



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**ANTIİNFLAMATUAR İLAÇ NİMESULİDİN
ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜP İLE
MODİFİYE EDİLMİŞ KARBON PASTA
ELEKTROT KULLANILARAK
ELEKTROANALİTİK ANALİZİ**

Vildan SERDAROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Fatma AĞIN

Trabzon – 2016

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Doç. Dr. Ahmet YAŞAR

Analitik kimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Vildan SERDAROĞLU'nun hazırladığı "Antiinflatuar İlaç Nimesulidin Çok Duvarlı Karbon Nanotüp ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Elektrot Kullanılarak Elektroanalitik Analizi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Yrd. Doç. Dr. Fatma AĞIN



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Fatma AĞIN



Doç. Dr. Dilek KUL



Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ



Tarih:....../.../2016

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun....../.../.... Tarih ve

Sayıli kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak 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 kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

13/07/2016

Vildan SERDAROĞLU

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince her açıdan desteğini esirgemeyen ve çalışmalarımda yol gösterici olan danışmanım ve değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fatma AĞIN'a; çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Doç. Dr. Dilek KUL ve Doç. Dr. Ahmet YAŞAR'a; her zaman manevi desteğini esirgemeyen değerli ve sevgili hocam Doç. Dr. Nuran KAHRİMAN'a; tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Gökçe ÖZTÜRK ve Arş. Gör. Şeyda AKKAYA'a; sonsuz dostluklarıyla en iyi destekçilerim olan Sena ATAL ve Melek KOÇ'a; laboratuvar imkânlarından dolayı K.T.Ü. Eczacılık Fakültesi Dekanlığı'na teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca bana olan desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Vildan SERDAROĞLU

İÇİNDEKİLER**Sayfa****KABUL ve ONAY****BEYAN****TEŞEKKÜR****İÇİNDEKİLER DİZİNİ****v****TABLolar DİZİNİ****viii****ŞEKİLLER DİZİNİ****ix****RESİMLER DİZİNİ****xi****KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ****xii****1. ÖZET****1****2. SUMMARY****2****3. GİRİŞ ve AMAÇ****3****4. GENEL BİLGİLER****5**

4.1. Elektrokimya

5

4.2. Elektrokimyasal Hücreler ve Tepkimeler

6

4.2.1. Galvanik (Voltaik) Hücreler

7

4.2.2. Elektrolitik Hücreler

7

4.3. Voltametrik Hücrenin Bileşenleri

8

4.3.1. Voltametrik Kap

8

4.3.2. Destek Elektrolit

8

4.3.3. Çalışma Elektrodu (İndikatör Elektrot)

8

4.3.3.1. Cıva Kökenli Elektrotlar

9

4.3.3.2. Katı Elektrotlar

10

4.3.3.2.1. Karbon Pasta Elektrot

10

4.3.3.3. Modifiye Elektrotlar

11

4.3.4. Referans Elektrot

12

4.3.4.1. Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot

12

4.3.4.2. Kalomel Referans Elektrot

13

4.3.5. Yardımcı (Karşıt) Elektrot

13

4.4. Elektroanalitik Yöntemler

14

4.4.1. Voltametri	15
4.4.1.1. Dönüşümlü Voltametri	18
4.4.1.2. Doğrusal Taramalı Voltametri	20
4.4.1.3. Puls Voltametri	22
4.4.1.3.1. Normal Puls Voltametri	22
4.4.1.3.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi	22
4.4.1.3.3. Kare Dalga Voltametri	24
4.4.1.4. Sıyırma Yöntemleri	25
4.4.1.4.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi	25
4.4.1.4.2. Katodik Sıyırma Voltametrisi	25
4.4.1.4.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi	26
4.4.2. Polarografi	26
4.5. Karbon Nanotüpler	27
4.6. Nimesulid	29
5. GEREÇ ve YÖNTEM	31
5.1. Kullanılan Maddeler	31
5.1.1. Nimesulid Stok Çözeltisi	31
5.1.2. Sodyum Hidroksit Çözeltisi	31
5.1.3. Asetat Tampon Çözeltisi (AT)	31
5.1.4. Britton-Robinson Tampon Çözeltisi (BRT)	31
5.1.5. Fosfat Tampon Çözeltisi (FT)	32
5.1.6. Dimetil Formamid	32
5.2. Kullanılan Diğer Cihaz ve Malzemeler	32
5.3. Elektrokimyasal Ölçme Sistemi	33
5.3.1. Potansiyostat	33
5.3.2. Elektrot Sistemi	33
5.4. Modifiye Elektrodun Hazırlanması	34
5.4.1. Karbon Pasta Elektrodun Hazırlanması (KPE)	34
5.4.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Hazırlanması (ÇDKNT)	35
5.4.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Elektrodun Hazırlanması	35
5.5. Voltametrik Çalışmalar	36

5.5.1. pH Taraması	36
5.5.2. Hız Taraması	36
5.5.3. Kalibrasyon Çalışması	37
5.5.4. Tekrar Edilebilirlik Çalışması	38
5.5.5. Nimesulidin Farmasötiklerden Tayini	39
5.5.6. Geri Kazanım Çalışması	40
6. BULGULAR	41
6.1. Elektrot Modifikasyonunun Belirlenmesi	41
6.2. pH Etkisi	43
6.3. Hız Taraması	46
6.4. Kalibrasyon Çalışması	48
6.5. Tekrar Edilebilirlik Çalışması	49
6.6. Tablet ve Geri Kazanım Çalışması	50
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
7.1. Elektrot Modifikasyonunun Belirlenmesi	52
7.2. pH Etkisi	52
7.3. Hız Taraması	53
7.4. Kalibrasyon Çalışması	53
7.5. Tekrar Edilebilirlik Çalışması	54
7.6. Tablet ve Geri Kazanım Çalışması	54
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	56
9. KAYNAKLAR	57
10. ÖZGEÇMİŞ	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablolar	Sayfa
Tablo 1. Modifiye elektrot kullanılarak NİM'in DPV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon verileri	49
Tablo 2. Modifiye elektrot kullanılarak NİM'in DPV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	50
Tablo 3. Modifiye elektrot kullanılarak NİM'in DPV yöntemi ile elde edilen tablet verileri	51
Tablo 4. Modifiye elektrot kullanılarak NİM'in DPV yöntemi ile elde edilen geri kazanım verileri	51
Tablo 5. Modifiye elektrot ile elde edilmiş kalibrasyon verilerinin literatürdeki verilerle karşılaştırılması	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa
Şekil 1. Galvanik bir hücrenin şematik gösterimi	7
Şekil 2. Elektrolitik bir hücrenin şematik gösterimi	7
Şekil 3. Karbon pasta elektrodun şematik olarak gösterimi	11
Şekil 4. (a) Dönüşümlü voltametrde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği; (b) Dönüşümlü voltametrde elde edilen akım-gerilim eğrisi	18
Şekil 5. Doğrusal voltametrde uygulanan potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak değişim grafiği	21
Şekil 6. Diferansiyel puls voltametrisinde uygulanan potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak değişim grafiği	23
Şekil 7. Kare dalga voltametrde uygulanan potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak değişim grafiği	24
Şekil 8. Tek duvarlı karbon nanotüp	27
Şekil 9. Çok duvarlı nanotüp	28
Şekil 10. Nimesulidin yapısı	30
Şekil 11. 1×10^{-5} M NİM'in pH 7.0, 0.04 M Britton-Robinson tampon ortamı DPV ile elde edilen mineral yağ yüzdesine karşı pik akımı değerleri	41
Şekil 12. 1×10^{-5} M NİM'in pH 7.0, 0.04 M Britton-Robinson tampon ortamı, (a) %0.2, 2.5 μ L; (b) %0.5, 1 μ L; (c) %0.5, 3 μ L ve (d) %0.2, 5 μ L ÇDKNT/DMF ile modifiye edilmiş KPE ile alınan DP voltamogramları	42
Şekil 13. 1×10^{-4} M NİM'in dönüşümlü voltamogramları. 1.0 M AT pH 3.5 (-----), 0.1 M FT pH 4.0 (.....), pH 5.0 (—), 0.04 M BRT pH 7.0 (— · — · —), pH 9.0 (—), 0.1 M FT pH 5.0 (- · - · -). Tarama hızı 100 mV s ⁻¹	43
Şekil 14. 1×10^{-4} M NİM'in KD voltamogramları 1.0 M AT pH 3.5 (---), 0.1 M FT pH 5.0 (—), 0.04 M BRT pH 7.0 (- · -), pH 9.0 (—)	44

- Şekil 15.** (A) DV, (B) DPV (C) KDV ile elde edilen 1 M AT, 0.1 M FT, 0.04 M BRT tampon ortamlarındaki 1×10^{-4} M NİM'in pH karşı pik potansiyeli grafikleri. ■: 0.1 M FT, ▲: 0.04 M BRT, ●: 1.0 M AT 45
- Şekil 16.** (A) DV, (B) DPV (C) KDV ile elde edilen 1 M AT, 0.1 M FT, 0.04 M BRT tampon ortamlarındaki 1×10^{-4} M NİM'in pH karşı pik akımı grafikleri. ■: 0.1 M FT, ▲: 0.04 M BRT, ●: 1.0 M AT 46
- Şekil 17.** Tek döngülü DV yöntemi ile yapılan 0.1 M pH 5.0 FT içerisindeki 1×10^{-4} M Nimesulid'in hız taraması voltamogramları 47
- Şekil 18.** pH 5.0 0.1 M FT ortamında 1×10^{-4} M NİM için DV ile elde edilen (A) tarama hızının kareköküne karşı pik akımı ve (B) log (tarama hızı)'na karşı log (pik akımı) grafikleri 48
- Şekil 19.** pH 5.0 0.1 M FT ortamında, (A) (a) 10.0, (b) 8.0, (c) 6.0, (d) 4.0, (e) 1.0, (f) 0.4 μ M nimesulid için DP voltamogramları (B) 6×10^{-8} - 1×10^{-5} M aralığındaki akım-konsantrasyon grafiği 49

RESİMLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa
Resim 1. (A) Ag/AgCl referans elektrot, (B) platin tel karşıt elektrot	13
Resim 2. Potansiyostat cihazı	33
Resim 3. Üçlü elektrot sistemi	34



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AT	Asetat tamponu
BRT	Britton–Robinson tamponu
%BSS	Yüzde bağıl standart sapma
%BH	Yüzde bağıl hata
ÇDKNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
KPE	Karbon pasta elektrot
DV	Dönüşümlü voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametri
FT	Fosfat tamponu
KDV	Kare dalga voltametri
NİM	Nimesulid
pH	Hidrojen konsantrasyonunun kologaritması
S	Standart sapma
TAS	Tayin alt sınırı
TS	Teşhis sınırı

Simgeler

A	Amper
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
μ	Mikro
μM	Mikromolar
$\bar{x}$	Ortalama değer
E_p	Pik potansiyeli
I_p	Pik akımı
s	Saniye
V	Volt

Formüller

Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş Klorür
CH₃COOH	Asetik Asit (Glasiyal)
DMF	N,N-Dimetil Formamid
H₃BO₃	Borik Asit
H₃PO₄	Fosforik Asit
Na₂HPO₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaH₂PO₄.2H₂O	Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat

1. ÖZET

Antiinflamatuvar İlaç Nimesulidin Çok Duvarlı Karbon Nanotüp ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Elektrot Kullanılarak Elektroanalitik Analizi

Antiinflamatuvar ilaç etken maddesi nimesulidin elektrokimyasal özellikleri damlatma yöntemiyle elde edilen çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot kullanılarak dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametri ve kare dalga voltametri yöntemleri ile yükseltgenme yönünde incelendi. Antiinflamatuvar ilaç etken maddesi nimesulidin elektrokimyasal analizi için en uygun tampon ortamının belirlenmesi çalışması yapıldı. Bu amaçla farklı tamponlarda pH taraması gerçekleştirildi. Nimesulidin farklı tampon çözeltilerinde yapılan analizlerde redoks reaksiyonunun tersinmez olduğu görüldü. Hız taraması çalışması ile nimesulidin yükseltgenme yönünde difüzyon kontrollü davranış gösterdi. Nimesulidin DPV ile kalibrasyon çalışmasında doğrusallık aralığı 6×10^{-8} - 1×10^{-5} M (korelasyon katsayısı 0.992) olarak, teşhis sınırı 1.07×10^{-9} M ve tayin alt sınırı 3.24×10^{-9} M olarak belirlendi. Diferansiyel puls voltametrisi ile elde edilen nimesulidin kalibrasyon grafiği sonuçları literatürdeki sonuçlarla karşılaştırıldı. Çalışmanın son basamağında nimesulidin farmasötik dozaj formlarından analizi herhangi bir ayırma ve süzme işlemi yapılmadan gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda, antiinflamatuvar ilaç etken maddesi nimesulidin diferansiyel puls voltametrisi yöntemi kullanılarak çok duvarlı karbon nanotüpün damlatılmasıyla modifiye edilmiş olan karbon pasta elektrot ile iyi derecede kesinlik, yüksek doğruluk ve hassas sonuçlar verdi.

Anahtar Sözcükler: Çok duvarlı karbon nanotüp, Diferansiyel puls voltametri, Karbon pasta elektrot, Nimesulid, Validasyon, Voltametri.

2. SUMMARY

Electrochemical Analysis of Antiinflammatory Drug Nimesulide Using Multiwall Carbon Nanotubes Modified Carbon Paste Electrode

Electrochemical properties of nimesulide which is antiinflammatory drug were investigated in the direction of oxidation with carbon paste electrode modified with multiwalled carbon nanotubes obtained with dropping method by cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, and square wave voltammetry. Determination studies of optimum buffer solution were done for electrochemical analysis of antiinflammatory drug nimesulide. For this purpose, pH scanning was carried out at different pH buffer. The analysis of nimesulide solution in different buffer solutions were found to be irreversible redox reaction. The oxidation of nimesulide showed diffusion controlled behaviour with scan rate study. The linearity range was determined as 6×10^{-8} - 1×10^{-5} M (correlation coefficient 0.992), the limit of detection 1.07×10^{-9} M and limit of quantification 3.24×10^{-9} M in the calibration work of nimesulide with DPV. The results of calibration graph obtained with DPV were compared with the results in the literature. Analysis of pharmaceutical dosage form of nimesulide in the final step of the study was carried out without any separation and filtration processes. As a result of the studies, anti-inflammatory drug nimesulide gave a good degree of precision, high accuracy, and sensitivity using DPV method with carbon paste electrode modified by dropping method of multi-walled carbon nanotubes.

Key Words: Multi walled carbon nanotubes, Differential pulse voltammetry, Carbon paste electrodes, Nimesulide, Validation, Voltammetry.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Elektrokimyasal teknikler; kimya ve elektrik arasındaki etkileşim ile elektrik miktar ölçümü, akım, potansiyel veya yükün kimyasal parametreler ile bağlantılarını inceler. Elektrokimyasal analiz yöntemi; ilaç sanayi, metal sanayi ve çevre analizlerinde yarar sağlayan güçlü bir analitik tekniktir. Elektrokimyasal analizler; yüksek duyarlık, doğruluk, kesinlik, geniş doğrusal aralık, az miktarda numune ve çözücü kullanımı, düşük maliyet, yüksek hızda numune analizi ve yüksek tarama hızı gibi avantajlarından dolayı güçlü ve çok yönlü analitik tekniklerdir.

Elektrokimyasal teknikler, özellikle voltametri, farmasötik bileşiklerin dozaj biçimlerinden ve biyolojik örneklerinden belirlenmesinde kullanılır. Analitik kimya laboratuvarlarında günümüzde kullanılan voltametrik yöntemlerin, özellikle analitik verilerin bilgisayar işlemleriyle uygulanması enstrümantasyon açısından oldukça yüksek fayda sağlamaktadır.

Voltametri, çalışma elektroduna uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın cevap olarak elde edildiği elektroanalitik yöntemlerin bir tipini temsil eder. Voltametrik tekniklerde uygulanan potansiyel aralığı katı elektrodun türüne, destek elektrolit tipine, pH ve çalışılan çözeltiye bağlıdır. Voltametrik tekniklerin performansı, çalışma elektrodunun maddeler üzerine etkisi açısından oldukça güçlüdür.

Son yıllarda voltametrik metodlar elektrokimyasal reaksiyonların, elektrokimyasal olarak üretilen serbest radikaller, enzimatik kataliz model çalışmaları, koordinasyon kimyası, güneş enerjisi dönüşümü, endüstriyel kalite kontrolü, biyolojik ve klinik olarak önemli bileşiklerin eser konsantrasyonlarının belirlenme çalışmaları için yaygın bir araç olmuştur.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında öncelikle, antiinflamatuvar ilaç etken maddesi NİM'in elektrokimyasal analizinin gerçekleştirilebilmesi için karbon pasta elektrot yüzeyine çok duvarlı karbon nanotüpün damlatılmasıyla duyarlılığı yüksek, ekonomik ve etken modifiye elektrot hazırlanması planlanmıştır. Planlanan çalışma kapsamında kullanılacak uygun tampon çözelti bileşimi, pH, potansiyel tarama hızı, konsantrasyon ve diğer parametreler araştırılarak NİM'in elektrokimyasal analizi için en uygun parametreler seçilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda nimesulidin duyarlı, hassas, düşük tayin etme sınırına sahip, tamamen valide edilen diferansiyel puls voltametrisi ve kare

dalga voltametrisi yöntemleri kullanılarak kantitatif analizinin gerçekleştirilmesi planlanmıştır.

Nimesulid ilaç etken maddesinin farmasötik dozaj formlarından miktar tayininin yapılması için uygulanacak metotların ve çeşitli parametrelerin validasyonunun gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda antiinflamatuvar ilaç etken maddesi NİM'in DPV yöntemi kullanılarak çok duvarlı karbon nanotüpün damlatılmasıyla modifiye edilmiş olan karbon pasta elektrot ile analizi sonucunda iyi derecede kesinlik, yüksek doğruluk ve hassas sonuçlar elde edilmesi ve böylece literatüre önemli bir katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Elektrokimya

Elektrokimya, elektrot çözelti ara yüzeyinde heterojen olarak ya da çözelti sistemlerinde homojen olarak gözlenen yük ayrılması ve yük aktarımı gibi elektriksel ve kimyasal etkilerin birbiriyle bağlantısını inceleyen bir kimya dalıdır. Elektrokimya Volta'nın elektrik pilini (1799) keşfi ile başlayan uzun bir geçmişe sahiptir.

Elektrokimya, oldukça fazla sayıda farklı olayların, teknolojilerin ve araçların incelenmesini kapsar. Kimyasal sistemlerle ilgili elektrokimyasal ölçümler çok çeşitli amaçlar için uygulanır. Bu amaçlar, bir reaksiyona ait termodinamik veri elde etmek, kararsız bir ara ürün meydana getirmek ve onun bozulma hızını ve spektroskopik davranışlarını incelemek, bir numunedeki eser miktardaki metal iyonları veya organik türlerin özelliklerini belirlemektir (1, 2).

Geçtiğimiz yıllarda, insan hastalıklarının teşhis, tedavi ve önlenmesinde kullanılan farmasötik aktif bileşiklerin buluş, sentez, hassas analiz ve uygulama süreçlerinde olağanüstü hızlanma olmuştur. Kan, serum, idrar ve benzeri gibi biyolojik örneklerin küçük miktarlardaki analizi, düşük algılama ve kararlılık sınırlarının bulunabilmesi için daha hassas yöntemler gereklidir.

