



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI ANTİHİPERTANSİF ETKEN
MADDELERİNİN MODİFİYE
CAMSİ KARBON ELEKTROTLAR
KULLANILARAK FARMASÖTİK DOZAJ
FORMLARINDAN VE BİYOLOJİK
SIVILARDAN ELEKTROANALİTİK
YÖNTEMLERLE TAYİNİ**

Gökçe ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Dilek KUL

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

14.02.2024
Gökçe ÖZTÜRK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora sürecimde birlikte çalıştığım, kendisinden çok şey öğrendiğim, akademik ve sosyal hayatımda güzel anılar paylaştığım danışman hocam Prof. Dr. Dilek KUL'a;

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili hocam Doç. Dr. Fatma AĞIN'a;

Bana karşı hep aynı güzellikte olan, farmasötik kimya ana bilim dalının benim için ayrı bir yerde olmasının öncelikli sebebi sevgili hocam Doç. Dr. İ. Selin DOĞAN'a;

Tezim için ne zaman yardımına ihtiyaç duysam elinden gelenin en iyisini yapmak için emek veren arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi H. Erdinç SELLİTEPE ve Dr. Öğr. Üyesi Seçkin ENGİN'e;

Desteğiyle daima yanımda olan sevgili meslektaşım Sena ATAL'a;

Tanıdığım için şanslı olduğum, yoluma anlam ve değer katan ısıltılarının hep var olmasını dilediğim Ezgi PEHLİVANLAR, Kutsal ÖZCAN, Hilal ZIVALI, Ümran SOFU, Didem AKKAYA, Elif ŞİŞMAN, Gökçe SEYHAN ve Batuhan ÇETİN'e;

Her zor zamanımda bana kendimi güçlü hissettirmeyi başaran kardeşim, en değerlim Selin'e ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gökçe ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xviii
ÖZET	xxi
ABSTRACT	xxii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hipertansiyon	3
2.2. Antihipertansif İlaçlar	5
2.2.1. Doksazosin	5
2.2.2. Amlodipin	7
2.2.3. Bisoprolol	8
2.3. Tez Kapsamında İncelenen Maddelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	9
2.3.1. Doksazosin Mesilatın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	9
2.3.2. Amlodipin Besilatın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	10
2.3.3. Bisoprolol Fumaratın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	11
2.4. Elektrokimya	11
2.4.1. Elektrokimyasal Hücreler	12
2.4.2. Kütle Transferi	12
2.4.2.1. Difüzyon	12
2.4.2.2. Konveksiyon	12
2.4.2.3. İyonik Göç	13
2.5. Elektroanalitik Kimya	13
2.6. Voltametri	14
2.7. Voltametrik Hücre	15

2.8. Çalışma Elektrodu	15
2.8.1. Katı Elektrotlar	16
2.8.1.1. Camsı Karbon Elektrot	17
2.8.2. Modifiye Elektrot	18
2.8.2.1. Karbon Nanotüpler	19
2.8.2.2. İletken Polimerler	21
2.8.2.3. Naftol Yeşili B	22
2.9. Referans Elektrot	25
2.10. Yardımcı Elektrot	25
2.11. Voltametrik Yöntemler	25
2.11.1. Döngülü Voltametri	25
2.11.2. Puls Voltametri	28
2.11.2.1. Diferansiyel Puls Voltametrisi	29
2.11.2.2. Kare Dalga Voltametrisi	30
2.11.3. Sıyırma Voltametrisi	30
2.12. Analitik Yöntem Validasyonu ve Parametreleri	31
2.13. Etken Maddelerin Literatürdeki Çalışmaları	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	46
3.1. Cihazlar	46
3.2. Gereçler	46
3.3. Elektrotlar	47
3.4. Kimyasal Maddeler	47
3.4.1. Etken Maddeler ve Diğer Kimyasallar	47
3.5. Çözeltilerin Hazırlanması	48
3.5.1. Etken Madde Çözeltileri	48
3.5.2. Destek Elektrolit Çözeltileri	49
3.5.3. Yapay İdrar Çözeltisi	49
3.5.4. Tablet Çözeltileri	49
3.5.5. Biyolojik Sıvıların Çözeltileri	50
3.5.6. Nanopartikül ve Monomer Çözeltileri	50
3.5.6.1. Karbon Nanotüp Süspansiyonu	50
3.5.6.2. Monomer Çözeltisi	50
3.6. Modifiye Elektrotların Hazırlanması	51

3.6.1. MWCNT/GCE'nin Hazırlanması	51
3.6.2. PNGB/GCE'nin Hazırlanması	51
3.6.3. MWCNT/PNGB/GCE'nin Hazırlanması	51
3.6.4. PNGB/MWCNT/GCE'nin Hazırlanması	52
3.7. Voltametrik Çalışmalar	52
3.7.1. Modifiye Elektrodun Seçilmesi	52
3.7.2. Destek Elektrolit ve pH Etkisi	52
3.7.3. Hız Taraması	53
3.7.4. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu	53
3.7.5. Kalibrasyon Çalışması	53
3.7.6. Tekrar Edilebilirlik Çalışması	54
3.7.7. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin Çalışması	55
3.7.8. Geri Kazanım Çalışması	55
3.7.9. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması	55
4. BULGULAR	56
4.1. Elektrotların Polimerizasyonu	56
4.2. Doksazosin Mesilat için Elde Edilen Bulgular	57
4.2.1. Elektrodun Optimizasyonu	57
4.2.2. Destek Elektrolit ve pH Etkisi	60
4.2.3. Hız Taraması	64
4.2.4. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu	65
4.2.5. Kalibrasyon Çalışması	67
4.2.6. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları	69
4.2.7. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması	71
4.3. Amlodipin Besilat için Elde Edilen Bulgular	76
4.3.1. Elektrodun Optimizasyonu	76
4.3.2. Destek Elektrolit ve pH Etkisi	79
4.3.3. Hız Taraması	83
4.3.4. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu	84
4.3.5. Kalibrasyon Çalışması	86
4.3.6. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları	88
4.3.7. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması	90
4.4. Bisoprolol Fumarat için Elde Edilen Bulgular	93

4.4.1. Elektrodun Optimizasyonu	93
4.4.2. Destek Elektrolit ve pH Etkisi	96
4.4.3. Hız Taraması	99
4.4.4. Kalibrasyon Çalışması	101
4.4.5. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları	103
4.4.6. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması	104
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	107
5.1. Doksazosin Mesilat	107
5.2. Amlodipin Besilat	110
5.3. Bisoprolol Fumarat	114
5.4. Literatürdeki Çalışmalar ile Karşılaştırma	116
6. KAYNAKLAR	123
ÖZGEÇMİŞ	149

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Kullanılan ilaç etken maddelerin farmasötik dozaj formları ve birim doz içerikleri	47
Tablo 2. Kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar	48
Tablo 3. Farklı elektrotlar ile pH 7.0 FT içerisindeki 6×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri	58
Tablo 4. Farklı elektrotlar kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 2×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri	59
Tablo 5. DM'nin PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri	68
Tablo 6. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM çözeltilerinden DPSV ve SWSV yöntemleri ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	69
Tablo 7. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri	70
Tablo 8. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM çözeltilerinden DPSV ve SWSV yöntemleri ile elde edilen geri kazanım çalışması verileri	70
Tablo 9. PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV yöntemi kullanılarak DM içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	72
Tablo 10. PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV ve SWSV kullanılarak DM içeren idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	73
Tablo 11. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM içeren serum çözeltilerinden DPSV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	74
Tablo 12. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM içeren idrar çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	74
Tablo 13. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak 6.0×10^{-7} M DM içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	75

Tablo 14.	PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak DPSV için 1.0×10^{-6} M ve SWSV için 8.0×10^{-6} M DM içeren idrar çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	75
Tablo 15.	Farklı elektrotlar ile pH 7.0 FT içerisindeki 6×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri	77
Tablo 16.	Farklı elektrotlar kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri	78
Tablo 17.	AB'nin PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri	87
Tablo 18.	PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak DPSV için pH 7.0 FT ve SWSV için pH 5.5 AT içerisindeki AB çözeltilerinden elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	88
Tablo 19.	PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak DPSV için pH 7.0 FT ve SWSV için pH 5.5 AT içerisindeki AB çözeltilerinden elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri	89
Tablo 20.	PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak DPSV için pH 7.0 FT ve SWSV için pH 5.5 AT içerisindeki AB çözeltilerinden elde edilen geri kazanım çalışması verileri	90
Tablo 21.	PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV yöntemi kullanılarak AB içeren serum ve idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	91
Tablo 22.	PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki AB içeren serum ve idrar çözeltilerinden DPSV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	92
Tablo 23.	PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-6} M AB içeren serum ve idrar çözeltilerinden DPSV yöntemi ile elde edilen geri kazanım verileri	93
Tablo 24.	Farklı elektrotlar ile pH 7.0 FT içerisindeki 8×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri	95
Tablo 25.	Farklı elektrotlar kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 8×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri	96
Tablo 26.	BF'nin MWCNT/GCE ile DPV yöntemi kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri	102

Tablo 27.	MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki BF çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	102
Tablo 28.	MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki BF çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri	103
Tablo 29.	MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki BF çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen geri kazanım çalışması verileri	104
Tablo 30.	MWCNT/GCE ile DPV yöntemi kullanılarak BF içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri	105
Tablo 31.	MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki BF içeren serum çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	106
Tablo 32.	MWCNT/GCE kullanılarak 1.0×10^{-5} M BF içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	106
Tablo 33.	Doksazosin için tez çalışması ile elde edilen kalibrasyon verilerinin literatür çalışmaları ile karşılaştırılması	119
Tablo 34.	Amlodipin için tez çalışması ile elde edilen kalibrasyon verilerinin literatür çalışmaları ile karşılaştırılması	120
Tablo 35.	Bisoprolol için tez çalışması ile elde edilen kalibrasyon verilerinin literatür çalışmaları ile karşılaştırılması	122

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. DM'nin kimyasal yapısı	10
Şekil 2. AB'nin kimyasal yapısı	10
Şekil 3. BF'nin kimyasal yapısı	11
Şekil 4. Grafen, SWCNT ve MWCNT'nin şematik gösterimi	20
Şekil 5. NGB'nin kimyasal yapısı	24
Şekil 6. CV yöntemi için üç döngülü uygulanan uyarma sinyalinin şematik gösterimi	26
Şekil 7. (A) Tersinir, (B) yarı tersinir ve (C) tersinmez bir elektrot reaksiyonunun döngülü voltamogramları	27
Şekil 8. DPV için (A) uyarma sinyalinin şematik gösterimi ve (B) elektrot reaksiyonunun voltamogramı	29
Şekil 9. SWV için (A) uyarma sinyalinin şematik gösterimi ve (B) elektrot reaksiyonunun voltamogramı	30
Şekil 10. (A) GCE ve (B) MWCNT/GCE yüzeyine 0.1 M BRT (pH 3.1) içerisinde PNGB filminin kaplanması ile elde edilen döngülü voltamogramlar. Döngü sayısı: 15. Monomer derişimi: 5.0×10^{-4} M	56
Şekil 11. Farklı miktarlarda MWCNT ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın GCE, (b) 1 μ L, (c) 2 μ L, (d) 4 μ L ve (e) 6 μ L MWCNT/GCE	58
Şekil 12. Farklı miktarlarda MWCNT ve/veya PNGB ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 2.0×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın, (b) 2 μ L MWCNT, (c) PNGB/2 μ L MWCNT, (d) 2 μ L MWCNT/PNGB ve (e) PNGB modifiyeli GCE	59
Şekil 13. (a) pH 5.0 BRT, (b) pH 5.5 AT, (c) pH 6.0 BRT, (d) pH 7.0 FT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s ⁻¹	60

Şekil 14.	(a) pH 8.0 FT, (b) pH 6.0 FT, (c) pH 5.5 AT, (d) pH 5.0 BRT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM'nin (A) DP ve (B) SW voltamogramları	61
Şekil 15.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT (▲), 0.2 M FT (●) ve 0.04 M BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM'nin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri	62
Şekil 16.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT (▲), 0.2 M FT (●) ve 0.04 M BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM'nin pH'ya karşı pik akımı grafikleri	63
Şekil 17.	pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM çözeltisinden tek döngülü CV ile alınan hız taraması voltamogramları	64
Şekil 18.	CV yöntemi ile (A) tarama hızına ve (B) tarama hızının kareköküne karşı pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen pik akımı grafikleri	65
Şekil 19.	(A) DPSV ve (B) SWSV yöntemleri ile pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM çözeltilerinden elde edilen biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri	65
Şekil 20.	(A ve B) DPSV ve (C ve D) SWSV ile pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM çözeltilerinden (A ve C) 100 rpm ve (B ve D) 500 rpm karıştırma hızlarında elde edilen biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri	67
Şekil 21.	(A) DPSV ve (C) SWSV yöntemleri ile pH 5.5 AT içerisindeki DM çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar ve (B) DPSV ve (D) SWSV için DM konsantrasyonuna karşı pik akımı grafikleri	68
Şekil 22.	DPSV yöntemi ile DM içeren pH 5.5 AT içerisindeki serum çözeltilerinden elde edilen (A) voltamogramlar ve (B) konsantrasyona karşı pik akımı grafiği	71
Şekil 23.	(A) DPSV ve (C) SWSV ile pH 5.5 AT içerisindeki DM içeren idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar ve (B) DPSV ve (D) SWSV için konsantrasyona karşı pik akımı grafikleri	72

- Şekil 24.** Farklı miktarlarda MWCNT ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın GCE, (b) 1 μ L, (c) 2 μ L, (d) 4 μ L ve (e) 6 μ L MWCNT/GCE 77
- Şekil 25.** Farklı miktarlarda MWCNT ve/veya PNGB ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) PNGB, (b) yalın, (c) 2 μ L MWCNT, (d) PNGB/2 μ L MWCNT ve (e) 2 μ L MWCNT/PNGB modifiyeli GCE 78
- Şekil 26.** (a) pH 8.0 FT, (b) pH 7.0 FT, (c) pH 6.0 BRT, (d) pH 5.5 AT ve (e) pH 5.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s⁻¹ 79
- Şekil 27.** (a) pH 7.0 FT, (b) pH 5.5 AT, (c) pH 8.0 BRT, (d) pH 6.0 BRT ve (e) pH 5.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB'nin (A) DP ve (B) SW voltamogramları 80
- Şekil 28.** (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT ($\blacktriangle$), 0.2 M FT ($\bullet$) ve 0.04 M BRT ($\times$) içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB'nin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri 81
- Şekil 29.** (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT ($\blacktriangle$), 0.2 M FT ($\bullet$) ve 0.04 M BRT ($\times$) içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB'nin pH'ya karşı pik akımı grafikleri 82
- Şekil 30.** pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB çözeltisinden tek döngülü CV ile alınan hız taraması voltamogramları 83
- Şekil 31.** CV yöntemi ile (A) tarama hızına ve (B) tarama hızının kareköküne karşı pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen pik akımı grafikleri 84
- Şekil 32.** (A) DPSV ve (B) SWSV yöntemleri ile pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB çözeltilerinden elde edilen biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri 84

Şekil 33.	(A ve B) DPSV ile pH 7.0 FT ve (C ve D) SWSV ile pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB çözeltilerinden (A ve C) 100 rpm ve (B ve D) 500 rpm karıştırma hızlarında elde edilen biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri	86
Şekil 34.	(A ve B) pH 7.0 FT ve (C ve D) pH 5.5 AT içerisindeki AB çözeltilerinden elde edilen (A) DPS ve (C) temel çizgi düzeltmesi yapılmış SWS voltamogramları. (B) DPSV ve (D) SWSV için AB konsantrasyonuna karşı pik akımı grafikleri	87
Şekil 35.	DPSV yöntemi ile AB içeren pH 7.0 FT içerisindeki (A ve B) serum ve (C ve D) idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar ve konsantrasyona karşı pik akımı grafikleri	91
Şekil 36.	Farklı miktarlarda MWCNT ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 8.0×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın GCE, (b) 1 μ L, (c) 2 μ L, (d) 4 μ L ve (e) 6 μ L MWCNT/GCE	94
Şekil 37.	Farklı miktarlarda MWCNT ve/veya PNGB ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 8.0×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın, (b) PNGB, (c) PNGB/2 μ L MWCNT, (d) 2 μ L MWCNT/PNGB ve (e) 2 μ L MWCNT modifiyeli GCE	95
Şekil 38.	Farklı pH'lardaki FT içerisindeki 1.0×10^{-4} M BF'nin (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramları	97
Şekil 39.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT ($\blacktriangle$), 0.2 M FT ($\bullet$) ve 0.04 M BRT ($\times$) içerisindeki 1.0×10^{-4} M BF'nin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri	98
Şekil 40.	(A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT ($\blacktriangle$), 0.2 M FT ($\bullet$) ve 0.04 M BRT ($\times$) içerisindeki 1.0×10^{-4} M BF'nin pH'ya karşı pik akımı grafikleri	99
Şekil 41.	pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M BF çözeltilerinden tek döngülü CV ile alınan hız taraması voltamogramları	100

Şekil 42. CV yöntemi ile (A) tarama hızına ve (B) tarama hızının kareköküne karşı pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen pik akımı grafikleri	100
Şekil 43. DPV yöntemi ile pH 7.0 FT içerisindeki BF çözeltilerinden (A) temel çizgi düzeltmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar ve (B) konsantrasyona karşı pik akımı grafiği	101
Şekil 44. DPV yöntemi ile pH 7.0 FT içerisindeki BF içeren serum çözeltilerinden (A) temel çizgi düzeltmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar ve (B) konsantrasyona karşı pik akımı grafiği	105



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AB	Amlodipin besilat
AT	Asetat tamponu
BF	Bisoprolol fumarat
BRT	Britton-Robinson tamponu
CV	Döngülü voltametri
DM	Doksazosin mesilat
DMF	Dimetil formamid
DP	Diferansiyel puls
DPS	Diferansiyel puls sıyırma
DPSV	Diferansiyel puls sıyırma voltametrisi
DPV	Diferansiyel puls voltametri
FDA	The Food and Drug Administration
FT	Fosfat tamponu
GCE	Camsı karbon elektrot
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
JNC	Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
LSV	Doğrusal taramalı voltametri
<i>m</i>	Eğim
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüpler
MWCNT-COOH	Karboksilik asit grubu ile fonksiyonlanmış çok duvarlı karbon nanotüpler
NGB	Naftol yeşili B
pH	Hidrojen konsantrasyonunun kologaritması
PNGB	Poli(Naftol yeşili B)
RSD	Bağıl standart sapma
<i>s</i>	Standart sapma
SWCNT	Tek duvarlı karbon nanotüpler

SW	Kare dalga
SWS	Kare dalga sıyırma
SWSV	Kare dalga sıyırma voltametrisi
SWV	Kare dalga voltametrisi
USP	United States Pharmacopeia

Simgeler

°C	Santigrat derece
μ	Mikro
A	Amper
dk	Dakika
E	Potansiyel
g	Gram
I_p	Pik akımı
i	Akım
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmHg	Milimetre cıva
mV	Milivolt
r	Korelasyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
v	Tarama hızı
V	Volt

Formüller

Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş klorür
Al(OH)₃	Alüminyum hidroksit
C₂H₅OH	Etil alkol
CaCl₂.2H₂O	Kalsiyum klorür dihidrat
CH₃CN	Asetonitril
CH₃COOH	Asetik asit
CH₄N₂O	Üre
H₂SO₄	Sülfürik asit

H₃BO₃	Borik asit
H₃PO₄	Fosforik asit
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
Na₂SO₄	Sodyum sülfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH₂PO₄.2H₂O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
NaOH	Sodyum hidroksit
NH₄Cl	Amonyum klorür



ÖZET

Bazı Antihipertansif Etken Maddelerinin Modifiye Camsı Karbon Elektrotlar Kullanılarak Farmasötik Dozaj Formlarından ve Biyolojik Sıvılardan Elektroanalitik Yöntemlerle Tayini

Bu tez çalışmasında elektrokimyasal olarak aktif olan doksazosin mesilat, amlodipin besilat ve bisoprolol fumarat antihipertansif etken maddelerinin voltametrik yöntemlerle hassas tayini için modifiye camsı karbon elektrotlar geliştirildi. Camsı karbon elektrot yüzeyi, çok duvarlı karbon nanotüplerin ve/veya naftol yeşili B boyar maddesinin elektrot yüzeyinde farklı kombinasyonlarda kaplanması ile modifiye edildi. Her bir etken madde için, değişik kombinasyonlarda hazırlanan modifiye elektrotlar arasında en yüksek pik akımına sahip en simetrik pikleri veren modifikasyon seçilerek analiz çalışmaları bu elektrotlarla yapıldı. Etken maddelerin analizi için, döngülü voltametri, diferansiyel puls voltametrisi ve kare dalga voltametrisi yöntemleri kullanıldı. Analiz için uygun tampon ortamı, doksazosin mesilat için pH 5.5 asetat tamponu, amlodipin besilat için pH 7.0 fosfat ve pH 5.5 asetat tamponları ve bisoprolol fumarat için pH 7.0 fosfat tamponu olarak belirlendi. Tarama hızı çalışmaları ile doksazosin mesilat ve amlodipin besilatın adsorpsiyon kontrollü ve bisoprolol fumaratın difüzyon kontrollü bir prosese sahip olduğu olduğu görüldü. Adsorpsiyon kontrollü etken maddeler için biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi ve karıştırma hızı optimize edildi. Belirlenen şartlarda her bir maddenin kantitatif analizi için voltametrik yöntemler kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturuldu; doğrusal çalışma aralıkları, teşhis ve tayin sınırları belirlendi. Geliştirilen yöntemlerin kesinlikleri gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneyleri ile beş değer üzerinden hesaplandı ve %2'nin altında elde edildi. Son olarak etken maddeler, geliştirilen yöntemler kullanılarak farmasötik dozaj formlarından, insan serum ve yapay idrar örneklerinden tayin edildi. Buna göre, her bir etken madde için geliştirilen en az bir yöntem hem farmasötik dozaj formlarına hem de biyolojik numuneye uygulanabildi. Bu da, numunelerdeki diğer maddelerin etkisi olmadan etken maddelerin yüksek doğrulukla analizlerinin yapılabildiğini gösterdi.

Anahtar Sözcükler: Amlodipin, Bisoprolol, Doksazosin, Karbon nanotüp, Naftol yeşili B, Voltametri

ABSTRACT

Determination of Some Antihypertensive Active Substances from Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Fluids Using Modified Glassy Carbon Electrodes with Electroanalytical Methods

In this thesis study, modified glassy carbon electrodes were developed for the sensitive determination of the electrochemically active antihypertensive active substances doxazosin mesylate, amlodipine besylate and bisoprolol fumarate by voltammetric methods. The glassy carbon electrode surface was modified by coating multi-walled carbon nanotubes and/or naphthol green B dye in different combinations on the electrode surface. For each active substance, among the modified electrodes prepared in different combinations, the modification that gave the highest peak current and the most symmetrical peaks was selected and analysis studies were carried out with these electrodes. For the analysis of active substances, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, and square wave voltammetry methods were used. Suitable buffer media for analysis were determined as pH 5.5 acetate buffer for doxazosin mesylate, pH 7.0 phosphate and pH 5.5 acetate buffers for amlodipine besylate, and pH 7.0 phosphate buffer for bisoprolol fumarate. Scan rate studies showed that doxazosin mesylate and amlodipine besylate had an adsorption-controlled process and bisoprolol fumarate had a diffusion-controlled process. Deposition potential, deposition time, and stirring rate were optimized for adsorption-controlled active substances. Calibration graphs were obtained using voltammetric methods for the quantitative analysis of each substance under specified conditions; linear working ranges, detection and quantification limits were determined. The precision of the developed methods was calculated based on five values through intra-day and inter-day repeatability experiments and was obtained below 2%. Finally, the active substances were determined from pharmaceutical dosage forms, human serum, and artificial urine samples using the developed methods. Accordingly, at least one method developed for each active substance could be applied to both pharmaceutical dosage forms and biological samples. This showed that active substances could be analyzed with high accuracy without the influence of other substances in the samples.

Keywords: Amlodipine, Bisoprolol, Carbon nanotube, Doxazosin, Naphthol green B, Voltammetry

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yeni ilaçların keşfedilmesi, var olan ilaçların günümüze kadar gelen süreçteki keşif, tasarım ve geliştirme basamaklarının ve bu basamaklarda kullanılan yaklaşım ve yöntemlerin bilinmesiyle gerçekleşir. İlaç keşfi ve geliştirme süreci iki ana aşamaya ayrılabilir: İlk aşama olan ilaç keşfi aktif bileşenin izolasyonunu, saflaştırılmasını ve standartlaştırılmasını içerirken; ikinci aşama olan ilaç geliştirme ise tek bir bileşikle başlayan ve daha sonra bu bileşiğin yeni bir ilaç olarak onaylanmasını desteklemeyi amaçlayan farklı çalışmaları içerir. Yeni ilaç daha sonra uygun bir farmasötik dozaj şekli olarak formüle edilir (1). Farmasötik ürün, insan veya hayvan kullanımı için tasarlanmış bir ilaçtır ve hastalıkların tedavi edilmesi, hafifletilmesi, önlenmesi veya teşhis edilmesi amacıyla kullanılır. Etkisiz, zararlı veya düşük kaliteli ilaçların kullanımı, sağlık riskleri oluşturur ve kaynakların israfına yol açar. Bu sorunlar, olumsuz iklim koşulları ve zayıf ilaç tedarik sistemi tarafından daha da kötüleştirilebilir. Bu durum, ilaç kalitesinin bozulmasına, etkinliğin kaybına ve zararlı bozunma ürünlerinin oluşmasına neden olabilir. Tüm bu faktörler, her farmasötik ürünün etkinliğini ve güvenliğini sağlamak için çeşitli analitik prosedürlere tabi tutulması gerekliliğini ortaya koyar. Bu nedenle, etkili bir ilaç kalite güvence ve değerlendirme sistemi oluşturulmalı ve sürdürülmelidir (2). Farmasötik ve biyomedikal analiz, uygulamalı analitik kimyanın en önemli dallarından biridir. Analitik ölçüm prosedürleri, hem ilaç analizi hem de biyolojik örneklerin incelenmesinde kritik bir rol oynar. İlaç analizleri; ilaç malzemelerinin analitik incelenmesi, sentez süreçlerindeki ara maddelerin incelenmesi, ilaç formülasyonlarının incelenmesi, ilaç maddelerindeki kirliliklerin ve bozunma ürünlerinin incelenmesi, ilaçları ve metabolitlerini içeren biyolojik örneklerin incelenmesi gibi unsurları kapsayan geniş bir alana yayılmıştır. Bu analizlerin amacı; ilaç tedavisinin üst düzey etkinliği, güvenliği ve farmasötik ilaç üretiminin ekonomisi için katkı sağlayabilecek veriler elde etmektir. Bu kapsamda uygulanan analitik yöntemler güvenilir ve hızlı sonuçlar sunmalıdır. Elde edilen sonuçlar, ilaç ürününün geliştirme döngüsü boyunca tutarlı olmalıdır. Geliştirilen yöntemler, daha fazla tekrarlayan testler yapan laboratuvarlara transfer edilebilmelidir.

Elektrokimya, enstrümantal kolaylık, diğer tekniklere oranla düşük maliyet ve taşınabilirlik ile karakterize edilen analitik teknikler sunması bakımından ön plana çıkar. Modern elektrokimyasal yöntemler, farmasötik alanlar dahil olmak üzere analitik kimyanın çoğu alanında uygulanabilen hassas, seçici, hızlı ve kolay tekniklerdir. Elektroanalitik

yöntemler aynı zamanda endüstriyel malzemeler, biyolojik örnekler ve çevre üzerine yapılan araştırmalarda ve izleme çalışmalarında da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tür analizler yüksek özgüllük, düşük teşhis ve tayin sınırları gerektirir ve ilaçları ve metabolitlerini aynı anda nanogram veya pikogram seviyesinde tayin edebilme kapasitesine sahip olmalıdır. Birçok durumda, modern elektroanalitik teknikler spektroskopik veya kromatografik yöntemlere alternatif olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Voltametrik teknikler, düşük dozların ardından kandaki ilaç seviyelerini, metabolitlerini ve idrar ile atılımını tayin etmede kullanılabilen son derece kullanışlı elektroanalitik yöntemlerdir (3).

Hipertansiyon hastalığının tedavisi için çok sayıda araştırma yapılmakta olup, yeni ilaç geliştirme çalışmaları ve mevcut ilaçlar üzerine araştırmalar sürdürülmektedir. Bu doktora tezi kapsamında, antihipertansif ilaç etken maddelerinden doksazosin mesilat, amlodipin besilat ve bisoprolol fumaratın farmasötik dozaj formlarından ve biyolojik sıvılardan elektrokimyasal yöntemlerle hızlı, duyarlı, güvenilir ve tekrar edilebilir şekilde tayin edilmesine yönelik araştırmalar sunulmuştur. Elektrokimyasal çalışmalarla, incelenen etken maddelerin farklı ortamlardaki davranışları araştırılmış ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonunun karakteri incelenmiştir. Duyarlı, tekrarlanabilir ve hızlı analiz için yeni bir sensör geliştirilmesi ve bununla uyumlu bir voltametrik yöntemin belirlenmesi hedeflenmiştir. Geliştirilecek yöntem kullanılarak ilaç etken maddelerin farmasötik dozaj formlarından ve biyolojik sıvılardan tayin edilmesi de bu çalışmanın hedefleri arasındadır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular ile seçilen etken maddelerin analizine dair literatüre yeni bir yöntem kazandırılacak ve ayrıca ilaçların klinik ortamlarda hızlı ve güvenilir analizi için yeni sensörlerin geliştirilmesi amacıyla yapılacak çalışmalara katkı sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon

Kardiyovasküler hastalık, dünya çapında ölümlerin önde gelen nedenidir. 2020 yılında, küresel olarak kardiyovasküler hastalık nedeniyle 19.05 milyon ölüm gerçekleştiği hesaplanmıştır ve bu durum, 2010 yılına göre %18.71'lik bir artış anlamına gelmektedir. Kardiyovasküler hastalık prevalansı 2020'de 607.64 milyon vaka olup, 2010'a göre %29.01 artış göstermiştir (4). Kardiyovasküler hastalık için önemli bir risk faktörü olan hipertansiyon, anormal derecede yüksek arteriyel kan basıncı olarak tanımlanır ve kalp krizi, felç, kalp yetmezliği ve böbrek yetmezliğinin gelişiminde önemli bir rol oynar (5). Kardiyovasküler hastalık ve buna bağlı sağlık yükü riskini azaltmak için hipertansiyonun önlenmesi, tedavisi ve kontrol edilmesi önemlidir. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC)'nin "JNC 8" yönergesi, 60 yaşın altındaki tüm tedavi gören hipertansif bireyler için sistolik/diyastolik kan basıncının 140/90 mmHg altında olmasını, 60 yaş üzerindeki hastalar için ise 150/90 mmHg altında olmasını önermektedir (6). Primer (idiyopatik) hipertansiyon ve sekonder (semptomatik) hipertansiyon olarak iki tip hipertansiyon bulunmaktadır. Primer hipertansiyonun sebebi bilinmemektedir ve periferik damar direncinin yükselmesine bağlıdır. Sekonder hipertansiyon ise primer bir hastalık nedeniyle organlardaki patolojik farklılıklar sonucu meydana gelir (7).

Hipertansiyonun tarihi çok eskilere dayanmaktadır. Eski Çin ve Hint tıbbında, eğitimli bir hekim tarafından palpasyonla hissedilen bir kişinin nabzının kalitesi, kalp-damar sisteminin durumuna açılan bir pencereydi. 19. yüzyılın sonlarında, Londra'daki Guy hastanesinde çalışan Doktor Frederick Akbar Mahomed (1849-1884), daha sonra primer hipertansiyon olarak anılacak olan durumları ilk kez tanımlayarak, primer hipertansiyonu, kronik glomerülonefritte görülen benzer vasküler değişikliklerden ayırdı. Akbar Mahomed'in kayda değer katkılarından bazıları, yüksek tansiyonun görünüşte sağlıklı bireylerde de bulunabileceğini, yüksek tansiyonun yaşlı nüfusta daha olası olduğunu ve kalp, böbrekler ve beynin yüksek arteriyel gerilimden etkilenebileceğini göstermesiydi (8–10). Bununla birlikte, yirminci yüzyılın başlarında cıva sfigmomanometresinin ortaya çıkması ve stetoskop aracılığıyla duyulan korotkoff seslerinin ortaya çıkması/kaybolması yoluyla sistolik ve diyastolik kan basıncının tanımlanmasıyla birlikte modern kantitatif hipertansiyon kavramı sistolik ve diyastolik kategorilere ayrılmıştır. Yirminci yüzyılın

ortalarına gelindiğinde tansiyon aletiyle kan basıncı kontrolü, hastane ve kliniklerde rutin fizik muayenenin bir parçası durumuna geldi (11). 1970’li yıllara kadar tıp topluluğunda, yaşlanma sürecinin önemli bir bileşeni olan hipertansiyonun tedavisine ihtiyaç olup olmadığına ilişkin tartışma devam etti. O dönemde mevcut olan az sayıdaki ilaçla hipertansiyonu tedavi etme girişimleri, genellikle tedavi uygulanmayan hastalardan daha fazla sıkıntı yaşamalarına ve hatta daha erken ölümlere neden oldu. Yaşanan bu durumlar, iki New Yorklu tıp profesörü tarafından 1965 yılında Archive of Internal Medicine’da yayımlanan bir yazıda dile getirildi. İlk çok merkezli hipertansiyon çalışması 1967 yılında The Journal of the American Medical Association’da yayımlandı. Veterans Administration iş birliği ile yürütülen antihipertansif ajanlar üzerine yapılan bu araştırma, antihipertansif tedaviye ilişkin yeterli güce sahip ilk randomize plasebo kontrollü klinik çalışmaydı. Çalışmanın sonuçları, tedavi grubunda özellikle hızlanmış veya kötü huylu hipertansiyondaki ilerlemenin yavaşlatılması ile hastalık ve ölüm oranı açısından belirgin bir fayda gösterdi (12). Hipertansiyon tedavisi hikayesindeki bir sonraki dönüm noktası, JNC tarafından 1977 yılında yayımlanan ilk raporla gerçekleşti. Bu rapordaki vurgu, diyastolik basıncı tedavi etmeye yönelikti ve sistolik basınca dayalı hipertansiyon evresi için öneriler yoktu. 1977’den bu yana, büyük klinik araştırmalar sayesinde daha fazla veri elde edilmesiyle birlikte, JNC raporlarının önerileri giderek daha keskin ve spesifik hale gelmiş ve özellikle 55-60 yaşın üzerindeki kişilerde sistolik basınca daha fazla vurgu yapılmıştır.

Hipertansiyonun dünya genelinde yaygınlığı çok yüksektir ve düşük ve orta gelirli ülkelerde halen artmaktadır. Son yıllarda yüksek gelirli ülkelerde bazı iyileşmeler bildirilse de hipertansiyon ve komplikasyonlarını aşmak için hala katedilecek çok yol bulunmaktadır. Ülkemizde hipertansiyon oldukça yaygın bir hastalıktır. Yetişkin her üç kişiden birinde hipertansiyon görülmektedir ve bu oran kadınlarda erkeklerden daha fazladır. Hastalığın başlıca unsurları, yüksek miktarda sodyum içeren beslenme alışkanlıkları, yetersiz fiziksel aktivite, kilo artışı ve obezite gibi faktörler olarak belirtilebilir (13). Yüksek kan basıncının erken tedavisi organ hasarını minimize edebilir ya da önleyebilir. Hastalığın klinik kanıtlarının bulunmasına kadar beklemek durumunda, fayda hala görülse de sonuçlar erken müdahale ile karşılaştırıldığında yeterince iyi olmayabilir. Günümüzde, etkili ve iyi tolere edilen farmakolojik terapiler mevcuttur (14). Birçok çalışma, antihipertansif ilaç tedavisinin hastalarda kardiyovasküler hastalık olayı riskini azalttığını göstermektedir (15). Günümüzde hipertansiyon kişiye özgü tedavi edilmekte olup kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Hipertansiyon tedavisi, tıbbi müdahale, yaşam tarzının değiştirilmesi ve hastanın

bilgilenmesi gibi bileşenleri içeren bir süreçtir. Kronik bir hastalık olan hipertansiyon, hastanın yaşamının her alanını etkileyebilir. Tedavinin hedefi, kan basıncını istenilen seviyeye düşürmek, hipertansiyonun neden olduğu organ hasarlarını ve komplikasyonları minimize etmek, semptomları gidermek ve ilaç yan etkilerini azaltmak, ayrıca hastanın tedaviye uyumunu artırmak ve kendi tedavisine aktif bir şekilde katılımını sağlamaktır (16).

2.2. Antihipertansif İlaçlar

Antihipertansif ilaçlar, dünya genelinde en yaygın reçete edilen ilaçlar arasında yer almaktadır. Hipertansiyon tedavisine yönelik farmakolojik araştırmalar, 1958 yılında keşfedilen tiazid grubu diüretikler gibi ilaçlarla başlayan bir süreçtir (17). İlaç düzenleyici otoriteler, özellikle randomize kontrollü çalışmalardan elde edilen etkinlik ve güvenlik konularındaki sağlam kanıtlar temelinde birçok antihipertansif ilacın onayını vermiştir (18). Farmakolojik tedavinin başlatılma zamanı, tedavi sürecini ve toplam sağlık harcamasını belirlemede kritik bir rol oynar (19). On yıllardır hipertansiyonlu bireylerde ilaç tedavisi için $\geq 140/90$ mmHg kan basıncı eşiği bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Ancak 2017’de American College of Cardiology/American Heart Association kılavuzları, yüksek kardiyovasküler riskli hastalarda tedaviye başlamak için $\geq 130/80$ mmHg kan basıncını önermiştir (20). Son yıllarda Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration tarafından yapılan bir analiz, kardiyovasküler hastalığı olan yüksek riskli kişilere, kan basıncı ve kardiyovasküler sağlık durumlarına bakılmaksızın farmakolojik terapi sunulması gerektiğini önermektedir (21). Ağustos 2021’de World Health Organization, antihipertansif ilaçların başlatılması için halen 140/90 mmHg kan basıncının eşik olabileceğini, ancak var olan kardiyovasküler hastalığı olan ve sistolik kan basıncı 130-139 mmHg olan bireylere farmakolojik antihipertansif tedavi önerdiğini belirtmiştir (22).

Hipertansiyonun önlenmesi, kontrol edilmesi veya tedavi edilmesi amacıyla kullanılan antihipertansif ilaçlar diüretikler, kalsiyum kanal blokörleri, beta blokörler, anjiyotensin reseptör blokörleri, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, renin inhibitörleri, alfa-adrenerjik reseptör blokörleri, merkezi etkili ajanlar ve doğrudan etkili vazodilatörler olarak sınıflandırılabilir (17). Bu tez çalışması kapsamında analizi yapılan antihipertansif etken maddeler ile ilgili bilgi ayrıntılı olarak aşağıda verilmiştir.

2.2.1. Doksazosin

Sempatik sinir sistemi tarafından sağlanan kardiyovasküler düzenlemeye, epinefrine ve norepinefrine verdikleri yanıtlara göre sınıflandırılan alfa-1 ve alfa-2 reseptörleri dahil

olmak üzere adrenerjik reseptör ailesinin bir veya daha fazla alt tipinin aktivasyonu aracılık eder. Alfa-1 reseptörlerinin blokajı, noradrenalin reseptörlere bağlanmasını inhibe ederek hipertansiyonun tedavisi için rasyonel bir yaklaşım sağlar ve böylece düz kas hücrelerinin gevşemesi, kan damarlarının direncinin azalması ve periferik direncin düşmesi sağlanır (23). Hızlı salım yapan ilaçların olumsuz farmakokinetik özellikleri ile ilişkili olarak gelişen postüral hipotansiyon, prazosin ve doksazosin kontrollü salımlı formülasyonların geliştirilmesiyle büyük ölçüde azalmıştır (24, 25). Bu tür formülasyonlar, ilaçların farmakokinetik profillerini iyileştirmek ve Emilimi yavaşlatıp plazma konsantrasyonundaki dalgalanmaları azaltarak yan etkileri en aza indirmek amacıyla tasarlanmıştır (26). Alfa-adrenerjik reseptör blokörleri, kan basıncını düşürmek amacıyla hem monoterapi olarak hem de diğer antihipertansif ilaç sınıflarıyla kombinasyon halinde uygulanabilmektedir (27).

Doksazosin, postsinaptik alfa-1 adrenerjik reseptörlere yüksek derecede seçicidir ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan etkili ve iyi tolere edilir yapıda bir kinazolin türevidir (28, 29). Oral uygulamadan sonra doksazosin hızla emilir ve 2-3 saat içinde en yüksek plazma seviyelerine ulaşılır. Doksazosin büyük ölçüde metabolize edilir, uygulanan dozun yalnızca %5'i değişmeden idrarla atılır. Tek doz için oral biyoyararlanımın yaklaşık %65 ve yarılanma ömrünün 10-12 saat olduğu bildirilmiştir. Çoklu doz çalışmalarında, terminal yarı ömrünün yaklaşık 22 saat olduğu hesaplanmıştır (30, 31).

Hafif hipertansiyonun randomize tedavisi çalışmasında, 4 yıllık takipten sonra, standart salımlı doksazosin (günde 1-2 mg) ile başlangıç tedavisinin sistolik ve diyastolik kan basıncını sırasıyla 13.4 ve 11.2 mmHg azalttığı; plasebo alanlarda ise hem sistolik hem de diyastolik kan basıncında ortalama 8.6 mmHg azalma meydana geldiği bildirilmiştir (32). Doksazosin Araştırmacıları Çalışma Grubu, 12 haftalık plasebo kontrollü bir çalışmada, hafif-orta şiddette hipertansiyonu olan hastaların sırasıyla %68 ve %64'ünün, doksazosinin standart (günde 1-8 mg) ve kontrollü salımlı gastrointestinal terapötik sistem (günde 4-8 mg) formülasyonları ile hedef kan basıncına ulaştığını; plasebo grubunda ise bu oranın %36 olduğunu bildirmiştir (33). Doksazosin monoterapisiyle ilgili çalışmalar, olumlu bir güvenlik profili ile önemli kan basıncı düşüşleri göstermiştir (34, 35). Alfa blokörler genellikle iyi tolere edilebilen bir yapıdadır ve diğer antihipertansif ajanlarla benzer yan etki profillerine sahiptir (36-39). Yukarıdaki açıklamalar, doksazosinin hipertansiyon tedavisinde yaygın kullanılan ve etkili bir alfa-1 adreno reseptör blokörü olduğunu göstermektedir. Analitik yöntem geliştirme ve doğrulama prosedürleri, ilaç ve

farmasötiklerin keşfi ve geliştirilmesinde hayati öneme sahiptir. Bu nedenle, doksazosinin farklı matrislerde tespiti için yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir.

2.2.2. Amlodipin

İzole edilmiş kalp üzerinde yapılan bir dizi deney neticesinde 1883 yılında hücrel aktivitenin sürdürülmesi için kalsiyumun gerekliliği rapor edilmiştir (40). Altmış yıl sonra yayımlanan iki ayrı çalışmada ise, kas kasılması için hücre içi kalsiyumun rolü açıklanmıştır. Günümüzde kalsiyumun, çok çeşitli hücrel süreçlerde yer aldığı kabul edilmektedir. 1960'lı yıllarda, koroner vazodilatasyon için taranan moleküller üzerinde yapılan deneysel çalışmalar, kalsiyum kanal blokörleri olarak adlandırılan ilaçların kalsiyum girişi engelleme mekanizmasının keşfedilmesine olanak sağladı. Kalsiyum kanal blokörleri başlangıçta koroner kalp hastalığı için tanıtıldı, ancak kısa süre sonra hipertansiyon tedavisindeki etkinlikleri nedeniyle geniş çapta kullanım alanı buldu. Bu ilaçlar şu anda kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde en yaygın kullanılan ajanlar arasında yer almaktadır (41–43). Kalsiyum kanal blokörleri, yapısal olarak heterojen bir ilaç sınıfını oluşturur. Bu sınıftaki tüm ajanlar kalsiyum kanallarını bloke ederek etki gösterse de her alt sınıf hedef kalsiyum kanalına farklı noktalardan bağlanır (44, 45). Tüm kalsiyum kanal blokörleri, periferik vasküler direnci azaltarak arteriyel basıncı düşürür. Hem sistolik hem de diyastolik kan basıncını düşürmede etkililerdir (46, 47). Kalsiyum kanal blokörleri, dihidropiridinler ve nondihidropiridinler olarak sınıflandırılır. Dihidropiridinler arasında amlodipin, felodipin, nikardipin ve nifedipin bulunurken, nondihidropiridinler arasında diltiazem ve verapamil gibi ajanlar bulunur (48).

Amlodipin, hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan uzun etkili bir dihidropiridin türevi üçüncü nesil kalsiyum kanal blokörüdür (49). Amlodipin, kalsiyum iyonlarının vasküler düz kas ve kalp kasına taşınmasını inhibe eder (50). Amlodipin ilk olarak Pfizer şirketi tarafından geliştirildi ve 1992 yılında NORVASC® ticari adıyla onaylandı (51).

Oral uygulama sonrasında amlodipinin biyoyararlanımı %60-65'tir ve plazma konsantrasyonları uygulamadan sonra 6-8 saat içinde yavaşça zirveye ulaşır. Amlodipin karaciğerde büyük ölçüde metabolize olur ve 40-50 saatlik terminal eliminasyon yarı ömrü ile yavaşça elimine edilir. Dağılım hacmi büyüktür; yüksek oranda (%98) protein bağlanması vardır. Yaş, ciddi karaciğer yetmezliği ve ciddi böbrek yetmezliğinin, daha yüksek plazma konsantrasyonlarına ve daha uzun yarı ömürlere yol açan farmakokinetik profili etkilediğine

dair bazı kanıtlar bulunmaktadır (52). Amlodipin, doza bağılı lineer farmakokinetik özellikler gösterir. Diğer dihidropiridin türevleri ile yapısal benzerlik gösterse de önemli ölçüde farklı farmakokinetik özelliklere sahiptir ve günlük tek dozda uygulama için uygundur. Hipertansiyon tedavisi için genellikle başlangıç dozu günde 5 mg, maksimum günlük doz ise 10 mg olarak önerilmektedir. Yaşlı nüfusta ve karaciğer yetmezliği olanlarda, önerilen başlangıç dozu 2.5 mg'dır (49). İlaç alımından sonra oluşan yan etkilerle ilgili olarak bazı risk faktörleri periferik ödem, yorgunluk, çarpıntı, hazımsızlık ve bulantı olasılığını artırır (53–55). Bu nedenle, amlodipin içeren ilaçlar sıkı kalite kontrolünden geçmek zorundadır ve bu da ilacın hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik örneklerde tespiti ve miktarının belirlenmesi için basit, hızlı ve güvenilir analitik yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu kılar. Farmasötik preparatların analizi, üretim sırasında tekrarlanabilir değerlendirmenin sağlanması açısından da büyük önem taşımaktadır.

2.2.3. Bisoprolol

Beta blokörler, endojen katekolaminlerin beta-adrenerjik reseptörler üzerindeki etkisini bloke eden bir ilaç grubunu ifade eder (56). Beta-1 ve beta-2 reseptörleri, insan kardiyovasküler sistemindeki temel beta-adrenerjik reseptörlerdir. Beta blokörler, beta-1 veya beta-2 reseptör seçiciliği ve vazodilatör özelliklerine göre farklılık gösterir. Bu çeşitliliğe dayanarak, birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılırlar. Seçici olmayan blokörler olarak da adlandırılan birinci nesil beta blokörler, beta-1 ve beta-2 reseptörleri için eşit afiniteye sahiptir. İkinci nesil (veya seçici) beta blokörler, özellikle kalp kasılması sırasında aktive olan beta-1 reseptörlerine beta-2 reseptörlerinden daha fazla afinite gösterir. Bu geleneksel beta blokörlerin hiçbiri, üçüncü nesil beta blokörlerin kendine özgü bir özelliği olan vazodilatör özelliklere sahip değildir. Üçüncü nesil beta blokörler, alfa-1 adrenerjik reseptörleri bloke ederek ve beta-3 adrenerjik reseptörleri aktive ederek ek vazodilatör etkiler gösterir (57, 58). Beta blokörler, 1949 yılından beri, kan basıncı kontrolünde etkisi olduğu bilinen ilaçlardır (59).

Bisoprolol, yüksek seçiciliğe sahip ikinci nesil beta-1-adrenoreseptör antagonisti olup, birçok ülkede kalp yetmezliği, iskemik kalp hastalığı ve hipertansiyon gibi kalp hastalıklarının yönetiminde klinik endikasyonlara sahiptir. Farklı beta blokörlerin farklı etki mekanizmalarına sahip olması nedeniyle, bisoprolol ve diğer beta blokörlerin alt tipleri arasındaki etkinlik ve güvenlik farklarını değerlendirmek için ek araştırmalara ihtiyaç vardır. Bisoprolol 1976 yılında patentlenmiştir ve fumarat tuzu birçok farklı ilaç ürününde

kullanılmıştır (60, 61). Oral biyoyararlanımı %90'ın üzerinde ve yarı ömrü 10-12 saat arasında olan bir bileşiktir. Hipertansiyon tedavisi için günde bir kez kullanılır. Oral uygulamadan sonra hızla emilir, yaklaşık 3 saat sonra pik plazma konsantrasyonuna ulaşır ve %50'si değişmemiş olarak böbreklerden atılırken, %50'si farmakolojik olarak etkisiz metabolitlere elimine edilir ve ardından bu metabolitler böbrekler tarafından atılır (62–64).

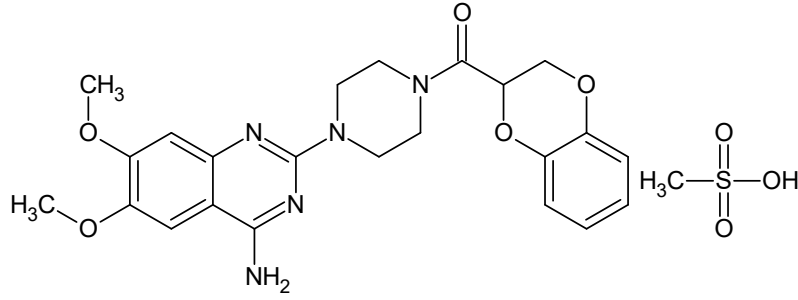
Kardiyovasküler ilaçlara yanıtta klinik, çevresel ve genetik faktörlere bağlı olarak bireyler arasında önemli bir değişkenlik bulunmaktadır. Bu durum değişen ilaç etkinliğine ve toksisitesine yol açmaktadır (65). Herhangi bir eş zamanlı ilaç ya da bitki kullanımı, bisoprololün plazma konsantrasyonunda değişikliklere neden olabilir (63). Bu unsurlar göz önüne alındığında, kardiyovasküler ilaç maruziyetinin farmakokinetik belirleyicilerini daha iyi anlamak, doz, maruziyet ve sonuç arasındaki ilişkinin güçlülüğünü belirlemek ve gelecekteki klinik bakım ve prospektif çalışmalarda kardiyovasküler dozlama konusunda potansiyel bir rehberlik sağlamak için basit ve nicel ilaç analiz yöntemleri geliştirmek önemlidir.

2.3. Tez Kapsamında İncelenen Maddelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

2.3.1. Doksazosin Mesilatın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Doksazosin serbest bazının çözünürlüğünün suda çok düşük olması nedeniyle ilacın çözünürlüğünü geliştirmek için tuz formu geliştirilerek kullanılmaya başlanmıştır (66).

Doksazosin mesilat (DM) ([4-(4-amino-6,7-dimetoksikinazolin-2-il)piperazin-1-il]-(2,3-dihidro-1,4-benzodioksin-3-il)metanon;metansülfonik asit), tuz formunda beyaz renkli homojen kristalize bir yapıdadır (67). Kapalı formülü $C_{23}H_{25}N_5O_5 \cdot CH_3SO_3H$, molekül ağırlığı 547.6 g/mol ve erime noktası 273.7 °C'dir (68, 69). DM, dimetilsülfoksitte serbestçe çözünürken metanol, etanol ve suda az çözünür ve asetonda çözünmez. Sudaki çözünürlüğü 25°C'de %0.8 (w/v) olarak, ayrıca 25 °C'de 2.6 g/L ve 37 °C'de 2.9 g/L olarak bildirilmiştir (68–70). pK_a değeri 8.63 olarak verilmiştir (71). Şekil 1'de DM'nin kimyasal yapısı gösterilmiştir.

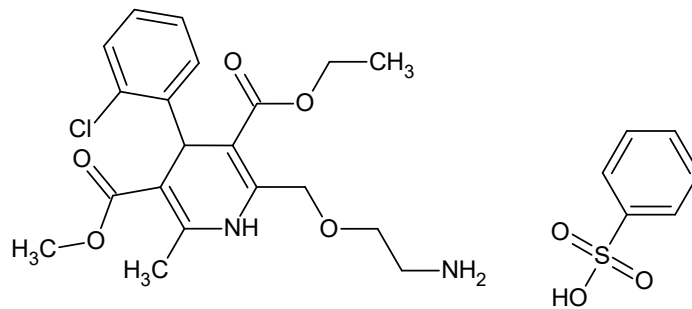


Şekil 1. DM'nin kimyasal yapısı

2.3.2. Amlodipin Besilatın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Benzen sülfonik asitler, özellikle amlodipin gibi azot atomu içeren ilaçların çözünürlüğünü önemli ölçüde artırır. Besilat (benzen sülfonat), bir ilaç bileşiğinin tercih edilen ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir ilave tuz formudur. Bir farmasötik bileşiğin besilat ilaveli tuz formu, iyi farmakokinetik özelliklere, neredeyse optimal çözünürlüğe ve geliştirilmiş stabiliteye sahiptir (72).

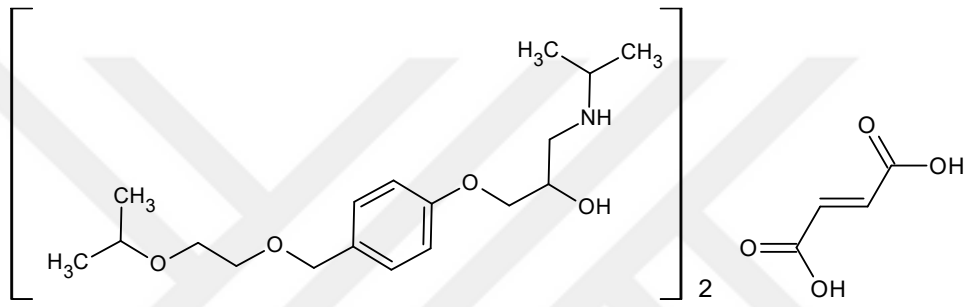
Amlodipin besilat (AB) (benzensülfonik asit;3-*O*-etil 5-*O*-metil 2-(2-aminoetoksimetil)-4-(2-klorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat), tuz formunda beyaz renkli homojen kristalize bir yapıdadır. Kapalı formülü $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_5O_3S$, molekül ağırlığı 567.05 g/mol ve erime noktası 201 °C'dir. AB etanolde çözünür ve suda az çözünür (73). Sudaki çözünürlüğü 32 °C'de 1.91 g/L, 37 °C'de 2.93 g/L olarak ve pH 6.6'da 4.6 g/L olarak bildirilmiştir (72, 73). pK_a değeri 8.6 olarak verilmiştir (74). Şekil 2'de AB'nin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2. AB'nin kimyasal yapısı

2.3.3. Bisoprolol Fumaratın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bisoprolol fumarat (BF) ((*E*)-but-2-endioik asit;(2*S*)-1-(propan-2-ilamino)-3-[4-(2-propan-2-iloksietoksimetil)fenoksi]propan-2-ol) su, metanol, etanol ve kloroformda kolaylıkla çözünebilen beyaz renkli kristal bir tozudur. Kapalı formülü (C₁₈H₃₁NO₄)₂.C₄H₄O₄ şeklindedir. Molekül ağırlığı 766.97 g/mol ve erime noktası 100 °C'dir. Serbest baz formu olan bisoprolol, suda 25 °C'de 2.24 g/L olarak düşük çözünürlük göstermesine rağmen BF'nin suda çok iyi çözüldüğü rapor edilmiştir (75, 76). pK_a değeri 9.57 olarak bildirilmiştir (77). Şekil 3'te BF'nin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3. BF'nin kimyasal yapısı

2.4. Elektrokimya

Elektrokimya terimi ilk olarak 1814 yılında George John Singer tarafından *Elements of Electricity and Electro-Chemistry* adlı kitabında, ardından 1817 yılında Wilhelm August Lampadius'un *Grundriß der Elektrochemie* adlı Almanca kitabında kullanılmıştır. Daha öncesinde *galvanizm* terimi kullanılıyordu. Elektrokimya, elektrik ve kimyasal enerji değişimlerinin bir reaktif düzen içinde gerçekleştiği fizikokimyasal olaylara dayalı bir bilim dalıdır. Bu bilim dalı, bir elektrik akımının geçişi ile malzemelerde meydana gelen kimyasal değişikliklerle veya bir pilde olduğu gibi, bir kimyasal reaksiyonla bir elektrik akımının üretildiği ters süreçle ilgilenir. Elektrokimya genel olarak çözelti ortamındaki yük farklılıklarıyla ilgili olan kimyasal olaylarla bağlantılıdır. Yük ayrımı, farklı kimyasal türler arasında çözeltide homojen olarak ya da elektrot yüzeylerinde heterojen olarak gerçekleşen yük transferi ile ilişkilidir. Elektron transferi ve yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları elektrokimyanın temel taşlarıdır (78, 79).

