlamsız bulunmuştur.Yani elde edilen sonuçların güven aralığı içerisinde birbirleri ile uyumlu olduğu söylenebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında levodopa, karbidopa, benserazid, amilorid ve hidroklorotiazid'in camsı karbon elektrot üzerindeki yükseltgenme davranışları DV, DTV, DPV ve KDV teknikleri kullanılarak detaylı olarak araştırılmıştır. Bu araştırmalarda ortam pH'sinin, destek elektroliti cinsinin ve birleşiminin bu 5 maddenin yükseltgenmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bunun için pH 2,0-12,0 aralığındaki BR tamponları, pH 1,60-7,74 aralığındaki fosfat tamponları ve pH 3,60-5,68 asetat tamponları kullanılmıştır.

Karbidopa - levodopa ve benserazid-levodopa eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yöntem uygun ortam olarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu seçilmiştir.

Benzer bir şekilde hidroklorotiazid-amilorid eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yöntem uygun ortam olarak pH 2.0 Britton-Robinson tamponu (% 20 metanol) ortamı seçilmiştir.

DV tekniği ile levodopa, karbidopa, benserazid, hidroklorotiazid ve amilorid'in seçilen çalışma ortamları içerisinde hız deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu incelemelerde çeşitli tarama hızlarında elde edilen voltamogramlar kullanılmıştır. $Ip-v^{1/2}$, $logip-logv$ verileri incelenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda levodopa, karbidopa, benserazid, hidroklorotiazid ve amilorid'in difüzyon kontrollü bir olayla elektrot yüzeyinde yükseltgendiği bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci kısmında ise levodopa-karbidopa, levodopa-benserazid ve amilorid-hidroklorotiazid ikili karışımlarının camsı karbon elektrotla aynı anda analizi yapılmıştır. Bunun için difüzyon kontrollü olan ve ikili karışımında yer alan maddelerin piklerinin birbirlerinden biraz ayrıldığı ortamlar seçilmiş, DPV ve KDV yöntemleri için şartlar optimize edilmiştir. Karbidopa - levodopa ve benserazid-levodopa eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yöntem uygun ortam olarak pH 5.0 Britton-Robinson tamponu seçilmiştir. Benzer

bir şekilde hidroklorotiazid-amilorid eğrilerinin birbirlerinden daha iyi ayrıldığı, ikili karışım için geliştirilen yönteme uygun ortam olarak pH 2.0 Britton-Robinson tamponu (% 20 metanol) ortamı seçilmiştir.

Seçilen destek elektrolitleri içerisinde levodopa-karbidopa'nın eş zamanlı analizinde karbidopa için $8 \times 10^{-6} \text{M}$ – $4 \times 10^{-4} \text{M}$, levodopa için $1 \times 10^{-5} \text{M}$ – $8 \times 10^{-5} \text{M}$; Levodopa-benserazid'in eş zamanlı analizinde benserazid için 1×10^{-5} – $2 \times 10^{-4} \text{M}$, levodopa için $1 \times 10^{-5} \text{M}$ – $8 \times 10^{-5} \text{M}$ ve hidroklorotiazid-amilorid'in eş zamanlı analizi için hidroklorotiazid için 1×10^{-5} – $2 \times 10^{-4} \text{M}$, amilorid için; 1×10^{-5} – $1 \times 10^{-3} \text{M}$ doğrusal derişim aralıkları saptanmıştır. Kalibrasyonlara ait gerekli bütün validasyon parametreleri hesaplanmış ve çizelgelarda gösterilmiştir. Geliştirilen DP ve KD voltamogram oranları 1. türev voltametrik yöntemler de bu ikili karışımların ilaç dozaj formlarından hızlı, basit ve hiçbir ayırma işlemine gerek duyulmaksızın doğrudan analizine imkan tanımıştır. Tablet içerisindeki katkı maddelerinin analizler üzerindeki etkisini araştırmak için geri kazanım deneyleri yapılmış ve deneylerin tablet katkı maddelerinden etkilenmediği gösterilmiştir.

Elde edilen bütün veriler sonucunda, karbidopa – levodopa, benserazid-levodopa ve amilorid-hidroklorotiazid ikili karışımlarının aynı anda tayini için hızlı, kolay, doğru, duyarlı, kesin, seçici ve herhangi bir ayırma işlemine ihtiyaç duyulmayan DP ve KD voltamogram oranları 1. türev voltametrik yöntemlerinin, bu ikili karışımların farmasötik dozaj formlarının analizinde kullanılabileceği önerilmektedir.