Elektrokimyasal teknikler yüksek hassasiyet, belirgin kesinlik, geniş doğrusal dinamik aralık ve nispeten düşük maliyetli enstrümantasyon gibi özelliklerinden dolayı güçlü ve çok yönlü analitik tekniklerdir (3).

Elektrokimyasal özelliklerden yararlanılarak maddelerin türlerinin ve miktarlarının belirlenmesi için uygulanan yöntemlere elektroanalitik yöntemler denir (4). Elektroanalitik yöntemler ile dağılmış katı parçalı ya da renkli numunelerin analizi mümkündür. Karmaşık örneklerde elektrokimyasal algılama seçiciliği oldukça yüksek duyarlılığa sahiptir (5). Elektroanalitik tekniklerin bazılarının uygulanması, elektrot çözelti ara yüzeyinde sürekli ve belli aralıklarla değişen potansiyel uygulamalarının sonucu olarak ölçülen akım cevabına dayanır. Elektroanalitik teknikler çeşitli katyon, anyon ve organik bileşiklerin gelişmesine olanak sağlar (6).

Elektriksel ölçümlerin analitik amaç için bazı kullanımları endüstriyel kalite kontrolü, çevre analizleri ve biyomedikal uygulamalar açısından desteklenmektedir (7).

Elektroanalitik kimya, analit çözeltisi bir elektrokimyasal hücrenin parçası olduğunda çözeltinin bir grup nitel ve nicel analitik yöntem ile analizini sağlayan elektrokimyasal özellikleri içerir. Bu veriler sayesinde ara yüzeylerdeki kütle aktarım hızı; yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı; kimyasal reaksiyonların hız ve denge sabitleri; adsorpsiyon ve kemisorpsiyonun derecesi belirlenebilir.

Elektroanalitik yöntemler diğer analiz yöntemlerine göre bazı özel üstünlüklere sahiptirler. Birincisi, elektrokimyasal ölçümler genellikle bir elementin özel bir yükseltgenme basamağı için ayırt edicidir. Elektroanalitik yöntemlerin ikinci önemli avantajı ise kullanılan cihazların daha ucuz olmasıdır.

Elektrokimyasal ölçümler, yükseltgenmenin ve indirgenmenin gerçekleştiği bir elektrokimyasal hücrede cereyan etmektedir.

4.2. Elektrokimyasal Hücreler ve Tepkimeler

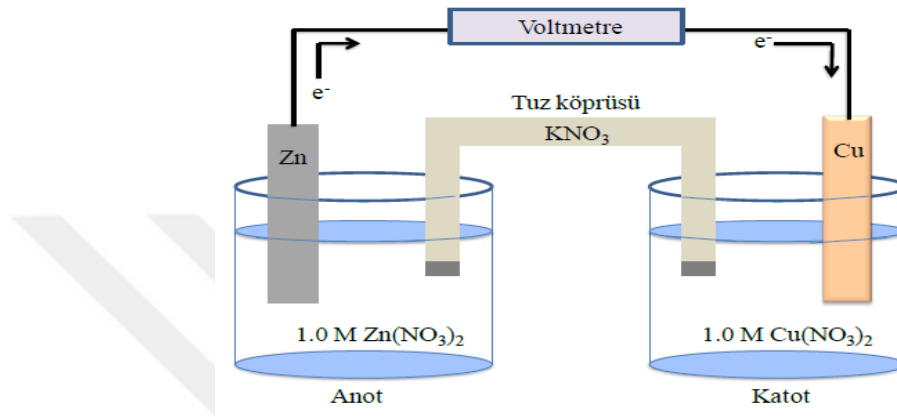
Bir elektrokimyasal hücre, uygun bir elektrolit çözeltisi ve bu elektrot çözeltisine daldırılmış, elektrot olarak adlandırılan iki elektriksel iletkenin meydana gelmektedir. Elektrokimyasal bir hücrede yükseltgenmenin olduğu elektrot anot, indirgenmenin olduğu elektrot katot olarak ifade edilir.

Hücrede bir akım meydana gelebilmesi için; elektrotların dış bağlantılarının bir metal iletkenle sağlanması, iki elektrolit çözelti arasında iyon geçişine imkân verecek bir temas olması ve elektrotların her birinde bir elektron aktarım reaksiyonunun gerçekleşmesi gereklidir. Çözeltide yük akışı hem katyonlarda hem de anyon türlerinde gözlenir (8). Elektrokimyasal hücreler meydana getirilirken iki elektrolit çözeltisinin karışmasını engellemek için genellikle tuz köprüleri kullanılır. Bir türden diğer bir türe elektronların aktarıldığı reaksiyonlar yükseltgenme/ indirgenme reaksiyonu olarak ifade edilir.

Elektrokimyasal hücrede elektron aktarımının, net reaksiyonun, indirgenin ve yükseltgenin fiziksel olarak birbirinden ayrı meydana getirilebilmesi yükseltgenme/ indirgenme reaksiyonlarının en dikkat çekici özelliğidir. Hücrelerde meydana gelen katottaki indirgenme ve anottaki yükseltgenme reaksiyonlarıyla elektrotlardaki elektronik iletkenlik, çözeltinin iyonik iletkenliğine sebep olur. Elektrokimyasal hücreler galvanik ve elektrolitik hücre olmak üzere iki kısma ayrılır.

4.2.1. Galvanik (Voltaik) Hücreler

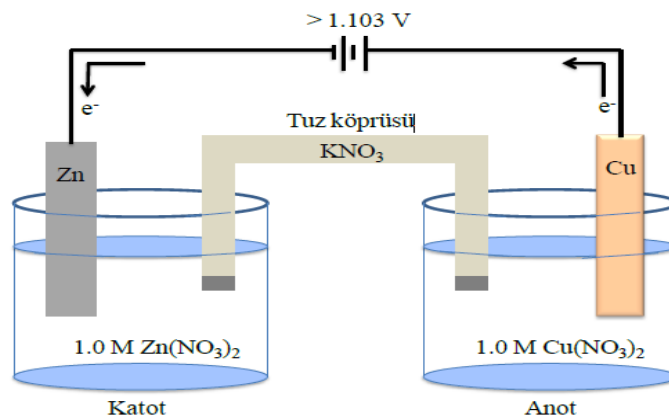
Galvanik veya voltaik hücreler istemli çalışan ve elektrik enerjisini bünyesinde saklayan pillerdir. Bu tip hücrelerde, anottan katoda bir dış iletken vasıtasıyla elektron geçişi olur ve iki elektrottaki reaksiyonlar kendiliğinden meydana gelme eğilimindedirler (Şekil1).



Şekil 1. Galvanik bir hücrenin şematik gösterimi (9)

4.2.2. Elektrolitik Hücreler

Elektrolitik bir hücre çalışmak için bir elektrik enerjisi kaynağına ihtiyaç duymaktadır. Bu hücre tipinde reaksiyonlar istemli değildir yani kendiliğinden meydana gelemez. Elektrolitik hücrelerde katot çözeltisi anot, anot çözeltisi katot olarak davranır (Şekil 2) ve sistem galvanik hücrelerin tam tersi olarak çalışır (10).



Şekil 2. Elektrolitik bir hücrenin şematik gösterimi (9)

4.3. Voltametrik Hücrenin Bileşenleri

Voltametrik sistemlerde bir hücre genellikle voltametrik kap, destek elektrolit, çalışma elektrodu, karşılaştırma (referans) elektrodu ve yardımcı (karşıt) elektrottan meydana gelmektedir.

4.3.1. Voltametrik Kap

Voltametrik analizler yapılırken genellikle cam, kuartz veya teflon malzemeler kullanılmaktadır. Seçilen malzemenin kirlenme ve adsorpsiyon olaylarının gözlenmediği maddelerden olması önem teşkil etmektedir.

4.3.2. Destek Elektrolit

Hücre içindeki çözeltilerde tayini yapılacak maddeden başka bulunan madde destek maddesi ya da destek elektroliti olarak ifade edilir. Destek elektrolit deney şartlarında elektroaktif olmayan türleri kapsamaktadır.

Destek elektrolitin konsantrasyonu, tayini yapılacak olan maddenin konsantrasyonunun en az 100 katı olarak hazırlanmalıdır. Bu şekilde analitin elektrik etkisiyle elektroda doğru göçü ve dolayısıyla taşıdıkları elektrik miktarı ihmal edilebilir. Bu da tayini yapılacak iyonu zıt yüklü elektroda doğru çekimini ya da göçünü elektroda uygulanan potansiyelden bağımsız hale getirir.

Destek elektrolit voltametrde, analit çözeltisine fazlaca ilave edilen tuz olarak ifade edilir. Analit tayininde kullanılan potansiyelde mikro elektrotta reaksiyona girmeyen alkali metal tuzları en yaygın tercih edilen tuzlardır.

Destek elektrolitin konsantrasyonu genellikle 0.1 M olarak kullanılır. Bu seviye minimum kirlilik ile yüksek iletkenlik arasındaki bir değerde değişmektedir. Çalışmalardaki destek elektrolit konsantrasyonu 0.01-1M arasında yer alır. Destek elektrolit hazırlanmasında kullanılan reaktiflerin çok yüksek saflıkta olması gerekmektedir.

4.3.3. Çalışma Elektrodu (İndikatör Elektrot)

Voltametrde kullanılan elektrotların hem kimyasal hem de elektrokimyasal özellikleri önem teşkil eder. Bu nedenle voltametrde sınırlı sayıda polarlanabilen

elektrot kullanılması tercih edilir. Bu elektrotlar; cıva, platin, altın, bizmut ve karbon içerikli katı elektrotlar ile modifiye elektrotlardan oluşur.

Durağan ya da döndürülerek kullanılabilen bu elektrotların her birinin potansiyel çalışma aralığı farklılık gösterir. Bu aralık elektrot türüne bağlı olduğu gibi, çözücüye kullanılan elektrolit türüne ve pH'a da bağlılık göstermektedir. Katodik sınırı hidrojenin oluşumu ya da destek elektrolitinin indirgenmesi, anodik sınırı ise elektrot materyalinin ya da çözücünün yükseltgenmesi temsil eder.

Voltametrik yöntemlerde kullanılan çalışma elektrotları polarlanmanın olabilmesi için küçük yüzey alanına sahip olmalıdır. Bunun için kullanılan çalışma elektrotları mikro elektrotlar olarak ifade edilmektedir.

Mikro elektrotların kullanılması sonucunda örnekteki elektroaktif türlerin çok küçük bir miktarı elektrokimyasal tepkime vermektedir. Böylece örneğin bileşimi hemen hemen aynı özellik göstermektedir. Bunun sonucunda aynı örneğin defalarca voltamogramı elde edilebilmektedir.

Çalışma elektrodu ile referans elektrot arasında potansiyel uygulanırken çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasında akım ölçülür.

4.3.3.1. Cıva Kökenli Elektrotlar

Cıva elektrotlar, oldukça geniş bir katodik çalışma potansiyel aralığına ve her damlada elektrot yüzeyinin yenilenme özelliğine sahiptirler. Bunun nedeni cıva elektrotlar üzerinde hidrojenin çıkış potansiyelinin büyük olmasıdır.

Metallerle amalgam oluşturma özelliğinden faydalanılarak, metal iyonlarının metalik halde ön deriştirilmesine olanak sağlarlar. Bunun sayesinde voltametrde oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptirler.

Voltametrde kullanılacak cıvanın çok saf olması ve içindeki safsızlıklar ppm düzeyinden daha düşük seviyede özellik göstermesi gereklidir. Fakat bu saflıkta olmayan cıvanın %10'luk nitrik asitle iyice çalkalandıktan sonra saf su ile yıkanması, daha sonra da düşük basınç altında damıtılması gereklidir. Cıva buharlarının zehirli olması nedeniyle bu işlem dikkatlice yapılmalıdır.

4.3.3.2. Katı Elektrotlar

Damlayan cıva elektrot kullanılmasıyla karşılaşılan problemlerin ortadan kaldırılması için 1940'lı yılların sonunda Skobets ve arkadaşları tarafından başlatılan ve günümüze kadar süren katı elektrot çalışmaları, voltametri alanında geniş bir uygulama olanağı sunmuştur.

Anodik çalışma bölgesi cıva kökenli elektrotlarda geniş değildir. Daha pozitif potansiyellerde meydana gelen yükseltgenme olaylarının araştırılması gerektiğinde elektrot çalışma aralığı buna uygun olmalı, başka bir ifadeyle elektrot türünün anodik çözünmesi daha pozitif potansiyellerde gerçekleşmelidir.

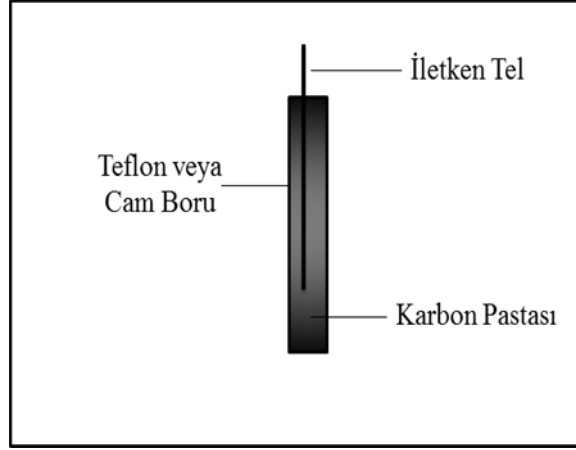
Bu özelliğe sahip platin, altın gibi soy metaller ve karbon gibi materyaller elektrot yapımında tercih edilir. Bu yolla elde edilen katı elektrotlar daha geniş anodik çalışma bölgesi sağlarlar fakat bu tip elektrotlar bazı problemlere yol açabilir.

Katı elektrotların kullanıldığı voltametri, özellikle indirgenme olaylarına oranla daha az araştırılmış olan yükseltgenme reaksiyonlarındaki rolü ile biyoloji alanında ve dolayısıyla fizyolojik öneme sahip bileşiğin farmakolojik etki reaksiyonlarının açıklanmasında da önemli fayda sağlamaktadır. Bu sebeple geliştirilen ultramikro elektrot in-vitro ve canlı organizmada in-vivo çalışmalarda kolay uygulanabilmektedir.

Bu yöntemdeki en önemli katkılardan biri de biyosensör olarak ifade edilen ve enzim, doku, bakteri elektrotları içeren modifiye elektrotlarla, biyolojik ortam reaksiyonlarının reaktant ve ürünleri ölçülerek biyolojik açıdan önemi olan bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinin yapılmasına olanak sağlamasıdır. Bu tip elektrotlara glikoz elektrodunu ve üre elektrodunu örnek olarak gösterebiliriz.

4.3.3.2.1. Karbon Pasta Elektrot

Toz grafitin nujol gibi organik bir sıvı ile karıştırılması ile karbon pasta elektrot meydana getirilir (Şekil 3). Pasta karışımı hazırlandıktan sonra bir tüp içine sıkıştırılır. Karbon pasta elektrotlar ile oldukça geniş çalışma aralığında analit incelemesi gerçekleştirilebilir. Bu tip elektrotların yapımları ve yenilenmeleri kolay bir süreçtir (11).



Şekil 3. Karbon pasta elektrodun şematik olarak gösterimi

4.3.3.3. Modifiye Elektrotlar

Molekül veya iyonların elektrot yüzeyinde toplanmasını sağlayacak bir tabakanın hazırlanmasıyla meydana gelir. Modifiye işlemi uygulanmamış katı elektrotların yüzeyleri kararsızdır ve zamanla değişikliğe uğrama gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Elektrot yüzeyinde meydana gelmesi istenen reaksiyon, belirli bir süre sonra yüzeyde meydana gelen kirlenme ve oksitlenme sebebiyle engellenebilir veya farklı sonuçlar elde edilebilir. Bu problemleri önlemek için katı elektrotların yüzeylerine farklı modifikasyon işlemleri uygulanmaktadır.

Voltametrde kullanılan elektrotların özelliklerinin sınırlı olması sebebiyle elektrotların kimyasal veya elektrokimyasal özellikleri farklılaştırılarak çalışma şartları oluşturulmuştur.

Genel olarak elektrot yüzeyinde önderiştirme sağlayan kimyasal maddelerle veya elektrot yüzeyinin elektron aktarma özelliğini değiştiren işlemler kullanılarak modifiye elektrotlar oluşturulur.

Modifiye elektrotların önderiştirme amacıyla kullanımları iki şekilde meydana getirilebilir: Örnek ve destek elektrolitin bulunduğu ortamda biriktirme yapıldıktan sonra yine aynı analit ile ortamda voltametrik çalışmalar gerçekleştirilir. Örnek ortamında önderiştirme gerçekleştirildikten sonra, elektrot yüzeyi saf su ile yıkanarak, farklı bir elektrolit ortamına yerleştirilerek voltametrik ölçüm alınabilir.

Bu tür elektrotlarda; hızlandırılmış elektrot tepkimesi, biyokataliz ve seçimli geçirgenliğin sağlanması gibi avantajlar gözlenir. Modifiye elektrotlar; kimyasal modifiye elektrotlar (oksit veya polimer kaplı elektrotlar) ve biyolojik modifiye elektrotlar (enzim, doku ve bakteri elektrotlar) olmak üzere iki tip elektrotlardan oluşur (11, 13).

4.3.4. Referans Elektrot

Referans elektrotların, analizi yapılan çözeltinin bileşiminden ve derişiminden hiç etkilenmemesi, belli bir sıcaklıkta, sabit bilinen bir potansiyele sahip olması ve potansiyeli deney süresince değişmemesi gerekir.

Bu elektrot kolay hazırlanılabilirmeli, dayanıklı olmalı ve sistemden az bir akım akarken sabit bir potansiyel meydana getirmelidir. Referans elektrotu içine alan sistemin direnci oldukça yüksektir bu nedenle buradan neredeyse hiç akım geçmemektedir ve kaynaktan çıkan akım yardımcı elektrottan çalışma elektroduna ulaşmaktadır.

Temelde çok önemli olmasına rağmen standart hidrojen elektrot, reaksiyona giren bileşenlerin aktivitelerinin kontrolünde karşılaşılan problemler ve elektrot yüzeyinin hazırlanmasının kolay olmaması gibi sebeplerle yeteri kadar pratik değildir. Bu nedenlerden dolayı kimyacılar yeni referans elektrotlar geliştirme yoluna gitmişlerdir.

İyi bir referans elektrottan beklenen özellikleri şu şekilde sıralayabiliriz;

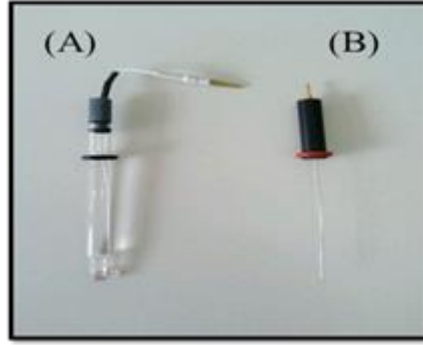
- Tersinir olmalıdır ve Nernst eşitliğiyle uyum sağlamalıdır.
- Zamanla bağımlı olmayan sabit bir potansiyel göstermelidir.
- Az miktarlarda akım elde edildikten sonra yine eski haline kısa sürede dönme özelliği göstermelidir.
- Sıcaklık değişimleriyle önemli bir değişim göstermemelidir (11).

4.3.4.1. Kalomel Referans Elektrot

İkinci yaygın kullanılan referans elektrot doygun kalomel elektrottur. Bu elektrot; cıva (I) klorür (kalomel) ve potasyum klorür ile doyurulmuş bir çözeltiyle bağlantılı olan cıva havuzundan oluşur.