2.4.1. Elektrokimyasal Hücreler

Redoks reaksiyonları elektrokimyasal hücrelerde gerçekleşir. Elektrokimyasal hücreler, galvanik veya elektrolitik hücre olarak sınıflandırılır. Galvanik hücre, dışarıdan bir iletken ile bağlandığında elektrotlarda reaksiyonların kendiliğinden meydana geldiği hücredir. Bu hücreler çoğunlukla kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştürmek amacıyla kullanılır. Galvanik hücrelere, piller ve yakıt hücreleri örnek olarak verilebilir. Elektrolitik hücre ise, hücrenin açık devre potansiyeline göre daha büyük bir harici voltaj uygulanması ile reaksiyonların etkilendiği hücredir. Bu hücreler genellikle elektrik enerjisi harcayarak istenen kimyasal reaksiyonları gerçekleştirmek için kullanılır. Elektrolitik hücreleri içeren ticari işlemlere elektrolitik sentezler, elektorafinasyon ve elektrokaplama örnek olarak verilebilir (80, 81).

2.4.2. Kütle Transferi

İyonik bir sıvı içerisindeki elektrot ile sıvı arasında bir ara yüzey bulunur. Bu ara yüzeyde redoks reaksiyonlarının meydana gelebilmesi için elektrot ile sıvı arasında bir kütle transferinin gerçekleşmesi gerekir. Elektrokimyasal hücrelerde analit çözeltisindeki reaksiyona giren türlerin bir yerden başka bir yere taşınması olayına *kütle transferi* denir. Bir elektrokimyasal hücre çalışırken, iyonların veya moleküllerin ana çözeltiden elektrot yüzeyine ya da yüzey tabakadan ana çözeltiye aktarımı difüzyon, konveksiyon ve elektriksel göç olmak üzere üç farklı mekanizmayla gerçekleşir (82).

2.4.2.1. Difüzyon

Difüzyon, elektrot yüzeyindeki sıvı film ile çözelti arasında oluşan konsantrasyon farkından kaynaklı olarak türlerin derişik olan çözelti ortamından seyreltik ortama yani elektrot yüzeyine doğal olarak hareket etmesidir. Elektrot yüzeyine ulaşan madde hızlı bir şekilde indirgenir ya da yükseltgenir ve bunun sonucunda akım meydana gelir. Difüzyon mekanizması ile kütle transferi, türlerin derişim farkı nedeniyle yaptıkları hareketten ileri gelir. Kendiliğinden gerçekleşen bir mekanizma olan difüzyonda amaç, elektrolit içerisindeki konsantrasyon farkının en az olmasını sağlamaktır (82, 83).

2.4.2.2. Konveksiyon

Reaksiyona giren türün, çözeltinin yoğun olduğu bölgeden elektrodun yüzeyine taşınması olayına konveksiyon denir. Konveksiyon; mekanik taşınma ya da doğal taşınma yoluyla gerçekleşir. Analit çözeltisinin elle ya da bir karıştırıcıyla karıştırılması ile olan

taşınma *mekanik taşınma*; sıcaklık ya da yoğunluk farkından ileri gelen taşınma ise *doğal taşınmadır*. Konveksiyon, karıştırma ya da elektrodun dönmesi gibi sebeplerle açığa çıkan mekanik kuvvete bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu taşınma yönteminde çözeltinin herhangi bir bölümündeki tüm bileşenler aynı hızda hareket etmektedir (82, 83).

2.4.2.3. İyonik Göç

İyonik göç, anot ve katot arasında oluşan potansiyel farktan dolayı bir elektriksel alan oluşması ve elektrikle yüklü taneciklerin bu elektriksel alan içerisinde hareket etmesi olayıdır. Bu göç, iyonlar ile yüklü elektrot arasındaki elektrostatik çekimden kaynaklanır. Bu elektriksel alan etkisi ile iyonlar zıt yüklü elektrotlara hareket etme eğilimi gösterir. Elektronların bu hareketi sonucu elektriksel göç ile madde aktarımı gerçekleşir. Bu tür akımların analitik açıdan bir önemi bulunmaz. İyonik göç, analitik sonuçların açıklanmasını zorlaştırır ve bu nedenle ihmal edilecek seviyede olması istenir. Bunun için çözelti içerisine elektrot reaksiyonlarına katılmayan ve reaksiyonları engellemeyen bir destek elektrolit çözeltisinin aşırısı eklenir. Destek elektrolit olarak genellikle yükseltgenmesi ve indirgenmesi zor olan alkali metal tuzları kullanılır. Çözeltideki tüm iyonlar elektrik taşıdıkları için destek elektrolit oranına kıyasla yükseltgenen ya da indirgenen iyonun katkısı ihmal edilir ve böylece reaksiyon veren iyonun göçü ihmal edilir (82, 83).

2.5. Elektroanalitik Kimya

Elektroanalitik kimya, bir elektrokimyasal hücre içerisindeki analit çözeltisinin elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesine dayanan bir grup yöntemi içerir. Elektroanalitik yöntemlerde akım, potansiyel ve iletkenlik gibi özelliklerin madde türüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi incelenir. Elektrokimyasal yöntemler kullanılarak sistemler hakkında ara yüzeylerdeki yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kimyasal reaksiyonların hız ve denge sabitleri ve adsorpsiyon ve kemisorpsiyon derecesi gibi sistemi karakterini veren bilgiler elde edilir. Bu yöntemler ile çok düşük tayin sınırlarına ulaşılabilir (84).

Elektroanalitik yöntemler, ara yüzeyde meydana gelen yöntemler ve tüm analiz ortamında meydana gelen yöntemler olarak iki bölüme ayrılır. Ara yüzey yöntemleri, elektrot yüzeyleriyle bu yüzeylere hemen bitişik olan ince çözelti tabakası arasındaki olaylara dayanmaktadır. Tüm analiz ortamı yöntemleri ise, çözeltinin tamamında meydana gelen olaylara dayanır ve ara yüzey etkilerinden kaçınmak için çeşitli yöntemlere başvurulur. Ara yüzey yöntemleri, elektrokimyasal hücrelerin akımın varlığında ya da yokluğunda

alışmasına göre dinamik ya da statik olarak sınıflandırılır. Potansiyometri, bir çözeltinin elektrokimyasal bir hücreye dönüştürülerek akımın geçmediği veya sabit tutulduğu durumlarda potansiyelinin ölçülmesi ve bu ölçümden hareketle analit derişiminin tayin edilmesi prensibine dayanan statik bir yöntemdir. Ara yüzey yöntemlerinden olan dinamik yöntemler ise; kontrollü potansiyel ve sabit akım yöntemleri olarak sınıflandırılır. Kontrollü potansiyel yöntemlerine voltametri, amperometri ve kulometri örnek olarak verilebilir. Sabit akım yöntemleri kulometrik titrasyonlar ve elektrogravimetriyi içerir. Tüm analiz ortamı yöntemleri ise kondktometri ve kondüktometrik titrasyonlardan meydana gelir.

Dinamik ara yüzey yöntemlerinde elektrokimyasal hücrelerdeki akımlar önemli bir rol oynar. Bu yöntemlerle yapılan lme işlemelerinde hücre potansiyelinin kontrol edilmesi esastır. Duyarlık açısından yüksek etkiye sahip bu yöntemler oldukça geniş bir çalışma aralığı sunmaktadır. Ayrıca bu analizlerin çoğu, mikrolitre veya nanolitre gibi çok az miktarda örnek miktarıyla gerçekleştirilebilmektedir.

Elektrokimyasal analizler, yüksek hassasiyet, düşük miktarda çözücü ve örnek kullanımı, düşük işletme maliyeti ve hızlı analiz gibi önemli avantajlara sahiptir. Bu analizler ilaç endüstrisinde, metal endüstrisinde ve çevresel uygulamalarda kullanılan güçlü tekniklerdir. Endüstriyel prosesler, enerji kaynakları, elektrokatalizörler, korozyon nleme, sensörler, elektroanaliz ve biyoelektrokimyaya kadar geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır (85).

2.6. Voltametri

Elektrokimyanın şu anda voltametri olarak adlandırılan dalı tarihsel olarak, kimyager Jaroslav Heyrovsky'nin 1922'de polarografiyi keşfetmesi ve bu sayede 1959 Nobel Kimya dl'n almasıyla geliştirilmiştir. İlk voltametrik yöntemler, rutin analitik kullanım için ideal olmamalarına neden olan birtakım zorluklar içermekteydi. Bununla birlikte, 1960'lardan sonra voltametrimin tüm alanlarında (teori, metodoloji ve enstrümantasyon) nemli ilerlemeler kaydedildi. Bu ilerlemeler duyarlığı artırdı ve analitik yöntemlerin alanının genişlemesine neden oldu (86).

Voltametri, bir elektroda bir potansiyelin uygulanması ile meydana gelen kimyasal reaksiyonlar sonucunda elektrokimyasal hücreden geçen akımın izlenmesini içeren elektroanalitik bir yöntemdir. Elektroda uygulanan potansiyel kimyasal türlerin elektron vererek yükseltgenmesine veya elektron alarak indirgenmesine neden olur. Yükseltgenme ya da indirgenme sonucunda elektron hareketiyle bir akım meydana gelir. Akım cevapları

madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Tüm voltametrik metotlar potansiyel, akım ve zamanın bir fonksiyonu olarak tanımlanır. Bunlar, potansiyometri gibi statik yöntemlerin aksine dinamik yöntemler olarak kabul edilir. Çünkü uygulanan potansiyel, elektrokimyasal olarak indirgeyerek veya yükseltgeyerek elektrot yüzeyindeki elektroaktif türlerin konsantrasyonunda bir değişikliğe neden olur. Voltametrik yöntemler ile elde edilen akım-potansiyel grafiklerine *voltamogram* adı verilir (87).

Çeşitli voltametrik yöntemlerin analitik avantajları arasında hem anorganik hem de organik türler için yüksek duyarlık ve geniş bir doğrusal konsantrasyon aralığında (10^{-12} ile 10^{-1} M) çalışılabilmesi, az miktarda çözücü ve elektrolit kullanımı, hızlı analiz süreleri, birden fazla analitin simultane tespiti ve farklı potansiyel dalga formlarının oluşturulması ile küçük akımların ölçülmesinin kolaylığı bulunmaktadır. Voltametrik teknikler, çeşitli çözünmüş inorganik ve organik maddelerin miktarının belirlenmesi için rutin olarak kullanılır. Bunun yanı sıra, yüzeylerdeki adsorpsiyon süreçleri, elektron transferi ve reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasını içeren çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Bu yöntemler aynı zamanda, farmasötik açıdan önemli olan bileşiklerin analizi için kullanılan etkili araçlardır (88).

2.7. Voltametrik Hücre

Voltametrik analizlerin gerçekleştiği elektrokimyasal bir hücre; elektrolit, analit ve üçlü elektrot sisteminden oluşur. Bu sistem bir çalışma elektrodu, bir referans elektrot ve bir yardımcı (karşıt) elektrot içerir. Genel olarak bir çalışma elektrodu, üzerinde bir yükün transfer edilebileceği bir arayüz sağlar. Bir maddenin, uygulanan bir potansiyelde çalışma elektrodu yüzeyinde indirgenmesi veya yükseltgenmesi, elektrot yüzeyine kütle transferine ve bir akımın meydana gelmesine neden olur. Referans elektrot, deney süresince potansiyeli sabit olan elektrottur. Bu elektrodun direnci yüksek olduğu için üzerinden akım geçmez. Tüm akım, yardımcı elektrot üzerinden çalışma elektroduna taşınır. Sonuç olarak, üç elektrotlu bir elektrokimyasal sistemde çalışma elektrodu ile referans elektrot arasında bir potansiyel uygulanır ve buna karşılık çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot arasında bir akım cevabı alınır (85, 88).

2.8. Çalışma Elektrodu

Çalışma elektrodu, voltametrik hücre içerisindeki elektrokimyasal türlerin reaksiyonunun gerçekleştiği elektrottur. Çalışma elektrotları analite göre seçilen ve analit aktivitesini saptayan elektrotlardır. Bu elektrotlar yalın ya da modifiye gibi farklı şekillerde

kullanılabilir. Genellikle altın, platin ve camısı karbon gibi inert materyaller çalışma elektrodu olarak tercih edilir. Çalışma elektrotları polarlanabilmesi için küçük yüzey alanlarına sahip olmalıdır. Bu sayede eser miktarda elektroaktif madde ile redoks reaksiyonu gerçekleşebilir. Maddelerin çalışma elektrodu üzerindeki indirgenmesinden kaynaklanan akıma katodik akım, yükseltgenmesinden kaynaklanan akıma ise anodik akım denir. Çalışma elektrotları, istenilen şekli alabilmesi için kolay işlenebilir olmalı, iletkenlik özelliği iyi olmalı, negatif potansiyel sınırı yüksek olmalı ve çalışılan potansiyel aralığında inert özellik göstermelidir. Bu elektrotların potansiyel çalışma aralığı, elektrot tipine, çözücüye, pH'ya ve destek elektrolite göre farklılık göstermektedir.

Çalışma elektrotları; cıva kökenli elektrotlar, dönen elektrotlar, katı elektrotlar ve modifiye elektrotlar olarak dört grupta sınıflandırılabilir. Cıva kökenli elektrotlar; durgun cıva damla elektrot, damlayan cıva elektrot, asılı cıva damla elektrot ve cıva film elektrottur. Cıva kökenli elektrotlarda analiz geniş bir katodik çalışma potansiyel aralığında gerçekleştirilir. Aynı zamanda her cıva damlasında elektrot yüzeyinde yenilenme sağlanır. Cıva kökenli elektrotlar metallerle amalgam oluşturabildikleri için metal iyonları metalik halde ön deriştirilebilir ve bu nedenle özellikle metallerin eser analizinde kullanılır. Dönen elektrotlar; dönen disk elektrotlar ve halka disk elektrotlar olarak sınıflandırılır. Dönen disk elektrotlar, platin ve camısı karbon yapıya sahip olup bir motor sistemi ile dönme hızları kontrol edilir. Bu elektrotlarda elektroda madde taşınması konvektif difüzyonla gerçekleştiğinden durgun elektrotlara göre daha büyük bir akım elde edilir ve böylece duyarlılığı daha yüksek ölçümler elde edilmiş olur. Halka disk elektrotlar, ortada bir disk elektrot ve onun dış kısmında elektriksel olarak yalıtılmış halka şeklinde ikinci bir elektrot içerir. Tepkime sırasında, disk elektrotta meydana gelen ürün, elektrodun dönmesi ile birlikte halka elektroda doğru hareket eder (84, 85, 88).

Bu tez çalışması kapsamında çalışma elektrodu olarak katı elektrot ve modifiye elektrot kullanılmış olup bu iki türdeki çalışma elektrodu alt başlık olarak açıklanmıştır.

2.8.1. Katı Elektrotlar

Cıvanın zehirli olması, kolay oksitlenmesi, faradayik olmayan artık akım vermesi gibi dezavantajlardan dolayı 1940'lı yılların sonunda cıva elektrotlara alternatif olarak Skobets ve ekibinin başlattığı ve günümüze kadar devam eden katı metal elektrot çalışmaları, voltametriye geniş bir uygulama alanı sağlamıştır. Katı elektrotlar cıva elektrotlara göre daha geniş anodik çalışma bölgesi sağlamasının yanında bazı dezavantajlar gösterir; cıva

elektrotlardaki gibi elektrot yüzeyinin yenilenmesi söz konusu olmadığından çalışma sırasında elektrot yüzeyine adsorplanmış safsızlıklardan dolayı tekrarlanabilir sonuçların alınması zorlaşabilir. Bu sorun, elektrot yüzeyinin her bir ölçüm öncesinde temizlenmesi ile giderilir. Her metal için kendine özgü olan bu işleme *ön işlem* denir (89–91).

Farklı yapılarda katı malzemelerden oluşan çalışma elektrotları bulunmaktadır. Sıklıkla kullanılan yapılardan bazıları karbon, rutenyum, platin ve altındır. Nikel, gümüş, bizmut ve bakır da bazı analizler için kullanılır. Katı elektrotlar tüp, halka, makro ve mikro gibi çeşitli formlarda ve boyutlarda hazırlanabilir. Platin, altın ve paladyum gibi soy metaller genellikle inert kabul edilir, ancak belirli elektrokimyasal koşullar altında bu elektrotlar yüksek derecede etkilidir. Soy metal elektrotlarının avantajı yüksek iletkenlikleridir ve genellikle analitik uygulamalar veya elektrokimyasal mekanizmaların incelenmesi için elektrot olarak kullanılırlar. Altın, platin, bizmut, paladyum, rodyum, bakır, rutenyum ve gümüş gibi metallerden yapılmış katı elektrotlar, geniş potansiyel aralığında çalışılabilme, düşük artık akım gösterme, düşük maliyet ile analiz, zengin yüzey alanına sahip olma ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlama gibi avantajları nedeniyle elektroanalitik kimyada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Elektrotların iyi elektriksel iletkenlik göstermesi önemli bir faktördür. Karbon esaslı elektrotlar, yükseltgenme ve indirgenme bölgelerinde geniş bir çalışma aralığı sunmaları, düşük maliyetli olmaları, kolay kullanımları ve modifikasyon işlemlerine uygun olmaları nedeniyle voltametriye yaygın olarak tercih edilmektedir. Ancak, karbon yüzeylerinde gözlenen elektron transfer oranları genellikle soy metal elektrotlara kıyasla daha yavaştır. Elektron transfer reaktivitesi, karbon yüzey yapısından önemli oranda etkilenir. Karbon esaslı elektrotlara; camı karbon, grafit, bor katkılı elmas ve karbon pasta elektrotlar örnek olarak verilebilir (92–94).

2.8.1.1. Camı Karbon Elektrot

Camı karbon, 1962 yılında, Yamada ve Sato tarafından fenol formaldehit reçinesinin inert bir gaz içerisinde ısıtılması yoluyla ortaya çıkarılmıştır. Camı karbon elektrot (GCE) diğer karbon yapıları elektrotlara kıyasla farklı fiziksel özelliklere sahiptir; yüzeyinde daha küçük gözenekler bulundurduğu için diğer karbon yapıları elektrotlardan daha fazla tercih edilir. Camı karbon yapısı, gelişigüzel aromatik moleküllerden oluşmaktadır. Yapısal özelliği nedeniyle elektrokimyasal ölçümler öncesinde elektrodun yüzeyine parlatma işlemi uygulanır. Çalışma öncesinde camı karbon elektrodun aktivasyonunu sağlamak ve tekrar

edilebilir sonuçlar elde edebilmek amacıyla yapılan ön işlemler kesin bir standartta olmayıp çalışılacak maddenin yapısına ve çözelti ortamına bağlı olarak farklılık gösterir. Parlatma, radyofrekans uygulanması, kimyasal ve elektrokimyasal işlemler ve düşük basınçta sıcaklık uygulaması bu işlemlerden birkaçıdır. Yapılan aktivasyon işlemleriyle, mikropartiküllerin, fonksiyonel grupların ve serbest keskin uçların oluşumu sağlanır. Aynı zamanda yüzey alanının büyütülmesi ve yüzey safsızlıklarının uzaklaştırılması gerçekleştirilir (95–98).

2.8.2. Modifiye Elektrot

Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan katı elektrotların yüzeyi, çalışma potansiyellerine ya da duyarlılıklarına bağlı olarak söz konusu reaksiyon için elverişli olmayabilir. Bu durum, yalın elektrotların modifiye edilerek özelliklerinin analite özgü olarak iyileştirilmesi düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Elektrot modifikasyonu, sensörlerin hassasiyetini, seçiciliğini, stabilitesini ve tepkisini artırmak amacıyla polimerler, nanomalzemeler ve biyolojik ajanlar gibi çeşitli malzemeler kullanılarak gerçekleştirilen farklı kimyasal ve fiziksel yöntemleri içeren bir tekniktir. Modifikasyon işlemi ile düşük teşhis sınırlarıyla, karmaşık bir ortamda bile, analitlerin çok düşük miktarlarının tespiti sağlanabilir. Modifiye elektrotlar, kimyasal ve elektrokimyasal özelliklerini değiştirmek amacıyla elektrotların yüzeyine çeşitli organik ve inorganik maddelerin yerleştirilmesi ile hazırlanmaktadır. Bir elektrodun yüzeyi modifiye edildiğinde şu fenomen meydana gelir: Modifiye edici maddenin fizikokimyasal özellikleri elektroda taşınır ve genellikle yüzey alanındaki artış nedeniyle elektrokatalitik aktivitede bir artış olur. Modifiye elektrotların hazırlanması temelde şu üç mekanizma ile gerçekleştirilir: Kimyasal modifikasyon, yüzey adsorpsiyonu ve polimer kaplama. Polimer film modifikasyonu, genellikle özel bir sınıf olarak ele alınsa da ilk iki prosedürün bir parçası olarak kabul edilebilir. Bu işlem, kendi avantajlarına sahip gelişen bir modifikasyon prosedürüdür. Bu üç ana prosedürün kombinasyonu da mümkündür, örneğin polimer filmlerin kovalent modifikasyonu veya kovalent olarak bağlı bir mono-katmanın adsorpsiyon modifikasyonu gibi. Elektrot yüzeyine polimer, film, nanotüp ve nanopartikül gibi malzemelerin bağlanması ya da biriktirilmesi ile elektrotların duyarlılıkları geliştirilir. Bu amaçla, elektrot yüzeyinde birikme gösteren maddeler kullanılabilir ya da elektrot yüzeyinde polimerik bir film oluşturularak elektron aktarma niteliği değiştirilebilir. Elektrot yüzeyine modifikasyon işlemi uygulandıktan sonra genellikle elektrot saf su ile yıkanır ve böylece yüzeye bağlanmamış gruplar ortamdaki uzaklaştırılır. Bu işlem sonrasında, destek elektrolit çözeltisi ortamında genellikle döngülü

voltametri (CV) yöntemi kullanılarak çoklu döngü alınır ve elektrodun aktivasyon işlemi tamamlanır (99, 100).

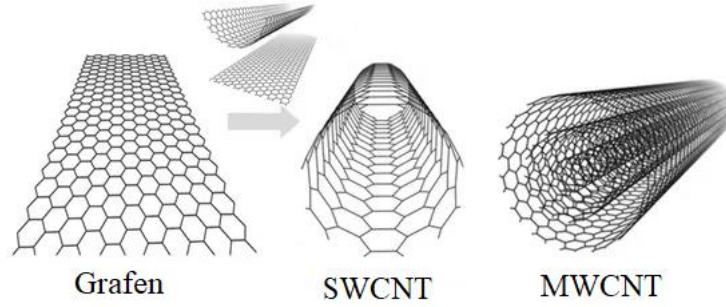
Modifiye elektrotlar güvenilir olmalı, tekrar kullanılabilirmeli, hazırlanması kolay olmalı, kısa sürede sonuç vermeli, kimyasal olarak kararlı olmalı, mekanik dayanıklılığa sahip olmalı ve çalışılan potansiyel aralığında sınır akımları düşük olmalıdır. Ayrıca modifikasyon için kullanılan madde uzun süre aktivitesini kaybetmemeli ve elde edilen analit cevabı bir elektrottan diğerine farklılık göstermemelidir (99, 101).

Çoğu geleneksel elektrodun zayıf yüzey kinetiği, elektrodun seçiciliğini ve duyarlılığını önemli ölçüde etkileyerek bir dizi kritik soruna neden olmaktadır. Geleneksel elektrotlarda analitler genellikle geniş bir pik gösterir ve düşük konsantrasyonlarda bir pik gözlenmez. Yalın elektrot yüzeyleri farklı türdeki malzemelerle ve havayla etkileşime girdiğinden, doğrudan kullanıldığında düşük seviyeler için duyarlı olmamaktadır (102, 103). İletken polimerler, karbon nanopartiküller, metal nanopartiküller, nanokompozitler ve kil mineralleri gibi çeşitli işlevselleştirilmiş malzemeler, elektrot yüzeylerinde modifikasyon ajanı olarak kullanılmaktadır. Karbon nanotüpler, fullerenler, nanolifler ve grafen gibi karbon bazlı materyallerle modifiye edilmiş elektrotlar, iyi elektriksel iletkenlik, özel yüzey alanı ve hızlı elektron transfer oranı gibi önemli özelliklere sahip olduklarından birçok elektrokimyasal sensör uygulamasında yer almaktadır (104–108).

2.8.2.1. Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler, ilk kez 1991 yılında Sumio Iijima tarafından gözlemlenmiş ve nano boyutlu, içi boş tüp şeklindeki yapılarıyla tanımlanmış malzemelerdir (109). Karbon atomlarının oluşturduğu bal peteği şeklindeki levhanın silindirik bir şekilde sarmalanmasıyla karbon nanotüp yapıları oluşur. Düzgün karbon nanotüp yapılarında, atomlar birbirleriyle sp^2 şeklinde bağlanır ve sadece altıgen geometri oluşturur. Bu düzendeki her bir atom yalnızca üç komşuya sahiptir. Karbon nanotüplerin çapları nanometre düzeyinde, boyları mikron civarındadır. Küçük boyutlarına rağmen son derece sağlam bir yapıya sahip olan karbon nanotüpler, katman sayısına göre, tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) olarak adlandırılır. SWCNT, karbon atomlarının düzlemde altıgen bir düzenlemesinden oluşan grafen tabakasının kesintisiz silindirleridir. Altıgen silindir etrafına sarılma şekline göre koltuk, zikzak ve kiral olarak adlandırılır. MWCNT, matruşka modelini oluşturan, yani çeşitli duvarlardan oluşan, her biri birbiri içinde yerleşmiş tek duvarlı nanotüplerden oluşur. MWCNT büyük yarıçapları nedeniyle

SWCNT'ye kıyasla daha az eğilebilir; yani SWCNT, MWCNT'ye göre daha esnek bir yapıya sahiptir (110–112). Grafenin sarmalanması yoluyla oluşan SWCNT ve MWCNT yapıları Şekil 4'te verilmiştir (113).



Şekil 4. Grafen, SWCNT ve MWCNT'nin şematik gösterimi (Zhao'dan, 113)

Karbon nanotüpler, yüksek elektriksel iletkenlik, kimyasal stabilite ve dayanıklılık gibi benzersiz geometrik, mekanik, elektronik ve kimyasal özelliklere sahip bir nanomalzeme grubunu temsil etmektedir (114, 115). Bu özellikleri, karbon nanotüpleri elektrokimyasal analiz uygulamaları için de son derece ilgi çekici kılmaktadır. Çalışmalar, karbon nanotüplerin güçlü bir elektrokatalitik aktivite ve düşük yüzey kirlenmesi yeteneği kazandırabileceğini göstermektedir. Karbon nanotüpler ticari uygulamalarda popüler nanomalzemelerdir; yakıt hücresi tasarımlarında, fotovoltaiik sistemlerde ve biyomedikal alanda geniş bir şekilde kullanılmaktadır (116–118). Tıbbi uygulamalar için umut vadeden bir nanomalzeme sınıfını temsil etmektedir. Araştırmalar, karbon nanotüplerin ilaç ve biyomolekül taşıma, tümör görüntüleme ve fototermal tedavi için kullanılabileceğini göstermiştir (119–123).

Karbon nanotüpler, elektrokimyasal uygulamalarda elektrot modifikasyon materyali olarak sıklıkla kullanılan malzemelerdendir. Atomik yapılarına bağlı olarak, elektriksel olarak bir metal veya yarı iletken olarak davranırlar. Karboksilik asit grubu ile fonksiyonlanmış çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT-COOH), yüksek dispersiyon kalitesine, moleküler tanıma için bağlama aktivitesine ve MWCNT'nin yüzeyindeki karboksilik asit gruplarının redoks aktivitesine sahiptir (124). Karbon nanotüpler 1996 yılında ilk kez elektrot uygulaması olarak dopaminin yükseltgenmesinde kullanılmıştır ve o zamandan bu yana en umut verici elektrot malzemelerinden biri olarak kabul edilmiştir (125, 126). Karbon nanotüplerin analitik teşhiste kullanılması amacıyla elektrot yüzeyine

modifikasyonuna dair literatürde birçok çalışma mevcuttur. Karbon nanotüp modifiyeli sensörler genellikle düşük konsantrasyonlarda veya karmaşık matrislerde geleneksel karbon elektrotlara göre daha yüksek duyarlılığa, daha düşük teşhis sınırlarına ve daha hızlı elektron transfer kinetiğine sahiptir. Optimal bir karbon nanotüp esaslı sensör oluşturmak için birçok faktör araştırılmalıdır. Elektrodun performansı; nanotübün ön işlemi, elektroda bağlanma yöntemi ve elektron taşıyıcıların eklenmesi gibi faktörlerden etkilenebilir. Karbon nanotüplerin glikoz ve DNA tespiti için biyosensör olarak kullanıldığı ve performanslarının yalın karbon elektrotlardan çok daha üstün olduğu gösterilen çalışmalar literatürde mevcuttur (127–130). Platin, camı karbon ve altın elektrot üzerinde SWCNT filmleri ile oluşturulan modifiye elektrotlar, dopamin, epinefrin ve sitokrom c gibi bazı biyomoleküllerin elektrokimyasal reaksiyonlarını katalize etmek için kullanılmıştır (131, 132). MWCNT ile modifiye edilmiş bir elektrodun nitrik oksidin elektrokimyasal yükseltgenme reaksiyonunu katalize edebildiği bildirilmiştir (133). Ayrıca, karbon nanotüp temelli elektrokimyasal sensörler ile ilaç moleküllerinin analizine dair pek çok çalışma literatürde yer almaktadır (134–137). Karbon nanotüp esaslı modifiye elektrotların hazırlanması, özellikleri ve uygulaması üzerine yapılan çalışmalar dünyada halen birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir.

2.8.2.2. İletken Polimerler

Modifiye edilmiş elektrotların ortaya çıkmasından önce elektrokimya, mevcut elektrot malzemelerinin az sayıda olması ile sınırlıydı ve elektrot yüzeylerinde çeşitli bileşiklerin adsorpsiyonuyla ilişkili sorunlar mevcuttu (138). 1970’lerde bazı araştırma grupları, elektrot yüzeylerinin kasıtlı olarak değiştirilmesinin elektrodu belirli uygulamalara uyarlamak için kullanılabileceğini fark etti (139). 1970’lerde polimer modifiyeli elektrotların ortaya çıkmasından bu yana bu tür yapılar büyük ilgi görmektedir. Miller ve Van de Mark, platin elektrotları aromatik nitro gruplar, kinonlar ve diğer redoks aktif gruplar içeren polimerlere daldırarak polimer modifiyeli elektrotların temelini oluşturan ilk kişilerdi. Polimerle modifiye edilmiş elektrotlar, tek katmanlı modifiye edilmiş elektrotların geliştirilmiş versiyonları olarak kabul edilebilir. Polimerik filmler, gerekli kalınlıkta olacak şekilde elektrot yüzeyine uygulanabilmeleri nedeniyle tek tabakalara göre avantajlıdır. Modifikasyon işlemi ile elektroaktif merkezlerin yüzey konsantrasyonu büyük ölçüde artar, bu da elektrotların daha uzun ömürlü olması ve daha yüksek katalitik verimlilik elde edilmesi için bir temel sağlar. Polimerik sistemlerden gelen elektrokimyasal tepkiler genellikle tek

katmanlardan gelenlerden çok daha büyüktür, dolayısıyla deneylerin yürütülmesi daha kolaydır (138, 140, 141).

Polimerik türlerin geleneksel substratların yüzeyine adsorpsiyonu veya kaplanması, kimyasal olarak değiştirilmiş elektrotların yapımı için tercih edilen bir yaklaşım haline gelmiştir. Son yıllarda polimer filmle modifiye edilmiş elektrotlar, iyi stabiliteleri, tekrarlanabilirlikleri ve kimyasal sensörler ve biyosensörler olarak uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmüştür (142–145). Polimer modifikasyonu uygulanacak yüzey olarak, dokuyla biyouyumluluğu, geniş bir potansiyel aralığında düşük artık akıma sahip olması ve elektrot kirlenmesinin bir sonucu olarak hatalı yanıt verme eğiliminin minimum olması nedeniyle metal elektrotlarla karşılaştırıldığında öncelikle karbon bazlı elektrotlar tercih edilir. Polimerik filmle modifiye edilmiş elektrotların hazırlanmasında farklı metodolojiler kullanılmıştır. Bu yöntemler arasında elektropolimerizasyon, üç boyutlu bir dağılıma sahip modifiye bir elektrot üretir. Bu tür elektrotlar tek katmanlılara kıyasla duyarlılığı artırır ve katalitik aktiviteyi iyileştirir. Elektrot yüzeyini modifiye etme metodolojisi, analitik uygulamalarda kısa ve uzun vadeli kullanım üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Elektrot yüzeyinde ince polimer filmlerin elektrokimyasal olarak kontrollü oluşumu, elektroaktif türlerin belirlenmesi için önemli tekniklerden biridir (146, 147). Çeşitli elektrotların modifikasyonu için bazı boyar maddelerin polimerleştirilme yoluyla kullanımı analitik uygulamalarda giderek daha fazla yer bulmaktadır. Bu uygulamalar sayesinde geçiş metal iyonları, peroksitler, anyonlar ve organik türler dahil olmak üzere farklı tipteki analitlerin tayini gerçekleştirilebilir (148–151).

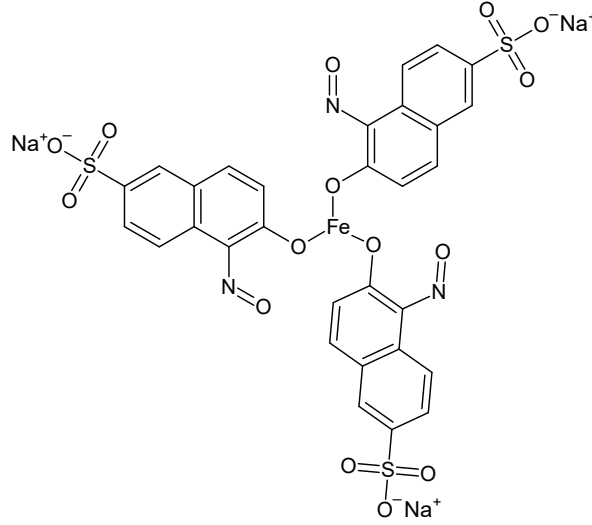
2.8.2.3. Naftol Yeşili B

Boyaların elektrokimyasal polimerizasyonu, bir iletken polimer tabakasının biriktirilmesi için en etkili yöntemlerden biridir. Böylece kimyasal stabilite, potansiyel döngü sayısının ayarlanması ile katman kalınlığı üzerinde kontrol, yük aktarımı ve geçirgenlik sağlanabilir. Ayrıca, elektropolimerizasyon yöntemi, genellikle diğer tekniklerde karmaşık olan çözünürlük engellerini ortadan kaldırır. Çünkü elektropolimerizasyonda sadece ilgili monomer çözünür ve polimer tabakası doğrudan iletken elektrot yüzeyinde biriktirilir ve bu, diğer modifikasyon yöntemlerine kıyasla kolay ve aynı zamanda daha ekonomik bir yöntemdir (152, 153).

Elektropolimerizasyon, CV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilebilir; burada tarama hızı, döngü sayısı ve potansiyel tarama aralığı gibi deneysel koşullar, elde edilen polimerik

ince filmlerin genel yapısını etkiler. Bir monomerin elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyona uğraması için, yükseltgenebilecek veya indirgenebilecek fonksiyonel gruplara sahip olması gerekir. Elektropolimerizasyon reaksiyonlarını kolaylaştırmak için en yaygın olan fonksiyonel gruplar amino, hidroksi ve vinil gruplarıdır. Bu durumlarda, bir bağ yapmamış elektron çifti veya bir π -elektron sistemi bulunur. Bu organik gruplar, yükseltgenme veya indirgenme, hangi adımın başlatma adımı olduğuna bağlı olarak radikal katyonları veya anyonları oluşturur. Bu radikal türleri elektrot yüzeyinde birleşir ve ince filmi oluşturmak için redoks süreçlerinden geçer. Bir bileşikteki fonksiyonel grup sayısının artması, radikal türlerin oluşumunu ve yoğun bir polimerik film oluşumunu destekler (154).

Naftol yeşili B (NGB) (1-nitro-2-naftalin-6-sodyum sülfonat demir tuzu) (Şekil 5), naftol yeşili Y'nin sodyum tuzudur ve daha iyi redoks özellikler gösterir. Demirin bir koordinasyon kompleksidir. Bir anyon olarak asidik bir boya gibi davranır ve mükemmel redoks özelliklere sahiptir. Histolojide kolajen boyama için, endüstride ise naylon, kağıt ve sabunun boyanması için kullanılmaktadır (147, 155, 156). NGB, yük seçici bir bileşik görevi görür; sulu çözeltiden pozitif yüklü türleri çeker ve negatif yüklü türleri iter, böylece homojen bir redoks aktif tabaka elde edilir. Yapısında bulunan Fe^{3+} sayesinde NGB bileşiği mükemmel redoks reaksiyonları gösterir ve elektrot yüzeyine iyi bir şekilde adsorplanır. Bu nedenle, NGB'nin bir elektrot üzerine immobilize edilmesi, elektrokimyasal sensör cihazları geliştirmek için potansiyel bir yöntemdir. Nitro ve azin grubu boyar maddeler, elektrokimyada geniş bir kullanıma sahiptir. Bu boyalar ile ortaya çıkan matris, hızlı yük aktarımı, iyon aktarımı ve moleküler reaksiyonlara karşı iyi katalitik yetenek gibi ilgi çekici özellikler sergiler (157–159).



Şekil 5. NGB'nin kimyasal yapısı

Boyar maddeler kullanılarak hazırlanan polimer film kaplı elektrotlar iyi stabilite, tekrarlanabilirlik, daha fazla aktif bölge ve elektrokimyasal biriktirmede homojenlik göstermektedir. Birçok redoks boya, yapay elektron donörleri olarak bilinir. Bu tür boyalar, kararlı bir redoks aktif tabaka üreterek sulu çözelti içerisinde elektropolimerizasyona uğrayabilir (160, 161). Literatürde, NGB'nin farklı tipteki elektrotların yüzeyine modifikasyonu ve geliştirilen bu elektrotlar kullanılarak yapılan analiz çalışmaları mevcuttur. Örneğin, NGB modifiyeli platin elektrot ile askorbik asit; NGB modifiyeli karbon pasta elektrot ile ürik asit ve dopamin; NGB modifiyeli camı karbon elektrot ile serotonin ve epinefrin analiz edilmiştir (147, 159, 162). Ayrıca, gıda katkı maddesi olarak kullanılan persülfat iyonunun MWCNT-NGB kompozit film modifiyeli camı karbon elektrot ile analizine dair yapılan bir çalışma da rapor edilmiştir. Geliştirilen MWCNT-NGB kompozit filmi, elektrokataliz için kolay üretim, yüksek tekrarlanabilirlik ve uzun vadeli stabilite avantajları göstermiştir (157).

Karbon nanotüp-polimer kompozitleri üzerine yapılan çalışmalar, daha yüksek iletkenlik ve yüksek kapasitans gibi fonksiyonel özelliklerde iyileşme yoluyla karbon nanotüp üzerinde polimerin avantajını göstermektedir (163, 164). Her ne kadar karbon nanotüplerin veya boya matrislerinin elektrokatalitik aktiviteleri tek tek iyi sonuçlar gösterse de farklı teknikler için mekanik stabilite ve hassasiyet gibi bazı sorunlarla karşılaşmaktadır. Ancak NGB bir anyon olduğundan çeşitli matrislere katkı maddesi olarak dahil edilebilir

(159, 165). Bu sebeple, bu tez çalışmasında MWCNT ve NGB'den yapılmış bir elektrodun hazırlanmasına yönelik çalışmalar yürütülmüştür.

2.9. Referans Elektrot

Elektroanalitik çalışmalarda kullanılan referans elektrot, yarı hücre potansiyeli sabit, analitin yapısından bağımsız belirli bir potansiyel değeri olan ve reaksiyona herhangi bir etkisi olmayan elektrottur. Referans elektrot zaman ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmeyen sabit bir potansiyele sahip olmalıdır. Referans elektrotlar küçük akım şiddetlerinde polarlanmaz, akım şiddeti arttığında ise ideal konumdan sapmalar gözlenir. Voltametrde referans elektrot olarak ikinci gruptan metal-metal iyonu elektrotlar kullanılır. Cıva ve gümüş gibi bir metal ile o metalin az çözünen tuzundan yapılmış, hazırlanması ve kullanımı kolay referans elektrotlar tercih edilmektedir. Voltametrik ölçümlerde sıklıkla doymuş kalomel elektrot ve gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrot kullanılır. Ag/AgCl elektrot, gümüş elektrodun gümüş klorürle doyurulmuş potasyum klorür çözeltisine daldırılmasıyla elde edilir. Ag/AgCl elektrot standart hidrojen elektroda karşı 25 °C'de 0.199 V potansiyele sahiptir (166, 167).

2.10. Yardımcı Elektrot

İki elektrotlu sistem kullanılan elektrokimyasal ölçümlerde polarlanmayan çalışma elektrodu, üzerinden bir akım geçtiğinde polarize olur. Bu polarizasyonu önlemek amacıyla üçlü elektrot sistemi kullanılır ve ortama yardımcı elektrot dahil edilir. Yardımcı elektrot elektrokimyasal hücrede akım taşıyan ve tepkime ile ilgisi olmayan elektrottur. Çalışma ve referans elektrotlar arasına uygulanan akım, referans elektrot yerine yardımcı elektrottan geçer ve böylece referans elektrodun potansiyeli akım değişiminden etkilenmez. Çalışma elektrodunun potansiyelinin ölçümü, referans elektroda karşı, akımın sıfır olduğu şartlar altında yapılmaktadır. Akımın yardımcı elektrodun üzerinden geçmesinden dolayı tantal, tungsten, grafit ve platin gibi soy metal olan yardımcı elektrotlar kullanılır (85, 168).

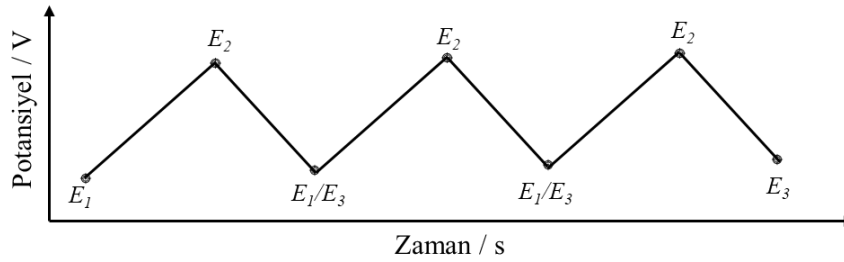
2.11. Voltametrik Yöntemler

2.11.1. Döngülü Voltametri

Döngülü voltametri (CV), elektrokimyasal reaksiyonlara dair kalitatif bilgi edinmek amacıyla en sık kullanılan voltametrik yöntemidir. Bu yöntem kullanılarak, reaksiyon ürünlerinin kararlılığı, reaksiyonların elektrokimyasal yönden tersinirliği, indirgenme ya da yükseltgenmenin kaç adımda ve hangi potansiyelde gerçekleştiği ve adsorpsiyon/difüzyon

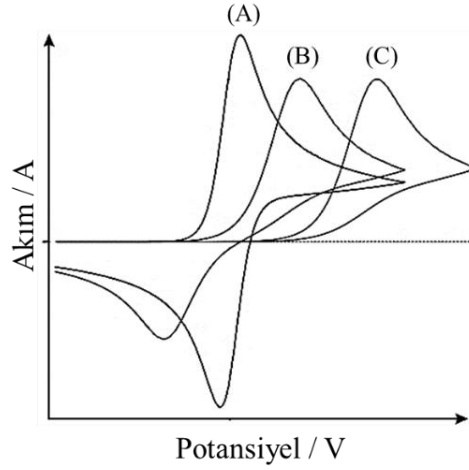
süreçleri gibi sistemi karakterize eden pek çok bilgi elde edilebilir (169). CV, elektroaktif türlerin redoks potansiyellerini hızlı bir şekilde belirleme ve çevresel koşulların redoks süreci üzerindeki etkisini kolayca değerlendirme özelliğine sahip olması nedeniyle genellikle elektroanalitik bir çalışmanın ilk basamağı olarak kullanılır.

CV, durgun bir çözelti içerisinde bir çalışma elektrodunun potansiyelinin doğrusal bir şekilde değiştirilerek sabit bir hızda pozitif veya negatif yönde tarama yapılması ve ardından tarama yönünün ters çevrilmesi ile başlangıç potansiyeline doğru ters yönde bir tarama yapılması esasına dayanır. Potansiyel taramasının, yalnızca başlangıç potansiyeli (E_1) ve bitiş potansiyeli (E_2) değerleri arasında gerçekleşmesi durumunda bu yöntem *doğrusal taramalı voltametri* (LSV) denir. E_2 değerine ulaşıldıktan sonra, aynı tarama hızıyla ilk taramanın ters yönüne doğru tarama yapıldığında ise yöntem CV olur. Ters taramada potansiyel E_1 'de sonlandırılabilir gibi, farklı bir E_3 değerine de götürülebilir (Şekil 6). CV'de zamana karşı uygulanan potansiyelin grafiği üçgen dalga formundadır. Döngü sayısı analize bağlı olarak tek veya çoklu olacak şekilde ayarlanabilir. Potansiyel taraması sırasında potansiyostat, uygulanan potansiyelden kaynaklanan akımı ölçer. CV'de katodik tarama negatif potansiyel yönlü taramaları, anodik tarama ise pozitif potansiyel yönlü taramaları ifade eder. Elde edilen akım-potansiyel grafiği ise voltamogramdır (170, 171).



Şekil 6. CV yöntemi için üç döngülü uygulanmış uyarma sinyalinin şematik gösterimi

Voltametrde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi ile meydana gelir. Elektrot yüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonlar, tersinir, tersinmez veya yarı tersinir bir karakter gösterir (Şekil 7) (172, 173).



Şekil 7. (A) Tersinir, (B) yarı tersinir ve (C) tersinmez bir elektrot reaksiyonunun döngülü voltamogramları

Tersinir bir reaksiyon şu şekilde gösterilir: $O + ne^- \rightleftharpoons R$

Tersinir bir elektrot reaksiyonunun 25 °C sıcaklıktaki pik akımı katı elektrotlar için “Randles-Sevcik” eşitliği ile ifade edilir: $I_p = 2.69 \times 10^5 n^{2/3} A D^{1/2} C \nu^{1/2}$

Bu denklemde, I_p , pik akımı (amper); n , yarı reaksiyonda yer alan elektron sayısı; A , elektrot yüzey alanı (cm^2); D , O türünün difüzyon katsayısı (cm^2/s); C , O türünün çözelti konsantrasyonu (mol/cm^3); ν , tarama hızı (V/s) şeklindedir.

Tersinir bir sistem şu özelliklere sahiptir:

- ✓ Nernst eşitliği geçerlidir; elektron aktarım hızı tüm potansiyellerde kütle aktarım hızından büyüktür.
- ✓ Anodik ya da katodik yönde tarama yapıldığında, ters yönde uygulanan taramada da bir pik gözlenir.
- ✓ Tarama hızının değişmesi ile pik potansiyeli ve pik şekli değişmez.
- ✓ 25 °C’de tüm tarama hızlarında, anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark $0.059/n$ V’dir.
- ✓ Anodik ve katodik pik akımları oranı 1’e eşittir ve bu oran tarama hızı ile değişmez.
- ✓ Farklı tarama hızlarından alınan voltamogramlar ile elde edilen tarama hızının kareköküne karşı pik akımı grafiği doğrusaldır.

Tersinmez sistemlerde Nernst eşitliği geçerli değildir; çünkü elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından yeterince büyük değildir. Tersinmez sistemler şu özellikleri gösterir:

- ✓ İleri taramanın tersi olan potansiyel bölgesinde yapılan taramada herhangi bir pik gözlenmez.
- ✓ Tarama hızının değişmesi ile anodik veya katodik pik potansiyelleri değişir; anodik pikler daha anodik potansiyele, katodik pikler ise daha katodik potansiyele kayar.
- ✓ Anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark $0.059/n$ V'den daha büyük olur.
- ✓ Anodik ve katodik pik akımları oranı 1'e eşit olmaz.

Yarı tersinir sistemler ise şu özelliklere sahiptir:

- ✓ Tarama hızının artması ile pik şekli değişir.
- ✓ Anodik ve katodik pik potansiyelleri tarama hızı ile değişir ve bu değişim tarama hızının artması ile daha negatif değerlere kayma eğilimindedir.
- ✓ Düşük tarama hızlarında anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark $0.059/n$ V'ye yaklaşırken yüksek tarama hızlarında $0.059/n$ V'den büyüktür ve tarama hızı ile bu değer artar.
- ✓ Anodik ve katodik pik akımları oranı 1'e eşit değildir.

Elektrokimyasal analizlerde çalışma elektrodu ile analit çözeltisi arasındaki elektron aktarımının çözelti-elektrot ara yüzeyinde gerçekleşmesi durumunda sistem difüzyon kontrollü; sadece elektrot yüzeyinde gerçekleşmesi durumunda ise sistem adsorpsiyon kontrollüdür. Değişen tarama hızları için elde edilen elektroaktif türe ait döngülü voltamogramların pik akımı değerleri üzerinden çizilen grafikler sistemin difüzyon ya da adsorpsiyon kontrollü olması hakkında bilgi sağlar. Sistemin adsorpsiyon kontrollü olması durumunda, tarama hızındaki değişim ile pik akımı doğrusal bir değişim gösterir. Ayrıca, tarama hızının logaritmasına karşı pik akımının logaritması grafiğinin eğim değerinin 1'e yakın olması gerekir. Sistemin difüzyon kontrollü olması durumunda, tarama hızının karekökündeki değişim ile pik akımı doğrusal bir değişim gösterir ve tarama hızının logaritmasına karşı pik akımının logaritması grafiğinin eğim değerinin 0.5'e yakın olması gerekir (84, 174).

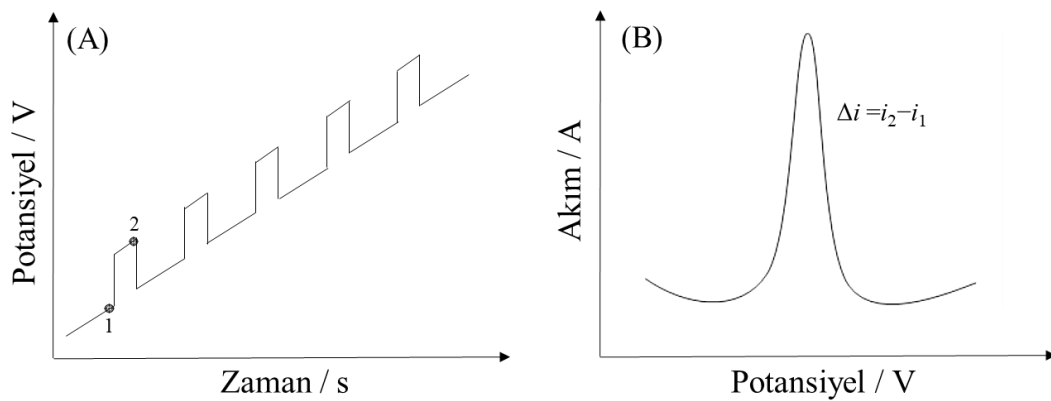
2.11.2. Puls Voltametri

Puls voltametrik yöntemler, daha duyarlı çalışmaların gerçekleştirilmesine olanak sağlayan, özellikle kantitatif analiz çalışmalarında yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Elektrokimyasal analiz çalışmalarında faradayik ve faradayik olmayan akımlar söz

konusudur. Analizlere, faradayik olmayan akımın yani kapasitif akımın katkısının minimum olması istenir. Bu katkının minimum etkide olması için faradayik akımın faradayik olmayan akıma oranının maksimum olacağı yöntemler geliştirilmektedir. Puls voltametri yöntemleri bu amaçla geliştirilen yöntemlerdir. Bu yöntemlerde, çalışma elektroduna belirli aralıklarla potansiyel pulslar uygulanır ve böylece puls uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra akımın ölçülmesi ile faradayik akımın faradayik olmayan akıma oranı önemli ölçüde artırılır (84, 92). Farklı şekillerde puls voltametri yöntemleri vardır. Bu tez çalışmasında kullanılan puls voltametri yöntemleri diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve kare dalga voltametrisi (SWV)'dir.

2.11.2.1. Diferansiyel Puls Voltametrisi

DPV, faradayik olmayan akımın analize katkısını minimize eden yöntemlerden biridir. Bu yöntemde doğrusal bir potansiyel artışına göre belirlenen sabit büyüklükte pulslar çalışma elektroduna belli bir süre boyunca uygulanır. Analiz sırasında aynı puls için iki defa akım ölçümü yapılır. Birinci ölçüm puls potansiyeli uygulanmadan hemen önce potansiyelde bir artış olmadan, ikinci ölçüm ise puls potansiyelinin bitmesine yakın bir bölgede yapılır. Bu iki akım arasındaki fark alınarak toplam akım oluşur ve böylece voltamogram elde edilir. Voltamogramda elde edilen pik akımının yüksekliği analitin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. DPV yöntemi için uyarma sinyalinin şekli ve voltamogramı Şekil 8'de verilmiştir (175, 176).



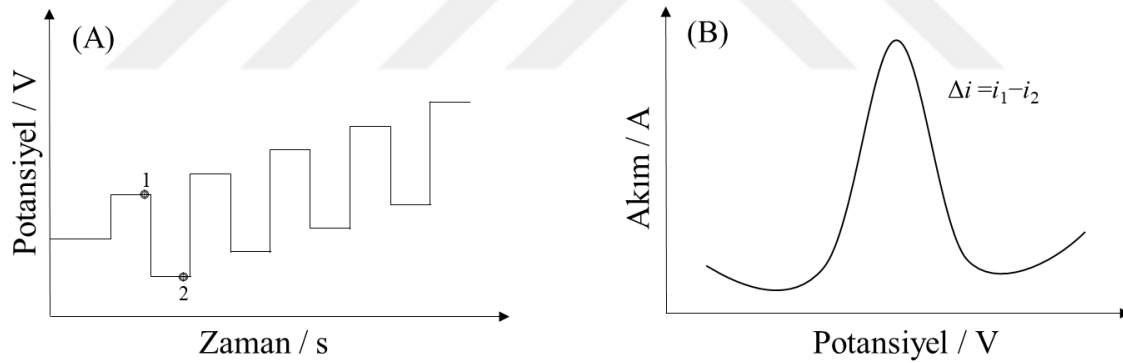
Şekil 8. DPV için (A) uyarma sinyalinin şematik gösterimi ve (B) elektrot reaksiyonunun voltamogramı

Duyarlığı yüksek bir yöntem olan DPV, sağladığı üstünlükler sayesinde nanomolar ve mikromolar seviyedeki birçok analitin kantitatif analiz çalışmalarına uygulanmaktadır.