ÖZET

İKİLİ İLAÇ ETKİN MADDE KARIŞIMLARININ ELEKTROKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Levodopa, benserazid, karbidopa, amilorid ve hidroklorotiazid'in elektrokimyasal davranışları camı karbon elektrot üzerinde değişik voltametrik teknikler kullanılarak çalışılmıştır. Bütün maddeler için pik akım ve potansiyellerinin pH'a bağımlılığı, derişim, hız taraması ve destek elektroliti yapısı ayrı ayrı incelenmiştir. camı karbon elektrot üzerinde bütün maddelerin yükseltgenmesi difüzyon kontrollü bulunmuştur. Levodopa-benserazid, levodopa-karbidopa ve amilorid-hidroklorotiazid ikili karışımlarının dozaj formlarından birbirlerinin varlığında miktar tayinleri için voltamogram oranları birinci türev voltametriyle çalışılmıştır. Levodopa-benserazid; levodopa-karbidopa ve amilorid-hidroklorotiazid'in miktar tayinleri diferansiyel puls ve kare dalga voltametriyle çalışılmıştır. Bu teknikler; her maddenin artan derişimlerin bir fonksiyonu olarak voltamogram oranları birinci türev voltametri tekniği ile ölçümüne bağlıdır. Voltamogram oranları türev voltametri; her maddenin voltamogramlarının, seçilmiş standart voltamogramlara bölünerek elde edilen oran voltamogramı akımlarının birinci türevi alınarak hesaplanmıştır. DPV ve KDV yöntemleri ile voltamogram oranları türev voltametrisine bağlı olarak ölçülen potansiyeller; sırasıyla levodopa-benserazid için 0,23V ve 0,33V; levodopa-karbidopa için 0,23V ve 0,30V; amilorid-hidroklorotiazid için 1,25V ve 1,23V ve KDV yöntemi ile ise sırasıyla levodopa-benserazid için 0.32 V ve 0.32 V ; levodopa-karbidopa için 0.34 V ve 0.36 V ; amilorid-hidroklorotiazid için 1.28 V and 1.26 V'dur. pH 5,00 Britton Robinson tamponunda levodopa ve benserazid için sırasıyla $1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5} \text{M}$ ve $6 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{M}$ derişim aralığında; levodopa ve karbidopa için $1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5} \text{M}$ ve $1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4} \text{M}$ derişim aralığında ve pH 2,00 Britton Robinson tamponunda (%20 metanol) amilorid ve hidroklorotiazid için $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3} \text{M}$ ve $1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4} \text{M}$ derişim aralığında doğrusallık saptanmıştır. Önerilen method için bütün yöntem geçerlilik testleri yapılmış ve bu maddelerin birbirleri varlığında tayinleri gerçekleştirilmiş ve yöntem farmasötik dozaj formlarından analize başarıyla uygulanmıştır.

Key Words: Anti-Parkinson ilaçları, Anti-Hipertansif ilaçlar, Sentetik karışımlar, Yöntem geçerliliği, Voltametri

SUMMARY

ELECTROCHEMICAL INVESTIGATION OF BINARY DRUG COMPOUND MIXTURES

The electrochemical behavior of levodopa, benserazide, carbidopa, amiloride and hydrochlorothiazide at a glassy carbon electrode has been studied using different voltammetric techniques. The dependence of the peak currents and potentials on pH, concentration, scan rate and nature of the buffer were investigated for all compounds individually. The oxidation of all compounds was diffusion-controlled on the glassy carbon electrode. First derivative of the ratio voltammetric methods for determination of the binary mixtures of levodopa-benserazide; levodopa-carbidopa and amiloride-hydrochlorothiazide in their dosage forms in the presence of each other has been described. The differential pulse and square wave voltammetric method is presented for the simultaneous determination of levodopa-benserazide; levodopa-carbidopa and amiloride-hydrochlorothiazide. These techniques depends on the measuring of first derivative of the ratio voltammograms of each concentration as a function of the increased concentrations. First derivative of the ratio voltammograms were obtained by dividing of the voltammogram to the selected standard voltammogram of each component and then calculating the first derivative current of the ratio voltammogram. Both methods depend on first derivative of the ratio-voltammetry by measurements of the potentials at 0.23 V and 0.33 V for levodopa-benserazide; 0.23 V and 0.30 V levodopa-carbidopa and 1.25 V and 1.23 V for amiloride-hydrochlorothiazide, using DPV method and at 0.32 V and 0.32 V for levodopa-benserazide; 0.34 V and 0.36 V levodopa-carbidopa and 1.28 V and 1.26 V for amiloride-hydrochlorothiazide, using SWV method, respectively. The linear response was within the range of $1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5}$ M and $6 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$ M for levodopa and benserazide; $1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5}$ M and $1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$ M for levodopa and carbidopa in Britton-Robinson buffer at pH 5.0 and $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$ M and $1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$ M for amiloride and hydrochlorothiazide in Britton-Robinson buffer at pH 2.0 (20% constant amount of methanol), respectively. The proposed methods have been extensively validated and successfully applied to the determination of these compounds in the presence of each other and in pharmaceutical dosage forms.