Doygun kalomel elektrot kolay hazırlanabildiği için yaygın olarak kullanılır. Sıcaklık katsayısı oldukça büyüktür ve bu bir dezavantaj oluşturmaktadır. Diğer bir önemli dezavantaj ise sıcaklık değişim durumlarında potansiyelin yeni değerine oldukça

geç ulaşmasıdır. Bu, potasyum klorür ve kalomel arasındaki çözünürlük dengesinin yeniden kurulmasından dolayıdır.



Resim 1. (A) Ag/AgCl referans elektrot, (B) platin tel karşıt elektrot

4.3.4.2. Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot

Günümüzde en yaygın kullanılan referans elektrotlardan biri gümüş/gümüş klorür elektrottur (Resim 1A). Gümüş/gümüş klorür elektrot, doymuş veya 3.5 M potasyum klorür çözeltisiyle hazırlanmaktadır. Gümüş/gümüş klorür elektrotlar, 60°C üzerindeki sıcaklıklarda kullanılabilmektedirler fakat kalomel elektrotlar böyle bir özelliğe sahip değildirler.

4.3.5. Yardımcı (Karşıt) Elektrot

Elektriğin kaynaktan çıkıp, çözelti içinden geçerek çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan helezon şeklinde sarılmış bir platin tel ya da bir cıva havuzu şeklinde olan bir elektrottur (Resim 1B) (7, 8).

İki elektrotlu sistemlerdeki polarize olmayan elektrot üzerinden akım geçtiği için, yüksek akımlarda polarize olduğu gözlenir. Ayrıca çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli olan potansiyelin önemli bir düzeye çıkması gereklidir.

Bu iki nedenden dolayı çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyelinin yanılgılı olduğu bilinir. Bunun sonucu olarak $i=f(E)$ eğrileri yatıklaşırlar ve belirli bir noktadan sonra basamaklaşır veya pikler silinir. Sistemde yardımcı (karşıt) elektrot adı verilen üçüncü bir elektrot kullanılarak bu sorun ortadan kaldırılır.

Bu amaçla akım çalışma elektrotuyla yardımcı elektrot arasından geçirilir ve çalışma elektrotunun potansiyeli karşılaştırma elektroduna karşı sıfır akım altında belirlenir.

Akım yardımcı elektrot üzerinden geçtiği için bu elektrotların platin, grafit, tantal ya da tungsten tel çubuklar gibi soy metal olmaları tercih edilir. Bu elektrotların alanı çalışma elektrodu alanının en az 50 katı olmalıdır. Ayrıca çok küçük hacimlerle çalışıldığında yardımcı elektrotta oluşan ürünlerin, çalışma elektrodunda girişim yapmayacağı elektrot türü belirlenmelidir (11).

4.4. Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik kimya, analit çözeltisi bir elektrokimyasal hücrenin parçası olduğunda çözeltinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan bir grup nitel ve nicel analitik yöntemden oluşmaktadır. Bir başka ifadeyle maddenin elektrik enerjisiyle etkileşmesi sonucu oluşan kimyasal ve fiziksel değişimler ile kimyasal enerjinin elektrik enerjisine dönüştürülmesini inceleyen bilim dalı olarak ifade edilmektedir. Elektroanalitik teknikler çok iyi gözlenebilir sınırlarına ulaşabilirler ve elektrokimyasal yöntemlerin uygulanabildiği sistemler hakkında çok değerli bilgiler sunmaktadır. Ara yüzeylerdeki yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon ve kemisorpsiyonun derecesi, kimyasal reaksiyonların hızı ve denge sabitleri bu bilgiler arasında kabul edilmektedir.

Elektroanalitik kimyada yaygın uygulanan teknikler (voltametri, potansiyometri, kulometri ve kondüktometri), duyarlık ve hızlılık, numune hazırlama, seçicilik, düşük tayin sınırı ve ekonomiklik gibi önemli avantajları nedeniyle tercih edilmektedirler. Elektroanalitik teknikler çok sayıda inorganik ve organik maddenin kalitatif ve kantitatif tayine olanak sunar. Bu teknikler diğer analitik tekniklerden bazı üstünlükleri nedeniyle son yıllarda yaygın olarak tercih edilmektedirler. Bu üstünlükleri şöyle sıralayabiliriz;

1. Diğer tekniklerle analiz edilecek maddenin sadece toplam miktarı elde edilebilirken; elektroanalitik tekniklerle bir maddenin veya iyonun toplam miktarının yanında istenilen yükseltgenme basamağı da bulunabilir.
2. Elektroanalitik kimya alanında kullanılan cihazlar basit ve ekonomik kullanım imkanı sağlarlar.

3. Elektroanalitik tekniklerle genellikle bir iyonun konsantrasyonu değil aktivitesi de belirlenebilir. Örneğin, fizyolojik amaçlarla kalsiyum, sodyum ve potasyum analiz edilirken, bunların vücuttaki aktiflikleri belirlenir. Bu durum konsantrasyon ölçülmesinden daha faydalıdır.
4. Az miktardaki numune ile çalışılması mümkündür.
5. Elektroanalitik teknikler için numune hazırlama işlemi basittir.
6. Yüksek doğruluk, kesinlik, hızlılık, duyarlık, hassaslık, spesifiklik ve seçicilik özellikleri gösterir.
7. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) daha düşük seviyelerdedir.

4.4.1. Voltametri

İlk olarak elektrolitik bir hücrede akım potansiyel ilişkileri, polarografi yöntemiyle ortaya koyulmuştur. Bu polarografi tekniği geliştirilerek voltametri yöntemi açığa çıkarılmıştır.

Voltametri 1920'lerin başında Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından ileri sürülmüştür. Polarografi ve voltametri teknikleri birbirine bağlı yöntemlerdir (8, 11). Elektroanalitik bir yöntem olan voltametri; akım, potansiyel, elektrik yük miktarı ile madde miktarı arasındaki ilişkiye dayanır. Çeşitli ortam çözeltilerinde indirgenebilen veya yükseltgenebilen elektroaktif organik veya inorganik numunelerin optimum deney şartlarında elde edilen akım şiddeti-potansiyel eğrilerini (voltamogramlarını) değerlendiren analiz yöntemidir.

Bir kısım voltametrik yöntemlerde potansiyel sabit değerde tutulur veya farklı şekillerde değiştirilerek madde miktarına göre değişen akım değeri ölçülür ve incelenir. Sisteme uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlarda, akım değerine bağlı olarak numune hakkında bilgi edilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir.

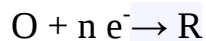
Voltametri tekniğiyle maddelerin kalitatif, kantitatif analizleri, elektrokimyasal reaksiyonların işleyiş mekanizmaları, maddelerin çözeltilerdeki kararlılıkları ve çeşitli fizikokimyasal sabitlerin değerleri araştırılabilir (11, 14). Voltametrik analizlerde katı elektrotların kullanılması maddenin biyotransformasyonu ve farmakolojik etkinliği ile ilgili çalışmalarda bilgi vermektedir. Çeşitli modifiye elektrotların üretilmesiyle

maddeye özgü analizler artmıştır. Bu tip gelişmeler sayesinde in-vivo analizler açısından gelişmeler sağlanmıştır.

Voltametri genellikle katı elektrotlar kullanılarak yükseltgenme olaylarının araştırılmasında, polarografik yöntem ise damlayan cıva elektrotun daha kolay yükseltgenmesi sebebiyle genellikle indirgenme olaylarının araştırılmasında tercih edilmektedir. Voltametri tekniğinde karbon elektrotların kullanılmasıyla hem yükseltgenme, hem de indirgenme bölgesinde geniş ve etken çalışma aralığı ($\sim -1.8 \text{ V} - +1.8 \text{ V}$ (sulu ortamda)) mevcuttur (12). Voltametri günümüzde az miktarda maddeyle çalışılabilmesi, analiz süresinin uzun olmaması, numuneye ön işlem uygulanılmaması, düşük konsantrasyonlarda numune kullanılabilmesi gibi avantajlarından dolayı tercih edilir. Bu özelliklerinden dolayı idrar, serum gibi numunelerde ve ilaç etken maddelerinin analizlerinde uygulanmaktadır (15). Voltametrik ölçümlerde genellikle yüzey alanı birkaç milimetre kareden daha küçük olan mikroeletrotlar tercih edilmektedir. Bu mikroeletrotlar voltametrik ölçümlerde önemli olan polarizasyonun olmasını sağlarlar (16). Voltametri, yüzeydeki adsorpsiyon olaylarının incelenmesi, kimyasal olarak modifiye işlemine tabi tutulmuş elektrot yüzeylerinde meydana gelen elektron transfer mekanizmalarının açığa çıkarılmasında ve farklı ortamlarda gerçekleşen yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin araştırılması gibi analitik olmayan çalışmalar için de tercih edilmektedir.

Farmasötik çalışmalar açısından önemli olan maddelerin analizinde voltametri yönteminin tercih edilmesi, bu yöntemle yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur. Farklı karmaşık karışımların analiz çalışmalarında kullanılmak üzere voltametri yöntemiyle sıvı kromatografisi bir araya getirilmiştir. Yükseltgenme ve indirgenme çalışmalarının yanında modern voltametri, adsorpsiyon çalışmalarında da kullanılmaktadır.

Polarize olmuş şartlardaki elektrotlarla yapılan çalışmalarda çözeltide yükseltgenmiş tür (O) elektrot yüzeyinde meydana gelen aşağıdaki denkleme göre;



n sayıda elektron alarak elektrot yüzeyinde indirgenmiş türü (R) meydana getirirken, uygulanan potansiyel (E), elektroaktif maddelerin derişimi Nernst denkleminle ifade edilecektir (Eşitlik 1).

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (1)$$

R= İdeal gaz sabiti (8.314 J mol⁻¹K⁻¹)

T= Mutlak sıcaklık (K)

F= Faraday sabiti (96487 kulon)

n= Alınır verilen elektron sayısı

E°= İlgili redoks çiftinin standart elektrot potansiyelini ifade etmektedir.

Yukarıda ifade edilen redoks tepkimesi sonucu oluşan akım Faraday yasalarına uygun olduğu için faradaik akım olarak ifade edilir. Bir mol maddenin n sayıda elektron alarak indirgenmesinin meydana geldiği sırada n × 96487 kulonluk yük transferi meydana gelmektedir. Redoks tepkimesinin hızı faradaik akım ile ifade edilebilir. Faradaik akım ve kapasitif akımın toplamı toplam akım olarak ifade edilir.

Basit bir indirgenme tepkimesinde sadece elektrot-çözelti ara yüzeyinde elektron aktarımı, elektroaktif türün çözelti içinden elektrot yüzeyine aktarımı ve meydana gelen ürünün çözelti içerisine geri difüzyonu bulunmaktadır (17).

Voltametik ölçümler ve mekanik incelemeler daha duyarlı, tekrarlanabilir ve kolay kullanımından dolayı biyolojik öneme sahip çeşitli elektroaktif örneklerin (ilaç, metal, hormon ve vitaminler) redoks sistemi olarak araştırılmasına olanak sağlar ve, voltametri ve ilaç örnekleri arasında bazı durumlar ilişkilidir ve elektrot reaksiyon mekanizmasının yaşayan hücrelerle bağlantısını açıklayan faydalı ipuçları verir.

Günümüze kadar yapılan farmasötik çalışmalarda ilaçların voltametik ve polarografik analizler yapılmasında ve analitiksel problemlerin çözümü için oldukça yaygındır.

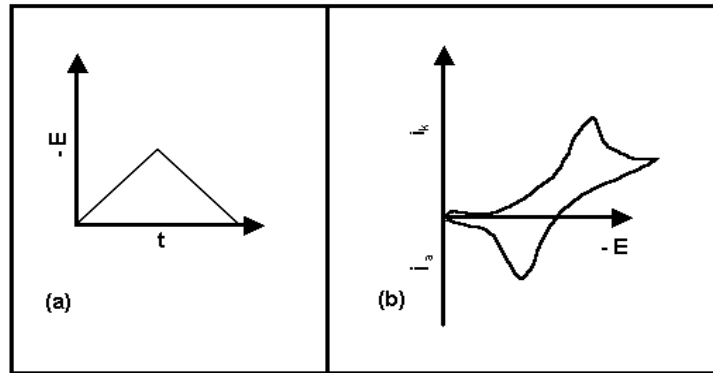
İlaç etken maddeleri içeren şuruplar, tabletler, kremler, fitiller ve merhemler ya da biyolojik sıvılar gibi karışık matriks içeren çeşitli örneklerde ilaçların belirlenmesi için

elektrokimyasal teknikler daha uygundur. Modern elektrokimyasal metotların, yardımcı maddelerin müdahalesine ihtiyaç olmaması, genelde ayırma ve ekstraksiyona gerek olmaması başlıca avantajlarından (18).

4.4.1.1. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri elektroanalitik kimyanın birçok alanda kullanılan ve oldukça öneme sahip olan bir tekniğidir. Kantitatif tayinler için pek az tercih edilen dönüşümlü voltametriden, kimyasal reaksiyonların nasıl meydana geldiğini açıklamakta ve genellikle redoks reaksiyonlarının araştırılmasında faydalanılmaktadır.

Referans elektrot ile çalışma elektrodu arasına zamanla artan şekilde potansiyel uygulanan, çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot arasındaki akım farkı potansiyele karşı okunan ve ilk olarak 1964’de Nicholson ve Shine tarafından geliştirilen bir tekniktir. DV, potansiyel –zaman eğrisinin şeklinden dolayı üçgen dalga veya testere dişi olarak ifade edilir (Şekil 4) (13).



Şekil 4. (a) Dönüşümlü voltametri de elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği; (b) Dönüşümlü voltametri de elde edilen akım-gerilim eğrisi (9)

Dönüşümlü voltametri tarama yönünün tersine de gerilimin uygulandığı hızlı gerilim tekniği olarak ifade edilir ve ileri ve geri yönde tarama hızı aynı şiddette uygulanır. Dönüşümlü voltametri de tek döngü ya da çok döngülü modlardan yararlanılabilir.

Anodik ve katodik pik potansiyeli (E_{pa} ve E_{pc}), anodik ve katodik pik akımı (I_{pa} ve I_{pc}) ve katodik ve anodik akım pik değerlerinin yarıya ulaştığı yarım tepe potansiyelleri ($E_p/2$) dönüşümlü voltametri de ölçülen parametrelerdir (19). Yöntemde, çözeltinin

karıştırılması önem kazanmaktadır; çünkü böylelikle elektrot yüzeyinin temiz kalması sağlanır. Elektrot yüzeyinde indirgenme ve yükseltgenme olayları sonucunda yeni bileşikler oluşabilir ve bunların yüzeyde kalabilme ihtimalleri vardır. Bu sebeple her tarama işleminden sonra elektrot yüzeyine temizlik işlemi uygulanmalıdır.

Tarama işlemi sırasında; analitin indirgenme potansiyeline (E_{pk} = Katodik pik potansiyeli) varıncaya kadar akımda artma meydana gelir ve bir maksimum değer elde edilir (I_{pk} = Katodik pik akımı). Bu varılan noktadan sonra elektrot yüzeyinde indirgenecek madde kalmadığı için akım değerinde azalma gözlenir. Devamında ters yönde tarama işlemi uygulandığında analitin yükseltgenme potansiyeline (E_{pa} =Anodik pik potansiyeli) elde edilinceye kadar akım değerinde artış meydana gelir ve tekrardan maksimum değer elde edilir (I_{pa} =Anodik pik akımı). Eğer reaksiyon tersinir ise (yani reaksiyon hem indirgenebilir hem de yükseltgenebilir ise) iki taraflı meydana gelen eğrilerin şekilleri birbirlerinden farksız olur. Fakat reaksiyon geri dönüşümlü ise E_{pk} ile E_{pa} arasında en fazla $59/n$ mV kadar bir fark olması gereklidir ve I_{pa} , I_{pk} değerlerinin birbirine eşit olmalıdır.

Elektrot reaksiyonunun geri dönüşümlülüğü azaldıkça; birbirlerinden farklı potansiyellerde anodik ve katodik pikler daha geniş olarak meydana gelir. Reaksiyon tersinir değilse; elektrot reaksiyonu sonucunda elektrot yüzeyinde indirgenme veya yükseltgenme olayı hızla meydana gelir ve geri reaksiyonda herhangi bir pik meydana gelmez. Dönüşümlü voltametrde anodik ve katodik yöndeki tarama hızları genellikle aynı alınır fakat hızlı homojen kimyasal reaksiyonlarda bu hızlar farklı olarak alınabilir.

Dönüşümlü voltametri genelde çözelti içerisinde analitin elektrokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde başvurulan bir tekniktir. Bu özellikler arasında redoks potansiyelinin belirlenmesi ve elektrokimyasal reaksiyon hızlarının hesaplanması yer alabilir.

Tarama hızı değiştirilerek pik yüksekliklerinin tarama hızıyla değişmesiyle birlikte adsorpsiyon, difüzyon ve elektron aktarımı reaksiyonuna eşlik eden kimyasal reaksiyonların varlığı ve özellikleri hakkında bilgi açığa çıkarılır. Elektrokimyasal çalışmalarda dönüşümlü voltametri, susuz çözeltilerdeki en kullanışlı yöntemlerden birini oluşturmaktadır. Genellikle, kararsız bir ara ürün veya ürün içeren elektrot reaksiyonlarının incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bu yöntem puls yöntemlerine

göre daha düşük hassasiyetle olması nedeniyle genellikle maddelerin kalitatif analizlerinde kullanılır.

Reaksiyon mekanizmalarının tahmin edilebilmesi ve kararsız türlerin termodinamik ve kinetik özelliklerinin belirlenebilmesi, elde edilen voltamogramların incelenmesiyle açığa çıkarılabilir. Elektrokimyasal ve kimyasal reaksiyonların her biri farklı reaksiyon hızı ve tersinirlik gösterirler. Bu farklılıkları voltamogramlarda gözlemleyebiliriz.

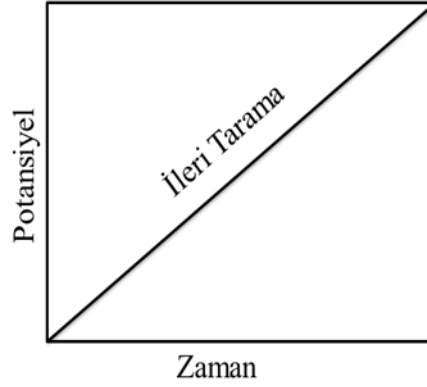
Bir elektrot reaksiyonunun, potansiyel aralığı, tarama hızı, sıcaklık, elektrodun cinsi, çözeltinin bileşimi gibi çeşitli parametreleri değiştirerek dönüşümlü voltamogramı alınırsa ve voltamogramlar incelenilirse, elektrot reaksiyonu ile ilgili bilgi sağlanabilir (1, 13). DV karmaşık elektrokimyasal uygulamalardan biri olsa da, birçok kimyasal mekanizmanın kinetik ve termodinamik açıdan deneysel veri incelemesine olanak sağlamaktadır (20). DV, farmasötik bileşiklerde redoks davranışı araştırmak için en iyi yöntem olarak bilinir (21). Numunenin elektrokimyasal davranışının incelenmesinde DV ön hazırlık işlemlerinde kullanılır (22). DV elektroaktif türlerin incelenmesi için ölçüm kolaylığı ile inorganik kimya, biyokimya ve organik kimya alanlarında fazlasıyla kullanılmaktadır (23).

4.4.1.2. Doğrusal Taramalı Voltametri

Doğrusal taramalı voltametri; doğrusal artan elektrot potansiyelinin fonksiyonu olarak elektrokimyasal reaksiyon akımının gözlemlendiği popüler ve güçlü bir yöntemdir.