Ayrıca DPV, farklı türdeki elektroaktif maddelerin eş zamanlı tayini için de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

2.11.2.2. Kare Dalga Voltametrisi

SWV, hızlı analize olanak sağlayan yüksek duyarlığa sahip bir puls voltametri tekniğidir. DPV yönteminde olduğu gibi, akım her bir puls döngüsünde iki defa ölçülür. SWV'yi DPV'den ayıran en önemli özellik SWV'de geri yönde de puls uygulanmasıdır. İleri ve geri yönde uygulanan pulsa ait bitiş noktalarında ölçülen akım değerlerinin farkları alınarak net akım belirlenir. Akımlardan birinin değeri negatif olduğu için hesaplanan net akım, her iki akımdan daha büyük olur. Bu yöntemin hassasiyeti DPV'ye göre daha yüksektir; çünkü DPV'de ters akım söz konusu değildir. SWV yöntemini DPV yönteminden ayıran diğer bir özelliği de kapasitif akımın, toplam akıma katkısının minimum oluşudur. Ayrıca SWV'nin önemli bir diğer avantajı hızlı bir yöntem olmasıdır. DPV'de 2-3 dakikada elde edilen voltamogram SWV'de birkaç saniye içinde kaydedilebilir. Şekil 9'da SWV yöntemi için uyarma sinyalinin şekli ve voltamogramı verilmiştir (175, 176).



Şekil 9. SWV için (A) uyarma sinyalinin şematik gösterimi ve (B) elektrot reaksiyonunun voltamogramı

2.11.3. Sıyırma Voltametrisi

Sıyırma voltametrisi, bir elektroaktif maddenin elektrot yüzeyinde birikmesine dayanan bir tayin yöntemidir. Sıyırma voltametrisi, voltametrik çalışmalarda duyarlılığı artırmak ve sinyal:gürültü oranını iyileştirmek amacıyla geliştirilmiştir. Elektroanalitik yöntemler arasında en duyarlı olanı sıyırma voltametrisi yöntemleridir.

Bu yöntemlerin temel işleyişi şu adımlardan oluşur: Belirli bir potansiyelin uygulanması ile bir çözelti içerisindeki analitin genellikle karıştırma yoluyla elektrodun yüzeyinde birikmesi sağlanır ve birikme yeterli miktara ulaştığında karıştırma durdurulur. Bu biriktirme işleminden sonra voltametrik metotların biriyle belirli bir potansiyel aralığında tarama yapılır ve maddenin elektrot yüzeyinden sıyırılması ile voltamogram elde edilir. Sıyırma basamağında voltametrik metot olarak DPV kullanılması durumunda yöntem diferansiyel puls sıyırma voltametrisi (DPSV) ve SWV kullanılması durumunda ise kare dalga sıyırma voltametrisi (SWSV) adını alır. Analiz sonuçları, biriktirme potansiyeline, biriktirme süresine ve karıştırma hızına bağlı olarak değişir.

Biriktirme basamağı ve sıyırma aşamasında taranan potansiyel aralığına bağlı olarak anodik, katodik ve adsorptif olmak üzere üç farklı sıyırma voltametrisi yöntemi bulunmaktadır. Yöntem, potansiyel taramasının anodik bölgede yapılması durumunda *anodik sıyırma voltametrisi* ve katodik bölgede yapılması durumunda *katodik sıyırma voltametrisi* olarak adlandırılır. Biriktirme basamağında elektron aktarımı gerçekleşmiyorsa yönteme *adsorptif sıyırma voltametrisi* denir. Adsorptif sıyırma voltametrisinde biriktirme işlemi doğrudan doğruya elektrot yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla olur. Elektrot yüzeyinde biriken eser miktardaki madde, sıyırma basamağında uygulanan potansiyel taraması ile yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonları sonucu oluşan akım ile ölçülür.

Sıyırma voltametrisi alt başlıklarla ifade edilse de, adsorptif sıyırma voltametrisi anodik ve katodik sıyırma voltametrisi ile önemli farklılıklar göstermez. Analitin elektrodun yüzeyine ön deriştirilmesi, adsorptif sıyırma voltametrisinde diğer tekniklerden farklı olarak elektrolitik yolla değil, maddenin fiziksel adsorpsiyonuyla gerçekleşir. Bu yöntem sayesinde nanomolar gibi çok düşük seviyelerde pek çok maddenin tayini yapılabilmektedir (84, 93).

2.12. Analitik Yöntem Validasyonu ve Parametreleri

Analitik yöntem validasyonu; belirli bir sürecin, belirli şartname ve kalite özelliklerinde istenen sonucu tutarlı bir şekilde üreteceğine dair yüksek düzeyde güvence sağlayan belgelenmiş bir kanıtın oluşturulması olarak tanımlanabilir. Yöntem validasyonu, analitik işlemlerin belirli bir kullanım için uygunluğunu doğrulayan parametrelerdir. Geliştirilen bir yöntemin kabul edilebilmesi için, gerekli olan validasyon testleri ve ilgili hesaplamaların tamamlanmış olması gerekir. Çeşitli yöntemleri doğrulamak için gereken performans özellikleri, USP (United States Pharmacopeia), ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), FDA

(The Food and Drug Administration) ve Avrupa Yönergeleri gibi çeşitli kılavuzlar kullanılarak belirlenmelidir. Uluslararası kılavuzlar, yöntem validasyonu sırasında özgüllük/seçicilik, doğrusallık ve doğrusal aralık, duyarlık, teşhis sınırı, tayin sınırı, kesinlik, doğruluk, sağlamlık, tutarlık ve stabilite parametrelerinin bazılarının değerlendirilmesinin gerekli olduğunu bildirmektedir. Hangi tip validasyon karakteristiklerinin uygulanacağı, planlanacak analitik işlemlere göre belirlenir (177–179).

Bir analitik yöntemin, yalnızca bir bileşeni, hiçbir analitik sinyal vermeyen diğer tüm yardımcı ya da etken madde gibi yabancı maddelerin varlığında bu bileşenlerden bağımsız olarak belirleyebilmesi yeteneği özgüllük olarak tanımlanır. Diğer taraftan, bir analitik yöntem, birbirinden bağımsız olarak aynı anda bir veya birkaç bileşeni belirleyebiliyorsa seçici olarak adlandırılır (180).

Doğrusallık; analitin çeşitli konsantrasyonlarının belirli bir sırayla test edilmesi yoluyla elde edilen bir parametredir. Elektroanalitik cevabın konsantrasyona göre kalibrasyonunun grafik üzerinde düz bir çizgi oluşturmaya yakınlığı ile korelasyon katsayısı (r)'nin 0.990 ve üzerinde olması durumlarında doğrusallıktan bahsedilebilir. Doğrusal aralık ise; kalibrasyon eğrisinde düz bir çizginin elde edildiği en düşük derişimden, doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime kadar olan derişim aralığını ifade eder.

Duyarlık; analitik yöntemin analit derişimindeki küçük farkları ayırt edebilmesinin bir ölçüsüdür. Doğrusal aralık dahilinde elde edilen denklemin eğimi olarak ifade edilir.

Teşhis sınırı (LOD); belirli bir analitik prosedür aracılığıyla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde tespit edilebilen ancak miktarı kesin olarak bilinemeyen en düşük analit konsantrasyonudur. Tayin sınırı (LOQ) ise belirli bir analitik prosedürle, belirlenmiş doğruluk ve kesinlik kriterleri dahilinde analit miktarının tayin edilebileceği en düşük konsantrasyonu temsil eder. Teşhis sınırının ve tayin sınırının hesaplanmasında farklı yöntemler kullanılabilir. Yaygın olan ve bu tez çalışmasında kullanılan teşhis sınırı ve tayin sınırı denklemleri sırasıyla; $LOD = 3.3 s/m$ ve $LOQ = 10 s/m$ şeklindedir. Bu denklemlerde s ölçüm değerlerinin standart sapmasını, m ise kullanılan kalibrasyon denkleminin eğim değerini ifade eder (181).

Kesinlik; ölçüm sonuçlarının birbirine olan yakınlığının ifadesidir. Bir diğer ifadeyle, geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. %RSD üzerinden ifade edilir. Tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak iki genel kesinlik ölçüsü bulunur. Tekrar edilebilirlik, gün içi ve günler arası olmak üzere kısa süreli kesinlik ve orta süreli kesinlik

olarak değerlendirilebilir. Aynı gün içinde yapılan tekrarlı analiz sonuçlarının benzerliği gün içi kesinlik, farklı günlerde alınan tekrarlı analiz sonuçlarının birbirine olan yakınlığı ise günler arası kesinlik olarak ifade edilir. Tekrar üretilebilirlik ise analitik bir yöntemin farklı laboratuvarlarda uygulandığında elde edilen sonuçlarının aynı olma derecesini temsil eder. Böylece, farklı cihazlar, farklı deneyim düzeyine sahip analizciler, oda sıcaklığı ve nemindeki değişiklikler gibi çeşitli unsurların sonuçlara olan etkisi değerlendirilir.

Doğruluk; analiz sonucu elde edilen değerlerin gerçek değere olan yakınlığının bir ölçüsüdür. Ortama eklenen analitin ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Sonuçlar %geri kazanım olarak ifade edilir ve %RSD ve/veya %bağıl hata ile verilir.

Sağlamlık; yöntemin küçük değişimlerden etkilenmeden aynı şekilde kalabilme yeteneğidir. Ortam sıcaklığının ya da neminin değişmesi, kullanılan malzemelerin farklı markalardan tedarik edilmesi gibi değişkenlerin ölçüm sonuçlarına etkisi değerlendirilir.

Tutarlık; tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik ile ilişkilidir. Tutarlık, çalışmanın aynı laboratuvarda farklı analizciler ve/veya farklı cihazlar tarafından veya farklı laboratuvarlarda aynı analizciler tarafından gerçekleştirilmesi, reaktif ve çözücülerin farklı markalardan tedarik edilmesi gibi değişkenler üzerinden değerlendirilir ve %RSD ile ifade edilir.

Stabilite; maddelerin ne kadar süre bozunmadan kaldığını belirlemenin bir ölçüsüdür. Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için standart maddelerin, numunelerin ve kullanılan çözücülerin uygun bir süre stabilitesini koruması gerekir. Bu amaçla nem, sıcaklık, çözme-dondurma gibi unsurların stabiliteye olan etkisi belirli bir süre boyunca izlenerek maddelerin bozunmadan kaldığı süre tespit edilir (181–183).

2.13. Etken Maddelerin Literatürdeki Çalışmaları

Literatürde doksazosinin çeşitli farmasötik preparatlardan ve biyolojik matrislerden analizine dair çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, spektrofotometri (184–187), sıvı kromatografisi (188–191) ve termogravimetri (192) yöntemleri ile yapılmış çalışmalardır. Ayrıca literatürde, farmasötik preparatlarda ve biyolojik matrislerde doksazosinin analizi için geliştirilmiş elektrokimyasal yöntemler de mevcuttur. Literatür incelemesinde polarografik ve voltametrik olmak üzere altı adet elektrokimyasal çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen bulgulara aşağıda değinilmiştir.

Fernández de Betoño ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, asılı cıva damla elektrot kullanılarak diferansiyel puls adsorptif sıyırma polarografisi (DPSP) ve kare dalga adsorptif sıyırma polarografisi (SWSP) yöntemleri ile doksazosinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, elektrot reaksiyonu tersinmez ve adsorpsiyon kontrollü olarak belirlenmiştir. Destek elektrolit olarak 0.04 M Britton-Robinson tamponu (BRT) (pH 5.75) ve ön deriştirme koşulları olarak 0.24 V biriktirme potansiyeli, çözelti konsantrasyonuna göre 60–90 s biriktirme süresi, 3000 rpm karıştırma hızı seçilmiştir. İndirgenme yönünde yapılan analizde pik potansiyelleri DPSP ile -1.33 V ve SWSP ile -1.41 V olarak elde edilmiştir. Doğrusal aralıklar, DPSP için $8 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ ve SWSP için $3 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Teşhis sınırları, DPSP için 2.2×10^{-5} ve SWSP için $6.4 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ 'dır. Doksazosin tabletlerinden ve insan idrarından geri kazanım çalışmaları, yalnızca DPSP yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Geri kazanımlar tablet örneğinde %1.54 bağıl standart sapma (RSD) ile %100.8 olarak ve idrar örneklerinin üç farklı konsantrasyonu için ise %100.25 (%RSD=1.27), %99.75 (%RSD=1.28) ve %101.50 (%RSD=1.70) olarak bulunmuştur (193).

Arranz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yalın karbon pasta elektrot ve Tenaks modifiyeli karbon pasta elektrot ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak doksazosinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, elektrot reaksiyonları tersinmez ve adsorpsiyon kontrollü olarak belirlenmiştir. Destek elektrolit olarak 0.04 M BRT (pH 6.6) ve ön deriştirme koşulları olarak yalın elektrot için 0.55 V, 360 s, 2000 rpm ve modifiyeli elektrot için 0.55 V, 180 s, 2000 rpm seçilmiştir. İndirgenme yönünde yapılan analizde pik potansiyelleri 0 V civarında elde edilmiştir. Doğrusal aralıklar, yalın elektrot ile DPSV için $6 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ve SWSV için $2 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$; modifiyeli elektrot ile DPSV için $6 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ve SWSV için $8 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Teşhis sınırları, yalın elektrot ile DPSV için $4.66 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ ve SWSV için $1.34 \times 10^{-4} \mu\text{M}$; modifiyeli elektrot ile DPSV için $4.35 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ ve SWSV için $5.18 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ olarak verilmiştir. Doksazosin tabletlerinden ve insan idrarından geri kazanım çalışmaları, geliştirilen yöntemlerden yalnızca modifiyeli elektrot kullanılarak DPSV yöntemi için yapılmış ve geri kazanımlar tablet örneğinde %98.50 (%RSD=3.50) olarak ve idrar örneklerinin iki farklı konsantrasyonu için ise %98.00 (%RSD=3.79) ve %98.49 (%RSD=%3.91) olarak bulunmuştur (194).

Altıokka ve Tunçel'in yaptığı çalışmada, cıva elektrot ile aşırı yüklenmiş artan genlikli puls polarografisi (SIAPP) ve aşırı yüklenmiş sabit genlikli puls polarografisi

(SCAPP) teknikleri kullanılarak doksazosinin tayini açıklanmıştır. Tüm deneyler %20 (v/v) etanol, 0.2 M KCl ve 0.2 M asetat tamponu (AT) içeren destek elektrolitte gerçekleştirilmiştir. Doksazosin tayini için pH değeri olarak 3.5 tercih edilmiştir. Sistem, pH 3.5'te difüzyon kontrollü ve tersinmez olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon çalışmaları, SIAPP ve SCAPP yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve tüm teknikler için tatmin edici sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Bu yöntemler, süzölmüş ve süzölmemiş tablet çözeltilerine uygulanmış ve herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Bu çalışmada önerilen tayin yöntemlerinin doğru, hızlı ve uygulanabilir olduğu beyan edilmiştir (195).

Fernández de Betoño ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, doksazosinin elektrokimyasal davranışı nafyon modifiyeli karbon pasta elektrot üzerinde SWSV yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Reaksiyonun yarı tersinir ve adsorpsiyon kontrollü olduğu bildirilmiştir. Destek elektrolit olarak BRT (pH 6.8) ve ön deriştirme koşulları olarak 0.5 V, 90 s, 3000 rpm seçilmiştir. İndirgenme yönünde yapılan analizde pik potansiyeli -0.17 V'de elde edilmiştir. SWSV yöntemi ile yapılan kalibrasyon çalışmasında $6.0 \times 10^{-5} - 2.8 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ve $4.0 \times 10^{-3} - 4.0 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ olarak iki ayrı doğrusal aralık elde edilmiştir. Teşhis sınırı $2.33 \times 10^{-5} \text{ M}$ olarak hesaplanmıştır. Geri kazanımlar tablet örneğinde %98.50 olarak ve idrar örneklerinin iki farklı konsantrasyonu için ise %99.75 ve %100.38 olarak bildirilmiştir (196).

Arranz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yalın karbon pasta elektrot ve oktil bağlı silika (C_8) modifiyeli karbon pasta elektrot ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak doksazosinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, elektrot reaksiyonları tersinmez ve adsorpsiyon kontrollü olarak belirlenmiştir. Destek elektrolit olarak 0.2 M sitrat tamponu (pH 3.0) ve ön deriştirme koşulları olarak yalın elektrot için 0.55 V, 120 s, 1500 rpm ve modifiyeli elektrot için 0.55 V, 60 s, 1500 rpm seçilmiştir. Anodik yönde yapılan analizde pik potansiyelleri 1.0 V civarında elde edilmiştir. Doğrusal aralıklar, yalın elektrot ile DPSV için $2 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ve SWSV için $4 \times 10^{-3} - 4 \times 10^{-2} \mu\text{M}$; modifiyeli elektrot ile DPSV için $1 \times 10^{-3} - 3 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ve SWSV için $1 \times 10^{-3} - 4 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Teşhis sınırları, yalın elektrot ile DPSV için $1.80 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ve SWSV için $1.70 \times 10^{-3} \mu\text{M}$; modifiyeli elektrot ile DPSV için $7.40 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ ve SWSV için $7.70 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ olarak verilmiştir. Doksazosin tabletlerinden ve insan idrarından geri kazanım çalışmaları, geliştirilen yöntemlerden yalnızca modifiyeli elektrot kullanılarak DPSV yöntemi için yapılmış ve geri

kazanımlar, tablette %99.50 (%RSD=2.7) ve idrarda %96.7 (%RSD=5.3) olarak bulunmuştur (197).

Altiokka'nın yaptığı çalışmada, sabit ve dönen platin elektrotlar ile DPV yöntemi kullanılarak doksazosinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, elektrodun dönme hızı 500 rpm olarak seçilmiş ve reaksiyon difüzyon kontrollü olarak belirlenmiştir. Deneyler, %10 (v/v) etanol içerisindeki 0.2 M KCl ile 0.2 M tampon çözeltiden oluşan destek elektrolit ortamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada pH'nın pik akımı ve pik potansiyeli üzerindeki etkisi araştırılmış ve en simetrik piklerin dönen koşullarda 0.5 M H₂SO₄ kullanılarak elde edildiği belirlenmiştir. Dönen platin elektrot ile teşhis sınırı 15 µM olarak hesaplanmıştır. Doksazosinin tabletlerden tayini, yalnızca dönen elektrot sistemi koşullarında gerçekleştirilmiş ve istatistiksel değerlendirmelere bağlı olarak kabul edilebilir sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (198).

Literatürde amlodipinin analizine dair, spektrofotometri (199–201), sıvı kromatografisi (202–204) ve gaz kromatografisi (205, 206) yöntemleri ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Literatür incelemesinde ayrıca farmasötik preparatlarda ve biyolojik matrislerde etken madde olarak yalnızca amlodipinin analiz edildiği yirmi sekiz adet voltametrik çalışmaya rastlanmıştır. Amlodipinin farklı etken maddeler ile eş zamanlı analizine dair çalışmalar da bulunmaktadır (188–212). Ancak bu tez, hazırlanan modifiye elektrotlarla yeni yöntem geliştirilmesi ve seçilen her bir madde için ayrı ayrı uygulanabilirliğinin araştırılması kapsamında olduğu için literatür sonuçları eş zamanlı analiz çalışmaları hariç tutularak aşağıda açıklanmıştır.

Prasanna ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, poli(kafeik asit-L-arjinin)-MoS₂ nanokompozit modifiyeli GCE ile DPV yöntemi kullanılarak amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, reaksiyon tersinmez ve difüzyon kontrollü olarak belirlenmiştir. Destek elektrolit olarak 0.1 M fosfat tamponu (FT) (pH 7.0) kullanılmıştır. Anodik yönde yapılan analizde pik potansiyeli 0.8 V'de elde edilmiştir. İki doğrusal aralık 0.010 – 16.82 µM ve 16.82 – 433.3 µM olarak ve teşhis sınırı ise 3.6×10^{-3} µM olarak bulunmuştur. Doksazosinin insan serum ve idrar örneklerinden geri kazanım çalışmaları modifiye elektrot kullanılarak DPV yöntemi ile üçer farklı konsantrasyon için yapılmış ve geri kazanımlar serumda %94.80, %98.20 ve %96.74 ve idrarda %96.30, %97.10 ve %95.21 olarak bulunmuştur (213).

Fard ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TiO_2 nanopartikül-Au nanopartikül-kitosan nanokompozit modifiyeli kalem grafit elektrot ile DPV yöntemi kullanılarak amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tersinmez ve difüzyon kontrollü olarak belirlenmiştir. DPV ile yapılan kantitatif analiz çalışmasında destek elektrolit olarak 0.1 M NaCl içeren 0.5 M AT (pH 4.0) kullanılmıştır. Anodik yönde yapılan analizde pik potansiyeli 0.8 V civarında elde edilmiştir. Doğrusal aralık 0.04 – 2.8 μM ve teşhis sınırı $1.5 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. DPV yöntemi ile üçer farklı konsantrasyon için yapılan doğruluk çalışmasında geri kazanımlar; tabletten %96.67, %98.87 ve %102.30, serumdan %105.0, %97.50 ve %103.30 ve idrardan %95.00, %107.50 ve %100.30 olarak bulunmuştur (214).

Akbari Javar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Pt katkılı NiCo_2O_4 nanokompozit modifiyeli ekran baskılı elektrot kullanılarak DPV yöntemi ile amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. Elektrot reaksiyonu tersinmez ve difüzyon kontrollü olarak belirlenmiştir. Destek elektrolit olarak 0.1 M FT (pH 7.0) seçilerek anodik yönde yapılan analizde amlodipinin pik potansiyeli 0.65 V olarak belirlenmiştir. Doğrusal aralık 0.07 – 350 μM ve teşhis sınırı $9 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. DPV yöntemi ile üçer farklı konsantrasyon için yapılan doğruluk çalışmasında geri kazanımlar tabletten %103.0 (%RSD=2.7), %97.3 (%RSD=2.1) ve %97.7 (%RSD=2.4); serumdan %97.0 (%RSD=2.6), %102.0 (%RSD=2.2) ve %97.6 (%RSD=1.9); idrardan %104.0 (%RSD=2.9), %103.0 (%RSD=2.1) ve %98.6 (%RSD=2.2) olarak bulunmuştur (215).

Sudha ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, gümüş-seryum tungstatla kaplanmış karbon nanofiber ($\text{Ag-Ce}_2(\text{WO}_4)_3@\text{CNF}$) modifiyeli GCE ile DPV yöntemi kullanılarak amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. Destek elektrolit olarak 0.05 M FT (pH 7.0) kullanılmıştır. Reaksiyon tersinmez ve difüzyon kontrollü olarak belirlenmiştir. Doğrusal aralık 0.01 – 130 μM ve teşhis sınırı $7.12 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. DPV yöntemi ile üçer farklı konsantrasyon için yapılan doğruluk çalışmasında geri kazanımlar; tabletten %95.8 (%RSD=2.61), %96.92 (%RSD=3.12) ve %97.34 (%RSD=2.16) ve idrardan %96.4 (%RSD=2.96), %95.24 (%RSD=2.35) ve %95.9 (%RSD=2.81) olarak bulunmuştur (216).

Firouzi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, CuO-NiO nanokompoziti ve 1-bütül-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat modifiyeli karbon pasta elektrot (CuO-NiO/IL/CPE) ile DPV yöntemi kullanılarak amlodipin analiz edilmiştir. Anodik yönde yapılan çalışmada sistem difüzyon kontrollü olarak belirtilmiştir. DPV piki 0.5 V civarında gözlenmiştir. DPV ile yapılan kalibrasyon çalışmasında doğrusal aralık $6.0 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ teşhis sınırı ile

0.1 – 100 μM olarak bulunmuştur. Amlodipinin iki farklı ticari formundan ve serum ve idrar örneklerinden farklı konsantrasyonlar için yapılan doğruluk çalışmalarında, geri kazanımlar tablet formları için %99.2 – 101.2, serum için %97.2 – 102.6 ve idrar için %97.6 – 98.6 arasında değişmiş olup, %RSD değerleri 0.4 – 1.7 arasında bulunmuştur (217).

Ahmed Khand ve arkadaşları, nikel oksit nanoyapı modifiyeli GCE ile CV yöntemini kullanarak amlodipinin kantitatif analizini gerçekleştirmiştir. Anodik yöndeki reaksiyon difüzyon kontrollü olarak belirtilmiş ve 0.1 M FT (pH 10.0) ortamında CV yöntemi ile yapılan kalibrasyon çalışmasında doğrusal aralık 0.02 – 0.09 μM ve teşhis sınırı 2.1×10^{-3} μM olarak bildirilmiştir. Geliştirilen sensör birçok yaygın ilaç ve yaygın kimyasal tür üzerinde dikkate değer bir seçicilik göstermiş olup, önerilen nikel oksit malzemesinin ticari tabletlerden amlodipinin tespiti için başarıyla kullanıldığı beyan edilmiştir (218).

Arvand ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, altın nanoçubuk-grafen oksit-fonksiyonlanmış karbon nanotüp nanokompozit modifiyeli GCE kullanılarak amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. Elektrot reaksiyonu tersinmez ve adsorpsiyon kontrollü olarak belirtilmiş ve biriktirme süresi 480 s tutularak amlodipin anodik yönde DPV yöntemi ile analiz edilmiştir. Destek elektrolit olarak 0.1 M FT (pH 4.8) kullanılarak 0.01 – 1.0 ve 1.0 – 75.0 μM şeklinde iki farklı doğrusal aralık ve 3×10^{-3} μM teşhis sınırı bildirilmiştir. Tablette, kan serumu ve kan plazması örneklerinde yapılan geri kazanım çalışmasında; tablet formu için geri kazanım %99.2 (%RSD=1.3), serum örneklerinin üç farklı konsantrasyonu için geri kazanımlar %98.6 (%RSD=1.3), %101.2 (%RSD=1.0), %98.4 (%RSD=1.2) ve plazma örneklerinin üç farklı konsantrasyonu için geri kazanımlar %101.8 (%RSD=1.6), %98.2 (%RSD=1.8), %100.5 (%RSD=1.5) olarak belirtilmiştir (219).

Lou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, NiMoO₄/kitosan nanokompozit modifiyeli GCE ile DPV yöntemi kullanılarak kantitatif analiz çalışması yapılmıştır. 0.05 M FT (pH 7.0) ortamında CV yöntemi ile alınan voltamogramda anodik pik 0.78 V'de elde edilmiştir. Reaksiyon tersinmez ve difüzyon kontrollüdür. DPV ile yapılan kalibrasyon çalışmasında doğrusal aralık 0.05 – 373.6 μM ve teşhis sınırı 4.62×10^{-3} μM olarak saptanmıştır. Tablet ve idrar örneklerinden üçer farklı konsantrasyon için yapılan doğruluk çalışmasında geri kazanımlar tablette %93.6 (%RSD=3.28), %96.76 (%RSD=3.62), %96.74 (%RSD=2.94) ve idrarda %95.2 (%RSD=3.16), %94.44 (%RSD=2.68), %94.22 (%RSD=3.49) olarak bildirilmiştir (220).

Naikoo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, fonksiyonlanmış-MWCNT/bakır nanopartikül modifiyeli karbon pasta elektrot üzerine gümüş nanopartikül film kaplanarak elde edilen modifiye elektrot (AgNPs/fMWCNT/Cu NP-CPE) ile SWSV yöntemi kullanılarak amlodipinin tayini gerçekleştirilmiştir. Elektrot reaksiyonu tersinmez ve adsorpsiyon kontrollüdür. CV yöntemi ile alınan voltamogramda anodik pik 0.05 M BRT (pH 10.5) içerisinde 0.52 V'de gözlenmiştir. SWSV ile yapılan kalibrasyon çalışmasında doğrusal aralık $2.0 \times 10^{-2} - 6.3 \mu\text{M}$ ve teşhis sınırı $5.16 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ olarak saptanmıştır. İki farklı ticari tablet formundan, serumdan, plazmadan ve idrar örneklerinden farklı konsantrasyonlar için yapılan doğruluk çalışmasında, geri kazanımlar %99.00 – 100.75 aralığında elde edilmiştir (221).

Mohammadi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, çekirdek-kabuk yapılı manyetik mangan ferrit nanopartikül modifiyeli ekran baskılı karbon elektrot (MCSNP/SPCE) ile DPV yöntemi kullanılarak amlodipinin tayini gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon difüzyon kontrollü olarak belirlenmiştir. CV yöntemi ve 0.1 M FT (pH 7.0) ortamında alınan voltamogramlarda, yalın elektrot ve modifiye edilmiş elektrot üzerinde sırasıyla 725 mV ve 600 mV potansiyellerde tek bir tersinmez yükseltgenme piki gözlenmiştir. DPV ile modifiye elektrotta elde edilen doğrusal aralık 0.5 – 400 μM ve teşhis sınırı $1.0 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Amlodipin tabletlerinden ve idrar örneklerinden yapılan doğruluk çalışmasında, geri kazanım değerleri farklı üçer konsantrasyon için farmasötik preparatlardan %101.0 (%RSD=2.5), %98.8 (%RSD=2.7), %102.3 (%RSD=3.2) ve idrardan %103.5 (%RSD=2.4), %97.7 (%RSD=2.5), %102.3 (%RSD=2.5) olarak elde edilmiştir (222).

Parsa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, indiyum(III) karışık ligand nanokompleks ile modifiye edilmiş grafit ekran baskılı elektrot (In(III) nanocomplex/SPE) kullanılarak 0.1 M FT (pH 7.0) içerisinde amlodipinin tayini gerçekleştirilmiştir. Amlodipinin modifiye elektrot ile yükseltgenmesi difüzyon kontrollüdür. DPV yöntemi ile yapılan kantitatif analiz çalışmasında doğrusal aralık 1.0 – 500.0 μM ve teşhis sınırı $2.0 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ olarak saptanmıştır. Amlodipin tabletlerinden ve idrar örneklerinden dörder farklı konsantrasyon ile yapılan geri kazanım çalışmalarında %RSD değerleri tabletlerden %99.2 – 102.1 ve idrar örneklerinden %98.0 – 102.5 aralığında elde edilmiştir (223).

Djaalab ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Candida rugosa*-polianilin@demir oksit/jelatin biyokompozit film modifiyeli platin (CRL-PANI@Fe₂O₃/Ge-Pt) elektrot ile CV

yöntemi kullanılarak amlodipinin elektrokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Amlodipinin katodik davranışı, 5 mM FT (pH 7.4) içerisinde -0.185 V'de görülen tersinmez indirgenme sinyali üzerinden ölçülmüştür. Sistem difüzyon kontrollüdür. Modifiye elektrot ve CV yöntemi kullanılarak doğrusal aralık 10^{-6} – 10 μ M ve teşhis sınırı 1.0×10^{-6} μ M olarak bulunmuştur (224).

Arvand ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, CeO_2 -Au nanofiberler ve grafen oksit nanolevhalar ile modifiye edilmiş GCE (CeO_2 -AuNFs/GO/GCE) ile DPV yöntemi kullanılarak amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. Difüzyon kontrollü ve tersinmez bir anodik reaksiyon söz konusudur. 0.1 M FT (pH 5.0) ortamında alınan DPV voltamogramlarında pik potansiyeli 0.85 V civarında elde edilmiştir. Doğrusal aralık 0.01 – 1000 μ M ve teşhis sınırı 2.0×10^{-3} μ M olarak bildirilmiştir. Önerilen sensör, insan kan serumu, plazma ve farmasötik örneklerde amlodipinin tayini için başarıyla uygulanmış ve farmasötik preparatlar için %98 ve serum ve plazma örneklerinin üçer farklı konsantrasyon için %92.2 – 101.46 aralığında bulunan geri kazanımlar 0.41 – 3.03 %RSD değerleri ile elde edilmiştir (225).

Hrichi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, amlodipin tayini için moleküler olarak baskılanmış poli(anilin-ko-antranilik asit) esaslı yeni bir voltametrik sensör geliştirilmiştir. Sensör (MIP/GCE), GCE üzerine amlodipin molekülleri ve perklorik asit varlığında anilin ve antranilik asidin elektrokopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Yükseltgenme reaksiyonu difüzyon kontrollü olarak belirlenmiş ve destek elektrolit olarak 0.2 M FT (pH 5.0) seçilmiştir. DPV yöntemi ile yapılan kalibrasyon çalışmasında pik potansiyeli 0.7 V civarında gözlenmiştir. Amlodipin için 0.01 – 0.08 nM ve 0.3 – 8.0 nM olarak iki ayrı doğrusal aralık, 2.66×10^{-6} μ M teşhis sınırı ile elde edilmiştir. Önerilen sensör, amlodipinin farmasötik preparatlarda, insan idrarında, insan serumunda ve plazmasında tespiti için başarıyla uygulanmıştır. Üç farklı ticari tablet formunun farklı konsantrasyonları için yapılan çalışmalarda geri kazanımlar %97.30 – 99.25 arasında ve %0.64 – 2.23 RSD oranları ile elde edilmiştir. İnsan serum, plazma ve idrar örneklerinde ise geri kazanımlar sırasıyla %99.0 (%RSD=1.25), %99.0 (%RSD=0.92), %98.0 (%RSD=0.65) olarak bildirilmiştir (226).

Mohammadizadeh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ZrO_2 nanopartiküllerle modifiye edilmiş GCE ile DPV yöntemi kullanılarak amlodipinin tayini gerçekleştirilmiştir. 0.1 M FT (pH 7.0) içerisinde alınan CV voltamogramlarından reaksiyon difüzyon kontrollü

olarak belirlenmiştir. DPV ile anodik yönde yapılan taramada 0.8 V civarında yükseltgenme piki gözlenmiştir. Doğrusal aralık 10.0 – 200.0 μM ve teşhis sınırı 2.0 μM olarak belirlenmiştir. Hazırlanan modifiye elektrot, tabletlerden ve idrar örneklerinden amlodipinin tayini için başarılı bir şekilde uygulanmış ve %97.5 – 102.9 aralığında geri kazanım değerleri %1.8 – 3.1 RSD oranları ile elde edilmiştir (227).

Jadon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bir kalem grafit elektrot ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak amlodipin tayini için tekrarlanabilir ve duyarlı bir voltametrik prosedür geliştirilmiştir. BRT (pH 8.5) destek elektrolit içerisinde amlodipine ait CV piki 0.75 V'de elde edilmiştir. Yükseltgenme reaksiyonu tersinmez ve difüzyon kontrollüdür. Doğrusal aralıklar DPV için 2.1 – 89.6 nM ve SWV için 0.8 – 52.2 nM ve teşhis sınırları DPV için 6.0×10^{-8} μM ve SWV için 2.0×10^{-8} μM olarak bulunmuştur. Amlodipin, farklı markalardaki dozaj formlarından %99.9 ve insan serumundan %99.2 – 99.5 aralığındaki geri kazanımlar ile elde edilmiştir (228).

Fathirad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yeni bir iletken polimerik iyonik sıvı (IL)- Fe_3O_4 nanokompozit (PIL- Fe_3O_4) modifiyeli GCE ile DPV kullanılarak amlodipinin kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir. 0.1 M FT (pH 7.0) içerisinde amlodipinin yükseltgenme reaksiyonu difüzyon kontrollü olarak belirlenmiştir. DPV ile doğrusal aralık 0.001 – 0.5 μM ve teşhis sınırı 3.6×10^{-4} μM olarak bulunmuştur. Modifiye elektrot, farmasötik ve biyolojik örneklerde amlodipin tayini için kullanılmış ve tablette %98.2 ve insan serum ve idrar örneklerinde %95.1 – 104.6 aralığında geri kazanımlar elde edilmiştir (229).

Khairy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yalın ve DNA modifiyeli ekran baskılı elektrotlar ile DPV yöntemi kullanılarak amlodipinin tayini gerçekleştirilmiştir. Yükseltgenme reaksiyonu tersinmez ve difüzyon kontrollüdür. 0.05 M BRT (pH 9.0) ortamında alınan DPV voltamogramlarından doğrusal aralıklar, yalın elektrot ile 0.066 – 1.0 μM ve modifiye elektrot ile 0.066 – 2.0 μM olarak ve sırasıyla 2.07×10^{-2} μM ve 1.49×10^{-2} μM teşhis sınırları ile elde edilmiştir. Modifiye elektrot ile tabletlerden ve insan idrar örneklerinden farklı konsantrasyonlar için yapılan doğruluk çalışmasında tablet için geri kazanım değerleri %102.5 – 104.3 arasında ve idrar örnekleri için %81.25 – 92.09 arasında elde edilmiştir (230).

Erden ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TiO_2 modifiyeli karbon pasta elektrot (TiO_2 -CPE) ile SWSV yöntemi kullanılarak amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. Amlodipinin TiO_2 -CPE ile tersinmez yükseltgenme sürecinin, difüzyon etkisi altında

adsorpsiyon davranışı gösterdiği bildirilmiştir. SWSV ile alınan voltamogramlarda pik potansiyeli 0.8 V'de gözlenmiştir. Optimum sıyırma parametreleri olarak 562.30 mV biriktirme potansiyeli ve 64.30 s biriktirme süresi seçilerek, 0.04 M BRT (pH 5.69) içerisinde yapılan kantitatif analiz çalışmasında doğrusal aralık 0.01 – 1.0 μM ve teşhis sınırı 2.97×10^{-3} μM olarak saptanmıştır. Optimize edilmiş deneysel koşullar altında, önerilen yöntem ticari tabletlerdeki amlodipinin analizi için %101.00 geri kazanım değeri ile başarıyla uygulanmıştır (231).

Amiri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hidrofilik karbon nanopartiküllerin (Emperor 2000TM) GCE yüzeyine modifikasyonu ile CNPs/GCE çalışma elektrodu hazırlanmıştır. 0.1 M FT (pH 7.0) ortamında alınan CV voltamogramlarında reaksiyon adsorpsiyon kontrollü olarak bulunmuştur. DPV yöntemi ile yapılan kantitatif analiz çalışması, modifiye edilmiş elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki amlodipin çözeltisine 15 dakika batırılması, ardından yıkanması ve FT (pH 7.0) çözeltisine transfer edilmesi yoluyla elde edilmiştir. Amlodipine ait yükseltgenme piklerinden, 1000 – 10.0 μM ve 10.0 – 0.01 μM olarak iki ayrı doğrusal aralık elde edilmiştir. Teşhis sınırı 1.0×10^{-3} μM olarak hesaplanmıştır. Ticari tabletlerden ve insan serumundan yapılan gerçek örneklerden analiz çalışmasında, geri kazanımlar tabletten %95.0 ve serumdan %97.1 olarak bildirilmiştir (232).

Švorc ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, amlodipinin analizi bor katkılı elmas elektrot ile DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. CV çalışmalarında, BRT (pH 5.0) içerisinde 0.75 V'de yükseltgenme piki gözlenmiştir. Reaksiyon difüzyon kontrollü bir süreçtir. Amlodipine ait 0.2 – 6.0 μM ve 6.0 – 38 μM olarak iki ayrı doğrusal aralık, 7.0×10^{-2} μM teşhis sınırı ile bulunmuştur. Önerilen yöntem farmasötik tabletlerdeki toplam amlodipin içeriğinin geri kazanımlarla (%101.3 – 104.1) ve ayrıca, geliştirilen prosedürün biyolojik uygunluğu, insan idrar örneklerinden geri kazanımlarla (%94.1 ve %105.7) gösterilmiştir (233).

Emami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, poli-L-metiyonin-altın nanoparçacıklar/MWCNT modifiyeli GCE (PLM–GNP/MWCNT/GCE) kullanılarak DPV yöntemiyle amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. Modifiye elektrot ile 0.1 M FT (pH 7.12) ortamında CV ile alınan voltamogramlarda yükseltgenme piki 0.55 V'de gözlenmiştir. Reaksiyon tersinmez ve adsorpsiyon kontrollüdür. Doğrusal aralık 0.005 – 2.5 μM ve teşhis

sınırı $1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ olarak elde edilmiştir. Geri kazanımlar farmasötik dozaj formlarından %96.0 ve plazma örneklerinden %98 olarak bulunmuştur (234).

Sikkander ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bazı kalsiyum kanal blokörü etken maddeler MWCNT modifiyeli GCE ile DPSV yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. CV yöntemi ile yapılan taramada 0.5 V civarında amlodipine ait tersinmez yükseltgenme piki gözlenmiştir. Elektrot reaksiyonu adsorpsiyon kontrollü olarak belirlenmiş ve biriktirme potansiyeli 0.3 V ve biriktirme süresi 15 s olarak seçilmiştir. Amlodipinin pH 13.0 ortamında ve optimum biriktirme koşulları ile yapılan kantitatif analiz çalışmasında, doğrusal aralık $1.8 \times 10^{-2} - 0.53 \mu\text{M}$ ve teşhis sınırı $8.8 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar umut verici olup geliştirilen yöntemin farmasötik formülasyonlarda amlodipinin tayini için duyarlı ve kullanışlı olduğu beyan edilmiştir (235).

Stoiljković ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MWCNT modifiyeli altın elektrot ile SWSV yöntemi kullanılarak amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. 0.1 V biriktirme potansiyeli, 220 s biriktirme süresi ve FT pH 11.0 destek elektrolit koşullarında alınan SWSV voltamogramlarında 0.63 V'de yükseltgenme piki gözlenmiştir. Doğrusal aralık 24 – 34 μM ve teşhis sınırı 4.2 μM olarak bildirilmiştir (236).

Goyal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, SWCNT ve MWCNT modifiyeli kenar düzlem pirolitik grafit elektrotlar (SWCNT/EPPGE ve MWCNT/EPPGE) ile SWV yöntemi kullanılarak 1.0 M FT (pH 7.2) içerisinde amlodipinin analizi gerçekleştirilmiştir. CV yönteminde SWCNT/EPPGE ile 0.524 V'de ve MWCNT/EPPGE ile 0.605 V'de tersinmez yükseltgenme pikleri elde edilmiştir. Ayrıca CV yöntemiyle iki elektrodun karşılaştırılması amacıyla aynı amlodipin konsantrasyonu için alınan ölçümlerde SWCNT/EPPGE'de elde edilen pik akım değerinin MWCNT/EPPGE'de elde edilenden büyük olduğu belirlenmiş ve bu sonuca dayanarak, SWCNT/EPPGE'nin daha iyi bir sensör olarak hizmet ettiği belirtilmiştir. SWCNT/EPPGE ile kalibrasyon çalışmasında doğrusal aralık 0.005 – 1.0 μM ve teşhis sınırı $1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Önerilen yöntem, farmasötik preparatlardaki ve amlodipin tedavisi gören anjina hastalarının idrar örneklerindeki amlodipin içeriğini belirlemek için başarıyla kullanılmıştır (237).

Kazemipour ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, amlodipinin tayini karbon pasta elektrot ile SWSV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. CV çalışmaları, amlodipinin elektrot yüzeyindeki tersinmez yükseltgenme reaksiyonunun, adsorpsiyon kontrollü bir süreç olduğunu göstermiştir. SWSV ile kantitatif analiz çalışmaları, FT (pH 11.0) içerisinde,

0.1 V biriktirme potansiyeli ve 220 s biriktirme süresi koşullarında yapılmıştır. Doğrusal aralık $9.9 \times 10^{-3} - 1.4 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ ve teşhis sınırı $2 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Bu yöntem bazı ticari ürünlerdeki amlodipin içeriğinin analizi için başarıyla uygulanmıştır (238).

Gazy'nin yaptığı çalışmada, amlodipinin tayini GCE ile SWSV yöntemi kullanılarak 0.04 M BRT (pH 11.0) içerisinde gerçekleştirilmiştir. CV sonuçları, amlodipinin tersinmez yükseltgenme sürecinin adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermiştir. SWSV ile yükseltgenme piki 0 V biriktirme potansiyeli ve 180 s biriktirme süresi koşullarında 0.51 V'de gözlenmiştir. Doğrusal aralık 0.04 – 2.0 μM ve teşhis sınırı $1.4 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir. Yöntem, tabletlerde amlodipinin analizi için başarıyla uygulanmıştır. Yöntemin serum ve idrar örneklerinde ilacın analizi için uygulanabilirliği, sırasıyla, %96.98 ve %96.31 ortalama geri kazanımlar ile gösterilmiştir (239).

Altıokka ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, amlodipinin tayini %10 metanol, 0.2 M KCl ve 0.1 M AT (pH 5.5) içeren destek elektrolit ortamında sabit GCE ve dönen GCE ile DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dönen koşullar için 200 – 1000 rpm aralığında ve sabit koşullar için 2 – 40 mV s^{-1} aralığında 70.53 μM konsantrasyona kadar sistem difüzyon kontrollüdür. Sistemin, amlodipin konsantrasyonunun 70.53 μM 'dan yüksek olduğu durumlarda difüzyon kontrollü bir karakterden adsorpsiyon kontrollü bir karaktere doğru yavaşça geçtiği bildirilmiştir. Amlodipinin dönen GCE ile DPV analizinde dönme hızı 500 rpm olarak uygulanmıştır. Teşhis sınırları sabit GCE ile 12.7 μM ve dönen GCE ile 7.1 μM olarak bulunmuştur. Önerilen yöntem, amlodipin içeren tabletlere uygulanmış ve kabul edilebilir sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (240).

Literatürde bisoprololün analizine dair, spektrofotometri (241, 242), sıvı kromatografisi (243–245) ve gaz kromatografisi (246) yöntemleri ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, bisoprololün farklı etken maddeler ile eş zamanlı analizine dair elektrokimyasal çalışmalar bulunmaktadır (247, 248). Literatür incelemesinde, etken madde olarak yalnızca bisoprololün analiz edildiği dört adet voltametrik çalışmaya rastlanmış ve aşağıda bu analiz çalışmaları açıklanmıştır.

Koçak ve İpek'in yaptığı çalışmada, nasyon-titanyum dioksit-grafen modifiyeli GCE (n-TiO₂-GR/GCE) ile DPV ve SWV yöntemleri kullanılarak bisoprololün analizi gerçekleştirilmiştir. pH 7.0 içerisindeki bisoprolol çözeltisinden alınan SWV voltamogramında pik potansiyeli 1.3 V'de gözlenmiştir. SWV ile yapılan kalibrasyon çalışmasında, doğrusal aralık 0.3 – 50 μM ve teşhis sınırı $1.98 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur.

Ayrıca yöntem, tabletlerden bisoprololün tayini için başarıyla uygulanmış ve geri kazanım oranı %98.65 olarak belirlenmiştir (249).

Zil'berg ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, poli(arilen ftalit) modifiyeli GCE ile SWV yöntemi kullanılarak bisoprololün analizi gerçekleştirilmiştir. 0.1 M H₂SO₄ destek elektrolit ortamında alınan CV voltamogramlarında bisoprololün tersinmez yükseltgenme piki 1.56 V'de gözlenmiştir. Reaksiyon difüzyon kontrollüdür. Doğrusal aralık 1 – 10 µM ve teşhis sınırı $(3.5-9.8) \times 10^{-2}$ µM olarak bulunmuştur. Yöntemin, bisoprololün ticari ürünlerdeki içeriğinin analizi için başarıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (250).

Nigović ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bisoprololün analizi nafyon kaplanmış GCE (NGCE) ile SWSV kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modifiye elektrot ile 0.1 M H₂SO₄ içerisinde alınan CV voltamogramlarında 1.27 ve 1.63 V'de iki iyi tanımlı tersinmez yükseltgenme piki gözlenmiştir. Sistem adsorpsiyon kontrollü olarak bulunmuştur. Biriktirme potansiyeli olarak 0.6 V ve biriktirme süresi olarak 120 s seçilmiştir. CV taramasında 1.63 V'de elde edilen pik akımı 1.27 V'de elde edilenden 1.6 kat fazla olduğu için SWSV ile yapılan kantitatif analiz çalışmasında 1.63 V'deki pik dikkate alınmıştır. Doğrusal aralık 0.05 – 0.5 µM ve teşhis sınırı 1.03×10^{-2} µM olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem, tabletlerden ve idrar örneklerinden bisoprololün tayini için başarılı bir şekilde uygulanmış ve iki farklı ticari isimdeki tabletlerden geri kazanım oranı %98.5 ve %99.4 olarak %1.32 ve %1.57 RSD oranı ile ve idrar örneklerinden %95.9 geri kazanım %2.6 RSD ile elde edilmiştir (251).

Goyal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bisoprololün tayini SWCNT modifiyeli GCE ile DPV yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. 0.5 M FT (pH 7.2) içerisinde alınan DPV voltamogramında 0.95 V civarında keskin bir anodik pik elde edilmiştir. Doğrusal aralık 10 – 100 µM ve teşhis sınırı 8.27×10^{-1} µM olarak bulunmuştur. Önerilen yöntemin, ticari tabletlerden ve idrar örneklerinden bisoprololün tespiti için başarıyla uygulandığı bildirilmiştir (252).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve marka/model bilgileri aşağıda verilmiştir.

- Potansiyostat cihazı (Metrohm Autolab/PGSTAT128N, Nova 1.19 yazılım)
- Saf su/Ultra saf su cihazı (Santorius/Arium 61316/Arium proUV)
- pH metre (Hanna/HI2211)
- Analitik terazi (Ohaus/PA214C)
- Ultrasonik banyo (Soltec/Sonica 3300MH)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph/MR Hei)
- Karıştırıcı, vortex (Heidolph/Reax top)
- Buzdolabı (Profilo/BD2046W2NN)
- Otomatik mikropipetler, 0.5-10, 20-200, 100-1000 μ L ve 0.5-5 mL (Isolab, Socorex ve Eppendorf)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma/3-30K)

3.2. Gereçler

- Balon jojeler (10 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL)
- Deney tüpü (10 mL)
- Eppendorf tüpü (1.5 mL)
- Voltametrik cam hücre (45 mL)
- Cam pipetler (2, 5 ve 10 mL)
- Beherler
- Porselen havan ve havaneli
- Pipet uçları
- Silindirik manyetik balık (10×6 mm)
- BASi marka elektrot yüzeyi parlatma/cilalama pedleri

3.3. Elektrotlar

Tez çalışmasında kullanılan elektrotlara ait marka/model bilgileri aşağıda verilmiştir.

- Çalışma elektrodu: Camsı karbon elektrot (GCE, BASi, MF-2012, çap: 3.0 mm, yüzey alanı: 7.069 mm²) ve modifiye edilmiş camsı karbon elektrot
- Referans elektrot: Ag/AgCl (3 M NaCl) elektrot (BASi, MF-2052)
- Yardımcı elektrot: Platin tel elektrot (BASi, MW-1032)

3.4. Kimyasal Maddeler

3.4.1. Etken Maddeler ve Diğer Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan etken maddeler, müstahzarları, temin edildiği firmalar ve farmasötik dozaj formlarına dair bilgiler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan ilaç etken maddelerin farmasötik dozaj formları ve birim doz içerikleri

Etken madde	Üretici firma	Müstahzar	Farmasötik dozaj formu	Farmasötik dozaj formun içerdiği etken madde miktarı
Doksazosin mesilat	Pfizer İlaçları Ltd. Şti.	Cardura®	Tablet	4.850 mg/tablet
Amlodipin besilat	Pfizer İlaçları Ltd. Şti.	Norvasc®	Tablet	13.888 mg/tablet
Bisoprolol fumarat	Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş.	Concor®	Tablet	5.000 mg/tablet

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıktaydı ve herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmaksızın doğrudan kullanıldı. Maddelerin temin edildiği firmalar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar

Kimyasal adı	Firma adı
Alüminyum hidroksit, Al(OH) ₃	Merck
Amonyum klorür, NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich
Asetik asit, CH ₃ COOH	Merck
Asetonitril, CH ₃ CN	Sigma-Aldrich
Borik asit, H ₃ BO ₃	Sigma-Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat, Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
Etil alkol, C ₂ H ₅ OH	Merck
Fosforik asit, H ₃ PO ₄	Merck
Kalsiyum klorür dihidrat, CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma-Aldrich
Potasyum dihidrojen fosfat, KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür, KCl	Sigma-Aldrich
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat, NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Merck
Sodyum hidroksit, NaOH	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür, NaCl	Sigma-Aldrich
Sodyum sülfat, Na ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
Sülfürik asit, H ₂ SO ₄	Merck
Üre, CH ₄ N ₂ O	Sigma-Aldrich
Dimetil formamid, DMF	Sigma-Aldrich
Karboksilik asit grubu ile fonksiyonlanmış çok duvarlı karbon nanotüpler, MWCNT-COOH	Sigma-Aldrich
Naftol yeşili B, NGB	Sigma-Aldrich
İnsan serumu (erkek AB plazma)	Sigma-Aldrich

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

3.5.1. Etken Madde Çözeltileri

DM, AB ve BF stok çözeltileri 1.0×10^{-3} M konsantrasyonda hazırlandı. DM ve AB etken maddeleri için, gerekli standart madde miktarı tartılarak bir balon jojeye aktarıldı ve hacim ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. BF stok çözeltisi ise “destek elektrolit ve pH etkisi” çalışması için 25 mL hacimde ve diğer çalışmalar için 10 mL hacimde olacak şekilde ultra saf su ile hazırlandı. Çözünmenin tamamen sağlanabilmesi için stok çözeltiler 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Etken madde stok çözeltileri günlük olarak taze hazırlandı.

Çalışma çözeltileri, stok çözeltilerden belirlenen hacmin alınarak 10 mL'ye seyreltilmesi yoluyla hazırlandı. Seyreltme için tampon çözeltiler kullanıldı.

3.5.2. Destek Elektrolit Çözeltileri

0.2 M fosfat tamponu (FT) çözeltileri, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve Na_2HPO_4 tuzları kullanılarak 6.0, 7.0 ve 8.0 pH değerlerinde hazırlandı.

0.2 M asetat tamponu (AT) çözeltileri için CH_3COOH kullanılarak 1.0 L stok çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden, pH'sı 3.5, 4.5, 5.0 ve 5.5 olan tampon çözeltiler hazırlandı.

0.04 M Britton-Robinson tamponu (BRT) çözeltileri için H_3PO_4 , CH_3COOH ve H_3BO_3 kullanılarak 1.0 L stok çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden, 100 mL hacimlerde olacak şekilde pH'sı 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 olan tampon çözeltiler hazırlandı.

0.1 M BRT çözeltisi, H_3PO_4 , CH_3COOH ve H_3BO_3 kullanılarak 500 mL hacimde hazırlandı. Bu çözeltinin pH'sı 3.1 olarak ayarlandı.

Oda sıcaklığında hazırlanan tampon çözeltilerin istenen pH'ya ayarlanmasında 5.0 M NaOH çözeltisi kullanıldı. Tampon çözeltiler +4 °C'de buzdolabında saklandı ve kullanılacağı zaman buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi için beklendi.

3.5.3. Yapay İdrar Çözeltisi

Yapay idrar çözeltisi için 25.00 g $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, 1.00 g NH_4Cl , 1.08 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.40 g Na_2SO_4 , 1.60 g KCl, 1.40 g KH_2PO_4 ve 2.92 g NaCl tartılarak balon jojeye aktarıldı ve hacim ultra saf su ile 1.0 L'ye tamamlandı. Hazırlanan yapay idrar çözeltisinin pH'sı, 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl kullanılarak 6.0 olarak ayarlandı. Çözelti kullanılacağı zamana kadar karanlıkta bekletildi (253, 254).

3.5.4. Tablet Çözeltileri

DM içeren tablet stok çözeltisi için 10 adet Cardura® tablet 2.4182 g olarak tartıldı ve bir havanda toz haline getirildi. Bu tozdan 1.0×10^{-3} M DM'e eşdeğer miktarda tartılıp balon jodede ultra saf su ile 25 mL'ye tamamlandı ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletildi.

AB içeren tablet stok çözeltisi için 15 adet Norvasc® tablet 6.1268 g olarak tartıldı ve bir havanda toz haline getirildi. Bu tozdan 1.0×10^{-3} M AB'ye eşdeğer miktarda tartılıp balon jodede ultra saf su ile 25 mL'ye tamamlandı ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletildi.