Key Words: Anti-Parkinson drugs, Anti-Hypertensive drugs, Binary Mixtures, Validation, Voltammetry

KAYNAKLAR

- ABDEL-HAY, M.H., GAZY, A.A., HASSAN, E.M., BELAL, T.S., (2008). Derivative and derivative ratio spectrophotometric analysis of antihypertensive ternary mixture of amiloride hydrochloride, hydrochlorothiazide and timolol maleate. *Journal of the Chinese Chemical Society* **55** (5) 971-978.
- ADAMOVIĆ, J.A., (1997) Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York
- ADAMS, R. N., (1958). Carbon pasta electrode. *Anal. Chem.*, **30**, 1576
- ADAMS, R.N., Mc CLURE, J.H., MORRIS, J.B. (1958) Chrono – potentiometric studies at solid electrodes. *Anal. Chem.*, **30**, 471
- AHUYA, S., SCYPINSKI, S., (2001) Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, New York..
- BEBAWY, L.I., (2002). Application of TLC-Densitometry, First Derivative UV Spectrophotometry, and Ratio Derivative Spectrophotometry for the Determination of Dorzolamide Hydrochloride and Timolol Maleate. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27**, 737–746.
- BERGAMINI, M.F., SANTOS, A.L., STRADIOTTO, N.R., ZANONI, M.V.B., (2005). A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **39** (1-2), 54-59.
- BERZAS-NEVADO, J.J., GUIBERTEAU CABANILLAS, C., SALINAS, F., (1992) Spectrophotometric Resolution of ternary mixtures of salicylaldehyde, 3-hydroxybenzaldehyde and 4-hydroxybenzaldehyde by the derivative ratio spectrum-zero crossing method. *Talanta* **39**, 547–553.
- BERZAS-NEVADO, J.J., GUIBERTEAU CABANILLAS, C., LOPEZ SALINAS, F., (1990). Resolution of the binary mixture of salicylaldehyde and 4-hydroxybenzaldehyde by using first derivative ratio spectra. *Anal. Lett.* **23**, 2077–2094.
- BİRYOL, İ., KABASAKALOĞLU, M., ŞENTÜRK, Z., (1989) Investigation of mechanism of the electrochemical oxidation of bamipine hydrochloride by voltammetry. *Analyst*, **114**, 181 – 184
- BİRYOL, İ., USLU, B., KÜÇÜKYAVUZ, Z. (1996) Voltammetric determination of imipramine hydrochloride and amitriptyline hydrochloride using a polymer modified carbon paste electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15**, 371- 381
- BİRYOL, İ., USLU, B., KÜÇÜKYAVUZ, Z. (1998) Voltammetric determination of amoxicillin using a carbon paste electrode modified with poly (4- vinyl pyridine)STP *Pharma.Sci.*, **8**(6):383-386

- BISHOP, E., HUSSEIN, W. (1984) Anodic voltammetry of dopamine, noradrenaline and related compounds at rotating disc electrodes of platinum and gold. *Analyst*, **109**: 627-632
- BLANCO, M., COELLO, J., ITURRIAGA, H., MASPOCH, S., VILLEGAS, N., (2000). Simultaneous spectrophotometric determination of levodopa and benserazide in a pharmaceutical preparation by use of partial least-squares regression. *Analytical Letters* **33 (13)**, 2701-2718.
- BOCRIS, J.O.M., REDDY, A.K.N. (1970) Modern Electrochemistry. Vol:2 London : Mc Donald Co Ltd.
- BOND, A.M.,(1980). Modern polarographic methods in analytical chemistry, Marcel Dekker Inc.N.Y.
- BREZINA, M., ZUMAN, P., (1958) Polarography in Medicine. Biochemistry and Pharmacy. New York, Interscience Publishers
- BRAGGIO,S., BARNABY,R.J., GROSSI,P., CUGOLA,M. (1996) A strategy for validation of bioanalytical methods.*J.Pharm.Biomed.Anal.***14**.375-388.
- CHRISTIE, J.H., TURNER, J.A., OSTERYOUNG, R.A., (1977) Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode . Theory. *Anal. Chem.*, **49 (13)**: 1899 - 1913
- COELLO, J., MASPOCH, S., VILLEGAS, N., (2000). Simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of levodopa and benserazide by bi- and three-way partial least squares calibration. *Talanta* **53 (3)**, 627-637.
- CORBELLA TENA, R., RODRIQUEZ DELGADO, M.A., SANCHEZ, M.J.,GARCIA MONTELONGO, F., (1997). Comparative Study ofthe Zero-Crossing, Ratio Spectra Derivative and Partial Least-Squares Methods Applied to the Simultaneous Determination of Atrazine and Its Degradation Product Desethylatrazin-2-Hydroxy in Ground Water. *Talanta* **44**, 673–683.
- COX, J.A., GADD, S.E., DAS, B.K., (1988) Modification of glassy carbon with a stable film containing iridium oxide and palladium. *J. Electroanal. Chem.* **256**: 199 - 205
- De BIEVRE, P.,GUNZLER, H. Eds.(2005) Validation in chemical measurement Spriger pub., New York.
- DEMİRCİGİL, B.T., ÖZKAN, S.A., ÇORUH, Ö., YILMAZ, S. (2002). Electrochemical behavior of formoterol fumarate and its determination in capsules for inhalation and human serum using differential – pulse and square – wave voltammetry. *Electroanal.*, **14(2)**, 122 – 127
- DEMİRCİGİL, B.T., USLU, B., ÖZKAN, Y., ÖZKAN, S.A., ŞENTÜRK, Z., (2003) "Voltammetric oxidation of ambroxol and application to its determination in pharmaceutical and in drug dissolution studies, *Electroanalysis*,**15**: 230-234
- DERMİŞ, S., BİRYOL, İ., (1990) Anodic oxidation of some phenothiazine derivatives on pretrated platinum and ruthenium electrodes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**: 999 - 1003