Sabit potansiyel basamak yaklaşımından ziyade doğrusal taramalı voltametri de akım-potansiyel ilişkisi daha hızlı elde edilebilir ve daha fazla bilgi elde edilebilen bir tekniktir (Şekil 5).

Doğrusal taramalı voltametri bazik çözelti içinde platinyum elektrotlar gibi katalizörler yardımıyla oksijen indirgeme kinetiklerinin açıklanmasında kullanılır (24).



Şekil 5. Doğrusal voltametriye uygulanan potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak değişim grafiği

Çalışma elektrodunun potansiyelinin $2-5 \text{ mV s}^{-1}$ 'lik tipik bir hızla arttırıldığı ya da azaltıldığı ilk ve en basit voltametrik yöntem doğrusal taramalı voltametri tekniğidir. Genellikle, mikroamper derecesinde olan akım, çalışma elektroduna uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ifade edilir ve bu şekilde grafiğe geçirilir (10). Çözelti veya mikroelektrodun sürekli hareket halinde olduğu normal (doğrusal) taramalı voltametri hidrokinamik voltametri olarak ifade edilir. Günümüzde hidrokinamik voltametrinin en önemli uygulamalarından bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

- Akış enjeksiyon cihazlarından ya da kromatografik kolonlardan çıkan kimyasal türlerin belirlenmesi ve kantitatif analizi,
- Oksijen, laktoz, glukoz, ve sakkaroz gibi biyokimyasal önemi olan türlerin rutin analizi,
- Volumetrik ve kulometrik titrasyonlarda dönüm noktası tayini,
- Elektroanalitik kimyasal işlemlerle ilgili genel çalışmalar.

Hidrokinamik voltametri, akış enjeksiyon metodlarıyla veya yüksek basınç sıvı kromatografisiyle ayrılmış yükseltgenebilir ya da indirgenebilir bileşik veya iyonların belirlenmesinde ve tayininde yaygın bir şekilde tercih edilmektedir. Bu uygulamalar için bir ince tabaka hücresi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücrelerde, karşı elektrottan ayrılan çalışma elektrodu ince bir tabaka ile yalıtkan bir blok duvara yerleştirilir. Böyle bir hücrenin hacmi $0.1-1$ mikrolitre değerinde yer alır. Analitlerin sınır akımı bölgesine karşı gelen bir potansiyel, dedektörün altına yerleştirilmiş bir gümüş/ gümüş klorür referans elektrodu ile metal veya camı karbon elektrodu arasına

uygulanır. Bu tip uygulamada, analit için 10^{-9} - 10^{-10} M'a kadar düşük tayin sınırı tespit edilir (11).

4.4.1.3. Puls Voltametri

Puls yöntemlerinin gelişmesiyle geleneksel doğrusal taramalı voltametrinin uygulanmasındaki pek çok sınırlama engellenmiştir. Akımı, istenen faradayik eğri ile girişim yapan yükleme akımı arasındaki farkın büyük olduğu bir anda ölçme işlemi gerçekleştirilmek, puls voltametrik yöntemlerin hepsinin temelinde yatan ana ilkeyi oluşturmaktadır. Bu yöntemler için çok farklı çeşitte katı elektrotlar tercih edilmektedir (8).

4.4.1.3.1. Normal Puls Voltametri

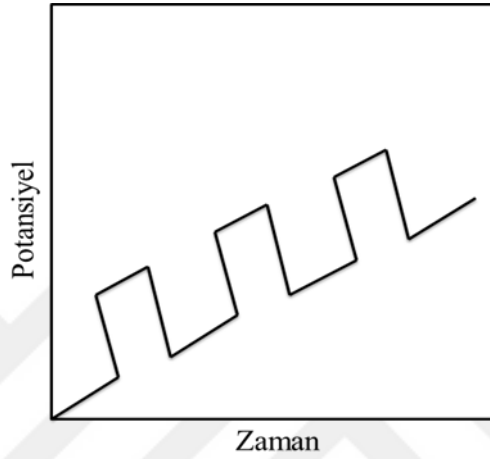
Normal puls voltametri potansiyel puls serisi ile sabit aralıkta, sürekli artan genlik ve her pulstan sonra başlangıç potansiyel değerine geri dönüş şeklinde uygulanır. Akım önemli ölçüde şarj akımı bileşenini azaltmak için yeterlidir ve her bir darbe sonunda, belli bir süre ölçülür (25). Normal puls voltametrisinde puls uygulama süresi arttıkça elektrot olayı daha tersinir olarak meydana gelmektedir.

4.4.1.3.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisinde normal voltametrinde artan doğru akım voltajına uygulanan potansiyel sonlarına doğru sabit pulsalar oluşturulur (Şekil 6). Puls uygulamasından önce ve puls uygulamasının sonuna doğru akım ölçümü yapılır. İkisi arasındaki fark potansiyele karşı grafiğe geçirilir ve voltamogram pik şeklinde gözlenir. Pikin tepe noktasındaki potansiyel, pik potansiyeli olarak tanımlanır ve E_p şeklinde ifade edilir. Pik potansiyeli $E_{1/2}$ civarında gözlemlenir (11).

Diferansiyel puls voltametrinin yüksek duyarlılığı iki sebebe bağlanabilir: Bunlardan ilki, faradayik akımın artması; ikincisi ise, faradayik olmayan yükleme akımının azalarak değişmesidir. Potansiyel aniden 50 mV artırıldığında, elektrodu çevreleyen yüzey tabakasında elektroaktif bir tür varsa, analit derişimini yeni oluşturulan potansiyel tarafından istenen seviyeye düşürecek ani bir akım artışı meydana gelir. Fakat bu potansiyel için gerekli olan denge derişimine erişilince akım, difüzyonu karşılayacak yeterli bir noktaya; yani, difüzyon kontrollü akım seviyesine ulaşır.

Klasik voltametrinde başlangıçtaki ani akım artışı gözlenmez. Çünkü ölçümün yapıldığı süre, bu anlık akımın ömründen çok daha büyüktür. Diğer taraftan bu akım artışı tamamen sona ermeden önce puls voltametrinde akım ölçme işlemi gerçekleştirilir. Ölçülen akım hem difüzyon kontrollü bir bileşeni; hem de yüzey tabakasındaki derişimi Nernst eşitliğinin gerektirdiği bir değere indirecek bir bileşeni içerir; yani toplam akım, tipik olarak difüzyon akımından birkaç kat daha büyüktür.



Şekil 6. Diferansiyel puls voltametrisinde uygulanan potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak değişim grafiği

Hidrodinamik şartlar altında bir sonraki puls serisi başlamadan önce çözelti, analit derişimi bakımından homojen bir şekil alır. Bu uygulanan her voltajda, her voltaj pulsı için aynı ölçekte ani bir akım artışı olacağı ifade edilir.

Elektroda potansiyel pulsı ilk uygulandığında, yük arttığı için faradayik olmayan akımda da ani bir artış olur. Fakat bu akım zamanla üstel olarak azalır ve sıfıra yaklaştığı gözlenir. Akımı bu evrede ölçmek için faradayik olmayan artık akım büyük oranda azaltılır ve sinyal/gürültü oranının arttığı gözlenir. Bunun sonucunda duyarlılıkta önemli bir artış meydana gelir.

Son zamanlarda bu yöntem en yaygın kullanılan analitik voltametrik yöntemlerden biri haline gelmiş olup, ağır metal iyonlarının eser derişimlerini belirlemede özellikle kullanışlıdır (8).

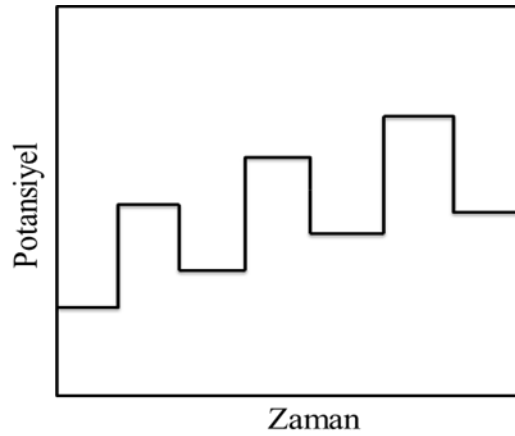
4.4.1.3.3. Kare Dalga Voltametri

Kare dalga voltametri elektrokinetik ölçümlerinin ve elektrot işlemlerinin mekanistik çalışmaları gibi analitik uygulamalar için uygun olan güçlü bir elektrokimyasal tekniktir.

Puls tekniklerinin gelişmiş duyarlık, dönüşümlü voltametrinin elektrodun içgöçü mekanizması ve empedans tekniklerinin çok hızlı elektrot işlemleriyle kinetik bilgi elde edilmesi gibi avantajlarının birleşmesiyle oluşan kare dalga voltametri günümüzde en gelişmiş voltametrik tekniklerden biri olarak kabul edilir.

Modern kare dalga voltametrisi geçiş potansiyellerinin bir birleşimi olan ve değişmeyen elektrot ile uygulanan periyodik kare şekilli potansiyel işlevi belirleyebilen özellikli dijital elektrokimyasal araçlarla birleştirilmiştir. KDV temel özelliklerinin yanı sıra, yeni metodolojik değişiklik önermesi, tekniğin kapsamı ve uygulama çeşitliliğinin geliştirilmesine olanak sağlar (Şekil 7).

İlave olarak, son zamanlarda hem analitik numunelerin belirlenmesi için kullanılan tipik çalışmalarda hem de biyokimyasal çalışmalarda ve mekanik ve elektrokinetik amaçlı uygulamalarda kare dalga voltametri teorisinin oldukça fazla katkısı olmuştur.



Şekil 7. Kare dalga voltametrinde uygulanan potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak değişim grafiği

İlaç olarak kabul edilen çeşitli bileşiklerin fizyolojik açıdan önemli sistemlerin, biyolojik aktif maddelerin, pestisitler ve daha fazla türün analitiksel uygulamalarında ve

temel çalışmalarında en gelişmiş voltametrik tekniklerden biri olan kare dalga voltametrisi sıklıkla tercih edilir.

Kare dalga voltametrisi analitik uygulamalar için kullanıldığında, diğer voltametrik yöntemlere kıyasla daha fazla avantaja sahiptir. Bu voltametri yöntemi oldukça fazla duyarlık, kısa analiz süresi ve kapasitif akımların önemli indirgenme kabiliyetleri ile tanınır. Elektroaktif olarak tanımlanan ya da çalışılan, çeşitlendirme için uygulanan farklı modlardaki duyarlıklarda KDV'nin avantajları bulunmaktadır. Son yıllarda, pahalı olan ve uzun süre alan kromatografi ve spektrometrik yöntemlere nazaran kare dalga voltametrisi uygulanabilir ve ucuz bir alternatif yöntem olarak açığa çıkmıştır. KDV'nin en değerli yeteneklerinden biri çeşitli farmasötik ve fizyolojik örneklerde benzer yapılar ile bileşikler eş zamanlı belirleme için yapılan uygulamalarıdır (26).

4.4.1.4. Sıyırma Yöntemleri

Sıyırma voltametrisi, elektroliz ile bir ön deriştirme basamağı ve daha sonra voltametrik çalışma gerektiren elektrokimyasal yöntemleri kapsar. Bu işlemler sırasında analit genellikle karıştırılan bir çözeltide öncelikli olarak bir elektrot üzerine biriktirilir. Ölçülen biriktirme süresinden sonra elektroliz işlemi tamamlanır. Daha sonra birikmiş analit voltametrik yöntemlerden biri ile belirlenir. Sıyırma işlemi anotta gerçekleşiyorsa; potansiyel anodik, katotta olacaksa katodik yönde taranır (8).

4.4.1.4.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi

Element analizlerinin ppt seviyede yapılabildiği bir yöntemdir. Çalışma sırasında çözelti içerisindeki metal iyonları verilen bir zaman dilimi içerisinde gerekli bir negatif potansiyel uygulanarak elektrot üzerine biriktirme işlemi gerçekleştirilir.

Anodik sıyırma voltametrisi eser miktar ölçümlerinde tayin yapılabilmesine olanak sağlar ve bu nedenle genellikle metal tayinleri için tercih edilir (13, 27).

4.4.1.4.2. Katodik Sıyırma Voltametrisi

Elektrot ile suda çözünmeyen tuzlar meydana getirebilen bileşiklerin analizinde bu yöntem tercih edilir. Elektroda bu defa pozitif potansiyel uygulayarak elektrot yüzeyinde çözünmeyen bir tabaka meydana getirilir. Daha sonra negatif bir potansiyel uygulanarak biriken maddeler çözülerek çözeltiye geçirilir (28, 29).

4.4.1.4.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrиси

Bu teknik anodik ve katodik sıyırma voltametrisine benzemesine karşılık bazı farklılıklar içermektedir. Temel fark biriktirme işlemi sırasında analitin ya elektrotun yüzeyine adsorbe edilmesi veya kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotlar üzerinde kimyasal bir reaksiyon ile tutulmasının sağlanmasıdır. Analit önce elektrot yüzeyinde adsorplanır, ardından da sıyırma işlemi meydana getirilir. Adsorptif sıyırma voltametrиси çalışmalarında modifiye elektrotların kullanımı yüksek hassasiyetli ilaç analizlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır (13, 30, 31).

4.4.2. Polarografi

Voltametri tipleri arasında polarografi doğrusal taramalı voltametrinin ilk bulunan ve kullanılan tipidir ve hidrodinamik voltametriden iki yönden farklılık göstermektedir. Bunlardan birincisi, konveksiyonun önlenmiş olması, ikincisi ise çalışma elektrodu olarak bir damlayan cıva elektrodun tercih edilmesidir. Konveksiyondan kaçınılmasının sonucu olarak polarografik sınır akımları sadece difüzyonla denetlenir. Konveksiyon olmadığı için, polarografik sınır akımları hidrodinamik sınır akımlarından genellikle 10-1000 kat daha küçüktür. Polarografide akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda meydana gelir.

Polarografinin Avantajları;

- Cıva üzerindeki hidrojen aşırı gerilimi yüksek olduğu için pek çok analizde tercih edilebilir.
- Her an yenilendiği için tekrarlanabilir akım geçmesine yardımcı olur.

Polarografinin dezavantajları;

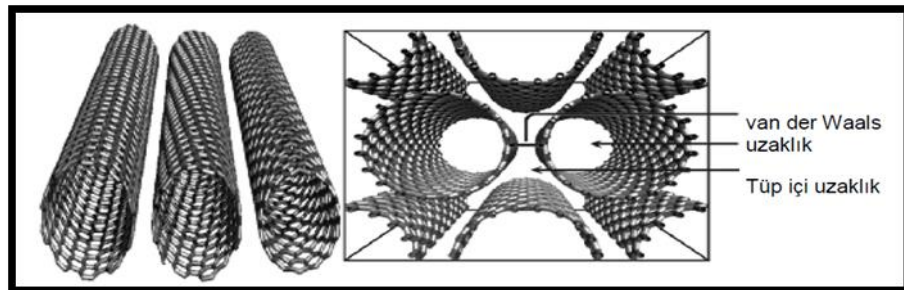
- Cıva bulunduğu ortamda buharlaşır ve buharlar çok zararlıdır. Cıva buharları ile uzun süre temasta kalan araştırmacılarda cıva solunum yolu ile kana geçer ve organizmada yağda çözünerek birikimlere neden olur.
- Kullanılan cıvanın çok saf olması gerekir ve her zaman istenen saflıkta cıva bulmak kolay değildir. Bu sebeple oldukça zor saflaştırma işlemlerinin yapılmasına neden olur.
- Cıvanın +0.5 V'dan daha pozitif voltajda oksitlenmesi bir negatif yön teşkil eder. Bu, cıvanın anot olarak kullanılmasına neden olur (8, 11).

4.5. Karbon Nanotüpler

Nanomateriyaller son yıllarda geniş potansiyelleri nedeniyle farklı alanlarda büyük ilgi odağı olmuşlardır. Iijima tarafından 1991 yılında keşfedilen karbon nanotüpler (KNT), diğer nano malzemeler arasında önemli bir grup temsil eder. Karbon nanotüpler basit kimyasal bileşimlere ve atomik bağ konfigürasyonuna sahiptirler. Nano materiyaller arasındaki zenginlik, yapı ve özelliklerle ilişkilidir ve geniş çeşitlilik sergiler. KNT keşfinden bu yana, eşsiz yapı, elektronik ve mekanik özelliklerinden dolayı çeşitli bilimsel çalışmaların hedefi olmuştur ve oldukça geniş uygulama alanları için çok ilgi çekici bir materyal olmaktadır (32). KNT, yüksek elektrik iletkenlik, geniş yüzey alan, kimyasal kararlılık, çoğu elektrolit çözeltilerindeki nispeten kimyasal inertlik ve geniş çalışma potansiyel aralığı gibi özelliklerinden dolayı elektrokataliz ve elektroanaliz süreçlerinde elektrot malzemesi olarak işlev gördüğünden, elektron transfer reaksiyonlarını desteklemek için kullanılabilir (33). Bu özellikler yeni elektrokimyasal sensör ve elektroanalitik malzemelerin geliştirilmesi için elektrokimyasal yüzey modifikasyonlarına olanak sağlar (34). Bu nano malzemelerin elektronik özellikleri, biyolojik türler (insülin, karbonhidratlar, hidrojen peroksit, nükleik asitler, dopamin, askorbik ve ürik asit) ve moleküllerin geniş çalışma aralığı için elektron transfer reaksiyonlarının ilerleyişinde önemli rol oynar (33).

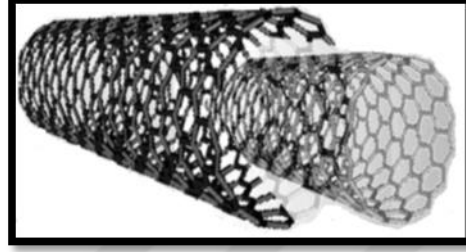
İki farklı türde karbon nanotüp bulunmaktadır:

1. Tek duvarlı karbon nanotüp olarak ifade edilen (TDKNT) nanotüpler tek grafen tabakasından meydana gelir ve uzunluğu santimetreye kadar ve çapı 1 nm civarında olan pürüzsüz silindirik yapılardır (Şekil 8).



Şekil 8. Tek duvarlı karbon nanotüp (35)

2. Çok duvarlı karbon nanotüpler ise (ÇDKNT) birden fazla grafen tabakasından meydana gelmektedir. Çok duvarlı nanotüplerin boyu onlarca mikron uzunluğuna ulaşabilmektedir ve çapı 2-100 nm arasında farklılık göstermektedir. Yoęun silindirik formlarının diziliminden ibaret olan bu nanotüpler 0.35 nm olarak ayrılmış ve grafitten ayrılmış esas tabakalarla aynıdır ( ekil 9) (35, 36).



Şekil 9. Çok duvarlı karbon nanotüp (35)

Karbon nanotüplerin çok yönlü fabrikasyon teknolojisi karbon nanotüplerin ve karbon nanotüp tabakalarının hızlı ve etkili üretimine olanak sağlar. Bu çalışmaların birçoğu geniş alan yüzeyindeki periyodik çeşitlendirilmesine ve karbon nanotüpün düzenlenmesine ihtiyaç duyar. Substrat bazlı kimyasal buhar çöktürme sayesinde dikey olarak hazırlanmış karbon nanotüplerin etken sentezi meydana getirilir. Bu  alışma süresince, KNT geliştirmek için gerekli olan katalizör film substrat tabakasında biriktirilir. Yapısal KNT tabakalarının üretiminde nanomateryal transfer baskı, lazer kırpma ve litografi benzeri yöntemler uygulanmaktadır. KNT dizileri üretmek için litografi aşaması mikro elektronik tekniklerde sıklıkla kullanılır (37).

