



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**ANTİBAKTERİYEL İLAÇ SEFEPİMİN
KARBON ESASLI ELEKTROTLAR İLE
ELEKTROKİMYASAL OKSİDASYONU VE
FARMASÖTİKLERDEN VE SERUMDAN
KANTİTATİF TAYİNİ**

Gökçe ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Dilek KUL

Trabzon – 2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**ANTİBAKTERİYEL İLAÇ SEFEPİMİN
KARBON ESASLI ELEKTROTLAR İLE
ELEKTROKİMYASAL OKSİDASYONU VE
FARMASÖTİKLERDEN VE SERUMDAN
KANTİTATİF TAYİNİ**

Gökçe ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Dilek KUL

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 Gökçe ÖZTÜRK'ün hazırladığı “Antibakteriyel İlaç Sefepimin Karbon Esaslı Elektrotlar ile Elektrokimyasal Oksidasyonu ve Farmasötiklerden ve Serumdan Kantitatif Tayini” 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 Doç. Dr. Dilek KUL

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Dilek KUL

Prof. Dr. Bengi USLU

Yrd.Doç.Dr. Fatma AĞIN

Tarih: .../.../2016

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve sayılı 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 çalışması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

20/05/2016

Gökçe ÖZTÜRK

TEŞEKKÜR

Bu tez kapsamındaki analizlerin tümü, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenim ve çalışmalarım süresince bilgisi, tecrübesi ve yol göstericiliğiyle daima yanımda olan, sadece elektroanalitik kimya alanında değil her alanda bir şeyler öğrendiğim ve kendisi ile çalışmaktan son derece mutlu olduğum danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. Dilek KUL'a; bilgisi ve görüşleri için her zaman kapısını çalabildiğim değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fatma AĞIN'a; tez çalışmamın bir bölümü için gerekli olan Etik Kurul Raporunun hazırlanması aşamasında engin bilgisi ve önerilerinden yararlandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ahmet AYAR'a; çalışma ortamımızı farklı kılan ve aynı laboratuvarında çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Vildan SERDAROĞLU, Sena ATAL, Büşra KAYA, İrem KURT ve Nevin ULAŞ'a ve tezimin yazım aşamasında gösterdiği ilgi ve destek için meslektaşım Şeyda AKKAYA'ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca, hayatım boyunca bana daima güç veren sevgili kardeşim Selin'e, başta annem ve babam olmak üzere her zaman yanımda olan ve bana güvenen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gökçe ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç Kapak Sayfası	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
RESİMLER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xvi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Sefepim	4
4.2. Elektrokimya	5
4.3. Elektrokimyasal Hücreler	6
4.3.1. Kütle Transferi	8
4.4. Elektroanalitik Yöntemler	8
4.5. Voltametri	9
4.6. Voltametrik Hücrenin Bileşenleri	10
4.6.1. Destek Elektrolit	10
4.6.2. Referans Elektrot	11
4.6.3. Yardımcı Elektrot	12
4.6.4. Çalışma Elektrotu (İndikatör Elektrot)	12
4.6.4.1. Cıva Kökenli Elektrotlar	13
4.6.4.2. Katı Elektrotlar	14
4.6.4.2.1. Bor-Katkılı Elmas Elektrot	14
4.6.4.2.2. Karbon Pasta Elektrot	15
4.6.4.3. Dönen Elektrotlar	15
4.6.4.4. Modifiye Elektrotlar	16

4.7. Voltametrik Yöntemler	16
4.7.1. Polarografi	17
4.7.2. Doğrusal ve Döngülü Voltametri	17
4.7.3. Puls Voltametri	21
4.7.3.1. Normal Puls Voltametri	21
4.7.3.2. Diferansiyel Puls Voltametri	22
4.7.3.3. Kare Dalga Voltametri	23
4.7.4. Sıyırma Yöntemleri	24
4.7.4.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi	24
4.7.4.2. Katodik Sıyırma Voltametrisi	24
4.7.4.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi	25
5. GEREÇ ve YÖNTEM	26
5.1. Kullanılan Maddeler	26
5.1.1. Sefepim Stok Çözeltileri	26
5.1.2. Serum Stok Çözeltileri	26
5.1.3. Sodyum Hidroksit Çözeltisi	27
5.1.4. Britton-Robinson Tampon Çözeltisi (BRT)	27
5.1.5. Fosfat Tampon Çözeltisi (FT)	27
5.1.6. Asetat Tampon Çözeltisi (AT)	27
5.1.7. Alüminyum Hidroksit	28
5.1.8. Karbon Pasta Elektrot Bileşimi	28
5.2. Kullanılan Cihazlar	28
5.2.1. Voltametri Cihazı	28
5.2.2. Elektrot Sistemi	29
5.2.3. pH Metre	29
5.2.4. Saf Su/Ultra Saf Su Cihazı	29
5.2.5. Ultrasonik Banyo	29
5.2.6. Terazî	30
5.2.7. Manyetik Karıştırıcı	30
5.2.8. Vortex	30
5.2.9. Buzdolabı	30
5.2.10. Mikropipet	30

5.3. Çalışma Elektrotlarının Hazırlanması ve Temizlenmesi	30
5.4. Voltametrik Çalışmalar	31
5.4.1. pH Taraması	31
5.4.2. Hız Taraması	32
5.4.3. Sıyırma Voltametrisi Parametreleri	32
5.4.4. Kalibrasyon Çalışması	33
5.4.5. Tekrar Edilebilirlik Çalışması	35
5.4.6. Sefepimin Farmasötiklerden Tayini	36
5.4.7. Geri Kazanım Çalışması	37
5.4.8. Serum Çalışması	38
6. BULGULAR	40
6.1. Bor-Katkılı Elmas Elektrotla Elde Edilen Bulgular	40
6.1.1. Destek Elektrolit Seçimi ve pH Etkisi	40
6.1.2. Hız Taraması	43
6.1.3. Sıyırma Optimizasyonu	45
6.1.4. Kalibrasyon Çalışması	47
6.1.5. Farmasötiklerden Tayin ve Geri Kazanım Çalışması	50
6.1.6. Serum Çalışması	52
6.2. Karbon Pasta Elektrotla Elde Edilen Bulgular	56
6.2.1. Karbon Pasta Elektrot Bileşimi Optimizasyonu	56
6.2.2. pH Taraması	57
6.2.3. Hız Taraması	62
6.2.4. Sıyırma Optimizasyonu	64
6.2.5. Kalibrasyon Çalışması	66
6.2.6. Farmasötiklerden Tayin ve Geri Kazanım Çalışması	70
6.2.7. Serum Çalışması	72
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
7.1. Bor-Katkılı Elmas Elektrotla Elde Edilen Sonuçlar	77
7.1.1. pH Etkisi	77
7.1.2. Hız Taraması	78
7.1.3. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları	78
7.1.4. Farmasötiklerden Geri Kazanım Çalışması	79

7.1.5. Serum Çalışması	79
7.2. Karbon Pasta Elektrotla Elde Edilen Sonuçlar	80
7.2.1. Karbon Pasta Bileşiminin Seçilmesi	80
7.2.2. pH Etkisi	80
7.2.3. Hız Taraması ve Sıyırma Parametrelerinin Belirlenmesi	81
7.2.4. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları	81
7.2.5. Farmasötiklerden Geri Kazanım Çalışması	82
7.2.6. Serum Çalışması	82
7.3. Sefepim Verilerinin Karşılaştırılması	83
8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	85
9. KAYNAKLAR	86
10. ETİK KURUL ONAYI	94
11. ÖZGEÇMİŞ	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa
Şekil 1. Sefepimin molekül yapısı	4
Şekil 2. (A) Galvanik ve (B) elektrolitik hücre sistemleri	7
Şekil 3. Üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi	10
Şekil 4. (A) Doygun kalomel ve (B) Ag/AgCl referans elektrotlar	12
Şekil 5. Doğrusal voltametri yöntemindeki uyarma sinyalinin şekli	18
Şekil 6. Döngülü voltametri yöntemindeki uyarma sinyalinin şekli	18
Şekil 7. Döngülü voltametri ile elde edilmiş (A) tersinir ve (B) tersinmez voltamogramlar	19
Şekil 8. Normal puls voltametri yöntemi için (A) uyarma sinyalinin şekli ve (B) tersinmez bir reaksiyon için elde edilen voltamogram	22
Şekil 9. Diferansiyel puls voltametri yöntemi için (A) uyarma sinyalinin şekli ve (B) tersinmez bir reaksiyon için elde edilen voltamogram	22
Şekil 10. Kare dalga voltametri yöntemi için (A) uyarma sinyalinin şekli ve (B) tersinmez bir reaksiyon için elde edilen voltamogram	23
Şekil 11. (a) pH 2.0 BRT, (b) pH 3.0 FT, (c) pH 4.5 AT, (d) pH 7.0 FT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1}	40
Şekil 12. (a) pH 2.0 BRT, (b) pH 3.0 FT, (c) pH 4.5 AT, (d) pH 7.0 FT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin (A) diferansiyel puls ve (B) kare dalga voltamogramları	41
Şekil 13. (A) DV, (B) DPV ve (C) KDV yöntemleri ile FT, AT ve BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin pH'ya karşı pik potansiyel grafikleri. ×: BRT, Δ: AT, ●: FT	42
Şekil 14. (A) DV, (B) DPV ve (C) KDV yöntemleri ile FT, AT ve BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin pH'ya karşı pik akım grafikleri. ×: BRT, Δ: AT, ●: FT	43
Şekil 15. Tek döngülü DV ile yapılan (A) pH 2.0 BRT ve (B) pH 7.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin hız taraması voltamogramları	44

Şekil 16.	(A ve B) pH 2.0 BRT ve (C ve D) pH 7.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin DV ile elde edilen (A ve C) tarama hızına ve (B ve D) tarama hızının kareköküne karşı pik akımı grafikleri	45
Şekil 17.	pH 2.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M sefepimin (A) DPSV ve (B) KDSV yöntemleri ile elde edilen biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri	46
Şekil 18.	pH 2.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M sefepimin (A) DPSV ve (B) KDSV yöntemleri ile elde edilen biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri	46
Şekil 19.	(A) DPV ve (B) KDV yöntemleri ile pH 2.0 BRT içerisindeki sefepim çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar	47
Şekil 20.	(A) DPV ve (B) KDV yöntemleri ile elde edilen pH 2.0 BRT içerisindeki sefepim konsantrasyonuna karşı pik akım grafikleri	48
Şekil 21.	(A) DPV ve (B) KDV yöntemleri ile pH 2.0 BRT içerisindeki sefepim içeren serum çözeltilerinden temel çizgi düzeltmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar	53
Şekil 22.	(A) DPV ve (B) KDV yöntemleri ile elde edilen pH 2.0 BRT içerisindeki sefepim içeren serum konsantrasyonuna karşı pik akım grafikleri	53
Şekil 23.	(A) %25 ve (B) %30 pasta bileşimiyle elde edilen farklı tamponlardaki 6.0×10^{-5} M sefepimin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1}	58
Şekil 24.	Farklı tampon ortamlarında 6.0×10^{-5} M sefepimin (A ve B) %25'lik ve (C ve D) %30'luk pasta bileşimiyle elde edilen (A ve C) diferansiyel puls ve (B ve D) kare dalga voltamogramları	59
Şekil 25.	(A) DV, (B) DPV ve (C) KDV yöntemleri ile FT, AT ve BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin pH'ya karşı pik potansiyel grafikleri. ×: BRT, Δ: AT, ●: FT	61
Şekil 26.	(A) DV, (B) DPV ve (C) KDV yöntemleri ile FT, AT ve BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin pH'ya karşı pik akım grafikleri. ×: BRT, Δ: AT, ●: FT	62

Şekil 27.	KP elektrot kullanılarak tek döngülü DV ile (A) pH 5.0 FT ve (B) pH 10.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-6} M sefepimin hız taraması voltamogramları	63
Şekil 28.	(A ve B) pH 5.0 FT ve (C ve D) pH 10.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-6} M sefepimin DV ile elde edilen (A ve C) tarama hızına ve (B ve D) tarama hızının kareköküne karşı pik akımı grafikleri	64
Şekil 29.	DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-6} M sefepimin (A) biriktirme potansiyeline ve (B) biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri	65
Şekil 30.	KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-6} M sefepimin (A) biriktirme potansiyeline ve (B) biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri	66
Şekil 31.	(A) DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisinde ve (B) KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisinde sefepim içeren çözeltilerden temel çizgi düzeltmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar	67
Şekil 32.	(A) DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisinde ve (B) KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisindeki sefepim konsantrasyonuna karşı pik akım grafikleri	67
Şekil 33.	(A) DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisindeki ve (B) KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisindeki sefepim içeren serum çözeltilerinden temel çizgi düzeltmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar	73
Şekil 34.	(A) DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisindeki ve (B) KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisindeki serum çözeltisindeki sefepim konsantrasyonuna karşı pik akım grafikleri	73

TABLOLAR DİZİNİ

Tablolar	Sayfa
Tablo 1. BKE elektrot kullanılarak sefepimin DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon verileri	48
Tablo 2. BKE elektrot kullanılarak pH 2.0 BRT içindeki sefepim çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	49
Tablo 3. BKE elektrot kullanılarak pH 2.0 BRT içindeki sefepim çözeltilerinden KDV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	50
Tablo 4. BKE elektrot kullanılarak DPV için 8.0×10^{-6} M ve KDV için 4.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinden elde edilen farmasötiklerden tayin çalışması verileri	51
Tablo 5. BKE elektrot kullanılarak DPV için 1.0×10^{-5} M ve KDV için 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	52
Tablo 6. BKE elektrot kullanılarak sefepim içeren serum çözeltilerinden pH 2.0 BRT içinde DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon verileri	54
Tablo 7. BKE elektrot kullanılarak DPV için 6.0×10^{-6} M ve KDV için 6.0×10^{-5} M sefepim içeren serum çözeltilerinden elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	55
Tablo 8. BKE elektrot kullanılarak DPV için 8.0×10^{-6} M ve KDV için 8.0×10^{-5} M sefepim içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	56
Tablo 9. Farklı oranlardaki pasta bileşimleri kullanılarak, 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinden DV, DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen pik akım değerleri	57
Tablo 10. KP elektrot kullanılarak sefepimin DPSV ve KDSV yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon verileri	68

Tablo 11.	KP elektrot kullanılarak 4.0×10^{-6} M ve 6.0×10^{-6} M sefepim çözeltilerinden DPSV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	69
Tablo 12.	KP elektrot kullanılarak 6.0×10^{-6} M ve 8.0×10^{-6} M sefepim çözeltilerinden KDSV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	70
Tablo 13.	KP elektrot kullanılarak DPSV için 4.0×10^{-6} M ve KDSV için 8.0×10^{-6} M sefepim çözeltilerinden elde edilen farmasötiklerden tayin verileri	71
Tablo 14.	KP elektrot kullanılarak DPSV için 6.0×10^{-6} M ve KDSV için 1.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	72
Tablo 15.	KP elektrot kullanılarak sefepim içeren serum çözeltilerinden DPSV ve KDSV yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon verileri	74
Tablo 16.	KP elektrot kullanılarak DPSV ve KDSV yöntemleri ile 2.0×10^{-6} M sefepim içeren serum çözeltilerinden elde edilen tekrar edilebilirlik verileri	75
Tablo 17.	KP elektrot kullanılarak DPSV ve KDSV yöntemleri ile 4.0×10^{-6} M sefepim içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri	76
Tablo 18.	BKE ve KP elektrot ile elde edilmiş kalibrasyon verilerinin literatürdeki voltametrik yöntemlerle karşılaştırılması	84

RESİMLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa
Resim 1. Potansiyostat/galvanostat cihazı	28
Resim 2. (A) Ag/AgCl referans elektrot, (B) platin tel karşıt elektrot, (C) karbon pasta çalışma elektrotu, (D) bor-katkılı elmas çalışma elektrotu ve (E) üç elektrotlu hücre	29



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AT	Asetat tamponu
BKE	Bor-katkılı elmas
BRT	Britton-Robinson tamponu
BSS	Bağlı standart sapma
DKE	Doygun kalomel elektrot
DV	Döngülü voltametri
DPSV	Diferansiyel puls sıyırma voltametrisi
DPV	Diferansiyel puls voltametri
FT	Fosfat tamponu
KDSV	Kare dalga sıyırma voltametrisi
KDV	Kare dalga voltametrisi
KP	Karbon pasta
SHE	Standart hidrojen elektrot
pH	Hidrojen konsantrasyonunun kologaritması
r	Korelasyon katsayısı
S	Standart sapma
TAS	Tayin alt sınırı
TS	Teşhis sınırı

Simgeler

A	Amper
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
μ	Mikro

Ω	Ohm
E_p	Pik potansiyeli
I_p	Pik akım
s	Saniye
V	Volt

Formüller

Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş Klorür
Al(OH)₃	Alüminyum Hidroksit
CH₃COOH	Asetik Asit (Glasiyal)
H₃BO₃	Borik Asit
H₃PO₄	Fosforik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
Na₂HPO₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaH₂PO₄.2H₂O	Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat

ÖZET

Antibakteriyel İlaç Sefepimin Karbon Esaslı Elektrotlar ile Elektrokimyasal Oksidasyonu ve Farmasötiklerden ve Serumdan Kantitatif Tayini

Bir sefalosporin antibiyotiği olan sefepimin elektrokimyasal analizi bor-katkılı elmas elektrot ve karbon pasta elektrot kullanılarak yükseltgenme yönünde incelendi. Her iki elektrot için farklı pH'lardaki tampon çözeltileri kullanılarak döngülü voltametri ile taramalar yapıldı. Hız taraması çalışması ile sefepimin bor-katkılı elmas elektrot üzerinde difüzyon kontrollü olarak oksidasyona uğradığı belirlendi. Sefepimin kantitatif analizi diferansiyel puls voltametri ve kare dalga voltametri yöntemleri kullanılarak yapıldı. Bor-katkılı elmas elektrot kullanılarak kalibrasyon grafiklerinden elde edilen sefepimin doğrusallık aralıkları diferansiyel puls voltametri için $0.04 - 10 \mu\text{M}$ (korelasyon katsayısı 0.999) ve kare dalga voltametri için $0.4 - 60 \mu\text{M}$ (korelasyon katsayısı 0.998) olarak, sırasıyla 1.58×10^{-3} ve $1.10 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ teşhis sınırlarıyla belirlendi. Karbon pasta elektrot için optimum pasta bileşimi %25 olarak belirlendi. Hız taraması çalışması ile, oksidasyon sürecinin adsorpsiyon kontrollü olduğunu belirlendi. Kalibrasyon grafiklerine göre, diferansiyel puls sıyırma voltametri için doğrusal aralıklar $0.08 - 10 \mu\text{M}$ (korelasyon katsayısı 0.999) ve kare dalga sıyırma voltametri için $0.4 - 10 \mu\text{M}$ (korelasyon katsayısı 0.998) olarak, sırasıyla 3.73×10^{-3} ve $2.21 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ teşhis sınırları ile belirlendi. Kullanılan yöntemlerin kesinliği, tekrar edilebilirlik çalışmaları ile incelendi. Geliştirilen bu yöntemler ile sefepimin farmasötik dozaj şekillerinden ve insan kan serumundan kantitatif analizi, her iki elektrot için herhangi bir ayırma işlemi yapılmadan gerçekleştirildi.

Anahtar Sözcükler: Bor-katkılı elmas elektrot, Diferansiyel puls voltametri, Döngülü voltametri, Karbon pasta elektrot, Kare dalga voltametri, Sefepim

SUMMARY

Electrochemical Oxidation of Antibacterial Drug Cefepime and Its Quantitative Determination from Pharmaceuticals and Serum with Carbon Based Electrodes

Electrochemical analysis of cefepime which is a cephalosporin antibiotic was studied in the direction of oxidation using boron-doped diamond electrode and carbon paste electrode. Scans were performed using buffer solutions at different pHs with cyclic voltammetry for both electrodes. Cefepime was determined to oxidize as diffusion controlled with scan rate study on boron-doped diamond electrode. Quantitative analysis of cefepime was done using differential pulse voltammetry and square wave voltammetry methods. Linear ranges of cefepime obtained from the calibration graphs using boron-doped diamond electrode were determined as 0.04 - 10 μM (correlation coefficient 0.999) for differential pulse voltammetry and 0.4 - 60 μM (correlation coefficient 0.998) for square wave voltammetry with the detection limits of 1.58×10^{-3} and 1.10×10^{-2} μM , respectively. Optimum paste composition for carbon paste electrode was determined as 25%. The oxidation process was adsorption controlled by scan rate study. According to the calibration graphs, linear ranges for differential pulse voltammetry were obtained as 0.08 - 10 μM (correlation coefficient 0.999) for differential pulse stripping voltammetry and 0.4 - 10 μM (correlation coefficient 0.998) for square wave stripping voltammetry with the detection limits of 3.73×10^{-3} and 2.21×10^{-2} μM , respectively. Precision of the methods was examined with repeatability studies. Quantitative analysis of cefepime from pharmaceutical dosage forms and human blood serum was done for both electrodes without any separation with these developed methods.

Keywords: Boron-doped diamond electrode, Carbon paste electrode, Cefepime, Cyclic voltammetry, Differential pulse voltammetry, Square wave voltammetry

3. GİRİŞ ve AMAÇ

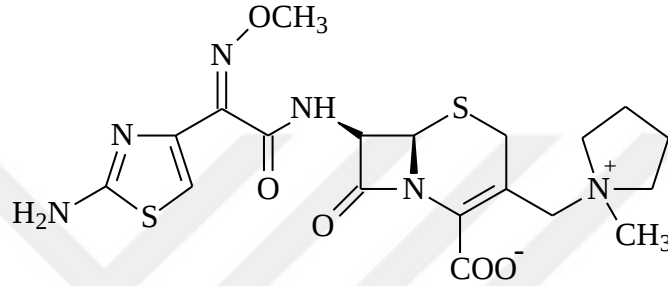
Tam polarize olmuş bir indikatör elektroda uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesi esasına dayanan yöntem *voltametri* denir. Yükseltgenebilen ve/veya indirgenebilen elektroaktif organik ve inorganik maddelerin karakterizasyonu, voltametrik yöntemlerle elde edilen potansiyel-akım ilişkisinden yararlanarak yapılabilir. Bu yöntem ile mikromolar-nanomolar gibi çok düşük konsantrasyondaki maddelerin kalitatif ve kantitatif analizleri hızlı ve hassas bir şekilde yapılabilir (1). Yapılarında elektroaktif fonksiyonel gruplar barındıran ilaç etkin maddelerinin de miktar tayinleri voltametrik yöntemler kullanılarak etkin bir şekilde yapılabilir ve bu nedenle günümüzde çok önemli bir yere sahiptir (2-4). Ayrıca, ilaç etkin maddelerinin farmasötik preparatlardan ve biyolojik sıvılardan da herhangi bir ayırma işlemine gerek kalmadan voltametrik yöntemlerle (puls-dalga formları, sıyırma teknikleri vb. kullanılarak) hızlı, hassas ve ekonomik bir şekilde tayin edilmeleri de mümkündür (5-7). Elektrokimyasal analizlerde karbon esaslı ve soy metal elektrotlar başta olmak üzere çeşitli elektrotlar kullanılmaktadır. Karbon esaslı elektrotların arasında en yaygın kullanılanlar camı karbon (CK), karbon pasta (KP), bor-katkılı elmas (BKE) ve grafit elektrotlardır (6).

Bu tez kapsamında, bir β -laktam sefalosporin antibiyotiği olan sefepimin yükseltgenme yönündeki elektrokimyasal analizinin, bor-katkılı elmas ve karbon pasta elektrotlar kullanılarak voltametrik yöntemlerle yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, her iki elektrot için uygun destek elektrolit türünün ve pH'nın belirlenmesi ve bu ortamda miktar tayininin yapılması için geliştirilen yöntemin validasyon parametrelerinin elde edilmesi planlanmıştır. Seçilen elektrotlar ile sefepimin kantitatif analizinin literatürdeki farklı elektrotlar ile yapılmış az sayıda çalışmaya oranla daha hassas ve hızlı bir şekilde yapılması amaçlanmıştır. Daha sonra, her iki elektrot için geliştirilen yöntemler ile elde edilecek sonuçlar hem birbiri ile hem de literatürde bulunan diğer çalışmalarla karşılaştırılarak üstünlüklerinin ortaya konulması planlanmıştır. Böylece, seçilen elektrotlar ile geliştirilecek metotlar sefepimin kalitatif ve kantitatif analizi için hem literatürdeki diğer yöntemlere göre hem de diğer elektrotlara göre tercih edilebilecektir. Ayrıca, geliştirilecek metotlar ile sefepimin farmasötik dozaj formlarından ve serumdan tayininin yapılması ile, bu yöntemlerin doğruluğunun ve güvenilirliğinin saptanması da amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Sefepim

Sefepim (sefepim hidroklorür), 1-[[[(6R,7R)-7-[2-(2-amino-4-tiyazolil)-glioksilamido]-2-karboksi-8-okso-5-tia-1-aza-bisiklo [4.2.0] okt-2-en-3-il] metil]-1-metil pirrolidinyum klorür 72-(Z)-(O-metiloksim) monohidroklorür monohidrat (Şekil 1), 1994 yılında geliştirilmiş, dördüncü nesil bir sefalosporindir (8-10).



Şekil 1. Sefepimin molekül yapısı

Sefalosporinler β -laktam familyasının yarı sentetik antibiyotikleridir ve ilk kez 1948 yılında sefalosporium acremonium adlı mantar kültürlerinden elde edilmişlerdir (11, 12). Kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve toksisiteleri penisilinlere benzer. Bununla birlikte, bakteriler tarafından üretilen beta-laktamaza, penisiline oranla daha dayanıklıdırlar. Sefalosporinlerin kimyasal yapılarında yapılan değişiklikler sayesinde 1961 yılından bu yana birçok sefalosporin antibiyotiği geliştirilmiştir. Yeni nesil sefalosporinlerin etki spektrumları daha geniş ve antimikrobiyal aktiviteleri daha yüksektir (12). Sefepim, yeni nesil bir sefalosporindir ve hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı geniş bir spektrumda aktivitesi bulunmaktadır. Özellikle *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus* türlerine karşı mükemmel bir aktivite gösterir (13).

Sefepim, hücre duvarında yer alan ve bakteri hücrelerini çevreleyip ona belirli bir şekil veren peptidoglikan tabakanın sentezini çapraz bağların oluşumu safhasında inhibe eder, bakteriye ait hidrolazların da olaya katılmasıyla duvar örgüsünü kaybeden bakteri hücresi ölür (14, 15). Birçok aerobik gram negatif bakteriye karşı etkilidir.

Gram negatif ve gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde, üçüncü kuşak sefalosporinlerden daha geniş bir antibakteriyel etkinliğe sahiptir. Antipseudomonal bir sefalosporindir. Sefepim çift kutuplu bir moleküldür, suda çözünürlüğü yüksektir, gram negatif bakterilere penetrasyonu hızlıdır. Bakterilerin sitoplazmik membranlarına hızla penetre olur. Kısa sürede yüksek kan düzeyleri oluşturur ve 12 saat boyunca etkili konsantrasyonlarda kalır. Sefepimin serum pik konsantrasyonu 130 mg/L olarak tespit edilmiştir (16). Sefepim, vücut doku ve sıvılarına hızla ve yüksek oranlarda penetre olur. Eliminasyonu aktif olarak böbreklerden olur, idrarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Kanıtlanmış bir toksisitesi yoktur. Diğer parenteral sefalosporinlerden farklı olarak, C-3 pozisyonunda pozitif yüklü bir kuaterner-amonyum grubu içermesi, gram negatif bakterilerin dış membranından daha kolay ve daha hızlı penetrasyonunu sağlar; C-7 pozisyonundaki yan zincire bir 2-aminotiazolilasetamido grubunun girmesi de sefepimi değişik β -laktamlara karşı daha dayanıklı kılar (17).