- DINC, E., USTUNDAG, O., (2002). Chemometric resolution of a mixture containing hydrochlorothiazide and amiloride by absorption and derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **29** (1-2), 371-379.
- DINC, E., KAYA, S., DOGANAY, T., BALEANU, D., (2007). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **44** (4), 991-995.
- DOGAN, B., USLU, B., ÖZKAN, S.A., (2004) " Anodic adsorptive stripping voltammetry of the hypertensive drug candesartan cilextil at the glassy carbon electrode" *Die Pharmazie*, **11**:840-844,
- DOGAN, B., ÖZKAN, S.A., USLU, B., (2005a) "Electrochemical characterization of flupenthixol and rapid determination of the drug in human serum and pharmaceuticals by voltammetry" *Anal. Lett.*, **38**: 641-656
- DOGAN, B., USLU, B., SÜZEN, S., ÖZKAN, S. A. (2005b). Electrochemical evaluation of nucleoside analogue lamivudine in pharmaceutical dosage forms and human serum. *Electroanalysis*, **17**:1886-1894
- DOGAN, B., CANBAZ, D., ÖZKAN, S.A., USLU, B., (2006)."Electrochemical methods for determination of protease inhibitor indinavir sulfate in pharmaceuticals and human serum" *Die Pharmazie*, **61**, 409-413
- DUPLAY, D.(2007), *Physicians Desk Reference* (PDR), 61st Ed., Published by Thomson Medical Economics Company Inc., Electronic Verison, Montvale, NJ.
- EGGERTSEN, F.T, WEISS,F.T.,(1956). Effect of structure of certain amine indicators on oxidation potential and color intensity on oxidation. *Anal. Chem* **28**:1000
- EL-GINDY, A., EL WALILY, A.F.M., BEDAIR, M.F., (2000). First-Derivative Spectrophotometric and LC Determination of Cefuroxime and Cefadroxil in Urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**, 341–352.
- ELSHANAWANE, A.A., MOSTAFA, S.M., ELGAWISH, M.S., (2009). Development and validation of an LC method for simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in human urine. *Journal of AOAC International* **92** (3), 813-819.
- ELSHANAWANE, A.A., MOSTAFA, S.M., ELGAWISH, M.S., (2009). Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide, and chlorthalidone in their combined mixtures. *Journal of AOAC International* **92** (2), 404-409.
- ERDEM A., OZSOZ M., (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions. *Electroanal.* **14**: 965-974.
- ERK, N., OZKAN, Y., BANOGLU, E., OZKAN, S.A., SENTURK, Z., (2001).Simultaneous determination of paracetamol and methocarbamol in tablets by ratio spectra derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 469–475.

- ERMER, J. (2001) Validation in pharmaceutical analysis. Part 1 :An intergrated approach.. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **24**,755-767
- ERMER, J. MILLER, J.H. McB. (2005) Method validation in pharmaceutical analysis. 1st Ed. Wiley-VCH Pub., Weinheim.
- EVANS,J.F., KUWANA, T., (1977) Radiofrequency oxygen plasma treatment of pyrolytic graphite electro surface. *Anal. Chem.* **49**: 1632 - 1635
- FAGAN, D.T., HU, I.F., KUWANA, T., (1985) Vacuum heat treatment for activation of glassy carbon electrode. *Anal. Chem.* **57**: 2759 – 2763
- FERRARO, M.C.F., CASTELLANO, P.M., KAUFMAN, T.S., (2004).Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **34 (2)**, 305-314.
- FERRARO, M.C.F., CASTELLANO, P.M., KAUFMAN, T.S., (2002).Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in synthetic samples and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30 (4)**, 1121-1131.
- FERRET and PHILIPS, (1985) Studies in polarography. The rotating platinum electrode. *Trans. Faraday Soc.* **51**: 390
- GOODMAN GILMAN, A., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P., (1990), The Pharmacological Basis of Therapeutics, 18th Ed., Pergamon Pres, New York.
- GREEF, R., PEAT, R., PETER, L.M., PLETCHER, D., ROBINSON, J., (1990) Instrumental methods in electrochemistry, London, Ellis Harwood Series in Physical Chemistry.
- GOEBEL, C., TROUT, G.J., KAZLAUSKAS, R., (2004). Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **502 (1)**, 65-74.
- HART, J.P., (1990) Electroanalysis of Biologically Important Compounds. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry. 20 - 21
- HASSIB, S.T., (1990). Derivative Spectrophotometric Determination of Levodopa and Benserazide Hydrochloride. *Anal. Lett.* **23**, 2195–2214.
- HE, W.W., ZHOU, X.W., LU, J.Q., (2007). Capillary electrophoresis-chemiluminescence detection of levodopa and benserazide in Medopar tablet. *Chinese Chemical Letters* **18 (1)**, 91-93.
- HE, W.-W., ZHOU, X.-W., LU, J.-Q., (2006). Simultaneous determination of benserazide and levodopa by capillary electrophoresis-chemiluminescence using an improved interface. *Journal of Chromatography A* **1131 (1-2)**, 289-292.
- HERSHENHART, E., Mc CREEY, R.L., KNIGHT, R.D., (1984)In situ cleaning and activation of solid electrode surface by pulsed laser light. *Anal. Chem.* **56**: 2256 - 2257