KNT çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu kullanım alanlarını şöyle sıralayabiliriz:

- Kapasitörlerde,
- Elektrokimyasal enerji depolamada,
- Yakıt pillerinde,
- Elektronik uygulamalarda,
- Elektrokimyasal ve biyo sensörlerde,
- Moleküler mühendislikte,
- Karbon nanotüp hidrid cihazlarda,

- Tıpta,
- Katalizde uygulanmaktadır.

Karbon nanotüpler, çok iyi kimyasal ve termal kararlılık özelliği gösterir ve esnek yapıya sahiptirler. Maliyetleri çok yüksek olmamakla birlikte, bozunma nadiren görülür. Üretimi kolaydır ve geri dönüşüm uygulanabilir. Bu üstün özelliklerinden dolayı KNT yukarıdaki birçok çalışma alanında uygulanabilmektedir (38).

Çok duvarlı karbon nanotüpler; yüksek dağılma kalitesine sahip olan karboksilik asit gruplarının redoks aktivitesiyle işlevsel hale getirilirler (39).

Nano malzemelerin; daha geniş yüzeyli biyomoleküllerin immobilizasyonunda kullanılması daha büyük avantaj sağlar (40).

4.6. Nimesulid

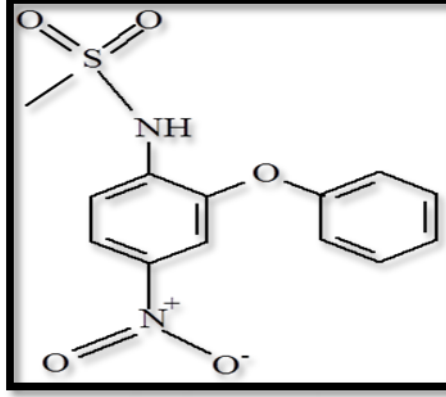
Tez kapsamında üzerinde çalışılmak üzere seçilen ilaç etken maddesi NİM, N-(4-nitro-2-fenoksifenil) metansülfonamid, asidik olmayan ($pK_a = 6.5$), steroidal olmayan, anti-iltihabik, anti-piretik ve analjezik özellikli bir ilaçtır. Bu ilaç, prostaglandin sentetaz/ siklooksijenaz inhibe eder ve prostaglandin üretimini sınırlar.

Nimesulidin siklooksijenaz inhibisyon potansiyeli ara seviyededir fakat NİM siklooksijenaz-2'ye (COX-2) nispeten seçicidir ve bu nedenle mide hasarları azdır. İnflamasyon meydana geldiği durumlarda, nimesulid bir serbest radikal toplayıcı olarak görev yapar ve doku hasarına karşı korumaya yardımcı olur. Nimesulid, osteoartrit ve romatizmal artrit ile ilişkili ağrıyı azaltmada etkilidir (41).

Nötr ortamda, NİM suda çok az çözünür ($\sim 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) ve farklı şekilde çözünürlüğü arttırılmaya çalışılır. Bununla birlikte, nimesulid bir zayıf asidik sülfonanilid grubuna sahiptir ve hem lipofilikliği hem de çözünürlüğü pH değerine göre değişir ancak organik polar çözücülerde serbestçe çözünür. Aromatik halka içinde, fenosiklik grubu (aromatik eter) ve nitrik grubu bulunur. Nimesulidin analjezik ve antiinflamatuvar etkisi tamamiyle COX inhibisyonuna bağlı değildir.

Nimesulid metaloproteinaz gibi enzimlerin güçlü bir inhibitörüdür ve bu enzimler serbest radikaller ile dejeneratif süreçte bağlı olan molekül matrislerinin bozunmasından sorumludur. Nimesulid neredeyse tamamen serbest radikal ve konjuge formlarında 4-

hidroksi nimesulid haline biyolojik olarak dönüştürülür ve bu metabolitin, bileşiklerin antienflamatuar aktivitesine katkı sağladığı gözlenmektedir (Şekil 10).



Şekil 10. Nimesulidin yapısı

İlaç ve fizyolojik matrislerde, nimesulid miktar tayini hem klinik tanı hem de kalite kontrol açısından oldukça önemlidir (42).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Maddeler

5.1.1. Nimesulid Stok Çözeltisi

Elektrokimyasal analizini gerçekleştirmek üzere Sanovel-Türkiye'den temin edilen NİM ilaç etken maddesi kullanıldı.

Nimesulidin sudaki çözünürlüğü az olduğu için metanolde çözülerek stok çözeltisi hazırlandı. 0.003 g NİM saf ilaç etken (1×10^{-3} M'lık) maddesi tartılarak 10 mL'lik balon jojeye alındı ve üzerine bir miktar metanol ilave edilip daha iyi çözünmesi için ultrasonik banyoda 10 dakika bekletildi ve metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

Nimesulidin tampon ortamındaki çalışma çözeltilerinde %20 metanol oranı daima korundu.

5.1.2. Sodyum Hidroksit Çözeltisi

Konsantrasyonu 5.0 M olan sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi hazırlamak için 20 g NaOH tartıldı ve balon joje içerisinde ultra saf su çözüldükten sonra ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon çözeltilerinin pH değerlerinin ayarlanması için saflaştırılmadan aynen kullanıldı.

5.1.3. Asetat Tampon Çözeltisi (AT)

1.0 M konsantrasyonda asetat tampon çözeltisini hazırlamak için 28.6 mL asetik asit (CH_3COOH) (%99.8, yoğunluğu 1.049 g mL^{-1} , Merck, Almanya) bir balon jojeye alındı ve hacmi ultra saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. Daha sonra, 5.0 M NaOH kullanılarak istenen pH'lara (3.5, 4.5 ve 5.5) ayarlandı. Tampon çözeltiler oda sıcaklığında hazırlandı ve daha sonra buzdolabında saklandı.

5.1.4. Britton-Robinson Tampon Çözeltisi (BRT)

0.04 M Britton-Robinson tampon çözeltisi hazırlamak için 2.74 mL fosforik asit (H_3PO_4 , %85, yoğunluğu 1.685 g mL^{-1} , Merck, Almanya), 2.29 mL glasiyal asetik asit (CH_3COOH , %99.8, yoğunluğu 1.049 g mL^{-1} , Merck, Almanya) ve 2.47 gram borik asit (H_3BO_3) (%99.5, Aldrich, U.S.A.) karışımı ultra saf su kullanılarak 1.0 L'ye tamamlandı. Stok olarak hazırlanmış bu çözelti 100'er mL'lik bölümlere ayrılarak, 5.0

M NaOH çözeltisi ile istenen pH'lara (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) ayarlandı. Tampon çözeltiler bozulmaması için buzdolabında bekletildi.

5.1.5. Fosfat Tampon Çözeltisi (FT)

0.1 M'lık stok fosfat tampon çözeltisi H_3PO_4 (%85, yoğunluğu 1.685 g mL^{-1} , Merck, Almanya) hazırlamak için, 6.84 mL H_3PO_4 balon jojeye alınıp ultra saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. Bu stok çözelti 100'er mL'lik kısımlar halinde ayrıldı ve pH değerleri 5,0 M NaOH ile 3.0 ve 4.0 olacak şekilde ayarlandı.

pH değerleri 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 olan 0.1 M fosfat tampon çözeltileri $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ($\geq 99\%$, Merck, Almanya) ve Na_2HPO_4 ($\geq 99\%$, Aldrich, Almanya) kullanılarak hazırlandı. pH 5.0 fosfat tamponunu hazırlamak için 8.7 mg Na_2HPO_4 ve 1.55 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ tartılarak balon jojeye alındı. Daha sonra balon jojenin hacmi ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. pH değeri 6.0 olan fosfat tampon çözeltisini hazırlamak için 82 mg Na_2HPO_4 ve 1.47 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ tartılarak balon jojeye alındı ve balon jojenin hacmi ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Daha sonra pH 7.0 için 0.54 g Na_2HPO_4 ve 0.97 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ tartılarak balon jojeye alındı ve balon jojenin hacmi ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Son tampon çözeltimiz pH 8.0 fosfat için 1.22 g Na_2HPO_4 ve 0.22 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ tartıldı ve balon jojeye alındı. Daha sonra balon jojenin hacmi ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon çözeltilerinin pH'ları 5.0 M NaOH çözeltisi kullanılarak pH metre ile ayarlandı. Tampon çözeltiler oda sıcaklığında hazırlandı ve bozulmamaları için buzdolabında muhafaza edildi.

5.1.6. Dimetil Formamid

Karbon nanotüpün homojen süspansiyonunun hazırlanmasında ve karbon pasta elektrot yüzeyine karbon nanotüp modifiye işlemi sırasında, N,N-Dimetil formamid (DMF, %99, Aldrich, Almanya) karbon nanotüplerin yüzeye daha iyi bir şekilde tutunması için kullanıldı.

5.2. Kullanılan Diğer Cihaz ve Malzemeler

Kullanılan tampon çözeltilerinin pH'larının ayarlanmasında Hanna HI2211 model (Romanya) masaüstü pH metre kullanıldı. pH metrenin kalibrasyonu, pH değerleri sırasıyla 4.0 ve 7.0 olan standart tampon çözeltileri (Merck, Almanya) ile oda

sıcaklığında yapıldı. Çözeltilerin hazırlanması amacıyla 0.5-10, 10-100 ve 100-1000 µL hacim aralıklarına sahip Socorex (İsviçre) ve İsolab (Almanya) marka mikropipetler kullanıldı.

Çözeltileri karıştırmak için Heidolph MR Hei Standart model (Almanya) magnetik karıştırıcı kullanıldı. Tüm tampon ve çözeltiler Arium proUV model ultra saf su cihazı (Almanya) kullanılarak elde edilen ultra saf su (direnç değeri $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) ile hazırlandı.

Yıkama ve temizlik işlerinde Sartorius marka Arium 61316 model saf su cihazı ile elde edilen saf su kullanıldı ve tartımlar Ohaus PA214C model (U.S.A.) elektronik terazi ile yapıldı. Karıştırma, çözme ve temizlik işlemleri Sonica 3300MH model (İtalya) ultrasonik banyoda yapıldı.

5.3. Elektrokimyasal Ölçme Sistemi

5.3.1. Potansiyostat

Yapılan çalışmalar sırasında Autolab marka ve PGSTAT128N model potansiyostat/galvanostat cihazı kullanıldı (Metrohm-Autolab, Hollanda). Cihaz ile ölçüm alınırken Nova 1.10 programından yararlanıldı (Resim 2).

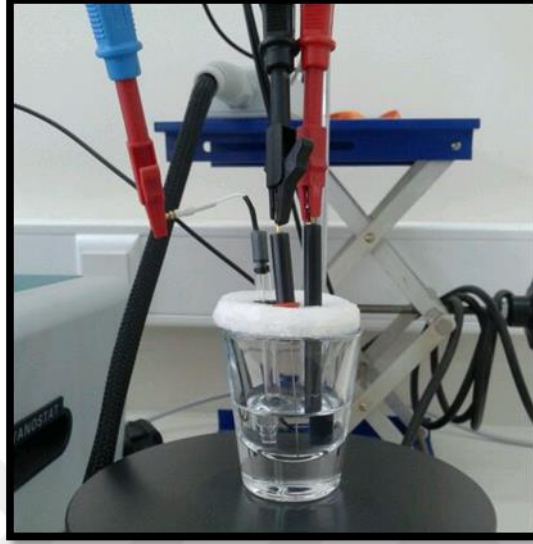


Resim 2. Potansiyostat cihazı

5.3.2. Elektrot Sistemi

Gerçekleştirilen deneyler sırasında üçlü hücre elektrot sistemi kullanıldı. Bu elektrotlardan çalışma elektrotu olarak; çok duvarlı karbon nanotüp modifiyeli karbon

pasta elektrot (BASİ, U.S.A.), karşıt elektrot olarak platin tel (BASİ, U.S.A.) ve referans elektrot olarak Ag/AgCl (BASİ, U.S.A.) kullanıldı (Resim 3).



Resim 3. Üçlü elektrot sistemi

5.4. Modifiye Elektrodun Hazırlanması

5.4.1. Karbon Pasta Elektrodun Hazırlanması (KPE)

Karbon pasta elektrotun hazırlanması işlemi sırasında BASİ marka karbon pasta elektrot kullanıldı.

Grafit tozu ve %15, %20, %25, %30, %35, %40 oranlarında mineral yağı kullanılarak karbon pasta hazırlandı. Bu oranlar %15'lik KPE için %85 grafit tozu ve %15 mineral yağ, %20'lik KPE için %80 grafit tozu ve %20 mineral yağ, %25'lik KPE için %75 grafit tozu ve %25 mineral yağ, %30'lik KPE için %70 grafit tozu ve %30 mineral yağ, %35'lik KPE için %65 grafit tozu ve %35 mineral yağ, %40'lik KPE için %60 grafit tozu ve %40 mineral yağ içerecek şekilde hazırlandı.

Bütün oranlardaki KPE için 0.3 g grafit tozu tartıldı. Mineral yağ miktarları sırasıyla %15, %20, %25, %30, %35 ve %40 için 0.06 mL, 0.09 mL, 0.12 mL, 0.15 mL, 0.19 mL ve 0.24 mL idi. Hassas şekilde tartılan grafit tozu üzerine hazırlanacak %KPE oranına bağlı olarak mikropipet yardımıyla ölçülen mineral yağ ilave edildi ve homojen olması için bir havanda karıştırıldı. Nimesulid ilaç etken maddesinin elektrokimyasal

özelliklerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanmış karbon pastalar sırasıyla boş elektrodun içerisine yerleştirildi. Elektrot yüzeyinin pürüzsüz olması için bir kağıt üzerinde sekiz çizilerek KPE elektrot hazırlandı.

pH değeri 7.0 olan 0.04 M BRT içerisinde 1×10^{-5} M NİM çözeltisi hazırlandı ve DV, DPV ve KDV yöntemleri ile elektrokimyasal ölçümleri alındı ve voltamogramlar karşılaştırıldı.

5.4.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Hazırlanması (ÇDKNT)

Çok duvarlı karbon nanotüp modifiyeli KPE'un hazırlanmasında kullanılan % 95 saflıkta 30 ± 10 nm yarıçapında 1-5 μ m uzunluğunda (Nanolab USA) kullanıldı.

Modifikasyon işleminin gerçekleştirilebilmesi için ağırlıkça ÇDKNT'ün %0.2 ve %0.5'lik DMF içinde süspansiyonları hazırlandı. %0.2'lik ÇDKNT için 1.0 mg karbon nanotüp tartılarak ependorfa alındı ve üzerine 0.5 mL DMF ilave edildi. %0.5'lik ÇDKNT hazırlamak için 1.0 mg karbonnanotüp tartılıp, üzerine 0.2 mL DMF ilave edildi ve hazırlanan süspansiyonların homojen karışması için dört saat boyunca ultrasonik banyoda karıştırıldı ve buzdolabında saklandı.

5.4.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Elektrodun Hazırlanması

Modifikasyon işlemi için öncelikle NİM ilaç etken maddesinin en iyi cevap verdiği %25 grafit tozu-mineral yağ oranlı karbon pasta elektrot boş elektrota dolduruldu ve yüzeyin pürüzsüzleştirildi. Hazırlanan %0.2 ÇDKNT/DMF süspansiyondan 2.5 ve 5.0 μ L hacimlerde ve %0.5'lik ÇDKNT/DMF süspansiyondan 1 ve 3 μ L ayrı ayrı bu karbon pasta elektrot üzerine damlatıldı ve 24 saat oda sıcaklığında kurutularak çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot elde edildi.

Nimesulidin yükseltgenme yönündeki en yüksek pik akımını elde edeceğimiz elektrot modifikasyonunu belirlemek için hazırladığımız her bir modifiye elektrot ile pH değeri 7.0 olan BRT içerisinde 1×10^{-5} M NİM'in DV, DPV ve KDV yöntemleri ile voltamogramları alındı.

5.5. Voltametrik Çalışmalar

5.5.1. pH Taraması

Nimesulid ilaç etken maddesinin elektrokimyasal özelliklerinin belirlenmesi kapsamında yapılan çalışmalar için uygun tampon ve pH'nın elde edilmesi için pH taraması yapıldı. Bu çalışma kapsamında pH'ları 3.5, 4.5 ve 5.5 olan 1.0 M AT, pH'ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olan 0.04 M BRT, pH'ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 olan 0.1M FT çözeltileri kullanıldı.

1×10^{-4} M NİM çözeltisi kullanılarak DV, DPV ve KDV yöntemleri ile NİM'in farklı tamponlar içerisindeki iki tekrarlı ölçümleri alındı. 1×10^{-4} M NİM çözeltisi için 1×10^{-3} M NİM stok çözeltisinden 0.5 mL alınıp, üzerine 0.5 mL metanol ilave edilip ölçümü alınacak tampon çözeltisi ile 5.0 mL'ye tamamlandı.

Dönüşümlü voltametri yöntemi için potansiyel tarama aralığı -0.4 ve +1.4 V, DPV yöntemi için +0.4 ve +1.2 V ve KDV yöntemi için +0.5 ve +1.2 V olarak belirlendi. Her ölçüm sonrasında, NİM içermeyen tampon çözeltisi içerisinde DV yöntemi kullanılarak -0.4 ile +1.4 V arasında 100 mV s^{-1} tarama hızında beş döngülü tarama yapıldı ve böylece elektrot yüzeyi elektrokimyasal olarak temizlendi.

pH taraması sonucunda elde edilen DV, DPV ve KDV voltamogramları incelendi. NİM ilaç etken maddesinin en simetrik ve en yüksek pik akımına sahip olduğu tampon ortamı belirlendi ve bundan sonraki yapılacak deneysel çalışmalar bu tampon ortamında gerçekleştirildi.

5.5.2. Hız Taraması

Hız taraması çalışmalarının sonucunda elde edilen sonuçlar NİM'in yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon veya adsorpsiyon kontrollü olduğu hakkında bilgi sağladı.

Hız taraması çalışması için; pH 5.0 FT ortamında 1×10^{-4} M NİM çözeltisinin DV yöntemi ile +0.5 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında sırasıyla 200, 150, 100, 75, 50, 25 ve 10 mV s^{-1} tarama hızlarında tek döngü ile tarandı.

5.5.3. Kalibrasyon Çalışması

Kalibrasyon çalışması için DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak +0.4 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında elde edilen veriler (NİM piklerinin akım değerleri) okunarak kalibrasyon grafiğine geçirildi.