Sefepim, özellikle alt solunum yolu enfeksiyonları, febrilnötropenik vakalar, idrar yolu enfeksiyonları, deri yumuşak doku enfeksiyonları, komplike karın içi enfeksiyonları ve jinekolojik enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (18). Ayrıca gram-negatif bakterilerin neden olduğu menenjit ve sepsis gibi özel enfeksiyonların tedavisinde de kullanılmaktadır (12).

Sefalosporinlerin en sık görülen yan etkileri alerjik reaksiyonlardır. Kullananların yaklaşık %5'inde olduğu saptanmıştır. En sık görülenler; makülopapüler cilt döküntüleri, ürtiker ve eozinofili şeklinde olanlardır. Ayrıca, gastrointestinal bozukluklar, lokal tahriş reaksiyonları, süperenfeksiyon, nefrotoksik etki ve karaciğer fonksiyon bozukluğu gibi yan etkiler de görülebilmektedir (19).

4.2. Elektrokimya

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesi sonucu ortaya çıkan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişimleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalıdır (20). Akım, potansiyel ve yük gibi elektriksel büyüklüklerin ölçümüne ve bunların kimyasal değişkenler ile arasındaki ilişkiye dayanır. Analitik amaçlı elektriksel ölçümler, endüstrideki kalite kontrol, çevresel ve biyomedikal analizler gibi alanlarda uygulamalara sahiptir (21).

Elektrokimyasal işlemler, elektrokimyasal hücre denilen bir düzenekte gerçekleşir. Elektrokimyasal süreçler elektronik bir iletken (metal, grafit, veya yarı iletken) ile iyonik bir iletken (elektrolit) ara yüzeyinde gerçekleşir. Tayin için kullanılan elektrik sinyalinin türü, farklı elektrokimyasal yöntemler arasındaki farkın nedenidir. Potansiyometrik ve potansiyostatik olmak üzere elektroanalitik ölçümlerin iki temel türü vardır (22).

Potansiyometri, akımın sıfıra yakın olduğu ve derişimin bir fonksiyonu olarak potansiyelin belirlendiği bir yöntemdir. Bu yöntemde akım geçişi olmaz, net faradayik tepkime meydana gelmez ve genellikle potansiyel sistemin termodinamik özellikleri tarafından kontrol edilir. Elektrotun yüzey alanı, kütle transferi, elektrotun şekli gibi özellikler potansiyele doğrudan etki etmez.

Potansiyostatik (potansiyel kontrollü) yöntemler, elektrot-çözelti ara yüzeyindeki yük transfer sürecini inceler. Bu yöntemde elektrot potansiyeli elektron transfer tepkimesinden kaynaklanır ve ortaya çıkan akım ölçülür ve bu akım reaksiyon hakkında bilgi verir. Potansiyostatik yöntemler ile indirgenebilen ya da yükseltgenen elektroaktif kimyasal türler ölçülebilir. Potansiyel kontrollü yöntemlerin amacı, incelenen analitin derişimine bağlı olarak bir akım elde etmektir. Bu yöntemlerin yüksek duyarlık, seçicilik, geniş doğrusal aralık, taşınabilir ve ucuz cihaz kullanımı ve farklı elektrot kullanımı gibi çok sayıda avantajı vardır.

4.3. Elektrokimyasal Hücreler

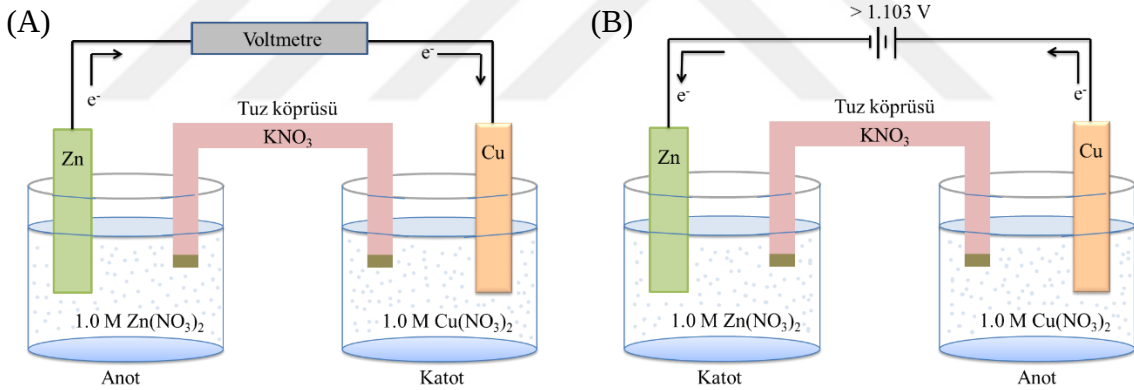
Elektrokimyasal hücreler indirgenme/yükseltgenme (redoks) reaksiyonlarının gerçekleştiği düzeneklerdir. Elektrokimyasal bir hücrede, uygun bir elektrolit çözeltisine daldırılmış elektrotlar bulunur. Elektrik akımı elde edilmesi için elektrotların dıştan iletken bir tel ile bağlanması ve iki elektrolit çözeltisinin, iyonların birinden diğerine hareketini sağlayacak şekilde birbiriyle bağlantı halinde bulunması gerekir. Düzenegın anot kısmında yükseltgenme, katot kısmında ise indirgenme olayı gerçekleşir. Reaksiyonda iki tür arasında gerçekleşen elektron alış verişinde elektron alan tür indirgenir elektron veren tür yükseltgenir.

Elektrokimyasal hücreler, elektrik enerjisi üretiminde kullanılıyorsa "galvanik", bir dış kaynaktan elektrik alıp harcıyorrsa "elektrolitik" olarak sınıflandırılırlar.

Hücrelerin çoğu, deney koşulları değiştirilerek galvanik veya elektrolitik amaçlarla çalıştırılabilir.

Bir galvanik hücre elektrik üretmek için kendiliğinden yürüyen bir kimyasal tepkimeden yararlanır. Bunu sağlamak için, bir reaktif yükseltgenmeli diğeri de indirgenmelidir. Elektronların indirgen maddeden yükseltgen maddeye doğrudan aktarılmaması için bu iki reaktif temas ettirilmemelidir. Bunun yerine yükseltgen ve indirgen maddeler fiziksel olarak ayrılır ve elektronlar reaktiflerin birinden diğere dış devre boyunca akışa zorlanır. Bataryalar ve yakıt pilleri galvanik hücrelerdir ve elektrik üretmek üzere reaktifleri tüketirler (23).

Elektrolitik hücrelerde reaksiyonlar kendiliğinden oluşmaz; böyle hücreler dışarıdan elektrik enerjisi alarak çalışır. Elektrolitik hücreler, galvanik hücrelerin tam tersi bir sisteme sahiptir. Galvanik hücrelerdeki anot elektrot, elektrolitik hücrelerde katot elektrot olarak davranır (Şekil 2).



Şekil 2. (A) Galvanik ve (B) elektrolitik hücre sistemleri (24)

Elektrokimyasal bir reaksiyon, iki veya üç elektrotlu hücrelerde yapılabilir. İki elektrotlu hücrede, elektrot potansiyeli ve indirgenme/yükseltgenme potansiyeli belirlenemez, gerçek elektrot potansiyeli belirsizdir. Üç elektrotlu hücrelerde ise, çalışma elektrotunun potansiyeli, referans elektrotu göre belirlendiği için reaksiyonun her safhasında elektrot potansiyeli bilinen bir değere sahiptir. Elektrokimyasal reaksiyonlarda açık veya kapalı tip hücreler kullanılabilir. Eğer reaksiyon esnasında oluşan ürünler veya ara ürünler hava oksijeninden etkileniyorsa kapalı tip hücreler

tercih edilir. Ayrıca çözülmüş oksijenin bozucu etkisinin varlığı durumunda kapalı tip hücrelerde azot veya argon gibi inert gazların atmosferi altında çalışılmalıdır (25).

4.3.1. Kütle Transferi

Elektrot tepkimesi birkaç basamakta gerçekleşir. Bu tepkimenin hızını en yavaş basamak belirler. Basit tepkimeler, elektroaktif türlerin elektrot yüzeyine sadece kütle transferi, ara yüzeyde elektron aktarımı ve ana çözeltiye ürünün taşınması ile gerçekleşen tepkimelerdir. Daha karmaşık tepkimeler, elektron aktarımından önce gerçekleşen bazı kimyasal ve yüzey süreçleri içerir.

Tepkimenin kütle taşınması ya da elektron aktarımı tarafından kontrol edilip edilmediği, bileşiğin türü ve çeşitli deneysel koşullar (elektrot malzemesi, ortam, potansiyel, kütle taşınmasının türü ve zaman ölçeği gibi) tarafından belirlenir (22).

Bir elektrokimyasal hücrede madde elektrot yüzeyine üç yolla taşınır: Difüzyon, konveksiyon ve elektriksel göç (migrasyon).

Difüzyon, bir çözeltinin iki bölgesi arasındaki derişim farkından dolayı iyonların veya moleküllerin daha derişik bölgeden daha seyreltik bölgeye hareket etmesidir.

Konveksiyon, elektrot yüzeyine veya elektrottan dışarıya mekanik yollarla maddelerin taşınmasıdır. Karıştırma veya sarsma gibi olaylarla meydana getirilen zorlamalı konveksiyon, elektrot yüzeyindeki difüzyon tabakasının kalınlığının azalmasına neden olur ve böylece derişim polarizasyonu azalır. Ayrıca, sıcaklık ve yoğunluk farkından kaynaklanan doğal konveksiyon elektroda doğru veya elektrottan dışarıya doğru moleküllerin taşınmasına katkıda bulunur (26).

Elektriksel göç, elektriksel bir alan boyunca yüklü parçacıkların zıt yüklü elektrotlara doğru hareket etmesi olayıdır.

4.4. Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik kimya, çözeltilerin elektrokimyasal hücrelerin bir kısmı haline getirildikten sonra, elektriksel özelliklerinin ölçülmesi ve ölçülen bu özelliklerinden yararlanılarak maddenin tayin edilmesi üzerine kurulmuş olan metotlar topluluğudur (27). Elektroanalitik yöntemler çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler ve elektrokimyasal yöntemlerin uygulanabildiği sistemler hakkında, ara yüzeylerdeki yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon ve kemisorpsiyonun

derecesi, kimyasal reaksiyonların hız ve denge sabitleri gibi bilgileri de içeren çok fazla sayıda sistemi karakterize eden bilgiler verirler.

Elektroanalitik yöntemler, değişik yükseltgenme basamağına sahip türlerin kolayca saptanabilmesi, bu yöntemlerin uygulanmasını sağlayan ticari cihazların kromatograflara ve spektrofotometrelere göre çok daha ucuz olması ve genellikle kimyasal türlerin analitik derişimini belirtmesi gibi üstünlüklere sahiptir (28).

Elektroanalitik yöntemler, ara yüzeyde gerçekleşen yöntemler ve tüm analiz ortamında gerçekleşen yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Ara yüzey yöntemleri, elektrot yüzeyleri ve bu yüzeylere hemen bitişik olan ince çözelti tabakası arasındaki ara yüzeyde oluşan olaylara dayanmaktadır. Tüm analiz ortamı yöntemleri, çözeltinin tamamında oluşan olaylara dayalıdır (29).

Elektroanalitik yöntemler başlıca potansiyometri, kulometri, kondüktometri ve voltametri olarak sınıflandırılır. Bir çözeltinin elektrokimyasal bir hücre haline getirilerek önemli miktarda akım almadan potansiyelinin ölçülmesi ve ölçülen potansiyelden yararlanılarak da içindeki maddenin konsantrasyonunun tayin edilmesi prensibi üzerine kurulmuş olan metotlar topluluğuna *potansiyometri* denir (27). Kulometri, bir tepkimede kullanılan elektronların sayılarak analit miktarının bulunmasına dayalı bir analiz yöntemidir (23). Kondüktometri ise elektrolitlerde iletkenlik ölçümüne dayalı olarak yapılan analiz yöntemidir (27).

Bir diğer elektroanalitik yöntem olan voltametri, bu tez çalışması kapsamında sefepim ilaç etkin maddesinin analizinde kullanıldığı için detaylı olarak açıklanacaktır.

4.5. Voltametri

Voltametri, Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında keşfedilen, özel bir voltametri tipi olan polarografi tekniğinden geliştirilmiştir.

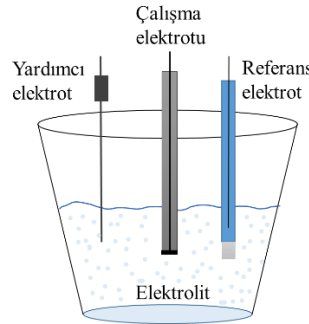
Voltametri, bir indikatör ya da çalışma elektrotunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanarak, analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik metoda verilen isimdir. Uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine *voltamogram* denir. Voltametri; çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması

ve elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması, moleküler oksijen tayini ve farmasötik açıdan önemli türlerin tayini gibi birçok uygulamada kullanılır (30).

Elektrokimyasal bir reaksiyon iki elektrotlu veya üç elektrotlu hücrelerde yapılabilir. Potansiyel ölçüm aletleri, sadece potansiyeldeki farkları ölçtüğünden tek bir elektrotla mutlak potansiyelin ölçümü mümkün değildir ve iki elektrotlu hücrelerde elektrot potansiyeli ve elektroaktif maddelerin indirgenme ve yükseltgenme potansiyeli belirlenemez. Bu nedenle potansiyel kontrollü elektrokimyasal çalışmalarda genellikle üç elektrotlu sistemler tercih edilmektedir.

4.6. Voltametrik Hücrenin Bileşenleri

Voltametrik çalışmaların yapıldığı bir elektrokimyasal hücrede üçlü elektrot sistemi, destek elektrolit ve çözücüde çözünmüş halde bulunan numune vardır. Numunenin miktarına ve kullanılan tekniğe bağlı olarak farklı büyüklüklerde, şekillerde ve farklı materyallerden yapılmış hücreler kullanılabilir. Elektrokimyasal hücreler çalışılan numune ile reaksiyon vermeyen cam, teflon veya polietilenden üretilir. Üçlü elektrot sistemi; referans elektrot, yardımcı elektrot ve çalışma elektrotundan oluşur (Şekil 3).



Şekil 3. Üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi

4.6.1. Destek Elektrolit

Elektrokimyasal ölçümler genellikle bir destek elektrolit içeren çözelti ortamlarında gerçekleştirilir. Çözücü seçiminde öncelikle analitin bu ortamdaki çözünürlüğünün iyi olmasına dikkat edilir. Çözücü, analitle tepkime vermemeli ve

elektrotta tepkimeye girmemelidir. Destek elektrolit, analit çözeltisine fazla miktarda ilave edilen ve elektrotta tepkimeye girmeyen alkali metal tuzlarıdır (30).

4.6.2. Referans Elektrot

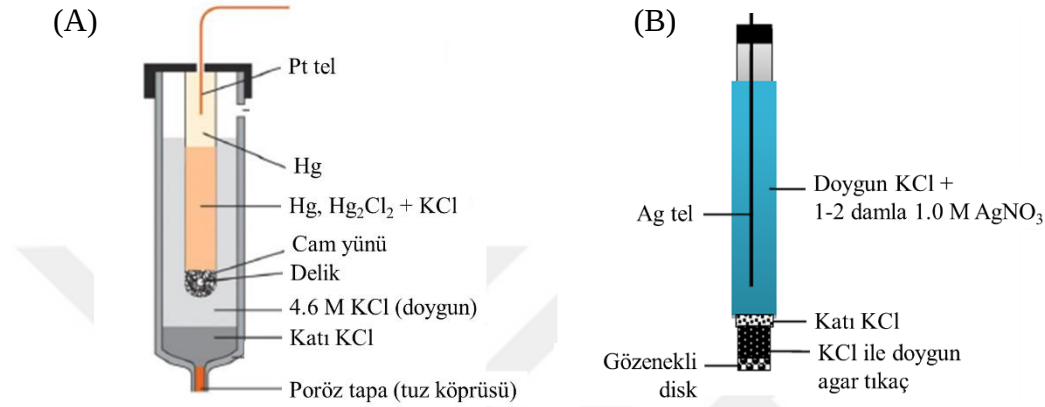
Referans elektrotlar, yarı hücre potansiyeli sabit, çalışılan çözeltinin bileşiminden bağımsız ve potansiyel değeri bilinen elektrotlardır. Referans elektrot, çalışma elektrotunun potansiyelini ölçer, tepkime ile hiç bir ilgisi yoktur. İndirgenme ve yükseltgenme potansiyellerinin tam olarak belirlenebilmesi, bağlantılardaki ve çözelti içindeki potansiyel kaybının ve ayrıca çözelti direncinin giderilmesi için referans elektrot kullanılmalıdır. Voltametriye referans elektrot olarak ikinci sınıftan metal-metal iyonu elektrotları kullanılır. En çok kullanılan referans elektrotlar; standart hidrojen elektrot (SHE), doygun kalomel elektrot (DKE) ve gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrottur (31).

Temel referans elektrotlardan biri olan standart hidrojen referans elektrot (SHE) bağıl yarı-hücre potansiyelleri hakkında bilgi veren bir referans elektrottur. Bu elektrot geçmişte referans elektrot olarak kullanılmalarının yanı sıra pH ölçümlerinde çalışma elektrodu olarak da kullanılmıştır. Bu elektrotun potansiyeli sıcaklık, çözeltideki hidrojen iyonu konsantrasyonu ve elektrot yüzeyindeki hidrojen gazının basıncına bağlıdır. SHE'nin potansiyeli tüm sıcaklıklarda sıfır volt olarak kabul edilmektedir. İdeal bir referans elektrot, kolay hazırlanabilmeli, Nernst eşitliğine uymalı, tersinir ve zamanla değişmeyen bir potansiyele sahip olmalıdır. Ayrıca, gerilimin sıcaklıkla değişme katsayısı küçük olmalıdır. SHE tüm bu özelliklere sahip olmadığından elektrot yüzeyinin hazırlanmasında ve reaktif aktivitelerinin kontrolünde karşılaşılan güçlük nedeniyle uygulamada çok fazla kullanışlı değildir.

Standart hidrojen referans elektrot yerine genellikle Hg ve Ag gibi bir metal ile o metalin az çözünen tuzundan yapılmış, hazırlanması ve kullanımı daha kolay referans elektrotlar (DKE ve Ag/AgCl elektrot gibi) tercih edilmektedir.

Doygun kalomel elektrot (Şekil 4A), Hg_2Cl_2 ve metalik cıvadan oluşmuş bir karışım ve KCl çözeltisinden oluşur. Standart hidrojen elektrotuna karşı, DKE'nin potansiyeli $25^{\circ}C$ 'de 0.244 V'tur. DKE'deki cıva(I) iyonları, gümüş iyonlarına göre daha fazla numune bileşeniyle reaksiyona girer ve bu tür reaksiyonlar elektrotla analit çözeltisi arasındaki bağlantının tıkanmasına neden olur (32).

Gümüş/Gümüş klorür referans elektrot (Şekil 4B), gümüş elektrotun gümüş klorürle doyurulmuş potasyum klorür çözeltisine daldırılmasıyla elde edilir (27). Gümüş-gümüş klorür elektrot 25°C’de standart hidrojen elektrota karşı 0.199 V potansiyele sahiptir.



Şekil 4. (A) Doymuş kalomel ve (B) Ag/AgCl referans elektrotlar (32, 33)

4.6.3. Yardımcı Elektrot

İki elektrotlu sistemlerdeki polarlanmayan elektrot, üzerinden akım geçtiği için, yüksek akımlarda polarlanır. Ayrıca çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli olan potansiyel önemli bir düzeye çıkar. Bu iki nedenden dolayı çalışma elektrotunun polarizasyon potansiyeli hatalı okunabilir. Bu sorun, sistemde üçüncü bir elektrot kullanılarak çözülür. Akım, çalışma elektrotu ile yardımcı elektrot ikilisinden geçirilir ve çalışma elektrotunun potansiyeli referans elektrota karşı sıfır akım altında saptanır. Yardımcı elektrot, reaksiyon ilgisi olmayan ve elektrokimyasal hücrede akımı taşıyan elektrottur. Akım yardımcı elektrot üzerinden geçtiği için bu elektrotların soy metal olmaları gerekir. Bu nedenle daha çok platin, grafit, tantal ya da tungsten tel çubuklar kullanılır. Ayrıca, çok küçük hacimlerle çalışıldığında yardımcı elektrotta oluşan ürünlerin çalışma elektrotunda girişim yapmayacağı elektrot türü seçilmelidir (31).

4.6.4. Çalışma Elektrotu (İndikatör Elektrot)

Çalışma elektrotu, incelenen elektrokimyasal olayın gerçekleştiği elektrottur ve işlevi elektrokimyasal ölçüm bölgesini oluşturmaktır. Çalışma elektrotu üzerinde

maddelerin indirgenmesinden dolayı oluşan akıma *katodik akım*, yükseltgenmesinden dolayı oluşan akıma *anodik akım* denir.

Genel anlamda bir çalışma elektrotu;

- İletken olmalı,
- Çalışılan potansiyel aralığında inert olmalı,
- Negatif potansiyel sınırı yüksek olmalı,
- İstenilen geometrik şekil kolaylıkla verilebilir ve kolay işlenebilir olmalıdır.

Çalışma elektrotları esasen fabrikasyon ürünü olmakla beraber, uygun materyaller (polimerler, nanopartiküller, doku hücreleri vs.) kullanılarak yapılan modifikasyon işlemi ile elektrotların yüzey aktifliği artırılabilir ve daha başarılı sonuçlar elde edilebilir.

Çalışma elektrotları genel olarak cıva kökenli elektrotlar, katı elektrotlar, dönen elektrotlar ve modifiye elektrotlar olarak sınıflandırılır.

4.6.4.1. Cıva Kökenli Elektrotlar

Cıva kökenli elektrotların, negatif potansiyellerde kullanılabilmeleri, her damlada oluşan yeni yüzeyle önceki işlemlerden kalan safsızlıkların cıva yüzeyinden uzaklaştırılabilmeleri ve geniş bir potansiyel aralığında kullanılabilmeleri gibi avantajları vardır (34). Bu üstün özelliklerine rağmen cıva elektrotların bazı sınırlamaları da vardır. Metalik cıvanın düşük pozitif potansiyelde bile kolayca yükseltgenebilmesi bu elektrotun kullanılmasını sınırlayan en önemli özelliklerden biridir. Ayrıca, cıvanın damlama süresinin ayarlanmasının zorluğu, cıvanın damlatılmasında kullanılan kılcalların tıkanması, cıva buharlarının toksik olması ve tekniğin doğrudan doğruya uygulanamaması bu elektrotun kullanılmasındaki başlıca sorunlardır (35).

Damlayan, asılı ve cıva film elektrot gibi farklı çeşitlere sahip cıva elektrotlar vardır. Analizi yapılacak elektroaktif tür ve söz konusu deneyin şartları dikkate alınarak en ideal cıva elektrot seçimi yapılır.

4.6.4.2. Katı Elektrotlar

1940'lı yılların sonunda başlatılan ve günümüze kadar süren katı metal elektrot çalışmaları voltametriye geniş bir uygulama alanı sağlamıştır (36, 37). Katı elektrotlar, platin, altın, bizmut ve karbon esaslı elektrotlar olarak sınıflandırılabilir.

Platin, iyi bir elektrokimyasal inertlik göstermesi ve çeşitli formlarda üretilbilme kolaylığı nedeniyle en uygun elektrot materyallerinden biri olarak kabul edilmektedir (38). Altın, belli bir derişime kadar oksijeni soğurmadığı için, platin elektrotta görülebilecek oksitlenme sorunu altın elektrotta daha azdır. Altın, yüksek iletkenliğe sahip olması da göz önünde bulundurulduğunda, iyi bir elektrot materyali olarak kabul edilmektedir (35, 39). Bizmut elektrotlar ise, düşük toksisite, kolay hazırlanma ve yüksek hassaslık gibi ilgi çekici özelliklere sahiptir (40).

Katı elektrot grubunda yer alan karbon esaslı elektrotların kullanımı 1950'li yıllarda başlamıştır ve bu elektrotlar günümüzde hala yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (41). Karbon elektrotlarla yapılan voltametri hem yükseltgenme, hem de indirgenme bölgesinde geniş bir çalışma aralığına imkân tanımaktadır. Grafit, camısı karbon, karbon pasta ve bor-katkılı elmas gibi farklı türde karbon esaslı elektrotlar bulunmaktadır. Grafit, yumuşak ve gözenekli bir materyal olduğu için yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Camısı karbon ise diğer karbon yapılarından farklı fiziksel özellikler taşır. Yüzeyinde daha ufak gözenekler bulunur ve bu özelliğinden dolayı diğer karbon türlerine göre daha çok kullanılır.

Sefepim ilaç etkin maddesinin analizinde çalışma elektrodu olarak bor-katkılı elmas elektrot ve karbon pasta elektrot kullanıldığı için, bu iki elektrot ayrıca açıklanacaktır.

4.6.4.2.1. Bor-Katkılı Elmas Elektrot

Elmas mükemmel bir elektriksel yalıtkandır. Elmasın bor ile işlem görmesiyle elektrik iletkenliği değiştirilmiş yeni bir elektrot materyali ortaya çıkar: Bor-katkılı elmas elektrot. Günümüzde elektroanalitik uygulamalarda yüksek kalitede bor-katkılı elmas elektrotlar sıklıkla kullanılmaktadır.

İletken özelliğe sahip bor-katkılı elmas elektrot, grafit veya camısı karbon gibi geleneksel karbon elektrotlardan üstün özelliklere sahip bir elektrottur. Oksijen

değişimine oldukça duyarsızdır ve sulu ortamlarda ya da organik çözücülerde iyileştirilmiş bir elektrokimyasal aralık sunmaktadır. Ayrıca, diğer elektrotlarla karşılaştırıldığında, geniş potansiyel aralığı, oldukça düşük gürültü-sinyal ve zemin-sinyal oranları ve elektrokimyasal uygulamalarda mekanik sağlamlık gibi karakteristik özellikleri bulunmaktadır (6).

4.6.4.2.2. Karbon Pasta Elektrot

Karbon pasta, grafit tozu ve su ile karışmayan organik bir sıvının belirli oranlarda karıştırılması ile hazırlanır. Organik sıvı olarak nujol, bromonaftalin ya da metil silikon tercih edilmektedir. Daha sonra, bu bileşim inert plastik yapılı bir elektrot gövdesinin alt kısmındaki boş bölmeye yerleştirilir ve iyice bastırılarak pastanın sıkışması sağlanır. Bu şekilde hazırlanan karbon pasta elektrotlar yalın halde kullanılabildikleri gibi uygun maddelerle modifiye edilerek de kullanılabilmektedirler. 1959-1963 yılları arasında yapılan araştırmalar, özellikle elektrotun kullanılmasında dikkat edilmesi gereken noktalara ve bu elektrot ile ne tür analizlerin gerçekleştirilebileceğine odaklanmıştır. 1964-1965 yıllarında ise ilk modifikasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir (41).