BF içeren tablet stok çözeltisi için 10 adet Concor® tablet 1.7344 g olarak tartıldı ve bir havanda toz haline getirildi. Bu tozdan 1.0×10^{-3} M BF'ye eşdeğer miktarda tartılıp balon jojede ultra saf su ile 25 mL'ye tamamlandı ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletildi.

Tablet çözeltileri hazırlandıktan sonra 15 dk karanlıkta bekletildi. Çalışma çözeltileri hazırlanmadan önce, tablet çözeltileri tekrar 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi ve ardından 5 dk boyunca 5000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısımları alınarak balon jøjeye aktarıldı.

3.5.5. Biyolojik Sıvıların Çözeltileri

Serum ve idrar çalışmaları için saf DM, AB ve BF'nin 1.0×10^{-3} M'lık stok çözeltileri ultra saf su içerisinde hazırlandı.

Etken maddeli serum ve idrar ana stok çözeltileri konsantrasyonu 1.0×10^{-4} M olacak şekilde hazırlandı. Bunun için, saf serum veya idrar çözeltisinden 3.6 mL, asetonitril çözeltisinden 5.4 mL ve 1.0×10^{-3} M'lık etken madde stok çözeltisinden 1.0 mL alınarak bu üç çözelti 10 mL'lik bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve böylece etken madde konsantrasyonu 1.0×10^{-4} M olan serum ve idrar ana stok çözeltileri hazırlandı.

Destek (boş) serum ve idrar ana stok çözeltisi için ise; 0.9 mL saf serum veya idrar çözeltisi, 1.35 mL asetonitril çözeltisi ve 0.25 mL ultra saf su karıştırılarak 1.0×10^{-3} M'lık 2.5 mL çözelti elde edildi.

Etken maddeli serum ve idrar stok çözeltileri ve destek stok çözeltisi hazırlandıktan sonra vortex ile karıştırıldı ve 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Ardından 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısımları alınarak deney tüplerine aktarıldı.

3.5.6. Nanopartikül ve Monomer Çözeltileri

3.5.6.1. Karbon Nanotüp Süspansiyonu

1 mL dimetil formamid (DMF) çözeltisi içerisinde 1 mg karboksilik asit grubu ile fonksiyonlanmış çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT-COOH) süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon 2 saat süreyle ultrasonik banyoda bekletildi.

3.5.6.2. Monomer Çözeltisi

NGB monomer çözeltisi 0.1 M BRT (pH 3.1) içerisinde 5.0×10^{-4} M olarak hazırlandı.

3.6. Modifiye Elektrotların Hazırlanması

Camsı karbon elektrot yüzeyi modifikasyon işlemleri öncesinde temizlendi. Bu amaçla öncelikle, yüzey parlatma pedi üzerine az miktarda $\text{Al}(\text{OH})_3$ tozu dökülerek sekiz (8) çizildi. Ardından elektrot saf su ile yıkandı ve sırasıyla etanol ve saf su içerisinde 5 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Modifikasyon işlemi öncesinde elektroda pH 7.0 FT içerisinde CV ile 50 mV s^{-1} tarama hızında -0.5 ile +1.5 V arasında stabil bir voltammogram elde edilene kadar (20 döngü) ön işlem uygulandı. Elektrodun hazırlık aşamaları her bir modifikasyon işlemi öncesinde tekrarlandı.

3.6.1. MWCNT/GCE'nin Hazırlanması

GCE yüzeyi temizlendikten sonra 1 mg/mL olan MWCNT süspansiyonundan elektrot yüzeyine 1, 2, 4 ve $6 \mu\text{L}$ olarak farklı hacimlerde damlatıldı. $1 \mu\text{L}$ 'den fazla olan hacimler için her seferinde $1 \mu\text{L}$ damlatılarak DMF'nin yüzeyden uzaklaşması için beklendi ve sonrasında diğer damla eklendi. Hazırlanan çok duvarlı karbon nanotüp modifiyeli camsı karbon elektrot (MWCNT/GCE), kuruması için oda koşullarında 30 dk bekletildi ve ardından, pH 7.0 BRT içerisinde 15 döngülü voltamogram alınarak yüzeyi aktive edildi.

3.6.2. PNGB/GCE'nin Hazırlanması

Poli(NGB) filminin (PNGB) GCE yüzeyine polimerizasyonu literatürde bulunan çalışma kullanılarak yapıldı (155). Yalın GCE yüzeyi Bölüm 3.6.'da açıklanan şekilde temizlenip hazırlandıktan sonra, Bölüm 3.5.6.2.'te belirtilen monomer çözeltisi içerisinde -0.5 ile +1.2 V arasında 100 mV s^{-1} tarama hızında 15 döngülü voltamogram alınarak elektrot yüzeyinde Poli(NGB) filminin oluşması sağlandı. Polimerizasyon işlemi sonrasında elektrot oda sıcaklığında 24 saat kurumaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan poli(naftol yeşili B) modifiyeli camsı karbon elektrot (PNGB/GCE), kullanılmadan önce pH 7.0 BRT içerisinde 15 döngülü voltamogram alınarak aktive edildi.

3.6.3. MWCNT/PNGB/GCE'nin Hazırlanması

GCE yüzeyi Bölüm 3.6.2.'de açıklanan şekilde PNGB film ile kaplanıp aktive edildikten sonra, üzerine $2 \mu\text{L}$ MWCNT damlatıldı. Hazırlanan MWCNT/PNGB/GCE, kullanılmadan önce pH 7.0 BRT içerisinde 15 döngülü voltamogram alınarak aktive edildi.

3.6.4. PNGB/MWCNT/GCE'nin Hazırlanması

GCE yüzeyi temizlendikten sonra 2 μL MWCNT damlatılarak 30 dk oda koşullarında bekletildi ve pH 7.0 BRT içerisinde 15 döngülü voltamogram alınarak aktive edildi. Ardından, MWCNT/GCE yüzeyi Bölüm 3.6.2.'de açıklanan şekilde PNGB film ile kaplandı. Bu şekilde hazırlanan PNGB/MWCNT/GCE, kullanılmadan önce pH 7.0 BRT içerisinde 15 döngülü voltamogram alınarak aktive edildi.

3.7. Voltametrik Çalışmalar

3.7.1. Modifiye Elektrodun Seçilmesi

Etken maddelerin analiz çalışmalarında kullanılacak elektrodu belirlemek amacıyla optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bunun için, MWCNT süspansiyonundan farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılarak önce en iyi sonucun alındığı nanotüp miktarı belirlendi. 1, 2, 4 ve 6 μL MWCNT damlatılmış elektrotlarla alınan voltamogramlardan elde edilen piklerin şekline ve akım değerlerine bakıldı. Böylece en iyi sonucun alındığı MWCNT miktarı belirlendi ve sonrasında bu miktar sabit tutularak NGB ile kompozisyonuna bakıldı. Bu amaçla, PNGB/MWCNT/GCE ve MWCNT/PNGB/GCE hazırlandı. Bunun haricinde, yalnızca MWCNT modifiyeli GCE, yalnızca NGB modifiyeli GCE ve yalnızca GCE ile elde edilen voltamogramların pik akımı değerleri de okundu. Böylece beş farklı elektrot ile her bir etken madde için elde edilen sonuçlar değerlendirildi ve analiz çalışmalarında kullanılacak modifiye elektrotlar seçildi.

3.7.2. Destek Elektrolit ve pH Etkisi

CV, DPV ve SWV ile yapılan pH taraması çalışmalarında destek elektrolit olarak DM ve AB maddeleri için pH 5.0, 5.5 AT, pH 6.0, 7.0, 8.0 FT ve pH 5.0–9.0 BRT; BF maddesi için ise pH 3.5, 4.5 ve 5.5 AT, pH 6.0, 7.0, 8.0 FT ve pH 2.0–10.0 BRT kullanıldı. Çalışma çözeltileri 10 mL olarak hazırlandı ve üç elektrotlu elektrokimyasal hücreye aktararak voltamogramlar kaydedildi.

Potansiyel tarama aralıkları DM ve AB maddeleri için CV'de -0.2 ila +1.2 V, DPV ve SWV'de +0.2 ila +1.1 V olarak; BF maddesi için ise CV'de -0.2 ila +1.45 V, DPV ve SWV'de +0.2 ila +1.3 V olarak belirlendi. CV için tarama hızı 100 mV s⁻¹ olarak uygulandı. Yöntem parametreleri DPV için; 1 mV puls potansiyeli, 50 mV modülasyon genliği, 50 ms modülasyon zamanı ve 500 ms aralık zamanı olarak ve SWV için; 1 mV puls potansiyeli, 25 mV puls genliği ve 10 Hz frekans olarak uygulandı.

Modifiye elektrotların yüzey temizliği tampon çözelti içerisinde, DM ve AB maddeleri için -0.2 ile +1.2 V arasında; BF maddesi için ise -0.2 ile +1.45 V arasında üç döngülü CV ile yapıldı.

Her bir madde için yapılan pH taraması çalışmasından en simetrik ve en yüksek piklerin elde edildiği tampon çözelti belirlendi ve sonraki çalışmalar bu ortamda gerçekleştirildi.

3.7.3. Hız Taraması

Etken maddelerin elektrot yüzeyindeki yükseltgenme reaksiyonunun karakteri hız taraması çalışmaları ile değerlendirildi. Bunun için, pH taraması çalışmaları ile belirlenen tampon çözelti ortamlarında DM, AB ve BF çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 200 ile 5 mV s⁻¹ aralığındaki tarama hızlarında tek döngülü voltamogramlar alındı. Her bir tarama hızı için elde edilen piklerin akım değerleri okundu ve hem tarama hızına hem de tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirildi.

3.7.4. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu

DM ve AB etken maddelerinin kantitatif analiz çalışmaları için sıyırma parametrelerinin optimize edilmesi amacıyla, her bir madde için seçilen tampon çözelti ortamında çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerde DPSV ve SWSV için 60 s biriktirme süresi sabit tutularak biriktirme potansiyeli 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ve 1.2 V olarak değiştirildi ve pik akımı değeri en yüksek olan en simetrik DM ve AB piklerinin gözlemlendiği biriktirme potansiyelleri belirlendi. Ardından, her bir yöntem için biriktirme süresi optimize edildi. Bu amaçla, seçilen biriktirme potansiyelleri sabit tutuldu ve biriktirme süresi; DM için sırasıyla 15, 30, 60, 90, 120, 180, 200 ve 300 s olarak ve AB için 15, 30, 60, 90, 120, 180, 200, 300, 400 ve 450 olarak değiştirildi. Elde edilen voltamogramlar incelenerek her bir madde ve yöntem için pik akımı değeri en yüksek olan en simetrik pikin elde edildiği biriktirme süresi belirlendi. Son olarak, biriktirme süresinin kısaltılması amacıyla, karıştırma hızı 100, 250, 500 ve 750 rpm olarak değiştirildi. Elde edilen pikler değerlendirilerek en uygun karıştırma hızları belirlendi.

3.7.5. Kalibrasyon Çalışması

Kantitatif analiz çalışmalarında, DM ve AB etken maddeleri için DPSV ve SWSV yöntemleri; BF etken maddesi için ise DPV yöntemi kullanıldı. Potansiyel tarama aralıkları, DM için DPSV yönteminde +0.3 ila +1.1 V ve SWSV yönteminde +0.4 ila +1.2 V; AB için

DPSV ve SWSV yöntemlerinde +0.3 ila +1.1 V; BF için DPV yönteminde +0.4 ila +1.1 V olarak uygulandı. Elde edilen DM, AB ve BF pik akım değerleri ile kalibrasyon çalışması yapıldı.

Kalibrasyon çalışmalarının yüksek hassasiyette gerçekleştirilmesi amacıyla 1.0×10^{-3} M etken madde ana stok çözeltileri kullanılarak konsantrasyonları 1.0×10^{-4} , 1.0×10^{-5} , 1.0×10^{-6} ve 1.0×10^{-7} M olan ara stok çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla öncelikle, 1.0×10^{-3} M ana stok çözeltiden 1000 μ L alınıp hacmin ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile 1.0×10^{-4} M'lık ara stok çözelti hazırlandı. Daha sonra, 1.0×10^{-4} M'lık ara stoktan 1000 μ L alınıp hacmin ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile 1.0×10^{-5} M'lık ara stok çözelti; 1.0×10^{-5} M'lık ara stoktan 1000 μ L alınıp hacmin ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile 1.0×10^{-6} M'lık ara stok çözelti; 1.0×10^{-6} M'lık ara stoktan 1000 μ L alınıp hacmin ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile 1.0×10^{-7} M'lık ara stok çözelti hazırlandı. Ana ve ara stok çözeltilerin uygun miktarlarının, seçilen tampon çözeltilerle seyreltilmesi yoluyla çalışma çözeltileri hazırlandı. $6.0 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-8}$ M çalışma çözeltileri 1.0×10^{-7} M ara stok çözelti ile; $6.0 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-7}$ M çalışma çözeltileri 1.0×10^{-6} M ara stok çözelti ile; $6.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-6}$ M çalışma çözeltileri 1.0×10^{-5} M ara stok çözelti ile; $6.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5}$ M çalışma çözeltileri 1.0×10^{-4} M ara stok çözelti ile ve $6.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-4}$ M çalışma çözeltileri 1.0×10^{-3} M ana stok çözelti ile hazırlandı.

Kalibrasyon çalışması için, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan etken madde çözeltilerinin voltamogramları alındı. Bu voltamogramlardan okunan pik akımları konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi ve böylece doğrusallığın elde edildiği konsantrasyon aralıkları belirlendi. Ayrıca, kalibrasyon verileri kullanılarak Bölüm 2.12'de açıklandığı şekilde LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

3.7.6. Tekrar Edilebilirlik Çalışması

Geliştirilen yöntemlerin kesinliği, gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik olmak üzere iki şekilde değerlendirildi. Gün içi tekrar edilebilirlik çalışmaları için; belirlenen konsantrasyonlardaki etken madde çalışma çözeltilerinden, her yöntem için kendi içinde değerlendirilmek üzere, aynı gün içerisinde elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli verilerinden seçilen beş değer ortalama alınarak %RSD oranları hesaplandı. Günler arası tekrar edilebilirlik çalışması, bir hafta içerisinde farklı günlerde elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli verilerinden seçilen beş değer üzerinden yapıldı.

3.7.7. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin Çalışması

Farmasötik preparatlardan tayin deneylerinde, Bölüm 3.5.4'te açıklandığı şekilde tablet stok çözeltileri hazırlandı. Çalışma çözeltilerinin yüksek hassasiyette hazırlanabilmesi amacıyla, bu ana stok çözeltiler kullanılarak 10 mL hacimde ara stok çözeltiler hazırlandı. Ana veya ara stok çözeltiler ile hazırlanan farmasötik çalışma çözeltilerinden alınan voltamogramların pik akımı değerlerinin ortalamaları ve %RSD oranları beş değer üzerinden hesaplandı.

3.7.8. Geri Kazanım Çalışması

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğu geri kazanım çalışmaları ile değerlendirildi. Etken maddenin tablet formundan hazırlanan ilaç çözeltisine, saf etken maddenin stok çözeltiden bilinen miktarda ilave edildi ve tampon çözelti ile hacim 10 mL'ye tamamlanarak çalışma çözeltileri hazırlandı. Her bir yöntem için üçer adet çalışma çözeltisi hazırlandı. Elde edilen voltamogramların pik akımı değerlerinin ortalamaları ve %RSD oranları beş değer üzerinden hesaplandı. Geri kazanım değerleri, ortalama yüzde geri kazanım olarak verildi.

3.7.9. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması

Serum ve idrar örnekleri ile yapılan kalibrasyon çalışmalarında, saf etken maddeler için yapılan kalibrasyon çalışmalarında belirlenen doğrusal aralık verileri dikkate alınarak artan konsantrasyonda etken madde içeren serum ve idrar çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden DM ve AB için DPSV ve SWSV; BF için DPV yöntemleri kullanılarak ölçümler alındı. Konsantrasyona karşı okunan pik akımı değerleri grafiğe geçirilerek serum ve idrar çözeltileri için kalibrasyon grafikleri ve verileri elde edildi.

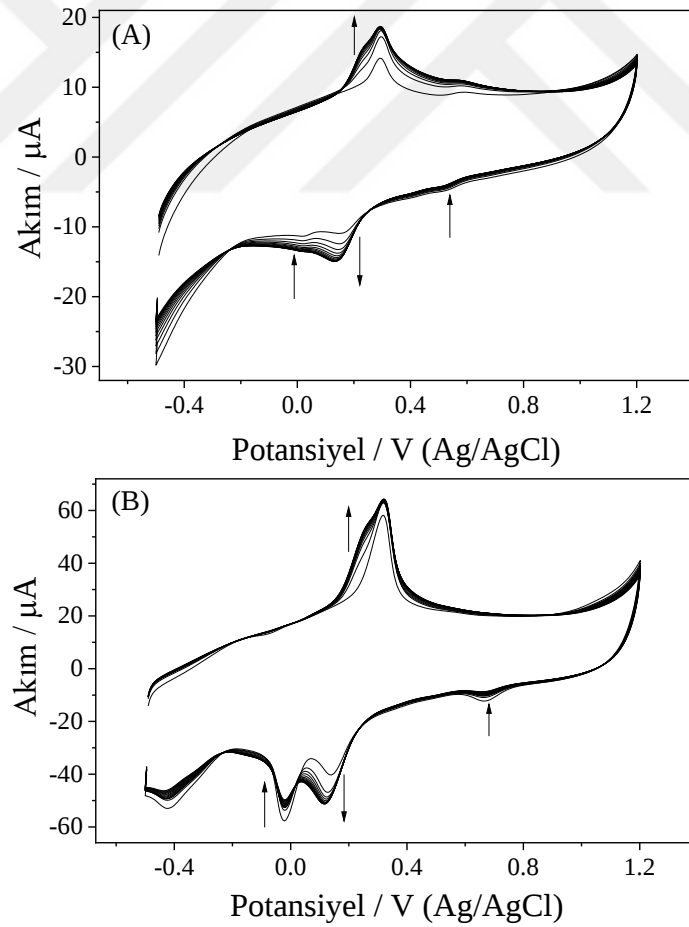
Her bir madde için elde edilen doğrusal aralık verileri dikkate alınarak, gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları için etken madde içeren serum ve idrar çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri üzerinden yöntemlerin kesinliği değerlendirildi.

Serum ve idrar çalışma çözeltileri ile yapılan geri kazanım çalışmasında, etken madde içeren serum ya da idrar çözeltisi üzerine saf etken madde çözeltisi eklendi ve hacim tampon çözelti ile 10 mL'ye tamamlandı. Çalışma çözeltilerinin yüksek hassasiyette hazırlanması amacıyla ana veya ara stok çözeltiler kullanıldı. Her bir yöntem için üçer adet serum çalışma çözeltisi hazırlandı ve alınan voltamogramlar üzerinden ortalama yüzde geri kazanım oranları hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. Elektrotların Polimerizasyonu

PNGB filminin GCE ve MWCNT/GCE yüzeylerine modifikasyonu ile elde edilen voltamogramlar Şekil 10'da verilmiştir. İlk döngüde +0.3 V civarında anodik yönde görülen monomer pikinin tepe noktasının solunda, ikinci döngü itibariyle bir dalga meydana geldi ve bu dalga'nın akım değeri her döngüde arttı. Oluşan polimerin piki olduğu değerlendirilen bu pikin monomer piki ile girişim yapması nedeniyle hem monomer pikinin hem de oluşan polimer pikinin akım değerleri net olarak okunamadı. Bu nedenle, katodik yönde +0.15 V civarında monomer pikinden ayrı olarak oluşan ve akım değeri döngü sayısı ile birlikte artan polimer piki üzerinden pik akımları değerlendirildi. Katodik yöndeki polimer pikinin 15. döngüdeki akım değerleri, PNGB/GCE için 3.78 μA ve PNGB/MWCNT/GCE için 17.2 μA olarak, modifikasyonda MWCNT kullanılması ile 4.55 oranında bir artış gösterdi.



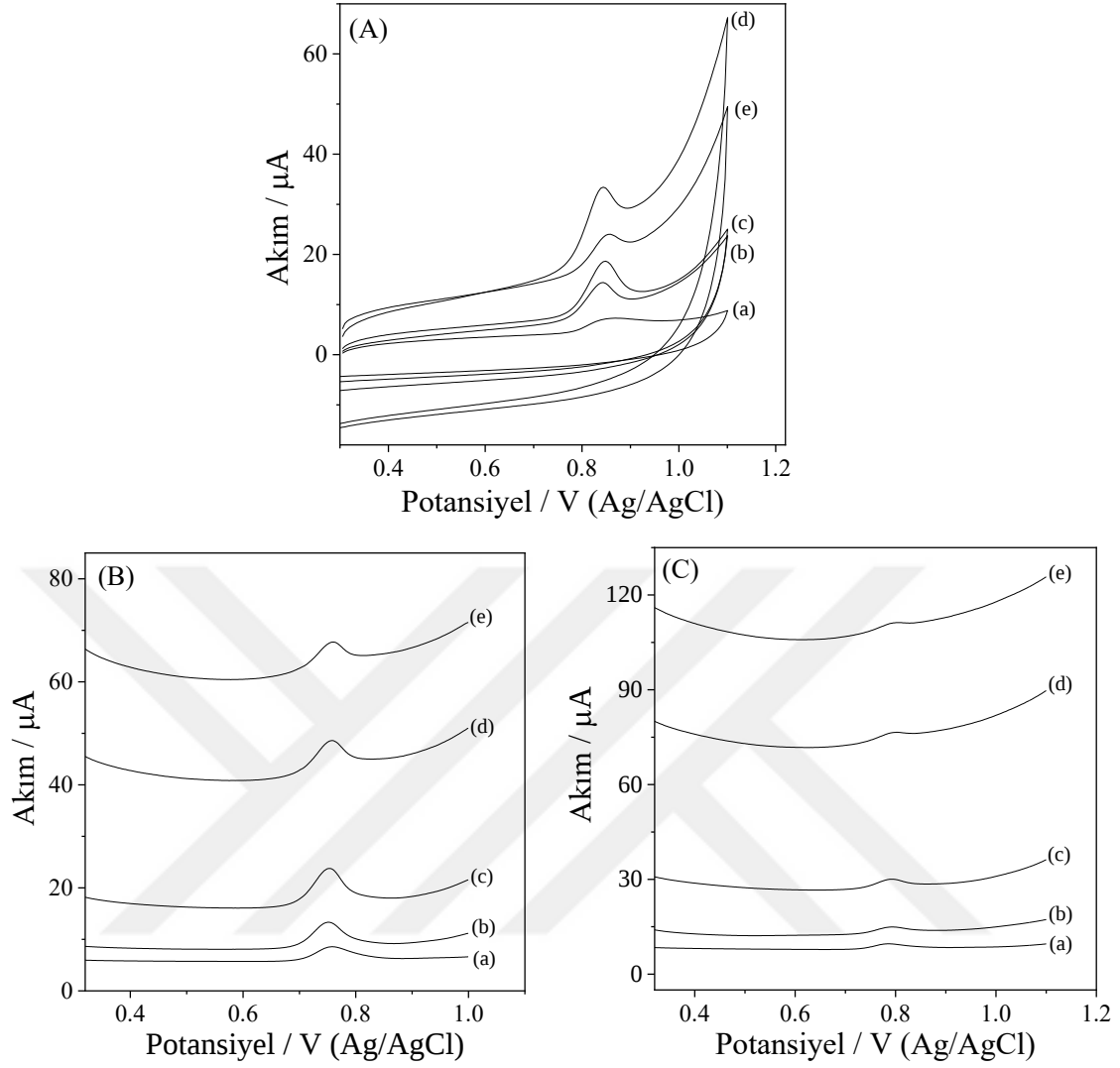
Şekil 10. (A) GCE ve (B) MWCNT/GCE yüzeyine 0.1 M BRT (pH 3.1) içerisinde PNGB filminin kaplanması ile elde edilen döngülü voltamogramlar. Döngü sayısı: 15. Monomer derişimi: 5.0×10^{-4} M.

4.2. Doksazosin Mesilat için Elde Edilen Bulgular

4.2.1. Elektrodun Optimizasyonu

DM etken maddesinin analiz çalışmalarında kullanılacak elektrodu belirlemek amacıyla optimizasyon çalışması yapıldı. Bunun için, MWCNT süspansiyonundan farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılarak önce en iyi sonucun alındığı nanotüp miktarı belirlendi. 1, 2, 4 ve 6 μL MWCNT damlatılmış elektrotlarla alınan voltamogramlar Şekil 11’de ve okunan pik akımı değerleri Tablo 3’te verilmiştir. Bu sonuçlara göre, en yüksek pik akımlarına sahip en simetrik pikler 2 μL MWCNT ile elde edildi. En uygun nanotüp süspansiyonunun 2 μL olduğu kararlaştırıldıktan sonra, bu miktar sabit tutularak PNGB ile kompozisyonuna bakıldı. Bu amaçla önce GCE yüzeyi temizlendi, temiz yüzeyin üzerine 2 μL MWCNT damlatıldı ve yüzey kuruduktan sonra aktive edilerek üzerine PNGB kaplandı. PNGB/MWCNT/GCE ile pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M DM çözeltisinde CV, DPV ve SWV voltamogramları alınarak pik akımı değerleri okundu.

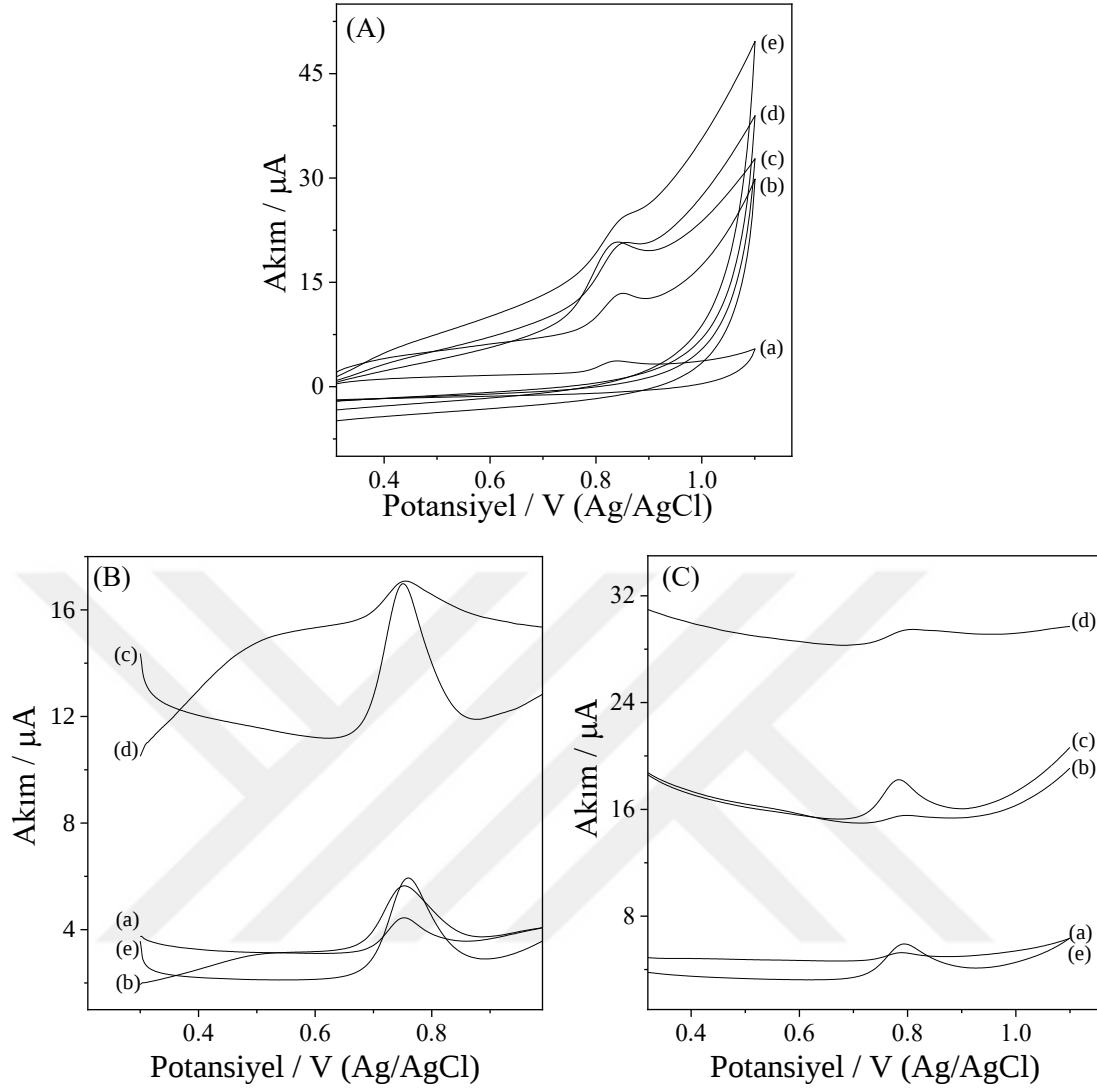
Sonraki aşamada elektrot temizlendi ve yüzeyi PNGB film ile kaplandı. Yüzey aktive edildikten sonra MWCNT süspansiyonundan 2 μL damlatılarak kurumaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan MWCNT/PNGB/GCE ile pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M DM çözeltisinde CV, DPV ve SWV voltamogramları alınarak pik akımı değerleri elde edildi. Ayrıca, yalnızca MWCNT modifiyeli GCE, yalnızca PNGB modifiyeli GCE ve yalın GCE ile elde edilen voltamogramların pik akımı değerleri de okundu. Beş farklı elektrot için elde edilen sonuçlar Şekil 12 ve Tablo 4’te verilmiştir. DM maddesi için en yüksek pik akımı PNGB/MWCNT modifiyeli GCE ile elde edildi. Bu sonuca dayanarak DM’nin analiz çalışmaları PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 11. Farklı miktarlarda MWCNT ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın GCE, (b) 1 μL , (c) 2 μL , (d) 4 μL ve (e) 6 μL MWCNT/GCE

Tablo 3. Farklı elektrotlar ile pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri

Elektrot		Yöntem		
		CV	DPV	SWV
Pik akımı (μA)	GCE	1.89	2.59	1.52
	1 μL MWCNT/GCE	5.26	4.68	1.77
	2 μL MWCNT/GCE	8.41	6.69	2.38
	4 μL MWCNT/GCE	9.11	5.39	1.63
	6 μL MWCNT/GCE	4.14	4.15	1.46



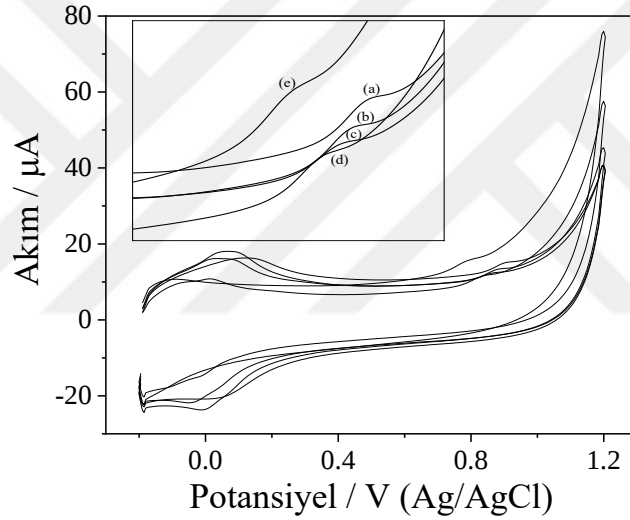
Şekil 12. Farklı miktarlarda MWCNT ve/veya PNGB ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 2.0×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın, (b) 2 μL MWCNT, (c) PNGB/2 μL MWCNT, (d) 2 μL MWCNT/PNGB ve (e) PNGB modifiyeli GCE

Tablo 4. Farklı elektrotlar kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 2.0×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri

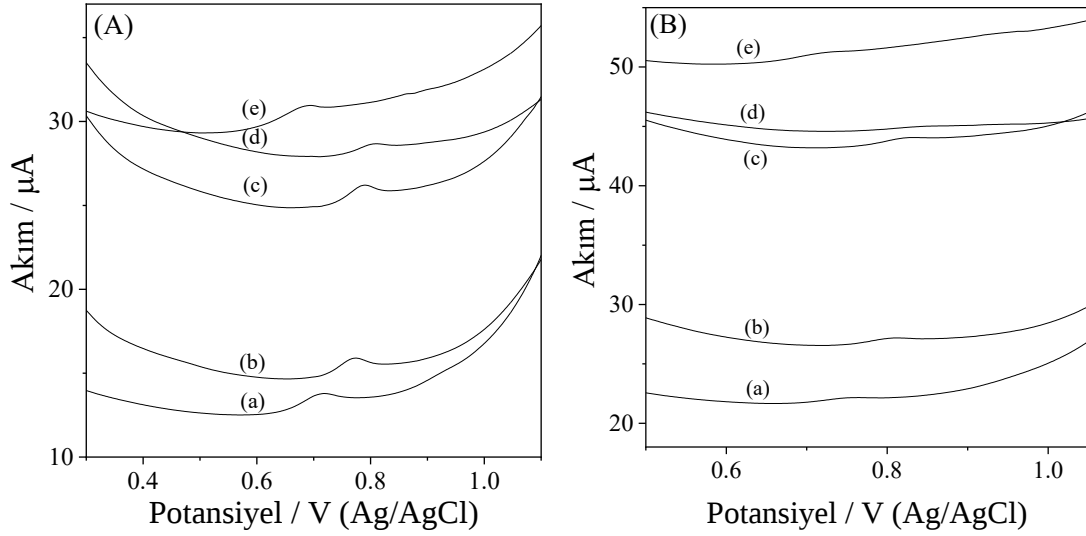
	Elektrot	Yöntem		
		CV	DPV	SWV
Pik akımı (μA)	GCE	1.13	1.11	0.46
	2 μL MWCNT/GCE	2.63	2.18	0.61
	PNGB/2 μL MWCNT/GCE	5.86	5.45	2.57
	2 μL MWCNT/PNGB/GCE	3.37	1.77	0.85
	PNGB/GCE	1.85	3.41	2.25

4.2.2. Destek Elektrolit ve pH Etkisi

DM'nin PNGB/MWCNT/GCE ile elektrokimyasal analiz çalışmaları için en ideal tampon çözeltinin seçilmesi amacıyla pH taraması yapıldı. Bu amaçla, pH değerleri 5.0 ve 5.5 olan 0.2 M AT, pH'sı 6.0 ile 8.0 arasında değişen 0.2 M FT ve pH'sı 5.0 ile 9.0 arasında değişen 0.04 M BRT içerisinde 1.0×10^{-5} M DM çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler ile CV, DPV ve SWV voltamogramları alındı. DM'nin bazı tampon çözeltiler içerisindeki CV voltamogramları Şekil 13'te, DPV ve SWV voltamogramları Şekil 14'te gösterilmiştir. Şekil 13'te görüldüğü gibi, farklı tamponlar içerisindeki DM etken maddesi için PNGB/MWCNT/GCE üzerinde yalnızca +0.8 V civarında yükseltgenme yönünde bir pik gözlenirken, indirgenme yönünde bir pik gözlenmedi.



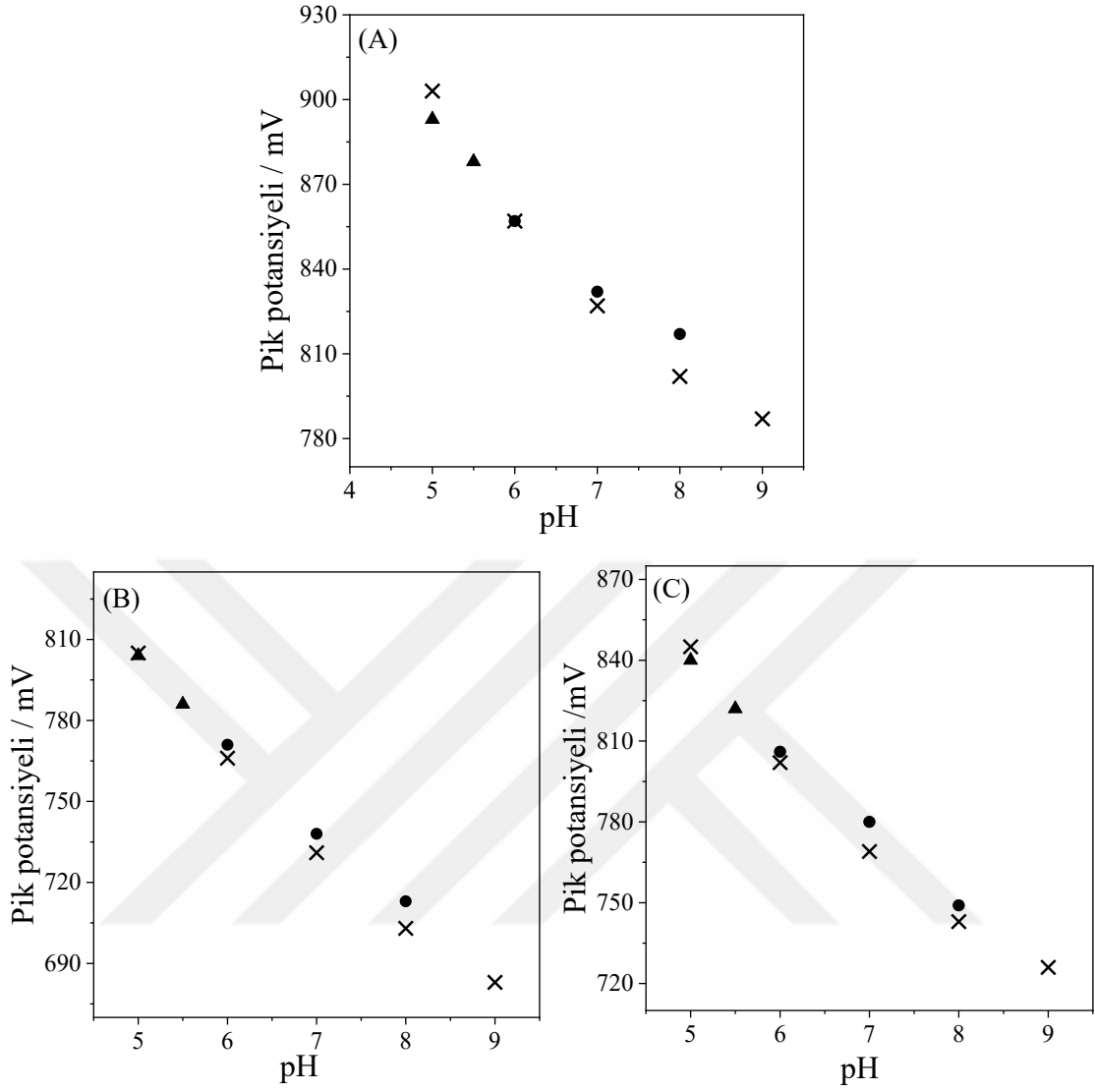
Şekil 13. (a) pH 5.0 BRT, (b) pH 5.5 AT, (c) pH 6.0 BRT, (d) pH 7.0 FT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1}



Şekil 14. (a) pH 8.0 FT, (b) pH 6.0 FT, (c) pH 5.5 AT, (d) pH 5.0 BRT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM'nin (A) DP ve (B) SW voltamogramları

Kantitatif analiz çalışmaları için hazırlanan PNGB/MWCNT/GCE'nin stabilitesi, 1., 2., 4., 6., 7. ve 9. günlerde pH 7.0 FT içerisindeki 4.0×10^{-7} M DM çözeltisinin akım cevapları üzerinden değerlendirildi. Bu amaçla, elektrodun elektrokimyasal davranışının zamanın bir fonksiyonu olarak değişimi incelendi. Hazırlanan sensör 25 °C'de oda sıcaklığında bekletildi. Sensör ile 4. günde elde edilen cevap, sensör hazırlandıktan hemen sonra elde edilen cevabın %86.2'si kadardı. Bu cevap 6. günde %66.9'a ve daha sonraki günlerde %50'ye kadar düşüş gösterdi. Bu veriler doğrultusunda, PNGB/MWCNT/GCE sensörün en fazla 4 güne kadar stabil olduğuna karar verildi.

Konsantrasyonu 1.0×10^{-5} M olan DM çözeltilerinden elde edilen yükseltgenme pik potansiyelinin tampon pH'sına karşı değişimi Şekil 15'te gösterilmektedir. Buna göre, CV, DPV ve SWV yöntemleri için DM pik potansiyeli pH 5.0'dan pH 9.0'a 0.12 V negatif yönde kaydı.



Şekil 15. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT (▲), 0.2 M FT (●) ve 0.04 M BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM'nin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri

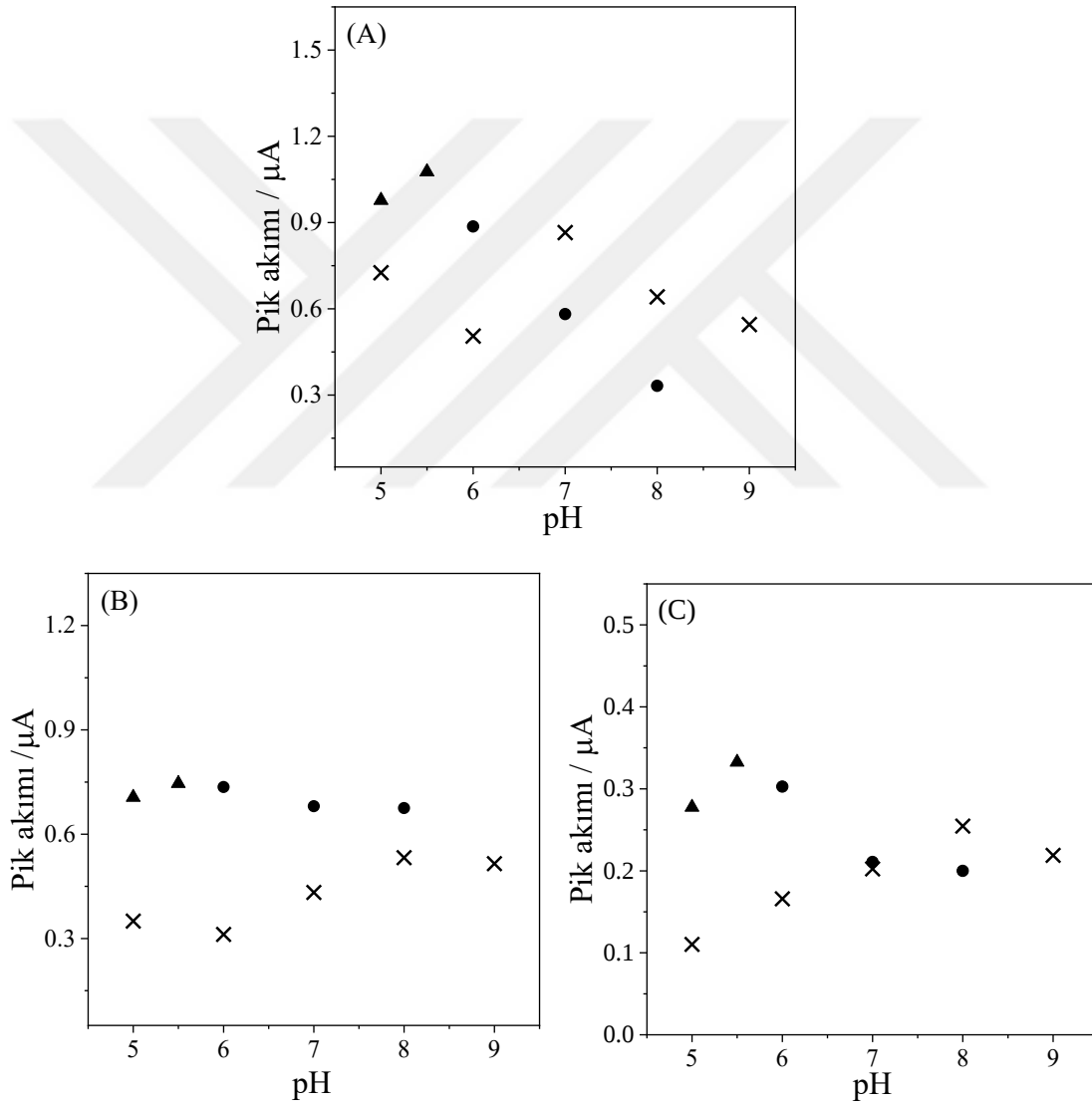
DM için pH'ya karşı pik potansiyeli grafiklerinde, pH 5.0'dan pH 8.0'a kadar pik potansiyelinde doğrusal bir azalma elde edildi (Şekil 15). pH 8.0'dan 9.0'a geçişte doğrusallıkta bir kırılma meydana geldi. Grafiklerdeki kırılma noktası, Bölüm 2.3.1.'de 8.63 olarak bildirilen DM'ye ait pK_a değeri ile uyumludur. Eşitlik 1-3'te pH 5.0 ile 8.0 arasında pH'ya karşı DM pik potansiyeli (E_p) grafiklerinin denklemleri verilmiştir.

$$\text{CV yöntemi: } E_p \text{ (mV)} = 1063.7 - 33.3 \text{ pH} \text{ (} r = 0.980 \text{)} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

$$\text{DPV yöntemi: } E_p \text{ (mV)} = 972.9 - 34.1 \text{ pH} \text{ (} r = 0.995 \text{)} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

$$\text{SWV yöntemi: } E_p \text{ (mV)} = 1007.9 - 33.4 \text{ pH} \text{ (} r = 0.993 \text{)} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

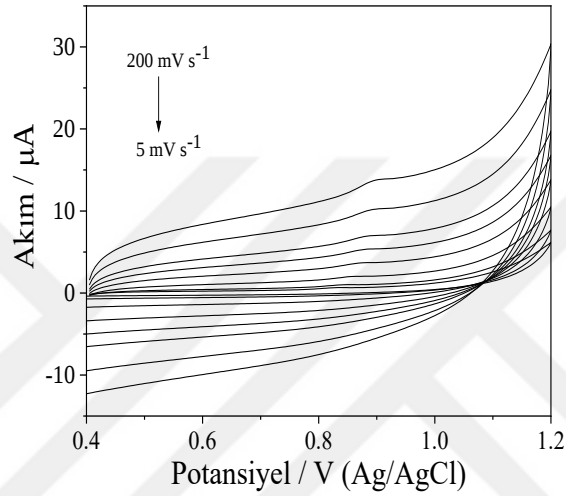
DM'nin elektrokimyasal analizi için en uygun pH'daki tampon ortamını belirlemek üzere CV, DPV ve SWV yöntemleri ile yapılan taramada elde edilen piklerin akım değerlerine ve piklerin simetrisine bakıldı. Her bir yöntem için pH 5.0 ile 9.0 arasında okunan pik akımı değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirildi (Şekil 16). Elde edilen DM pikleri üç yöntem için değerlendirildi ve en yüksek pik akımına sahip en simetrik DM pikinin pH 5.5 AT ortamında elde edildiği belirlendi. Sonraki tüm çalışmalar bu destek elektrolit ortamında gerçekleştirildi.



Şekil 16. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT (▲), 0.2 M FT (●) ve 0.04 M BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM'nin pH'ya karşı pik akımı grafikleri

4.2.3. Hız Taraması

DM'nin elektrot yüzeyindeki yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon ya da adsorpsiyon kontrollü olması durumunu belirlemek amacıyla hız taraması çalışması yapıldı. Bu amaçla, pH 5.5 AT içerisinde 1.0×10^{-5} M konsantrasyonda çalışma çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti ile 200 mV s^{-1} 'den 5 mV s^{-1} 'e değişen tarama hızlarında tek döngülü CV taraması yapıldı (Şekil 17).

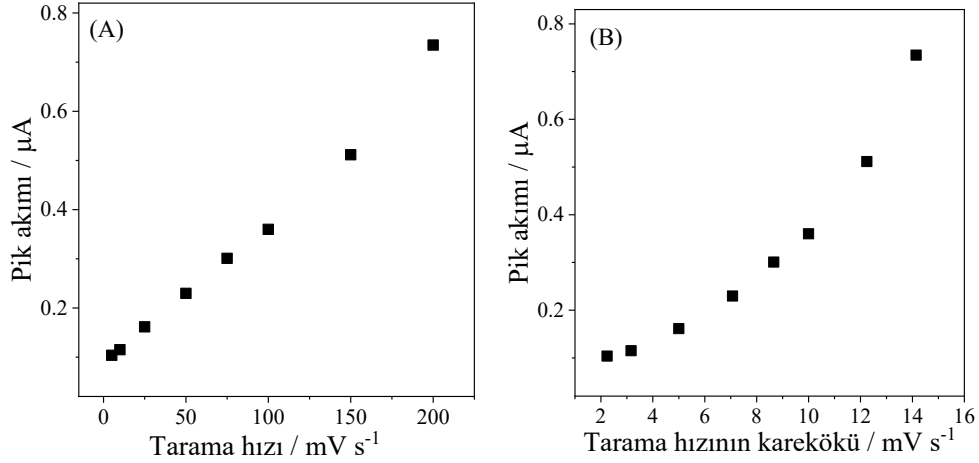


Şekil 17. pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM çözeltisinden tek döngülü CV ile alınan hız taraması voltamogramları

Her bir tarama hızı için elde edilen voltamogramda DM yükseltgenme pik akımı değerleri okundu. Tarama hızına (v) karşı (Şekil 18A) ve tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) karşı (Şekil 18B) pik akımı (I_p) değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 18A'da elde edilen doğrusal grafiğe ait regresyon denklemi Eşitlik 4'te verildi. Ayrıca, elektrot yüzeyü üzerindeki DM redoks reaksiyonunu daha iyi değerlendirmek için $\log I_p$ ve $\log v$ arasında bir grafik de oluşturuldu. Elde edilen doğrusal grafiğe ait denklem Eşitlik 5'te verildi.

$$I_p (\mu\text{A}) = 0.0031 v (\text{mV s}^{-1}) + 0.08 (r = 0.990) \quad (\text{Eşitlik 4})$$

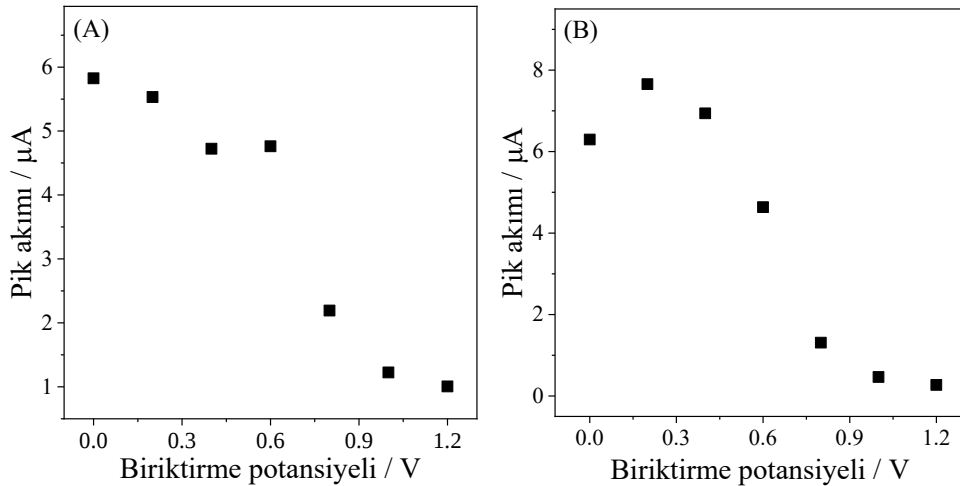
$$\log I_p (\mu\text{A}) = 0.72 \log v (\text{mV s}^{-1}) - 1.87 (r = 0.994) \quad (\text{Eşitlik 5})$$



Şekil 18. CV yöntemi ile (A) tarama hızına ve (B) tarama hızının kareköküne karşı pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM çözeltisinden elde edilen pik akımı grafikleri

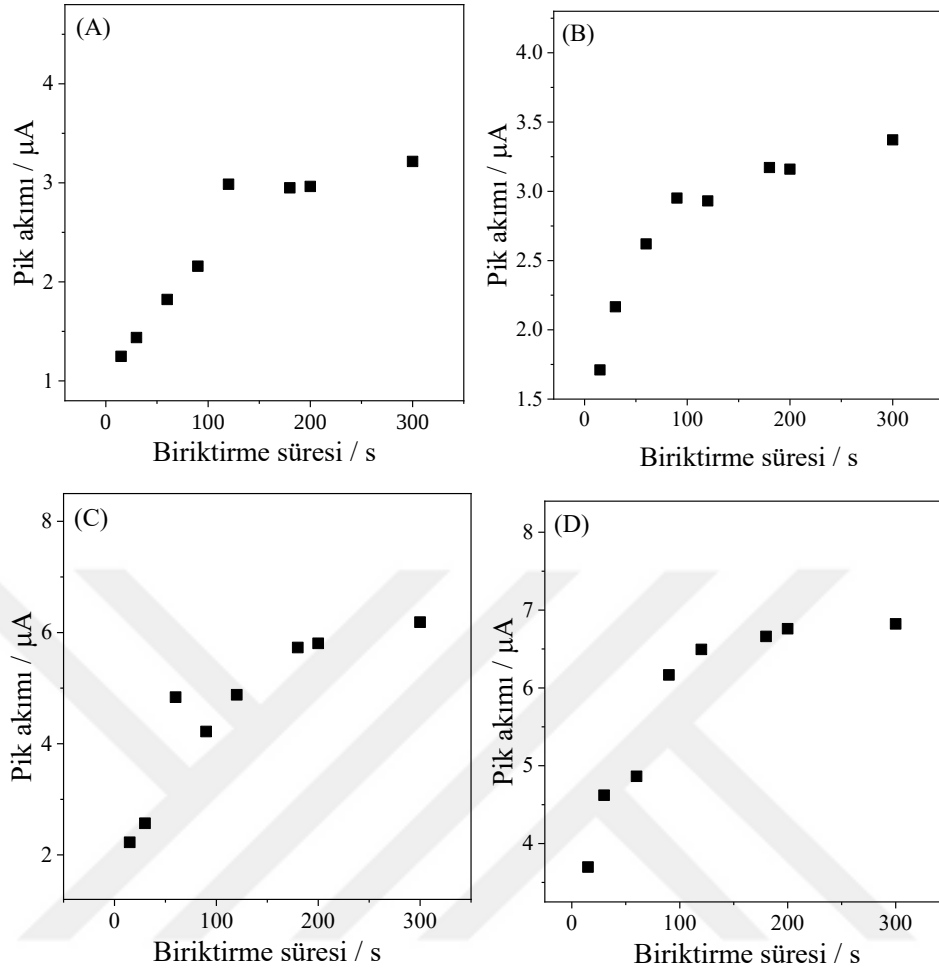
4.2.4. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu

DM'nin DPSV ve SWSV yöntemleri ile kantitatif analiz çalışmaları için sıyırma parametreleri optimize edildi. Bu amaçla, pH 5.5 AT içerisinde 1.0×10^{-5} M DM çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltide öncelikle karıştırma hızı 100 rpm'de ve biriktirme süresi 60 s'de sabit tutularak biriktirme potansiyeli değiştirildi ve en yüksek pik akımının elde edildiği biriktirme potansiyeli belirlendi. Şekil 19A'da DPSV için ve Şekil 19B'de SWSV için biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri verilmiştir.