NİM'in pH 5.0 FT ortamında 2×10^{-9} ile 4×10^{-5} M konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlandı. 1×10^{-3} M ana stok çözeltisinden hata oranını en aza indirip doğru sonuç bulabilmek için NİM konsantrasyonları 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} ve 1×10^{-7} M olan dört ara stok çözelti hazırlandı. Konsantrasyonu 1×10^{-4} M olan birinci ara stok, 1×10^{-3} M ana stoktan 1.0 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Konsantrasyonu 1×10^{-5} M olan ikinci ara stok 1×10^{-4} M birinci ara stoktan 1.0 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Konsantrasyonu 1×10^{-6} M olan üçüncü ara stok, 1×10^{-5} M ikinci ara stoktan 1.0 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Konsantrasyonu 1×10^{-7} M olan dördüncü ara stok 1×10^{-6} M üçüncü ara stoktan 1.0 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

NİM çalışma çözeltileri, ara stok çözeltileri kullanılarak pH 5.0 FT içerisinde hazırlandı. Bu çözeltilerden; 2×10^{-9} , 4×10^{-9} , 6×10^{-9} ve 8×10^{-9} M NİM çözeltileri konsantrasyonu 1×10^{-7} M olan ara stoktan hazırlandı. 1×10^{-8} , 2×10^{-8} , 4×10^{-8} , 6×10^{-8} ve 8×10^{-8} M NİM çözeltileri konsantrasyonu 1×10^{-6} M olan ara stoktan; 1×10^{-7} , 2×10^{-7} , 4×10^{-7} , 6×10^{-7} ve 8×10^{-7} M NİM çözeltileri konsantrasyonu 1×10^{-5} M olan ara stoktan; 1×10^{-6} , 2×10^{-6} , 4×10^{-6} , 6×10^{-6} ve 8×10^{-6} M NİM çözeltileri konsantrasyonu 1×10^{-4} M olan ara stoktan; 1×10^{-5} , 2×10^{-5} ve 4×10^{-5} M NİM çözeltileri konsantrasyonu 1×10^{-3} M olan NİM ana stok çözeltiden hazırlandı. %20 metanol oranı her bir çalışma çözeltisi için korundu.

Kalibrasyon çalışmaları yapılırken en düşük NİM konsantrasyonuna sahip çalışma çözeltisinden başlayarak (2×10^{-9} M) sırasıyla en yüksek (4×10^{-5} M) NİM konsantrasyonuna sahip çalışma çözeltisine kadar DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak voltamogramlar elde edildi. Pik akım değerleri okunarak kalibrasyon grafikleri oluşturuldu.

NİM ilaç etken maddesi için teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) değerleri DPV yöntemleri kullanılarak elde edilen voltamogramlar ışığında çizilen kalibrasyon grafiklerinden eşitlik (Eşitlik 2 ve 3) kullanılarak elde edildi.

$$TS=3 \text{ (S/m)} \quad (2)$$

$$TAS=10 \text{ (S/m)} \quad (3)$$

Eşitliklerde, S beş değer üzerinden elde edilen NİM'in yükseltgenme pik akım değerlerinin standart sapması ve m ilgili yöntemin kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir (43).

5.5.4. Tekrar Edilebilirlik Çalışması

Nimesulidin elektrokimyasal özelliklerinin incelendiği bu çalışmada kesinliğinin belirlenmesi için DPV yöntemi kullanıldı. Tekrar edilebilirlik çalışmaları gün içi ve günler arası olmak üzere yapıldı.

Tekrar edilebilirlik çalışması DPV yöntemi kullanılarak +0.4 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında elde edilen NİM piklerinin akım değerleri elde edildi. Her ölçüm sonrasında NİM içermeyen pH 5.0 0.1 M FT içerisinde -0.4 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında beş döngülü voltamogramları alınarak elektrotun temizlenme işlemi gerçekleştirildi.

Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmasını gerçekleştirebilmek için; 1×10⁻³ M NİM ana stok çözeltisi kullanılarak pH 5.0 0.1 M FT içerisinde üç adet 8×10⁻⁶ M NİM çalışma çözeltileri hazırlandı.

Gün içi tekrar edilebilirlik değerleri için hazırlanan NİM'in çalışma çözeltilerinden aynı gün içerisinde elde edilen veri değerlerinden NİM'in pik akımı ve pik potansiyeli verileri kullanılarak beş değer üzerinden ortalamaları, standart sapma ve %BSS belirlendi.

Günler arası tekrar edilebilirlik verilerinin belirlenebilmesi için bir hafta içerisinde üç farklı günde hazırlanan üçer adet 8×10⁻⁶ M'lık NİM çalışma çözeltileri kullanıldı. 8×10⁻⁶ M için NİM'in pik potansiyeli ve pik akım değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve yüzde bağıl standart sapmaları (Eşitlik 4) beş değer üzerinden hesaplandı.

$$\%BSS = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}}{\bar{X}} \times 100 \quad (4)$$

Yukarıdaki eşitlikte belirtilen, %BSS yüzde bağıl standart sapma, S standart sapma, $\bar{x}$ verilerin aritmetik ortalaması, n veri sayısı ve x_i ölçülen değerdir (8).

5.5.5. Nimesulidin Farmasötiklerden Tayini

Nimesulid ilaç etken maddesinin farmasötik formlarından analizi DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçüm aralığı +0.6 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında gerçekleştirildi. Her ölçüm sonrasında NİM içermeyen pH 5.0 0.1 M FT içerisinde -0.4 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında ve 100 mVs⁻¹ tarama hızında beş döngülü DV ile elektrodun yüzeyinin temizlenme işlemi gerçekleştirildi.

Tablet çalışmasını gerçekleştirebilmek için her bir tabletinde 100 mg NİM içeren Nimes® isimli farmasötik kullanıldı. Bu tabletlerden 10 adet alınarak hassas bir şekilde tartıldı. Daha sonra bu 10 adet tablet iyice ezilerek ve karıştırılarak homojen olması sağlandı.

Nimesulid ilaç etken maddesinin 1×10⁻³ M'lık stok çözeltisini hazırlamak için gerekli olan toz tablet miktarı belirlendi ve 5.89 mg toz tablet tartılarak metanol ile 5 mL'ye tamamlandı. Maddenin tamamen çözünebilmesi için hazırlanan çözelti ultrasonik banyoda 10 dakika karıştırıldı ve daha sonra ışık almayan kapalı bir ortamda yarım saat bekletildi. Bu sayede çözünmeyen diğer maddelerin dibe çökmesi sağlandı.

6×10⁻⁶ M ara stok çalışma çözeltisini hazırlarken hata payını en aza indirmek için konsantrasyonu 1×10⁻⁴ M olan ara stok çözeltisi kullanıldı. 1×10⁻⁴ M ara stok çalışma çözeltisi için 1×10⁻³ M ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı. 6×10⁻⁶ M tablet ara stok çalışma çözeltisini hazırlamak için, 1×10⁻⁴ M ara stok çözeltisinden 0.3 mL alınıp üzerine 0.7 mL metanol ilave edildi ve daha sonra pH 5.0 0.1 M FT ile 5 mL'ye tamamlandı.

Hazırlanan üç adet 6×10⁻⁶ M tablet çalışma çözeltisinin DPV yöntemi kullanılarak elde edilen voltamogramlardan NİM pikinin pik potansiyeli ve pik akımı değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve yüzde bağıl standart sapmaları (Eşitlik 4) beş değer üzerinden hesaplandı.

5.5.6. Geri Kazanım Çalışması

Nimesulid ilaç etken maddesinin elektrokimyasal özellikleri incelenirken geliştirilen metotların doğruluğu için DPV yöntemi kullanılarak geri kazanım çalışması gerçekleştirildi.

Ölçüm aralığı +0.6 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında gerçekleştirildi. Her ölçüm sonrasında NİM içermeyen pH 5.0 0.1 M FT içerisinde -0.4 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında ve 100 mV s^{-1} tarama hızında beş döngülü DV ile elektrodun yüzeyinin temizlenme işlemi gerçekleştirildi.

Geri kazanım çalışmasını gerçekleştirmek için $8 \times 10^{-6} \text{ M}$ çalışma çözeltisi kullanıldı. Bu amaçla, NİM'in farmasötik dozaj formu olan Nimes[®] tabletlerinden hazırlanan çözeltiye saf NİM çözeltisi enjekte edildi. $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ tablet stok çözeltisi ve $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ NİM saf ilaç etken maddesi çözeltisi kullanıldı. $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ tablet stok çözeltisini hazırlamak için $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ tablet ana stok çözeltisinden 1.0 mL alınıp üzeri metanol ile 10 mL'ye tamamlandı. $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ NİM saf ilaç etken maddesi ara stok çözeltisi $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ NİM saf ilaç etken ana stok çözeltinden 1.0 mL alınıp üzeri metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. 0.3 mL $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ tablet ara stok çözeltisinden, 0.1 mL $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ saf ilaç etken maddesi ara stok çözeltisinden alınarak üzerine 0.6 mL metanol ilave edilip pH 5.0 0.1 M FT ile 5.0 mL'ye tamamlandı.

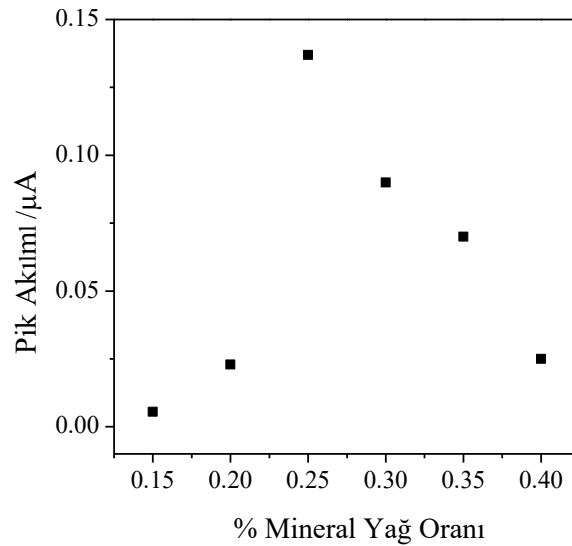
Bu çözeltiden üç adet hazırlanarak DPV yöntemiyle voltamogramları alındı. Voltamogramlardaki NİM pik akım değerleri okunarak kalibrasyon grafiğinden elde edilen eşitlikte yerine kondu ve % geri kazanım değeri hesaplandı. Beş değer üzerinden ortalama % geri kazanım, standart sapma ve %BSS (Eşitlik 4) değerleri belirlendi.

6. BULGULAR

6.1. Elektrot Modifikasyonunun Belirlenmesi

Nimesulid ilaç etken maddesinin elektrokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde ve yapılacak analiz çalışmalarında kullanılacak olan en uygun KPE için grafit tozu ve mineral yağ oranı belirlendi. Bu işlemi gerçekleştirmek için mineral yağ oranı %15, %20, %25, %30, %35 ve %40 olacak şekilde karbon pasta elektrotlar hazırlandı.

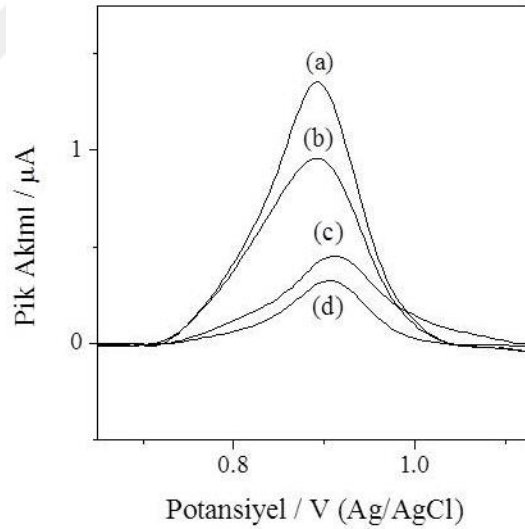
Boş elektrotun içine hazırlanan karbon pasta sıkıca dolduruldu ve yüzeybir yağlı kağıt üzerinde sekiz çizerek düzeltildi. NİM için en uygun karbon pasta elektrot grafit tozu: mineral yağ oranını belirleyebilmek amacıyla 1×10^{-5} M NİM'in pH 7.0 0.04 M BR tampon çözelti ortamında DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak iki tekrarlı ölçümleri alındı. Ölçümler arasında beş döngülü DV ile elektrotun yüzey temizliği gerçekleştirildi. DV, DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen voltamogram sonuçlarına göre NİM'in yükseltgenme yönündeki en yüksek pik akım değerleri %25'lik KPE ile elde edildi. DV, DPV ve KDV ile elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. Bu nedenle Şekil 11'de 1×10^{-5} M NİM'in sadece DPV ile elde edilen verilerle mineral yağ yüzdesine karşı pik akım grafiği gösterildi. NİM için uygun karbon pasta bileşimi belirlendikten sonra KPE'un ÇDKNT ile modifikasyon işlemine geçildi.



Şekil 11. 1×10^{-5} M NİM'in pH 7.0 0.04 M Britton-Robinson tampon ortamı DPV ile elde edilen mineral yağ yüzdesine karşı pik akımı değerleri.

Karbon pasta elektrodun ÇDKNT ile modifikasyonu için %0.2 ve %0.5'lik ÇDKNT/DMF süspansiyonları kullanıldı. %0.2'lik süspansiyondan 2.5 ve 5.0 µL, %0.5'lik süspansiyondan 1.0 ve 3.0 µL hacimlerde ayrı ayrı olmak üzere karbon pasta elektrot yüzeyine mikropipet ile damlatıldı ve 24 saat oda sıcaklığında kurutuldu. ÇDKNT'ün damlatma işleminin homojen olmasına ve elektrot yüzeyinin ortasına damlatılmasına özellikle dikkat edildi.

Hazırlanan bu dört farklı modifiye elektrot ile NİM'in yükseltgenme yönündeki pik akım değerlerinin hangi modifikasyonda daha iyi olduğunu belirleyebilmek için 1×10^{-5} M NİM'in pH 7.0, 0.04 M BRT içerisindeki çözeltileri ile DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak voltamogramları alındı. Bu voltamogramlar sonucunda %0.2'lik süspansiyondan 2.5 µL damlatarak modifiye ettiğimiz KPE ile NİM'in yükseltgenme reaksiyonunda en yüksek pik akım değerine sahip en simetrik pikin elde edildiği görüldü. DV, DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen sonuçlar birbiri ile uyumlu olduğu için Şekil 12'de sadece DP voltamogramları gösterildi.

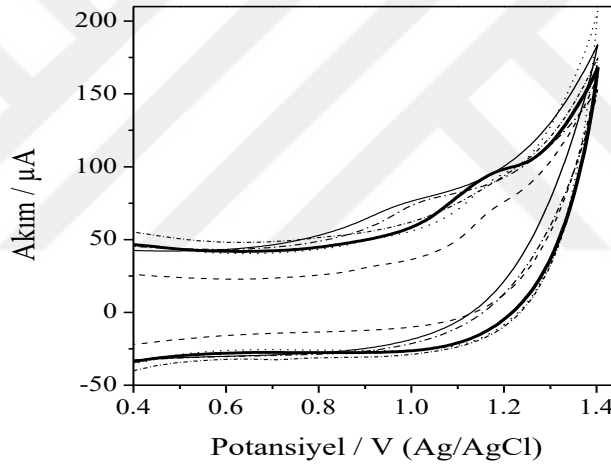


Şekil 12. 1×10^{-5} M NİM'in pH 7.0 0.04 M Britton-Robinson tampon ortamında, (a) %0.2, 2.5 µL; (b) %0.5, 1 µL; (c) %0.5, 3 µL ve (d) %0.2, 5 µL ÇDKNT/DMF ile modifiye edilmiş KPE ile alınan DP voltamogramları.

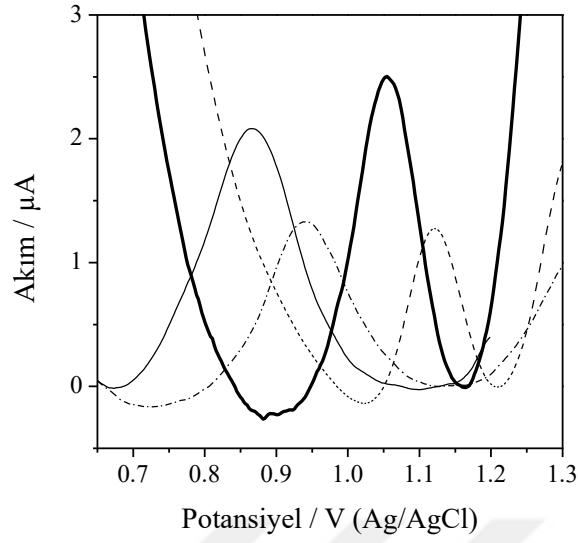
6.2. pH Etkisi

Yapılan elektrokimyasal analizler için NİM etken maddesinin en uygun tampon ortamının belirlenebilmesi amacıyla pH taraması gerçekleştirildi. Bu çalışma kapsamında pH'ları 3.5, 4.5 ve 5.5 olan 1.0 M AT, pH'ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olan 0.04 M BRT ve pH'ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 olan 0.1 M FT çözeltileri kullanıldı.

1×10^{-4} M NİM içeren çözeltilerin DV, DPV ve KDV yöntemleri voltamogramları alındı. Kullanılan yöntemlerle elde edilen sonuçlar birbiriyle uyumlu olduğundan bazı tamponlar içerisindeki Şekil 13'te dönüşümlü voltamogramlar ve Şekil 14'te kare dalga voltamogramlar gösterildi.



Şekil 13. 1×10^{-4} M Nimesulidin dönüşümlü voltamogramları. 1.0 M AT pH 3.5 (-----), 0.1 M FT pH 4.0 (.....) ve pH 5.0 (—), 0.04 M BRT pH 7.0 (— · — · —), pH 9.0 (— · — · —); 0.1 M FT pH 5.0 (-·-·-·). Tarama hızı 100 mV s^{-1} .



Şekil 14. 1×10^{-4} M NİM'in KD voltamogramları 1.0 M AT pH 3.5 (---), 0.1 M FT pH 5.0 (—), 0.04 M BRT pH 7.0 (-.-.-), pH 9.0 (—).

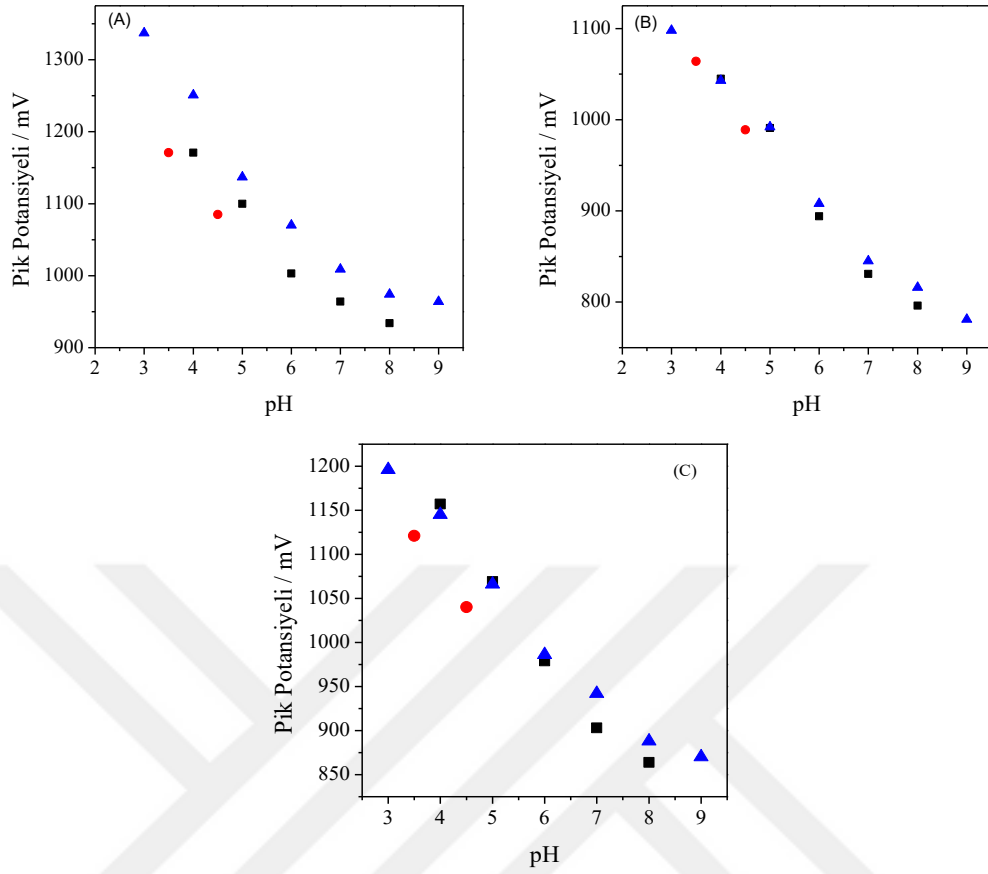
Şekil 13'te NİM'in sadece yükseltgenme yönünde pik verdiği indirgenme yönünde herhangi bir piki olmadığı görüldü. Dolayısıyla NİM'in yükseltgenme reaksiyonunun tersinmez olduğu belirlendi.