Karbon pasta elektrot yüzeyinin tekrar edilebilirliği iyi olmadığından, her ölçüm öncesinde elektroda doldurulmuş pastanın analit ile etkileşen dış kısmı ince bir spatül yardımıyla sıyrılır ve yerine yeni pasta doldurulur. Bu şekilde kolayca yeni ve temiz bir yüzey oluşturulabilmektedir.

Karbon pasta elektrotlar oldukça geniş bir potansiyel aralığına sahiptirler. Yapımları ve yenilenmeleri zaman alıcı olmayıp, zemin akımları oldukça düşüktür. Eğer karbon pasta üzerinde soğurulmuş oksijen kalmışsa, bunun indirgenmesi nedeniyle önemli miktarda bir artık akım oluşur. Bunun, ön elektrolizle giderilmesinde yarar vardır (34).

4.6.4.3. Dönen Elektrotlar

Dönen elektrotlar; dönen disk ve halka disk elektrotlar olmak üzere ikiye ayrılır. Bu elektrotlar platin veya camsi karbon gibi bir maddeden yapılır ve bir motor sistemi ile dönme hızları kontrol edilir (42).

Dönen disk elektrotta hareket eden sıvı değil, elektrotun kendisidir. Elektrot bir eksen etrafında döndürüldükçe bir sıvı akışı oluşur. Burada sıvı akışı elektrotun merkezine doğru olur ve elektrota geldiğinde merkezkaç kuvveti etkisiyle saçılır. Dönen disk elektrotlar, kütle transferini hızlandırmak için etkili bir yol olarak bilinmektedir. Bu elektrot, yüzeyine çok yakın etkili bir konveksiyon oluşturur. Madde taşınması konveksiyon ile gerçekleştiğinden durgun elektrotlardan daha büyük bir akım yoğunluğu sağlarlar. Bu nedenle, bu tür elektrotlarla yapılan ölçümlerde duyarlık daha yüksektir (43, 44).

Halka disk elektrot sistemi, bir disk elektrotu çevresine yerleştirilmiş olan halka şeklindeki bir başka elektrottan oluşur. Halka ile disk arasındaki mesafe oldukça dardır. Temel elektrot reaksiyonu disk üzerinde gerçekleşir. Halka kısmı da disk üzerinde oluşan ürünlerin nitel ve bazen de nicel tespitinde kullanılır (44).

4.6.4.4. Modifiye Elektrotlar

Çeşitli organik veya inorganik modifiye edicilerin elektrot yüzeyine yerleştirilmesi ile analitik amaçlara uygun olacak şekilde, modifiye edilmiş elektrotlar hazırlanmaktadır. Organik madde olarak genelde polimerler kullanılmasına karşılık, inorganik madde olarak ligandlar, kompleksler ya da metal oksitler kullanılır. Modifikasyon işlemi ile elektroaktif türlerin yükseltgenme ve indirgenme potansiyelini azaltmak ve yalın haldeki elektrotun özelliklerinin zenginleştirilmesi amaçlanır. Analitik amaçlarla kullanılacak kimyasal olarak modifiye edilmiş bir elektrot, mekanik dayanıklılık, kimyasal kararlılık, tekrarlanabilirlik, modifiye edicinin aktivitesinin uzun süreli olması, gerekli potansiyel aralığındaki zemin akımlarının düşük ve kararlı olması, elektrot yapımının basit ve güvenli olması gibi özelliklere sahip olmalıdır. Ayrıca hızlı cevap verme ve yeniden kullanılabilir olma özelliğine de sahip olmalıdır. Elektrokimyasal yöntemler, kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotların hazırlanarak seçici ve hassas analitik uygulamalarda kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (45, 46).

4.7. Voltametrik Yöntemler

Voltametrik yöntemler, direkt yöntemler ve sıyırma yöntemleri olarak iki sınıfta toplanabilir. Direkt yöntemlerde, elektroaktif tür potansiyel taraması sırasında çalışma elektrotu üzerinde doğrudan elektrolizlenir. Sıyırma yöntemleri ise çok sayıda

elektrokimyasal işlem içerir. Bu işlemlerde analit, genellikle karıştırılan bir çözeltide önce bir elektrot üzerinde biriktirilir. Ölçülen bir sürenin sonunda, elektroliz ve karıştırma durdurulur ve birikmiş analit tayin edilir. Analizin ikinci basamağında analit elektrot yüzeyinden çözülür veya sıyrılır. Bu nedenle bu yöntemlere *sıyırma yöntemleri* adı verilir.

Voltametrde en çok kullanılan dört uyarma sinyali ve bu sinyallere bağlı olarak oluşan voltametrik yöntemler şunlardır: Doğrusal tarama-doğrusal taramalı voltametri, üçgen dalga-dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls-diferansiyel puls voltametri ve kare dalga-kare dalga voltametri.

4.7.1. Polarografi

Polarografi, Çek bilim adamı Jaroslav Heyrovsky tarafından geliştirilmiş ilk voltametrik yöntemdir. Heyrovsky bu alandaki çalışmalarıyla 1959 yılında Nobel Kimya Ödülü kazanmıştır.

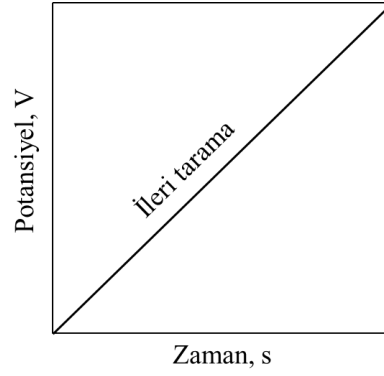
Polarografide çalışma elektrotu olarak en çok damlayan cıva elektrot kullanılır. Damlayan cıva elektrotun potansiyelinin referans elektrota karşı değiştirilip hücredeki akımın ölçülmesi, polarografinin çalışma prensibini oluşturur. Akım, elektroaktif maddenin damlayan cıva elektrot üzerinde indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sonucu meydana gelir. Oluşan akıma karşı çizilen potansiyel grafiğine *polarogram* denir.

Damlayan cıva elektrot her damla ile yeni bir elektrot yüzeyi oluşturduğundan elektrotun davranışı daha önceki durumdan bağımsız olur. Bu elektrotun aksine diğer katı metal elektrotları, yüzeylerinde adsorplanmış veya birikmiş safsızlıkların bulunması durumunda oldukça düzensiz davranış gösterirler.

Bazı tayinler için en iyi yöntem olmasına rağmen polarografinin birkaç sınırlaması bulunmaktadır. Bunların en önemlisi, cıvanın +0.2 V'dan yüksek potansiyellerde oksidasyona uğraması ve bu nedenle pozitif potansiyel bölgesinde çalışmaya uygun olmamasıdır (30, 47).

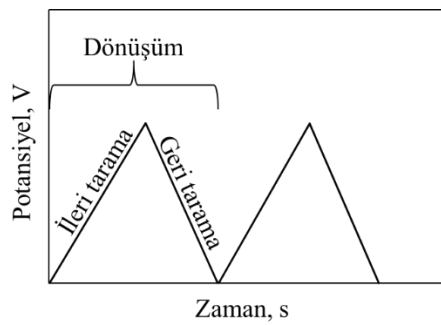
4.7.2. Doğrusal ve Döngülü Voltametri

Doğrusal voltametri yönteminde elektrokimyasal hücredeki çözeltiye uygulanan potansiyel, zaman ile doğrusal olarak artırılır, yani hücreye doğrusal uyarma sinyali (Şekil 5) gönderilir. Potansiyelin zamanla değişim hızı, tarama hızı olarak ifade edilir.



Şekil 5. Doğrusal voltametri yöntemindeki uyarma sinyalinin şekli

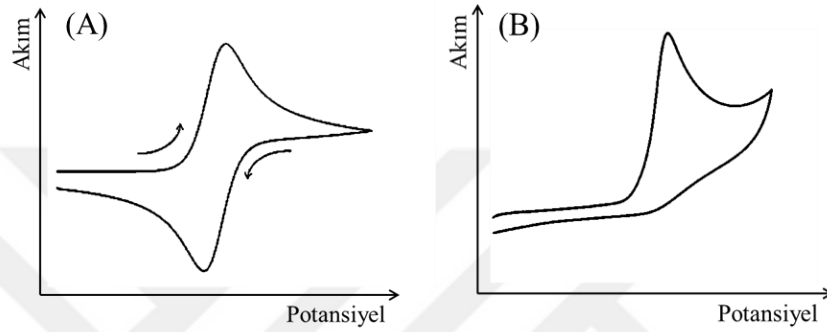
Doğrusal voltametrimin daha yaygın olarak kullanılan şekli döngülü voltametridir. Bu yöntemde potansiyel belirlenen bir değere çıkarılır ve ardından ilk değere ya da belirlenen başka bir değere döndürülür. Yani, ileri yönde yapılan tarama sonlandığı an potansiyelin yönü değiştirilir ve geri yönde tarama yapılır. İleri taramada indirgenme olmuşsa, ters taramada yükseltgenme meydana gelir. Doğrusal voltametride yalnızca ileri yönde tarama yapılırken döngülü voltametride ileri ve geri yönde tarama yapılır. Döngülü voltametri yönteminde kullanılan uyarma sinyali Şekil 6'da gösterilmiştir. Her iki yöntemde de, uygulanan potansiyelin sonucu olarak akım değerleri elde edilir ve voltamogram olarak adlandırılan potansiyel-akım grafikleri çizilir (48).



Şekil 6. Döngülü voltametri yöntemindeki uyarma sinyalinin şekli

Döngülü voltamogramların ayrıntılı incelenmesiyle, bir sistemin hangi potansiyellerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiği, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığı, elektrot tepkimesini izleyen bir çözelti tepkimesinin olup

olmadığı, oluşan ürünlerin kararlılığı, elektrot tepkimesine giren maddelerin veya ürünlerin elektrot yüzeyine tutunup tutunmadığı anlaşılabilir (49). Pozitif bölgede oluşan pik anodik, negatif bölgede oluşan pik ise katodiktir. Sadece anodik yönde ya da sadece katodik yönde bir pik oluşmuşsa reaksiyon tersinmezdir. Hem anodik hem de katodik yönde bir pik oluşmuşsa reaksiyon tersinirdir. Şekil 7’de döngülü voltametri yöntemi ile elde edilmiş tersinir ve tersinmez pikler gösterilmiştir.



Şekil 7. Döngülü voltametri ile elde edilmiş (A) tersinir ve (B) tersinmez voltamogramlar

Elektroanalitik çalışmalarda genellikle ilk olarak döngülü voltametri basamağı uygulanır. Bu basamakta özellikle, elektroaktif türlerin redoks potansiyellerinin yeri hızlı bir şekilde belirlenir ve ortamın redoks reaksiyonuna etkisi değerlendirilir. Elektron aktarımının çözelti-elektrot ara yüzeyinde gerçekleştiği elektrokimyasal dönüşümler difüzyon kontrollü sistemler olarak adlandırılırken, bu aktarımın elektrot yüzeyinde gerçekleştiği dönüşümler adsorpsiyon kontrollü sistemler olarak adlandırılır. Döngülü voltametri, gerçekleşen elektrokimyasal değişimin yukarıda verilen iki temel sistemden hangisine ait olduğunu belirlemede en sık kullanılan deneysel yöntemdir. Bunun belirlenmesi için elektroaktif türün derişimi sabit tutularak döngülü voltametri yöntemi ile tarama hızı çalışması yapılır. Bu çalışmalarda tarama hızı düzenli olarak değiştirilir ve pik akımının tarama hızı ile değişimi incelenir.

➤ *Tersinir sistemler için;* Randles-Sevcik denkleminde (Eşitlik 1) göre akım (I_p) ile konsantrasyon doğru orantılıdır ve tarama hızının karekökü ($v^{1/2}$) ile artar.

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

Burada, n alınıp verilen elektron sayısı, A elektrotun yüzey alanı (cm^2), C analit konsantrasyonu (mol L^{-1}), D difüzyon katsayısı ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) ve v tarama hızı (V s^{-1})'dir.

Yükseltgenme/indirgenme piklerinin potansiyelleri redoks oluşum potansiyellerine bağlıdır. Tersinir sistemlerde, anodik ve katodik pik akım değerleri birbirine eşittir ($I_{pa}/I_{pc} = 1$) ve oluşum potansiyeli (E°) anodik pik potansiyeli (E_{pa}) ile katodik pik potansiyeli (E_{pc}) arasındadır (Eşitlik 2).

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (2)$$

Pik potansiyelleri arasındaki fark, redoks reaksiyonu sırasında alınıp verilen elektron sayısını vermektedir (Eşitlik 3). Ayrıca, tersinir sistemlerde anodik ve katodik pik potansiyelleri tarama hızından bağımsızdır.

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0.0592}{n} V \quad (3)$$

➤ *Tersinmez ve yarı tersinir sistemlerde;* düşük tarama hızlarında tersinir olan sistem tarama hızı arttığında tersinmez hale gelir. Anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark tersinir sistemlere göre fazladır. Pik akımı ile tarama hızı arasındaki ilişki (4) eşitliği ile verilir.

$$I_p = 2.99 \times 10^5 n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (4)$$

Burada, α transfer katsayısı, n reaksiyonda alınıp verilen elektron sayısı, n_a yük transfer basamağındaki elektron sayısı, A elektrotun yüzey alanı (cm^2),

C analit konsantrasyonu (mol L^{-1}), D difüzyon katsayısı ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) ve v tarama hızı (V s^{-1})'dir. Ayrıca, tersinmez sistemlerde ters pik yoktur ve I_p ile $v^{1/2}$ orantılıdır.

Tarama hızının karekökü ($v^{1/2}$) ile pik akımı (I_p) arasındaki grafiğin doğrusal olması, incelenen elektron aktarımının elektrot-çözelti ara yüzeyinde gerçekleştiğini (difüzyon kontrollü) gösterir. Tarama hızı (v) ile pik akımı (I_p) grafiğinin doğrusal olması ise, incelenen elektrot aktarımının elektrot yüzeyinde gerçekleştiğini (adsorpsiyon kontrollü) belirtir. Ayrıca, pik akımının logaritması ($\log I_p$) ile tarama hızının logaritması ($\log v$) arasındaki grafiğin eğiminin 0.5 olması olayın difüzyon kontrollü, 1.0 çıkması ise olayın adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir (26, 50-52).

Doğrusal ve döngülü voltametri, elektrokimyasal süreçler hakkındaki bilgiyi içeren verilerin kısa sürede, kolayca elde edilmesi ve yorumlanması bakımından eşsiz birer yöntem olarak kabul edilmektedir (53).

4.7.3. Puls Voltametri

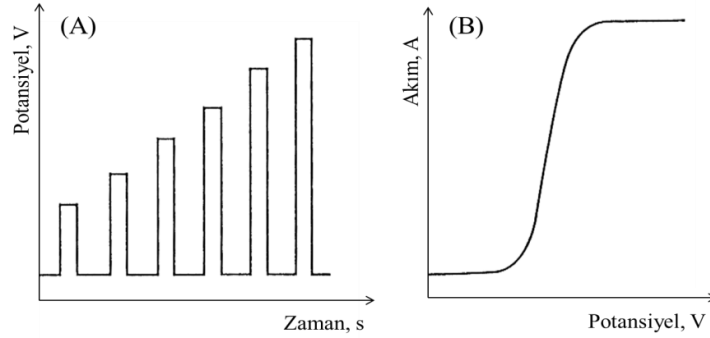
Puls voltametrik yöntemler, analitik kimyada daha duyarlı çalışmalar yapmak amacıyla geliştirilmiştir. Günümüzde puls yöntemleri özellikle analitik kimyada geniş uygulama alanı bulan yöntemlerden biridir. Bu yöntemler, elektroaktif türler için arka plan akımlarını düşürerek daha düşük saptama limitleri elde edebilmek ve polarografik performansı iyileştirmek amacıyla Barker ve Gardner tarafından önerilmiştir (48, 54).

Puls voltametri tekniklerinde, voltametrik hücreye potansiyel pulsları uygulanır ve oluşan akım bu pulsların ömrü süresince zamanın fonksiyonu olarak ölçülür. Normal ve diferansiyel puls olmak üzere iki tür puls vardır. En sık kullanılan puls voltametri yöntemleri; normal puls voltametri, diferansiyel puls voltametri ve kare dalga voltametridir.

4.7.3.1. Normal Puls Voltametri

Normal puls voltametri yönteminde hücreye, başlangıç potansiyeli olarak seçilen değerden itibaren belirli aralıklarla basamak halinde artan genlikli pulslar uygulanır. Her bir basamak arasındaki fark birbirine eşittir. Uygulanan pulslar sonucu elde edilen akım değerlerinden, analiz edilen madde hakkında bilgiye ulaşılır. Bu yöntem özellikle analiz edilen türün veya reaksiyon sonucu oluşan ürünün adsorpsiyon özelliği hakkında

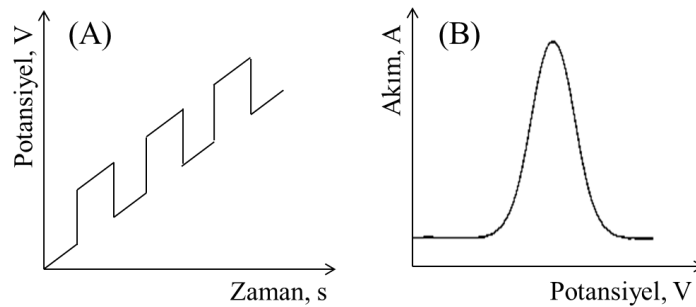
bilgi verir. Şekil 8’de normal puls voltametri yönteminde kullanılan uyarma sinyalinin şekli ve bu uyarma sinyali ile elde edilen voltamogram gösterilmiştir.



Şekil 8. Normal puls voltametri yöntemi için (A) uyarma sinyalinin şekli ve (B) tersinmez bir reaksiyon için elde edilen voltamogram

4.7.3.2. Diferansiyel Puls Voltametri

Diferansiyel puls voltametri yöntemi, organik ve inorganik türlerin eser miktarlarının analizinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde çalışma elektrotuna, doğrusal bir potansiyel artışına göre ayarlanmış sabit büyüklükte pulsalar uygulanır. Akım, ilk olarak puls uygulanmadan yani tam pulsun başladığı anda potansiyelde bir artış olmadan ölçülür ve sonra pulsun bitmesine yakın bir bölgede ölçülür. Bu iki akım arasındaki fark alınır. Uygulanan potansiyele karşı bu akım farklarının grafiğe geçirilmesiyle diferansiyel puls voltamogramı elde edilir (50). Şekil 9’da diferansiyel puls voltametri yönteminin uyarma sinyali ve bu uyarma sinyali ile elde edilen voltamogram gösterilmiştir.

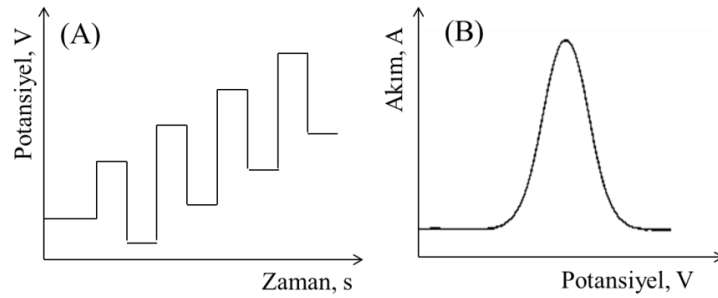


Şekil 9. Diferansiyel puls voltametri yöntemi için (A) uyarma sinyalinin şekli ve (B) tersinmez bir reaksiyon için elde edilen voltamogram

Diferansiyel puls voltametri, en çok kullanılan elektroanalitik yöntemlerden biridir. Normal puls voltametriyle karşılaştırıldığında iki üstünlüğü vardır: Birincisi, her bir analitin analitik pikleri birbirinden kolayca ayrılabilmesi için tek bir voltamogramda pek çok analitin belirlenebilmesi mümkün olabilmektedir. İkinci üstünlüğü ise, diferansiyel akımla çalışılması ve böylece analitik duyarlılığın artırılmasıdır (55).

4.7.3.3. Kare Dalga Voltametri

Diferansiyel puls voltametri yönteminde olduğu gibi kare dalga voltametri yönteminde de her bir puls döngüsünde iki defa akım ölçülür. Bu yöntemin diferansiyel puls voltametri yönteminden temel farkı ise geri yönde de puls uygulanmasıdır. Akım, ileri yönde uygulanan pulsun bitişi ile geri yönde uygulanan pulsun bitişinde ölçülür ve net akım olarak iki akım arasındaki fark alınır. İleri yönde uygulanan pulsun akımı pozitif, geri yönlü pulsun akımı ise negatif olduğundan, hesaplanan net akım hem ileri yönde uygulanan pulsun akımından hem de geri yönde uygulanan pulsun akımından daha büyük olur (21, 50). Bu iki akım arasındaki fark, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde Şekil 10'da görüldüğü gibi bir kare dalga voltamogramı elde edilir.



Şekil 10. Kare dalga voltametri yöntemi için (A) uyarma sinyalinin şekli ve (B) tersinmez bir reaksiyon için elde edilen voltamogram

Kare dalga voltametri, oldukça hızlı bir teknik olması bakımından üstün bir yöntemdir. Voltamogramlar birkaç saniye içinde elde edilebilmektedir. Ortalama 2-3 dakikayı bulan diferansiyel puls voltamogramının tamamlanması ile karşılaştırıldığında, kare dalga voltametrisinin analiz süresi oldukça kısadır (50, 55). Bu yöntemin bir diğer üstünlüğü ise, kare dalga voltametri ile elde edilen toplam akıma, artık akımın katkısının minimuma indirilmiş olmasıdır. Ayrıca, kare dalga voltametri

yönteminde net akım hem ileri hem de geri puls akımlarından daha büyük olduğundan, voltametrik pik genellikle oldukça kolay okunmaktadır. Bu da, yöntemin doğruluğunu artırmakta ve diferansiyel puls voltametri yönteminden daha yüksek duyarlılığın elde edilmesini sağlamaktadır (56).

4.7.4. Sıyırma Yöntemleri

Sıyırma teknikleri voltametrik analizlerde duyarlılığı artırmaya yönelik olarak geliştirilen iki aşamalı tekniklerdir. Bu yöntemde, analizi yapılacak madde seyreltik çözeltiden indirgenme veya yükseltgenme yoluyla elektrot yüzeyinde biriktirilir. Bu basamakta yapılan işlem bir elektrokimyasal ön deriştirme işlemidir. Daha sonra elektroda pozitif (anodik) veya negatif (katodik) yönde potansiyel taraması uygulanır. Bu tarama esnasında elektrot yüzeyinde yoğunlaşmış madde indirgenme veya yükseltgenme ile elektrot yüzeyinden sıyrılarak tekrar çözeltiye geçer. Bu esnada oluşan akım ölçülerek madde miktarı tayin edilir. Sıyırma yöntemleri kullanılarak 10^{-6} ile 10^{-9} M aralığında çözeltilerin analizi yapılabilmektedir (30).

4.7.4.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi

Anodik sıyırma voltametrisinde, önce negatif yönde potansiyel uygulanır ve analitin çalışma elektrotu üzerinde birikmesi sağlanır; sonra pozitif yönde potansiyel uygulanır ve elektrot yüzeyinde birikmiş olan analitin elektrot yüzeyinden ayrılarak çözeltiye geçmesi sağlanır.

Anodik sıyırma yöntemlerinde elektrot, biriktirme basamağı sırasında bir katot olarak, analiz edilecek maddenin ilk haline yükseltgendiği sıyırma basamağında ise anot olarak davranır (57).

Bu yöntemde yüksek derişimlerde çalışılır ve uzun süre biriktirme uygulanırsa, elektrot yüzeyi doygunluğa ulaşır ve çözelti içi derişim ile elde edilen sinyal arasındaki bağıntı geçerliliğini yitirebilir. Bu nedenle elde edilen pik akımları ile derişim arasındaki doğrusal ilişki sıklıkla kontrol edilmelidir.

4.7.4.2. Katodik Sıyırma Voltametrisi

Bu yöntemde ise, anodik sıyırma voltametrisindeki işlemlerin tersi yapılır. Elektrota önderiştirme basamağında pozitif yönde potansiyel; sıyırma basamağında ise negatif yönde potansiyel uygulanır. Önderiştirme basamağında elektrot yüzeyinde

analitin çözünürlüğü az olan tuzu oluşur ve bu tuz sıyırma basamağında indirgenerek elektrot yüzeyinden ayrılır. Bu esnada ölçülen akım, potansiyelin fonksiyonu olarak grafiğe geçirilir ve voltamogramlar elde edilir (58, 59).

4.7.4.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi

Adsorptif sıyırma yöntemleri anodik ve katodik sıyırma yöntemlerine oldukça benzemektedir. Bu yöntemde, çalışma elektrotu sürekli karıştırılan bir analit çözeltisine daldırılır. Bu şekilde elektrot yüzeyinde analitin birikmesi, anodik ve katodik sıyırma yöntemlerindeki gibi elektrolitik olarak değil, fiziksel adsorpsiyonla meydana gelir. Biriktirme basamağından sonra karıştırma durdurulur ve birikmiş madde doğrusal taramalı ya da puls voltametri tekniklerinden biri ile tayin edilir (30).

Bu yöntem ile biyolojik öneme sahip ilaçlar ve pestisitler gibi birçok bileşik nanomolar düzeyde tayin edilebilmektedir. Bazı ilaçların adsorptif sıyırma voltametri yöntemi ile 10^{-12} M gibi düşük konsantrasyonlarda tayininin yapılabildiğine dair bilgiler literatürde mevcuttur (60-62).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Maddeler

5.1.1. Sefepim Stok Çözeltileri

Sefepim saf ilaç etkin maddesi Sigma-Aldrich'ten ve sefepimin farmasötik dozaj şekli olan Unisef® (1.0 g/1 flakon) Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş.'den tedarik edildi ve saflaştırılmadan aynen kullanıldı.

Saf sefepimin 1.0×10^{-3} M'lık stok çözeltisi ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı. Bunun için 28.6 mg sefepim tartılıp 50 mL'lik bir balon jøjeye alındı ve ultra saf su ile hacme tamamlandı. Tamamen çözünmesi için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Sefepim çalışma çözeltileri, bu stoktan belirlenen hacimde alınıp uygun tampon çözelti ile istenen hacme tamamlanarak hazırlandı. Sefepim çözeltileri günlük olarak taze hazırlandı.

5.1.2. Serum Stok Çözeltileri

Serum çalışmasının yapılabilmesi için gerekli izni almak üzere Etik Kurul Raporu hazırlandı ve KTÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na sunuldu. Rapor, kurul tarafından onaylandıktan sonra sağlıklı ve herhangi bir ilaç kullanmayan bir bireyden 60 mL kan örneği alındı. Serum kısmını ayırmak amacıyla, kan örneği santrifüj edildi. Ayrılan serum eppendorf tüplerine aktarıldı ve buzdolabının dondurucu kısmında -22°C 'nin altında saklandı.

Serum çalışması için, saf sefepimin 1.0×10^{-2} M'lık stok çözeltisi ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı. Bunun için 57.2 mg sefepim tartılıp 10 mL'ye ultra saf su ile tamamlandı.

Sefepim etkin maddeli serum ana stok çözeltisi 1.0×10^{-3} M olacak şekilde hazırlandı. Bunun için, saf serum çözeltisinden 3.6 mL, asetonitril çözeltisinden 5.4 mL ve 1.0×10^{-2} M'lık sefepim stok çözeltisinden 1.0 mL alınarak bu üç çözelti 10 mL'lik deney tüpüne aktarıldı ve 1.0×10^{-3} M'lık etkin maddeli serum ana stok çözeltisi elde edilmiş oldu.