Şekil 19. (A) DPSV ve (B) SWSV yöntemleri ile pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM çözeltilerinden elde edilen biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri

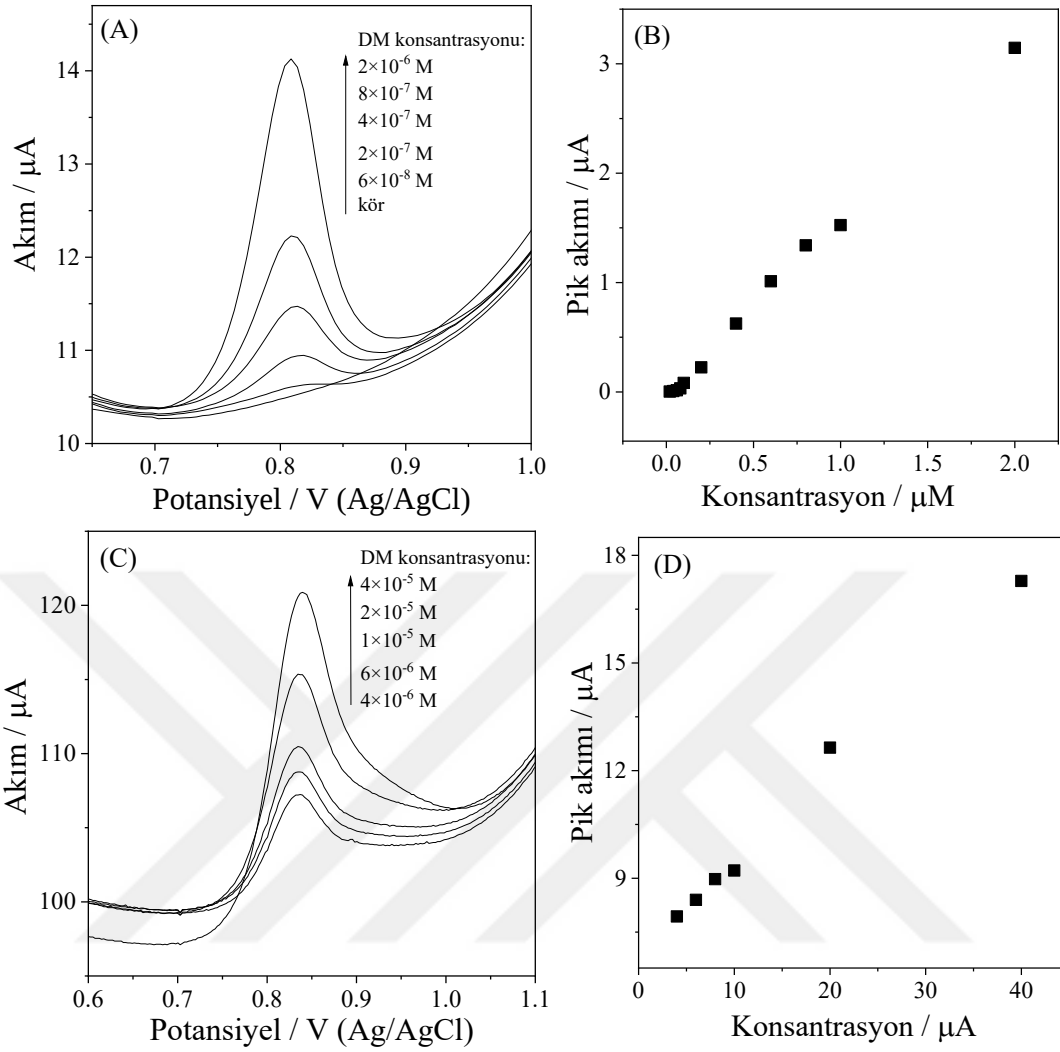
Şekil 19'daki biriktirme potansiyeli grafiklerinden, en yüksek DM pik akımının DPSV yöntemi için 0.0 V'de ve SWSV yöntemi için 0.2 V'de elde edildiği görüldü. Sonraki aşamada, DPSV yöntemi için 100 rpm karıştırma hızı ve 0.0 V biriktirme potansiyeli ve SWSV yöntemi için 100 rpm karıştırma hızı ve 0.2 V biriktirme potansiyeli sabit tutularak biriktirme süresi değiştirildi (Şekil 20A ve 20C). İdeal biriktirme süresi DPSV için 120 s ve SWSV için 180 s olarak belirlendi. Ardından, her bir voltamogramı elde etmek için gerekli olan bu süreleri kısaltmak amacıyla karıştırma hızı optimize edildi. Bu amaçla, her bir yöntemin kendi ideal biriktirme potansiyelini sabit tutmak koşuluyla, biriktirme süresi 90 s'de tutularak 100, 250, 500 ve 750 rpm karıştırma hızları için DPSV ve SWSV voltamogramları alındı. DPSV için 120 s, SWSV için 180 s ve 100 rpm koşullarında elde edilen pik akımları, her iki yöntem için 90 s ve 500 rpm koşullarında elde edilebildi. İdeal karıştırma hızı 500 rpm olarak seçilerek biriktirme süresi ile pik akımının değişimi incelendi (Şekil 20B ve 20D). Pik akımının 90 s'ye kadar doğrusal bir artış gösterdiği ve ardından hemen hemen sabit kaldığı görüldü. Bu nedenle, DPSV yöntemi için 0.0 V biriktirme potansiyeli, 90 s biriktirme süresi ve 500 rpm karıştırma hızı ve SWSV için 0.2 V biriktirme potansiyeli, 90 s biriktirme süresi ve 500 rpm karıştırma hızı ideal biriktirme koşulları olarak belirlendi.



Şekil 20. (A ve B) DPSV ve (C ve D) SWSV ile pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M DM çözeltilerinden (A ve C) 100 rpm ve (B ve D) 500 rpm karıştırma hızlarında elde edilen biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri

4.2.5. Kalibrasyon Çalışması

Kantitatif analiz çalışmaları, ideal biriktirme koşullarındaki DPSV ve SWSV yöntemleri ile yapıldı. Kalibrasyon çalışması için pH 5.5 AT içerisinde 6.0×10^{-9} ile 1.0×10^{-4} M aralığında DM çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen verilere göre, akım değeri okunabilen ilk DM piki DPSV için 1.0×10^{-8} M'de ve SWSV için 1.0×10^{-7} M'de gözlemlendi. SWSV için düşük konsantrasyonlarda doğrusal bir kalibrasyon grafiği elde edilemedi. DM pikinin konsantrasyondaki artış ile değişimi Şekil 21'de gösterildi. Kalibrasyon çalışması ile elde edilen bulgular Tablo 5'te verildi.



Şekil 21. (A) DPSV ve (C) SWSV yöntemleri ile pH 5.5 AT içerisindeki DM çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar ve (B) DPSV ve (D) SWSV için DM konsantrasyonuna karşı pik akımı grafikleri

Tablo 5. DM'nin PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri

	DPSV	SWSV
Pik potansiyeli (mV)	809	839
Doğrusal aralık (μ M)	0.01 – 2	4 – 40
Eğim, m (μ A μ M ⁻¹)	1.62	0.26
Kesim noktası (μ A)	-5.42×10^{-2}	-6.82×10^{-2}
Korelasyon katsayısı, r	0.997	0.995
Teşhis sınırı, LOD (μ M)	5.05×10^{-4}	2.92×10^{-1}
Tayin sınırı, LOQ (μ M)	1.53×10^{-3}	8.84×10^{-1}

Geliştirilen yöntemlerin kesinliği tekrar edilebilirlik çalışmaları ile değerlendirildi. Bu amaçla, pH 5.5 AT içerisinde DPSV için 8.0×10^{-7} M ve SWSV için 1.0×10^{-5} M olarak hazırlanan DM çözeltilerinde gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneyleri yapıldı. Her bir yöntem için hazırlanan üçer adet DM çözeltisinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %RSD'leri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM çözeltilerinden DPSV ve SWSV yöntemleri ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPSV</u>		<u>SWSV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.809	0.809	0.835	0.844
		0.809	0.809	0.837	0.844
		0.809	0.809	0.837	0.835
		0.809	0.809	0.842	0.837
		0.809	0.809	0.842	0.837
	Ortalama (V)	0.809	0.809	0.839	0.839
	s	0.0000	0.0000	0.0032	0.0043
	%RSD	0.00	0.00	0.38	0.51
Pik akımı	Veriler (μ A)	1.2413	1.2486	9.4839	9.4078
		1.2319	1.2153	9.6804	9.5811
		1.2395	1.1935	9.7012	9.5778
		1.2408	1.2395	9.5441	9.8234
		1.2147	1.2408	9.6115	9.7012
	Ortalama (μ A)	1.2336	1.2275	9.6042	9.6183
	s	0.0112	0.0228	0.0913	0.1550
	%RSD	0.91	1.85	0.95	1.61

4.2.6. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları

Geliştirilen yöntemlerinin doğruluğu, DM'nin farmasötik preparatlardan tayini ve geri kazanım çalışması ile araştırıldı. Farmasötik preparatlardan tayin çalışması için DM'nin tablet formu kullanılarak pH 5.5 AT içerisinde DPSV için 8.0×10^{-7} M ve SWSV için 1.0×10^{-5} M DM içeren üçer adet çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerden elde edilen voltamogramların pik potansiyeli ve pik akımı değerleri okundu. Pik akımları kullanılarak, hesaplanan DM miktarı ile DM'nin dozaj formunda bildirilen miktarı karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 7'de gösterildi.

Geri kazanım çalışmasında DPSV yöntemi için tablet formundan hazırlanan 8.0×10^{-7} M DM çözeltisinin üzerine toplam DM konsantrasyonu 1.0×10^{-6} M olacak şekilde saf DM çözeltisi; SWSV yöntemi için ise tablet formundan hazırlanan 1.0×10^{-5} M DM çözeltisinin üzerine toplam DM konsantrasyonu 2.0×10^{-5} M olacak şekilde saf DM çözeltisi ilave edilerek üçer adet çözelti hazırlandı. Bu çözeltiler ile alınan voltamogramların pik akım değerleri okundu ve beşer adet değer üzerinden DPSV ve SWSV için %RSD ve yüzde geri kazanım oranları hesaplandı (Tablo 8).

Tablo 7. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri

		DPSV	SWSV
Farmasötik preparatlardan tayin	Tablette beyan edilen DM miktarı (mg)	4.850	4.850
	Bulunan DM miktarları (mg)	4.874	4.902
		4.890	4.946
		4.972	4.764
		4.970	4.788
		4.913	4.770
	Bulunan ortalama DM miktarı (mg)	4.924	4.834
	s	0.045	0.084
	%RSD	0.92	1.74
	%Bağıl hata	1.53	-0.33
	t-testi	0.07	
	F-testi	0.26	

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

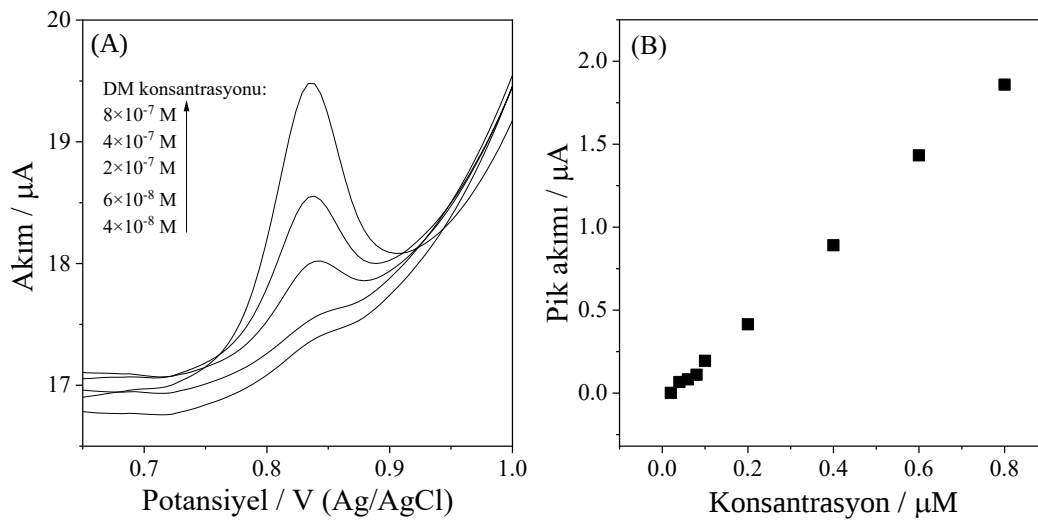
Tablo 8. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM çözeltilerinden DPSV ve SWSV yöntemleri ile elde edilen geri kazanım çalışması verileri

	DPSV	SWSV
İlave edilen DM konsantrasyonu (μ M)	0.2000	10.0000
Bulunan DM konsantrasyonu (μ M)	0.2038	10.1616
	0.1970	10.1231
	0.1970	9.8141
	0.2031	9.9513
	0.1970	9.8590
Bulunan ortalama DM konsantrasyonu (μ M)	0.1996	9.9818
Ortalama geri kazanım (%)	99.79	99.82
s	1.77	1.55
%RSD	1.78	1.56
%Bağıl hata	-0.20	-0.18

4.2.7. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması

DM için yapılan analiz çalışmaları sonucu elde edilen verilerin insan serumu ve yapay idrar ortamındaki uygulanabilirliğini araştırmak amacıyla Bölüm 3.5.5.'te belirtildiği şekilde serum ve idrar çözeltileri hazırlandı. Saf DM için yapılan kalibrasyon çalışmasında olduğu gibi DM içeren serum ve idrar analizlerinde de destek elektrolit olarak pH 5.5 AT kullanıldı.

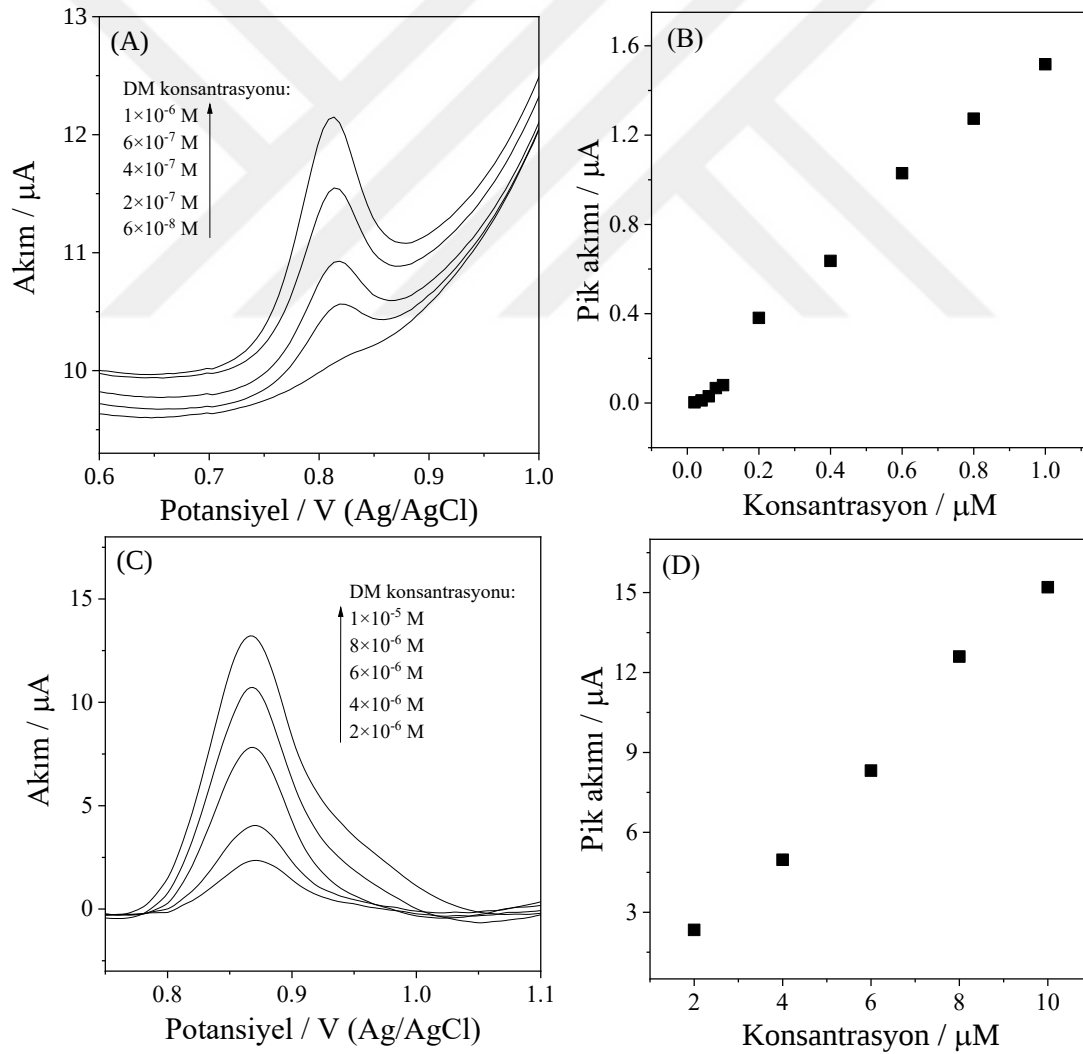
Serum ve idrar örnekleri için yapılan kalibrasyon deneyleri için serum ve idrar içermeyen DM çözeltilerinin Tablo 5'te belirtilen doğrusal aralık verileri dikkate alınarak, pH 5.5 AT içerisinde DPSV için 8.0×10^{-9} ile 2.0×10^{-6} M aralığında ve SWSV için 1.0×10^{-6} ile 4.0×10^{-5} M aralığında serum ve idrar çalışma çözeltileri hazırlandı. Serum ve idrar çözeltilerden elde edilen voltamogramlara göre pik akımı okunabilen en düşük konsantrasyon DPSV için 2.0×10^{-8} M olarak bulundu. Serum çözeltilerinde SWSV ile yapılan kalibrasyon çalışmasında doğrusal bir konsantrasyon aralığı elde edilemedi. Bu nedenle DM içeren serum çözeltileri ile kantitatif analiz çalışması yalnızca DPSV yöntemi ile yapıldı. Serum çözeltilerinden DPSV ile alınan voltamogramlar ve konsantrasyona karşı pik akımı grafiği Şekil 22'de ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler Tablo 9'da; idrar çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile alınan voltamogramlar ve konsantrasyona karşı pik akımı grafikleri Şekil 23'te ve kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler Tablo 10'da verilmiştir.



Şekil 22. DPSV yöntemi ile DM içeren pH 5.5 AT içerisindeki serum çözeltilerinden elde edilen (A) voltamogramlar ve (B) konsantrasyona karşı pik akımı grafiği

Tablo 9. PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV yöntemi kullanılarak DM içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	DPSV
Pik potansiyeli (mV)	830
Doğrusal aralık (μM)	0.02 – 0.8
Eğim, m ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	2.41
Kesim noktası (μA)	-5.56×10^{-2}
Korelasyon katsayısı, r	0.999
Teşhis sınırı, LOD (μM)	6.63×10^{-4}
Tayin sınırı, LOQ (μM)	2.01×10^{-3}



Şekil 23. (A) DPSV ve (C) SWSV ile pH 5.5 AT içerisindeki DM içeren idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar ve (B) DPSV ve (D) SWSV için konsantrasyona karşı pik akımı grafikleri

Tablo 10. PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV ve SWSV kullanılarak DM içeren idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	DPSV	SWSV
Pik potansiyeli (mV)	810	869
Doğrusal aralık (μM)	0.02 – 1	2 – 10
Eğim, m ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	1.62	1.67
Kesim noktası (μA)	-3.34×10^{-2}	1.32
Korelasyon katsayısı, r	0.991	0.993
Teşhis sınırı, LOD (μM)	7.29×10^{-4}	2.17×10^{-1}
Tayin sınırı, LOQ (μM)	2.21×10^{-3}	6.56×10^{-1}

Tekrar edilebilirlik deneyleri için DM içeren serum çalışma çözeltileri 4.0×10^{-7} M; idrar çalışma çözeltileri ise DPSV için 8.0×10^{-7} M ve SWSV için 6.0×10^{-6} M konsantrasyonda hazırlandı. Üçer ayrı çözeltiden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerinin gün içi ve günler arası %RSD oranı hesaplandı. Sonuçlar serum çözeltileri için Tablo 11’de ve idrar çözeltileri için Tablo 12’de verildi.

Geri kazanım çalışması için, 4.0×10^{-7} M DM içeren serum çözeltisi üzerine toplam DM konsantrasyonu 6.0×10^{-7} M olacak şekilde saf DM çözeltisi eklendi ve pH 5.5 AT ile hacim tamamlandı. İdrar örneklerinden geri kazanım çalışmasında, DPSV için 8.0×10^{-7} M DM içeren idrar çözeltisi üzerine toplam DM konsantrasyonu 1.0×10^{-6} M olacak şekilde ve SWSV için 6.0×10^{-6} M DM içeren idrar çözeltisi üzerine toplam DM konsantrasyonu 8.0×10^{-6} M olacak şekilde saf DM çözeltileri eklendi ve hacim tampon çözelti ile tamamlandı. Üçer adet olarak hazırlanan çalışma çözeltilerinden elde edilen sonuçlar serum çözeltileri için Tablo 13’te ve idrar çözeltileri için Tablo 14’te verildi.

Tablo 11. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM içeren serum çözeltilerinden DPSV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.834	0.834
		0.829	0.834
		0.829	0.829
		0.829	0.829
		0.829	0.829
	Ortalama (V)	0.830	0.831
Pik akımı	s	0.0023	0.0028
	%RSD	0.27	0.33
	Veriler (μ A)	1.0249	1.0117
		1.0096	1.0261
		1.0376	1.0491
		1.0007	1.0249
	Ortalama (μ A)	1.0151	1.0225
	s	0.0157	0.0182
	%RSD	1.55	1.78

Tablo 12. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 5.5 AT içerisindeki DM içeren idrar çözeltilerinden DPSV ve SWSV ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		DPSV		SWSV	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.809	0.809	0.871	0.871
		0.809	0.809	0.869	0.869
		0.809	0.814	0.869	0.871
		0.809	0.814	0.869	0.869
		0.814	0.804	0.869	0.866
	Ortalama (V)	0.810	0.810	0.869	0.869
Pik akımı	s	0.0022	0.0042	0.0011	0.0020
	%RSD	0.28	0.52	0.13	0.23
	Veriler (μ A)	1.0876	1.0682	10.299	10.299
		1.0603	1.0788	10.496	10.277
		1.0669	1.0913	10.504	10.475
		1.0618	1.0553	10.292	10.772
	Ortalama (μ A)	1.0643	1.0565	10.277	10.403
	s	1.0682	1.0700	10.374	10.445
		0.0111	0.0153	0.1157	0.0199
	%RSD	1.04	1.43	1.12	1.91

Tablo 13. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak 6.0×10^{-7} M DM içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

Geri kazanım		DPSV
	İlave edilen saf DM konsantrasyonu (μM)	0.2000
	Bulunan saf DM konsantrasyonu (μM)	0.1935
		0.1920
		0.1935
		0.1991
		0.1945
	Bulunan ortalama saf DM konsantrasyonu (μM)	0.1945
	Ortalama geri kazanım (%)	97.3
	s	1.35
	%RSD	1.39
	%Bağıl hata	-2.75

Tablo 14. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak DPSV için 1.0×10^{-6} M ve SWSV için 8.0×10^{-6} M DM içeren idrar çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

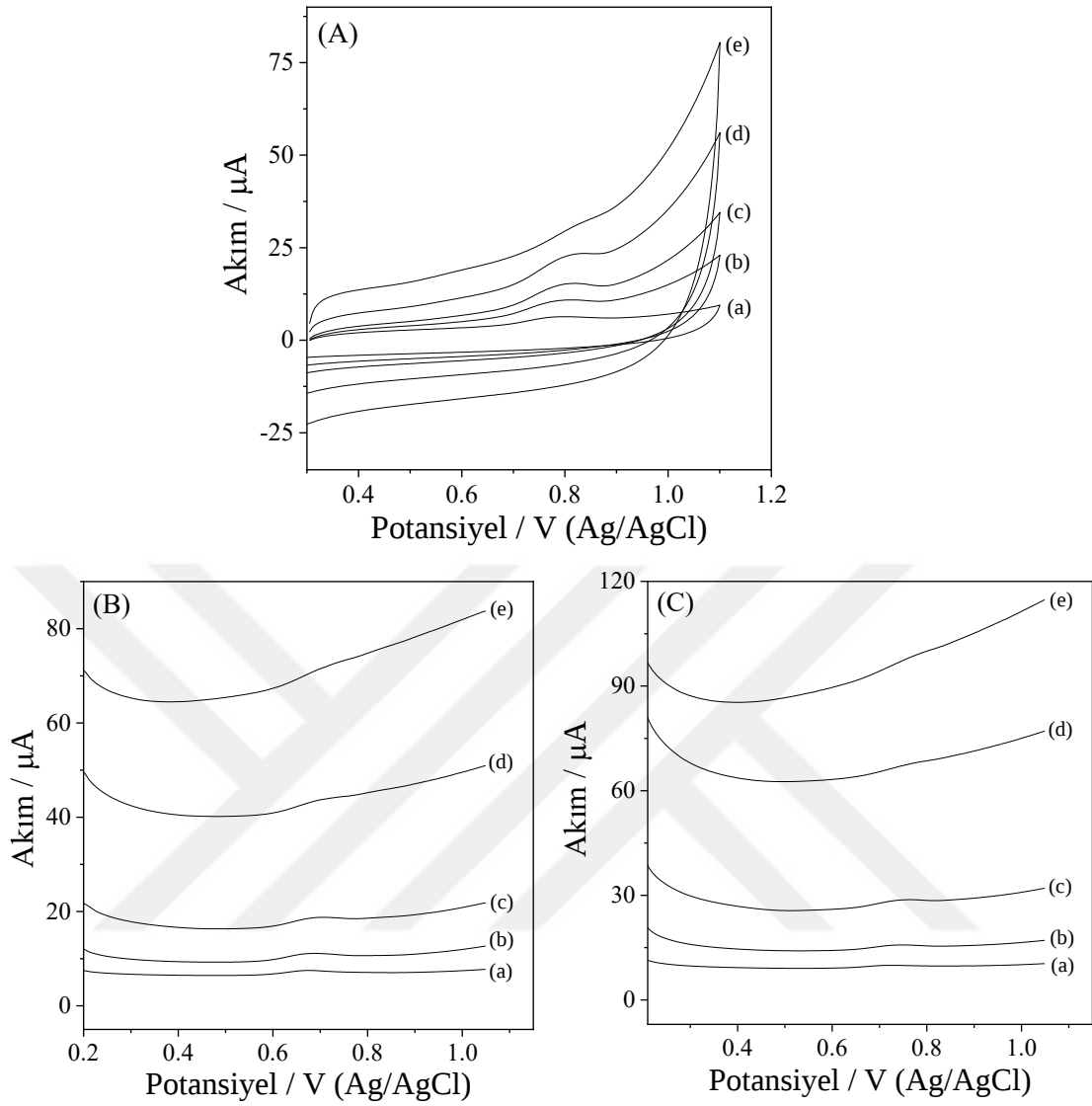
Geri kazanım		DPSV	SWSV
	İlave edilen saf DM konsantrasyonu (μM)	0.2000	2.0000
	Bulunan saf DM konsantrasyonu (μM)	0.1943	1.9385
		0.1967	2.0081
		0.1988	1.9661
		0.1971	1.9881
		0.1977	1.9656
	Bulunan ortalama saf DM konsantrasyonu (μM)	0.1969	1.9733
	Ortalama geri kazanım (%)	98.5	98.7
	s	0.82	1.31
	%RSD	0.83	1.33
	%Bağıl hata	-1.55	-1.34

4.3. Amlodipin Besilat için Elde Edilen Bulgular

4.3.1. Elektrodun Optimizasyonu

AB etken maddesinin analiz çalışmalarında kullanılacak elektrodu belirlemek amacıyla MWCNT süspansiyonundan farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılarak önce en iyi sonucun alındığı nanotüp miktarı belirlendi. 1, 2, 4 ve 6 μL MWCNT damlatılmış elektrotlarla alınan voltamogramlar Şekil 24’te ve okunan pik akımı değerleri Tablo 15’te verilmiştir. Bu sonuçlara göre, üç yöntem için de en yüksek pik akımları 2 μL MWCNT ile elde edildi. 2 μL MWCNT miktarı sabit tutularak PNGB ile kompozisyonuna bakıldı. Bu amaçla önce GCE yüzeyi temizlendi, temiz yüzeyin üzerine 2 μL MWCNT damlatıldı ve yüzey kuruduktan sonra aktive edilerek üzerine PNGB kaplandı. PNGB/MWCNT/GCE ile pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M AB çözeltisinde CV, DPV ve SWV voltamogramları alınarak pik akımı değerleri okundu.

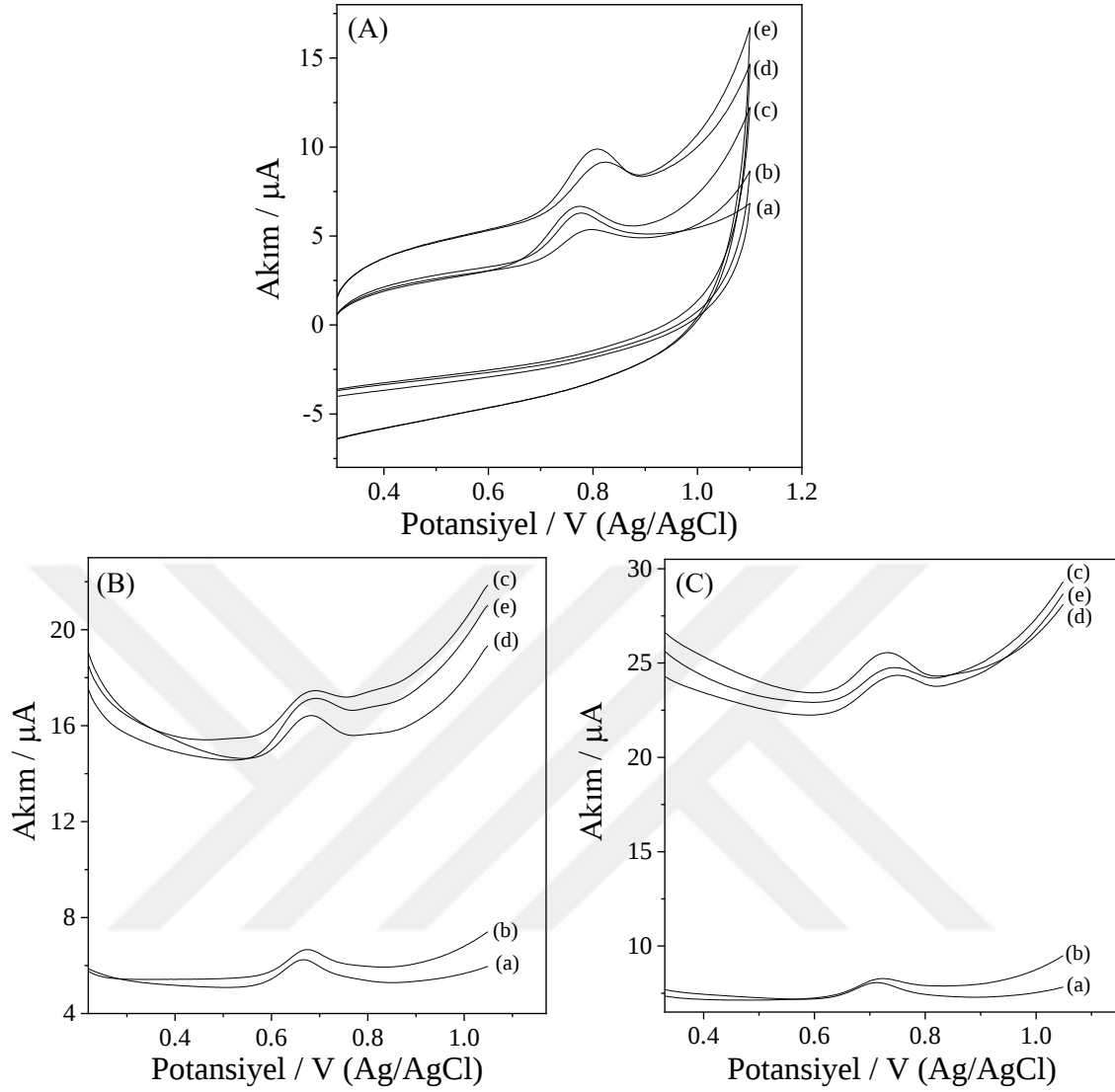
Sonraki aşamada, GCE temizlendi ve PNGB film ile kaplanarak kurutuldu. Yüzey aktive edildikten sonra MWCNT süspansiyonundan 2 μL damlatılarak kurumaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan MWCNT/PNGB/GCE ile pH 7.0 FT içerisinde 6.0×10^{-5} M AB çözeltisinden CV, DPV ve SWV voltamogramları alınarak pik akım değerleri okundu. Ayrıca, yalnızca MWCNT modifiyeli GCE, yalnızca PNGB modifiyeli GCE ve yalın GCE ile elde edilen voltamogramların pik akımı değerleri de elde edildi. Beş farklı elektrot için elde edilen sonuçlar Şekil 25 ve Tablo 16’da verilmiştir. AB maddesi için en yüksek pik akımı PNGB/MWCNT modifiyeli GCE ile elde edildi. Bu sonuca dayanarak AB’nin analiz çalışmaları PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 24. Farklı miktarlarda MWCNT ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın GCE, (b) 1 μL , (c) 2 μL , (d) 4 μL ve (e) 6 μL MWCNT/GCE

Tablo 15. Farklı elektrotlar ile pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri

	Elektrot	Yöntem		
		CV	DPV	SWV
Pik akımı (μA)	GCE	1.40	0.67	0.47
	1 μL MWCNT/GCE	2.08	0.99	0.84
	2 μL MWCNT/GCE	3.00	1.10	1.16
	4 μL MWCNT/GCE	2.82	0.63	0.39
	6 μL MWCNT/GCE	0.42	0.47	0.46



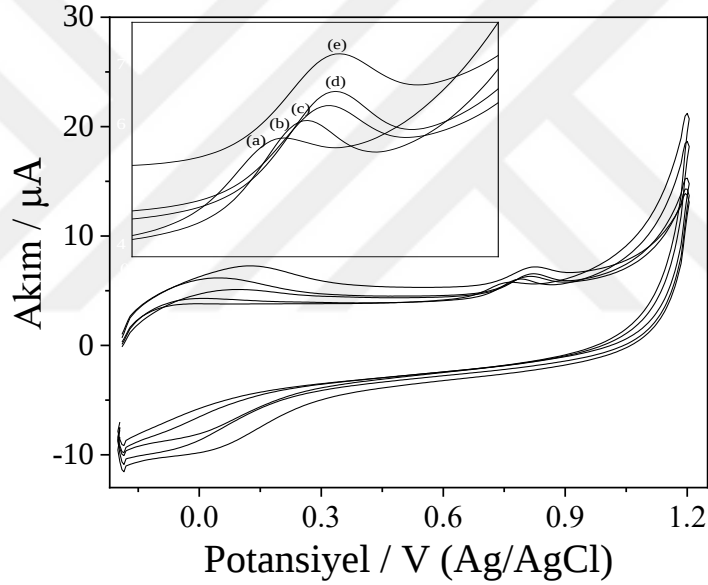
Şekil 25. Farklı miktarlarda MWCNT ve/veya PNGB ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) PNGB, (b) yalın, (c) 2 μ L MWCNT, (d) PNGB/2 μ L MWCNT ve (e) 2 μ L MWCNT/PNGB modifiyeli GCE

Tablo 16. Farklı elektrotlar kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri

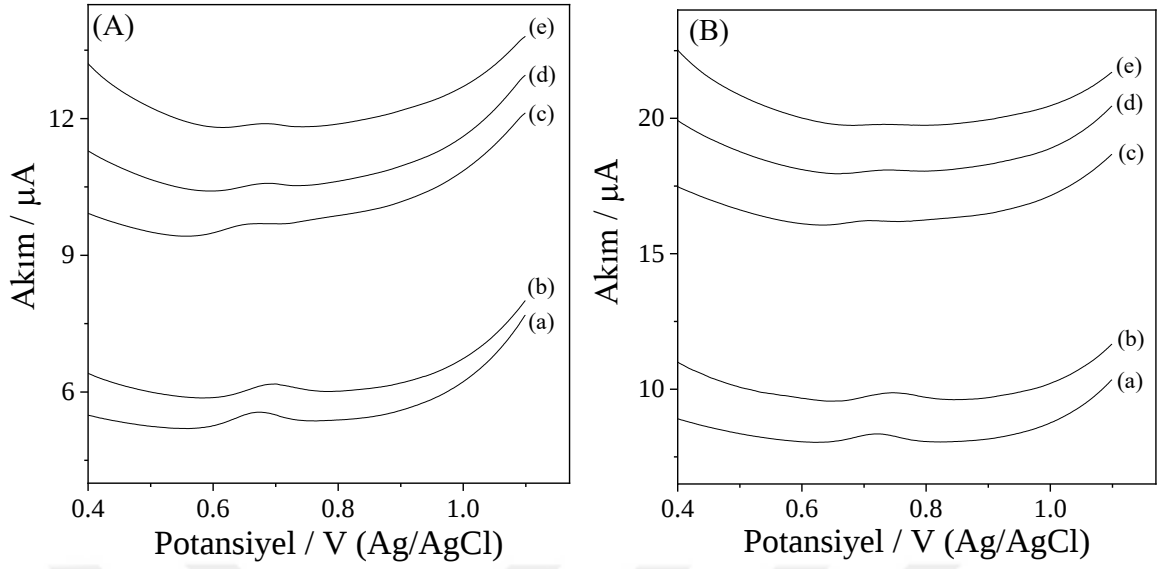
	Elektrot	Yöntem		
		CV	DPV	SWV
Pik akımı (μ A)	PNGB/GCE	2.07	0.89	0.77
	GCE	1.22	0.77	0.65
	2 μ L MWCNT/GCE	2.16	1.12	1.08
	PNGB/2 μ L MWCNT/GCE	2.56	1.27	1.63
	2 μ L MWCNT/PNGB/GCE	1.66	1.26	1.18

4.3.2. Destek Elektrolit ve pH Etkisi

AB'nin PNGB/MWCNT/GCE ile elektrokimyasal analiz çalışması için en uygun tampon ortamının seçilmesi amacıyla pH taraması yapıldı. Bunun için, pH değerleri 5.0 ve 5.5 olan 0.2 M AT, pH'sı 6.0 ile 8.0 arasında değişen 0.2 M FT ve pH'sı 5.0 ile 9.0 arasında değişen 0.04 M BRT çözeltileri içerisinde 1.0×10^{-5} M AB çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler ile CV, DPV ve SWV voltamogramları alındı. AB'nin bazı tampon çözeltiler içerisindeki CV voltamogramları Şekil 26'da, DPV ve SWV voltamogramları Şekil 27'de gösterilmiştir. Şekil 26'da görüldüğü gibi, farklı tamponlar içerisindeki AB etken maddesi PNGB/MWCNT/GCE üzerinde yalnızca +0.8 V civarında yükseltgenme yönünde bir pik verdi, indirgenme yönünde herhangi bir pik gözlenmedi.

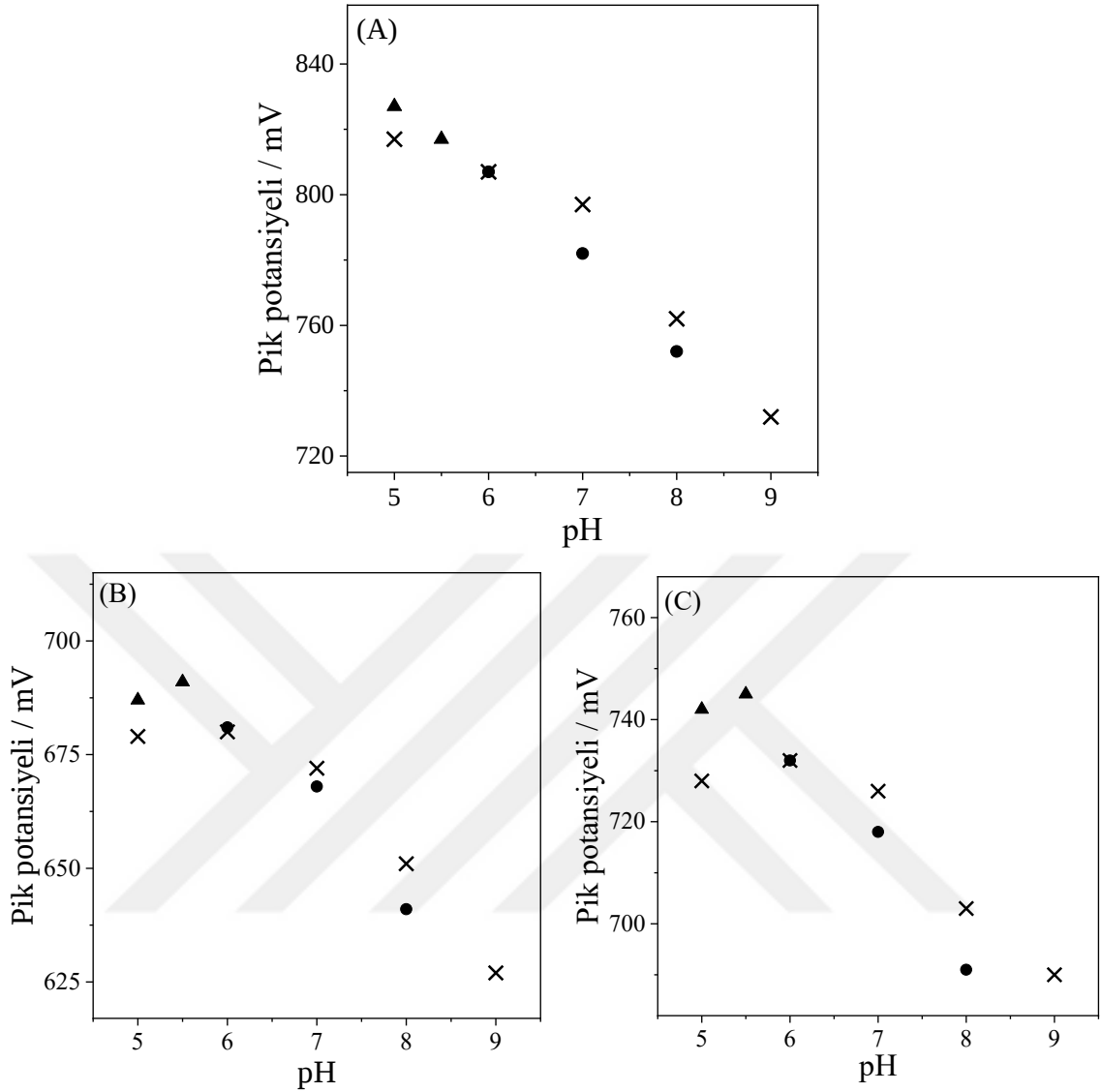


Şekil 26. (a) pH 8.0 FT, (b) pH 7.0 FT, (c) pH 6.0 BRT, (d) pH 5.5 AT ve (e) pH 5.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB'nin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1}



Şekil 27. (a) pH 7.0 FT, (b) pH 5.5 AT, (c) pH 8.0 BRT, (d) pH 6.0 BRT ve (e) pH 5.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB'nin (A) DP ve (B) SW voltamogramları

Konsantrasyonu 1.0×10^{-5} M olan AB çözeltilerinden elde edilen yükseltgenme pik potansiyellerinin tampon pH'sına karşı değişimi Şekil 28'de gösterilmektedir. Buna göre, pik potansiyeli pH 5.0'dan pH 9.0'a doğru CV için 0.10 V, DPV için 0.06 V ve SWV için 0.05 V negatif yönde kaydı.



Şekil 28. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT (▲), 0.2 M FT (●) ve 0.04 M BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB'nin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri

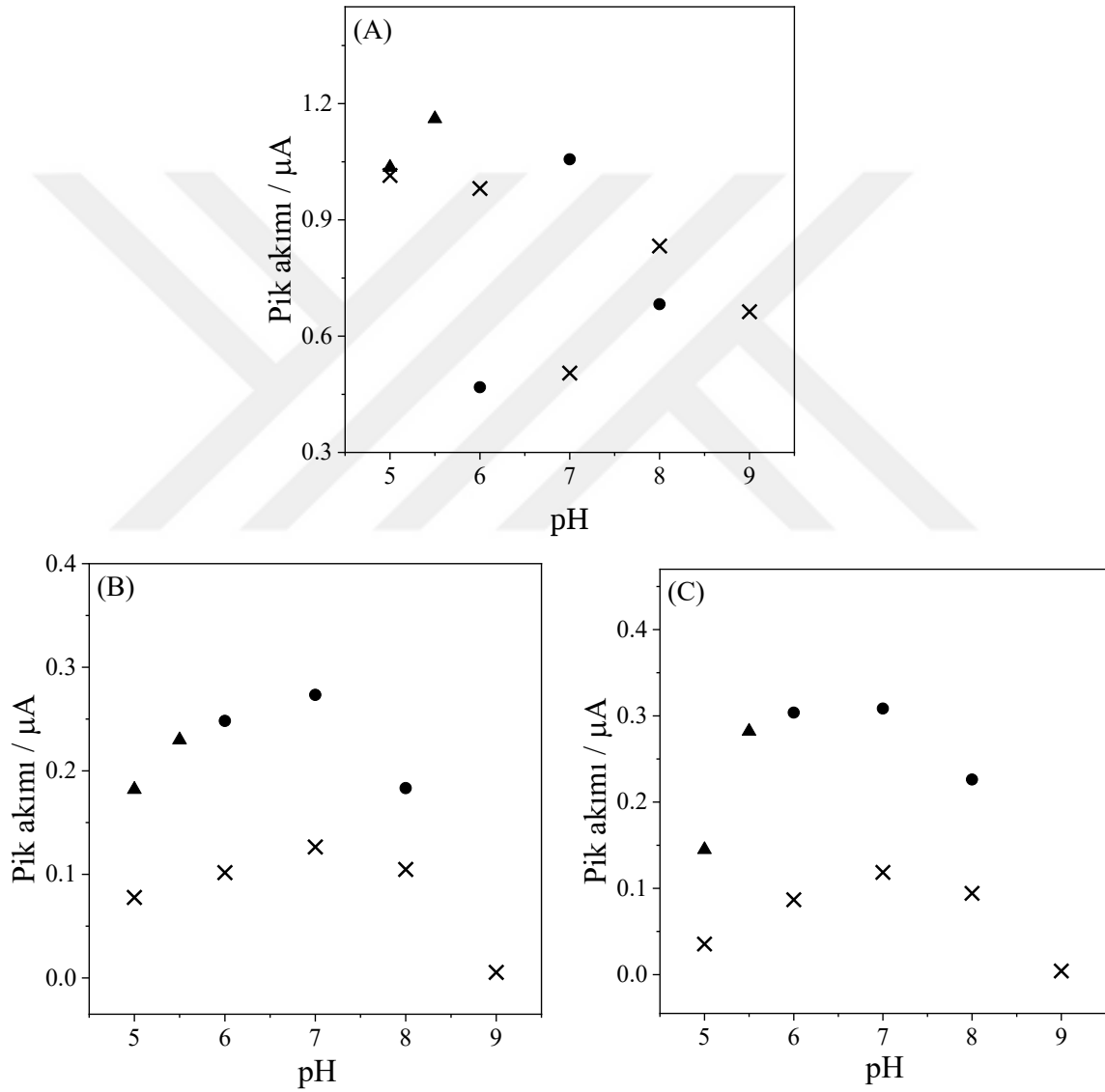
AB için pik potansiyeline karşı pH grafiklerinde, CV için pH 5.0'dan ve DPV ve SWV için pH 5.5'ten pH 9.0'a kadar pik potansiyelinde bir azalma elde edildi (Şekil 28). Eşitlik 6'da pH 5.0 ile 9.0 arasında, Eşitlik 7'de pH 5.5 ile 8.0 arasında ve Eşitlik 8'de pH 5.0 ile 9.0 arasında elde edilen pH'ya karşı AB pik potansiyeli (E_p) grafiklerinin doğrusallık denklemleri verilmiştir.

$$\text{CV yöntemi: } E_p \text{ (mV)} = 951.7 - 24.5 \text{ pH} \text{ (} r = 0.996 \text{)} \quad (\text{Eşitlik 6})$$

$$\text{DPV yöntemi: } E_p \text{ (mV)} = 775.8 - 15.6 \text{ pH} \text{ (} r = 0.996 \text{)} \quad (\text{Eşitlik 7})$$

$$\text{SWV yöntemi: } E_p \text{ (mV)} = 810.1 - 13.3 \text{ pH} \text{ (} r = 0.996 \text{)} \quad (\text{Eşitlik 8})$$

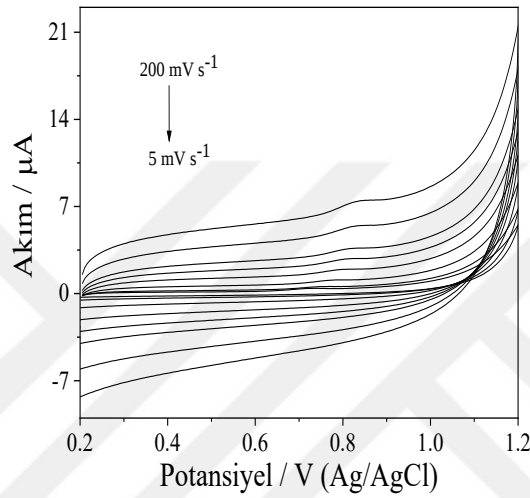
AB'nin elektrokimyasal analizi için en uygun tampon ortamını belirlemek üzere CV, DPV ve SWV yöntemleri ile yapılan taramada elde edilen piklerin akım değerlerine ve piklerin simetrisine bakıldı. Her bir yöntem için pH 5.0 ile 9.0 arasında okunan pik akım değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirildi (Şekil 29). Elde edilen AB pikleri üç yöntem için değerlendirildi ve en yüksek pik akımına sahip en simetrik AB pikinin pH 7.0 FT ortamında elde edildiği belirlendi ve sonraki çalışmalar bu destek elektrolit ortamında gerçekleştirildi.



Şekil 29. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT (▲), 0.2 M FT (●) ve 0.04 M BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB'nin pH'ya karşı pik akımı grafikleri

4.3.3. Hız Taraması

AB'nin elektrot yüzeyindeki yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon ya da adsorpsiyon kontrollü olması durumunu belirlemek amacıyla hız taraması çalışması yapıldı. Bu amaçla, pH 7.0 FT içerisinde 1.0×10^{-5} M konsantrasyonda çalışma çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti ile 200 mV s^{-1} 'den 5 mV s^{-1} 'e değişen tarama hızlarında tek döngülü CV taraması yapıldı (Şekil 30).

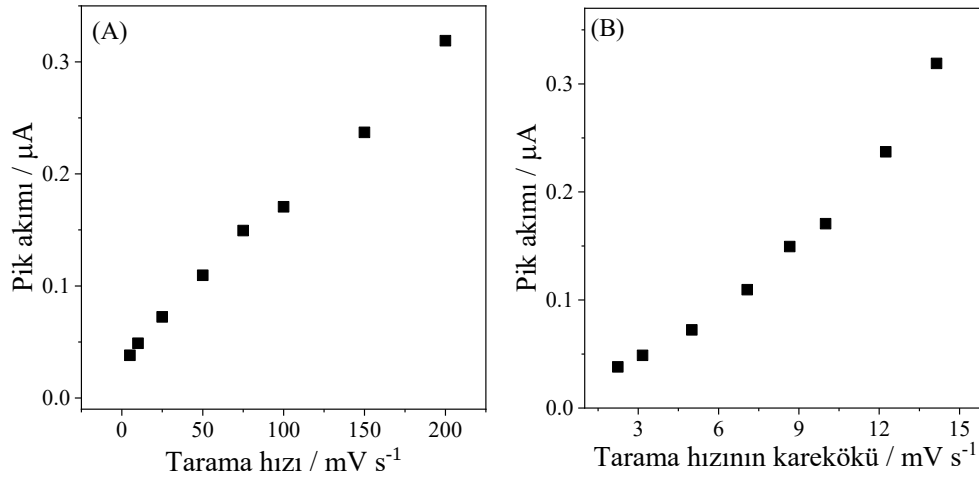


Şekil 30. pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB çözeltisinden tek döngülü CV ile alınan hız taraması voltamogramları

Her bir tarama hızına karşı elde edilen voltamogramın AB yükseltgenme pik akımı değeri okundu. Tarama hızına (ν) karşı (Şekil 31A) ve tarama hızının kareköküne ($\nu^{1/2}$) karşı (Şekil 31B) pik akımı (I_p) değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 31A'da elde edilen doğrusal grafiğe ait regresyon denklemi Eşitlik 9'da verildi. Ayrıca, elektrot yüzeyi üzerindeki AB'nin redoks reaksiyonunu daha iyi değerlendirmek için $\log I_p$ ve $\log \nu$ arasında bir grafik oluşturuldu. Elde edilen doğrusal grafiğe ait denklem Eşitlik 10'da verildi.

$$I_p (\mu\text{A}) = 0.0014 \nu (\text{mV s}^{-1}) + 0.04 \quad (r = 0.997) \quad (\text{Eşitlik 9})$$

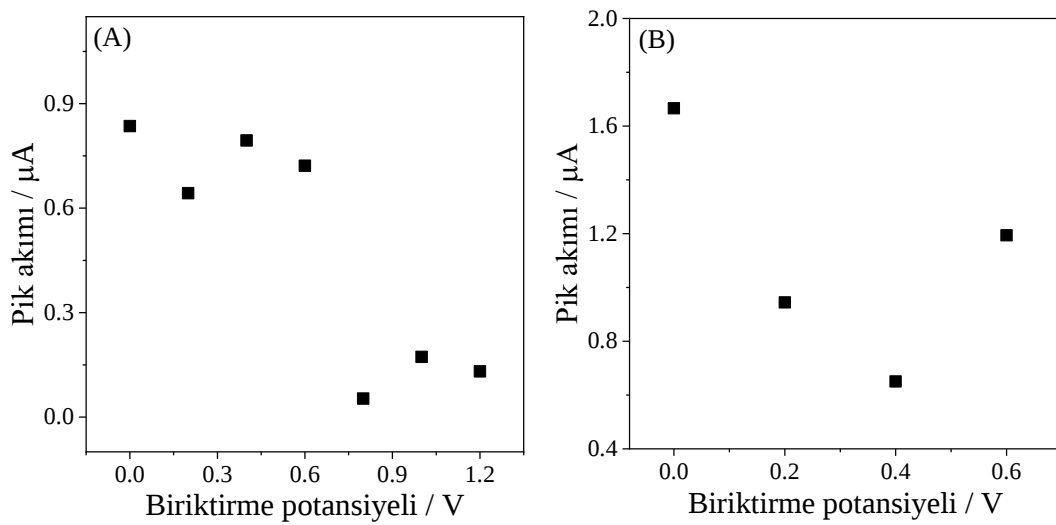
$$\log I_p (\mu\text{A}) = 0.70 \log \nu (\text{mV s}^{-1}) - 2.14 \quad (r = 0.991) \quad (\text{Eşitlik 10})$$



Şekil 31. CV yöntemi ile (A) tarama hızına ve (B) tarama hızının kareköküne karşı pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen pik akımı grafikleri

4.3.4. Sıyırma Parametrelerinin Optimizasyonu

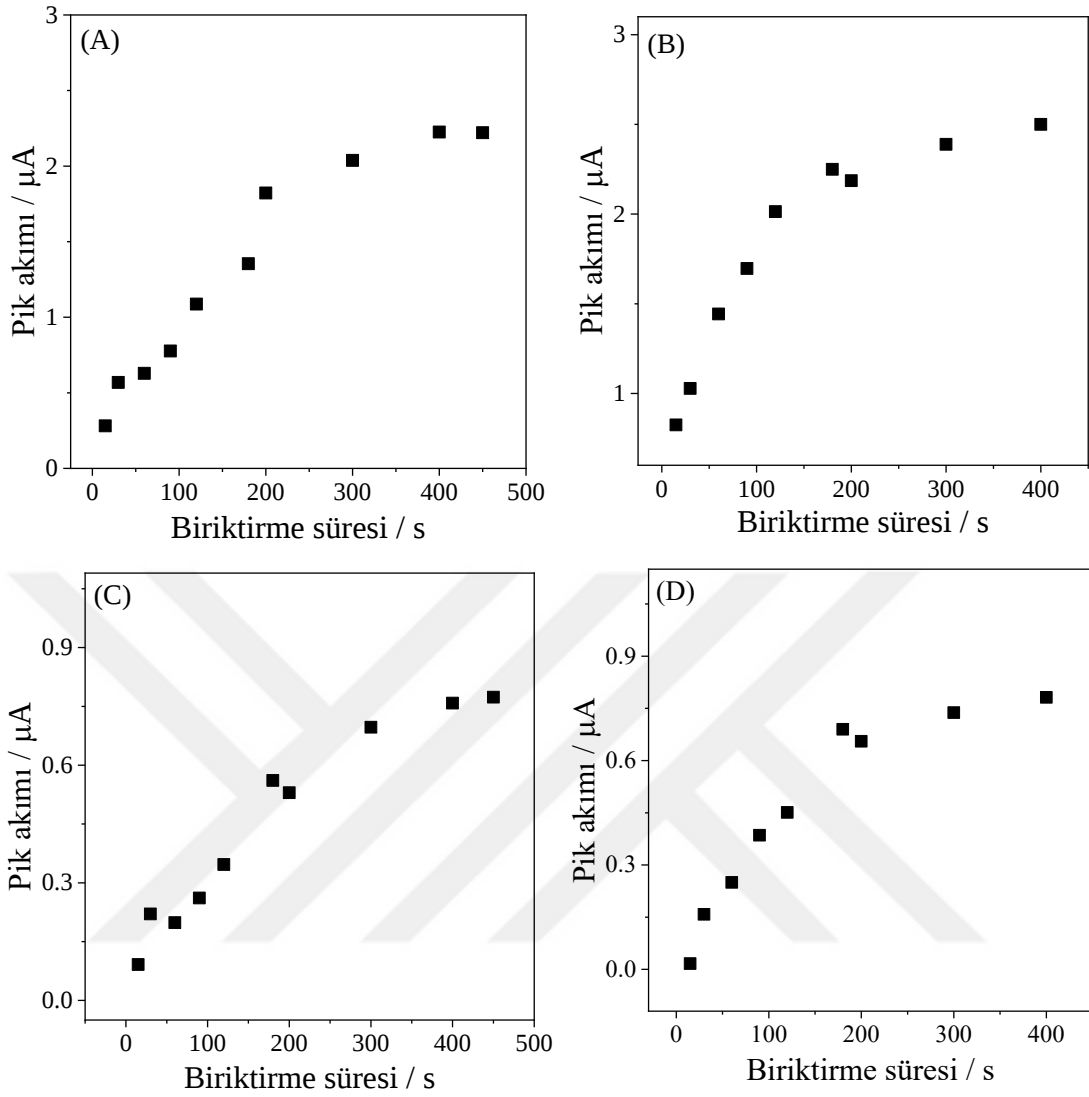
AB'nin DPSV ve SWSV yöntemleri ile kantitatif analiz çalışmaları için sıyırma parametreleri optimize edildi. Bu amaçla, pH 7.0 FT içerisinde 1.0×10^{-5} M AB çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltide öncelikle karıştırma hızı 100 rpm'de ve biriktirme süresi 60 s'de sabit tutularak biriktirme potansiyeli değiştirildi ve en yüksek pik akımının elde edildiği biriktirme potansiyeli belirlendi. Şekil 32A'da DPSV için ve Şekil 32B'de SWSV için biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri verilmiştir.