Konsantrasyonu 1×10^{-4} M olan NİM'in çalışma çözeltilerinin DV, DPV ve KDV ile elde edilen voltamogramları okunarak pH'ya karşı pik potansiyeli ve pH'ya karşı pik akımı grafikleri çizildi. Şekil 15 incelendiğinde, pH arttıkça pik potansiyeli pH 7.0'a kadar daha negatif değerlere doğru kaydı ancak pH 7.0'dan sonra NİM pik potansiyeli pH'dan bağımsız oldu. NİM'in pik potansiyeline karşı pH (E_p -pH) grafiğinden pH 3.0 ile 7.0 arasında elde edilen edilen doğrusallık denklemleri Eşitlik 5, 6, 7'de görülmektedir. AT için pH 5.5'ta ve FT için pH 3.0'da birleşmiş iki pik görüldüğü için grafiklere bu pH daki NİM'in pik akımı ve pik potansiyeli değerleri dahil edilmedi.

$$E_p(\text{mV}) = 1427 - 67.2 \text{ pH}; r=0.982 \text{ (pH 3.0 and 7.0 arası)} \quad (5)$$

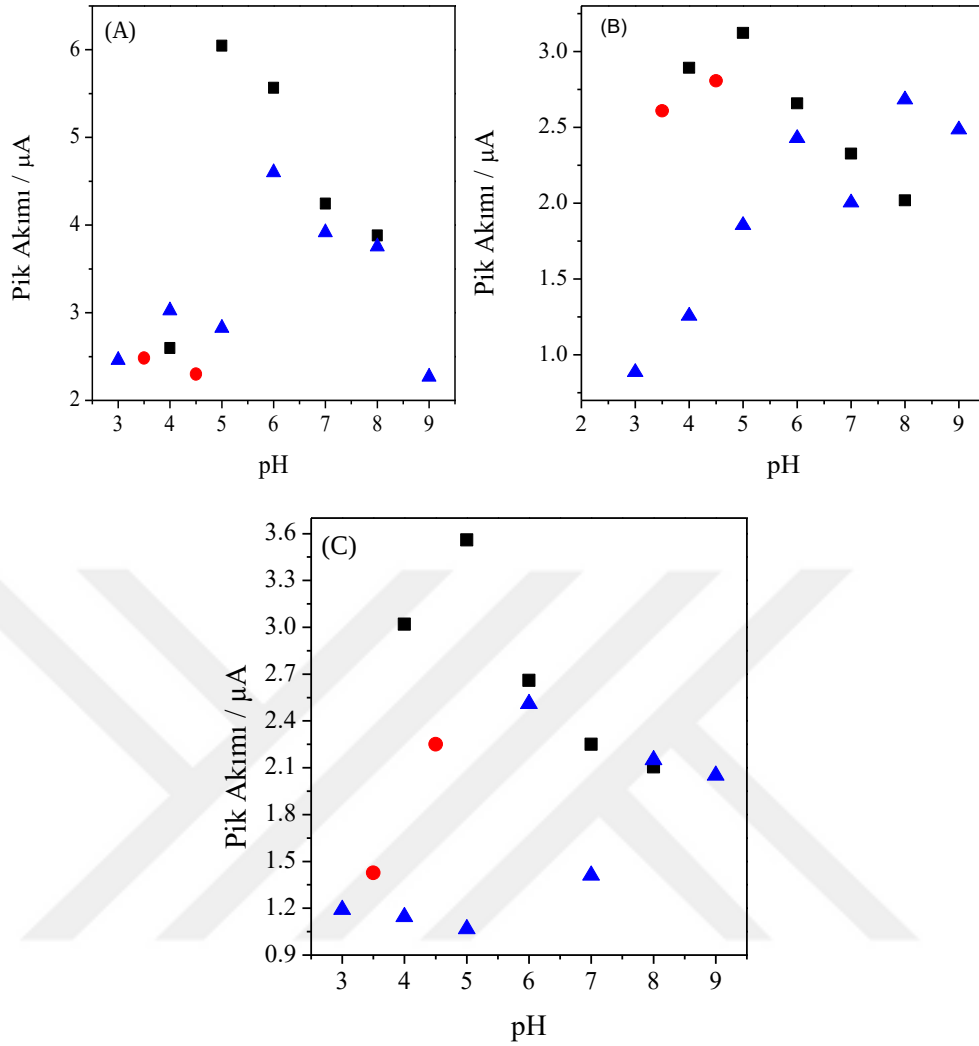
$$E_p(\text{mV}) = 1298 - 64.1 \text{ pH}; r=0.992 \text{ (pH 3.0 and 7.0 arası)} \quad (6)$$

$$E_p(\text{mV}) = 1401 - 66.7 \text{ pH}; r=0.991 \text{ (pH 3.0 and 7.0 arası)} \quad (7)$$



Şekil 15. (A) DV, (B) DPV (C) KDV ile elde edilen 1.0 M AT, 0.1 M FT, 0.04 M BRT tampon ortamlarındaki 1×10^{-4} M NİM'in pH karşı pik potansiyeli grafikleri. ■: 0.1 M FT, ▲: 0.04 M BRT, ●: 1.0 M AT.

Nimesulidin elektrokimyasal analizinde en uygun tampon ortamını belirlemek için DV, DPV ve KDV ile elde edilen voltamogramlardan pik akımı değerleri okundu ve pH'ya karşı pik akımı değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 16'dan da görüldüğü gibi NİM için en yüksek pik akımı değerini veren en simetrik pikin 0.1 M FT için pH 5.0 ortamında elde edildiği görüldü. Bundan sonraki çalışmalara bu tampon ortamında devam edildi.

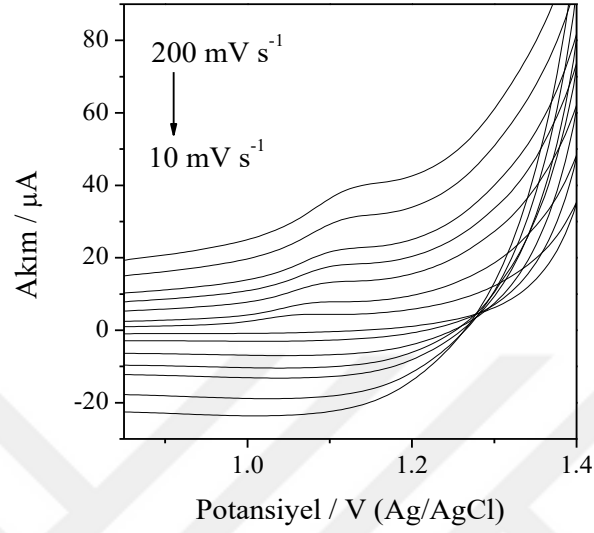


Şekil 16. (A) DV, (B) DPV (C) KDV ile elde edilen 1.0 M AT, 0.1 M FT, 0.04 M BRT tampon ortamlarındaki 1×10^{-4} M NİM'in pH karşı pik akımı grafikleri. ■: 0.1 M FT, ▲: 0.04 M BRT, ●: 1.0 M AT.

6.3. Hız Taraması

Nimesulid için hız taraması yapılarak, yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü ya da adsorpsiyon kontrollü olduğu hakkında bilgi edinildi. Bu çalışmayı gerçekleştirmek için pH 5.0 0.1 M FT ortamındaki 1×10^{-4} M NİM çözeltisi ile +0.5 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında sırasıyla 200, 150, 100, 75, 50, 25 ve 10 mV s^{-1} değişen tarama hızlarıyla DV ile tek döngülü tarama gerçekleştirildi (Şekil 17). Hız taraması çalışması üç kez tekrarlandı. Elde edilen voltamogramlardan pik akım değerleri okundu. Tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) karşı pik akım değerleri (I_p) (Şekil 18A) ve tarama hızının logaritmasına ($\log v$) karşı pik akım değerlerinin logaritması

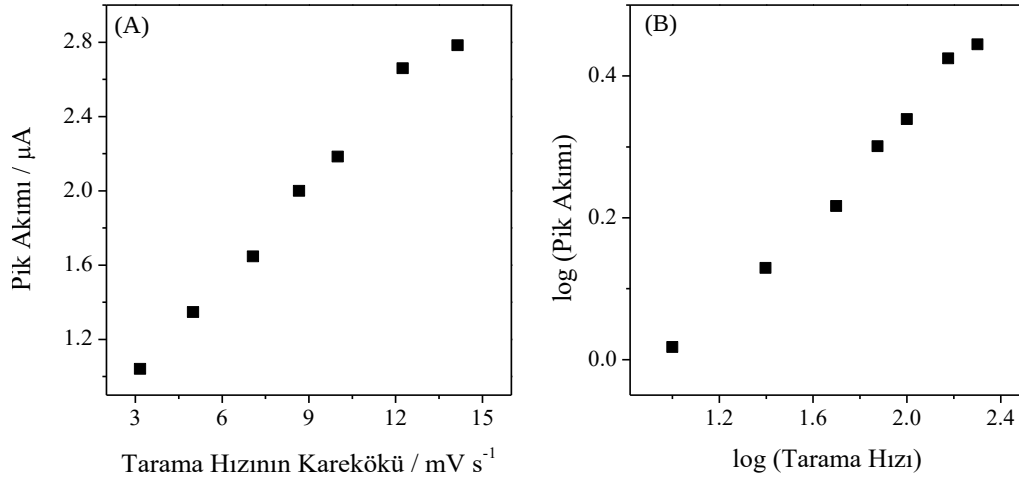
($\log I_p$) (Şekil 18B) grafiğe geçirildi ve elde edilen doğruların eğim değerleri hesaplandı. Bu eğim değerlerinden yola çıkarak NİM'in yükseltgenme yönündeki reaksiyonunun difüzyon kontrollü olduğu belirlendi.



Şekil 17. Tek döngülü DV yöntemi ile yapılan pH 5.0 0.1 M FT içerisindeki 1×10^{-4} M NİM'in hız taraması voltamogramları.

$$I_p (\mu A) = 0.341 v^{1/2} (mV s^{-1}) - 0.339 (r = 0.991) \quad (8)$$

$$\log I_p (\mu A) = 0.166 \log v (mV s^{-1}) + 0.519 (r = 0.991) \quad (9)$$

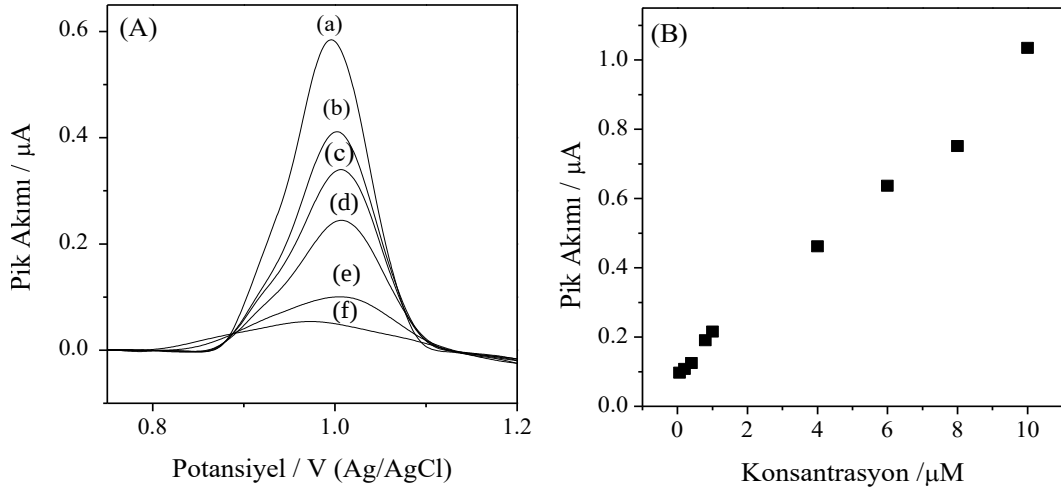


Şekil 18. pH 5.0 0.1 M FT ortamındaki 1×10^{-4} M NİM'in DV ile elde edilen (A) tarama hızının kareköküne karşı pik akımı ve (B) log (tarama hızı)'na karşı log (pik akımı) grafikleri.

6.4. Kalibrasyon Çalışması

Nimesulid ilaç etken maddesinin kantitatif analizinin yapılabilmesi için uygun deneysel parametreler belirlendikten sonra DV, DPV ve KDV yöntemi kullanılarak +0.4 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında kalibrasyon çalışması gerçekleştirildi. Ancak, kalibrasyon grafiği için doğrusallık sadece DPV ile elde edilebildi. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalara sadece DPV ile devam edildi ve bu yöntem ile elde edilen sonuçlar verildi. Elde edilen voltamogramlardan NİM piklerinin akım değerleri okunarak kalibrasyon grafiğine geçirildi.

Kalibrasyon çalışmaları pH 5.0 0.1 M FT ortamında 2×10^{-9} ile 4×10^{-5} M konsantrasyon aralığında gerçekleştirildi. Şekil 19A'da DPV yöntemi için NİM konsantrasyonundaki artış ile pik akımının değişimi görülmektedir. Elde edilen DP voltamogramlarındaki NİM pik akım değerleri okunarak NİM konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi ve doğrusallığın görüldüğü konsantrasyon aralığı 6×10^{-8} - 1×10^{-5} M olarak belirlendi. Çizilen doğrusal kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler Tablo 1'de gösterildi.



Şekil 19. pH 5.0 olan 0.1 M FT ortamında, (A) (a) 10.0, (b) 8.0, (c) 6.0, (d) 4.0, (e) 1.0 ve (f) 0.4 μM NİM için DP voltamogramları (B) 6×10^{-8} - 1×10^{-5} M aralığındaki akım-konsantrasyon grafiği.

Tablo 1. Modifiye elektrot kullanılarak NİM'in DPV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV
Pik Potansiyeli (mV)	1000
Doğrusallık Aralığı (μM)	6×10^{-2} -10
Eğim ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.8905 ± 0.0030
Kesim Noktası (μA)	0.1008 ± 0.0147
Korelasyon Katsayısı, r	0.9911
Teşhis Sınırı, TS (μM)*	1.07×10^{-3}
Tayin Alt Sınırı, TAS (μM)*	3.24×10^{-3}

*Üç değer üzerinden hesaplandı.

6.5. Tekrar Edilebilirlik Çalışması

Nimesulid için geliştirilen DPV'nin kesinliği kanıtlamak amacıyla 8×10^{-6} M NİM içeren pH 5.0 0.1 M FT ortamındaki üç farklı çalışma çözeltisi için gün içi ve günler arası olmak üzere tekrar edilebilirlik çalışması yapıldı. Elde edilen beş değer üzerinden pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin ortalama, standart sapma ve %BSS değerleri hesaplandı (Tablo 2).

Tablo 2. Modifiye elektrot kullanılarak NİM'in DPV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		DPV (8×10^{-6} M)	
		Gün İçi	Günler Arası
Pik Potansiyeli	Veriler (mV)	1006	1006
		1003	995
		995	999
		1002	999
		999	1004
	Ortalama (mV)	1001	1002
	Standart Sapma	2.04	2.63
	% BSS*	0.204	0.263
Pik Akımı	Veriler (μ A)	0.5978	0.5978
		0.6050	0.5977
		0.5977	0.5978
		0.6030	0.598
		0.5978	0.5858
	Ortalama (μ A)	0.6003	0.5952
	Standart Sapma	0.0034	0.0051
	% BSS*	0.574	0.8620
*Yüzde bağıl standart sapma			
Hesaplamalar beş değer üzerinden yapıldı.			

6.6. Tablet ve Geri Kazanım Çalışması

Nimesulid ilaç etken maddesinin tablet ve geri kazanım çalışmalarının gerçekleştirilmesi için NİM'in farmasötik dozaj formu kullanıldı ve DPV yöntemi ile çok duvarlı karbon nanotüp modifiyeli karbon pasta elektrot kullanılıp yöntemin doğruluğu araştırıldı.

Tablet çalışmasını gerçekleştirebilmek için pH 5.0 0.1 M FT ortamında 8×10^{-6} M NİM çözeltisi (üç adet) hazırlandı. NİM'in DP voltamogramlardan pik akım değerleri okundu ve kalibrasyon çalışmasında elde edilen grafiğin doğrusal eşitliğinden yararlanılarak NİM'in pik akım değerlerine karşılık gelen NİM miktarları hesaplandı. Beş değer üzerinden ortalama NİM miktarı, standart sapma ve %BSS elde edildi. Pik akım değerlerinden elde edilen ortalama NİM miktarı, farmasötik formunda belirtilen NİM miktarı ile karşılaştırıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Modifiye elektrot kullanılarak NİM'in DPV yöntemi ile elde edilen tablet verileri

		DPV
Beyan Edilen NİM Miktarı (mg)		100
Tablet	Bulunan NİM Miktarı	100.47
		100.84
		100.09
		100.25
		100.41
Ortalama Bulunan NİM Miktarı (mg)		100.41
Standart Sapma		0.28
% BSS*		0.28
% BH		-0.41
*Hesaplamalar beş değer üzerinden yapıldı.		

Geri kazanım çalışması için 1×10^{-4} M tablet stok çözeltisi ve 1×10^{-4} M NİM saf ilaç etken maddesi çözeltisi kullanıldı ve tablet çözeltisine saf NİM çözeltisi ilave edilip 8×10^{-6} M çalışma çözeltisi (üç adet) hazırlandı. Bu çözelti kullanılarak DPV yöntemiyle NİM çözeltilerinin voltamogramları alındı. Elde edilen voltamogramlardan beş adet NİM pik akım değerlerinden %BSS ve % geri kazanım değerleri hesaplandı (Tablo 4).

Tablo 4. Modifiye elektrot kullanılarak NİM'in DPV yöntemi ile elde edilen geri kazanım verileri

		DPV
İlave Edilen NİM Miktarı (mg)		33.33
Bulunan NİM Miktarı (mg)		34.52
		32.61
		33.83
		34.33
		35.66
Ortalama Bulunan NİM Miktarı (mg)		34.16
Ortalama Geri Kazanım (%)		100.65
Standart Sapma		0.82
% BSS*		0.82
% BH		-3.51
*Hesaplamalar beş değer üzerinden yapıldı.		

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

7.1. Elektrot Modifikasyonunun Belirlenmesi

Nimesulid ilaç etken maddesinin elektrokimyasal analizini gerçekleştirmek için en etken karbon pasta bileşimi belirlendi. Bunun için altı farklı karbon pasta bileşimi hazırlandı ve NİM'in yükseltgenme yönündeki en yüksek pik akım değeri %25 mineral yağ oranı ve %75 grafit tozu oranında kullanılarak hazırlanan KPE'tan elde edildi. Dolayısıyla çalışmalara bundan sonra bu elektrot ile devam edildi.