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

5.1.3. Sodyum Hidroksit Çözeltisi

Tampon çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanmasında kullanılan sodyum hidroksit (NaOH) ≥ 98 saflıkta, Aldrich (Çek Cumhuriyeti) marka ürün idi. Saflaştırılmadan aynen kullanıldı. 5.0 M'lık NaOH çözeltisi hazırlamak için 20.0 g NaOH tartıldı ve balon joje içerisinde ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

5.1.4. Britton-Robinson Tampon Çözeltisi (BRT)

Britton-Robinson tampon çözeltisi için 0.04 M fosforik asit (H_3PO_4 , %85, yoğunluğu 1.685 g mL^{-1} , Merck, Almanya), 0.04 M glasiyal asetik asit (CH_3COOH , %100, yoğunluğu 1.049 g mL^{-1} , Merck, Almanya) ve 0.04 M borik asit (H_3BO_3 , %99.5, Aldrich, ABD) karışımı ultra saf su ile toplam hacim 1.0 L olacak şekilde hazırlandı. Stok olarak hazırlanmış bu çözelti 50 veya 100 mL'lik balon jojelere aktararak, 5.0 M NaOH çözeltisi ile istenen pH'lara (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0) ayarlandı. Tampon çözeltiler oda sıcaklığında hazırlandı ve buzdolabında saklandı.

5.1.5. Fosfat Tampon Çözeltisi (FT)

Fosfat tampon çözeltisi, H_3PO_4 (%85, yoğunluğu 1.685 g mL^{-1} , Merck, Almanya) ile hazırlandı. Bunun için, 6.84 mL H_3PO_4 ultra saf su ile 500 mL'ye tamamlanarak 0.2 M'lık stok çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden 100'er mL alınarak balon jojelere aktarıldı ve bu çözeltiler 5.0 M NaOH ile istenilen pH'lara (2.0, 3.0, 4.0, 5.0) ayarlandı. pH değerleri 6.0, 7.0 ve 8.0 olan 0.1 M fosfat tampon çözeltileri ise, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (≥ 99 , Merck, Almanya) ve Na_2HPO_4 (≥ 99 , Aldrich, Almanya) tuzlarından hazırlandı. pH 6.0 için 1.47 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve 82 mg Na_2HPO_4 ; pH 7.0 için 0.97 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve 0.54 g Na_2HPO_4 ; pH 8.0 için 0.22 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve 1.22 g Na_2HPO_4 tartılarak 100'er mL'lik balon jojelere alındı ve hacim ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Çözeltiler, 5.0 M NaOH çözeltisi ile söz konusu pH'lara ayarlandı. Tampon çözeltiler oda sıcaklığında hazırlandı ve buzdolabında saklandı.

5.1.6. Asetat Tampon Çözeltisi (AT)

Asetat tampon çözeltisi, CH_3COOH (%100, yoğunluğu 1.049 g mL^{-1} , Aldrich, Almanya) ile derişimi 1.0 M olacak şekilde hazırlandı. Bunun için, 28.6 mL CH_3COOH bir balon jojeye alındı ve hacmi ultra saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden

100'er mL alınarak balon jojelere aktarıldı ve 5.0 M NaOH çözeltisi kullanılarak istenilen pH'lara (3.5, 4.5 ve 5.5) ayarlandı.

5.1.7. Alüminyum Hidroksit

Bor-katkılı elmas elektrot yüzeyinin cilalanması işlemi için kullanılan pudra formundaki alüminyum hidroksit ($\text{Al}(\text{OH})_3$, %100, Merck, Almanya) ürünü idi.

5.1.8. Karbon Pasta Elektrot Bileşimi

Bileşim için, grafit tozu (yoğunluğu 2.2 g mL^{-1} , Merck, Almanya) ve mineral yağ (yoğunluğu 0.84 g mL^{-1} , Aldrich, ABD) kullanıldı. Bileşim, porselen bir havan içerisinde belirlenen oranlarda grafit tozu ve mineral yağın karıştırılması ile hazırlandı. Öncelikle %15 mineral yağ ve %85 grafit tozunu içeren bileşim için, 0.3 g grafit tozu ve 63 μL mineral yağ homojenlik sağlanıncaya kadar iyice karıştırıldı. Daha sonra, sırasıyla, %20 mineral yağ-%80 grafit tozu için 0.3 g grafit tozu ve 89 μL mineral yağ; %25 mineral yağ-%75 grafit tozu için 0.3 g grafit tozu ve 120 μL mineral yağ; %30 mineral yağ-%70 grafit tozu için 0.3 g grafit tozu ve 153 μL mineral yağ; %35 mineral yağ-%65 grafit tozu için 0.3 g grafit tozu ve 192 μL mineral yağ; %40 mineral yağ-%60 grafit tozu için 0.3 g grafit tozu ve 238 μL mineral yağ karıştırılarak altı farklı oranda pasta bileşimi hazırlandı. Hazırlanan bileşimler eppendorf tüplerine alınarak, oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edildi.

5.2. Kullanılan Cihazlar

5.2.1. Voltametri Cihazı

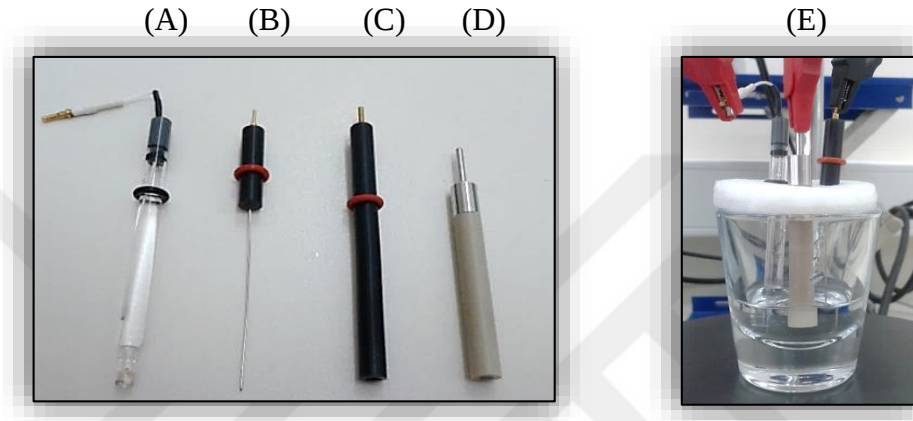
Autolab marka PGSTAT128N model potansiyostat/galvanostat cihazı (Resim 1) kullanıldı (Metrohm-Autolab, Hollanda). Analiz sonuçları, Nova 1.10 programı ile değerlendirildi.



Resim 1. Potansiyostat/galvanostat cihazı

5.2.2. Elektrot Sistemi

Deneyler, çalışma elektrotu, referans elektrot ve karşıt elektrottan oluşan üç elektrotlu elektrokimyasal hücre ile gerçekleştirildi. Çalışma elektrotu olarak Windorscientific marka bor-katkılı elmas (BKE) elektrot ya da BASİ marka karbon pasta (KP) elektrot; referans elektrot olarak BASİ marka Ag/AgCl elektrot ve karşıt elektrot olarak BASİ marka platin tel kullanıldı (Resim 2).



Resim 2. (A) Ag/AgCl referans elektrot, (B) platin tel karşıt elektrot, (C) karbon pasta çalışma elektrotu, (D) bor-katkılı elmas çalışma elektrotu ve (E) üç elektrotlu hücre

5.2.3. pH Metre

Hanna HI2211 model (Romanya) pH metre, tampon çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanmasında kullanıldı. Günlük pH ölçümleri öncesinde, pH metreyi kalibre etmek için pH değerleri 4.0 ve 7.0 olan standart tampon çözeltiler (Merck, Almanya) kullanıldı. Tüm ölçümler oda sıcaklığında yapıldı.

5.2.4. Saf Su/Ultra Saf Su Cihazı

Santorius marka Arium proUV model ultra saf su cihazı ve Arium 61316 model saf su cihazı (Almanya) idi. Çözeltilerin hazırlanmasında direnci $\geq 18 \text{ M}\Omega$ olan ultra saf su; yıkama ve temizlik işlerinde ise saf su kullanıldı.

5.2.5. Ultrasonik Banyo

Sonica 3300MH model (İtalya) idi. Çözeltilerin karıştırılmasında ve cam malzemelerin temizliğinde kullanıldı.

5.2.6. Terazi

Ohaus PA214C model (ABD) idi. Çözeltilerde kullanılan katı kimyasalların analitik hassasiyette tartılmasında kullanıldı.

5.2.7. Manyetik Karıştırıcı

Heidolph MR Hei Standart model (Almanya) idi. Sıyırma voltametrisi deneylerinde, hücredeki çözeltiyi karıştırmak amacıyla kullanıldı.

5.2.8. Vortex

Heidolph Reax Top model (Almanya) idi. Homojen karışımli çalışma çözeltileri elde etmek amacıyla kullanıldı.

5.2.9. Buzdolabı

Profilo BD2046W2NN model (Türkiye) idi. Tampon ve etkin madde stok çözeltilerinin muhafazasında kullanıldı. Serum stok çözeltileri buzdolabının dondurucu kısmında -22°C'nin altında saklandı.

5.2.10. Mikropipet

Isolab (Almanya) ve Socorex (İsviçre) marka idi. Çözeltilerin hassas bir şekilde hazırlanması amacıyla, hacim aralıkları 0.5-10, 10-100 ve 100-1000 µL olan mikropipetler kullanıldı.

5.3. Çalışma Elektrotlarının Hazırlanması ve Temizlenmesi

Bor-katkılı elmas elektrot yüzeyi ölçümler öncesinde cilalanarak temizlendi. Cilalama işlemi için, özel olarak hazırlanmış cilalama pedi saf su ile ıslatılarak üzerine az miktarda $Al(OH)_3$ tozu konuldu ve dairesel hareketlerle otuz kere sekiz çizildi. Daha sonra elektrotun yüzeyinde kalan $Al(OH)_3$ artıklarını uzaklaştırmak için saf su ile yıkandı.

Karbon pasta elektrot gövdesinin içine doldurulmak üzere, Bölüm 5.1.8'de açıklandığı şekilde, farklı oranlarda grafit tozu-mineral yağ bileşimi hazırlandı. Sefepimin analizi için en uygun bileşimi belirlemek amacıyla gerekli ölçümler yapıldı ve sonraki deneylerin tümü en uygun olduğu belirlenen pasta bileşimiyle gerçekleştirildi. Karbon pasta elektrot ile alınan her ölçüm sonrasında, elektrotun pasta bileşiminin hücredeki çözelti ile temas eden yüzey kısmı ince uçlu bir spatül ile

sıyrılarak çıkarıldı ve yeniden pasta ile dolduruldu. Daha sonra pastanın elektrota iyice yerleşmesi ve elektrot yüzeyinin pürüzsüzleşmesi amacıyla, kâğıt üzerinde pürüzsüz bir yüzey elde edilinceye kadar sekiz çizildi. Son olarak, elektrotun gövdesi saf su ile yıkanarak hazır hale getirildi.

Sefepimin voltametrik analizi için en uygun karbon pasta bileşimini belirlemek amacıyla, pH değeri 3.0 olan BRT, pH değeri 4.5 olan AT ve pH değeri 3.0 olan FT içerisinde 6.0×10^{-5} M'lık sefepim çözeltileri hazırlandı ve döngülü voltametri, diferansiyel puls voltametri ve kare dalga voltametri yöntemleri ile voltamogramlar alınarak elde edilen pik akım değerleri karşılaştırıldı.

5.4. Voltametrik Çalışmalar

5.4.1. pH Taraması

Sefepimin, BKE ve KP elektrotlar ile elektrokimyasal analiz çalışması için öncelikle en uygun tampon ortamı ve pH belirlendi. Bu amaçla, pH'ları 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 olarak hazırlanan FT çözeltileri, pH'ları 3.5, 4.5, 5.5 olarak hazırlanan AT çözeltileri ve pH'ları 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 olarak hazırlanan BR tampon çözeltileri kullanıldı. Konsantrasyonu 6.0×10^{-5} M olan sefepim çözeltileri için 1.0×10^{-3} M'lık sefepim stok çözeltisinden 0.3 mL alınıp hacmi tampon çözelti ile 5 mL'ye tamamlandı ve bu çözeltiler pH taramasında kullanıldı.

BKE elektrot kullanılarak yapılan pH taraması çalışmalarında, döngülü voltametri (DV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve kare dalga voltametri (KDV) yöntemleri için potansiyel tarama aralığı 0.0 ile +1.4 V olarak belirlendi. Her ölçüm öncesinde elektrot yüzeyi parlatılarak temizlendi. Daha sonra, sefepim içermeyen tampon çözeltinin bulunduğu hücrede DV yöntemi kullanılarak -0.4 ile +1.4 V arasında 100 mV s^{-1} tarama hızında dört döngülü tarama yapılarak yüzey aktif hale getirildi.

En iyi iki karbon pasta, %25 mineral yağ - %75 grafit tozu ve %30 mineral yağ - %70 grafit tozu içeren bileşimler olarak belirlendi ve bu iki bileşimle hazırlanan KP elektrotlar kullanılarak pH taraması yapıldı. DV, DPV ve KDV yöntemleri ile gerçekleştirilen pH taramasında, potansiyel tarama aralığı +0.1 ile +1.2 V olarak belirlendi. Her ölçüm öncesinde elektrot yüzeyi, DV yöntemi ile -0.4 ile +1.2 V arasında 100 mV s^{-1} tarama hızında dört döngülü tarama yapılarak aktifleştirildi.

DV, DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen pH taraması sonuçları incelendi ve her iki elektrot için ayrı ayrı olmak üzere, sefepimin en simetrik ve en yüksek pik akım değerleri belirlendi. Bu iki pik akım değerinin elde edildiği tampon ortamları çalışma tamponu olarak seçildi ve devamındaki çalışmalar seçilen tampon ortamlarında gerçekleştirildi.

5.4.2. Hız Taraması

Sefepimin elektrokimyasal yükseltgenme sürecinin difüzyon kontrollü ya da adsorpsiyon kontrollü olduğu bilgisi, hız taraması çalışmaları ile elde edildi. Her iki elektrot için ölçümler öncesindeki elektrotların temizlik ve yüzey aktivasyon işlemleri Bölüm 5.4.1’de açıklandığı şekilde seçilen tamponlar içerisinde DV yöntemi ile yapıldı.

BKE elektrot ile yapılacak hız taraması çalışmaları için, pH’sı 2.0 ve 7.0 olan BRT içindeki 6.0×10^{-5} M’lık sefepim çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiler, DV yöntemi kullanılarak +0.6 ile +1.4 V potansiyel tarama aralığında sırasıyla 150, 100, 75, 50, 25, 10 ve 5 mV s^{-1} tarama hızlarında tek döngü ile tarandı.

KP elektrot ile yapılan hız taraması çalışması için, pH’sı 5.0 olan FT ve pH’sı 10.0 olan BRT içinde 6.0×10^{-6} M’lık sefepim çözeltileri hazırlandı. Bu iki farklı tampon ortamlı sefepim çözeltileri, +0.3 ile +1.0 V potansiyel tarama aralığında DV yöntemi kullanılarak sırasıyla 150, 100, 75, 50, 25, 10 ve 5 mV s^{-1} tarama hızlarında tek döngü ile tarandı.

Uygulanan tarama hızlarına karşılık gelen sefepimin pik akım değerleri okunarak, her iki elektrot için hem tarama hızına karşı hem de tarama hızının kareköküne karşı pik akım grafikleri çizildi.

5.4.3. Sıyırma Voltametrisi Parametreleri

Sefepimin BKE elektrot ile diferansiyel puls sıyırma voltametrisi (DPSV) ve kare dalga sıyırma voltametrisi (KDSV) yöntemleri kullanılarak yapılan kantitatif analiz çalışmaları için sıyırma parametreleri optimize edildi. Bunun için pH 2.0 BRT içerisinde 1.0×10^{-5} M sefepim çözeltisi hazırlandı ve biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi optimize edilmeye çalışıldı.

Sefepimin, KP elektrot kullanılarak yapılan kantitatif analiz çalışmalarında, DPSV ve KDSV yöntemleri için farklı tamponlar kullanıldı: DPSV için pH 5.0 FT ve

KDSV için pH 10.0 BRT. Her iki elektrot için ölçümler öncesindeki elektrotların temizlik ve yüzey aktivasyon işlemleri Bölüm 5.4.1’de açıklandığı şekilde seçilen tamponlar içerisinde DV yöntemi ile yapıldı.

KP elektrot için hem DPSV hem de KDSV için sırasıyla biriktirme potansiyeli ve biriktirme zamanı optimize edildi. Bunun için öncelikle 1.0×10^{-3} M sefepim stok çözeltisi kullanılarak, DPSV çalışmaları için pH 5.0 FT içerisinde, KDSV çalışmaları için ise pH 10.0 BRT içerisinde 6.0×10^{-6} M’lık sefepim çalışma çözeltileri hazırlandı. Daha sonra her iki yöntem için biriktirme süresi 60 s’de sabit tutularak biriktirme potansiyeli sırasıyla 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 V olarak değiştirildi ve her iki yöntem için ayrı ayrı olmak üzere, pik akım değeri en yüksek olan en simetrik sefepim pikinin gözlemlendiği biriktirme potansiyeli seçildi. Son olarak, her iki yöntem için biriktirme süresinin optimizasyonu yapıldı. Bunun için, seçilen biriktirme potansiyelleri sabit tutuldu ve biriktirme süresi; DPSV için sırasıyla 15, 20, 30, 35, 40, 55, 75, 85, 90, 120 s olarak, KDSV için ise sırasıyla 15, 30, 45, 60, 75, 120, 180 s olarak arttırıldı. Elde edilen voltamogramlar incelenerek, her iki yöntem için ayrı ayrı olmak üzere, pik akım değeri en yüksek olan en simetrik sefepim pikinin gözlemlendiği biriktirme süresi seçildi.

5.4.4. Kalibrasyon Çalışması

Sefepimin, BKE elektrot ile yapılan kantitatif analiz çalışmaları için DPV ve KDV yöntemleri; KP elektrot ile yapılan kantitatif analiz çalışmaları için ise DPSV ve KDSV yöntemleri kullanıldı. Potansiyel tarama aralığı, DPV ve KDV için +0.6 ile +1.4 V, DPSV için +0.4 ile +1.0 V ve KDSV için +0.2 ile +0.85 V olarak belirlendi ve bu doğrultuda yapılan taramalar sonucu elde edilen sefepim piklerinin akım değerleri okunarak kalibrasyon çalışması yapıldı. Her iki elektrot için ölçümler öncesindeki elektrotların temizlik ve yüzey aktivasyon işlemleri Bölüm 5.4.1’de açıklandığı şekilde seçilen tamponlar içerisinde DV yöntemi ile yapıldı.

BKE elektrot ile yapılan kalibrasyon çalışması için, sefepimin pH 2.0 BRT içerisinde 2.0×10^{-8} ile 1.0×10^{-4} M konsantrasyon aralığında yirmi farklı çözeltisi hazırlandı. Çalışmanın yüksek hassasiyetle gerçekleştirilmesi amacıyla 1.0×10^{-3} M sefepim ana stok çözeltisi ve konsantrasyonları 1.0×10^{-4} , 1.0×10^{-5} ve 1.0×10^{-6} M olan sefepim ara stok çözeltileri hazırlandı. Öncelikle, 1.0×10^{-3} M ana stok çözeltiden 1.0 mL alındı ve hacmi ultra saf su ile 10 mL’ye tamamlanarak 1.0×10^{-4} M’lık ara stok

çözeltisi hazırlandı. Daha sonra, 1.0×10^{-4} M'lık ara stoktan 1.0 mL alınıp ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 1.0×10^{-5} M'lık ara stok çözeltisi hazırlandı. Son olarak, 1.0×10^{-5} M'lık ara stoktan 1.0 mL alınıp ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 1.0×10^{-6} M'lık ara stok çözeltisi hazırlandı. Ana ve ara stok çözeltiler kullanılarak pH 2.0 BRT içerisinde sefepim çalışma çözeltileri hazırlandı. Bunun için, konsantrasyonu 1.0×10^{-6} M olan ara stok çözelti ile 2.0×10^{-8} , 4.0×10^{-8} , 6.0×10^{-8} , 8.0×10^{-8} , 1.0×10^{-7} M sefepim çalışma çözeltileri; konsantrasyonu 1.0×10^{-5} M olan ara stok çözelti ile 2.0×10^{-7} , 4.0×10^{-7} , 6.0×10^{-7} , 8.0×10^{-7} , 1.0×10^{-6} M sefepim çalışma çözeltileri; konsantrasyonu 1.0×10^{-4} M olan ara stok çözelti ile 2.0×10^{-6} , 4.0×10^{-6} , 6.0×10^{-6} , 8.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} M sefepim çalışma çözeltileri; konsantrasyonu 1.0×10^{-3} M olan sefepim ana stok çözelti ile de 2.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} , 6.0×10^{-5} , 8.0×10^{-5} , 1.0×10^{-4} M sefepim çalışma çözeltileri hazırlandı. Kalibrasyon çalışması için, konsantrasyonu en düşük sefepim çalışma çözeltisinden (2.0×10^{-8} M) başlanarak konsantrasyonu en yüksek sefepim çalışma çözeltisine (1.0×10^{-4} M) doğru her bir konsantrasyon için yapılan DPV ve KDV taramaları sonucu elde edilen pik akım değerleri sefepim konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi.

KP elektrot ile yapılan kalibrasyon çalışmalarında, DPSV ve KDSV yöntemleri için seçilen tampon çözeltilerle hazırlanan sefepim çalışma çözeltileri kullanıldı. Sefepimin 2.0×10^{-8} ile 1.0×10^{-4} M konsantrasyon aralığında yirmi farklı çözeltisi DPSV taramaları için pH 5.0 FT içerisinde; KDSV taramaları için ise pH 10.0 BRT içerisinde hazırlandı. Ana stok çözelti, ara stok çözeltiler ve bu stoklar ile hazırlanan çalışma çözeltileri, BKE elektrot ile yapılan kalibrasyon çalışmasında olduğu gibi hazırlandı. Konsantrasyonu en düşük sefepim çalışma çözeltisinden başlanarak konsantrasyonu en yüksek sefepim çalışma çözeltisine doğru her bir konsantrasyon için yapılan DPSV ve KDSV tarama sonuçları incelenerek pik akım değerleri okundu ve sefepim konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi.

Sefepimin teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) değerleri DPV, KDV, DPSV ve KDSV yöntemleri için, sefepim çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon grafikleri yardımıyla Eşitlik 5 ve 6 kullanılarak hesaplandı.

$$TS = 3 (S/m) \quad (5)$$

$$TAS = 10 (S/m) \quad (6)$$

Eşitliklerde, s üç değer üzerinden elde edilen sefepimin pik akım değerlerinin standart sapması ve m ilgili yöntemin kalibrasyon denkleminin eğimidir (63).

5.4.5. Tekrar Edilebilirlik Çalışması

Sefepim analizi için önerilen metodun kesinliğinin tespiti amacıyla tekrar edilebilirlik çalışmaları yapıldı. BKE elektrot ile gerçekleştirilen tekrar edilebilirlik çalışmalarında DPV ve KDV; KP elektrot ile gerçekleştirilen tekrar edilebilirlik çalışmalarında ise DPSV ve KDSV yöntemleri kullanıldı. Hem sefepim pik akım değerleri hem de sefepim pik potansiyelleri için gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneyleri yapıldı. Tekrar edilebilirlik deneyleri için öncelikle, her iki elektrot için ölçümler öncesindeki elektrotların temizlik ve yüzey aktivasyon işlemleri Bölüm 5.4.1’de açıklandığı şekilde seçilen tamponlar içerisinde DV yöntemi ile yapıldı.

BKE elektrot kullanılarak elde edilen gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik verileri için pH 2.0 BRT içerisinde farklı konsantrasyonlarda sefepim çalışma çözeltileri hazırlandı. Çalışma çözeltilerinin konsantrasyonları, DPV yöntemi için 8.0×10^{-6} ve 1.0×10^{-5} M; KDV yöntemi için 8.0×10^{-6} ve 4.0×10^{-5} M olarak seçildi.

KP elektrot ile yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde DPSV ve KDSV için ayrı tampon ortamları kullanıldı. DPSV için pH 5.0 FT içerisinde 4.0×10^{-6} ve 6.0×10^{-6} M sefepim çalışma çözeltileri, KDSV için pH 10.0 BRT içerisinde 6.0×10^{-6} ve 8.0×10^{-6} M sefepim çalışma çözeltileri hazırlandı.

Belirlenen konsantrasyonlardaki sefepim çalışma çözeltilerinden, her yöntem için kendi içinde değerlendirilmek üzere, aynı gün içerisinde elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli verilerinden seçilen beş değer ortalama alınarak standart sapmaları ve yüzde bağıl standart sapmaları (Eşitlik 7) hesaplandı ve böylece gün içi tekrar edilebilirlik çalışması tamamlandı. Günler arası tekrar edilebilirlik çalışması, bir hafta içerisinde farklı günlerde elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli verilerinden seçilen beş değer üzerinden yapıldı.

$$\%BSS = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}}{\bar{x}} \times 100 \quad (7)$$

Eşitlikte, %BSS yüzde bağıl standart sapma, s standart sapma, x_i i'nci ölçümün sayısal değeri, $\bar{x}$ ise n sayıdaki ölçümün aritmetik ortalamasıdır (30).

5.4.6. Sefepimin Farmasötiklerden Tayini

Sefepimin farmasötiklerden analizi BKE elektrot ile DPV ve KDV; KP elektrot ile DPSV ve KDSV yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Her iki elektrot için sefepim çalışma çözeltilerinden alınan her bir ölçüm öncesinde elektrotların yüzeyi Bölüm 5.4.1'de anlatıldığı şekilde temizlenerek her bir yöntem için seçilen tamponlar içerisinde DV yöntemi ile aktive edildi.

Farmasötiklerden tayin deneylerinde, bir flakonunda 1.0 g sefepime eşdeğer sefepim hidroklorür bulunan Unisef[®] isimli ilaç kullanıldı. Çalışma için önce temiz ve kuru bir beherin ağırlığı ölçüldü. Daha sonra flakonun toz haldeki içeriği, flakonun içerisinde madde kalmamasına özen gösterilerek, bu behere aktarıldı. Dolu ve boş beherin ağırlıklarının farkı alınarak bir flakonun içeriği 1.488 g olarak hesaplandı. Sefepimin 1.0×10^{-3} M'lık farmasötik ana stok çözeltisini hazırlamak için gerekli olan flakon içeriğinin miktarı 41.07 mg olarak hesaplandı. Bu miktar tartılarak 50 mL'lik bir balon jöjeye aktarıldı ve ultra saf su ile hacme tamamlandı. Hazırlanan çözelti ultrasonik banyoda 10 dakika bekletildi. Çalışma çözeltilerinin yüksek hassasiyette hazırlanabilmesi amacıyla, 1.0×10^{-3} M'lık farmasötik ana stok çözeltisinden 1.0 mL alınıp hacmi ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak konsantrasyonu 1.0×10^{-4} M olan farmasötik ara stok çözeltisi hazırlandı. Farmasötik çalışma çözeltilerinin konsantrasyonları, BKE elektrot kullanılarak yapılan çalışmalarda DPV yöntemi için 8.0×10^{-6} M; KDV yöntemi için 4.0×10^{-5} M ve KP elektrot kullanılarak yapılan çalışmalarda ise DPSV yöntemi için 4.0×10^{-6} M; KDSV yöntemi için ise 8.0×10^{-6} M olarak seçildi.