- HU, I.F., KARWEIK, D.H., KUWATA, T. (1985) Activation and deactivation of glassy carbon electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **188**: 59 - 72
- IBRAHIM, M.S., SHEHATTA IS., AL-NAYELI AA., (2002). Voltammetric Studies of The Interaction of Lumazine with Cyclodextrins and DNA. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **28**:271-225.
- KABASAKALIAN, P., Mc GLOTTEN, J., (1958) Polarographic oxidation of phenothiazine tranquilizers. *Anal. Chem.* **30**: 471
- KARIMI, M., CARL, J.L., LOFTIN, S., PERLMUTTER, J.S., (2006). Modified high-performance liquid chromatography with electrochemical detection method for plasma measurement of levodopa, 3-O-methyldopa, dopamine, carbidopa and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **836 (1-2)**, 120-123.
- KARPIŃSKA, J., SMYK, J., WOŁYŃIEC, E., (2005). A spectroscopic study on applicability of spectral analysis for simultaneous quantification of l-dopa, benserazide and ascorbic acid in batch and flow systems. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **62 (1-3)**, 213-220.
- KARTAL, M., ERK, N., (1999). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride by ratio spectra derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **19 (3-4)**, 477-485.
- KERMAN K., MERIC B., OZKAN D., KARA P., ERDEM A., OZSOZ M., (2001). Electrochemical DNA biosensor for the determination of benzo[a]pyrene-DNA adducts. *Anal.Chim.Acta.* **450**: 45-52.
- KISSINGER, P.T. ; HEINEMAN, W.R., (1996) Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, 2nd Ed. Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- KOLTHOF, I.M., TANAKA, N., (1954) Rotated and stationary platinum wire electrode. *Anal. Chem.* **26**: 632 - 636
- LA-SCALEA MA., SERRANO SHP, FERREIRA EL., BRETT A.M.O.,(2002). Voltammetric behavior of benznidazole at a DNA-electrochemical biosensor. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **29**:561-568.
- LANE, R.F., HUBBARD, A.T., (1976) Differential double pulse voltammetry at chemically modified platinum electrodes for in vivo determination catecholamines. *Anal. Chem.* **48**: 1287 - 1293
- LU, M., TONG, P., XIAO, H., XIA, S., ZHENG, X., LIU, W., ZHANG, L., (2007). A new method for screening and determination of diuretics by on-line CE-ESI-MS. *Electrophoresis* **28 (9)**, 1461-1471
- LUNTE, S.M., RADZIK, D.M.(1996) Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis, Elsevier Science Ltd, New York.

- MARQUES, K.L., SANTOS, J.L.M., LOPES, J.A., LIMA, J.L.F.C., (2008). Simultaneous chemiluminometric determination of levodopa and benserazide in a multi-pumping flow system with multivariate calibration. *Analytical Sciences* **24** (8), 985-991.
- McDOWALL, R.D. (1999) The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. *Anal. Chim. Acta*, **391**, 149-158.
- MORELLI, B., (1995). Determination of Ternary Mixtures of Antibiotics, by Ratio-Spectra Zero-Crossing First- and Third-Derivative Spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **13**, 219-227.
- MORELLI, B., (1994). Simultaneous Determination of Cef triaxone and Streptomycin in Mixture by Ratio-Spectra 2nd Derivative and Zero- Crossing 3rd Derivative Spectrophotometry. *Talanta* **41**, 673-683.
- OLIVEIRA-BRETT A.M., DICULESCU V., PIEDADE J.A.P., (2002). Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. *Bioelectrochem*, **55**, 61-62.
- OMMATY, R., (2009) Vademecum Modern İlaç Rehberi, 32^{ed} *Pelikan Yayınları*
- OSTATNA, V., USLU, B., DOGAN, B., OZKAN, S.A., PALECEK, E. (2006) "Native and denatured bovine serum albumin. D.c. polarography, stripping voltammetry and constant current chronopotentiometry " *J. Electroanal. Chem.*, **593**: 172-178.
- OZKAN, S.A., USLU, B., ZUMAN, P., (2004) "Electrochemical oxidation of Sildenafil Citrate (Viagra) on Carbon Electrodes". *Anal. Chim. Acta.*, **501**: 227 - 233
- OZKAN S.A. USLU B., (2002) Electrochemical study of fluvastatin sodium--analytical application to pharmaceutical dosage forms, human serum, and simulated gastric juice. *Anal. Bioanal. Chem.* **372**: 582-586
- OZKAN, S.A., USLU, B., ABOUL-ENEIN, H.Y. (2003a). Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **33**, 155-181
- OZKAN S.A., USLU B., ABOUL-ENEIN H.Y., (2003b). Voltammetric investigation of Tamsulosin. *Talanta*, **61**: 147.
- OZKAN, S.A., ERK, N., SENTURK, Z., (1999). Simultaneous Determination of Two Component Mixtures in Pharmaceutical Formulations Containing Chlordiazepoxide by Ratio Spectra Derivative Spectrophotometry. *Anal. Lett.* **32**, 479-520.
- OZKAN, S.A., ÖZKAN, Y., ŞENTÜRK, Z., (1998) Electrochemical reduction of metronidazole at activated glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**: 3299 - 3305
- OZKAN, S.A., ŞENTÜRK, Z., BİRYOL, İ., (1997) Voltammetric determination of ornidazole in pharmaceutical dosage forms based on reduction at an activate glassy carbon electrode. *Int. J. Pharm.* **157**: 137 - 144
- OZKAN, S.A., BİRYOL, İ., ŞENTÜRK, Z., (1994) An activation method for glassy carbon electrode. *Tr. J. Chem.* **18**: 34 - 38