Şekil 32. (A) DPSV ve (B) SWSV yöntemleri ile pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB çözeltisinden elde edilen biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri

Şekil 32'deki biriktirme potansiyeli grafiklerinden, en yüksek AB pik akımlarının DPSV ve SWSV yöntemleri için 0.0 V'de elde edildiği görüldü. Sonraki aşamada, pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB çözeltisinde her iki yöntem için 100 rpm karıştırma hızı ve 0.0 V biriktirme potansiyeli sabit tutularak biriktirme süresi değiştirildi (Şekil 33A ve 33C). İdeal biriktirme süresi DPSV için 300 s olarak belirlendi. Bu süreyi azaltmak amacıyla karıştırma hızı optimize edildi. Bu amaçla, 0.0 V biriktirme potansiyeli koşulunda, biriktirme süresi 120 s'de tutularak 100, 250, 500 ve 750 rpm karıştırma hızları için DPSV voltamogramları alındı. DPSV için 300 s ve 100 rpm koşullarında elde edilen pik akımı, 120 s ve 500 rpm koşullarında elde edilebildi. İdeal karıştırma hızı DPSV için 500 rpm olarak seçilerek biriktirme süresi ile pik akımının değişimi incelendi (Şekil 33B). Pik akımının 120 s'ye kadar doğrusal bir artış gösterdiği ve ardından hemen hemen sabit kaldığı görüldü. Bu nedenle, DPSV yöntemi için 0.0 V biriktirme potansiyeli, 120 s biriktirme süresi ve 500 rpm karıştırma hızı, ideal biriktirme koşulları olarak belirlendi.

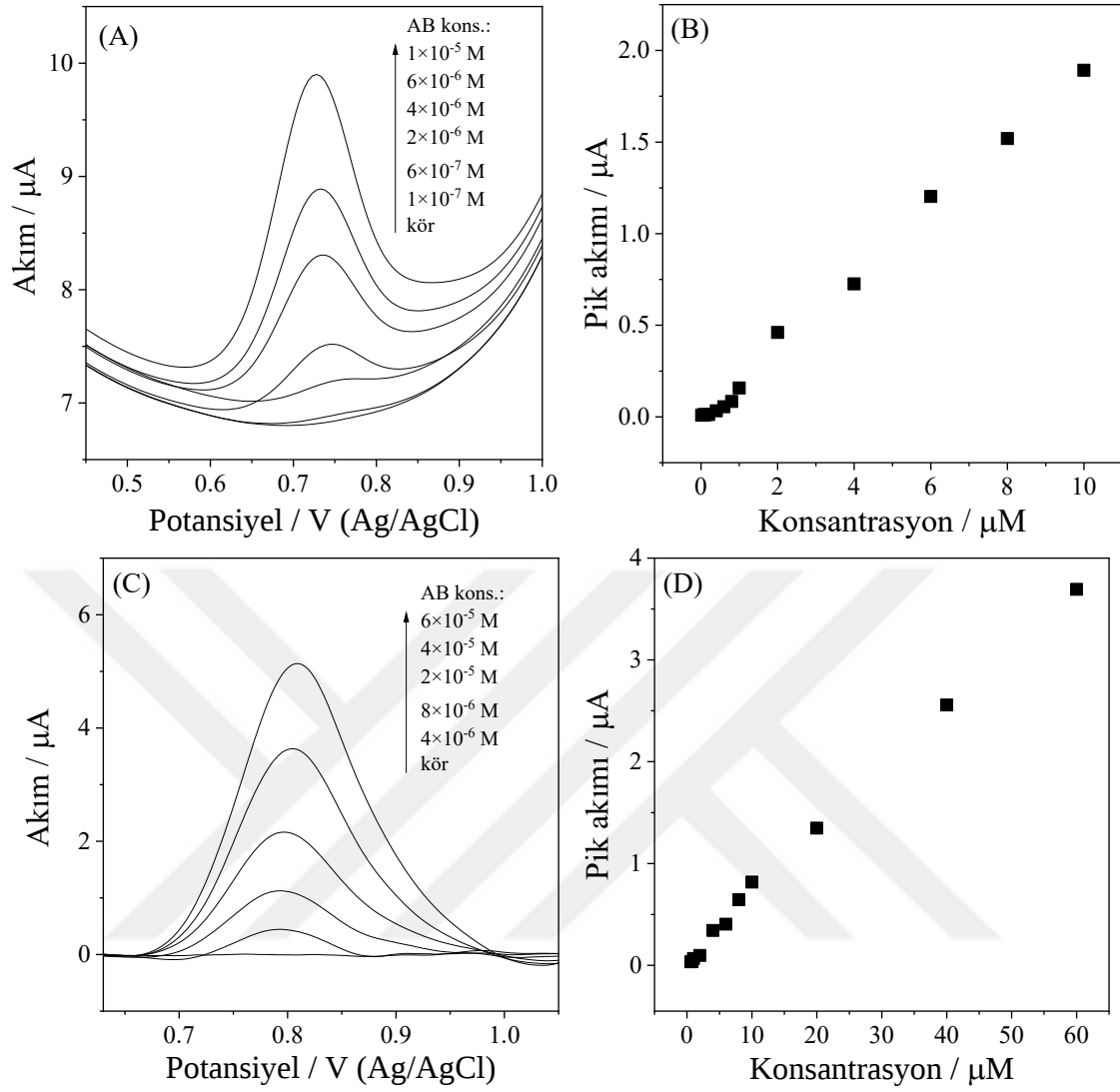
SWSV için yapılan biriktirme süresinin optimizasyonu deneylerinde tüm süreler için pH 7.0 FT ortamında piklerde yarıma meydana geldi. pH taramasında elde edilen voltamogramların pik simetrisi ve pik yükseklikleri dikkate alınarak FT'dan sonra en yüksek pik akımını veren pH 5.5 AT ortamında biriktirme süresi optimize edilmeye çalışıldı. pH 7.0 FT ortamında görülen yarıma, pH 5.5 AT ortamında gözlenmedi. Bu nedenle, SWSV için biriktirme süresinin optimizasyon deneyi pH 5.5 AT ortamında yapıldı. İdeal biriktirme süresi SWSV için 300 s olarak belirlendi. Ardından karıştırma hızı optimize edildi. Bu amaçla, 0.0 V biriktirme potansiyeli koşulunda, biriktirme süresi 180 s'de tutularak 100, 250, 500 ve 750 rpm karıştırma hızları için SWSV voltamogramları alındı. SWSV için 300 s ve 100 rpm koşullarında elde edilen pik akımı, 180 s ve 250 rpm koşullarında elde edilebildi. İdeal karıştırma hızı SWSV için 250 rpm olarak seçilerek biriktirme süresi ile pik akımının değişimi incelendi (Şekil 33D). Pik akımının 180 s'ye kadar doğrusal bir artış gösterdiği ve ardından hemen hemen sabit kaldığı görüldü. Bu nedenle, SWSV yöntemi için 0.0 V biriktirme potansiyeli, 180 s biriktirme süresi ve 250 rpm karıştırma hızı, ideal biriktirme koşulları olarak belirlendi.



Şekil 33. (A ve B) DPSV ile pH 7.0 FT ve (C ve D) SWSV ile pH 5.5 AT içerisindeki 1.0×10^{-5} M AB çözeltilerinden (A ve C) 100 rpm ve (B ve D) 500 rpm karıştırma hızlarında elde edilen biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri

4.3.5. Kalibrasyon Çalışması

Kantitatif analiz çalışması, ideal biriktirme koşullarındaki DPSV ve SWSV yöntemleri ile yapıldı. Kalibrasyon çalışmasında, DPSV için pH 7.0 FT içerisinde ve SWSV için pH 5.5 AT içerisinde 6.0×10^{-9} ile 1.0×10^{-4} M aralığında AB çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen verilere göre, akım değeri okunabilen ilk AB piki DPSV için 2.0×10^{-8} M'de ve SWSV için 6.0×10^{-7} M'de gözlemlendi. AB pikinin konsantrasyondaki artış ile değişimi Şekil 34'te ve kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler Tablo 17'de gösterildi.



Şekil 34. (A ve B) pH 7.0 FT ve (C ve D) pH 5.5 AT içerisindeki AB çözeltilerinden elde edilen (A) DPS ve (C) temel çizgi düzeltilmesi yapılmış SWS voltamogramları. (B) DPSV ve (D) SWSV için AB konsantrasyonuna karşı pik akımı grafikleri

Tablo 17. AB'nin PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV ve SWSV yöntemleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri

	DPSV	SWSV
Pik potansiyeli (mV)	726	804
Doğrusal aralık (μM)	0.02 – 10	0.6 – 60
Eğim, m ($\mu A \mu M^{-1}$)	0.19	0.07
Kesim noktası (μA)	-1.81×10^{-2}	8.27×10^{-2}
Korelasyon katsayısı, r	0.996	0.993
Teşhis sınırı, LOD (μM)	1.77×10^{-3}	6.70×10^{-2}
Tayin sınırı, LOQ (μM)	5.36×10^{-3}	2.03×10^{-1}

Geliştirilen yöntemlerin kesinliği tekrar edilebilirlik çalışmaları ile değerlendirildi. Bu amaçla DPSV için pH 7.0 FT içerisinde 8.0×10^{-6} M ve SWSV için pH 5.5 AT içerisinde 4.0×10^{-5} M olarak hazırlanan AB çözeltilerinde gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneyleri yapıldı. Her bir yöntem için hazırlanan üçer adet AB çözeltisinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %RSD oranı hesaplandı. Sonuçlar Tablo 18’de verildi.

Tablo 18. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak DPSV için pH 7.0 FT ve SWSV için pH 5.5 AT içerisindeki AB çözeltilerinden elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPSV</u>		<u>SWSV</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.723	0.718	0.803	0.803
		0.723	0.728	0.803	0.805
		0.728	0.728	0.803	0.808
		0.728	0.728	0.805	0.803
		0.728	0.728	0.805	0.803
	Ortalama (V)	0.726	0.726	0.804	0.804
	s	0.0028	0.0045	0.0013	0.0022
	%RSD	0.38	0.62	0.17	0.27
Pik akımı	Veriler (μ A)	1.7734	1.7734	2.5225	2.5573
		1.7955	1.7730	2.5311	2.4767
		1.7730	1.8243	2.5153	2.5225
		1.7878	1.7874	2.5223	2.5311
		1.7924	1.7634	2.5573	2.5573
	Ortalama (μ A)	1.7844	1.7843	2.5297	2.5290
	s	0.0106	0.0239	0.0164	0.0331
	%RSD	0.59	1.34	0.65	1.31

4.3.6. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğu, AB’nin farmasötik preparatlardan tayini ve geri kazanım çalışmaları ile araştırıldı. Farmasötik preparatlardan tayin çalışması için dozaj formunda AB kullanılarak DPSV için pH 7.0 FT içerisinde 8.0×10^{-6} M ve SWSV için pH 5.5 AT içerisinde 4.0×10^{-5} M AB içeren üçer adet çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerden elde edilen voltamogramların pik potansiyeli ve pik akımı değerleri okundu. Pik akımları

kullanılarak hesaplanan AB miktarı ile AB'nin dozaj formunda bildirilen miktarı karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 19'da gösterildi.

Geri kazanım çalışmasında DPSV yöntemi için tablet formundan hazırlanan 8.0×10^{-6} M AB çözeltisinin üzerine toplam AB konsantrasyonu 1.0×10^{-5} M olacak şekilde saf AB çözeltisi; SWSV yöntemi için ise tablet formundan hazırlanan 4.0×10^{-5} M AB çözeltisinin üzerine toplam AB konsantrasyonu 6.0×10^{-5} M olacak şekilde saf AB çözeltisi ilave edilerek üçer adet çözelti hazırlandı. Bu çözeltiler ile alınan voltamogramların pik akımı değerleri okundu. Pik akımı değerlerinden beşer adet seçilerek DPSV ve SWSV için %RSD ve yüzde geri kazanım oranları hesaplandı (Tablo 20).

Tablo 19. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak DPSV için pH 7.0 FT ve SWSV için pH 5.5 AT içerisindeki AB çözeltilerinden elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri

		DPSV	SWSV
Farmasötik preparatlardan tayin	Tablette beyan edilen AB miktarı (mg)	13.888	13.888
	Bulunan AB miktarları (mg)	13.973	14.006
		13.823	14.048
		13.906	13.812
		13.749	13.769
		13.865	13.999
	Bulunan ortalama AB miktarı (mg)	13.863	13.927
	s	0.084	0.127
	%RSD	0.61	0.91
	%Bağıl hata	-0.18	0.28
	t-testi	0.38	
	F-testi	0.45	

Teorik olarak t-testi: 2.78 ve F-testi: 6.39 (%95 güven seviyesi için)

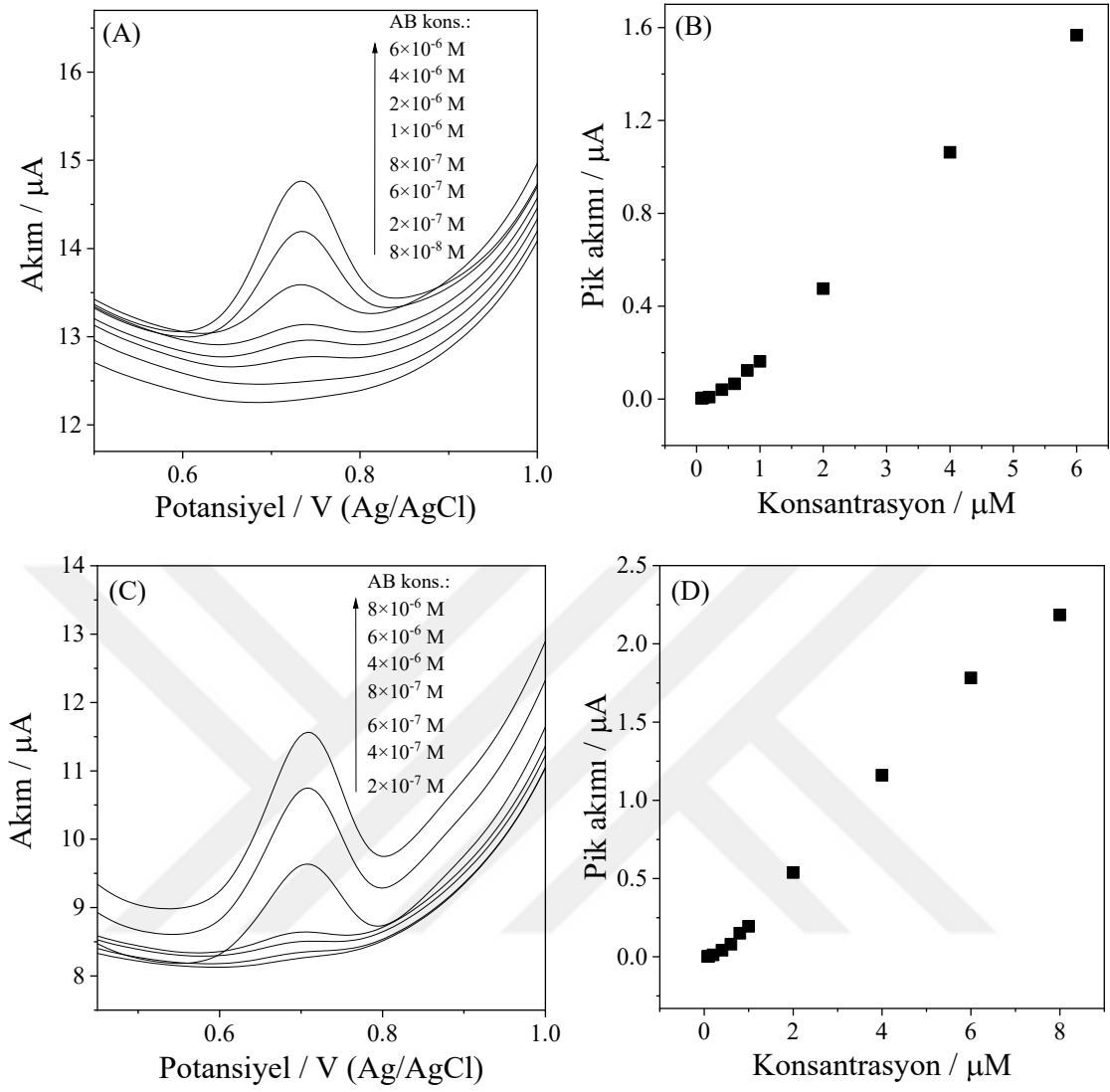
Tablo 20. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak DPSV için pH 7.0 FT ve SWSV için pH 5.5 AT içerisindeki AB çözeltilerinden elde edilen geri kazanım çalışması verileri

	DPSV	SWSV
İlave edilen AB konsantrasyonu (μM)	2.0000	20.000
Bulunan AB konsantrasyonu (μM)	1.9654	19.735
	1.9940	19.861
	2.0120	20.206
	1.9759	19.973
	1.9698	20.062
Bulunan ortalama AB konsantrasyonu (μM)	1.9835	19.967
Ortalama geri kazanım (%)	99.18	99.84
s	0.97	0.91
%RSD	0.98	0.91
%Bağıl hata	-0.83	-0.17

4.3.7. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması

AB için yapılan analiz çalışmaları sonucu elde edilen verilerin insan serumu ve yapay idrar ortamındaki uygulanabilirliğini araştırmak amacıyla Bölüm 3.5.5.'te belirtildiği şekilde serum ve idrar çözeltileri hazırlandı. Saf AB için yapılan kalibrasyon çalışmasında olduğu gibi AB içeren serum ve idrar analizlerinde de destek elektrolit olarak DPSV için pH 7.0 FT ve SWSV için pH 5.5 AT kullanıldı.

Serum ve idrar örnekleri için yapılan kalibrasyon deneyleri için serum ve idrar içermeyen AB çözeltilerinin Tablo 17'de belirtilen doğrusal aralık verileri dikkate alınarak, DPSV için pH 7.0 FT içerisinde 2.0×10^{-8} ile 1.0×10^{-5} M aralığında ve SWSV için pH 5.5 AT içerisinde 8.0×10^{-7} ile 6.0×10^{-5} M aralığında serum ve idrar çalışma çözeltileri hazırlandı. DPSV ile elde edilen voltamogramlara göre pik akımı okunabilen en düşük konsantrasyon serum ve idrar çözeltileri için 8.0×10^{-8} M olarak bulundu. Serum ve idrar çözeltilerinde SWSV yöntemi ile yapılan kalibrasyon çalışmalarında doğrusal kalibrasyon grafikleri elde edilemedi. Bu nedenle AB içeren serum ve idrar çözeltileri ile kantitatif analiz çalışmaları yalnızca DPSV yöntemi için uygulandı. DPSV ile serum ve idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar ve konsantrasyona karşı pik akımı grafikleri Şekil 35'te ve kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler Tablo 21'de verildi.



Şekil 35. DPSV yöntemi ile AB içeren pH 7.0 FT içerisindeki (A ve B) serum ve (C ve D) idrar çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar ve konsantrasyona karşı pik akımı grafikleri

Tablo 21. PNGB/MWCNT/GCE ile DPSV yöntemi kullanılarak AB içeren serum ve idrar çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	Serum	İdrar
Pik potansiyeli (mV)	737	717
Doğrusal aralık (μM)	0.08 – 6	0.08 – 8
Eğim, m ($\mu A \mu M^{-1}$)	0.27	0.29
Kesim noktası (μA)	-6.25×10^{-2}	-5.31×10^{-2}
Korelasyon katsayısı, r	0.996	0.996
Teşhis sınırı, LOD (μM)	1.99×10^{-3}	1.60×10^{-3}
Tayin sınırı, LOQ (μM)	6.03×10^{-3}	4.86×10^{-3}

Tekrar edilebilirlik deneyleri için 4.0×10^{-6} M AB içeren serum ve idrar çalışma çözeltileri hazırlandı. Üçer ayrı çözeltiden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerinin gün içi ve günler arası %RSD oranı hesaplandı. Sonuçlar Tablo 22’de verildi.

Geri kazanım çalışması için, 4.0×10^{-6} M AB içeren serum ve idrar çözeltilerinin üzerine toplam AB konsantrasyonu 6.0×10^{-6} M olacak şekilde saf AB çözeltisi eklendi ve pH 7.0 FT ile hacim tamamlandı. Üçer adet olarak hazırlanan çalışma çözeltilerinden elde edilen sonuçlar Tablo 23’te verildi.

Tablo 22. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki AB içeren serum ve idrar çözeltilerinden DPSV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>Serum</u>		<u>İdrar</u>	
		Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.733	0.733	0.713	0.713
		0.738	0.733	0.718	0.718
		0.738	0.738	0.718	0.708
		0.738	0.738	0.718	0.723
		0.738	0.743	0.718	0.723
	Ortalama (V)	0.737	0.737	0.717	0.717
	s	0.0024	0.0048	0.0022	0.0065
	%RSD	0.30	0.65	0.31	0.91
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.96418	0.97135	1.0976	1.0913
		0.96201	0.97009	1.1082	1.0896
		0.96144	0.95507	1.0913	1.0714
		0.95833	0.96418	1.1092	1.1000
		0.97419	0.95833	1.0896	1.1261
	Ortalama (μ A)	0.96403	0.96308	1.0992	1.0957
	s	0.0061	0.0071	0.0092	0.0199
	%RSD	0.63	0.74	0.84	1.82

Tablo 23. PNGB/MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-6} M AB içeren serum ve idrar çözeltilerinden DPSV yöntemi ile elde edilen geri kazanım verileri

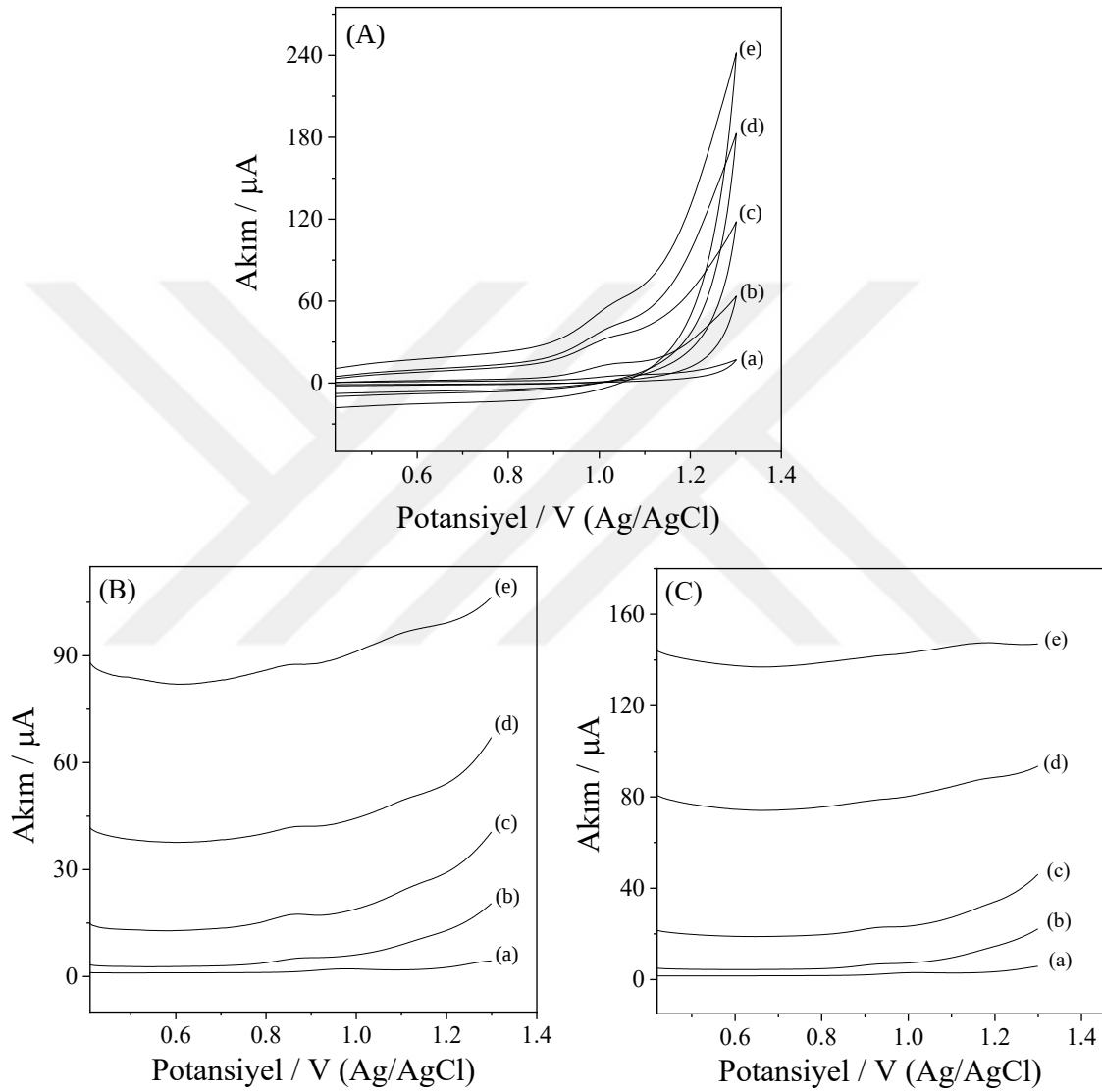
	Serum	İdrar	
Geri kazanım	İlave edilen saf AB konsantrasyonu (μM)	2.0000	2.0000
	Bulunan saf AB konsantrasyonu (μM)	1.9876	1.9985
		2.0075	1.9584
		2.0129	1.9865
		2.0289	1.9535
		2.0280	1.9416
	Bulunan ortalama saf AB konsantrasyonu (μM)	2.0130	1.9677
	Ortalama geri kazanım (%)	100.65	98.39
	s	0.85	1.19
	%RSD	0.84	1.21
%Bağıl hata	0.65	-1.62	

4.4. Bisoprolol Fumarat için Elde Edilen Bulgular

4.4.1. Elektrodun Optimizasyonu

BF etken maddesinin analiz çalışmalarında kullanılacak elektrodu belirlemek amacıyla optimizasyon çalışması yapıldı. Bunun için, MWCNT süspansiyonundan farklı miktarlarda elektrot yüzeyine damlatılarak önce en iyi sonucun alındığı nanotüp miktarı belirlendi. 1, 2, 4 ve 6 μL MWCNT damlatılmış elektrotlarla alınan voltamogramlar Şekil 36'da ve okunan pik akımı değerleri Tablo 24'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre, üç yöntem için de en yüksek pik akımları 2 μL MWCNT ile elde edildi. En uygun nanotüp süspansiyonunun 2 μL olduğu kararlaştırıldıktan sonra, bu miktar sabit tutularak PNGB ile kompozisyonuna bakıldı. Bu amaçla önce temiz GCE yüzeyine 2 μL MWCNT damlatıldı ve yüzey kuruduktan sonra aktive edilerek üzerine PNGB film ile kaplandı. PNGB/MWCNT/GCE ile pH 7.0 FT içerisindeki 8.0×10^{-5} M BF çözeltisinden CV, DPV ve SWV voltamogramları alınarak pik akımı değerleri okundu. Ardından elektrot temizlendi ve yüzeyi PNGB ile kaplandı. Yüzey aktive edildikten sonra üzerine MWCNT süspansiyonundan 2 μL damlatılarak kurumaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan MWCNT/PNGB/GCE ile pH 7.0 FT içerisindeki 8.0×10^{-5} M BF çözeltisinden CV, DPV ve SWV voltamogramları alınarak pik akımı değerleri okundu. Ayrıca, yalnızca MWCNT modifiyeli GCE, yalnızca PNGB modifiyeli GCE ve yalın GCE ile elde edilen

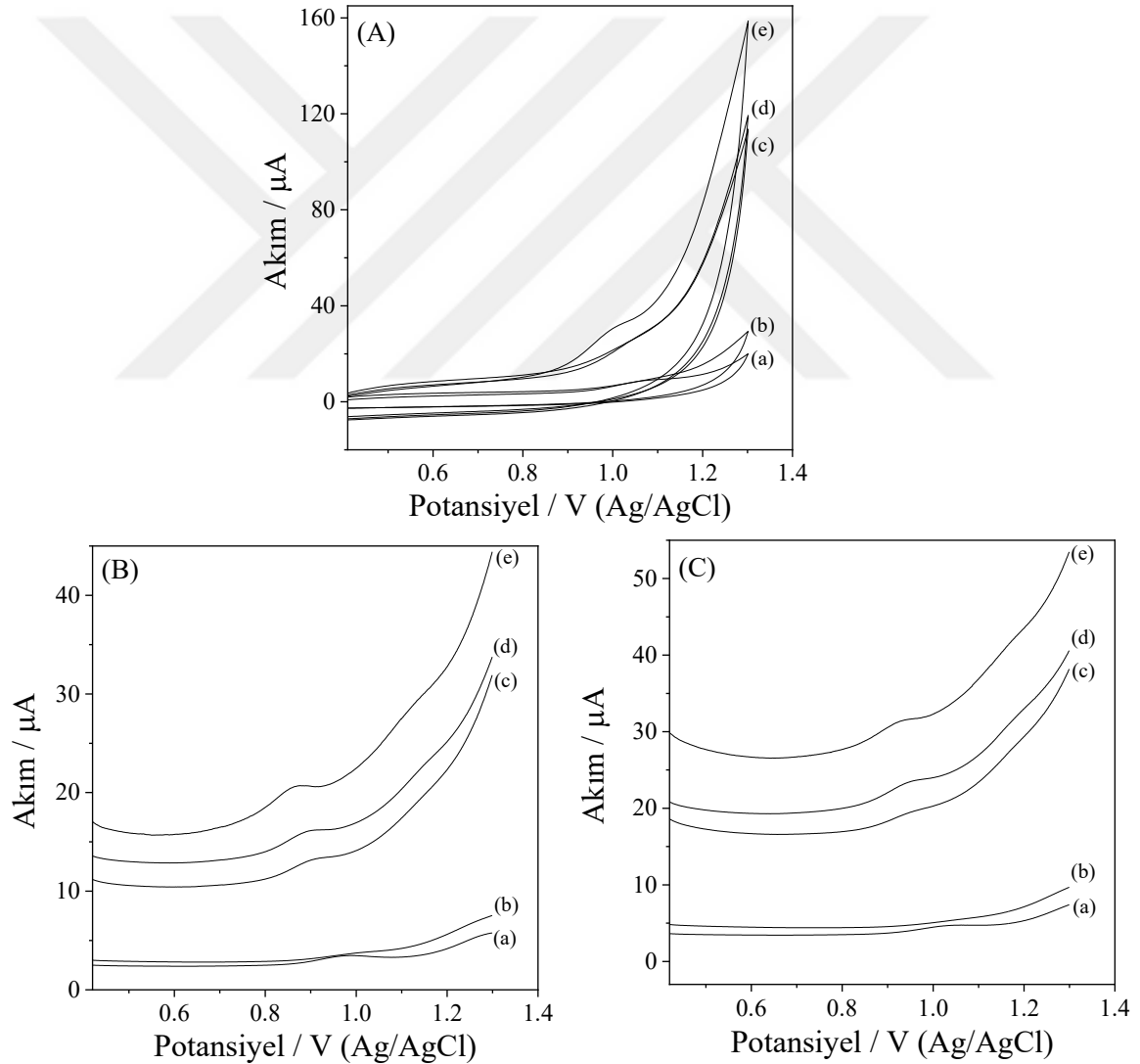
voltamogramların pik akımı değerleri de okundu. Beş farklı elektrot için elde edilen sonuçlar Şekil 37 ve Tablo 25’te verilmiştir. Buna göre PNGB modifikasyonunun, BF pik yüksekliğini olumsuz etkilediği görüldü. Bu nedenle BF’nin analiz çalışmaları, yalnızca MWCNT ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak yapıldı.



Şekil 36. Farklı miktarlarda MWCNT ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 8.0×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın GCE, (b) 1 μL , (c) 2 μL , (d) 4 μL ve (e) 6 μL MWCNT/GCE

Tablo 24. Farklı elektrotlar ile pH 7.0 FT içerisindeki 8.0×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri

	Elektrot	Yöntem		
		CV	DPV	SWV
Pik akımı (μ A)	GCE	0.74	0.60	0.60
	1 μ L MWCNT/GCE	1.97	0.51	0.47
	2 μ L MWCNT/GCE	2.18	1.38	0.82
	4 μ L MWCNT/GCE	1.88	0.91	0.27
	6 μ L MWCNT/GCE	1.82	1.06	0.26



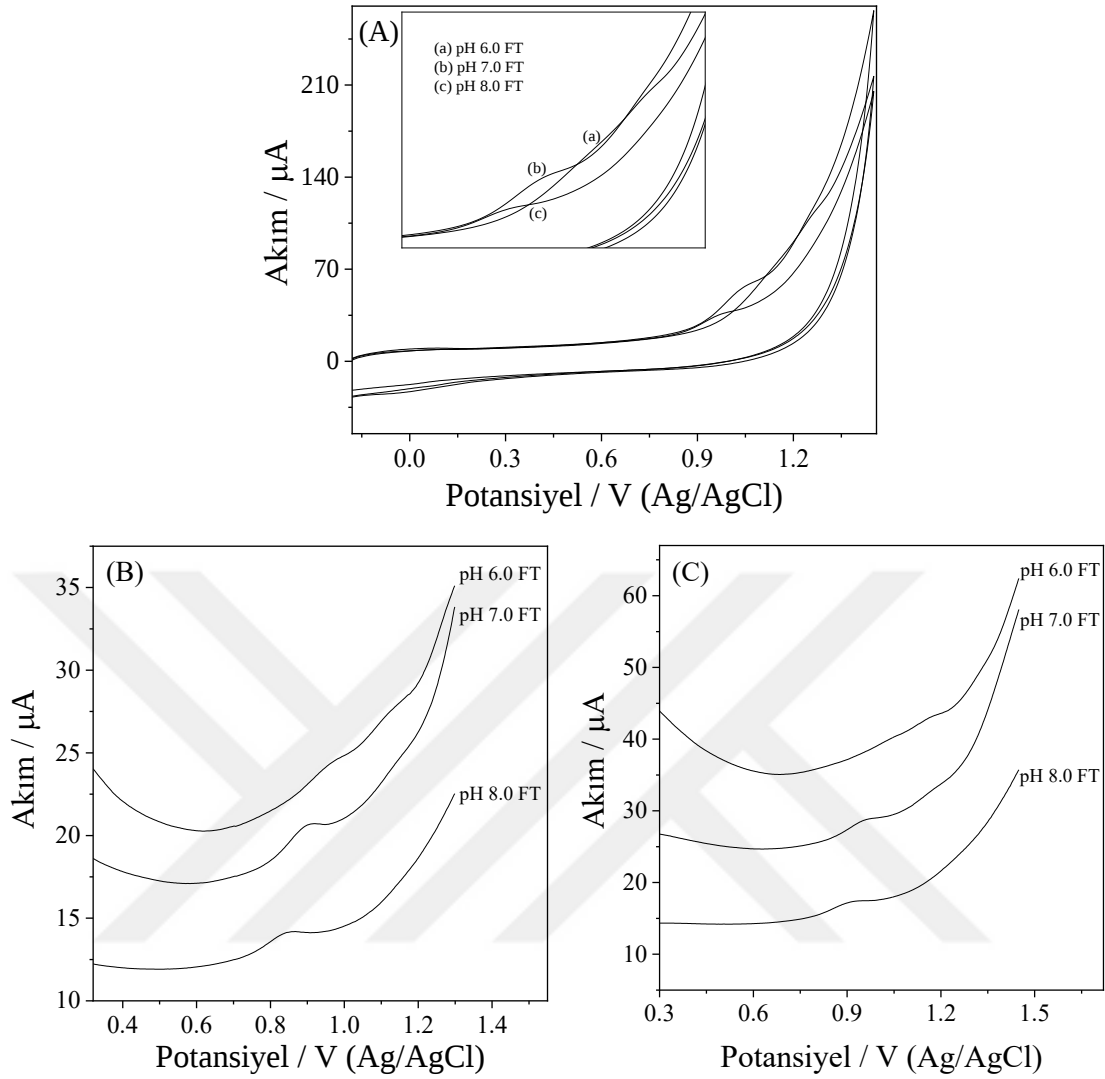
Şekil 37. Farklı miktarlarda MWCNT ve/veya PNGB ile modifiye edilmiş GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 8.0×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemlerinin voltamogramları. (a) Yalın, (b) PNGB, (c) PNGB/2 μ L MWCNT, (d) 2 μ L MWCNT/PNGB ve (e) 2 μ L MWCNT modifiyeli GCE

Tablo 25. Farklı elektrotlar kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki 8.0×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen pik akımı değerleri

	Elektrot	Yöntem		
		CV	DPV	SWV
Pik akımı (μ A)	GCE	0.96	0.49	0.38
	PNGB/GCE	0.49	0.07	0.006
	PNGB/2 μ L MWCNT/GCE	0.14	0.50	0.19
	2 μ L MWCNT/PNGB/GCE	0.59	0.73	0.68
	2 μ L MWCNT/GCE	2.03	1.14	0.80

4.4.2. Destek Elektrolit ve pH Etkisi

BF'nin MWCNT/GCE ile elektrokimyasal analizi için en uygun destek elektrolitin seçilmesi amacıyla pH taraması yapıldı. Bunun için, pH değerleri 2.0 ile 10.0 arasında değişen 0.04 M BRT, 6.0 ile 8.0 arasında değişen 0.2 M FT ve 3.5 ile 5.5 arasında değişen 0.2 M AT çözeltileri içerisinde 1.0×10^{-4} M BF çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin CV, DPV ve SWV voltamogramları alındı. Şekil 38'de BF'nin bazı tampon çözeltiler içerisindeki CV, DPV ve SWV voltamogramları gösterilmiştir. CV voltamogramlarında görüldüğü gibi, farklı tamponlar içerisindeki BF etken maddesi MWCNT/GCE üzerinde yalnızca +0.9 V civarında yükseltgenme yönünde bir pik verdi, indirgenme yönünde ise herhangi bir pik gözlenmedi.



Şekil 38. Farklı pH'lardaki FT içerisindeki 1.0×10^{-4} M BF'nin (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri ile elde edilen voltamogramları

BF çözeltilerinden elde edilen yükseltgenme pik potansiyellerinin tampon pH'sına karşı değişimi Şekil 39'da gösterildi. Tüm tampon çözeltiler içerisinde BF, ardışık oluşan iki pik verdi. Bu iki pikin birbirinden ayrılması asidik tamponlar içerisinde daha zor gerçekleşti ve bu nedenle pik potansiyellerinde düzensiz değişimler gözlemlendi. pH 6.0'dan itibaren özellikle FT ortamında bu iki pikin ayrımı net bir şekilde gerçekleştiği için pH'ya karşı pik potansiyeli grafiklerinde CV ve DPV yöntemlerinde pH 6.0 ile 9.0 arasında bir doğrusallık elde edildi. pH 9.0'dan 10.0'a geçişte doğrusallıkta bir kırılma meydana geldi, bu durum Bölüm 2.3.3'te BF için 9.57 olarak bildirilen pK_a değeri ile uyumludur. pH'ya karşı pik potansiyeli grafiklerinden pH 6.0 ile 9.0 arasında elde edilen denklemler Eşitlik 11-13'te verilmiştir.

CV yöntemi: E_p (mV) = 1541.5 – 70.9 pH ($r = 0.992$)

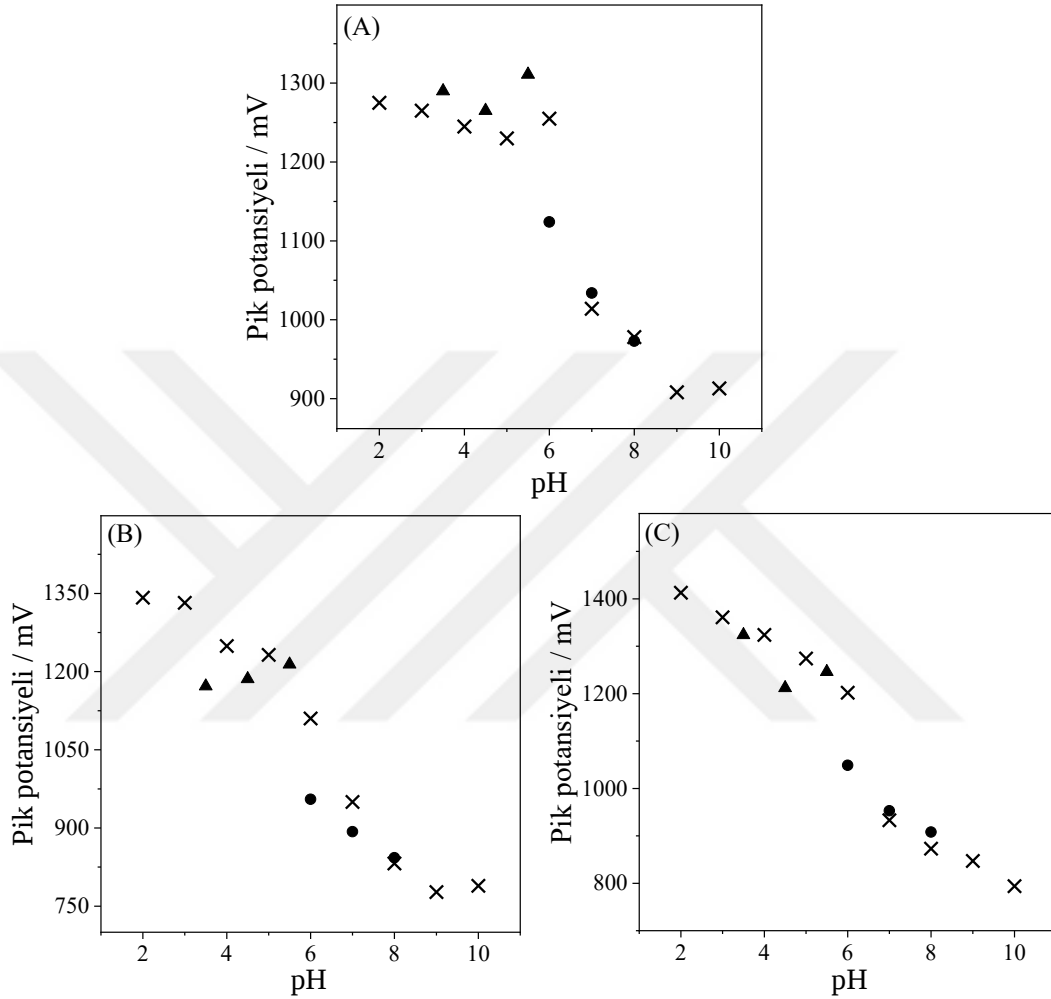
(Eşitlik 11)

DPV yöntemi: E_p (mV) = 1310.5 – 59.5 pH ($r = 0.995$)

(Eşitlik 12)

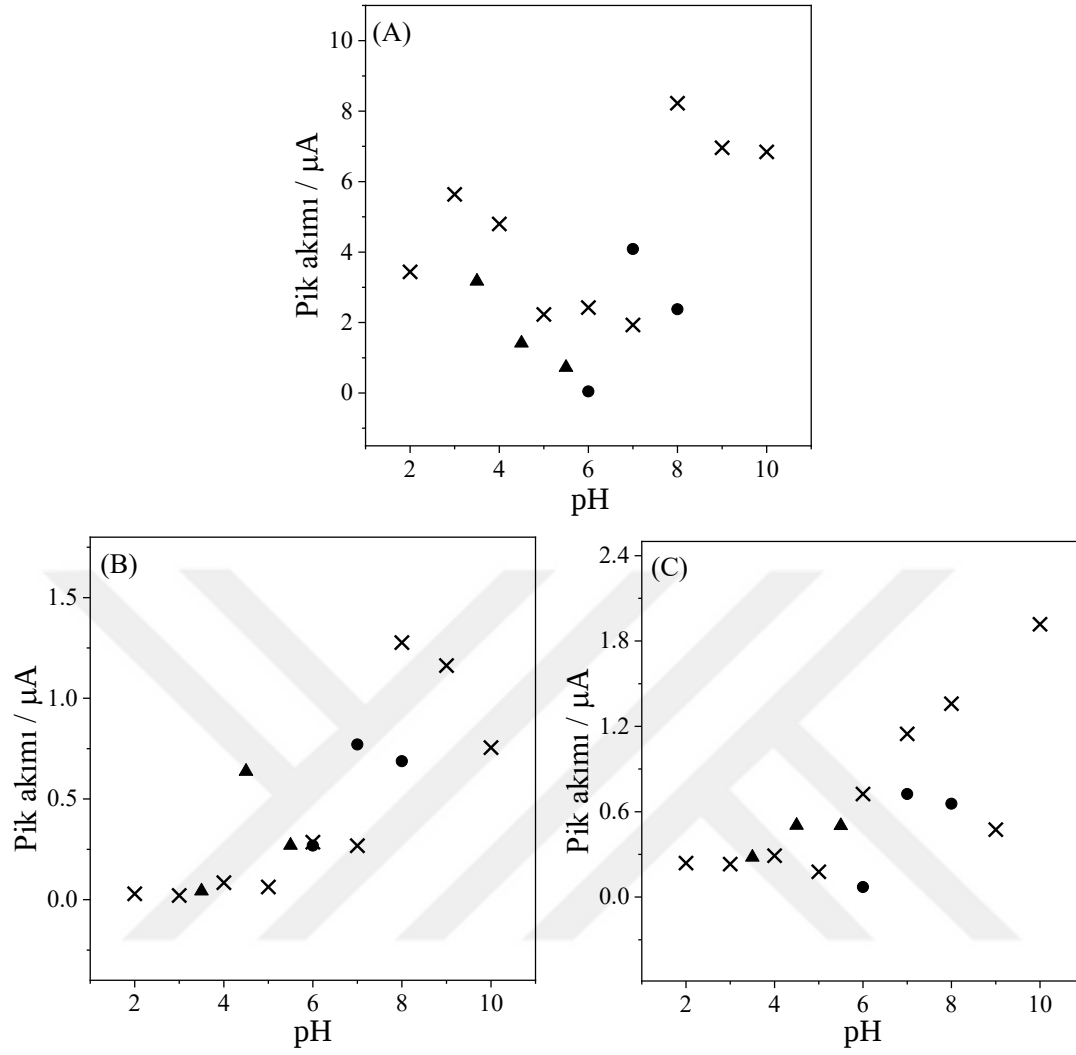
SWV yöntemi: E_p (mV) = 1427.5 – 65.1 pH ($r = 0.976$)

(Eşitlik 13)



Şekil 39. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT (▲), 0.2 M FT (●) ve 0.04 M BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-4} M BF'nin pH'ya karşı pik potansiyeli grafikleri

Her bir yöntem için pH 2.0 ile 10.0 arasında okunan pik akımı değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirildi (Şekil 40). Elde edilen BF pikleri üç yöntem için değerlendirildi ve en yüksek pik akımına sahip en simetrik BF pikinin pH 7.0 FT ortamında elde edildiği belirlendi. Sonraki tüm çalışmalar bu destek elektrolit ortamında gerçekleştirildi.



Şekil 40. (A) CV, (B) DPV ve (C) SWV yöntemleri için 0.2 M AT (▲), 0.2 M FT (●) ve 0.04 M BRT (×) içerisindeki 1.0×10^{-4} M BF'nin pH'ya karşı pik akımı grafikleri

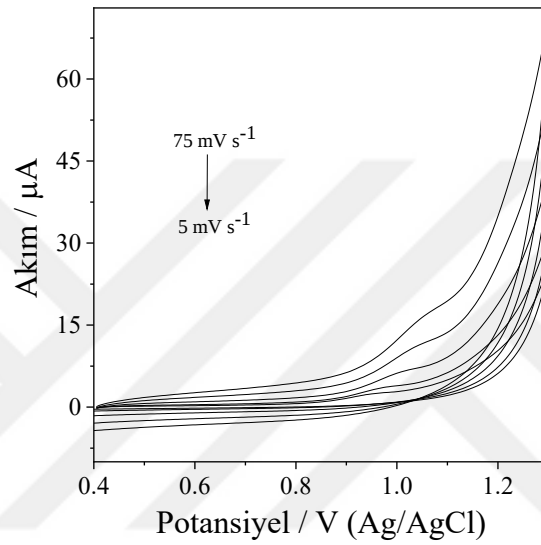
4.4.3. Hız Taraması

BF'nin yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon ya da adsorpsiyon kontrollü olması durumunu belirlemek amacıyla hız taraması çalışması yapıldı. Bu amaçla, pH 7.0 FT içerisinde 1.0×10^{-5} M BF çalışma çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti ile 200 mV s^{-1} ile 5 mV s^{-1} tarama hızlarında tek döngülü CV taraması yapıldı. Elde edilen pik akımı değerleri tarama hızına ve tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirildi. Her iki grafikte de doğrusal bir değişim elde edilemedi. Yapılan tekrar deneyleri de aynı sonucu verdi. Bununla birlikte, tarama hızının 75 mV s^{-1} 'den başlatılarak 5 mV s^{-1} 'e değişmesi ile bir doğrusallık elde edildi. 75 mV s^{-1} 'den 5 mV s^{-1} 'e değişen tarama hızlarında tek döngülü CV taraması ile elde edilen voltamogramlar Şekil 41'de ve bu voltamogramlardan okunan pik akımlarının tarama hızına

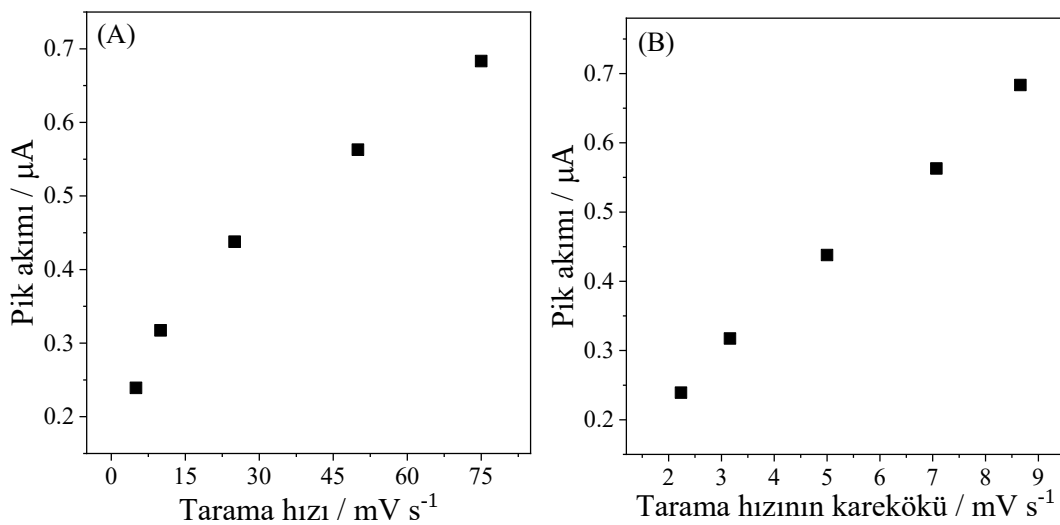
ve tarama hızının kareköküne karşı değişimi grafikleri Şekil 42’de gösterildi. Şekil 42B’de elde edilen doğrusal grafiğe ait regresyon denklemi Eşitlik 14’te verildi. Ayrıca, elektrot yüzeyi üzerindeki BF’nin redoks reaksiyonunu daha iyi değerlendirmek için $\log I_p$ ve $\log v$ arasında bir grafik oluşturuldu. Elde edilen doğrusal grafiğe ait denklem Eşitlik 15’te verildi.

$$I_p (\mu A) = 0.0674 v (\text{mV s}^{-1}) + 0.10 (r = 0.998) \quad (\text{Eşitlik 14})$$

$$\log I_p (\mu A) = 0.38 \log v (\text{mV s}^{-1}) - 0.88 (r = 0.998) \quad (\text{Eşitlik 15})$$



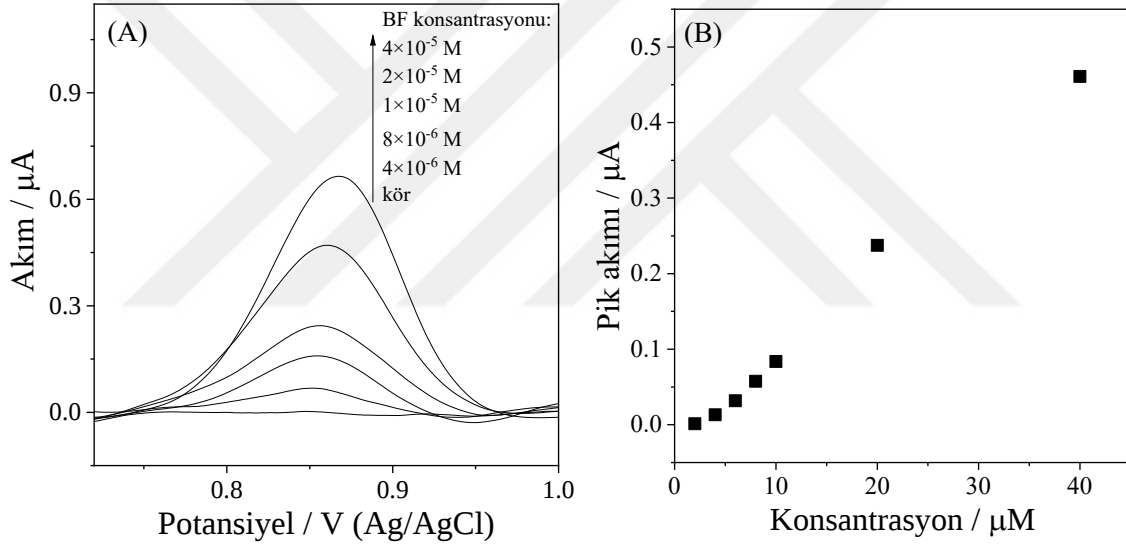
Şekil 41. pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M BF çözeltilerinden tek döngülü CV ile alınan hız taraması voltamogramları



Şekil 42. CV yöntemi ile (A) tarama hızına ve (B) tarama hızının kareköküne karşı pH 7.0 FT içerisindeki 1.0×10^{-5} M BF çözeltisinden elde edilen pik akımı grafikleri

4.4.4. Kalibrasyon Çalışması

Kantitatif analiz çalışmasının DPV ve SWV yöntemleri ile yapılması kararlaştırıldıktan sonra kalibrasyon çalışmasına geçildi. Kalibrasyon deneyleri pH 7.0 FT içerisinde hazırlanan DPV için 6.0×10^{-7} ile 6.0×10^{-5} M aralığındaki on bir farklı çözelti ile ve SWV için 4.0×10^{-6} ile 1.0×10^{-4} M aralığındaki dokuz farklı çözelti ile yapıldı. Pik akımı değeri okunabilen ilk BF piki DPV için 2.0×10^{-6} M'da ve SWV için 1.0×10^{-5} M'da gözlemlendi. SWV yönteminde herhangi bir doğrusal konsantrasyon aralığı elde edilemedi. Bu nedenle BF'nin kantitatif analiz çalışması DPV yöntemi ile gerçekleştirildi. Şekil 43'te DPV yöntemi ile yapılan kalibrasyon çalışması için BF konsantrasyonundaki artış ile pikteki değişim gösterilmektedir. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler Tablo 26'da verildi.