DPV yöntemi ile yapılan farmasötiklerden sefepim tayini çalışması için, üç adet 8.0×10^{-6} M'lık farmasötik çalışma çözeltisi hazırlandı. Bunun için, konsantrasyonu 1.0×10^{-4} M olan farmasötik ara stok çözeltisinden 0.4 mL alındı ve pH 2.0 BRT ile 5 mL'ye tamamlandı. KDV çalışmalarında kullanılan 4.0×10^{-5} M farmasötik çalışma

çözeltisi için, 1.0×10^{-3} M farmasötik ana stok çözeltisinden 0.2 mL alınıp pH 2.0 BRT ile 5 mL'ye tamamlandı. DPSV için seçilen 4.0×10^{-6} M farmasötik çalışma çözeltisi, 1.0×10^{-4} M farmasötik ara stok çözeltisinden 0.2 mL alınıp pH 5.0 FT ile 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Konsantrasyonu 8.0×10^{-6} M olarak KDSV metodu için seçilen farmasötik çalışma çözeltisi için ise, 1.0×10^{-4} M farmasötik ara stok çözeltisinden 0.4 mL alındı ve pH 10.0 BRT ile 5 mL'ye tamamlandı. Seçilen bu dört farklı çalışma çözeltisinin her birinden üçer adet hazırlandı.

Farmasötik çalışma çözeltilerinden elde edilen voltamogramlardan okunan pik akım değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve yüzde bağıl standart sapmaları (Eşitlik 7) beş değer üzerinden hesaplandı.

5.4.7. Geri Kazanım Çalışması

Sefepim için geliştirilen elektrokimyasal analiz yönteminin doğruluğunu test etmek amacıyla, geri kazanım çalışması yapıldı. Çalışma için, DPV, KDV, DPSV ve KDSV yöntemleri kullanıldı. Farmasötik formdaki sefepimin flakon içeriğinden hazırlanan ilaç çözeltisine, saf sefepim etkin maddesinden hazırlanan stok çözeltiden bilinen miktarda ilave edildi. Her iki elektrot için çalışma çözeltilerinden alınan her bir ölçüm öncesinde elektrotların yüzeyi Bölüm 5.4.1'de anlatıldığı şekilde temizlenerek her bir yöntem için seçilen destek tamponlar içerisinde DV yöntemi ile aktive edildi.

Geri kazanım çalışması için öncelikle Bölüm 5.4.6'da açıklandığı şekilde sefepimin 1.0×10^{-3} M'lık farmasötik ana stok ve 1.0×10^{-4} M'lık farmasötik ara stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra Bölüm 5.4.4'te açıklandığı şekilde 1.0×10^{-3} M'lık saf sefepim ana stok ve 1.0×10^{-4} M'lık saf sefepim ara stok çözeltileri hazırlandı.

BKE elektrot ile yapılan geri kazanım çalışmalarında DPV ve KDV; KP elektrot ile yapılan çalışmalarda ise DPSV ve KDSV yöntemleri kullanıldı. Çalışma çözeltisi konsantrasyonu DPV için 1.0×10^{-5} M; KDV için 6.0×10^{-5} M; DPSV için 6.0×10^{-6} M ve KDSV için 1.0×10^{-5} M olarak seçildi. DPV için 1.0×10^{-5} M'lık çalışma çözeltisi şu şekilde hazırlandı: 1.0×10^{-4} M'lık farmasötik ara stok çözeltisinden 0.8 mL alınıp bir deney tüpüne konulduktan sonra üzerine 1.0×10^{-4} M saf sefepim ara stok çözeltisinden 0.2 mL eklendi ve hacmi pH 2.0 BRT ile 10 mL'ye tamamlandı. KDV yöntemi için seçilen 6.0×10^{-5} M'lık çalışma çözeltisi, 1.0×10^{-3} M farmasötik ana stok çözeltisinden 0.4 mL alınıp bir deney tüpüne konularak üzerine 1.0×10^{-3} M saf sefepim ana stok

çözeltisinden 0.2 mL eklenmesi ve hacmin pH 2.0 BRT ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. DPSV'nin çalışma çözeltisi için ise, 1.0×10^{-4} M farmasötik ara stok çözeltisinden 0.4 mL alındı ve bir deney tüpüne konuldu, daha sonra üzerine 1.0×10^{-4} M saf sefepim ara stok çözeltisinden 0.2 mL eklendi ve hacmi pH 5.0 FT ile 10 mL'ye tamamlandı. Son olarak, 1.0×10^{-5} M'lık KDSV çalışma çözeltisi için, 1.0×10^{-4} M farmasötik ara stok çözeltisinden 0.8 mL alınıp bir deney tüpüne konulduktan sonra üzerine 1.0×10^{-4} M saf sefepim ara stok çözeltisinden 0.2 mL eklendi ve hacmi pH 10.0 BRT ile 10 mL'ye tamamlandı. Her bir yöntem için üçer adet çalışma çözeltisi hazırlandı ve belirtilen yöntemler ile yapılan taramalar sonucunda elde edilen voltamogramların sefepim pik akım değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve yüzde bağıl standart sapmaları (Eşitlik 7) beş değer üzerinden hesaplandı. Geri kazanım değerleri yüzde geri kazanım olarak verildi.

5.4.8. Serum Çalışması

Serum çalışması hem BKE hem de KP elektrot ile yapıldı. Sefepim içeren serum çözeltileri için yapılan çalışmalarda, her ölçüm öncesinde her iki elektrotun yüzeyi Bölüm 5.4.1'de anlatıldığı şekilde temizlendikten sonra her bir yöntem için seçilen tampon çözeltisiyle hazırlanmış 1.0×10^{-6} M destek serum çözeltisi ile DV yöntemi kullanılarak dört döngülü tarama yapıldı ve elektrot yüzeyleri aktifleştirildi.

Serum kalibrasyon çalışmasında öncelikle, Bölüm 5.4.4'deki kalibrasyon çalışmalarında belirlenen doğrusallık aralıkları dikkate alınarak artan konsantrasyonda sefepim içeren serum çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden BKE elektrot ile DPV ve KDV; KP elektrot ile DPSV ve KDSV yöntemleri kullanılarak ölçümler alındı. Sefepim konsantrasyonuna karşı okunan pik akım değerleri grafiğe geçirilerek serum kalibrasyon grafikleri elde edildi.

BKE elektrot kullanılarak elde edilen gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik verileri için pH 2.0 BRT içerisinde DPV için 6.0×10^{-6} M ve KDV için 6.0×10^{-5} M sefepim içeren serum çalışma çözeltileri hazırlandı. KP elektrot ile yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde ise, DPSV için pH 5.0 FT içerisinde ve KDSV için pH 10.0 BRT içerisinde 2.0×10^{-6} M sefepim içeren serum çalışma çözeltileri hazırlandı.

Serum çalışma çözeltileri ile yapılan geri kazanım çalışmasında, DPV için 8.0×10^{-6} M; KDV için 8.0×10^{-5} M; DPSV ve KDSV için 4.0×10^{-6} M çalışma çözeltileri

hazırlandı. Çalışma çözeltilerinin yüksek hassasiyette hazırlanması amacıyla 1.0×10^{-3} M sefepim içeren serum ana stok ve 1.0×10^{-4} M sefepim içeren serum ara stok çözeltisi hazırlandı. Ayrıca aynı konsantrasyonlarda, serum içermeyen saf sefepim ana ve ara stok çözeltileri de hazırlandı. 1.0×10^{-4} M'lık ara stok çözeltiler, ana stok çözeltiden 1.0 mL alınıp hacmin ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

BKE elektrot ile yapılan geri kazanım çalışmalarında, konsantrasyonu 8.0×10^{-6} M olan serum çalışma çözeltisi için, bir deney tüpüne 1.0×10^{-4} M sefepim içeren serum ara stok çözeltisinden 0.6 mL konuldu, daha sonra üzerine konsantrasyonu 1.0×10^{-4} M olan saf sefepim ara stok çözeltisinden 0.2 mL eklendi ve pH 2.0 BRT ile 10 mL'ye tamamlandı. Konsantrasyonu 8.0×10^{-5} M olan çalışma çözeltisi için şu adımlar izlendi: Öncelikle 1.0×10^{-3} M sefepim içeren serum ana stok çözeltisinden 0.6 mL alındı ve bir deney tüpüne aktarıldı, daha sonra üzerine konsantrasyonu 1.0×10^{-3} M olan saf sefepim ana stok çözeltisinden 0.2 mL eklendi ve pH 2.0 BRT ile 10 mL'ye tamamlandı.

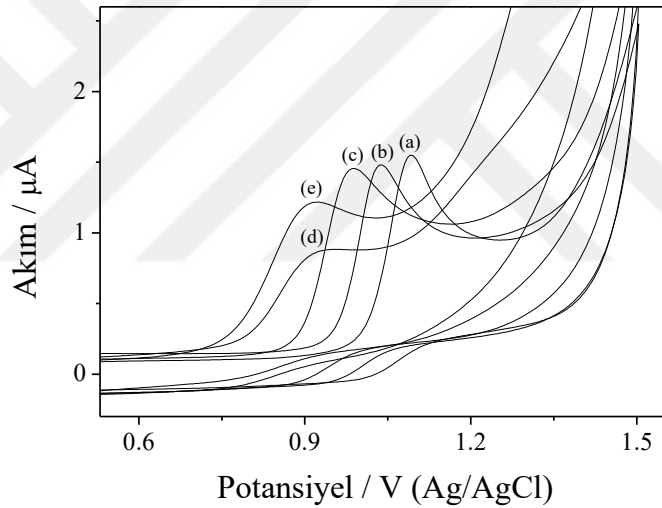
KP elektrot ile DPSV ve KDSV yöntemleri kullanılarak yapılan geri kazanım çalışmalarında, 4.0×10^{-6} M'lık serum çalışma çözeltisi kullanıldı. Bunun için öncelikle, 0.2 mL 1.0×10^{-4} M sefepim içeren serum ara stok çözeltisi ile 0.2 mL 1.0×10^{-4} M saf sefepim ara stok çözeltisi karıştırıldı ve hazırlanan bu karışım, DPSV çalışmalarında kullanılmak üzere pH 5.0 FT ile ve KDSV çalışmalarında kullanılmak üzere pH 10.0 BRT ile 10 mL'ye tamamlandı. Her bir yöntem için üçer adet serum çalışma çözeltisi hazırlandı ve belirtilen yöntemler ile yapılan taramalar sonucu elde edilen voltamogramların sefepim pik akım değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve yüzde bağıl standart sapmaları (Eşitlik 7) beş değer üzerinden hesaplandı. Geri kazanım değerleri yüzde geri kazanım olarak verildi.

6. BULGULAR

6.1. Bor-Katkılı Elmas Elektrot ile Elde Edilen Bulgular

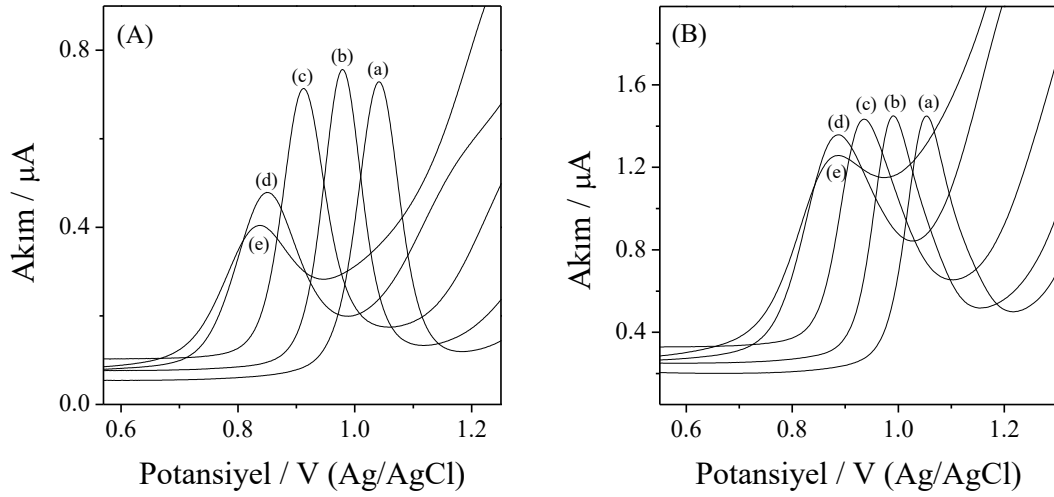
6.1.1. Destek Elektrolit Seçimi ve pH Etkisi

Bor-katkılı elmas elektrot kullanılarak sefepimin elektrokimyasal analiz çalışması için en uygun destek elektrolitin ve pH'nın belirlenmesi amacıyla pH taraması yapıldı. Bunun için, pH'sı 2.0 ile 11.0 arasında değişen 0.04 M BRT, 2.0 ile 5.0 arasında değişen 0.2 M FT, 6.0 ile 8.0 arasında değişen 0.1 M FT ve 3.5 ile 5.5 arasında değişen 1.0 M AT içerisinde 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin her birinin DV, DPV ve KDV yöntemleri ile voltamogramları elde edildi. Şekil 11'de bazı tamponlar içerisindeki sefepim etkin maddesinin döngülü voltamogramları gösterildi.



Şekil 11. (a) pH 2.0 BRT, (b) pH 3.0 FT, (c) pH 4.5 AT, (d) pH 7.0 FT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s^{-1}

Şekil 11'de görüldüğü gibi, farklı tamponlar içerisindeki sefepim etkin maddesi, BKE elektrot üzerinde yalnızca yükseltgenme yönünde pik verdi, indirgenme yönünde herhangi bir pik görülmedi. DPV ve KDV yöntemleri ile yapılan pH taraması için elde edilen voltamogramlar Şekil 12'de verildi.



Şekil 12. (a) pH 2.0 BRT, (b) pH 3.0 FT, (c) pH 4.5 AT, (d) pH 7.0 FT ve (e) pH 9.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin (A) diferansiyel puls ve (B) kare dalga voltamogramları

Konsantrasyonu 6.0×10^{-5} M olan sefepim çözeltilerinden elde edilen yükseltgenme pik potansiyellerinin tampon pH'sına karşı değişimi Şekil 13'te gösterildi. Sefepim pik potansiyellerine karşı pH grafiklerinde, belli bir pH'ya kadar pik potansiyellerinde doğrusal bir azalma görüldü, daha sonra doğrusallık sona erdi ve pH değiştikçe hemen hemen sabit kaldı. Bu iki bölgenin kesişme noktası ya da kırılma noktası DV, DPV ve KDV'de pH 5.0'da gözlemlendi. pH 9.0'dan sonra sefepim için herhangi bir pik gözlemlenmedi. Eşitlik 8-10'da, pH 2.0 ile 5.0 arasında sefepimin pik potansiyeline (E_p) karşı pH grafiklerinin doğrusallık denklemleri verilmiştir.

DV yöntemi için;

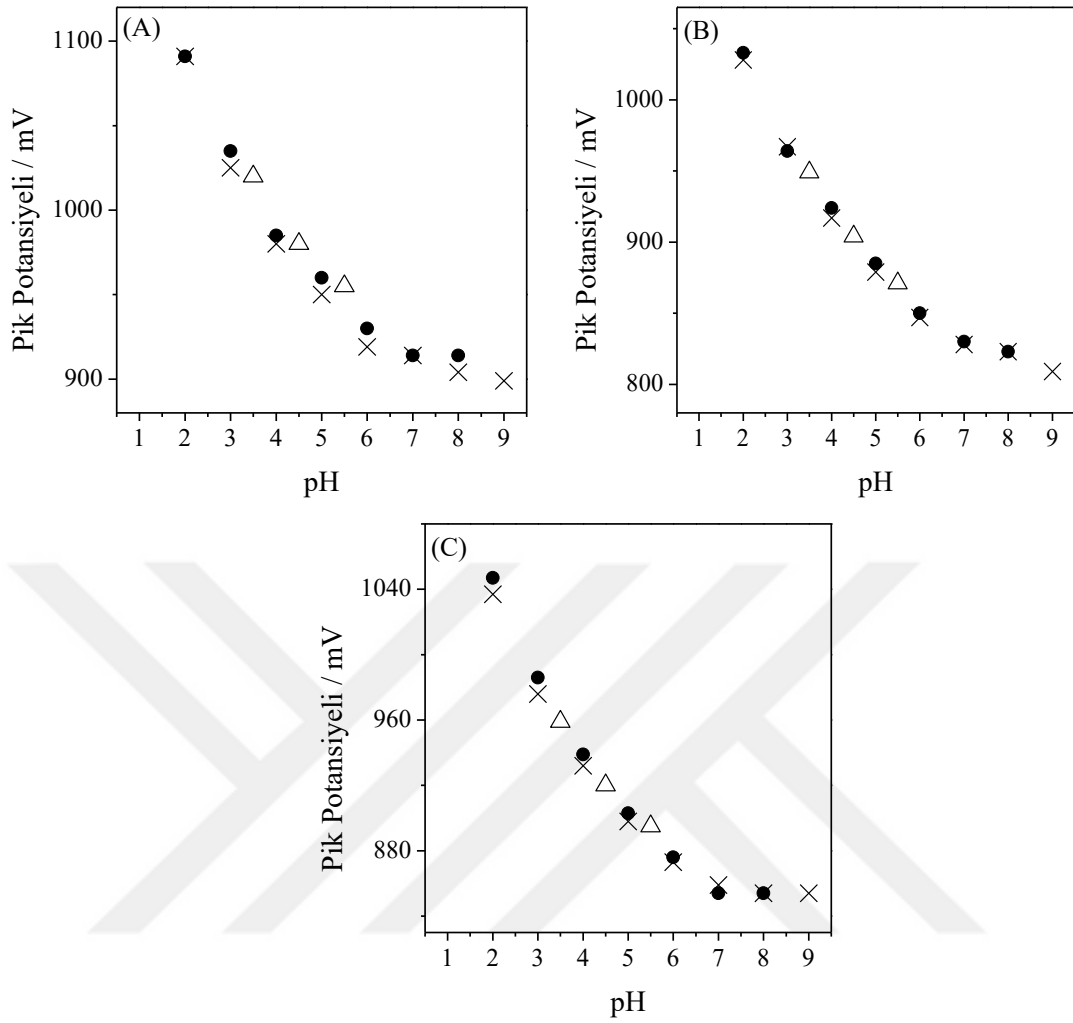
$$E_p \text{ (mV)} = 1170.4 - 42.6 \text{ pH} \text{ (} r = 0.990 \text{)} \quad (8)$$

DPV yöntemi için;

$$E_p \text{ (mV)} = 1119.6 - 48.5 \text{ pH} \text{ (} r = 0.993 \text{)} \quad (9)$$

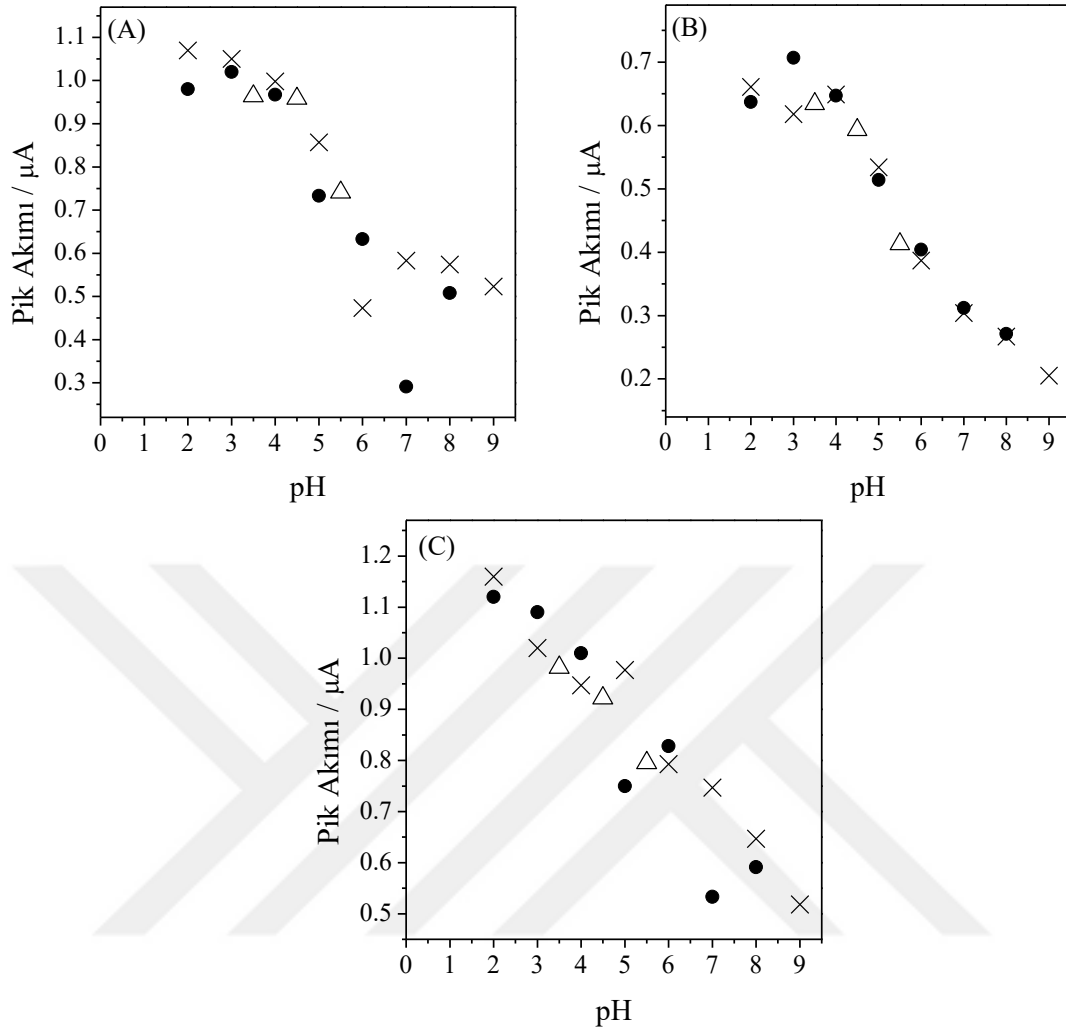
KDV yöntemi için;

$$E_p \text{ (mV)} = 1142.1 - 46.3 \text{ pH} \text{ (} r = 0.993 \text{)} \quad (10)$$



Şekil 13. (A) DV, (B) DPV ve (C) KDV yöntemleri ile FT, AT ve BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin pH'ya karşı pik potansiyel grafikleri. ×: BRT, Δ: AT, ●: FT

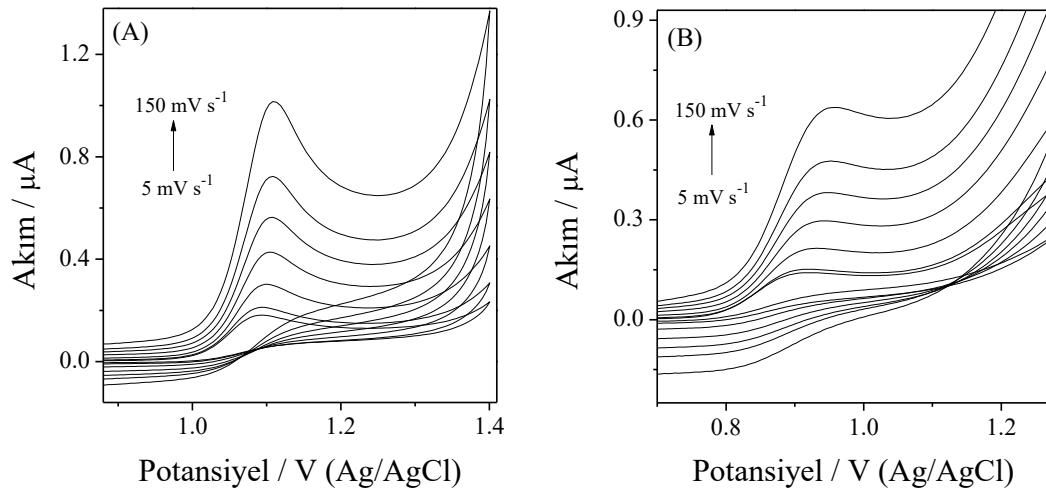
Sefepimin voltametrik analizi için en uygun pH'daki tampon ortamı belirlenirken DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak yapılan pH taramasında elde edilen sefepim piklerinin pik akım değerlerine ve piklerin simetrisine bakıldı. Her bir yöntem için pik akımları Şekil 14'te gösterildiği gibi pH'ya karşı grafiğe geçirildi. Akım değerleri pH 2.0 ile 9.0 arasında okundu. Kullanılan tüm yöntemlere göre elde edilen sefepim pikleri değerlendirildi ve en yüksek pik akımına sahip en simetrik sefepim piklerinin, pH 2.0 BRT ortamında elde edildiği görüldü.



Şekil 14. (A) DV, (B) DPV ve (C) KDV yöntemleri ile FT, AT ve BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin pH'ya karşı pik akım grafikleri. x: BRT, Δ : AT, $\bullet$: FT

6.1.2. Hız Taraması

Hız taraması çalışması sefepimin yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü mü adsorpsiyon kontrollü mü olduğunu tespit edebilmek amacıyla yapıldı. pH taramasında belirlenen tampon ve pH'nın yanı sıra farklı pH'larda ve konsantrasyonlarda sefepim çözeltileri hazırlandı. pH 2.0 ve pH 7.0 BRT içerisinde 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltileri hazırlandıktan sonra bu çözeltilerde 150 mV s^{-1} 'den 5 mV s^{-1} 'e değişen tarama hızlarında tek döngülü DV taraması yapıldı. Şekil 15A'da pH 2.0 BRT içerisindeki ve Şekil 15B'de pH 7.0 içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin hız taraması döngülü voltamogramları gösterildi.