- OZKAN, B., BİRYOL, İ., ŞENTÜRK, Z. (1993) Modifiye elektrotlara genel bir bakış. *FABAD J. Pharm. Sci.*, **18**(2): 95-101.
- O'NEIL, M.J. (Senior Ed.) (2001), *The Merck Index*, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13th Ed., Merck&Co., Inc., New Jersey.
- PALECEK E., JELEN F., (2002). Electrochemistry of nucleic acids and development of DNA sensors. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **32**: 261-270.
- PANZER, R.E., (1972) Behaviour of carbon electrodes in aqueous and non – aqueous system. *J. Electrochem. Soc.*, 119 – 864
- PAPADOYANNIS, I.N., SAMANIDOU, V.F. (2004) Validation of HPLC instrumentation. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* **27**, 753-783
- PATRIARCHE, G.J., CHATEAU – GOSSELIN, M., VANDENBALCK, J.L., (1979). Polarography and related electroanalytical techniques in pharmacy and pharmacology. *Electroanalytical Chem.* **Vol 11** Ed. J.A. Bard, New York: Marcel Dekker, p: 141 – 189
- PISTONESI, M., CENTURIÓN, M.E., BAND, B.S.F., DAMIANI, P.C., OLIVIERI, A.C., (2004). Simultaneous determination of levodopa and benserazide by stopped-flow injection analysis and three-way multivariate calibration of kinetic-spectrophotometric data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **36 (3)**, 541-547.
- PRAVDA, M., (1998) Application of electrochemical sensors and detection system in biomedical analysis. Thesis presented to fulfil the requirements for the degree of doctor in Pharmaceutical Sciences. Vrije Universiteit, Brussel.
- RAUF, S. GOODING, J.J., AKHTAR, K., GHOURI, M.A., RAHMAN, M., ANWAR, M.A., KHALID, A.M., (2005) Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 205-217
- RILEY, C.M., ROSANSKE, T.W., (1996) Development and Validation of Analytical Methods. Elsevier Science Ltd., New York.
- ROSS, Jr., (1977) The effect of anions hydrogen chemisorption and oxide formation in aqueous acids. *J. Electroanal. Chem.* **76**: 139 - 145
- RUSLING, J.F., (1984). Variations in electron-transfer rate at polished glassy carbon electrodes exposed to air. *Anal. Chem.*, **56**: 575 - 578
- SAGAR, K.A., SMYTH, M.R., (2000). Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and their metabolites in human plasma and urine samples using LC-EC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **22 (3)**, 613-624.
- SALINAS, F., BERZAS-NEVADO, J.J., ESPINOSA MANSILLA, A., (1990). A new spectrophotometric method for quantitative multicomponent analysis. Resolution of mixtures of salicylic and salicylic acids. *Talanta* **37**, 341–351.
- SHABIR, G.A. (2003) Validation high performance liquid chromatography methods

- for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A.*, **987**, 57-66.
- SHEARER, C.M., CHRISTENSON, K., MUJHERJI, A., PAPARIELLO, C.J., (1972) Peak voltammetry at glassy carbon electrode of acetaminophen dosage forms. *J. Pharm. Sci.* **61**: 1627
- SKOOG - HOLLER - NIEMAN. (2000). Analitik Kimya Temelleri. 7. Baskı Çeviri Editörleri Esma Kılıç ve ark., Bilim Yayıncılık - Ankara s: 460 - 466
- SMYTH, M.R., VOS, J.G., (1992) Analytical Voltammetry, Volume XXVII Elsevier Publications, N.Y.
- SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L. (1997): Practical HPLC Method Development, 2nd Ed.
- SONG, M., HANG, T., ZHAO, H., WANG, L., GE, P., MA, P., (2007). Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 3427-3434.
- STUTTS, K.J., KOVACH, P.M., KUHR, W.G., WHITMAN, R.M. (1983). Enhanced electrochemical reversibility at heat treated glassy carbon electrodes. *Anal. Chem.* **55**: 1632 - 1634
- SURMENIAN, M., ABOUL-ENEIN, H.Y., (1998). Simultaneous determination of pyridoxine and melatonin in tablet formulation by derivative ultraviolet spectroscopy. *Anal. Lett.* **31**, 1731-1741.
- SUSLU, I., DINC, E., DEMIRCAN, S., ALTINOZ, S., (2009). Continuous wavelet transform for the resolution of the overlapping voltammetric signals and simultaneous determination of levodopa and benserazide. *Reviews in Analytical Chemistry* **28 (2)**, 137-149.
- SWARTZ, M.E., KRULL, I.S., (1997) Analytical method development and validation, Marcel Dekker, New York.
- SWEETMAN S.C. (2007), Martindale, The Complete Drug Reference, 35th Ed., Pharmaceutical Press, London.
- ŞENTÜRK, Z., OZKAN, S.A., USLU, B., BİRYOL, İ., (1996) Anodic voltammetry of fluphenazine at different solid electrodes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**: 365 – 370
- ŞENTÜRK, Z., OZKAN, S.A., OZKAN, N., (1998) Electroanalytical study of nifedipine using activated glassy carbon electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**: 801 – 807
- TALEBPOUR, Z., HAGHGOO, S., SHAMSIPUR, M., (2004). ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa, carbidopa and methyl dopa in human serum and pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta* **506 (1)**, 97-104.
- TAYLOR, R.J., HUMPFAY, A.A. (1973) Electrochemical studies on glassy carbon