Şekil 43. DPV yöntemi ile pH 7.0 FT içerisindeki BF çözeltilerinden (A) temel çizgi düzeltilmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar ve (B) konsantrasyona karşı pik akımı grafiği

Tablo 26. BF'nin MWCNT/GCE ile DPV yöntemi kullanılarak elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV
Pik potansiyeli (mV)	869
Doğrusal aralık (μM)	2 – 40
Eğim, m ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.0126
Kesim noktası (μA)	-3.49×10^{-2}
Korelasyon katsayısı, r	0.995
Teşhis sınırı, LOD (μM)	1.07×10^{-1}
Tayin sınırı, LOQ (μM)	3.22×10^{-1}

Yöntemin kesinliği tekrar edilebilirlik çalışmaları ile değerlendirildi. Bu amaçla gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneylerinde kullanılmak üzere üçer adet pH 7.0 FT içerisinde 1.0×10^{-5} M BF çözeltisi hazırlandı. Elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %RSD oranı hesaplandı. Sonuçlar Tablo 27’de verildi.

Tablo 27. MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki BF çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

	Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.870
		0.866
		0.870
		0.868
		0.870
		0.870
		0.870
Pik akımı	Ortalama (V)	0.869
	s	0.869
	%RSD	0.0014
		0.0019
		0.16
		0.22
Pik akımı	Veriler (μA)	0.11288
		0.11220
		0.11340
		0.11108
		0.11515
		0.11321
		0.11356
		0.11515
		0.11449
Pik akımı	Ortalama (μA)	0.11449
		0.11323
	s	0.11390
	%RSD	9.11×10^{-4}
		1.66×10^{-3}
		0.80
		1.46

4.4.5. Farmasötik Dozaj Formlarından Tayin ve Geri Kazanım Çalışmaları

Geliştirilen yönteminin doğruluğu, BF'nin farmasötik preparatlardan tayini ve geri kazanım çalışmaları ile araştırıldı. Farmasötik preparatlardan tayin çalışması için dozaj formunda BF kullanılarak pH 7.0 FT içerisinde 1.0×10^{-5} M BF içeren üç adet çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerden elde edilen voltamogramların pik potansiyeli ve pik akımı değerleri okundu. Pik akımları kullanılarak, hesaplanan BF miktarı ile BF'nin dozaj formunda bildirilen miktarı karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 28'de gösterildi.

Geri kazanım çalışmasında ise tablet formundan hazırlanan 1.0×10^{-5} M BF çözeltisinin üzerine toplam BF konsantrasyonu 2.0×10^{-5} M olacak şekilde saf BF çözeltisi eklendi. Bu şekilde hazırlanan üç adet çözeltiden alınan voltamogramların pik akımı değerleri okundu. Bu değerlerden beş adet seçilerek %RSD ve yüzde geri kazanım oranları hesaplandı (Tablo 29).

Tablo 28. MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki BF çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen farmasötik preparatlardan tayin çalışması verileri

		DPV
Farmasötik preparatlardan tayin	Tablette beyan edilen BF miktarı (mg)	5.000
	Bulunan BF miktarları (mg)	4.683
		4.651
		4.790
		4.662
		4.808
	Bulunan ortalama BF miktarı (mg)	4.719
	s	0.074
	%RSD	1.57
	%Bağıl hata	-5.62

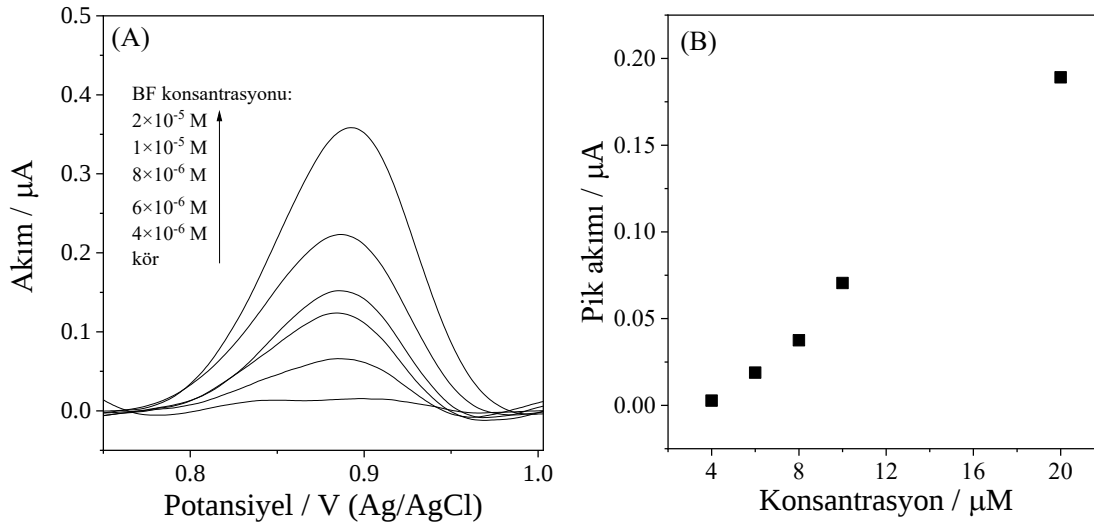
Tablo 29. MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki BF çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen geri kazanım çalışması verileri

	DPV
İlave edilen BF konsantrasyonu (μM)	10.0000
Bulunan BF konsantrasyonları (μM)	10.0426
	9.7742
	9.7489
	9.8606
	9.6918
Bulunan ortalama BF konsantrasyonu (μM)	9.8236
Ortalama geri kazanım (%)	98.23
s	1.37
%RSD	1.39
%Bağıl hata	-1.76

4.4.6. Biyolojik Sıvılardan Tayin Çalışması

BF için yapılan analiz çalışmaları sonucu elde edilen verilerin insan serumu ve yapay idrar ortamındaki uygulanabilirliğini araştırmak amacıyla Bölüm 3.5.5.'te belirtildiği şekilde serum ve idrar çözeltileri hazırlandı. Saf BF için yapılan kalibrasyon çalışmasında olduğu gibi BF içeren serum ve idrar analizlerinde de destek elektrolit olarak pH 7.0 FT kullanıldı.

Serum ve idrar örnekleri için yapılan kalibrasyon deneyleri için, serum ve idrar içermeyen BF çözeltilerinin Tablo 26'da belirtilen doğrusal aralık verisi dikkate alınarak, 1.0×10^{-6} ile 6.0×10^{-5} M aralığında pH 7.0 FT içerisinde sekiz farklı konsantrasyonda serum ve idrar çalışma çözeltileri hazırlandı. Serum çözeltilerden elde edilen voltamogramlara göre pik akımı okunabilen en düşük konsantrasyon 4.0×10^{-6} M olarak bulundu. İdrar çözeltileri ile yapılan kalibrasyon çalışmasında doğrusal bir konsantrasyon aralığı elde edilemedi. Bu nedenle, DPV yöntemi ile biyolojik sıvılardan tayin çalışması yalnızca BF içeren serum çözeltileri için uygulandı. Elde edilen voltamogramlar ve konsantrasyona karşı pik akımı grafiği Şekil 44'te gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler Tablo 30'da verildi.



Şekil 44. DPV yöntemi ile pH 7.0 FT içerisindeki BF içeren serum çözeltilerinden (A) temel çizgi düzeltmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar ve (B) konsantrasyona karşı pik akımı grafiği

Tablo 30. MWCNT/GCE ile DPV yöntemi kullanılarak BF içeren serum çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV
Pik potansiyeli (mV)	894
Doğrusal aralık (μM)	4 – 20
Eğim, m ($\mu A \mu M^{-1}$)	0.0119
Kesim noktası (μA)	-5.08×10^{-2}
Korelasyon katsayısı, r	0.996
Teşhis sınırı, LOD (μM)	1.43×10^{-1}
Tayin sınırı, LOQ (μM)	4.34×10^{-1}

Tekrar edilebilirlik deneyleri için pH 7.0 FT içerisinde $8.0 \times 10^{-6} M$ BF içeren serum çalışma çözeltileri hazırlandı. Üç ayrı çözeltiden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerinin gün içi ve günler arası %RSD oranı hesaplandı. Sonuçlar Tablo 31’de verildi.

Geri kazanım çalışması için, toplam BF konsantrasyonu $1.0 \times 10^{-5} M$ olacak şekilde $8.0 \times 10^{-6} M$ BF içeren serum çalışma çözeltisi üzerine saf BF çözeltisi eklendi ve pH 7.0 FT ile hacim tamamlandı. Üç adet olarak hazırlanan çalışma çözeltilerinden elde edilen voltamogramlardan bulunan sonuçlar Tablo 32’de verildi.

Tablo 31. MWCNT/GCE kullanılarak pH 7.0 FT içerisindeki BF içeren serum çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		Gün içi	Günler arası
Pik potansiyeli	Veriler (V)	0.894	0.892
		0.896	0.876
		0.892	0.894
		0.891	0.896
		0.896	0.896
	Ortalama (V)	0.894	0.891
	s	0.0019	0.0082
	%RSD	0.22	0.92
Pik akımı	Veriler (μA)	0.033051	0.033359
		0.033359	0.033494
		0.033494	0.033351
		0.032833	0.032109
		0.033351	0.033848
	Ortalama (μA)	0.033218	0.033232
	s	2.69×10^{-4}	6.59×10^{-4}
	%RSD	0.81	1.98

Tablo 32. MWCNT/GCE kullanılarak 1.0×10^{-5} M BF içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

	DPV
Geri kazanım	İlave edilen saf BF konsantrasyonu (μM)
	2.000
	Bulunan saf BF konsantrasyonu (μM)
	1.970
	1.968
	2.018
	1.962
	1.940
	Bulunan ortalama saf BF konsantrasyonu (μM)
	1.972
	Ortalama geri kazanım (%)
	98.6
	s
	1.42
	%RSD
	1.44
	%Bağıl hata
	-1.40

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Doksazosin Mesilat

DM etken maddesinin analiz çalışmalarında kullanılacak elektrodun seçilmesi amacıyla, öncelikle en uygun MWCNT miktarı belirlendi. Yalın ve değişen miktarlarda MWCNT modifiyeli GCE ile elde edilen verilere göre, MWCNT modifikasyonu akım cevabını artırdı (Şekil 11). En yüksek akım cevapları CV için 2 ve 4 μL , DPV ve SWV için 2 μL süspansiyon damlatılmış elektrotlarla elde edildi (Tablo 3). İdeal MWCNT miktarı 2 μL olarak seçildi ve bu miktar sabit tutularak PNGB ile kompozisyonuna bakıldı. Şekil 12 ve Tablo 4'te gösterildiği gibi, PNGB/GCE ile yalın GCE kıyaslandığında DPV ve SWV ile alınan akım cevapları, modifikasyon ile iki kattan fazla artış gösterdi. Ayrıca DM piki için, MWCNT/GCE'ye kıyasla PNGB/GCE'un daha üstün olduğu görüldü. Polimer filminin MWCNT'nin altına kaplanması (MWCNT/PNGB) durumunda pikte yalın GCE'ye kıyasla bir artış elde edilmekle birlikte, en iyi akım cevabının ve en simetrik pikin polimer filminin MWCNT'nin üzerine kaplanması ile elde edildiği belirlendi. Böylece DM'nin analiz çalışmaları için kullanılacak elektrot PNGB/MWCNT/GCE olarak seçildi.

Elektrot seçildikten sonra, DM'nin voltametrik yöntemler ile yapılan analiz çalışmaları için en uygun destek elektrolit ve pH belirlendi. Bunun için, pH'sı 5.0 ile 9.0 arasında değişen tampon çözeltiler içerisindeki DM çözeltilerinden CV, DPV ve SWV yöntemleri ile voltamogramlar elde edildi. pH 5.0'dan daha düşük ve pH 9.0'dan daha büyük pH değerlerinde polimer ve MWCNT modifikasyonunun stabil kalmaması nedeniyle çalışılamadı. Şekil 13'te görüldüğü gibi, farklı tamponlar içerisindeki DM, PNGB/MWCNT/GCE üzerinde yalnızca +0.8 V civarında yükseltgenme yönünde bir pik verdi, indirgenme yönünde ise herhangi bir pik gözlenmedi. Böylece, DM'nin redoks reaksiyonunun tersinmez olduğu sonucuna varıldı. Şekil 13 ve 14'te görüldüğü gibi pH artışı ile yani bazik bölgelere gidildikçe DM piki daha düşük potansiyellere kaydı. Bu durum, destek elektrolit pH'sındaki artış ile DM'nin daha kolay yükseltgendiğini gösterdi. pH'ya karşı çizilen pik potansiyeli grafiklerinde, pH 5.0'dan pH 8.0'a kadar pik potansiyelinde doğrusal bir azalma elde edildi (Şekil 15). pH 8.0'dan 9.0'a geçişte doğrusallıkta bir kırılma görüldü. Grafiklerdeki bu kırılma, Bölüm 2.3.1.'de 8.63 olarak bildirilen DM'ye ait pK_a değeri ile uyumludur. pH 5.0 ile 8.0 arasında elde edilen ve Eşitlik 1-3'te sırasıyla -33.3, -34.1 ve -33.4 mV pH^{-1} olarak verilen eğim değerleri, teorik -59.2 mV pH^{-1} değerinin yaklaşık yarısı kadardır (255). Bu sonuç, redoks reaksiyonunda yer alan elektron sayısının

~2 olabileceğini gösterdi. CV, DPV ve SWV ile elde edilen pH'ya karşı pik akımı grafikleri dikkate alınarak en yüksek pik akımına sahip en simetrik DM pikinin pH 5.5 AT ortamında elde edildiği belirlendi ve sonraki çalışmalar bu destek elektrolit ortamında gerçekleştirildi.

DM'nin yükseltgenme reaksiyonunun karakterini belirlemek amacıyla pH 5.5 AT ortamında hız taraması çalışması yapıldı. Bu çalışma ile DM'nin modifiye elektrot üzerindeki yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü mü yoksa adsorpsiyon kontrollü mü olduğu belirlendi. Bu amaçla, DM çalışma çözeltisi ile 200 mV s⁻¹'den 5 mV s⁻¹'e değişen tarama hızlarında tek döngülü CV taraması yapıldı. Her bir tarama hızına karşı elde edilen voltamogramın DM yükseltgenme pik akımı değeri okundu. Çizilen I_p-v ve $I_p-v^{1/2}$ grafikleri değerlendirildiğinde I_p-v 'nin doğrusallık gösterdiği belirlendi (Şekil 18, Eşitlik 4). Ayrıca çizilen $\log I_p-\log v$ grafiğinin 0.72 olan eğim değeri de sürecin adsorpsiyon kontrollü olduğunu gösterdi (Eşitlik 5). Böylece DM yükseltgenme reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucuna varıldı. Adsorpsiyon etkisinden dolayı DM'nin kantitatif analiz çalışmalarında sıyırma yöntemlerinin kullanılmasına karar verildi ve bu doğrultuda sıyırma parametreleri optimize edildi. Bu amaçla, çözeltide öncelikle karıştırma hızı 100 rpm'de ve biriktirme süresi 60 s'de sabit tutularak biriktirme potansiyeli değiştirildi ve en yüksek pik akımının elde edildiği biriktirme potansiyeli DPSV için 0.0 V ve SWSV için 0.2 V olarak belirlendi (Şekil 19). Sonraki aşamada, DPSV yöntemi için 100 rpm karıştırma hızı ve 0.0 V biriktirme potansiyeli ve SWSV yöntemi için 100 rpm karıştırma hızı ve 0.2 V biriktirme potansiyeli sabit tutularak biriktirme süresi değiştirildi (Şekil 20A ve 20C). İdeal biriktirme süresi DPSV için 120 s ve SWSV için 180 s olarak belirlendi. Ardından, her bir voltamogramı elde etmek için gerekli olan bu süreleri kısaltmak amacıyla karıştırma hızı optimize edildi. Bu amaçla, her bir yöntemin kendi ideal biriktirme potansiyelini sabit tutmak koşuluyla, biriktirme süresi 90 s'de tutularak 100 ile 750 rpm arasında değişen karıştırma hızları için DPSV ve SWSV voltamogramları alındı. DPSV için 120 s, SWSV için 180 s ve 100 rpm koşullarında elde edilen pik akımları, her iki yöntem için 90 s ve 500 rpm koşullarında elde edilebildi. İdeal karıştırma hızı 500 rpm olarak seçilerek biriktirme süresi ile pik akımının değişimi incelendi (Şekil 20B ve 20D). Pik akımının 90 s'ye kadar doğrusal bir artış gösterdiği ve ardından hemen hemen sabit kaldığı görüldü. Bu nedenle, DPSV yöntemi için 0.0 V biriktirme potansiyeli, 90 s biriktirme süresi ve 500 rpm karıştırma hızı ve SWSV için 0.2 V biriktirme potansiyeli, 90 s biriktirme süresi ve 500 rpm karıştırma hızı ideal biriktirme koşulları olarak belirlendi.

DM'nin kantitatif analiz çalışmaları, ideal biriktirme koşullarındaki DPSV ve SWSV yöntemleri ile yapıldı. pH 5.5 AT içerisinde hazırlanan çalışma çözeltileri ile yapılan kalibrasyon deneylerinde doğrusal aralıklar DPSV için $1.0 \times 10^{-8} - 2.0 \times 10^{-6}$ M ve SWSV için $4.0 \times 10^{-6} - 4.0 \times 10^{-5}$ M olarak elde edildi. Teşhis sınırları DPSV için 5.05×10^{-10} M ve SWSV için 2.92×10^{-7} M olarak hesaplandı (Tablo 5). Her iki yöntem karşılaştırıldığında, DM analizi için DPSV yönteminin SWSV'ye göre daha geniş doğrusallık aralığı ve daha düşük teşhis sınırı verdiği görüldü. Yöntemlerin kesinliği için tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. Her bir yöntem için hazırlanan üçer adet DM çözeltisinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %RSD'leri hesaplandı. Tablo 6'da her iki yöntem için %RSD değerleri pik potansiyeli için 0.00 ile 0.51 arasında ve pik akımı için 0.91 ile 1.85 arasında değişti. Böylece, DPSV ve SWSV yöntemlerinin kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı.

Yöntemlerin doğruluğu, farmasötik dozaj formlarından tayin ve geri kazanım çalışmaları ile araştırıldı. Farmasötik preparatlardan tayin çalışmasında, DM'nin tablet formunda 4.850 mg olarak beyan edilen miktarı DPSV ile 4.924 mg ve SWSV ile 4.834 mg olarak, sırasıyla %0.92 ve %1.74 RSD ile bulundu (Tablo 7). Tablet çözeltisi üzerine saf DM çözeltisi eklenmesi ile yapılan geri kazanım çalışmasında, eklenen miktarlar DPSV için %99.79 ve SWSV için %99.82 ortalama geri kazanımlar ile elde edildi (Tablo 8). Bu sonuçlar, tablette bulunan etken madde haricindeki maddelerin uygulanan yöntemler ile elde edilen sonuçları etkilemediğini gösterdi. Geliştirilen DPSV ve SWSV yöntemlerinin istatistiksel karşılaştırması, farmasötik form çalışmasından elde edilen DM pik akımları üzerinden yapılan hesaplamalar ile gerçekleştirildi. Bu çalışma için hesaplanan *t*-testi ve *F*-testi sonuçları %95 güven seviyesindeki teorik değerlerden (Tablo 7) düşük olduğu için, geliştirilen iki yöntem arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı sonucuna varıldı.

Valide edilen DPSV ve SWSV yöntemleri DM içeren serum ve idrar çözeltilerine uygulandı. pH 5.5 AT ortamında DM içeren serum çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırı DPSV için 6.63×10^{-10} M olarak hesaplandı (Tablo 9). SWSV ile yapılan kalibrasyon çalışmasında doğrusal bir konsantrasyon aralığı elde edilemedi. Bu durum, DM'nin serumdan tayini için SWSV yönteminin uygun olmadığını gösterdi. pH 5.5 AT ortamında DM içeren idrar çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırları DPSV için 7.29×10^{-10} M ve SWSV için 2.17×10^{-7} M olarak hesaplandı (Tablo 10). Tablo 11 ve 12'de verilen tekrar edilebilirlik deneylerinden her iki yöntem için elde edilen RSD verileri pik potansiyeli için %0.13 ile %0.52 arasında ve pik akımı için %1.04 ile %1.91

arasında değişti. Böylece, geliştirilen yöntemlerin serum ve idrar zeltelerindeki kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı. Serum ve idrar içerisindeki DM için doğruluk çalışmaları geri kazanım deneyleri ile değerlendirildi (Tablo 13 ve 14). Buna göre, serum ve idrar zeltelerine eklenen saf DM miktarı serum zelteleri için DPSV ile %97.3 ve idrar zelteleri için DPSV ile %98.5 ve SWSV için %98.7 ortalama geri kazanımlar ile elde edildi. Bu alışma ile geliştirilen SWSV ile DM'nin serumdan analizinde serumda bulunan türlerin etkisinin bulunduğu ve bununla birlikte DPSV ile serum ve idrardan ve SWSV ile idrardan DM'nin analizinde serum veya idrarda bulunan türlerin bir etkisinin bulunmadığı sonucuna varıldı.

5.2. Amlodipin Besilat

AB etken maddesinin analiz çalışmalarında kullanılacak elektrodun seçilmesi amacıyla, öncelikle en uygun MWCNT miktarı belirlendi. Yalın ve değişen miktarlarda MWCNT modifiyeli GCE ile elde edilen verilere göre, akım cevabı 4 μ L süspansiyon damlatılmış elektroda kadar artış eğiliminde idi (şekil 24). Ancak, en iyi akım cevapları 2 μ L süspansiyon damlatılmış elektrot ile elde edildi (Tablo 15) ve bu doğrultuda, en uygun MWCNT miktarı 2 μ L olarak seçildi. Ardından, bu miktar sabit tutularak PNGB ile kompozisyonuna bakıldı. şekil 25 ve Tablo 16'da gösterildiği gibi, PNGB/GCE ile yalın GCE kıyaslandığında, PNGB/GCE ile daha yüksek akım değerleri elde edildi. MWCNT/GCE ile PNGB/GCE kıyaslandığında, MWCNT/PNGB ile daha yüksek akım değerlerinin elde edildiği görüldü. PNGB'nin MWCNT zerine kaplanması ile akım cevabı ve pik simetrisi üzerinde iyileşme sağlandı. MWCNT'nin polimer filminin üstüne kaplanması (MWCNT/PNGB) durumunda pikte yalın GCE'ye kıyasla bir artış elde edilmekle birlikte, yine de en yüksek artışın polimer filminin MWCNT'nin üzerine kaplanması (PNGB/MWCNT) durumunda elde edildiği belirlendi. Ayrıca PNGB modifikasyonu sayesinde, yalın ve MWCNT modifiyeli elektrotlarda görülen, pikin sağ tarafa doğru yayvanlaşarak simetrisinin bozulması durumu PNGB modifikasyonu sayesinde ortadan kalktı ve pik simetrisinde iyileşme gözlendi. Böylece AB'nin analiz çalışmaları için kullanılacak elektrot PNGB/MWCNT/GCE olarak seçildi.

Elektrot seçildikten sonra, AB'nin voltametrik yöntemler ile yapılan analiz çalışmaları için en uygun destek elektrolit türü ve pH belirlendi. Bunun için, pH'sı 5.0 ile 9.0 arasında değişen tampon zelteler içerisindeki AB zeltelerinden CV, DPV ve SWV voltamogramları alındı. pH 5.0'dan daha düşük ve pH 9.0'dan daha büyük pH değerlerinde

polimerin ve MWCNT'ün stabilizasyonunun bozulması nedeniyle çalışılmadı. Şekil 26'da görüldüğü gibi, farklı tamponlar içerisindeki AB, PNGB/MWCNT/GCE üzerinde yalnızca +0.8 V civarında yükseltgenme yönünde bir pik verdi, ancak indirgenme yönünde herhangi bir pik gözlenmedi. Böylece, AB'nin redoks reaksiyonunun tersinmez olduğu sonucuna varıldı. Şekil 26 ve 27'de görüldüğü gibi pH 5.5 itibariyle, bazik bölgelere gidildikçe AB pikinin potansiyeli negative yöne doğru kaydı. Bu durum, destek elektrolit pH'sındaki artış ile AB'nin daha kolay yükseltgendiğini gösterdi. pH'ya karşı çizilen pik potansiyeli grafiklerinde, CV için pH 5.0'dan ve DPV ve SWV için pH 5.5'ten pH 9.0'a kadar pik potansiyelinde bir azalma elde edildi (Şekil 28). CV için pH 5.0 ile 9.0 arasında, DPV için pH 5.5 ile 8.0 arasında ve SWV için pH 5.0 ile 9.0 arasında elde edilen ve Eşitlik 6-8'de sırasıyla -24.5, -15.6 ve -13.3 mV pH⁻¹ olarak verilen eğim değerleri, teorik -59.2 mV pH⁻¹ değerinin yaklaşık olarak yarısı kadardır (255). Bu sonuç, redoks reaksiyonunda yer alan elektron sayısının ~2 olabileceğini gösterdi. CV, DPV ve SWV ile elde edilen pH'ya karşı pik akımı grafikleri dikkate alınarak en yüksek pik akımına sahip en simetrik AB pikinin pH 7.0 FT ortamında elde edildiği belirlendiğinden bundan sonarki çalışmaların bu ortamda gerçekleştirilmesine karar verildi.

AB'nin yükseltgenme reaksiyonunun karakterini belirlemek amacıyla pH 7.0 FT ortamında hız taraması çalışması yapıldı. Bu çalışma ile AB'nin modifiye elektrot üzerindeki yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü ya da adsorpsiyon kontrollü olduğu belirlendi. Bu amaçla, AB çalışma çözeltisi ile 200 mV s⁻¹'den 5 mV s⁻¹'e değişen tarama hızlarında tek döngülü CV taraması yapıldı. Her bir tarama hızına karşı elde edilen voltamogramın AB yükseltgenme pik akımı değeri okundu. Çizilen I_p-v ve $I_p-v^{1/2}$ grafikleri değerlendirildiğinde I_p-v 'nin doğrusallık gösterdiği belirlendi (Şekil 31, Eşitlik 9). Ayrıca, Eşitlik 10'da verilen $\log I_p-\log v$ grafiğinin eğim değeri de 0.70 olarak elde edildi. Bu sonuçlara göre, AB yükseltgenme reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü olduğu sonucuna varıldı. Adsorpsiyon etkisinden dolayı AB'nin kantitatif analiz çalışmalarında sıyırma yöntemlerinin kullanılmasına karar verildi ve bu doğrultuda sıyırma parametreleri optimize edildi. Bu amaçla, çözeltide öncelikle karıştırma hızı 100 rpm'de ve biriktirme süresi 60 s'de sabit tutularak biriktirme potansiyeli değiştirildi ve en yüksek pik akımının elde edildiği biriktirme potansiyeli DPSV ve SWSV için 0.0 V olarak belirlendi (Şekil 32). Sonraki aşamada, her iki yöntem için 100 rpm karıştırma hızı ve 0.0 V biriktirme potansiyeli sabit tutularak biriktirme süresi değiştirildi (Şekil 33A ve 33C). İdeal biriktirme süresi DPSV için 300 s olarak belirlendi. Bu süreyi azaltmak amacıyla karıştırma hızı optimize edildi. Bu

amaçla, 0.0 V biriktirme potansiyeli koşulunda, biriktirme süresi 120 s’de tutularak farklı karıştırma hızları için DPSV voltamogramları alındı. DPSV için 300 s ve 100 rpm koşullarında elde edilen pik akımı, 120 s ve 500 rpm koşullarında elde edilebildi. İdeal karıştırma hızı DPSV için 500 rpm olarak seçilerek biriktirme süresi ile pik akımının değişimi incelendi (Şekil 33B). Pik akımının 120 s’ye kadar doğrusal bir artış gösterdiği ve ardından hemen hemen sabit kaldığı görüldü. Bu nedenle, DPSV yöntemi için 0.0 V biriktirme potansiyeli, 120 s biriktirme süresi ve 500 rpm karıştırma hızı, ideal biriktirme koşulları olarak belirlendi. SWSV için yapılan biriktirme süresinin optimizasyonu deneylerinde tüm süreler için pH 7.0 FT ortamında piklerde yarıma meydana geldi. Bu nedenle, pH taramasında elde edilen voltamogramların pik simetrileri ve pik yükseklikleri dikkate alınarak farklı bir tampon ortamı olarak pH 5.5 AT ortamında biriktirme süresi tekrar optimize edilmeye çalışıldı. pH 7.0 FT ortamında görülen yarıma, pH 5.5 AT ortamında gözlenmedi. Bu nedenle, SWSV için biriktirme parametreleri pH 5.5 AT ortamı için optimize edildi. İdeal biriktirme süresi SWSV için 300 s olarak belirlendi. Ardından karıştırma hızı optimize edildi. Bu amaçla, 0.0 V biriktirme potansiyeli koşulunda, biriktirme süresi 180 s’de tutularak farklı karıştırma hızları için SWSV voltamogramları alındı. SWSV için 300 s ve 100 rpm koşullarında elde edilen pik akımı, 180 s ve 250 rpm koşullarında elde edilebildi. İdeal karıştırma hızı SWSV için 250 rpm olarak seçilerek biriktirme süresi ile pik akımının değişimi incelendi (Şekil 33D). Pik akımının 180 s’ye kadar doğrusal bir artış gösterdiği ve ardından hemen hemen sabit kaldığı görüldü. Bu nedenle, SWSV yöntemi için 0.0 V biriktirme potansiyeli, 180 s biriktirme süresi ve 250 rpm karıştırma hızı, ideal biriktirme koşulları olarak belirlendi.

AB’nin kantitatif analiz çalışmaları, ideal biriktirme koşullarındaki DPSV ve SWSV yöntemleri ile yapıldı. DPSV için pH 7.0 FT ve SWSV için pH 5.5 AT içerisinde hazırlanan çalışma çözeltileri ile yapılan kalibrasyon deneylerinde doğrusal aralıklar DPSV için $2.0 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-5}$ M ve SWSV için $6.0 \times 10^{-7} - 6.0 \times 10^{-5}$ M olarak elde edildi. Teşhis sınırları DPSV için 1.77×10^{-9} M ve SWSV için 6.70×10^{-8} M olarak hesaplandı (Tablo 17). Her iki yöntem karşılaştırıldığında, AB analizinde DPSV yönteminin SWSV’ye göre daha geniş doğrusallık aralığı ve daha düşük teşhis sınırı verdiği görüldü. Yöntemlerin kesinliği için tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. Her bir yöntem için hazırlanan üçer adet AB çözeltisinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %RSD oranı hesaplandı. Tablo 18’de her iki yöntem için verilen RSD değerleri pik potansiyeli için %0.17

ile %0.62 arasında ve pik akımı için %0.59 ile %1.34 arasında değişti. Böylece, DPSV ve SWSV yöntemlerinin kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı.

Yöntemlerin doğruluğu, farmasötik dozaj formlarından tayin ve geri kazanım çalışmaları ile araştırıldı. Farmasötik preparatlardan tayin çalışmasında, AB'nin tablet formunda 13.888 mg olarak beyan edilen miktarı DPSV ile 13.863 mg ve SWSV ile 13.927 mg olarak, sırasıyla %0.61 ve %0.91 RSD değerleri ile bulundu (Tablo 19). Tablet çözeltisi üzerine saf AB çözeltisi eklenmesi ile yapılan geri kazanım çalışmasında, eklenen miktarlar DPSV için %99.18 ve SWSV için %99.84 ortalama geri kazanımlar ile elde edildi (Tablo 20). Bu sonuçlar, tablette bulunan etken madde haricindeki maddelerin uygulanan yöntemler ile elde edilen sonuçları etkilemediğini gösterdi. Geliştirilen DPSV ve SWSV yöntemlerinin istatistiksel karşılaştırması, farmasötik form çalışmasından elde edilen AB pik akımları üzerinden yapılan hesaplamalar ile gerçekleştirildi. Bu çalışma için hesaplanan *t*-testi ve *F*-testi sonuçları %95 güven seviyesindeki teorik değerlerden (Tablo 19) düşük olduğu için, geliştirilen iki yöntem arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı sonucuna varıldı.

Valide edilen DPSV ve SWSV yöntemleri AB içeren serum ve idrar çözeltilerine uygulandı. DPSV için pH 7.0 FT ve SWSV için pH 5.5 AT ortamında AB içeren serum ve idrar çözeltileri hazırlandı. DPSV kullanılarak AB içeren serum ve idrar çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırları serum için 1.99×10^{-9} M ve idrar için 1.60×10^{-9} M olarak hesaplandı (Tablo 21). Serum ve idrar çözeltilerinde SWSV yöntemi ile yapılan kalibrasyon çalışmalarında doğrusal kalibrasyon grafikleri elde edilemedi. Bu durum, AB etken maddesinin serum ve idrar biyolojik sıvılarından tayini için geliştirilen DPSV yönteminin uygun olduğunu ve bununla birlikte geliştirilen SWSV yönteminin uygun olmadığını gösterdi. Bu nedenle AB içeren serum ve idrar çözeltileri ile kantitatif analiz çalışmaları yalnızca DPSV yöntemi için uygulandı. Tablo 22'de verilen tekrar edilebilirlik deneylerinden, AB içeren serum ve idrar için elde edilen RSD verileri pik potansiyeli için %0.30 ile %0.91 arasında ve pik akımı için %0.63 ile %1.82 arasında değişti. Böylece, yöntemlerin serum ve idrar çözeltilerindeki kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı. Serum ve idrar içerisindeki AB için doğruluk çalışmaları geri kazanım deneyleri ile değerlendirildi (Tablo 23). Buna göre, serum ve idrar çözeltilerine eklenen saf AB miktarı serum çözeltileri için %100.65 ve idrar çözeltileri için %98.39 ortalama geri kazanımlar ile elde edildi. Bu çalışma ile geliştirilen DPSV yöntemi ile AB'nin analiz edilmesine, serumda ve idrarda

bulunan türlerin bir etkisinin olmadığı ve bununla birlikte SWSV ile AB'nin analizinde ise serum veya idrarda bulunan türlerin etkisinin bulunduğu sonucuna varıldı.

5.3. Bisoprolol Fumarat

BF etken maddesinin analiz çalışmalarında kullanılacak elektrodun seçilmesi amacıyla, öncelikle en uygun MWCNT miktarı belirlendi. Yalın ve değişen miktarlarda MWCNT modifiyeli GCE ile elde edilen verilere göre, akım cevabı 4 μ L süspansiyon damlatılmış elektroda kadar artış eğiliminde idi (Şekil 36). Ancak, en yüksek akım cevapları 2 μ L süspansiyon damlatılmış elektrot ile elde edildi (Tablo 24) ve bu doğrultuda, en uygun MWCNT miktarı 2 μ L olarak seçildi. Ardından, bu miktar sabit tutularak PNGB ile kompozisyonuna bakıldı. Şekil 37 ve Tablo 25'te gösterildiği gibi, PNGB/GCE ile yalın GCE kıyaslandığında, yalın GCE ile daha yüksek akım değerleri elde edildi. MWCNT/GCE ile yalın GCE kıyaslandığında ise, MWCNT/GCE ile pikte yaklaşık iki kat artış elde edildi. PNGB'nin MWCNT üzerine kaplanması (PNGB/MWCNT) ile akım cevabı üzerinde bir iyileşme elde edilemedi. MWCNT'nin polimer filminin üzerine kaplanması (MWCNT/PNGB) durumunda ise pikte yalın GCE'ye kıyasla bir artış elde edilmekle birlikte, en iyi sonucun MWCNT modifiyeli GCE ile elde edildiği görüldü. Bu sonuçlara göre, BF'nin analiz çalışmaları için kullanılacak elektrot MWCNT/GCE olarak seçildi.

Elektrot seçildikten sonra, BF'nin voltametrik yöntemler ile yapılan analiz çalışmaları için en uygun destek elektrolit ve pH belirlendi. Bunun için, pH'sı 2.0 ile 10.0 arasında değişen tampon çözeltiler içerisindeki BF çözeltilerinden CV, DPV ve SWV voltamogramları alındı. Şekil 38'de görüldüğü gibi, farklı tamponlar içerisindeki BF, MWCNT/GCE üzerinde yalnızca +0.9 V civarında yükseltgenme yönünde bir pik verdi, ancak indirgenme yönünde herhangi bir pik gözlenmedi. Böylece, BF'nin redoks reaksiyonunun tersinmez olduğu sonucuna varıldı. Şekil 38'de görüldüğü gibi bazik bölgelere gidildikçe BF piki daha düşük potansiyellere kaydı. Bu durum, destek elektrolit pH'sındaki artış ile BF'nin daha kolay yükseltgendiğini gösterdi. BF çözeltilerinden elde edilen yükseltgenme pik potansiyellerinin tampon pH'sına karşı değişimi Şekil 39'da gösterildi. Tüm tampon çözeltiler içerisinde BF, birbirinden tam olarak ayıramamış iki pik verdi. Asidik tamponlar içerisinde bu iki pik, tayini mümkün kılmayacak şekilde iç içe geçtiğinden pik potansiyelleri tam olarak tayin edilemedi. Buna karşın, pH 6.0'dan itibaren özellikle FT ortamında bu iki pik birbirinden tam olarak ayrıldı ve böylece pH'ya karşı pik potansiyeli grafiklerinde CV ve DPV yöntemlerinde pH 6.0 ile 9.0 arasında bir doğrusallık

elde edildi. pH 9.0'dan 10.0'a geçişte doğrusallıkta bir kırılma meydana geldi. Bu durum Bölüm 2.3.3'te BF için 9.57 olarak bildirilen pK_a değeri ile uyumludur. Eşitlik 11-13'te -70.9, -59.5 ve -65.1 mV pH^{-1} olarak verilen eğim değerleri teorik -59.2 mV pH^{-1} değerine (255) yakındı. Bu durum, redoks reaksiyonunda yer alan elektron sayısının 1 olabileceğini gösterdi. CV, DPV ve SWV ile elde edilen pH'ya karşı pik akımı grafikleri dikkate alındığında, pH 6.0'dan sonraki BRT ortamlarında BF'nin pik yükseklikleri diğer tampon ortamlarından daha yüksek olarak elde edilmesine rağmen, pH 7.0–9.0 BRT ortamları için alınan tekrar ölçümlerinde çok düşük akım cevapları elde edildi. BRT için söz konusu olan tutarlı ve tekrarlı sonuç elde edememe sorunu, FT için yapılan tekrar deneylerinde gözlenmedi. Böylece bazik pH'lardaki BRT içerisinde BF'nin kararsız olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca pH 9.0'dan sonra elektrot yüzeyindeki MWCNT'de dökülmeler gözlemlendi. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek pik akımına sahip en simetrik BF pikinin pH 7.0 FT ortamında elde edildiği belirlendi ve sonraki tüm çalışmalar bu destek elektrolit ortamında gerçekleştirildi.

BF'nin yükseltgenme reaksiyonunun karakterini belirlemek amacıyla pH 7.0 FT ortamında hız taraması çalışması yapıldı. Bu çalışma ile BF'nin modifiye elektrot üzerindeki yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü ya da adsorpsiyon kontrollü olduğu belirlendi. Bu amaçla, BF çalışma çözeltisi ile 200 $mV s^{-1}$ 'den 5 $mV s^{-1}$ 'e değişen tarama hızlarında tek döngülü CV taraması yapıldı. Elde edilen pik akımı değerleri tarama hızına ve tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirildi. Her iki grafikte de doğrusal bir değişim elde edilemedi. Yapılan tekrar deneyleri de aynı sonucu verdi. Ancak, tarama hızının 75 $mV s^{-1}$ 'den başlatılarak 5 $mV s^{-1}$ 'e değişmesi ile bir doğrusallık elde edildi. Her bir tarama hızına karşı elde edilen voltamogramın BF yükseltgenme pik akımı değeri okundu. Çizilen I_p-v ve $I_p-v^{1/2}$ grafikleri değerlendirildiğinde $I_p-v^{1/2}$ 'nin doğrusallık gösterdiği belirlendi (Şekil 42, Eşitlik 14). Ayrıca çizilen $\log I_p-\log v$ grafiğinin 0.38 olan eğim değeri de sürecin difüzyon kontrollü olduğunu gösterdi (Eşitlik 15). Böylece BF yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü olduğu sonucuna varıldı.

BF'nin kantitatif analiz çalışmalarının DPV ve SWV yöntemleri ile yapılması kararlaştırıldıktan sonra, kalibrasyon çalışmasına geçildi. pH 7.0 FT içerisinde hazırlanan çalışma çözeltilerinden pik akımı okunabilen ilk BF piki DPV için 2.0×10^{-6} M'da ve SWV için 1.0×10^{-5} M'da gözlemlendi. SWV yöntemi ile yapılan kalibrasyon çalışmasında herhangi bir doğrusal konsantrasyon aralığı elde edilemedi. Bu nedenle BF'nin kantitatif analiz

çalışması sadece DPV yöntemi ile gerçekleştirildi. DPV ile yapılan kalibrasyon çalışmasında doğrusal aralık $2.0 \times 10^{-6} - 4.0 \times 10^{-5}$ M olarak 1.07×10^{-7} M teşhis sınırı ile elde edildi (Tablo 26). Yöntemin kesinliği için tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. Hazırlanan üç adet BF çözeltisinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin Tablo 27’de verilen RSD değerleri pik potansiyeli için %0.16 ve %0.22 olarak ve pik akımı için %0.80 ve %1.46 olarak bulundu. Böylece, DPV yönteminin kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı.

Yöntemin doğruluğu, farmasötik dozaj formlarından tayin ve geri kazanım çalışmaları ile değerlendirildi. Farmasötik preparatlardan tayin çalışmasında, BF’nin tablet formunda 5.000 mg olarak beyan edilen miktarı 4.719 mg olarak, %1.57 RSD değeri ile bulundu (Tablo 28). Tablet çözeltisi üzerine saf BF çözeltisi eklenmesi ile yapılan geri kazanım çalışmasında, eklenen miktar %98.23 ortalama geri kazanım ile elde edildi (Tablo 29). Bu sonuçlar, tablette bulunan etken madde haricindeki maddelerin uygulanan yöntem ile elde edilen sonuçları etkilemediğini gösterdi.

Valide edilen DPV yöntemi BF içeren serum ve idrar çözeltilerine uygulandı. Bu amaçla, pH 7.0 FT ortamında BF içeren serum ve idrar çözeltileri hazırlandı. Serum çözeltilerden elde edilen voltamogramlara göre pik akımı okunabilen en düşük konsantrasyon 4.0×10^{-6} M olarak bulundu. DPV kullanılarak BF içeren serum çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verilerinden teşhis sınırı 1.43×10^{-7} M olarak hesaplandı (Tablo 30). İdrar çözeltilerinde DPV yöntemi ile yapılan kalibrasyon çalışmasında doğrusal bir konsantrasyon aralığı elde edilemedi. Bu nedenle, DPV yöntemi ile biyolojik sıvılardan tayin çalışması sadece BF içeren serum çözeltileri için uygulandı. BF içeren serum çözeltileri ile yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde RSD verileri pik potansiyeli için %0.22 ve %0.92 olarak ve pik akımı için %0.81 ile %1.98 olarak elde edildi (Tablo 31). Böylece, yöntemin serum çözeltilerindeki kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı. Serum içerisindeki BF için doğruluk çalışması, geri kazanım deneyleri ile yapıldı (Tablo 32). Buna göre, serum çözeltilerine eklenen saf BF, %98.6 ortalama geri kazanım ile elde edildi. Bu çalışma ile geliştirilen DPV yöntemi ile BF’nin analiz edilmesine, serumda bulunan türlerin bir etkisinin olmadığı ve bununla birlikte idrarda bulunan türlerin etkisinin bulunduğu sonucuna varıldı.

5.4. Literatürdeki Çalışmalar ile Karşılaştırma

Tez çalışması kapsamındaki etken maddelerin analiz çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ile Bölüm 2.13’te açıklanan literatür çalışmalarındaki veriler karşılaştırıldı.

Tablo 33'te doksazosin, Tablo 34'te amlodipin ve Tablo 35'te bisoprolol için kalibrasyon verileri gösterilmektedir.

Tablo 33'te, doksazosin için oldukça düşük teşhis sınırlarının elde edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda asılı cıva damla elektrot, dönen platin elektrot ya da karbon pasta elektrotlar kullanılmıştır. İlk kez bu tez çalışması kapsamında doksazosinin analizi için camısı karbon elektrot denenmiş ve yalın halde çok düşük olarak elde edilen pik akım değerleri elektrodun modifiye edilmesi ile yükseltilmiştir. Tabloda verilen doğrusal aralıklar karşılaştırıldığında, en geniş doğrusal aralığın bu tez çalışmasında daha iyi sonuçlar veren DPSV yöntemi ile elde edildiği görüldü. Diğer çalışmalardaki en yakın doğrusal aralık genişliği, bu tez çalışmasındakinin dörtte biri kadardı. Teşhis sınırları karşılaştırıldığında ise, sadece asılı cıva damla elektrot (193), yalın karbon pasta elektrot ve tenaks modifiyeli karbon pasta elektrot (194) ve nafyon modifiyeli karbon pasta elektrot (196) ile elde edilen değerlerin, bu çalışmada daha düşük teşhis sınırı veren DPSV yöntemininkinden daha düşük olduğu görüldü. Ancak, teşhis sınırları düşük olan bu çalışmaların doğrusal aralıkları da bu çalışmada elde edilene göre oldukça dardı. Ayrıca, bu tez çalışmasında kullanılan PNGB/MWCNT/GCE hem iki adımda kolayca hazırlanabilme avantajına sahipti hem de (193) numaralı çalışmada kullanılan asılı cıva damla elektrot gibi toksik değildi. Bunun dışında, literatür çalışmalarına dair Bölüm 2.13'te detaylı şekilde açıklanan bilgiler incelendiğinde, biyolojik sıvılardan tayin çalışmalarının sadece idrar örneklerine uygulandığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında ise her iki yöntem de idrar örneklerine uygulanmış olup, ayrıca DPSV yöntemi serum örneklerine de uygulanmıştır.

Tablo 34'te amlodipinin analizine dair yapılmış çalışmalar gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında daha iyi sonuçların elde edildiği DPSV yöntemi ile literatürdeki çalışmalar karşılaştırıldığında, (213), (215), (216), (217), (220), (222), (224), (225) ve (232) numaralı çalışmalarda elde edilen doğrusal aralıkların bu çalışmadaki doğrusal aralığa göre daha geniş ve (223) ve (234) numaralı çalışmalarda elde edilenlerin ise aynı olduğu görüldü. Diğer tüm çalışmaların doğrusallık aralıkları ise bu çalışmadaki DPSV yöntemininkinden daha dardı. Teşhis sınırları açısından, (216), (221), (224), (226), (228), (229), (232), (234), (237) ve (238) numaralı çalışmaların teşhis sınırları, bu çalışmada DPSV yöntemiyle elde edilenden daha düşük idi. Buna göre, sadece (216), (224) ve (232) numaralı çalışmalarda hem doğrusal aralıklar daha geniş hem de teşhis sınırları daha düşük idi. (234) numaralı çalışmada ise doğrusallık aralığı aynı ve teşhis sınırı nispeten daha düşük idi. Ancak, bu çalışmalarda

kullanılan elektrotlar incelendiğinde özellikle (216), (224) ve (234) numaralı çalışmalarda hazırlanan elektrotların bu tez çalışmadaki elektrota göre daha karmaşık bir modifikasyona sahip oldukları ve hazırlanan elektrotların daha maliyetli olabileceği görüldü. Bu çalışmada elektrot modifikasyonunda kullanılan MWCNT ve PNGB hem elektrot yüzeyine tek adımda kolayca kaplanabilmeleri hem de kolay elde edilebilir olmaları bakımından avantajlıdır.

Tablo 35'te bisoprololün analizine dair yapılmış çalışmalar gösterilmiştir. Bisoprololün voltametrik analizine dair literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Tablo 35'e göre, en geniş doğrusal aralık n-TiO₂-GR/GCE ile yapılmış çalışmada (249) elde edilmiştir. Diğer çalışmalarda elde edilen doğrusal aralıklar ise tez çalışmasında elde edilenin yarısı kadardır (250–252). Teşhis sınırları değerlendirildiğinde ise (250) ve (251) numaralı çalışmaların teşhis sınırlarının daha düşük olduğu görüldü. Bu çalışmalarda kullanılan elektrotlar da modifiye elektrotlar olup, (251) numaralı çalışmada sıyırma yöntemi kullanılarak bu çalışmadakine göre daha zaman alıcı bir prosedür uygulanmıştır. Ayrıca, literatür çalışmalarından sadece (251) ve (252) numaralı kaynaklardaki çalışmalarda biyolojik sıvılardan geri kazanım çalışması yapılmış olup her iki çalışmada da sadece idrar örnekleri ile çalışılmıştır. Bu kapsamda, voltametrik yöntemle bisoprololün serumdan geri kazanım çalışması ilk kez bu tezde yapılmış ve idrar örneklerine kıyasla daha yüksek yüzde geri kazanımlar elde edilmiştir.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde; doksazosin, amlodipin ve bisoprolol etken maddelerinin analizi için geliştirilen elektrotların, bu maddelerin hassas ve hızlı bir şekilde analiz edilebilmesine olanak sağladığı görüldü. Ayrıca, diferansiyel puls (sıyırma) voltametrisi yönteminin, kare dalga (sıyırma) voltametrisi yöntemine göre daha geniş doğrusallık aralıkları ve daha düşük teşhis sınırları verdiği görüldü. GCE yüzeyi üzerine MWCNT için damlatma ve PNGB için elektropolimerizasyon yöntemleri ile tek adımda basit ve hızlı modifikasyon yapılabilirdi. Elde edilen tekrar edilebilirlik verilerine göre, bu modifikasyonun tek kullanımlık karbon esaslı elektrotlara da uygulanabileceği değerlendirildi. Bu tez çalışmasında serum ve idrar numuneleri ile yapılan çalışmalarda en az bir biyolojik sıvıdan tayin yapılabilmiş olması, bu etken maddelerin biyolojik sıvılardan rutin analizlerde kullanılabilme potansiyeli olduğunu gösterdi.