Hazırlanan %25'lik KPE'un modifikasyonu için ÇDKNT kullanıldı. ÇDKNT'ün DMF içinde %0.2 ve %0.5'lik süspansiyonları hazırlandı ve ÇDKNT/DMF süspansiyonlarından %0.2'den 2.5 ve 5.0 µL ve %0.5'ten 1.0 ve 3.0 µL KPE elektrot yüzeyine damlatıldı. Her modifikasyon sonrasında DV, DPV ve KDV ile 1×10^{-5} M NİM'in voltamogramları alındı. Voltamogramlar incelendiğinde en yüksek pik akımına sahip en simetrik pikin %0.2'lik süspansiyondan 2.5 µL damlatılarak modifiye edilen KPE ile elde edildiği gözlemlendi. Dolayısıyla çalışmaya bu modifikasyon ile devam edildi.

7.2. pH Etkisi

Nimesulidin elektrokimyasal analizi için yükseltgenme reaksiyon karakterizasyonunun ve en uygun tampon çalışma ortamının belirlenmesi için pH taraması çalışması yapıldı. Şekil 13'de görüldüğü üzere NİM'in sadece yükseltgenme yönünde pik verdiği, indirgenme yönünde herhangi bir pik vermediği belirlendi. Dolayısıyla NİM'in yükseltgenme yönündeki reaksiyonunun tersinmez olduğu sonucuna varıldı.

Nimesulidin pH 3.0 ile 9.0 arasında farklı tampon çözelti ortamında hazırlanan çalışma çözeltilerinin DV, DPV ve KDV yöntemleri ile voltamogramları alındı. Bu voltamogramlardan yararlanılarak çizilen pH'a karşı pik potansiyeli grafiklerinde (Şekil 15) pH arttıkça pik potansiyelinin pH 7.0'a kadar negatif değerlere kaydığı, pH 7.0'den sonra pik potansiyelinin pH'dan bağımsız olduğu görüldü. Bu durum yükseltgenmeden sorumlu elektroaktif grubun (metilsülfanamid grubu) asit-baz dengesinin pK_a 7.0 civarında olduğunu göstermektedir ve bu değer literatürdeki NİM'in pK_a 6.5 değeriyle uyumludur (41). Tamponun pH değeri NİM'in pK_a değerinden büyük olduğunda oluşan

konjuge baz baskın durumdadır ve böylece daha fazla konjuge baz oluşamaz ve yükseltgenme potansiyeli pH'dan bağımsız olur.

Nimesulidin pH'ya karşı pik potansiyeli grafiklerinde pH 3.0-7.0 aralığındaki doğruların eğim değerleri -64.1, -66.7 ve -67.2 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Nerst eşitliğindeki -59.0 mV/pH değerine oldukça yakın olduğundan NİM'in yükseltgenme reaksiyonunda eşit sayıda elektron ve proton yer almaktadır (44, 45).

NİM'in farklı tampon ortamlarında yapılan pH taraması sonucunda elde edilen voltamogramlardan en yüksek pik akımını veren en simetrik pik pH 5.0 0.1 M FT ortamında elde edildi (Şekil 15,16). Bundan sonraki tüm deneysel çalışmalar bu ortamda gerçekleştirildi.

7.3. Hız Taraması

Yapılan deneysel çalışmalarda reaksiyonun difüzyon ya da adsorpsiyon kontrollü olduğunu belirlemek amacıyla hız taraması yapıldı. Bu çalışmayı gerçekleştirmek için 1×10^{-4} M NİM'in pH 5.0 0.1 M FT tamponu ortamındaki çözelti kullanılarak sırasıyla 200 ile 10 mV s^{-1} arasında değişen tarama hızlarında DV ile tek döngülü tarama gerçekleştirildi. Nimesulidin yükseltgenme reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü mü difüzyon kontrollü mü olduğunun tespiti için Şekil 17'da görülen döngülü voltamogramların pik akım değerleri okundu. Tarama hızının kareköküne (mV s^{-1}) karşı pik akımı (Şekil 18A) ve log (tarama hızı)'na karşı pik log (pik akım) değerleri (Şekil 18B) grafiğe geçirildi. Elde edilen grafiklerin eğim değerlerinin 0.5'ten küçük olması da NİM reaksiyonunun difüzyon kontrollü olduğunu gösterdi (46).

7.4. Kalibrasyon Çalışması

Nimesulidin elektrokimyasal tayininin yapılabilmesi için uygun deneysel parametreler belirlendikten sonra DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak +0.4 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında kalibrasyon çalışması yapıldı. Kalibrasyon grafiği için doğrusallık DPV yöntemi ile elde edilebilmesine rağmen, DV ve KDV ile elde edilen sonuçlarda doğrusallık gözlenmedi. Bu nedenle bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalara DPV yöntemi ile devam edildi. Elde edilen voltamogramlardan NİM piklerinin akım değerleri okunarak kalibrasyon grafiği çizildi ve bu yöntem ile elde edilen sonuçlar Şekil 19'de verildi.

Nimesulid ilaç etken maddesinin DPV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğrusallık aralığının 6×10^{-8} - 1×10^{-5} M ($r=0.992$) olduğu belirlendi (Tablo 1).

Elde edilen kalibrasyon verileri literatürdeki NİM'in diğer elektrokimyasal çalışma sonuçları ile karşılaştırıldı. Tablo 5'deki doğrusallık aralığı ve teşhis sınırı değerleri bakımından incelendiğinde bu çalışmada kullanılan modifiye elektrot ve yöntem ile daha hassas ve duyarlı sonuçlar elde edildiği gözlemlendi.

Tablo 5. Modifiye elektrot ile elde edilmiş kalibrasyon verilerinin literatürdeki verilerle karşılaştırılması

Elektrot	Metod	Çalışma Aralığı (μ M)	Teşhis Sınırı (μ M)	Kaynak
Sisteik Asit/KNT ile Modifiye Edilmiş Camsı Karbon Elektrot	DPV	0.1-10	5.0×10^{-2}	(47)
Baryum ile Dop Edilmiş Çinko Oksit NPs ile Modifiye Edilmiş Camsı Karbon Elektrot	DPV	0.1-10	1.80×10^{-3}	(48)
Altın Elektrot	DPV	0.2-1.2	1.10×10^{-3}	(49)
Çok Duvarlı Karbon Nanotüp ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Elektrot	DPV	0.06-10	1.07×10^{-3}	Tez

7.5. Tekrar Edilebilirlik Çalışması

Nimesulid için geliştirilen DPV yönteminin kesinliğini kanıtlamak amacıyla gün içi ve günler arası olmak üzere tekrar edilebilirlik çalışması yapıldı. Çalışma çözeltisi olarak üç adet 8×10^{-6} M NİM çözeltisi kullanıldı ve beş değer üzerinden pik potansiyellerinin gün içi ve günler arası %BSS değerleri sırasıyla %0.204 ve %0.263, pik akımlarının gün içi ve günler arası %BSS değerleri sırasıyla %0.574 ve %0.862 olarak belirlendi. Bu veriler doğrultusunda DPV yönteminin kesinliğinin iyi olduğu gözlemlendi.

7.6. Tablet ve Geri Kazanım Çalışması

Nimesulid ilaç etken maddesinin DPV yöntemi kullanılarak elektrokimyasal analizi için yapılan çalışmaların doğruluğunun ve kesinliğinin belirlenmesi için tablet ve geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi.

Yapılan çalışmalar ile NİM'in farmasötik dozaj formu olan Nimes® içerisindeki etken madde haricindeki yardımcı maddelerin NİM'in elektrokimyasal analizinde herhangi bir etkisinin olup olmadığına bakıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda tablet içerisinde bulunan NİM miktarıyla, DPV yöntemiyle yapılan tablet çalışması sonucunda elde edilen NİM miktarının birbirine yakın olduğu belirlendi ve ortalama %BSS değerleri %0.28 olarak hesaplandı.

Geri kazanım çalışması için tablet çözeltisi üzerine saf NİM etken madde ilave edilerek hazırlanan çözeltilerin DPV ile elde edilen voltamogramlardan hesaplanan NİM miktarı % geri kazanım için %BSS'sı %0.82 olarak belirlendi.



8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, NİM'in elektrokimyasal analizi ÇDKNT ile modifiye edilmiş KPE kullanılarak DV, KDV ve DPV ile yapıldı. Öncelikli olarak karbon pasta elektrot için grafit tozu ve mineral yağ oranı NİM'in yükseltgenme yönündeki pik akım değerlerine göre belirlendi. Daha sonra yine NİM'in cevabına göre KPE'un modifikasyonu için ÇDKNT miktarı belirlendi. Daha sonra çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot ile NİM'in elektrokimyasal analizi DV, DPV, KDV yöntemleri ile yapıldı.

pH 3.0-9.0 aralığında hazırlanan tampon çözeltileri kullanılarak DV ile yapılan tarama sonucunda NİM için en uygun tampon ortamının pH 5.0 0.1 M FT olduğu belirlendi. Daha sonra yapılan hız taraması çalışması ile NİM'in yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü ve tersinmez olduğu görüldü.

Nimesulidin elektrokimyasal yöntemlerle miktar tayini için, pH 5.0 0.1 M FT farklı konsantrasyonlardaki NİM çözeltilerinin DV, DPV ve KDV yöntemleri ile kalibrasyon çalışması gerçekleştirildi. Fakat sadece DPV yöntemiyle doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edildi. DPV ile elde edilen kalibrasyon grafiğinden doğrusal çalışma aralığı, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı belirlendi. Nimesulidin literatürdeki voltametrik yöntemlerle yapılan miktar tayini çalışmalarının sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, bu çalışmada kullanılan modifiye elektrot ve yöntem ile daha geniş çalışma aralığı ve daha düşük teşhis sınırına inildiği ve dolayısıyla daha hassas ve duyarlı sonuçlar elde edildiği görüldü.

Ayrıca NİM'in pH 5.0 0.1 M FT ortamında için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen düşük %BSS verileri ile iyi bir kesinlik elde edilmiş oldu.

Nimesulid ilaç etken maddesinin farmasötik dozaj formlarından süzme ve ayırma işlemi uygulanmadan yapılan tablet ve geri kazanım çalışmalarının sonucunda elde edilen verilerin farmasötik formda belirtilen miktarla uyum gösterdiği belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda yapılan çalışmaların yüksek doğruluğa ve hassasiyete sahip olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak hızlı, ekonomik ve literatürdeki yöntemlere göre tercih edilebilecek daha duyarlı bir yöntem geliştirildi ve literatüre katkıda bulunuldu.

9. KAYNAKLAR

1. Özel AD (2007). Bazı hidrazonların elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi ve analitik amaçlı kullanılması. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
2. Bard AJ, Faulkner LR (2001). Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc,19-20.
3. Uslu B, Ozkan SA (2011). Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. Analytical letters 44: 2644–2702.
4. Yavaş AN (2014). Karbon pasta elektrotların bitki dokuları ile modifikasyonu ve elektrokataliz özelliklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
5. Gupta AK, Dubey RS, Malik JK (2013). Application of modern electroanalytical techniques: recent trend in pharmaceutical and drug analysis. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 4: 2450-2458
6. Farghaly OA, Abdel Hameed, RS, Abu-Nawwas AH (2014). Electrochemical Analysis Techniques: A Review on Recent Pharmaceutical Applications. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 8: 37-45.
7. Wang J (2000). Analytical Electrochemistry. İkinci baskı. John Wiley and Sons, Inc., USA; 1-190.
8. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (2013). Principles of Instrumental Analysis. Enstrümental Analiz İlkeleri. 6th ed. Çeviren: Kılıç E, Yılmaz H, Bilim Kitap Kırtasiye Ltd.Şti., Ankara, 627-756.
9. Kaya B (2014). Antipsikotik ilaç ketiapin fumaratın karbon nanotüp modifiyeli camı karbon elektrot ile elektrokimyasal analizi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
10. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2004). Fundamentaly of Analtical Chemistry. Analitik Kimya Temel İlkeler. 8'th ed. Çeviren Kılıç E, Yılmaz H, Bilim Kitap Kırtasiye Ltd. Şti., Ankara, 633-664.

11. Yılmaz S (2012). Uygulama örnekleriyle elektroanalitik kimya. İkinci baskı. Kriter yayınları, No.88, İstanbul.
12. Topal BD (2011). Bazı antiviral ve antineoplastik ilaç etken maddelerinin DNA ile etkileşimi ve elektrokimyasal analizleri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
13. Onur F (2011). Analitik Kimya II. Birinci baskı. Ankara Üniversitesi Basımevi, No.101, Ankara.
14. Turan S (2008). Ornizadol'un elektrokimyasal davranışı ve adsorptif sıyırma yöntemleriyle tayini. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
15. Aşkın G (2008). İlaç ve bazı meyvelerdeki askorbik asit miktarının voltametrik tekniklerle belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
16. Özmen T (2015). Herbisit olarak kullanılan bromasilin tayini için voltametrik yöntem geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
17. Temür O (2006). Bitkisel yağlardan bazı metallerin uzaklaştırılmasının voltametrik metodlarla incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
18. Ozkan SA, Uslu B, Aboul-Enein HY (2003). Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids Using Modern Electroanalytical Techniques. Critical Reviews in Analytical Chemistry 33:155-181.
19. Farghaly OA, Abdel Hameed RS, Abu-Nawwas AH (2014). Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques. International Journal of Electrochemical Science 9: 3287– 3318.
20. Scholz F(2010). Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Application. ikinci baskı. Springer –Verlag GmbH, Germany, 366.

21. Palabiyik BB, Topal BD, Uslu B, Can A, Ozkan SA (2013). Sensitive voltammetric assay of etoposide using modified glassy carbon electrode with a dispersion of multi-walled carbon nanotube. *Journal of Solid State Electrochemistry* 17: 2815–2822.
22. Levent A, Altun A, Yardım Y, Senturk Z (2014). Sensitive voltammetric determination of testosterone in pharmaceuticals and human urine using a glassy carbon electrode in the presence of cationic surfactant. *Electrochimica Acta* 128:54–60.
23. Kissinger PT, Heineman WR (1983). Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education* 9:60.
24. Lu W, Xu X, Cole RB (1997). On-Line Linear Sweep Voltammetry-Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 69:2478-2484.
25. Gulaboski R, Pereira CM (2008). Electroanalytical Techniques and Instrumentation in Food Analysis. *Notes/Handbook of Food Analysis Instruments*; 379.
26. Mirceski V, Gulaboski R, Lovric M, Bogeski I, Kappl R, Hoth M (2013). Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. *An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspect of Electroanalysis* 11: 2411-2422.
27. Li Z, Chen L, He F, Bu L, Qin X, Xie O, Yao S, Tu X, Luo S, Luo S (2014). Square wave anodic stripping voltammetric determination of Cd^{2+} and Pb^{2+} at bismuth-film electrode modified with electroreduced graphene oxide-supported thiolated thionine. *Talanta* 122: 285-292.
28. Cheize M, Sarthou G, Croot PL, Bucciarelli E, Baudoux AC, Baker AR (2012). Iron organic speciation determination in rainwater using cathodic stripping voltammetry. *An International Journal Devoted to All Branches of Analytical Chemistry* 736: 45-54.
29. El-Shahawi MS, Bashammakh AS, Al-Sibaai AA, Bahaidarah EA (2013). Analysis of spironolactone residues in industrial wastewater and in drug formulations by cathodic stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 3: 137-143.

30. Ardila JA, Oliveira GG, Medeiros RA, Fatibello-Filho O (2013). Determination of gemfibrozil in pharmaceutical and urine samples by square-wave adsorptive stripping voltammetry using a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes within a dihexadecyl hydrogen phosphate film. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 690: 32-37.
31. Aşangil D, Taşdemir İH, Kılıç E (2012). Adsorptive stripping voltammetric methods for determination of aripiprazole. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 3:193–199.
32. Rivas GA, Rubianes MD, Rodríguez MC, Ferreyra NF, Luque GL, Pedano ML, Miscoria AS, Parrado C (2007). Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. *Talanta* 74: 291–307.
33. Salimi A, Izadi M, Hallaj R, Rashidi M (2007). Simultaneous Determination of Ranitidine and Metronidazole at Glassy Carbon Electrode Modified with Single Wall Carbon Nanotubes. *An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspect of Electroanalysis* 16: 1668 – 1676.
34. Mazloum-Ardakani M, Beitollahi H, Ganjipour B, Naeimi H, Nejati M (2009). Electrochemical and catalytic investigations of dopamine and uric acid by modified carbon nanotube paste electrode. *Bioelectrochemistry* 75: 1–8.
35. Farsak M (2011). Metal çöktürülmüş karbon nanotüp elektrotta metanol oksidasyonunun araştırılması. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
36. L'u' S, Wu K, Danga X, Hua S (2004). Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole at a nanomaterial thin film coated glassy carbon electrode. *Talanta* 63:653-657.
37. Langheinrich D, Dörfler S, Althues H, Kaskel S, Lasagni A (2012). Rapid and scalable method for direct and indirect microstructuring of vertical aligned carbon nanotubes. *Surface - Coatings Technology* 206:4808–4813.
38. Valcarcel M, Simonet BM, Cardenas S, Suarez B (2005). Present and future applications of carbon nanotubes to analytical science. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 82: 1783–1790.

39. Topal BD, Palabiyik BB, 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* 177:841–847.
40. Saleh Ahammad AJ, Lee J, Rahman MA (2009). Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. *Chemical Sensors* 9: 2289-2319.
41. Malode SJ, Nandibewoor ST (2013). Electro-oxidation of nimesulide at gold electrode and its determination in pharmaceutical dosage form and human biological fluid. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 6: 71-76.
42. Ghavami R, Navaee A (2012). Determination of nimesulide in human serum using a glassy carbon electrode modified with SiC nanoparticles. *Analytical Sciences Based on Micro- and Nanomaterials* 176:493–499.
43. Ozkan SA (2012). *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation*, HNB Publishing, New York.
44. Álvarez-Lueje A, Vásquez P, Núñez-Vergara LJ, Squella JA (1997). Voltammetric study of nimesulide and its differential pulse polarographic determination in pharmaceuticals. *An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspect of Electroanalysis* 9: 1209-1213.
45. Wang J. (1988). *Electroanalytical techniques in clinical chemistry and laboratory medicine*, VCH Publishers, New York.
46. Karadas N, Ozkan SA (2014). Electrochemical preparation of sodium dodecylsulfate doped over-oxidized polypyrrole/multi-walled carbon nanotube composite on glassy carbon electrode and its application on sensitive and selective determination of anticancer drug: Pemetrexed. *Talanta* 119: 248-254.
47. Wang C, Shao X, Liu Q, Qu Q, Yang G, Hu X (2006.) Differential pulse voltammetric determination of nimesulide in pharmaceutical formulation and human serum at glassy carbon electrode modified by cysteic acid/CNTs based on electrochemical oxidation of L-cysteine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42: 237–244.

48. Bukkitgar SD, Shetti NP, Kulkarni MR, Doddamani RM. Electro-oxidation of nimesulide at 5% barium-doped zinc oxide nanoparticle modified glassy carbon electrode (2016). *Journal of Electroanalytical Chemistry* 762: 37–42.
49. Ghavami R, Navae A (2011). Determination of nimesulide in human serum using a glassy carbon electrode modified with SiC nanoparticles. *Microchimica Acta* 176: 493-499.



10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : SERDAROĞLU, Vildan
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 07.11.1988/ TRABZON
Medeni hali : Bekar
E-Posta : vildan_serdaroglu@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	2016
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2011
Lise	Trabzon Lisesi	2005

YABANCI DİL

İngilizce