electrodes. *Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, **42**: 347 - 354

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 24th Ed , 2000 [CD-ROM].

THORNTON, D.C., CORBY, K.T., SPENDEL, V.A., JORDAN, J., ROBBAT, A., RUTSTORM, D.J., EROS, M., RITZLER, G., (1985). Pretreatment and validation procedure for glassy carbon voltammetric indicator electrodes. *Anal. Chem.*, **57**: 150 - 155.

TJADEN, U.R., LANKELMA, J., POPPE, H., MUUSZE, R.G., (1976) Anodic coulometric detection with a glassy carbon electrode in combination with reversed phase high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* **125**: 275 - 286

TOLOKÁN, A., KLEBOVICH, I., BALOGH-NEMES, K., HORVAI, G., (1997).Automated determination of levodopa and carbidopa in plasma by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection using an on-line flow injection analysis sample pretreatment unit. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* **698** (1-2), 201-207.

TUNÇEL, N., AYRAL, M.N., BİRYOL, İ., (1984) İn vivo ve in vitro elektrokimyasal oksijen tayini. *Doğa Bilim Dergisi*, **8**: 82 – 89

TURNER, J.A., CHRISTIE, J.H., VUKOVIC, M., OSTERYOUNG, R.A., (1977) Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: Experimental. *Anal. Chem.* **49** (13): 1904 - 1908

USLU, B., BİRYOL, İ.(1999) "Voltammetric determination of amoxicillin using a poly (N-vinyl imidazole) modified carbon paste" *J.Pharm.Biomed.Anal.* , **20**,591-598

USLU, B., YILMAZ, S., OZKAN, S.A. (2001) "Determination of olsalazine sodium in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry" *Die Pharmazie* ,**56**(8): 629-632.

USLU, B., OZKAN, S.A., (2002). Determination of binary mixtures of levodopa and benserazide in pharmaceuticals by ratio-spectra derivative spectrophotometry. *Anal. Lett.*, **35**, 303–314.

USLU, B., OZKAN, S.A., (2002).Determination of lamivudine and zidovudine in binary mixture using first derivative spectrophotometric, first derivative of the ratio spectra, and HPLC-UV methods. *Anal.Chim. Acta*, **466**, 175–185.

USLU, B., ÖZKAN, S.A., (2002). Determination of binary mixtures of levodopa and benserazide in pharmaceuticals by ratio-spectra derivative spectrophotometry. *Analytical Letters* **35** (2), 303-314.

USLU, B., OZKAN S.A., ABOUL-ENEIN H.Y., (2002). Spectrophotometric Determination of Melatonin and Pyridoxine HCl in Binary Mixture using First Derivative of the Ratio Spectra Method. *Anal. Lett* **35**, 2305-2317.

USLU, B., ÖZKAN, S.A., (2002). Determination of Lamivudine and Zidovudine in Binary Mixture Using First Derivative Spectrophotometric, First Derivative of the Ratio Spectra, and HPLC-UV Methods. *Anal. Chim. Acta* **466**, 175–185.