Tablo 33. Doksazosin için tez çalışması ile elde edilen kalibrasyon verilerinin literatür çalışmaları ile karşılaştırılması

Elektrot	Yöntem	Çalışılan pH	Doğrusal aralık (μM)	LOD (μM)	Kaynak
Asılı cıva damla elektrot	DPSP	5.75	$8 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	2.2×10^{-5}	Fernández de Betoño (193)
	SWSV		$3 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-3}$	6.4×10^{-4}	
Yalın CPE	DPSV	6.6	$6 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	4.66×10^{-5}	Arranz (194)
	SWSV		$2 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$	1.34×10^{-4}	
Tenaks modifiyeli CPE	DPSV		$6 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	4.35×10^{-5}	
	SWSV		$8 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-3}$	5.18×10^{-5}	
Cıva elektrot	SIAPP	3.5	-	-	Altiokka (195)
	SCAPP				
Nafyon modifiyeli CPE	SWSV	6.8	$6.0 \times 10^{-5} - 2.8 \times 10^{-3}$ $4.0 \times 10^{-3} - 4.0 \times 10^{-2}$	2.33×10^{-5}	Fernández de Betoño (196)
Yalın CPE	DPSV	3.0	$2 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-2}$	1.80×10^{-3}	Arranz (197)
	SWSV		$4 \times 10^{-3} - 4 \times 10^{-2}$	1.70×10^{-3}	
Oktil bağlı silika modifiyeli CPE	DPSV		$1 \times 10^{-3} - 3 \times 10^{-2}$	7.40×10^{-4}	
	SWSV		$1 \times 10^{-3} - 4 \times 10^{-2}$	7.70×10^{-4}	
Dönen platin elektrot	DPV	0.3	-	15	Altiokka (198)
PNGB/MWCNT/GCE	DPSV	5.5	$1.0 \times 10^{-2} - 2.0$	5.05×10^{-4}	Tez
	SWSV		4.0 – 40	2.92×10^{-1}	

Tablo 34. Amlodipin için tez çalışması ile elde edilen kalibrasyon verilerinin literatür çalışmaları ile karşılaştırılması

Elektrot	Yöntem	Çalışılan pH	Doğrusal aralık (μM)	LOD (μM)	Kaynak
Poli(kafeik asit-L-arjinin)-MoS ₂ /GCE	DPV	7.0	$1.0 \times 10^{-2} - 16.82$ $16.82 - 433.3$	3.6×10^{-3}	Prasannan (213)
TiO ₂ /AuNPs/kitosan modifiyeli PGE	DPV	4.0	$4.0 \times 10^{-2} - 2.8$	1.5×10^{-2}	Fard (214)
Pt/NiCo ₂ O ₄ modifiyeli SPE	DPV	7.0	$7.0 \times 10^{-2} - 350$	9.0×10^{-3}	Akbari Javar (215)
Ag-Ce ₂ (WO ₄) ₃ @CNF modifiyeli GCE	DPV	7.0	$1.0 \times 10^{-2} - 130$	7.12×10^{-4}	Sudha (216)
CuO-NiO/IL/CPE	DPV	-	$1.0 \times 10^{-1} - 100$	6.0×10^{-2}	Firouzi (217)
NiO nanoyapı modifiyeli GCE	CV	10.0	$2.0 \times 10^{-2} - 9.0 \times 10^{-2}$	2.1×10^{-3}	Ahmed Khand (218)
Au/GO/CNT modifiyeli GCE	DPV	4.8	$1.0 \times 10^{-2} - 1.0$ $1.0 - 75.0$	3.0×10^{-3}	Arvand (219)
NiMoO ₄ /kitosan/GCE	DPV	7.0	$5.0 \times 10^{-2} - 373.6$	4.62×10^{-3}	Lou (220)
AgNPs/fMWCNT/Cu NP-CPE	SWSV	10.5	$2.0 \times 10^{-2} - 6.3$	5.16×10^{-4}	Naikoo (221)
MCSNP/SPCE	DPV	7.0	$5.0 \times 10^{-1} - 400$	1.0×10^{-1}	Mohammadi (222)
In(III) nanocomplex/SPE	DPV	7.0	$1.0 - 500.0$	2.0×10^{-1}	Parsa (223)
CRL-PANI@Fe ₂ O ₃ /Ge-Pt	CV	7.4	$1.0 \times 10^{-6} - 10$	1.0×10^{-6}	Djaalab (224)
CeO ₂ -AuNFs/GO/GCE	DPV	5.0	$1.0 \times 10^{-2} - 1000$	2.0×10^{-3}	Arvand (225)
MIP/GCE	DPV	5.0	$1 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5}$ $3 \times 10^{-4} - 8 \times 10^{-3}$	2.66×10^{-6}	Hrichi (226)
ZrO ₂ NPs/GCE	DPV	7.0	$10 - 200$	2.0	Mohammadi zadeh (227)
Kalem grafit elektrot	DPV	8.5	$2.1 \times 10^{-3} - 9.0 \times 10^{-2}$	6.0×10^{-8}	Jadon (228)
	SWV		$8.0 \times 10^{-4} - 5.2 \times 10^{-2}$	2.0×10^{-8}	

Tablo 34. (Devam)

PIL-Fe ₃ O ₄ /GCE	DPV	7.0	$2.0 \times 10^{-3} - 5.0 \times 10^{-1}$	3.6×10^{-4}	Fathirad (229)
PGE	DPV	9.0	$6.6 \times 10^{-2} - 1.0$	2.07×10^{-2}	Khairy (230)
DNA modifiyeli PGE			$6.6 \times 10^{-2} - 2.0$	1.49×10^{-2}	
TiO ₂ -CPE	SWSV	5.69	$1.0 \times 10^{-2} - 1.0$	2.97×10^{-3}	Erden (231)
CNPs/GCE	DPV	7.0	$1.0 \times 10^{-2} - 10$ 10 – 1000	1.0×10^{-3}	Amiri (232)
Bor katkılı elmas elektrot	DPV	5.0	$1.0 \times 10^{-1} - 6.0$ 6.0 – 38	7.0×10^{-2}	Švorc (233)
PLM–GNP/MWCNT/GCE	DPV	7.12	$5.0 \times 10^{-3} - 2.5$	1.0×10^{-3}	Emami (234)
MWCNT/GCE	DPSV	13.0	$1.8 \times 10^{-2} - 5.3 \times 10^{-1}$	8.8×10^{-3}	Sikkander (235)
MWCNT modifiyeli altın elektrot	SWSV	11.0	24 – 34	4.2	Stoiljković (236)
SWCNT/EPPGE	CV	7.2	$5.0 \times 10^{-3} - 1.0$	1.0×10^{-3}	Goyal (237)
CPE	SWSV	11.0	$9.9 \times 10^{-3} - 1.4 \times 10^{-1}$	2.0×10^{-4}	Kazemipour (238)
GCE	SWSV	11.0	$4.0 \times 10^{-2} - 2.0$	1.4×10^{-2}	Gazy (239)
Sabit GCE	DPV	5.5	-	12.7	Altiokka (240)
Dönen GCE				7.1	
PNGB/MWCNT/GCE	DPSV	7.0	$2.0 \times 10^{-2} - 10$	1.77×10^{-3}	Tez
	SWSV	5.5	$6.0 \times 10^{-1} - 60$	6.70×10^{-2}	

Tablo 35. Bisoprolol için tez çalışması ile elde edilen kalibrasyon verilerinin literatür çalışmaları ile karşılaştırılması

Elektrot	Yöntem	Çalışılan pH	Doğrusal aralık (μM)	LOD (μM)	Kaynak
n-TiO ₂ -GR/GCE	SWV	7.0	0.3 – 50	1.98×10 ⁻¹	Koçak (249)
Poli(arilen ftalit) modifiyeli GCE	SWV	0.7	1 – 10	(3.5–9.8)×10 ⁻²	Zil'berg (250)
NGCE	SWSV	0.7	0.05 – 0.5	1.03×10 ⁻²	Nigović (251)
SWCNT/GCE	DPV	7.2	10 – 100	8.27×10 ⁻¹	Goyal (252)
MWCNT/GCE	DPV	7.0	2 – 40	1.07×10 ⁻¹	Tez

6. KAYNAKLAR

1. Shantier SW (2020). Drug analysis. Ahmad U, Akhtar J (Eds.), Pharmaceutical Formulation Design - Recent Practices. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.88739>.
2. Cairns D (2008). Essentials of Pharmaceutical Chemistry. 3rd ed. UK: Pharmaceutical Press, UK.
3. Uslu B (2010). The Analytical Applications of Square Wave Voltammetry on Pharmaceutical Analysis. The Open Chemical and Biomedical Methods Journal 3: 56–73.
4. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Anderson CAM, Arora P, Avery CL, Baker-Smith CM, Beaton AZ, Boehme AK, Buxton AE, et al. (2023). Heart disease and stroke statistics–2023 update: A report from the american heart association. Circulation 147: e93–e621.
5. Singh S, Shankar R, Singh GP (2017). Prevalence and associated risk factors of hypertension: A cross-sectional study in urban varanasi. International Journal of Hypertension 2017: 1–10.
6. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, et al. (2014). 2014 Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults. JAMA 311: 507.
7. Grotto I, Huerta M, Sharabi Y (2008). Hypertension and socioeconomic status. Current Opinion in Cardiology 23: 335–339.
8. Cameron JS, Hicks J, Carl G (1996). Frederick Akbar Mahomed and his role in the description of hypertension at Guy’s Hospital. Kidney International 49: 1488–1506.
9. O’Rourke MF (1992). Frederick Akbar Mahomed. Hypertension 19: 212–217.
10. Esunge PM (1991). From blood pressure to hypertension: the history of research. Journal of the Royal Society of Medicine 84: 621–621.
11. Booth J (1977). A short history of blood pressure measurement. Proceedings of the Royal Society of Medicine 70: 793–799.
12. Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents (1967). Effects of Treatment on Morbidity in Hypertension. JAMA 202: 1028.

13. Pamukcu B (2022). Profile of hypertension in Turkey: From prevalence to patient awareness and compliance with therapy, and a focus on reasons of increase in hypertension among youths. *Journal of Human Hypertension* 36: 437–444.
14. Moser M (2006). Historical perspectives on the management of hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension* 8: 15–20.
15. Gueyffier F (1997). Effect of antihypertensive drug treatment on cardiovascular outcomes in women and men. *Annals of Internal Medicine* 126: 761.
16. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, et al. (2018). 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: A report of the american college of cardiology/american heart association task force on clinical practice guidelines. *Hypertension* 71.
17. Laurent S (2017). Antihypertensive drugs. *Pharmacological Research* 124: 116–125.
18. Esam H, Kanukula R, Dhurjati R, Aerram R, Chevireddy S, Bhaumik S, Atkins E, Huffman MD, Rodgers A, Salam A (2021). Systematic reviews of antihypertensive drugs: A review of publication trends, characteristics, and quality. *The Journal of Clinical Hypertension* 23: 915–922.
19. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, Ramirez A, Schlaich M, Stergiou GS, Tomaszewski M, et al. (2020). 2020 International society of hypertension global hypertension practice guidelines. *Hypertension* 75: 1334–1357.
20. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, et al. (2018). 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: A report of the american college of cardiology/american heart association task force on clinical practice guidelines. *Circulation* 138.
21. Rahimi K, Bidel Z, Nazarzadeh M, Copland E, Canoy D, Ramakrishnan R, Pinho-Gomes A-C, Woodward M, Adler A, Agodoa L, et al. (2021). Pharmacological blood pressure lowering for primary and secondary prevention of cardiovascular disease

- across different levels of blood pressure: An individual participant-level data meta-analysis. *The Lancet* 397: 1625–1636.
22. World Health Organization (2021). Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240033986>. [Accessed 1 January 2023].
 23. Kanagy NL (2005). α 2-adrenergic receptor signalling in hypertension. *Clinical Science* 109: 431–437.
 24. Fourtillan JB, Brisson AM, Couet W (1993). Pharmacokinetics of prazosin administered as gastro-intestinal-therapeutic-systems to 24 healthy volunteers. *Therapie* 48: 115–8.
 25. Chung, Vashi, Puente, Sweeney, Meredith (1999). Clinical pharmacokinetics of doxazosin in a controlled-release gastrointestinal therapeutic system (GITS) formulation. *British Journal of Clinical Pharmacology* 48: 678–687.
 26. DiPiro JT (1989). Controlling drug effects through improved oral formulations. *The American Journal of Medicine* 87: S31–S35.
 27. Chapman N, Chen C-Y, Fujita T, Hobbs FR, Kim S-J, Staessen JA, Tanomsup S, Wang J-G, Williams B (2010). Time to re-appraise the role of alpha-1 adrenoceptor antagonists in the management of hypertension?. *Journal of Hypertension* 28: 1796–1803.
 28. Daae LN, Westlie L (1998). A 5-year comparison of doxazosin and atenolol in patients with mild-to-moderate hypertension: effects on blood pressure, serum lipids, and coronary heart disease risk. *Blood Pressure* 7: 39–45.
 29. Fulton B, Wagstaff AJ, Sorkin EM (1995). Doxazosin. *Drugs* 49: 295–320.
 30. Vincent J, Meredith P, Elliott H, Reid J (1986). The pharmacokinetics of doxazosin in elderly normotensives. *British Journal of Clinical Pharmacology* 21: 521–524.
 31. Kwon YH, Gwak HS, Yoon SJ, Chun IK (2007). Pharmacokinetics of doxazosin gastrointestinal therapeutic system after multiple administration in korean healthy volunteers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 33: 824–829.

32. Neaton JD, Grimm RH, Prineas RJ, Stamler J, Grandits GA, Elmer PJ, Cutler JA, Flack JM, Schoenberger JA, McDonald R (1993). Treatment of mild hypertension study. Final results. Treatment of mild hypertension study research group. *JAMA* 270: 713–24.
33. Os I, Stokke HP (1999). Effects of doxazosin in the gastrointestinal therapeutic system formulation versus doxazosin standard and placebo in mild-to-moderate hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 33: 791–797.
34. Os I (2006). Comparison of doxazosin GITS and standard doxazosin in the treatment of high blood pressure. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 44: 99–106.
35. Calvo C, Gil-Extremuera B, Gomez-Fernández P, Masramon X, Pueyo C, Armada B (2005). Doxazosin GITS versus standard doxazosin in mild to moderate hypertension. *International Journal of Cardiology* 101: 97–104.
36. Joglekar SJ, Nanivadekar AS (1998). A randomized, controlled, multicenter study to compare prazosin GITS with enalapril in hypertensive patients with diabetes mellitus. Bombay hypertension study group. *The Journal of the Association of Physicians of India* 1: 52–62.
37. Itskovitz HD (1994). Alpha 1-blockade for the treatment of hypertension: A megastudy of terazosin in 2214 clinical practice settings. *Clinical Therapeutics* 16: 490–504.
38. Sega R, Marazzi M, Bombelli M, Vulpis V, Antonacci A, Dipriolo S, Pirrelli A, Libretti A (1991). Comparison of the new alpha-blocker alfuzosin with propranolol as first-line therapy in hypertension. *Pharmacological Research* 24: 41–52.
39. Fukiyama K, Omae T, Iimura O, Yoshinaga K, Yagi S, Inagaki Y, Ishii M, Kaneko Y, Yamada K, Ijichi H, et al. (1991). A double-blind comparative study of doxazosin and prazosin in the treatment of essential hypertension. *American Heart Journal* 121: 317–322.
40. Ringer S (1883). A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *The Journal of Physiology* 4: 29–42.
41. Godfraind T (2017). Discovery and development of calcium channel blockers. *Frontiers in Pharmacology* 8: 286.

42. Abernethy DR, Schwartz JB (1999). Calcium-antagonist drugs. *New England Journal of Medicine* 341: 1447–1457.
43. Triggle DJ (2007). Calcium channel antagonists: clinical uses—past, present and future. *Biochemical Pharmacology* 74: 1–9.
44. Opie LH (1996). Calcium channel antagonists in the treatment of coronary artery disease: fundamental pharmacological properties relevant to clinical use. *Progress in Cardiovascular Diseases* 38: 273–290.
45. Vetovec GW (1994). Hemodynamic and electrophysiologic effects of first- and second-generation calcium antagonists. *The American Journal of Cardiology* 73: A34–A38.
46. Frishman WH, Brobyn R, Brown RD, Johnson BF, Reeves RL, Wombolt DG (1994). Amlodipine versus atenolol in essential hypertension. *The American Journal of Cardiology* 73: A50–A54.
47. Materson BJ, Reda DJ, Cushman WC, Massie BM, Freis ED, Kochar MS, Hamburger RJ, Fye C, Lakshman R, Gottdiener J, et al. (1993). Single-drug therapy for hypertension in men – A comparison of six antihypertensive agents with placebo. *New England Journal of Medicine* 328: 914–921.
48. Eisenberg MJ, Brox A, Bestawros AN (2004). Calcium channel blockers: An update. *The American Journal of Medicine* 116: 35–43.
49. Fares H, DiNicolantonio JJ, O’Keefe JH, Lavie CJ (2016). Amlodipine in hypertension: A first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes. *Open Heart* 3: e000473.
50. Choi N-Y, Choi H, Park H-H, Lee E-H, Yu H-J, Lee K-Y, Joo Lee Y, Koh S-H (2014). Neuroprotective effects of amlodipine besylate and benidipine hydrochloride on oxidative stress-injured neural stem cells. *Brain Research* 1551: 1–12.
51. Wang T, Wang Y, Lin S, Fang L, Lou S, Zhao D, Zhu J, Yang Q, Wang Y (2020). Evaluation of pharmacokinetics and safety with bioequivalence of amlodipine in healthy chinese volunteers: Bioequivalence study findings. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 34(6): e23228.

52. Meredith PA, Elliott HL (1992). Clinical pharmacokinetics of amlodipine. *Clinical Pharmacokinetics* 22: 22–31.
53. Chen C-L, Pan T-M (2013). Red mold dioscorea decreases blood pressure when administered alone or with amlodipine and is a potentially safe functional food in SHR and WKY rats. *Journal of Functional Foods* 5: 1456–1465.
54. Packer M, Carson P, Elkayam U, Konstam MA, Moe G, O'Connor C, Rouleau J-L, Schocken D, Anderson SA, DeMets DL (2013). Effect of amlodipine on the survival of patients with severe chronic heart failure due to a nonischemic cardiomyopathy. *JACC: Heart Failure* 1: 308–314.
55. Kawai H, Deguchi S, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Omote Y, Kurata T, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K (2011). Protection against ischemic stroke damage by synergistic treatment with amlodipine plus atorvastatin in zucker metabolic rat. *Brain Research* 1382: 308–314.
56. Weber M (2005). The role of the new β -blockers in treating cardiovascular disease. *American Journal of Hypertension* 18: 169–176.
57. Pucci G, Ranalli MG, Battista F, Schillaci G (2016). Effects of β -blockers with and without vasodilating properties on central blood pressure. *Hypertension* 67: 316–324.
58. do Vale GT, Ceron CS, Gonzaga NA, Simplicio JA, Padovan JC (2019). Three generations of β -blockers: History, class differences and clinical applicability. *Current Hypertension Reviews* 15: 22–31.
59. Wiysonge CS, Bradley HA, Volmink J, Mayosi BM (2018). Cochrane corner: Beta-blockers for hypertension. *Heart* 104: 282–283.
60. Foch C, Allignol A, Hohenberger T, Boutmy E, Schaefer S, Hostalek U (2022). Effectiveness of bisoprolol versus other β -blockers and other antihypertensive classes: A cohort study in the Clinical Practice Research Datalink. *Journal of Comparative Effectiveness Research* 11: 423–436.
61. Detrich Á, Dömötör KJ, Katona MT, Markovits I, Vargáné Láng J (2019). Polymorphic forms of bisoprolol fumarate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 135: 3043–3055.

62. Nikolic VN, Jevtovic-Stoimenov T, Velickovic-Radovanović R, Ilic S, Deljanin-Ilic M, Marinkovic D, Apostolović S, Stanojevic D, Zivanovic S, Stefanovic N, et al. (2013). Population pharmacokinetics of bisoprolol in patients with chronic heart failure. *European Journal of Clinical Pharmacology* 69: 859–865.
63. Zeng W, Lao S, Guo Y, Wu Y, Huang M, Tomlinson B, Zhong G (2022). The influence of EGCG on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of bisoprolol and a new method for simultaneous determination of EGCG and bisoprolol in rat plasma. *Frontiers in Nutrition* 31(9): 907986.
64. Zeng W, Hu M, Tomlinson B (2014). Pharmacogenetics of antihypertensive therapies: Can this be applied in the clinic?. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 12: 72–88.
65. Turner RM, Pirmohamed M (2014). Cardiovascular pharmacogenomics: Expectations and practical benefits. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 95: 281–293.
66. Gonzaga E V., Vieira SS, Vilaca JLJ, Guerra M, Evangelista MG, Rosa IML, Figueiredo MM, Viana OMMS, Doriguetto AC (2019). Doxazosin free-base structure determination and its equilibrium solubility compared to polymorphic doxazosin mesylate forms A and H. *Crystal Growth & Design* 19: 737–746.
67. Yadav PS, Hajare AA, Patil KS (2022). Development and validation of UV spectrophotometric method for doxazosin mesylate in bulk and tablets. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 2675–2680.
68. <https://www.e-lactancia.org/media/papers/Doxazosin-DS-PhI2017.pdf>. [Accessed 18 January 2024].
69. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/019668s021lbl.pdf. [Accessed 18 January 2024].
70. Pavli M, Baumgartner S, Kos P, Kogej K (2011). Doxazosin–carrageenan interactions: A novel approach for studying drug–polymer interactions and relation to controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics* 421: 110–119.
71. Nageswara Rao R, Nagaraju D, Das AK, Jena N (2007). Separation, characterization, and quantitation of process-related substances of the anti-hypertensive drug doxazosin

- mesylate by reversed-phase LC with PDA and ESI-MS as detectors. *Journal of Chromatographic Science* 45: 63–69.
72. Andres CJ, Treanor RL (2010). Patents in drug discovery. Macor JE (Ed.), *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 449–463. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(10\)45027-7](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(10)45027-7).
 73. Ananchenko G, Novakovic J, Lewis J (2012). Amlodipine besylate. Brittain HG (Ed.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 31–77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397220-0.00002-7>.
 74. Ghobashy MM, Alshangiti DM, Alkhursani SA, Al-Gahtany SA, Shokr FS, Madani M (2020). Improvement of in vitro dissolution of the poor water-soluble amlodipine drug by solid dispersion with irradiated polyvinylpyrrolidone. *ACS Omega* 5: 21476–21487.
 75. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/020186s035lbl.pdf. [Accessed 18 January 2024].
 76. Bakheit AH, Ali R, Alshahrani AD, El-Azab AS (2021). Bisoprolol: A comprehensive profile. Al-Majed AA (Ed.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 51–89. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2020.07.006>.
 77. Hansmann S, Darwich A, Margolskee A, Aarons L, Dressman J (2016). Forecasting oral absorption across biopharmaceutics classification system classes with physiologically based pharmacokinetic models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 68: 1501–1515.
 78. Lefrou C, Nogueira RP, Huet F, Takenouti H (2010). 1.02 – Electrochemistry. Cottis B, Graham M, Lindsay R, Lyon S, Richardson T, Scantlebury D, Stott H (Eds.), *Shreir's Corrosion*, 13–51. <https://doi.org/10.1016/B978-044452787-5.00003-2>.
 79. Kurzweil P (2023). Electrochemical devices | Electrochemical devices: History of electrochemistry. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96022-9.00022-0>.
 80. Brett CMA (2018). Standard electrode potentials and application to characterization of corrosion phenomena. Wandelt K (Ed.), *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, 511–516. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13389-X>.

81. Moeller T, Bailar JC, Kleinberg J, Guss CO, Castellion ME, Metz C (1980). 24 – Electrochemistry. Moeller T, Bailar JC, Kleinberg J, Guss CO, Castellion ME, Metz C (Eds.), Chemistry, 744–764. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-503350-3.50029-9>.
82. Oldham KB, Zoski CG (1986). Chapter 2 Mass transport to electrodes. Bamford CH, Compton RG (Eds.), Comprehensive Chemical Kinetics, 26: 79–143. [https://doi.org/10.1016/S0069-8040\(08\)70026-8](https://doi.org/10.1016/S0069-8040(08)70026-8).
83. Mizushima T (1971). The electrochemical method in transport phenomena. Irvine TF, Hartnett JP (Eds.), Advances in Heat Transfer, 7: 87–161. [https://doi.org/10.1016/S0065-2717\(08\)70017-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2717(08)70017-0).
84. Bard AJ, Faulkner LR (2000). Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. 2nd ed. NY: John Wiley & Sons., New York.
85. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (2007). Principles of Instrumental Analysis, 6th ed. David Harris, Belmont.
86. Lubert K, Kalcher K (2010). History of Electroanalytical Methods. Electroanalysis 22: 1937–1946.
87. Evans DH (1991). Review of voltammetric methods for the study of electrode reactions. Montenegro MI, Queirós MA, Daschbach JL (Eds.), Microelectrodes: Theory and Applications, NATO ASI Series, 197: 17–32. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3210-7_2.
88. Kounaves SP (1997). Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Prentice-Hall, New Jersey.
89. Barek J, Fogg AG, Muck A, Zima J (2001). Polarography and voltammetry at mercury electrodes. Critical Reviews in Analytical Chemistry 31: 291–309.
90. Wang J, Hutchins LD (1985). Activation of glassy carbon electrodes by alternating current electrochemical treatment. Analytica Chimica Acta 167: 325–334.
91. Adams RN, McClure JH, Morris JB (1958). Chronopotentiometric studies at solid electrodes. Analytical Chemistry 30: 471–475.
92. Wang J (2000). Analytical Electrochemistry, Wiley-VCH Pub., New York.
93. Wang J (2006). Electroanalytical Chemistry, 3rd ed., Wiley-VCH Pub, New Jersey.

94. Kissinger PT, Heineman WR (1996). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York.
95. Uskoković V (2021). A historical review of glassy carbon: Synthesis, structure, properties and applications. *Carbon Trends* 5: 100116.
96. Rusling JF (1984). Variations in electron-transfer rate at polished glassy carbon electrodes exposed to air. *Analytical Chemistry* 56: 575–578.
97. Thornton DC, Corby KT, Spendel VA, Jordan Joseph, Robbat Albert, Rutstrom DJ, Gross Maurice, Ritzler G (1985). Pretreatment and validation procedure for glassy carbon voltammetric indicator electrodes. *Analytical Chemistry* 57: 150–155.
98. Taylor RJ, Humffray AA (1973). Electrochemical studies on glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 42: 347–354.
99. Kaya SI, Karabulut TC, Kurbanoglu S, Ozkan SA (2020). Chemically modified electrodes in electrochemical drug analysis. *Current Pharmaceutical Analysis* 16: 641–660.
100. Tajik S, Beitollahi H, Mohammadi SZ, Azimzadeh M, Zhang K, Van Le Q, Yamauchi Y, Jang HW, Shokouhimehr M (2020). Recent developments in electrochemical sensors for detecting hydrazine with different modified electrodes. *RSC Advances* 10: 30481–30498.
101. Sarakatsanou C, Karastogianni S, Girousi S (2023). Promising electrode surfaces, modified with nanoparticles, in the sensitive and selective electroanalytical determination of antibiotics: A review. *Applied Sciences* 13: 5391.
102. Kempahanumakkagari S, Deep A, Kim K-H, Kumar Kailasa S, Yoon H-O (2017). Nanomaterial-based electrochemical sensors for arsenic - A review. *Biosensors and Bioelectronics* 95: 106–116.
103. Rana A, Baig N, Saleh TA (2019). Electrochemically pretreated carbon electrodes and their electroanalytical applications – A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 833: 313–332.
104. Shao Y, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay IA, Lin Y (2010). Graphene based electrochemical sensors and biosensors: A review. *Electroanalysis* 22: 1027–1036.

105. Sotiropoulou S, Gavalas V, Vamvakaki V, Chaniotakis NA (2003). Novel carbon materials in biosensor systems. *Biosensors and Bioelectronics* 18: 211–215.
106. Wu S, He Q, Tan C, Wang Y, Zhang H (2013). Graphene-based electrochemical sensors. *Small* 9: 1160–1172.
107. Zhao Q, Gan Z, Zhuang Q (2002). Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. *Electroanalysis* 14: 1609–1613.
108. Meenakshi S, Rama R, Pandian K, Gopinath SCB (2021). Modified electrodes for electrochemical determination of metronidazole in drug formulations and biological samples: An overview. *Microchemical Journal* 165: 106151.
109. Iijima S (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354: 56–58.
110. Popov V (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 43: 61–102.
111. Che G, Lakshmi BB, Fisher ER, Martin CR (1998). Carbon nanotubule membranes for electrochemical energy storage and production. *Nature* 393: 346–349.
112. Rinzler AG, Hafner JH, Nikolaev P, Nordlander P, Colbert DT, Smalley RE, Lou L, Kim SG, Tománek D (1995). Unraveling nanotubes: Field emission from an atomic wire. *Science* 269: 1550–1553.
113. Zhao W-S, Fu K, Wang D-W, Li M, Wang G, Yin W-Y (2019). Mini-review: Modeling and performance analysis of nanocarbon interconnects. *Applied Sciences* 9: 2174.
114. Wang Y-R, Hu P, Liang Q-L, Luo G-A, Wang Y-M (2008). Application of carbon nanotube modified electrode in bioelectroanalysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 36: 1011–1016.
115. Qu L, Yang S (2011). Application of carbon nanotubes modified electrode in pharmaceutical analysis. Naraghi M (Ed.), *Carbon Nanotubes - Growth and Applications*. doi:10.5772/17277.
116. De Volder MFL, Tawfick SH, Baughman RH, Hart AJ (2013). Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science* 339: 535–539.

117. Jariwala D, Sangwan VK, Lauhon LJ, Marks TJ, Hersam MC (2013). Carbon nanomaterials for electronics, optoelectronics, photovoltaics, and sensing. *Chemical Society Reviews* 42: 2824–2860.
118. Aricò AS, Bruce P, Scrosati B, Tarascon J-M, van Schalkwijk W (2005). Nanostructured materials for advanced energy conversion and storage devices. *Nature Materials* 4: 366–377.
119. Robinson JT, Welsher K, Tabakman SM, Sherlock SP, Wang H, Luong R, Dai H (2010). High performance *in vivo* near-IR (>1 μm) imaging and photothermal cancer therapy with carbon nanotubes. *Nano Research* 3: 779–793.
120. Gong H, Peng R, Liu Z (2013). Carbon nanotubes for biomedical imaging: The recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65: 1951–1963.
121. Podesta JE, Al-Jamal KT, Herrero MA, Tian B, Ali-Boucetta H, Hegde V, Bianco A, Prato M, Kostarelos K (2009). Antitumor activity and prolonged survival by carbon-nanotube-mediated therapeutic sirna silencing in a human lung xenograft model. *Small* 5: 1176–1185.
122. Liu Z, Sun X, Nakayama-Ratchford N, Dai H (2007). Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. *ACS Nano* 1: 50–56.
123. Ali-Boucetta H, Al-Jamal KT, McCarthy D, Prato M, Bianco A, Kostarelos K (2008). Multiwalled carbon nanotube–doxorubicin supramolecular complexes for cancer therapeutics. *Chemical Communications* 28(4): 459–461.
124. Piña S, Candia-Onfray C, Hassan N, Jara-Ulloa P, Contreras D, Salazar R (2021). Glassy carbon electrode modified with C/Au nanostructured materials for simultaneous determination of hydroquinone and catechol in water matrices. *Chemosensors* 9: 88.
125. Li G, Liao JM, Hu GQ, Ma NZ, Wu PJ (2005). Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood. *Biosensors and Bioelectronics* 20: 2140–2144.
126. Britto PJ, Santhanam KSV, Ajayan PM (1996). Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 41: 121–125.
127. Santiago-Rodríguez L, Vargas-Barbosa NM, Sánchez-Pomales G, Cabrera CR (2009). Bioelectrochemical sensing based on single stranded deoxyribonucleic acid-carbon

- nanotubes covalently attached on gold electrodes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 9: 2450–2455.
128. Zhu N, Lin Y, Yu P, Su L, Mao L (2009). Label-free and sequence-specific DNA detection down to a picomolar level with carbon nanotubes as support for probe DNA. *Analytica Chimica Acta* 650: 44–48.
 129. Zhang X, Jiao K, Liu S, Hu Y (2009). Readily reusable electrochemical DNA hybridization biosensor based on the interaction of DNA with single-walled carbon nanotubes. *Analytical Chemistry* 81: 6006–6012.
 130. Yang K, Zhang C (2011). Simple detection of nucleic acids with a single-walled carbon-nanotube-based electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 28: 257–262.
 131. Wang J, Li M, Shi Z, Li N, Gu Z (2002). Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes. *Analytical Chemistry* 74: 1993–1997.
 132. Liu C (1999). Electrochemical characterization of films of single-walled carbon nanotubes and their possible application in supercapacitors. *Electrochemical and Solid-State Letters* 2: 577.
 133. Wu F-H, Zhao G-C, Wei X-W (2002). Electrocatalytic oxidation of nitric oxide at multi-walled carbon nanotubes modified electrode. *Electrochemistry Communications* 4: 690–694.
 134. Kaynar B, Öztürk G, Kul D (2023). Electrochemical analysis of antipsychotic drug quetiapine fumarate using multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 35: 2200057.
 135. Zrinski I, Martinez S, Ortner A, Samphao A, Zavašnik J, Kalcher K, Mehmeti E (2021). A novel sensor based on carbon paste electrode modified with polypyrrole/multi-walled carbon nanotubes for the electrochemical detection of cytostatic drug rapamycin. *Electroanalysis* 33: 1325–1332.
 136. da Silva EP, Araujo M da S, Kunita MH, Matos R, Medeiros RA (2022). Electrochemical sensor based on multi-walled carbon nanotubes and n-doped TiO₂ nanoparticles for voltametric simultaneous determination of benserazide and levodopa. *Molecules* 27: 8614.

137. Dogan-Topal B, Bozal-Palabıyık B, Uslu B, Ozkan SA (2013). Multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a voltammetric nanosensor for the sensitive determination of anti-viral drug valganciclovir in pharmaceuticals. *Sensors and Actuators B: Chemical* 177: 841–847.
138. Leech D (1996). Analytical applications of polymer-modified electrodes. Lyons MEG (Ed.), *Electroactive Polymer Electrochemistry*, 269–296. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1715-7_6.
139. Lane RF, Hubbard AT (1973). Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. *The Journal of Physical Chemistry* 77: 1401–1410.
140. Van de Mark MR, Miller LL (1978). A poly-p-nitrostyrene electrode surface. Potential dependent conductivity and electrocatalytic properties. *Journal of the American Chemical Society* 100: 3223–3225.
141. Miller LL, Van de Mark MR (1978). Electrode surface modification via polymer adsorption. *Journal of the American Chemical Society* 100: 639–640.
142. Manesh K, Santhosh P, Gopalan A, Lee K (2008). Electrocatalytic oxidation of NADH at gold nanoparticles loaded poly(3,4-ethylenedioxythiophene)–poly(styrene sulfonic acid) film modified electrode and integration of alcohol dehydrogenase for alcohol sensing. *Talanta* 75: 1307–1314.
143. Su W-Y, Cheng S-H (2008). Electrocatalysis and sensitive determination of cysteine at poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified screen-printed electrodes. *Electrochemistry Communications* 10: 899–902.
144. Zheng W, Li J, Zheng YF (2008). An amperometric biosensor based on hemoglobin immobilized in poly(ϵ -caprolactone) film and its application. *Biosensors and Bioelectronics* 23: 1562–1566.
145. Liu A-L, Zhang S-B, Chen W, Lin X-H, Xia X-H (2008). Simultaneous voltammetric determination of norepinephrine, ascorbic acid and uric acid on polycalconcarboxylic acid modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 23: 1488–1495.

146. Dawit M, Turbale M, Moges A, Amare M (2020). Poly(alizarin red S) modified glassy carbon electrode for square wave adsorptive stripping voltammetric determination of metronidazole in tablet formulation. *Plos One* 15: e0244115.
147. Chitravathi S, Kumara Swamy BE, Mamatha GP, Sherigara BS (2012). Electrochemical behavior of poly (naphthol green B)-film modified carbon paste electrode and its application for the determination of dopamine and uric acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 667: 66–75.
148. Collins GE, Rose-Pehrsson SL (1995). Chemiluminescent chemical sensors for oxygen and nitrogen dioxide. *Analytical Chemistry* 67: 2224–2230.
149. Schachl K, Alemu H, Kalcher K, Jezkova J, Svancara I, Vytras K (1997). Flow injection determination of hydrogen peroxide using a carbon paste electrode modified with a manganese dioxide film. *Analytical Letters* 30: 2655–2673.
150. Wang J (1996). Electrocatalytic reduction and flow injection analysis of organic peroxides at polymeric tetra-amino iron phthalocyanine modified electrode. *Analytical Letters* 29: 1575–1587.
151. Tse YH, Janda P, Lever ABP (1994). Electrode with electrochemically deposited N,N',N'',N'''-tetramethyltetra-3,4-pyridinoporphyrazinocobalt(I) for detection of sulfide ion. *Analytical Chemistry* 66: 384–390.
152. Grzeszczuk M (2018). Polymer electrodes: Preparation, properties, and applications. Wandelt K (Ed.), *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, 838–848. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11676-2>.
153. Banu R, Kumara Swamy BE, Jayaprakash GK, Sharma SC (2022). Simultaneous resolution of serotonin and epinephrine at poly (victoria blue B) amplified carbon paste electrode: A voltammetric study with density functional theory evidences. *Inorganic Chemistry Communications* 144: 109627.
154. Brown KL (2019). Electrochemical preparation and characterization of chemically modified electrodes. Maxakato NW, Gwebu SS, Mhlongo GH (Eds.), *Voltammetry*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81752>.

155. Cai C-X, Xue K-H (1998). electrochemical characterization of electropolymerized film of naphthol green b and its electrocatalytic activity toward NADH oxidation. *Microchemical Journal* 58: 197–208.
156. Kuskur CM, Kumara Swamy BE, Jayadevappa H (2019). Poly (naphthol green B) modified carbon paste electrode for the analysis of paracetamol and norepinephrine. *Ionics* 25: 1845–1855.
157. Umasankar Y, Wang S-H, Chen S-M (2011). Determination of peroxodisulfate ion using composite film containing naphthol green b and multi-walled carbon nanotubes. *Analytical Methods* 3: 2604.
158. Zhao Q, Yuan R, Mo CL, Chai YQ, Zhong X (2004). A new amperometric glucose biosensor with naphthol green b as mediator. *Chinese Chemical Letters* 15: 208–211.
159. Mohadesi A, Taher MA (2007). Electrochemical behavior of naphthol green b doped in polypyrrole film and its application for electrocatalytic oxidation of ascorbic acid. *Sensors and Actuators B: Chemical* 123: 733–739.
160. Harisha KV, Kumara Swamy BE, Ganesh PS, Jayadevappa H (2019). Electrochemical oxidation of haematoxylin at poly(alanine) modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 832: 486–492.
161. Ganesh PS, Kumara Swamy BE (2015). Simultaneous electroanalysis of hydroquinone and catechol at poly(brilliant blue) modified carbon paste electrode: A voltammetric study. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 756: 193–200.
162. banu R, Kumara Swamy BE, Ebenso E (2022). A glassy carbon electrode modulated with poly (naphthol green b) for simultaneous electroanalysis of serotonin and epinephrine in presence of l-tryptophan. *Inorganic Chemistry Communications* 145: 110013.
163. Tahhan M, Truong V-T, Spinks GM, Wallace GG (2003). Carbon nanotube and polyaniline composite actuators*. *Smart Materials and Structures* 12: 626–632.
164. Wang J, Dai J, Yarlagadda T (2005). carbon nanotube–conducting-polymer composite nanowires. *Langmuir* 21: 9–12.

165. Tang C, Yogeswaran U, Chen S-M (2009). Simultaneous determination of adenine guanine and thymine at multi-walled carbon nanotubes incorporated with poly(new fuchsin) composite film. *Analytica Chimica Acta* 636: 19–27.
166. Kahlert H (2010). Reference electrodes. Scholz F, Bond AM, Compton RG, Fiedler DA, Inzelt G, Kahlert H, Komorsky-Lovrić Š, Lohse H, Lovrić M, Marken F, Neudeck A, Retter U, Scholz F, Stojek Z (Eds.), *Electroanalytical Methods*, 291–308. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8>.
167. Shinwari MW, Zhitomirsky D, Deen IA, Selvaganapathy PR, Deen MJ, Landheer D (2010). Microfabricated reference electrodes and their biosensing applications. *Sensors* 10: 1679–1715.
168. Inzelt G (2013). Electrode potentials. Inzelt G, Lewenstam A, Scholz, F. (Eds.), *Handbook of Reference Electrodes*, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36188-3_1.
169. Tsierkezos NG (2007). cyclic voltammetric studies of ferrocene in nonaqueous solvents in the temperature range from 248.15 to 298.15 K. *Journal of Solution Chemistry* 36: 289–302.
170. Khalafi L, Rafiee M (2016). Cyclic voltammetry. Wang Z, Wille U, Juaristi E (Eds.), *Encyclopedia of Physical Organic Chemistry*, 3437–3479. <https://doi.org/10.1002/9781118468586>.
171. Marken F, Neudeck A, Bond AM (2010). Cyclic voltammetry. Scholz F, Bond AM, Compton RG, Fiedler DA, Inzelt G, Kahlert H, Komorsky-Lovrić Š, Lohse H, Lovrić M, Marken F, Neudeck A, Retter U, Scholz F, Stojek Z (Eds.), *Electroanalytical Methods*, 57–106. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_4.
172. Santos-Mendoza IO, Vázquez-Arenas J, González I, Ramos-Sánchez G, Castillo-Araiza CO (2019). revisiting electrochemical techniques to characterize the solid-state diffusion mechanism in lithium-ion batteries. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 17.
173. Hong T-K, Rusodimos I, Kim M-H (2017). Higher order derivative voltammetry for reversible and irreversible electrode processes under spherical diffusion. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 785: 255–264.

174. Denuault G, Sosna M, Williams K-J (2007). 11 - Classical experiments. Zoski CG (Ed.), Handbook of Electrochemistry, 431–469. <https://doi.org/10.1016/B978-044451958-0.50024-0>.
175. Deffo G, Nde Tene TF, Medonbou Dongmo L, Zambou Jiokeng SL, Tonleu Temgoua RC (2024). Differential pulse and square-wave voltammetry as sensitive methods for electroanalysis applications. Wandelt K, Bussetti G (Eds.), Encyclopedia of Solid-Liquid Interfaces, 409–417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85669-0.00040-4>.
176. Simões FR, Xavier MG (2017). 6 - Electrochemical sensors. Da Róz AL, Ferreira M, de Lima F (Eds.), Nanoscience and its Applications Elsevier, 155–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5>.
177. Sushila Dagadu Chavan, Deepa Mahendra Desai (2022). Analytical method validation: A brief review. World Journal of Advanced Research and Reviews 16: 389–402.
178. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>. [Accessed 18 January 2024].
179. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>. [Accessed 18 January 2024].
180. Danzer K (2001). Selectivity and specificity in analytical chemistry. General considerations and attempt of a definition and quantification. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 369: 397–402.
181. Miller JN (1991). Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review. The Analyst 116: 3.
182. Green JM (1996). Peer reviewed: A practical guide to analytical method validation. Analytical Chemistry 68: 305A-309A.
183. Sharma S, Goyal S, Chauhan K (2018). A review on analytical method development and validation. International Journal of Applied Pharmaceutics 10(6): 8–15.
184. S. Yadav P, A. Hajare A, S. Patil K (2022). Development and validation of UV spectrophotometric method for doxazosin mesylate in bulk and tablets. Research Journal of Pharmacy and Technology 15(6): 2675–2680.

185. Aydoğmuş Z, Barla A (2009). Spectrophotometric determination of doxazosin mesylate in tablets by ion-pair and charge-transfer complexation reactions. *Journal of AOAC International* 92: 131–7.
186. El S, Esmail N, Gouda A, Basset W (2012). Extractive spectrophotometric determination of some α -adrenergic-antagonists in pure forms and in pharmaceutical formulations. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 18: 179–191.
187. Bebawy LI, Moustafa AA, Abo-Talib NF (2002). Stability-indicating methods for the determination of doxazosin mezylate and celecoxib. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 27: 779–793.
188. Krotz D, Mengesha AE (2017). Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of doxazosin mesylate and finasteride. *Acta Chromatographica* 29: 309–324.
189. Erceg M, Cindric M, Frketic LP, Vertzoni M, Cetina-Cizmek B, Reppas C (2010). A LC-MS-MS method for determination of low doxazosin concentrations in plasma after oral administration to dogs. *Journal of Chromatographic Science* 48: 114–119.
190. Nageswara Rao R, Nagaraju D, Das AK, Jena N (2007). Separation, characterization, and quantitation of process-related substances of the anti-hypertensive drug doxazosin mesylate by reversed-phase LC with PDA and ESI-MS as detectors. *Journal of Chromatographic Science* 45: 63–69.
191. Kim YJ, Lee Y, Kang MJ, Huh JS, Yoon M, Lee J, Choi YW (2006). High-performance liquid chromatographic determination of doxazosin in human plasma for bioequivalence study of controlled release doxazosin tablets. *Biomedical Chromatography* 20: 1172–1177.
192. Attia AK, Abdel-Moety MM, Abdel-Hamid SG (2017). Thermal analysis study of antihypertensive drug doxazosin mesilate. *Arabian Journal of Chemistry* 10: S334–S338.
193. Fernández de Betoño S, Moreda JM, Arranz A, Arranz JF (1996). Study of the adsorptive stripping voltammetric behaviour of the antihypertensive drug doxazosin. *Analytica Chimica Acta* 329: 25–31.

194. Arranz A, de Betoño SF, Moreda JM, Cid A, Arranz JF (1997). Cathodic stripping voltammetric determination of doxazosin in urine and pharmaceutical tablets using carbon paste electrodes. *The Analyst* 122: 849–854.
195. Altıokka G, Tunçel M (1998). Pulse polarographic (constant and increasing) determinations of doxazosin in pharmaceutical tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17: 169–175.
196. Fernández de Betoño S, Arranz Garcia A, Francisco Arranz Valentín J (1999). UV-spectrophotometry and square wave voltammetry at nafion-modified carbon-paste electrode for the determination of doxazosin in urine and formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 20: 621–630.
197. Arranz A, Moreda JM, Arranz JF (2000). Preconcentration and voltammetric determination of the antihypertensive doxazosin on a C8 modified carbon paste electrode. *Microchimica Acta* 134: 69–75.
198. Altıokka G (2001). Voltammetric determination of doxazosin in tablets using rotating platinum electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 25: 387–391.
199. Mahmoud AM, Abdel-Wadood HM, Mohamed NA (2012). Kinetic spectrophotometric method for determination of amlodipine besylate in its pharmaceutical tablets. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2: 334–341.
200. Rahman N, Azmi SNH (2001). Spectrophotometric method for the determination of amlodipine besylate with ninhydrin in drug formulations. *Il Farmaco* 56: 731–735.
201. Rahman N, Nasrul Hoda M (2003). Validated spectrophotometric methods for the determination of amlodipine besylate in drug formulations using 2,3-dichloro 5,6-dicyano 1,4-benzoquinone and ascorbic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31: 381–392.
202. Tatar S, Atmaca S (2001). Determination of amlodipine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 758: 305–310.
203. Chen G, Jirjees F, Al Bawab A, McElnay JC (2018). Quantification of amlodipine in dried blood spot samples by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 1072: 252–258.

204. Brondi AM, Garcia JS, Trevisan MG (2017). Development and validation of a chromatography method using tandem UV/charged aerosol detector for simultaneous determination of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil: Application to drug-excipient compatibility study. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2017: 1–8.
205. Scharpf F, Riedel K-D, Laufen H, Leitold M (1994). Enantioselective gas chromatographic assay with electron-capture detection for amlodipine in biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 655: 225–233.
206. Monkman SC, Ellis JS, Cholerton S, Thomason JM, Seymour RA, Idle JR (1996). Automated gas chromatographic assay for amlodipine in plasma and gingival crevicular fluid. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 678: 360–364.
207. Khairy M, Khorshed AA (2020). Simultaneous voltammetric determination of two binary mixtures containing propranolol in pharmaceutical tablets and urine samples. *Microchemical Journal* 159: 105484.
208. da Silva EM, de Oliveira GC, de Siqueira AB, Terezo AJ, Castilho M (2020). Development of a composite electrode based on graphite and polycaprolactone for the determination of antihypertensive drugs. *Microchemical Journal* 158: 105228.
209. Atta NF, Galal A, Ahmed YM, El-Ads EH (2019). Design strategy and preparation of a conductive layered electrochemical sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, dobutamine, acetaminophen and amlodipine. *Sensors and Actuators B: Chemical* 297: 126648.
210. Rebech I, Salamanca-Neto CAR, Scremin J, Sartori ER (2017). Simultaneous voltammetric determination of amlodipine and atorvastatin on anodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Orbital - The Electronic Journal of Chemistry* 9: 225–233.
211. Karadas-Bakirhan N, Gumustas M, Uslu B, Ozkan SA (2016). Simultaneous determination of amlodipine besylate and rosuvastatin calcium in binary mixtures by voltammetric and chromatographic techniques. *Ionics* 22: 277–288.
212. Beitollahi H, Ebadinejad F, Shojaie F, Torkzadeh-Mahani M (2016). A magnetic core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{MWCNT}$ nanocomposite modified carbon paste electrode for

- amplified electrochemical sensing of amlodipine and hydrochlorothiazide. *Analytical Methods* 8: 6185–6193.
213. Prasannan A, Lee C-Y, Jayachitra R, Damastuti R, Yu H, Vetri Selvi S, Hong P-D (2024). Highly water dispersible poly (caffeic acid - L-arginine)-MoS₂ nanocomposite modified sensor for effective electrochemical detection of amlodipine drug. *Microchemical Journal* 196: 109666.
 214. Fard GP, Sabzi RE (2023). Preparation of TiO₂ nanoparticles-Au nanoparticles-chitosan nanocomposite modified pencil graphite electrode: application for electrochemical measurement of amlodipine in biological and pharmaceutical samples. *Journal of Analytical Chemistry* 78: 737–747.
 215. Akbari Javar H, Mahmoudi-Moghaddam H, Garkani-Nejad Z, Dehghannoudeh G (2022). Grass-like Pt-doped NiCo₂O₄ modified electrode for electrochemical detection of amlodipine. *Measurement* 191: 110790.
 216. Sudha K, Elangovan A, Jeevika A, Sharmila C, Arivazhagan G, Kalimuthu P (2021). Electroanalytical detection of amlodipine in urine and pharmaceutical samples using Ag-Ce₂(WO₄)₃@CNF nanocomposite-modified glassy carbon electrode. *Microchemical Journal* 165: 106138.
 217. Firouzi M, Giahi M, Najafi M, Homami SS, Mousavi SHH (2021). Electrochemical determination of amlodipine using a CuO-NiO nanocomposite/ionic liquid modified carbon paste electrode as an electrochemical sensor. *Journal of Nanoparticle Research* 23: 82.
 218. Ahmed Khand A, Ahmed Lakho S, Tahira A, Ahmed M, Aftab U, Abro MI, Juno AA, Nafady A, Ibupoto ZH (2021). Synthesis of sheet like nanostructures of NiO using potassium dichromate as surface modifying agent for the sensitive and selective determination of amlodipine besylate (ADB) Drug. *Electroanalysis* 33: 1121–1128.
 219. Arvand M, Kaykhaili M, Ashrafi P, Hemmati S (2021). An electrochemical interface for direct analysis of amlodipine in tablets and human blood samples. *Materials Science and Engineering: B* 263: 114868.
 220. Lou B-S, Rajaji U, Chen S-M, Chen T-W (2020). A simple sonochemical assisted synthesis of NiMoO₄/chitosan nanocomposite for electrochemical sensing of

- amlodipine in pharmaceutical and serum samples. *Ultrasonics Sonochemistry* 64: 104827.
221. Naikoo GA, Pandit UJ, Sheikh MUD, Hassan IU, Khan GA, Bhat AR, Das R, Horchani R (2020). Synergistic effect of carbon nanotubes, copper and silver nanoparticles as an efficient electrochemical sensor for the trace recognition of amlodipine besylate drug. *SN Applied Sciences* 2: 983.
 222. Mohammadi S, Tajik S, Beitollahi H (2019). Screen printed carbon electrode modified with magnetic core shell manganese ferrite nanoparticles for electrochemical detection of amlodipine. *Journal of the Serbian Chemical Society* 84: 1005–1016.
 223. Parsa A, Akbarzadeh-Torbati N (2018). Application of graphite screen printed electrode modified with indium(III) mixed-ligand nanocomplex for voltammetric determination of amlodipine. *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry* 10: 716–727.
 224. Djaalab E, Samar M, Zougar S, Kherrat R (2018). electrochemical biosensor for the determination of amlodipine besylate based on gelatin–polyaniline iron oxide biocomposite film. *Catalysts* 8: 233.
 225. Arvand M, Samie HA (2018). Electrospun CeO₂–Au nanofibers/graphene oxide 3D nanonetwork structure for the electrocatalytic detection of amlodipine. *Ionics* 24: 1813–1826.
 226. Hrichi H, Monser L, Adhoum N (2017). A novel electrochemical sensor based on electropolymerized molecularly imprinted poly(aniline-co-anthranilic acid) for sensitive detection of amlodipine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 805: 133–145.
 227. Mohammadizadeh N, Mohammadi SZ, Kaykhaii M (2017). Novel electrochemical sensor based on ZrO₂ nanoparticles modified glassy carbon electrode for low-trace level determination of amlodipine by differential pulse voltammetry. *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry* 9: 390–399.
 228. Jadon N, Jain R, Pandey A (2017). Electrochemical analysis of amlodipine in some pharmaceutical formulations and biological fluid using disposable pencil graphite electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 788: 7–13.

229. Fathirad F, Mostafavi A, Afzali D (2017). Conductive polymeric ionic liquid/ Fe_3O_4 nanocomposite as an efficient catalyst for the voltammetric determination of amlodipine besylate. *Journal of AOAC International* 100: 406–413.
230. Khairy M, Khorshed AA, Rashwan FA, Salah GA, Abdel-Wadood HM, Banks CE (2017). Sensitive determination of amlodipine besylate using bare/unmodified and DNA-modified screen-printed electrodes in tablets and biological fluids. *Sensors and Actuators B: Chemical* 239: 768–775.
231. Erden S, Eskiköy Bayraktepe D, Yazan Z, Dinç E (2016). TiO_2 modified carbon paste sensor for voltammetric analysis and chemometric optimization approach of amlodipine in commercial formulation. *Ionics* 22: 1231–1240.
232. Amiri M, Imanzade H (2016). Adsorption of amlodipine at the surface of tosyl-carbon nanoparticles for electrochemical sensing. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR* 15: 303–311.
233. Švorc L, Cinková K, Sochr J, Vojs M, Michniak P, Marton M (2014). Sensitive electrochemical determination of amlodipine in pharmaceutical tablets and human urine using a boron-doped diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 728: 86–93.
234. Emami M, Shamsipur M, Saber R (2014). Design of poly-L-methionine–gold nanocomposit/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode for determination of amlodipine in human biological fluids. *Journal of Solid State Electrochemistry* 18: 985–992.
235. Sikkander ARM, Vedhi C, Manisankar P (2012). Electrochemical determination of calcium channel blocker drugs using multiwall carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. *International Journal of Industrial Chemistry* 3: 29.
236. Stoiljković ZŽ, Ivić MLA, Petrović SD, Mijin DŽ, Stevanović SI, Lačnjevac UČ, Marinković AD (2012). Voltammetric and square-wave anodic stripping determination of amlodipine besylate on gold electrode. *International Journal of Electrochemical Science* 7: 2288–2303.
237. Goyal RN, Bishnoi S (2010). Voltammetric determination of amlodipine besylate in human urine and pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry* 79: 234–240.

238. Kazemipour M, Ansari M, Mohammadi A, Beitollahi H, Ahmadi R (2009). Use of adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry at carbon paste electrode for the determination of amlodipine besylate in pharmaceutical preparations. *Journal of Analytical Chemistry* 64: 65–70.
239. Gazy AAK (2004). Determination of amlodipine besylate by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on glassy carbon electrode in tablets and biological fluids. *Talanta* 62: 575–582.
240. Altiokka G, Dogrukol-Ak D, Tunçel M, Aboul-Enein HY (2002). Determination of amlodipine in pharmaceutical formulations by differential-pulse voltammetry with a glassy carbon electrode. *Archiv der Pharmazie* 335: 104–108.
241. Panainte AD, Bibire N, Tântaru G, Apostu M, Vieriu M, Dorneanu V (2014). Spectrophotometric method for estimation of bisoprolol fumarate in tablets. *Revista Medico-Chirurgicala A Societatii De Medici Si Naturalisti Din Iasi* 118: 558–63.
242. Mohammed S, Adam M, Shantier S (2017). Development and validation of UV spectrophotometric method for determination of bisoprolol fumarate in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Mediterranean Journal of Chemistry* 6: 196–199.
243. Vora D, Kadav A (2008). Development and validation of a simultaneous HPLC method for estimation of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate from tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 70: 542.
244. Liu G, Wang W, Jia J, Lu C, Liu Y, Zhang M, Liu Y, Li S, Yu C (2010). Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of bisoprolol in human plasma using d5-bisoprolol as the internal standard. *Biomedical Chromatography* 24: 574–580.
245. Tatar Ulu S, Aydogmus Z (2012). An HPLC method for the determination of bisoprolol in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatographic Science* 50: 615–619.
246. Fernandez-Lopez L, Pellegrini M, Rotolo MC, Luna A, Falcon M, Mancini R (2019). Development and validation of a method for the analysis of bisoprolol and atenolol in human bone. *Molecules* 24: 2400.

247. Bozal B, Gumustas M, Dogan-Topal B, Uslu B, Ozkan SA (2013). Fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrophotometric analytical methods. *Journal of AOAC International* 96: 42–51.
248. Elgendy K, Elmosallamy MAF, Soltan MK, Amin AS, Elshaprawy DS (2021). Novel potentiometric methods for the estimation of bisoprolol and alverine in pharmaceutical forms and human serum. *Reviews in Analytical Chemistry* 40: 127–135.
249. Koçak B, İpek Y (2023). Nafion–Titanium (IV) Oxide-graphene modified glassy carbon electrode (GCE) based electrochemical sensor for the voltammetric determination of the β -blocker bisoprolol fumarate. *Analytical Letters* 56: 1619–1631.
250. Zil'berg RA, Yarkaeva YuA, Sidel'nikov A V., Maistrenko VN, Kraikin VA, Gileva NG (2016). Voltammetric determination of bisoprolol on a glassy carbon electrode modified by poly(arylene phthalide). *Journal of Analytical Chemistry* 71: 926–931.
251. Nigović B, Marušić M, Jurić S (2011). A highly sensitive method for determination of β -blocker drugs using a nafion-coated glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 663: 72–78.
252. Goyal RN, Tyagi A, Bachheti N, Bishnoi S (2008). Voltammetric determination of bisoprolol fumarate in pharmaceutical formulations and urine using single-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta* 53: 2802–2808.
253. Parra KN, Gul S, Aquino JM, Miwa DW, Motheo AJ (2016). Electrochemical degradation of tetracycline in artificial urine medium. *Journal of Solid State Electrochemistry* 20: 1001–1009.
254. Ulusoy Hİ, Yılmaz E, Soylak M (2019). Magnetic solid phase extraction of trace paracetamol and caffeine in synthetic urine and wastewater samples by a using core shell hybrid material consisting of graphene oxide/multiwalled carbon nanotube/Fe₃O₄/SiO₂. *Microchemical Journal* 145: 843–851.
255. Madej M, Kochana J, Baś B (2019). Determination of viloxazine by diferential pulse voltammetry with boron-doped diamond electrode. *Monatshefte für Chemie* 150: 1655–1665.