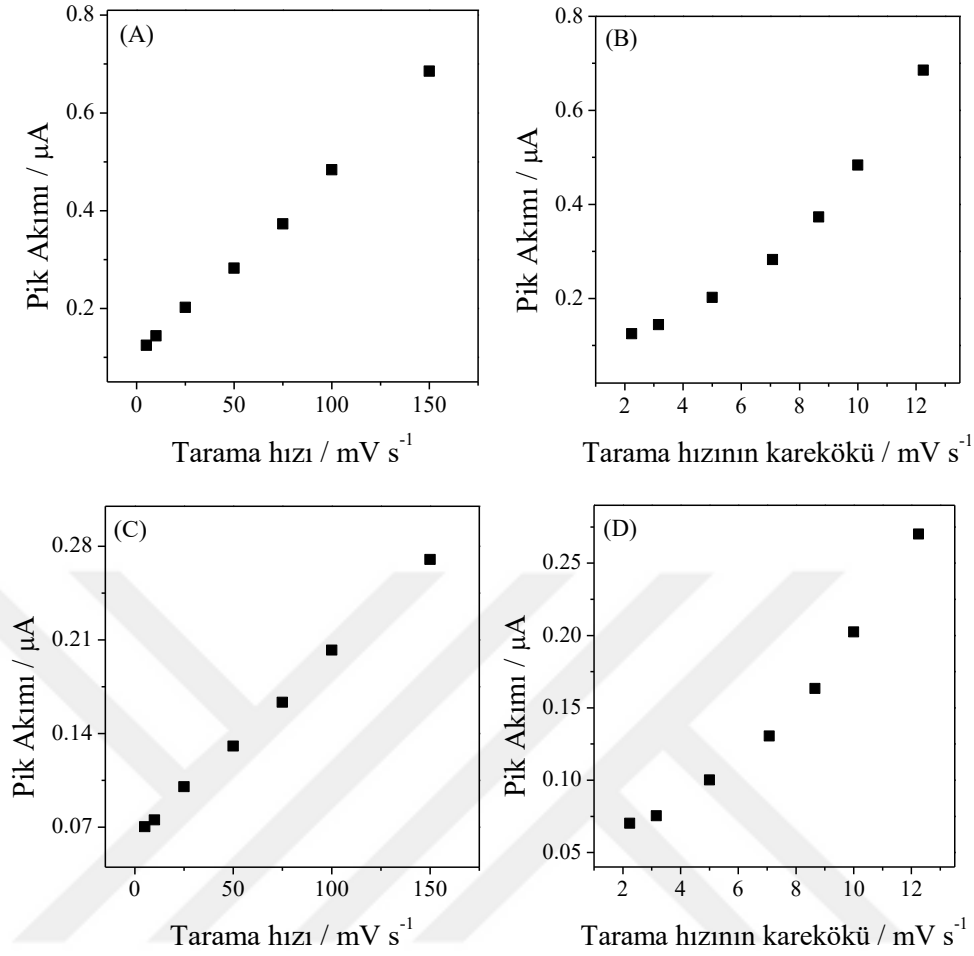


Şekil 15. Tek döngülü DV ile yapılan (A) pH 2.0 BRT ve (B) pH 7.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin hız taraması voltamogramları

Hazırlanan iki farklı sefepim çözeltisi için her bir tarama hızına karşı elde edilen sefepim yükseltgenme pikinin akım değerleri okundu. Her iki çözelti için tarama hızına (v) karşı (Şekil 16A, 16C) ve tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) (Şekil 16B, 16D) karşı sefepim pik akım değerleri (I_p) grafiğe geçirildi. Şekil 16A ve 16C'deki I_p - v grafikleri doğrusal bir değişim gösterdi ve doğrusallık denklemleri Eşitlik 11 ve 12'de verildi. Sefepim çözeltilerinden elde edilen hız taraması sonuçları incelenerek reaksiyonun adsorpsiyon ya da difüzyon kontrollü olduğu belirlendi.

$$I_p (\mu A) = 0.0038 v (mV s^{-1}) + 0.10 (r = 0.998) \quad (11)$$

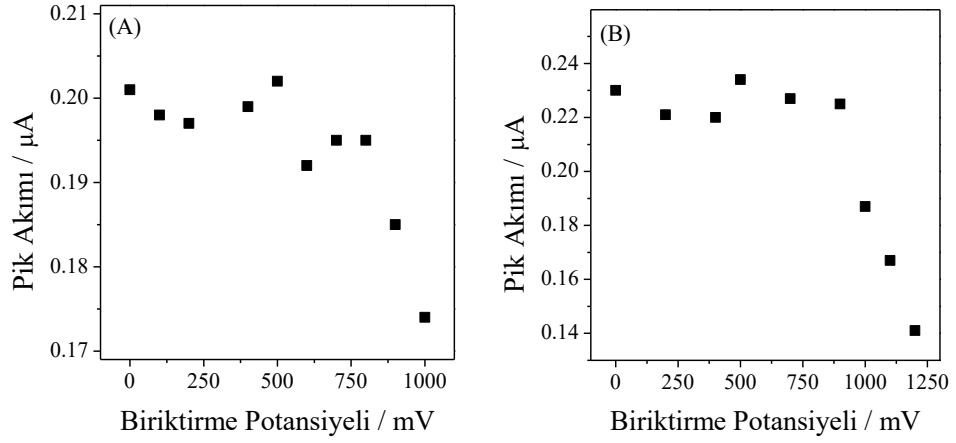
$$I_p (\mu A) = 0.0014 v (mV s^{-1}) + 0.06 (r = 0.999) \quad (12)$$



Şekil 16. (A ve B) pH 2.0 BRT ve (C ve D) pH 7.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin DV ile elde edilen (A ve C) tarama hızına ve (B ve D) tarama hızının kareköküne karşı pik akımı grafikleri

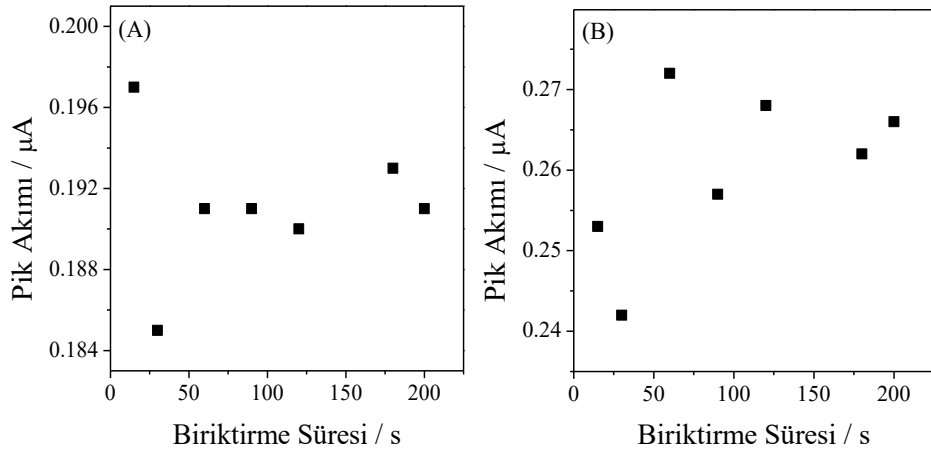
6.1.3. Sıyırma Optimizasyonu

Sefepimin pH 2.0 BRT içerisinde diferansiyel puls sıyırma voltametri (DPSV) ve kare dalga sıyırma voltametri (KDSV) yöntemleri kullanılarak yapılan kantitatif analiz çalışmaları için sıyırma parametreleri optimize edildi. Bunun için pH 2.0 BRT içerisinde 1.0×10^{-5} M sefepim çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltide öncelikle biriktirme süresi 60 s'de sabit tutularak biriktirme potansiyeli değiştirildi ve en yüksek pik akımını veren potansiyel belirlendi. Bu potansiyelin, yapılan tekrar çalışmalarında değişmediğinden emin olmak amacıyla aynı deney her iki yöntem için ikişer kez tekrarlandı. Şekil 17A'da DPSV için ve Şekil 17B'de KDSV için biriktirme potansiyeline karşı pik akım grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 17. pH 2.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M sefepimin (A) DPSV ve (B) KDSV yöntemleri ile elde edilen biriktirme potansiyeline karşı pik akımı grafikleri

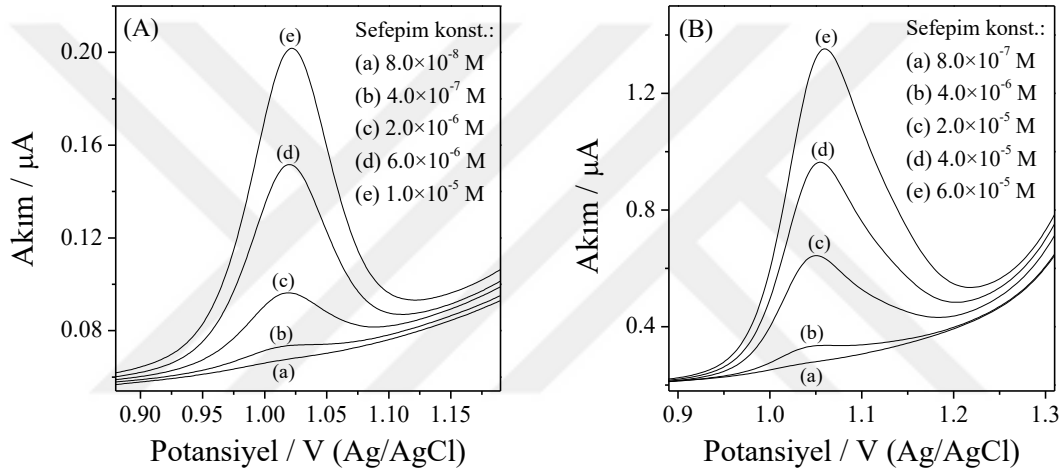
Şekil 17'deki biriktirme potansiyeli grafiklerinden, en yüksek pik akımını veren en ideal biriktirme potansiyeli +0.5 V olarak seçildi ve bu potansiyel sabit tutularak biriktirme süresi değiştirildi. Şekil 18A'da DPSV için ve Şekil 18B'de KDSV için biriktirme süresine karşı pik akım grafikleri verilmiştir. Her iki yöntem için biriktirme süresi ile orantılı şekilde artan pik akım değerleri elde edilemedi. Deneyler her iki yöntem için tekrarlandı ve yine biriktirme süresine göre düzensiz olarak değişen pik akım değerleri elde edildi. Bu nedenle biriktirme parametreleri optimize edilemedi ve daha sonraki miktar tayini çalışmalarında BKE elektrot için sıyırma yöntemlerinin kullanılmamasına karar verildi.



Şekil 18. pH 2.0 BRT içerisindeki 1.0×10^{-5} M sefepimin (A) DPSV ve (B) KDSV yöntemleri ile elde edilen biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri

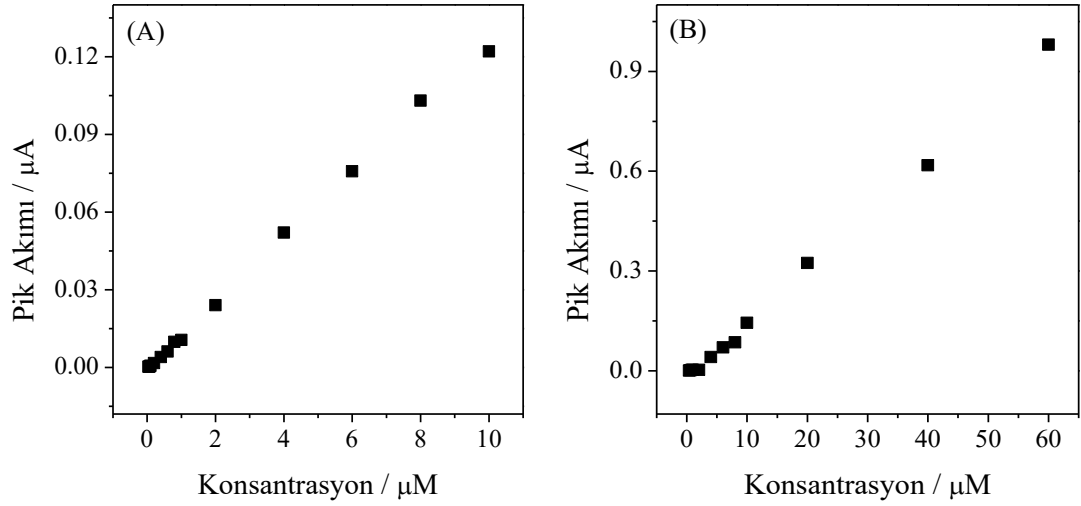
6.1.4. Kalibrasyon Çalışması

Sefepimin kantitatif analizinin DPV ve KDV yöntemleri ile yapılması kararlaştırıldıktan sonra kalibrasyon çalışmasına geçildi. Kalibrasyon deneyleri pH 2.0 BRT içerisinde hazırlanan 2.0×10^{-8} ile 1.0×10^{-4} M sefepim konsantrasyon aralığındaki yirmi farklı çözelti ile yapıldı. Elde edilen verilere göre, pik akım değeri okunabilen ilk sefepim piki DPV için 4.0×10^{-8} M’da ve KDV için 4.0×10^{-7} M’da gözlemlendi. Şekil 19’da DPV ve KDV yöntemleri ile yapılan kalibrasyon çalışması için sefepim konsantrasyonundaki artış ile sefepim pikinin değişimi görülmektedir.



Şekil 19. (A) DPV ve (B) KDV yöntemleri ile pH 2.0 BRT içerisindeki sefepim çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar

DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak elde edilen voltamogramlardaki sefepim pik akım değerleri okundu ve sefepim konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. Her iki yöntem için çizilen grafiklerden doğrusallığın görüldüğü konsantrasyon aralığı belirlendi (Şekil 20). Çizilen doğrusal kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler Tablo 1’de verilmiştir.



Şekil 20. (A) DPV ve (B) KDV yöntemleri ile elde edilen pH 2.0 BRT içerisindeki sefepim konsantrasyonuna karşı pik akım grafikleri

Tablo 1. BKE elektrot kullanılarak sefepimin DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV	KDV
Pik potansiyeli (mV)	1020	1050
Doğrusallık aralığı (μM)	0.04 – 10	0.4 – 60
Eğim (μA μM ⁻¹)	$1.26 \times 10^{-2} \pm 1.29 \times 10^{-4}$	$1.29 \times 10^{-2} \pm 9.06 \times 10^{-5}$
Kesim noktası (μA)	$-1.03 \times 10^{-3} \pm 3.44 \times 10^{-4}$	$-1.04 \times 10^{-3} \pm 3.30 \times 10^{-4}$
Korelasyon katsayısı, r	0.999	0.998
Teşhis sınırı, TS (μM)	1.58×10^{-3}	1.10×10^{-2}
Tayin alt sınırı, TAS (μM)	4.78×10^{-3}	3.34×10^{-2}

Kullanılan yöntemlerin kesinliğini test etmek amacıyla pH 2.0 BRT içerisinde hazırlanan, DPV için 8.0×10^{-6} ve 1.0×10^{-5} M; KDV için 8.0×10^{-6} ve 4.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinde gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneyleri yapıldı. Her bir konsantrasyon için hazırlanan üçer sefepim çözeltisinden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %BSS'leri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 2 ve 3'te gösterilmektedir.

Tablo 2. BKE elektrot kullanılarak pH 2.0 BRT içindeki sefepim çözeltilerinden DPV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>$8.0 \times 10^{-6} \text{ M}$</u>		<u>$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$</u>	
		Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası
Pik potansiyeli	Veriler (mV)	1021	1021	1016	1018
		1021	1021	1017	1017
		1020	1020	1018	1020
		1021	1018	1016	1021
		1018	1018	1018	1018
	Ortalama (mV)	1020.2	1019.6	1017.0	1018.8
	Standart sapma	1.30	1.52	1.00	1.64
	%BSS*	0.13	0.15	0.10	0.16
	Veriler (μA)	0.0836	0.0793	0.1090	0.1041
		0.0833	0.0817	0.1094	0.1036
Pik akımı		0.0830	0.0796	0.1078	0.1021
		0.0832	0.0787	0.1098	0.1027
		0.0827	0.0780	0.1081	0.1038
	Ortalama (μA)	0.0832	0.0795	0.1088	0.1033
	Standart sapma	3.3×10^{-4}	1.4×10^{-3}	8.2×10^{-4}	8.3×10^{-4}
	%BSS*	0.40	1.76	0.75	0.80

* Yüzde bağıl standart sapma

Tablo 3. BKE elektrot kullanılarak pH 2.0 BRT içindeki sefepim çözeltilerinden KDV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		$8.0 \times 10^{-6} \text{ M}$		$4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	
		Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası
Pik potansiyeli	Veriler (mV)	1038	1035	1044	1044
		1037	1037	1047	1042
		1037	1039	1044	1047
		1035	1035	1044	1049
		1039	1049	1044	1042
	Ortalama (mV)	1037.2	1037.0	1044.6	1044.8
	Standart sapma	1.48	2.00	1.34	3.11
	%BSS*	0.14	0.19	0.13	0.30
	Veriler (μA)	0.070	0.067	0.454	0.455
		0.070	0.066	0.453	0.454
Pik akımı		0.069	0.067	0.455	0.457
		0.071	0.065	0.454	0.456
		0.070	0.064	0.459	0.446
	Ortalama (μA)	0.070	0.066	0.455	0.454
	Standart sapma	5.1×10^{-4}	1.1×10^{-3}	2.4×10^{-3}	4.4×10^{-3}
	%BSS*	0.73	1.67	0.53	0.97

* Yüzde bağıl standart sapma

6.1.5. Farmasötiklerden Tayin ve Geri Kazanım Çalışması

Kullanılan DPV ve KDV yöntemlerinin doğruluğunu test etmek amacıyla, sefepimin farmasötiklerden tayini ve geri kazanım çalışması yapıldı. Öncelikle, farmasötiklerden tayin çalışması için flakon sefepim kullanılarak pH 2.0 BRT içerisinde DPV için $8.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ve KDV için $4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ sefepim içeren üçer adet çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerden elde edilen voltamogramlardan sefepimin pik potansiyeli ve pik akım değerleri okundu. Pik akım değerleri kullanılarak, hesaplanan sefepim miktarı ile sefepimin flakon formunda bildirilen sefepim miktarı karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. BKE elektrot kullanılarak DPV için 8.0×10^{-6} M ve KDV için 4.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinden elde edilen farmasötiklerden tayin çalışması verileri

	DPV	KDV
Flakonda beyan edilen sefepim miktarı (g)	1.000	1.000
Bulunan sefepim miktarları (g)	1.022	1.023
	1.006	1.027
	1.011	1.033
	1.012	1.038
	1.008	1.044
Bulunan ortalama sefepim miktarı (g)	1.012	1.033
Standart sapma	0.006	0.008
%BSS*	0.59	0.77
% Bağlı hata	1.2	3.3
<i>t</i> -testi	0.002	
<i>F</i> -testi	0.567	

* Yüzde bağlı standart sapma
Teorik olarak *t* -testi: 2.31 ve *F*-testi: 6.39

Farmasötiklerden tayin çalışmasını takiben yapılan geri kazanım çalışmasında, DPV yöntemi için sefepimin flakon formundan hazırlanan 8.0×10^{-6} M sefepim çözeltisinin üzerine toplam sefepim konsantrasyonu 1.0×10^{-5} M olacak şekilde saf sefepim çözeltisi; KDV yöntemi için ise flakon formundan hazırlanan 4.0×10^{-5} M sefepim çözeltisinin üzerine toplam sefepim konsantrasyonu 6.0×10^{-5} M olacak şekilde saf sefepim çözeltisi ilave edilerek üçer adet çözelti hazırlandı ve her iki yöntem ile elde edilen voltamogramlardan pik akım değerleri okundu. Elde edilen pik akım değerlerinden beşer adet seçilerek DPV ve KDV için %BSS ve yüzde geri kazanım değerleri hesaplandı (Tablo 5).

Tablo 5. BKE elektrot kullanılarak DPV için 1.0×10^{-5} M ve KDV için 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

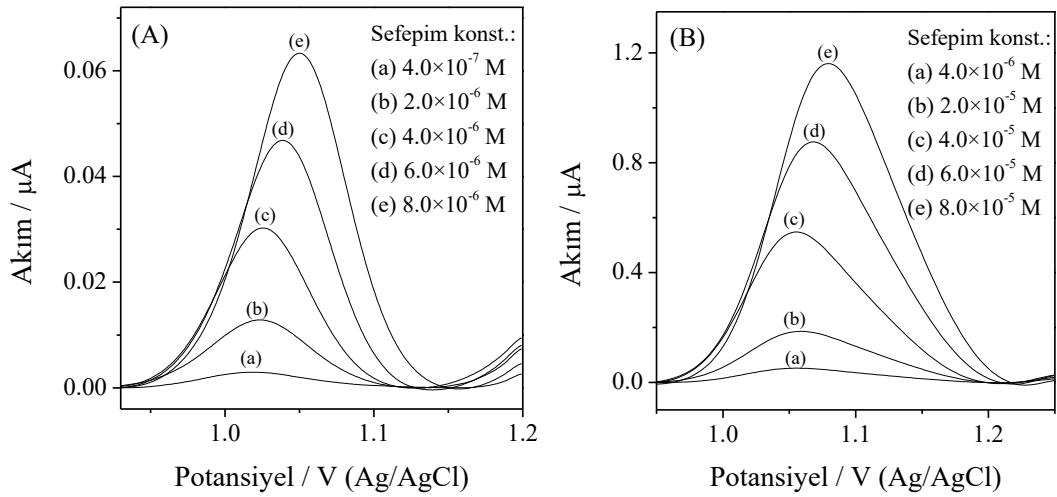
	DPV	KDV
İlave edilen sefepim miktarı (g)	1.107×10^{-5}	1.107×10^{-4}
Bulunan sefepim miktarı (g)	1.118×10^{-5}	1.124×10^{-4}
	1.112×10^{-5}	1.119×10^{-4}
	1.118×10^{-5}	1.136×10^{-4}
	1.103×10^{-5}	1.136×10^{-4}
	1.103×10^{-5}	1.135×10^{-4}
Geri kazanım		
Bulunan ortalama sefepim miktarı (g)	1.111×10^{-5}	1.130×10^{-4}
Ortalama geri kazanım (%)	100.37	102.07
Standart sapma	0.70	0.72
% BSS*	0.70	0.71
% Bağıl hata	0.36	2.08

* Yüzde bağıl standart sapma

6.1.6. Serum Çalışması

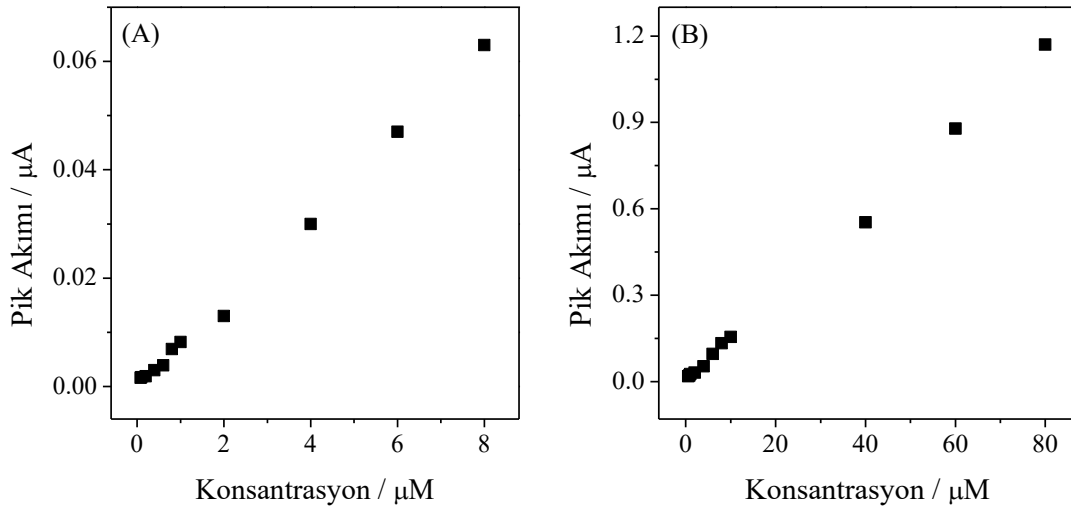
Sefepimin kalitatif ve kantitatif analiz çalışmaları sonucu elde edilen verilerin insan serumu kullanılarak yapılacak kantitatif analiz çalışmaları için Bölüm 5.1.2’de belirtilen şekilde serum çözeltileri hazırlandı ve Bölüm 6.1.4’te açıklandığı şekilde DPV ve KDV yöntemleri ile tayinler gerçekleştirildi. Saf sefepim için yapılan kalibrasyon çalışmalarında olduğu gibi sefepim içeren serum analizlerinde de destek elektrolit olarak pH 2.0 BRT çözeltisi kullanıldı.

Kalibrasyon deneyleri için, serum içermeyen sefepim çözeltilerinin Tablo 1’de belirtilen doğrusallık aralığı konsantrasyon verileri dikkate alınarak, DPV için 2.0×10^{-8} ile 2.0×10^{-5} M ve KDV için 2.0×10^{-7} ile 8.0×10^{-5} M aralığında pH 2.0 BRT içerisinde on altı farklı konsantrasyonda serum çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden elde edilen voltamogramlara göre pik akım değeri okunabilen en düşük konsantrasyon DPV için 8.0×10^{-8} M ve KDV için 6.0×10^{-7} M olarak bulundu. DPV ve KDV yöntemleriyle elde edilen sefepim pikleri Şekil 21’de gösterilmiştir.



Şekil 21. (A) DPV ve (B) KDV yöntemleri ile pH 2.0 BRT içerisindeki sefepim içeren serum çözeltilerinden temel çizgi düzeltmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar

Elde edilen DPV ve KDV voltamogramlarındaki pik akım değerleri okunarak konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi (Şekil 22). Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler Tablo 6’da gösterilmektedir.



Şekil 22. (A) DPV ve (B) KDV yöntemleri ile elde edilen pH 2.0 BRT içerisindeki sefepim içeren serum konsantrasyonuna karşı pik akım grafikleri

Tablo 6. BKE elektrot kullanılarak sefepim içeren serum çözeltilerinden pH 2.0 BRT içinde DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon verileri

	DPV	KDV
Pik potansiyeli (mV)	1030	1070
Doğrusallık aralığı (μM)	0.08 – 8	0.6 – 80
Eğim (μA μM ⁻¹)	$7.77 \times 10^{-3} \pm 9.17 \times 10^{-5}$	$1.44 \times 10^{-2} \pm 1.69 \times 10^{-4}$
Kesim noktası (μA)	$1.46 \times 10^{-4} \pm 4.75 \times 10^{-6}$	$6.30 \times 10^{-3} \pm 5.10 \times 10^{-4}$
Korelasyon katsayısı, r	0.997	0.999
Teşhis sınırı, TS (μM)	2.45×10^{-2}	0.13
Tayin alt sınırı, TAS (μM)	7.43×10^{-2}	0.40

Tekrar edilebilirlik deneylerinde pH 2.0 BRT içerisinde hazırlanan DPV için 6.0×10^{-6} M ve KDV için 6.0×10^{-5} M sefepim içeren serum çalışma çözeltileri kullanıldı. Her iki yöntem için hazırlanan üçer çözeltiden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin gün içi ve günler arası %BSS'leri hesaplandı. Veriler ve sonuçlar Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 7. BKE elektrot kullanılarak DPV için 6.0×10^{-6} M ve KDV için 6.0×10^{-5} M sefepim içeren serum çözeltilerinden elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		DPV		KDV	
		Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası
Pik potansiyeli	Veriler (mV)	1035	1034	1066	1066
		1033	1031	1071	1069
		1034	1028	1074	1069
		1034	1034	1071	1074
		1030	1038	1069	1074
	Ortalama (mV)	1033.2	1033.0	1070.2	1070.4
	Standart sapma	1.92	3.74	2.64	3.51
	%BSS*	0.19	0.36	0.25	0.33
	Veriler (μ A)	0.0479	0.0480	0.886	0.893
		0.0472	0.0474	0.893	0.883
Pik akımı		0.0477	0.0481	0.895	0.885
		0.0478	0.0472	0.883	0.910
		0.0482	0.0482	0.881	0.873
	Ortalama (μ A)	0.0478	0.0478	0.888	0.889
	Standart sapma	3.6×10^{-4}	4.5×10^{-4}	6.1×10^{-3}	13.8×10^{-3}
	%BSS*	0.76	0.94	0.69	1.55

* Yüzde bağıl standart sapma

Geri kazanım çalışması için, sefepim içeren serum stok çözeltisi ve saf sefepim çözeltisi kullanılarak Bölüm 5.4.7’de açıklandığı gibi hazırlanan, DPV için 8.0×10^{-6} M ve KDV için 8.0×10^{-5} M çalışma çözeltileri kullanıldı. Hem DPV hem de KDV yöntemleri için pH 2.0 BRT içerisinde üçer adet çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen voltamogramlardan bulunan veriler Tablo 8’de gösterilmektedir.