- USLU B., OZKAN S.A. (2004), Anodic Voltammetry of Abacavir and Its Determination in Pharmaceuticals and Biological Fluids. *Electrochim.Acta* **49**: 4321.
- USLU, B.,DOĞAN, B., OZKAN, S.A., ABAUL-ENEIN, H.Y.(2005) “Electrochemical behavior of vardenafil on glassy carbon electrode: Determination in tablets and human serum” *Anal. Chim. Acta*, **552**: 127 – 134
- USLU, B.,DOĞAN, B., OZKAN, S.A., ABOUL-ENEIN, H.Y., (2005a) “ Voltammetric investigation and determination of mefloquine” *Electroanalysis*, **17**: 1563-1570,.
- USLU, B., DOĞAN, B., OZKAN, S.A., (2005b) “Electrochemical studies of ganciclovir at glassy carbon electrodes and its direct determination in serum and pharmaceuticals by square wave and differential pulse voltammetry” *Anal. Chim. Acta*, , **537**: 307-313.
- USLU, B., OZKAN,S.A., ŞENTÜRK, Z., (2006) Electrooxidation of the antiviral drug valacyclovir and its square-wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human biological fluids. *Anal. Chim. Acta* , **555**: 341-347.
- USLU B., OZKAN SA. (2007)"Electroanalytical application of carbon based electrodes to the Pharmaceuticals" *Anal.Lett.* (baskıda).
- ÜSTÜNES, L., (2009) RxMedia Pharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı
- VAN DER LINDEN, W.E., DIEKER, J.W., (1986) Glassy Carbon as electrode material in electroanalytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*, **199** : 1 - 24
- VESSMAN, J.(1996) Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **14**, 867-869
- WANG, J., HUTCHINS, L.D., (1985) Activation of glassy carbon electrodes by alternating current electrochemical treatment. *Anal. Chim. Acta.*, **167**: 325 - 334
- WANG, J., LUO, D. B. (1985). The determination of bilirubin by adsorptive stripping Voltammetry. *J.Electroanal.Chem.*, **185**: 61-71.
- WANG, J. (1988) Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry on Laboratory Medicine. VCH Publishers, N.Y.
- WIGHTMAN R.M., DEAKIN, M.R., KOVACH, P.M., KUHR, W.G., STUTTS, K.J., (1984) Methods to improve electrochemical reversibility at carbon electrodes, *J. Electrochem. Soc.*, **131**: 1578 - 1583
- WILLIARD H.H., MERRIT, L.L., DEAN, J.A., SETTLE, F.A., (1981). Instrumental methods of analysis. 6th Ed., New York: Litton Educational Publishing Inc. P: 691 - 734.
- YILDIZ, A., GENÇ, Ö., (1993). Enstrümental Analiz. Hacettepe Üniversitesi Yayınları 1.Baskı, s: 352
- YILMAZ, N., OZKAN, S.A., USLU, B.,ŞENTÜRK, Z., BİRYOL, İ. (1998) “Determination of terbutaline based on oxidation by voltammetry” *J.Pharm.Biomed.Anal.*, **17**,349-355

YILMAZ S., USLU B., OZKAN S.A. (2001), Anodic Oxidation of Etodolac and Its Square Wave and Differential Pulse Voltammetric Determination in Pharmaceuticals and Human Serum. *Talanta* **54**, 351.

ZUMAN, P., BREZINA, M., (1962). Polarographic analysis in pharmacy. Progress in polarography. Vol. 2th Ed. P. Zuman, I.M. Kolthoff, New York, Interscience Publishers

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

SOYADI, ADI	DOĞUM YERİ, TARİHİ	
DEMİRCİGİL BARIŞ TOLGA	ANKARA, 1975	
UYRUĞU	MEDENİ DURUMU	
TC	EVLİ	
ASKERLİK DURUMU		
ASKERLİĞİNİ YAPMIŞ		
YAZIŞMA ADRESİ :		
BİLİCİ ECZANESİ 19 MAYIS MAH. GÜN SAZAK CAD. 101/A KEÇİÖREN		
TELEFON	FAKS	E-MAIL:
0312 358 28 37	0312 360 79 89	baristolgademircigil@gmail.com

II. Eğitimi

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE	ÖĞRENİM BİRİMİ	ÖĞRENİM ALANI
1992-1997	Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Eczacılık
1989-1992	Lise	Deneme Lisesi	Fen-Matematik
1986-1989	Ortaokul	Bahçelievler Ortaokulu	
1981-1986	İlkokul	Bahçelievler İlkokulu	

YABANCI DİLİ	SEVİYESİ
İngilizce	İyi

IV. Mesleki Deneyimi

GÖREV DÖNEMİ	GÖREV TÜRÜ	KURULUŞ
2003-...	Eczacı	Bilici Eczanesi

Serbest Eczane 6 yıl.

V. Bilimsel İlgi Alanları

ULUSLARARASI MAKALELER
DEMİRCİGİL, B.T., ÖZKAN, S.A., ÇORUH, Ö., YILMAZ, S. (2002). Electrochemical behavior of formoterol fumarate and its determination in capsules for inhalation and human serum using differential – pulse and square – wave voltammetry. <i>Electroanal.</i> , 14(2) , 122 – 127
DEMİRCİGİL, B.T., USLU, B., ÖZKAN, Y., ÖZKAN, S.A., ŞENTÜRK, Z., (2003) "Voltammetric oxidation of ambroxol and application to its determination in pharmaceutical and in drug dissolution studies, <i>Electroanalysis</i> , 15 : 230-234
SUZEN, S., ATES-ALAGOZ, Z., DEMİRCİGİL, B.T., OZKAN, S.A., (2001). Synthesis and analytical evaluation by voltammetric studies of some new indole-3-propionamide derivatives. <i>Farmaco.</i> 56 , 835–840.
USLU, B., DEMİRCİGİL, B.T., OZKAN, S.A., ŞENTURK, Z., ABOUL-ENEİN, H.Y., (2001). Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablet formulations by differential pulse voltammetry. <i>Pharmazie</i> 56 , 938–942.
TOPAL B. D., BOZAL, B., DEMİRCİGİL ,B. T., USLU, B., OZKAN, S. A., (2009). Electroanalytical studies and simultaneous determination of amlodipine besylate and atorvastatine calcium in binary mixtures using first derivative of the ratio-voltammetric methods. <i>Electroanalysis</i> , 21 (22) , 2427-2439.