Tablo 8. BKE elektrot kullanılarak DPV için 8.0×10^{-6} M ve KDV için 8.0×10^{-5} M sefepim içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

	DPV	KDV
İlave edilen saf sefepim konsantrasyonu (μM)	2.000	20.00
Bulunan saf sefepim konsantrasyonu (μM)	1.994	20.08
	2.001	19.83
	2.014	20.20
	1.985	20.11
	2.010	19.99
Geri kazanım		
Bulunan ortalama saf sefepim konsantrasyonu (μM)	2.001	20.04
Ortalama geri kazanım (%)	100.03	100.21
Standart sapma	0.59	0.69
% BSS*	0.59	0.69
% Bağlı hata	0.05	0.20

* Yüzde bağlı standart sapma

6.2. Karbon Pasta Elektrot ile Elde Edilen Bulgular

6.2.1. Karbon Pasta Elektrot Bileşimi Optimizasyonu

Karbon pasta elektrot ile gerçekleştirilecek elektrokimyasal analiz çalışmaları öncesinde, sefepim analizi için en iyi mineral yağ-grafit tozu oranına sahip bileşim belirlendi. Bu amaçla, pH 3.0 FT, pH 3.0 BRT ve pH 4.5 AT çözeltileri içerisinde 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak Bölüm 5.1.8’de açıklandığı gibi hazırlanan, farklı oranlarda pasta bileşimi içeren KP elektrotlar ile elde edilen DV, DPV ve KDV voltamogramları incelendi. %15 ve %20 mineral yağ oranı ile hazırlanan pasta bileşimleriyle yapılan deneylerde elektrotlarda bazı dökülmeler meydana geldi. Bu nedenle çalışmalara %25, %30, %35 ve %40 mineral yağ oranına sahip pasta bileşimleriyle devam edildi. DV, DPV ve KDV yöntemleri için çalışılan tüm tamponlarda elde edilen pik akım değerleri Tablo 9’da gösterilmektedir.

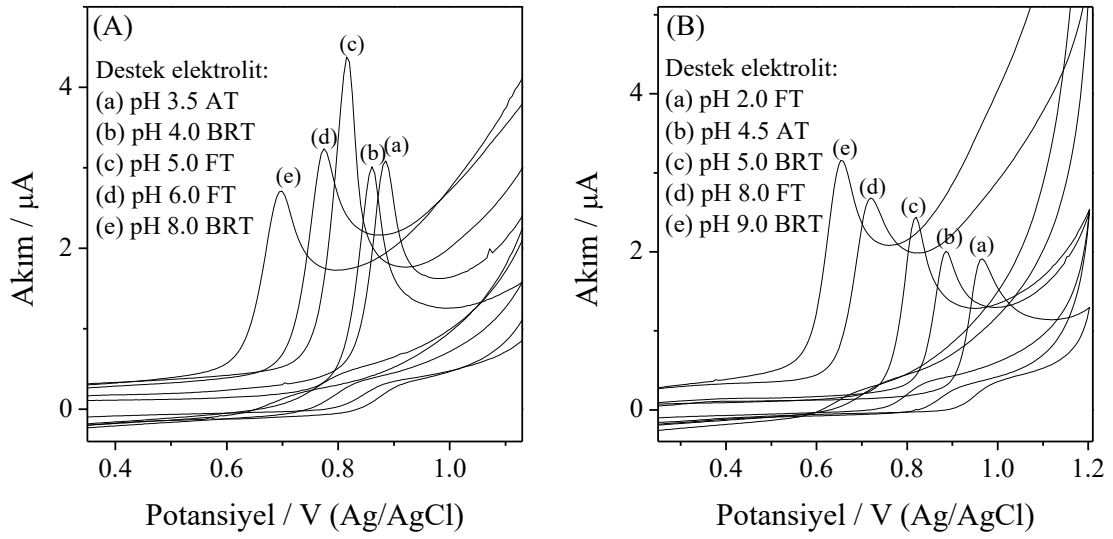
Elde edilen voltamogramların pik akım değerleri dikkate alınarak en uygun karbon pasta bileşimlerinin %25 ve %30 olabileceği görüldü. Her iki bileşim arasından en uygun olanına karar verebilmek için pH taraması çalışması hem %25 hem de %30’luk pasta oranları ile yapıldı.

Tablo 9. Farklı oranlardaki pasta bileşimleri kullanılarak, 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinden DV, DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen pik akım değerleri

		KP için mineral yağ oranı				
Tampon Çözeltiler		%25	%30	%35	%40	
Pik Akımı (μA)	DV	pH 3.0 FT	2.01	1.45	1.16	1.51
		pH 3.0 BRT	2.25	1.56	1.28	0.77
		pH 4.5 AT	2.57	1.71	1.08	1.18
	DPV	pH 3.0 FT	1.29	2.37	1.47	1.65
		pH 3.0 BRT	2.32	2.44	1.93	1.62
		pH 4.5 AT	2.90	2.91	1.76	1.29
	KDV	pH 3.0 FT	1.28	1.56	1.35	1.11
		pH 3.0 BRT	1.96	2.38	1.59	1.51
		pH 4.5 AT	2.25	1.91	1.14	1.33

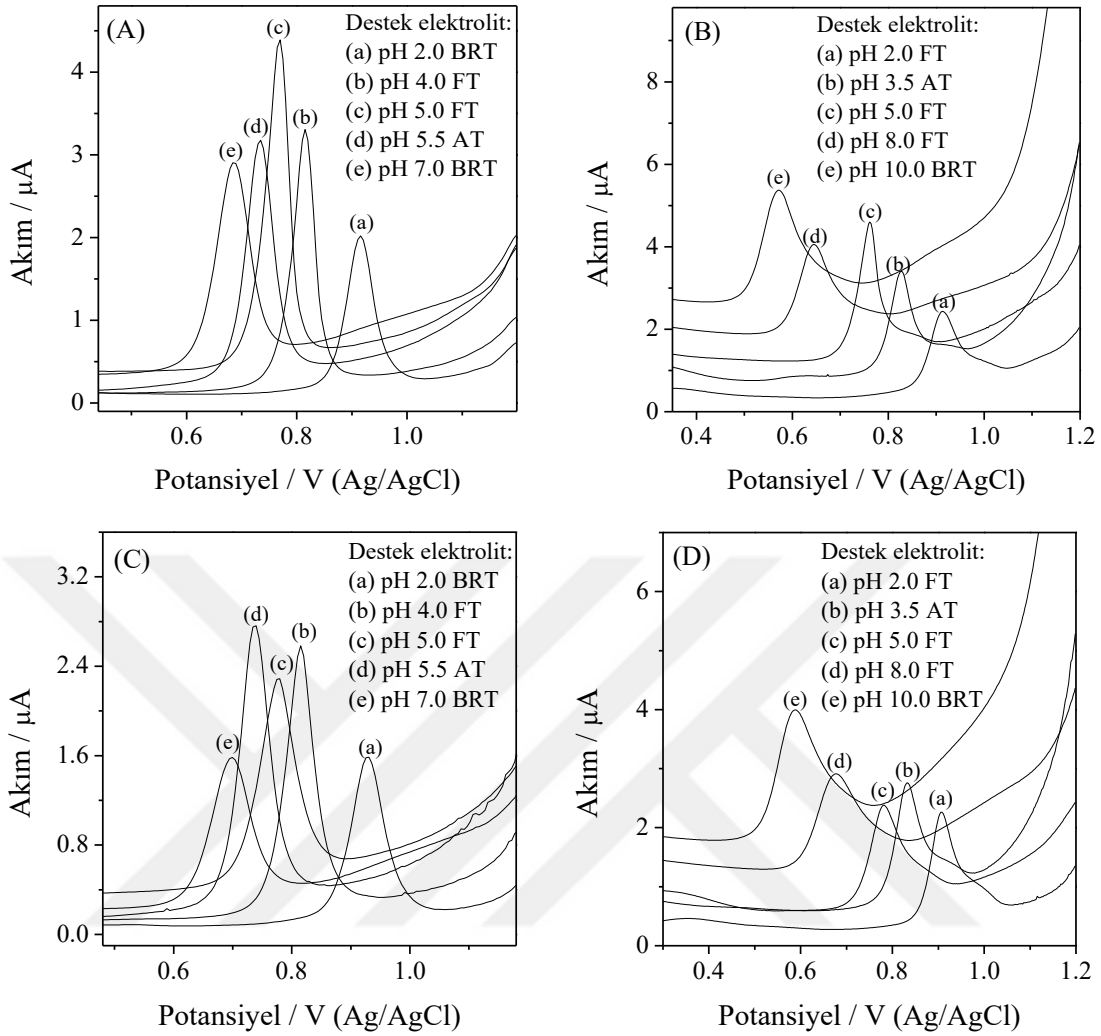
6.2.2. pH Taraması

Karbon pasta elektrot ile sefepimin elektrokimyasal analizi için en uygun destek elektroliti belirlemek amacıyla pH taraması yapıldı. Bunun için, pH'sı 2.0 ile 11.0 arasında değişen 0.04 M BRT, 2.0 ile 5.0 arasında değişen 0.2 M FT, 6.0 ile 8.0 arasında değişen 0.1 M FT ve 3.5 ile 5.5 arasında değişen 1.0 M AT içerisinde 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltileri hazırlandı. Öncelikle %25'lik KP elektrot kullanılarak bu çözeltilerin her birinin DV, DPV ve KDV yöntemleri ile voltamogramları elde edildi. Daha sonra %30'luk KP elektrot kullanılarak, aynı tamponlarda hazırlanan 6.0×10^{-5} M'lık sefepim çözeltilerinin DV, DPV ve KDV voltamogramları alındı. Şekil 23A'da %25'lik ve 23B'de %30'luk KP elektrot ile alınan bazı tamponlar içerisindeki sefepim etkin maddesinin döngülü voltamogramları gösterildi. Şekil 23'te görüldüğü gibi, farklı tamponlar içerisinde sefepim, KP elektrot üzerinde yalnızca yükseltgenme yönünde pik verdi, indirgenme yönünde herhangi bir pik görülmedi.



Şekil 23. (A) %25 ve (B) %30 pasta bileşimiyle elde edilen farklı tamponlardaki 6.0×10⁻⁵ M sefepimin döngülü voltamogramları. Tarama hızı 100 mV s⁻¹

pH taraması için ayrıca DPV ve KDV yöntemleri de kullanıldı. Böylece, her üç yöntem için hem %25 hem de %30'luk pasta bileşimine sahip elektrotlar ile elde edilen voltamogramlar değerlendirildi. Şekil 24'te %25 ve %30'luk KP elektrot ile pH taramasında elde edilen bazı tamponlar içerisindeki sefepim etkin maddesinin diferansiyel puls ve kare dalga voltamogramları gösterilmiştir.



Şekil 24. Farklı tampon ortamlarında 6.0×10^{-5} M sefepimin (A ve B) %25'lik ve (C ve D) %30'luk pasta bileşimiyle elde edilen (A ve C) diferansiyel puls ve (B ve D) kare dalga voltamogramları

Şekil 24'teki voltamogramlara göre, her iki pasta bileşimi için en yüksek pik akımına sahip en simetrik sefepim piki DPV yöntemi ile pH 5.0 FT ortamında gözlemlendi. KDV yöntemi ile de en yüksek pik akımı pH 5.0 FT ortamında elde edilmesine rağmen, bu pH'da sefepim pikinin omuzlanması nedeniyle pik akımı daha düşük olmasına rağmen en simetrik pik pH 10.0 BRT ortamında gözlemlendi.

DPV ve KDV yöntemleri için pH 5.0 FT ve pH 10.0 BRT ortamlarında %25 ve %30'luk pasta bileşimlerinden hangisiyle çalışmalara devam edileceğine karar verildi. Bunun için, sefepim çözeltilerinin DV, DPV ve KDV yöntemleriyle elde edilen voltamogramlarından, %25'lik pasta bileşimi ile sefepim için daha yüksek pik akım

değerlerinin elde edildiği görüldü. Sonuç olarak, sonraki çalışmalarda %25 mineral yağ - %75 grafit tozu içeren pasta bileşiminin kullanılmasına karar verildi.

%25'lik KP elektrot kullanılarak 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinden elde edilen yükseltgenme pik potansiyellerinin tampon pH'sına karşı değişimi Şekil 25'te gösterildi. Buna göre, pH 5.0'a kadar pH arttıkça pik potansiyellerinde doğrusal bir azalma görüldü. pH 5.0'dan sonra pik potansiyellerindeki azalma oranı düştü. Azalmanın daha yüksek olduğu pH aralığı ile daha az olduğu pH aralığının kesişim noktası ya da kırılma noktası DV, DPV ve KDV'de pH 5.0'da gözlemlendi. Eşitlik 13-15'de, pH 2.0 ile 5.0 arasında sefepimin pik potansiyeline (E_p) karşı pH grafiklerinin doğrusallık denklemleri görülmektedir.

DV yöntemi için;

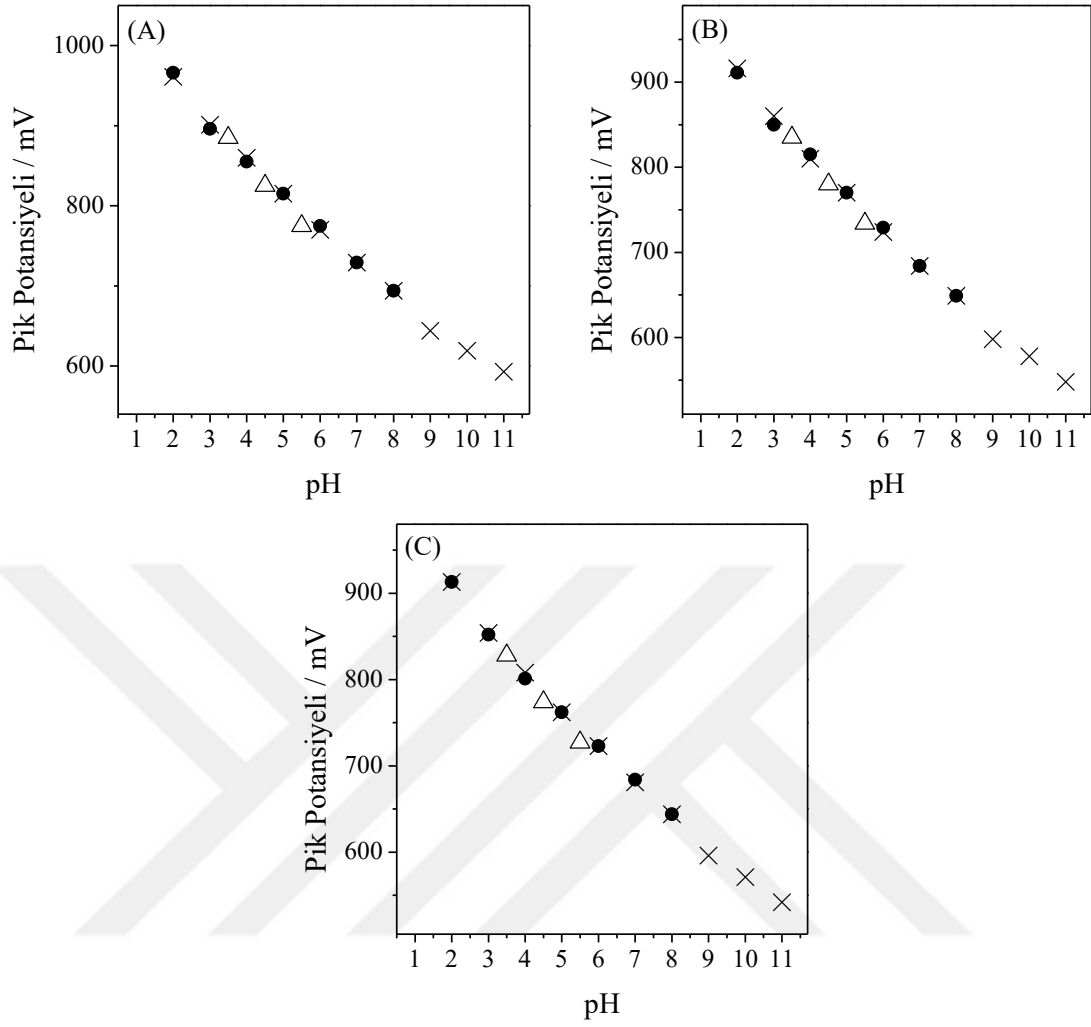
$$E_p \text{ (mV)} = 1052.8 - 48.4 \text{ pH (r = 0.991)} \quad (13)$$

DPV yöntemi için;

$$E_p \text{ (mV)} = 1006.3 - 48.7 \text{ pH (r = 0.992)} \quad (14)$$

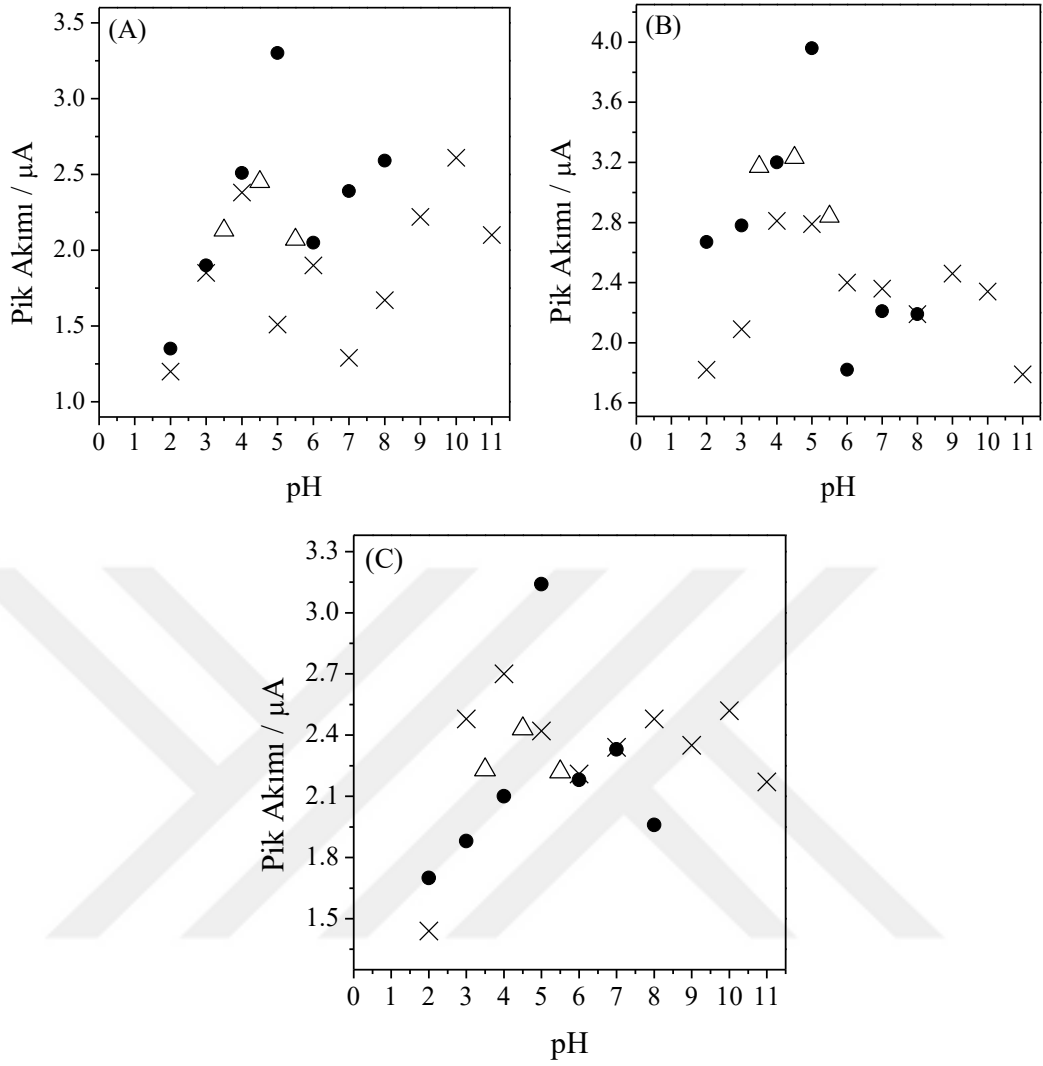
KDV yöntemi için;

$$E_p \text{ (mV)} = 1010.9 - 51.2 \text{ pH (r = 0.991)} \quad (15)$$



Şekil 25. (A) DV, (B) DPV ve (C) KDV yöntemleri ile FT, AT ve BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin pH'ya karşı pik potansiyel grafikleri. ×: BRT, Δ: AT, ●: FT

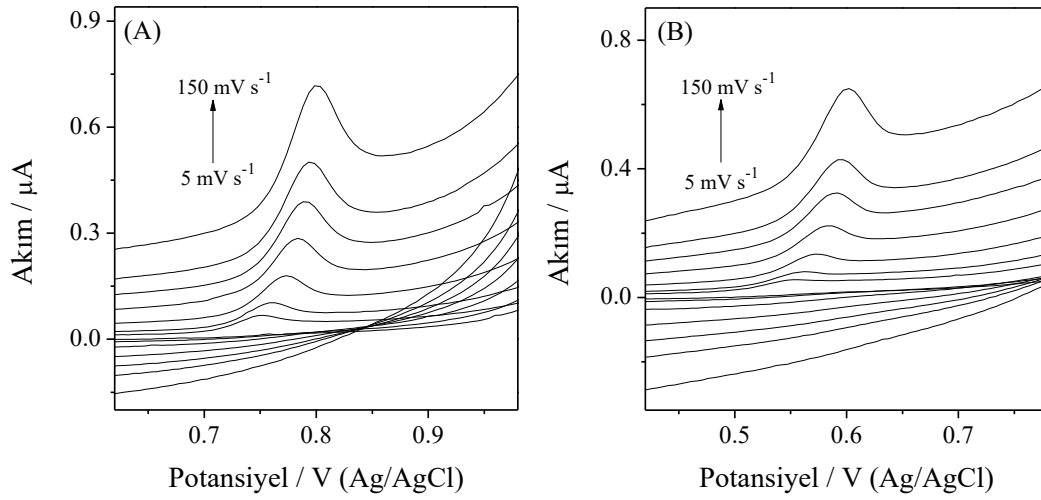
%25'lik KP elektrot kullanılarak her bir yöntem için elde edilen pik akımları Şekil 26'da gösterildiği gibi pH'ya karşı grafiğe geçirildi. Akım değerleri pH 2.0 ile pH 11.0 arasında okundu. Pik simetrisinin en iyi olduğu en yüksek akım değerine sahip sefepim piklerinin elde edildiği DPV için pH 5.0 FT ve KDV için pH 10.0 BRT çözeltileri sonraki çalışmalar için destek elektrolit olarak belirlendi.



Şekil 26. (A) DV, (B) DPV ve (C) KDV yöntemleri ile FT, AT ve BRT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin pH'ya karşı pik akım grafikleri. x: BRT, Δ : AT, $\bullet$: FT

6.2.3. Hız Taraması

Sefepimin %25'lik KP elektrot üzerindeki yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü mü adsorpsiyon kontrollü mü olduğunu tespit edebilmek amacıyla hız taraması yapıldı. pH taraması sonucunda belirlenen pH 5.0 FT ve pH 10.0 BRT ortamlarında 6.0×10^{-6} M sefepim çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerde 150 mV s^{-1} 'den 5 mV s^{-1} 'e değişen tarama hızlarında tek döngülü DV taraması yapıldı. Şekil 27'de pH 5.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-5} M sefepimin hız taraması voltamogramları gösterildi.

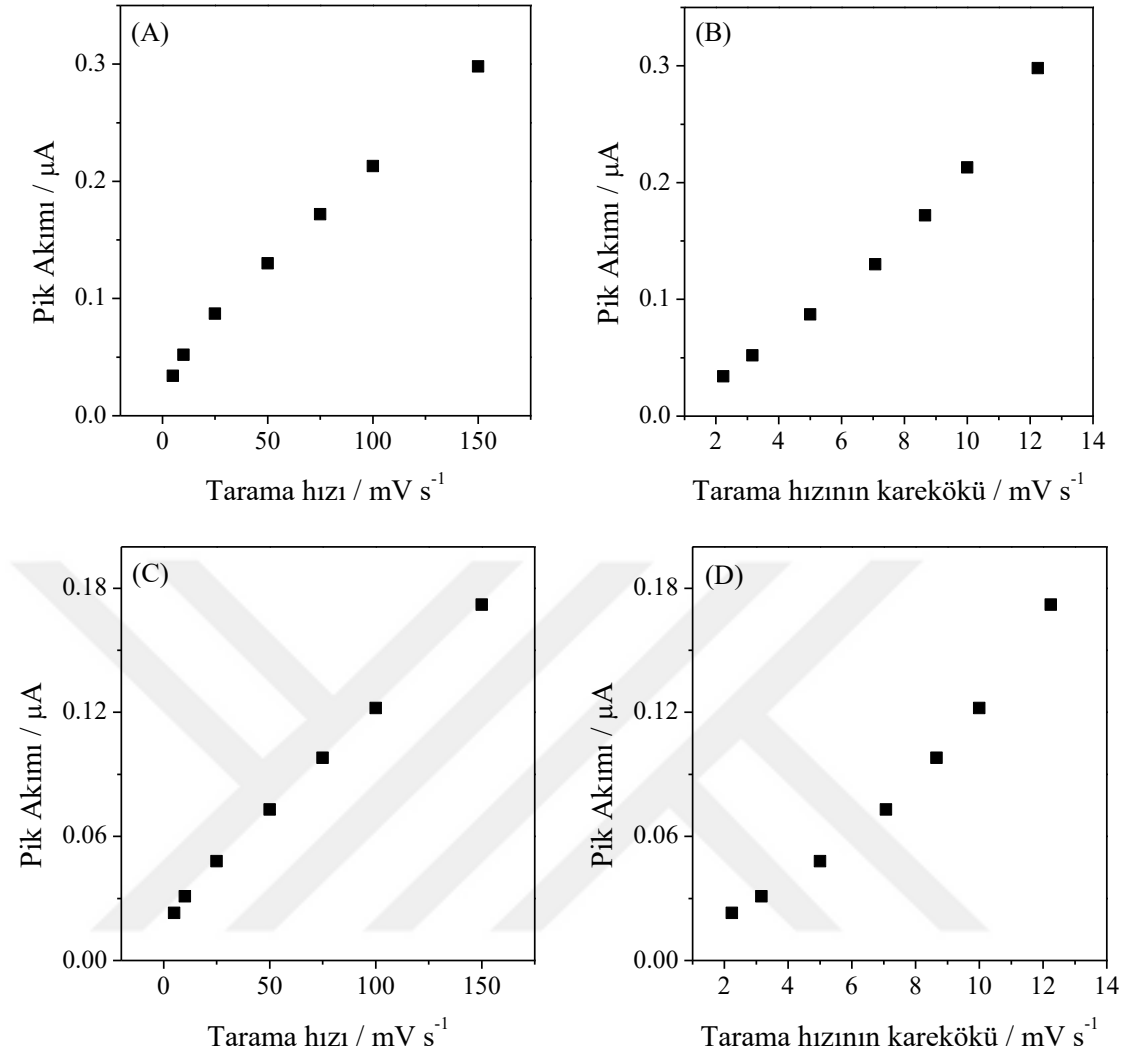


Şekil 27. KP elektrot kullanılarak tek döngülü DV ile (A) pH 5.0 FT ve (B) pH 10.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-6} M sefepimin hız taraması voltamogramları

pH 5.0 FT ve pH 10.0 BRT içerisinde hazırlanan sefepim çözeltileri için her bir tarama hızına karşı elde edilen sefepim yükseltgenme pikinin akım değerleri okunduktan sonra tarama hızına (v) karşı (Şekil 28A, 28C) ve tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) (Şekil 28B, 28D) karşı sefepim pik akım değerleri (I_p) grafiğe geçirildi. Şekil 28A ve 28C'deki I_p - v grafikleri doğrusal bir değişim gösterdi ve doğrusallık denklemleri Eşitlik 16 ve 17'de verildi. Sefepim çözeltilerinden elde edilen hız taraması sonuçları incelenerek reaksiyonun adsorpsiyon ya da difüzyon kontrollü olduğu belirlendi.

$$I_p (\mu\text{A}) = 0.0018 v (\text{mV s}^{-1}) + 0.03 (r = 0.996) \quad (16)$$

$$I_p (\mu\text{A}) = 0.0014 v (\text{mV s}^{-1}) + 0.01 (r = 0.997) \quad (17)$$



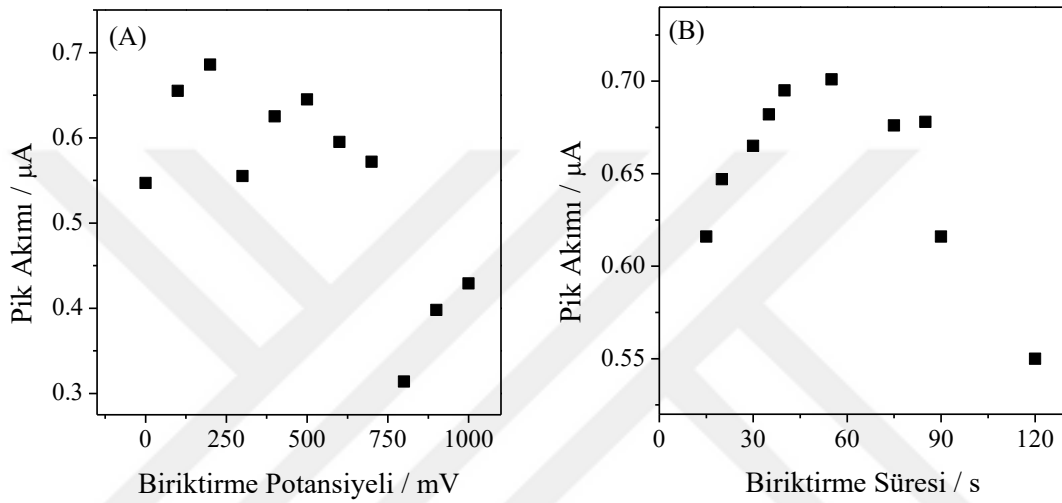
Şekil 28. (A ve B) pH 5.0 FT ve (C ve D) pH 10.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-6} M sefepimin DV ile elde edilen (A ve C) tarama hızına ve (B ve D) tarama hızının kareköküne karşı pik akımı grafikleri

6.2.4. Sıyırma Optimizasyonu

Sefepimin KP elektrot kullanılarak DPSV ve KDSV yöntemleri ile yapılan kantitatif analiz çalışması için sıyırma parametreleri optimize edildi. Bu amaçla, DPSV için pH 5.0 FT içerisinde ve KDSV için pH 10.0 BRT içerisinde 6.0×10^{-6} M sefepim çözeltileri hazırlandı.

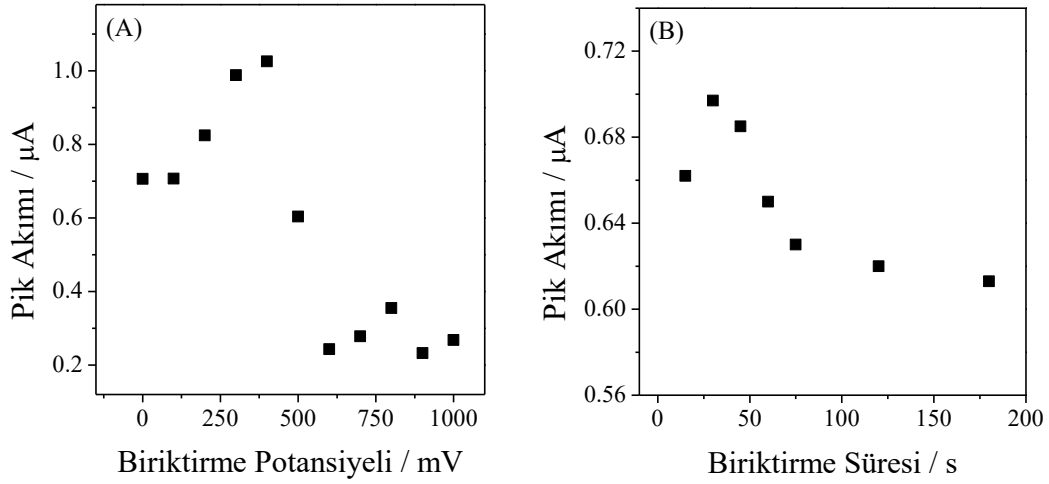
DPSV yöntemi için hazırlanan sefepim çözeltisi ile öncelikle biriktirme potansiyeli, sonra da biriktirme süresi optimize edildi. Bunun için, biriktirme süresi 60 s’de sabit tutularak biriktirme potansiyeli değiştirildi ve en yüksek pik akımını veren

potansiyel +0.2 V olarak belirlendi. Biriktirme süresinin belirlenmesi için, sefepim çözeltisinde biriktirme potansiyeli +0.2 V’de sabit tutularak biriktirme süresi değiştirildi. Şekil 29A’da biriktirme potansiyeline ve 29B’de biriktirme süresine karşı pik akım grafikleri verilmiştir. Biriktirme süresi arttıkça pik akım değerlerinin de arttığı, ancak 40 s’lik biriktirme süresinden itibaren pik akım değerlerinde artışın olmadığı gözlemlendi. Buna göre, biriktirme süresi olarak 40 s seçildi.



Şekil 29. DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisindeki 6.0×10^{-6} M sefepimin (A) biriktirme potansiyeline ve (B) biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri

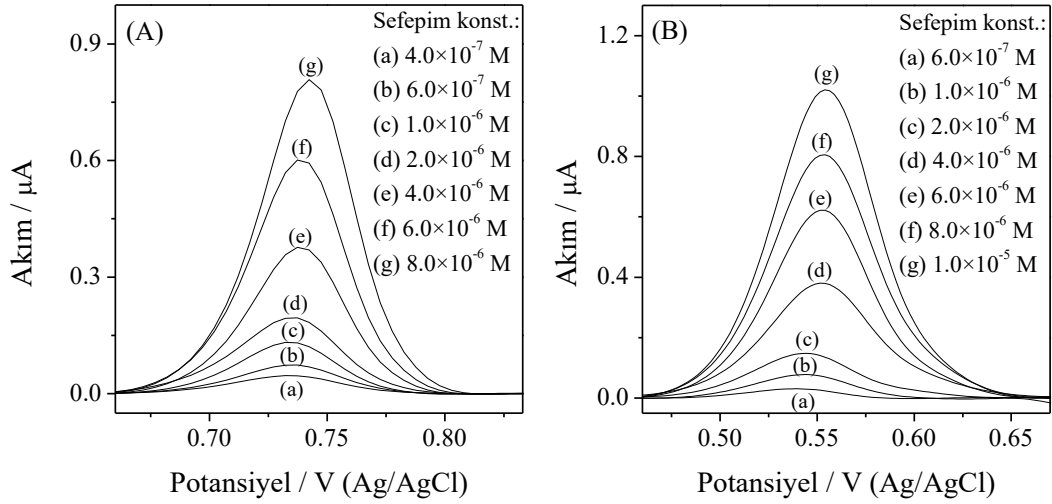
KDSV için biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresi, DPSV’ye benzer şekilde optimize edildi. Bunun için, pH 10.0 BRT içerisinde hazırlanan 6.0×10^{-6} M sefepim çözeltisi kullanıldı. Öncelikle biriktirme süresi 60 s’de sabit tutularak biriktirme potansiyeli değiştirildi. En yüksek pik akım değerini veren potansiyel +0.4 V olarak belirlendi; ancak bu potansiyelde sefepim pikinde omuzlanma gözlemlendi. Bu nedenle, omuzlanmanın olmadığı en yüksek pik akım değerine sahip sefepim pikinin gözlemlendiği 0.0 V biriktirme potansiyeli olarak seçildi. Daha sonra biriktirme süresi optimize edildi. Bunun için, sefepim çözeltisinde biriktirme potansiyeli 0.0 V’de sabit tutularak biriktirme süresi değiştirildi. Buna göre, en yüksek pik akımının elde edildiği süre 30 s olarak belirlendi. Şekil 30A’da biriktirme potansiyeline ve 30B’de biriktirme süresine karşı pik akım grafikleri verilmiştir.



Şekil 30. KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisindeki 6.0×10^{-6} M sefepimin (A) biriktirme potansiyeline ve (B) biriktirme süresine karşı pik akımı grafikleri

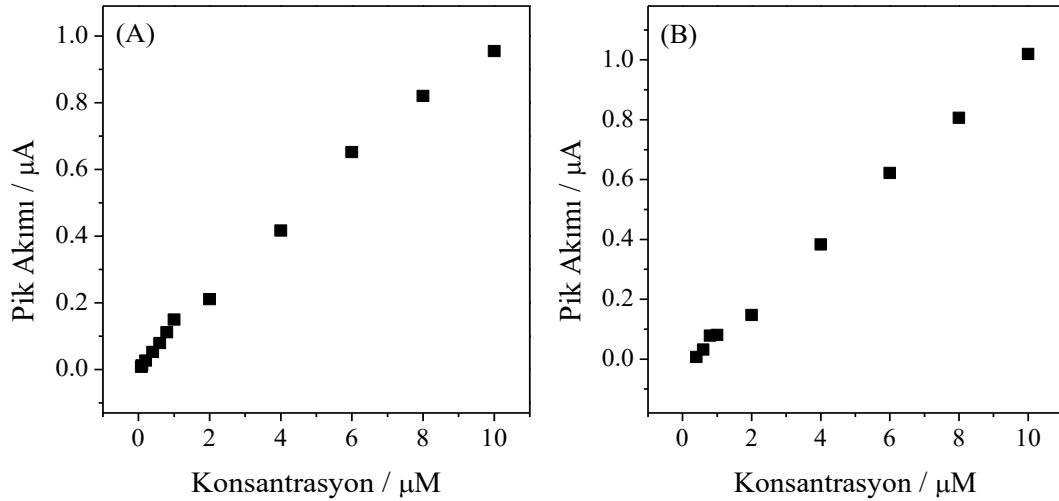
6.2.5. Kalibrasyon Çalışması

Sefepimin kantitatif analizi için DPSV ve KDSV yöntem parametreleri belirlendikten sonra kalibrasyon çalışmasına geçildi. DPSV ile yapılan kalibrasyon çalışması pH 5.0 FT içerisinde ve KDSV ile yapılan kalibrasyon çalışması pH 10.0 BRT içerisinde hazırlanan 2.0×10^{-8} ile 1.0×10^{-4} M konsantrasyon aralığındaki yirmi farklı sefepim çözeltisi ile gerçekleştirildi. Elde edilen DPSV verilerine göre, pik akım değeri okunabilen en düşük sefepim konsantrasyonu DPSV için 8.0×10^{-8} M ve KDSV için 4.0×10^{-7} M oldu. Şekil 31’de DPSV ve KDSV yöntemleri ile yapılan kalibrasyon çalışması için sefepim konsantrasyonundaki artış ile pik akımının doğrusal değişimi görülmektedir.



Şekil 31. (A) DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisinde ve (B) KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisinde sefepim içeren çözeltilerden temel çizgi düzeltmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar

DPSV ve KDSV ile elde edilen kalibrasyon voltamogramlarından sefepim pik akım değerleri okundu ve konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi (Şekil 32), çizilen grafikten doğrusallığın görüldüğü konsantrasyon aralığı belirlendi. Çizilen doğrusal kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler Tablo 10'da verilmiştir.



Şekil 32. (A) DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisinde ve (B) KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisindeki sefepim konsantrasyonuna karşı pik akım grafikleri

Tablo 10. KP elektrot kullanılarak sefepimin DPSV ve KDSV yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon verileri

	DPSV	KDSV
Pik potansiyeli (mV)	740	560
Doğrusallık aralığı (μM)	0.08 – 10	0.4 – 10
Eğim (μA μM ⁻¹)	$9.77 \times 10^{-2} \pm 2.21 \times 10^{-3}$	$1.05 \times 10^{-1} \pm 1.79 \times 10^{-3}$
Kesim noktası (μA)	$2.09 \times 10^{-2} \pm 9.50 \times 10^{-3}$	$-3.06 \times 10^{-2} \pm 8.89 \times 10^{-3}$
Korelasyon katsayısı, r	0.994	0.998
Teşhis sınırı, TS (μM)	3.73×10^{-3}	2.21×10^{-2}
Tayin alt sınırı, TAS (μM)	1.13×10^{-2}	6.71×10^{-2}

Kullanılan yöntemlerin kesinliğinin belirlenmesi için, DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisinde hazırlanan 4.0×10^{-6} ve 6.0×10^{-6} M; KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisinde hazırlanan 6.0×10^{-6} ve 8.0×10^{-6} M sefepim çözeltilerinden gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik deneyleri yapıldı. Aynı konsantrasyonda hazırlanan üçer çözeltiden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin %BSS'leri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 11 ve 12'de gösterilmektedir.

Tablo 11. KP elektrot kullanılarak 4.0×10^{-6} M ve 6.0×10^{-6} M sefepim çözeltilerinden DPSV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>4.0×10^{-6} M</u>		<u>6.0×10^{-6} M</u>	
		Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası
Pik potansiyeli	Veriler (mV)	742.34	737.30	737.30	737.30
		742.34	742.34	737.30	737.30
		742.34	737.30	742.30	742.30
		742.34	743.34	737.30	742.30
		737.30	742.34	737.30	742.30
	Ortalama (mV)	741.33	740.32	738.30	740.30
	Standart sapma	2.25	2.76	2.24	2.74
	%BSS*	0.30	0.37	0.30	0.37
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.383	0.382	0.545	0.532
		0.383	0.386	0.546	0.546
		0.386	0.373	0.546	0.546
		0.386	0.384	0.539	0.538
		0.384	0.386	0.538	0.553
	Ortalama (μ A)	0.384	0.382	0.543	0.543
	Standart sapma	0.0014	0.0055	0.0039	0.0080
	%BSS*	0.37	1.44	0.72	1.47

* Yüzde bağıl standart sapma

Tablo 12. KP elektrot kullanılarak 6.0×10^{-6} M ve 8.0×10^{-6} M sefepim çözeltilerinden KDSV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		6.0×10^{-6} M		8.0×10^{-6} M	
		Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası
Pik potansiyeli	Veriler (mV)	553.97	553.97	558.85	558.85
		558.85	553.97	561.29	561.29
		556.41	558.85	561.29	558.85
		558.85	558.85	561.29	561.29
		558.85	558.85	563.74	566.18
	Ortalama (mV)	557.39	556.90	561.29	561.29
	Standart sapma	2.18	2.67	1.73	2.99
	%BSS*	0.39	0.48	0.31	0.53
	Veriler (μ A)	0.576	0.579	0.670	0.666
		0.569	0.564	0.667	0.657
Pik akımı		0.569	0.578	0.669	0.675
		0.579	0.571	0.666	0.673
		0.574	0.575	0.657	0.666
	Ortalama (μ A)	0.574	0.573	0.666	0.667
	Standart sapma	0.0043	0.0059	0.0054	0.0073
	%BSS*	0.75	1.03	0.81	1.09

* Yüzde bağıl standart sapma

6.2.6. Farmasötiklerden Tayin ve Geri Kazanım Çalışması

Sefepimin kantitatif analizi için kullanılan DPSV ve KDSV yöntemlerinin doğruluğu, farmasötiklerden tayin ve geri kazanım çalışmaları ile incelendi. Farmasötiklerden tayin çalışması için flakon sefepim etkin maddesi kullanılarak DPSV için pH 5.0 FT içerisinde üçer adet 4.0×10^{-6} M ve KDSV için pH 10.0 BRT içerisinde üçer adet 8.0×10^{-6} M sefepim çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden elde edilen voltamogramların pik potansiyeli ve pik akımı değerleri okundu. Pik akım değerleri kullanılarak hesaplanan sefepim miktarı ile sefepimin farmasötik formunda bildirilen sefepim miktarı karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 13'te verildi.

Tablo 13. KP elektrot kullanılarak DPSV için 4.0×10^{-6} M ve KDSV için 8.0×10^{-6} M sefepim çözeltilerinden elde edilen farmasötiklerden tayin verileri

	DPSV	KDSV
Flakonda beyan edilen sefepim miktarı (g)	1.000	1.000
Bulunan sefepim miktarları (g)	1.007	0.994
	1.007	1.001
	1.002	1.000
	1.012	1.009
	0.996	1.001
Bulunan ortalama sefepim miktarı (g)	1.005	1.001
Standart sapma	0.0059	0.0055
%BSS*	0.59	0.55
% Bağlı hata	0.5	0.1
<i>t</i> -testi	0.323	
<i>F</i> -testi	0.812	

* Yüzde bağlı standart sapma
Teorik olarak *t* -testi: 2.31 ve *F* -testi: 6.39

Geri kazanım çalışmasında, DPSV yöntemi için sefepimin flakon formundan hazırlanan 4.0×10^{-6} M sefepim çözeltisinin üzerine toplam sefepim konsantrasyonu 6.0×10^{-6} M olacak şekilde saf sefepim çözeltisi; KDSV yöntemi için ise flakon formundan hazırlanan 8.0×10^{-6} M sefepim çözeltisinin üzerine toplam sefepim konsantrasyonu 1.0×10^{-5} M olacak şekilde saf sefepim çözeltisi ilave edildi ve her iki yöntem ile elde edilen voltamogramlardan sefepim pik akım değerleri okundu. Elde edilen pik akım değerlerinden beşer adet seçilerek DPSV ve KDSV için %BSS ve yüzde geri kazanım değerleri hesaplandı (Tablo 14).

Tablo 14. KP elektrot kullanılarak DPSV için 6.0×10^{-6} M ve KDSV için 1.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerden elde edilen geri kazanım verileri

	DPSV	KDSV
İlave edilen sefepim miktarı (g)	1.107×10^{-5}	1.107×10^{-5}
Bulunan sefepim miktarı (g)	1.113×10^{-5}	1.095×10^{-5}
	1.130×10^{-5}	1.105×10^{-5}
	1.109×10^{-5}	1.105×10^{-5}
	1.117×10^{-5}	1.116×10^{-5}
	1.130×10^{-5}	1.116×10^{-5}
Geri kazanım		
Bulunan ortalama sefepim miktarı (g)	1.120×10^{-5}	1.107×10^{-5}
Ortalama geri kazanım (%)	101.17	100.04
Standart sapma	0.87	0.80
% BSS*	0.86	0.80
% Bağlı hata	1.17	0.04

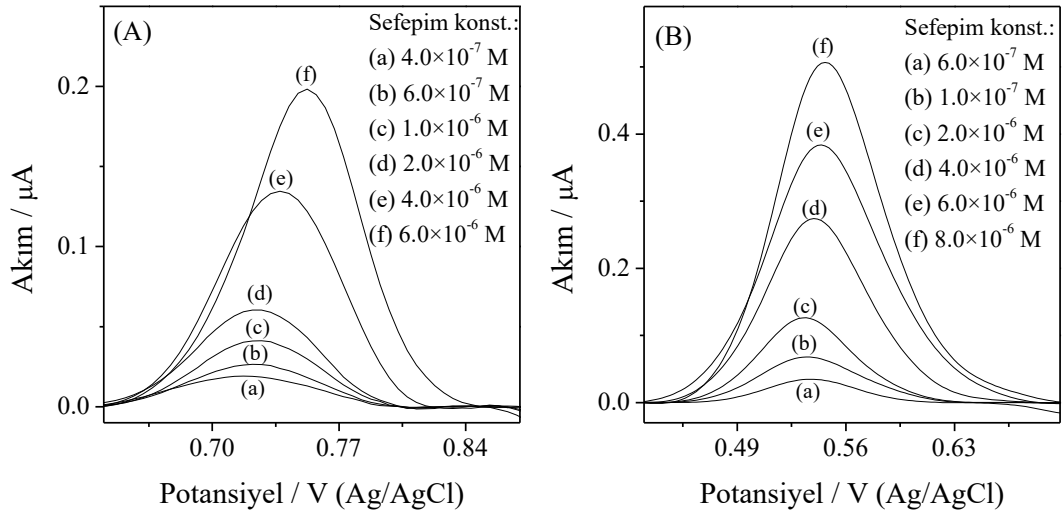
* Yüzde bağlı standart sapma

6.2.7. Serum Çalışması

Karbon pasta elektrot kullanılarak insan serumundan sefepim analizini yapmak üzere, Bölüm 5.1.2’de belirtilen şekilde serum çözeltileri hazırlandı.

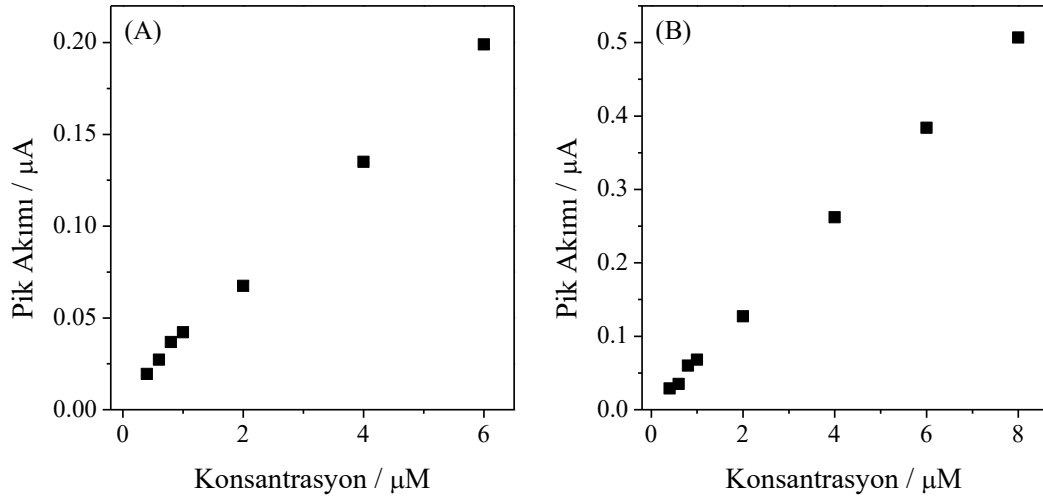
Sefepim içeren serum çözeltilerinin analizinde destek elektrolit olarak DPSV için pH 5.0 FT ve KDSV için pH 10.0 BRT çözeltileri kullanıldı. Serum içermeyen saf sefepim çözeltileri ile Bölüm 6.2.5’te açıklanan kalibrasyon çalışmasına paralel şekilde sefepim içeren serum çözeltileri ile kalibrasyon çalışması yapıldı.

Sefepim içeren serum çözeltilerinin kantitatif analizi için yapılan kalibrasyon çalışmasında, Bölüm 6.2.4’te açıklanan parametrelerdeki DPSV ve KDSV yöntemleri kullanıldı. DPSV yöntemi için pH 5.0 FT içerisinde 6.0×10^{-8} ile 2.0×10^{-5} M aralığında ve KDSV yöntemi için pH 10.0 BRT içerisinde 2.0×10^{-7} ile 2.0×10^{-5} M aralığında on üç farklı konsantrasyonda serum çalışma çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden elde edilen voltamogramlara göre pik akım değerinin okunabildiği en düşük konsantrasyon hem DPSV hem de KDSV için 4.0×10^{-7} M oldu.



Şekil 33. (A) DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisindeki ve (B) KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisindeki sefepim içeren serum çözeltilerinden temel çizgi düzeltmesi yapılarak elde edilen voltamogramlar

Elde edilen DPSV ve KDSV voltamogramlarındaki pik akım değerleri okunarak sefepim konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi (Şekil 34). Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler Tablo 15’te gösterilmektedir.



Şekil 34. (A) DPSV yöntemi ile pH 5.0 FT içerisindeki ve (B) KDSV yöntemi ile pH 10.0 BRT içerisindeki serum çözeltisindeki sefepim konsantrasyonuna karşı pik akım grafikleri

Tablo 15. KP elektrot kullanılarak sefepim içeren serum çözeltilerinden DPSV ve KDSV yöntemleri ile elde edilen kalibrasyon verileri

	DPSV	KDSV
Pik potansiyeli (mV)	730	540
Doğrusallık aralığı (μM)	0.4 – 6	0.4 – 8
Eğim (μA μM ⁻¹)	$3.16 \times 10^{-2} \pm 3.67 \times 10^{-4}$	$6.32 \times 10^{-2} \pm 5.09 \times 10^{-4}$
Kesim noktası (μA)	$8.40 \times 10^{-3} \pm 6.00 \times 10^{-4}$	$3.80 \times 10^{-3} \pm 2.28 \times 10^{-3}$
Korelasyon katsayısı, r	0.998	0.999
Teşhis sınırı, TS (μM)	3.01×10^{-2}	2.11×10^{-2}
Tayin alt sınırı, TAS (μM)	9.14×10^{-2}	6.39×10^{-2}

Tekrar edilebilirlik deneylerinde DPSV için pH 5.0 FT ve KDSV için pH 10.0 BRT içerisinde hazırlanan 2.0×10^{-6} M sefepim içeren serum çalışma çözeltileri kullanıldı. Her iki yöntem için de, üçer çözeltiden elde edilen beş adet pik akımı ve pik potansiyeli değerlerinin gün içi ve günler arası %BSS'leri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 16'da gösterilmektedir.

Tablo 16. KP elektrot kullanılarak DPSV ve KDSV yöntemleri ile 2.0×10^{-6} M sefepim içeren serum çözeltilerinden elde edilen tekrar edilebilirlik verileri

		<u>DPSV</u>		<u>KDSV</u>	
		Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası
Pik potansiyeli	Veriler (mV)	727.23	727.23	539.32	534.44
		727.23	727.23	539.32	536.88
		727.23	722.22	536.88	539.32
		727.23	732.27	536.88	539.32
		732.27	732.27	536.88	539.32
	Ortalama (mV)	728.24	728.24	537.86	537.86
	Standart sapma	2.25	4.21	1.34	2.18
	%BSS*	0.31	0.58	0.25	0.41
Pik akımı	Veriler (μ A)	0.0666	0.0660	0.128	0.126
		0.0669	0.0671	0.128	0.129
		0.0672	0.0674	0.129	0.129
		0.0674	0.0674	0.130	0.130
		0.0674	0.0677	0.130	0.131
	Ortalama (μ A)	0.0671	0.0671	0.128	0.129
	Standart sapma	3.5×10^{-4}	6.6×10^{-4}	1.0×10^{-3}	1.9×10^{-3}
	%BSS*	0.52	0.98	0.78	1.47

* Yüzde bağıl standart sapma

Geri kazanım çalışması için, sefepim içeren serum stok çözeltisi ve saf sefepim çözeltisi kullanılarak Bölüm 5.4.8’de açıklandığı gibi, DPSV için pH 5.0 FT ve KDSV için pH 10.0 BRT içerisinde hazırlanan 4.0×10^{-6} M çalışma çözeltileri kullanıldı. DPSV ve KDSV için üçer adet çalışma çözeltisinden elde edilen voltamogramlardan hesaplanan veriler Tablo 17’de gösterilmektedir.

Tablo 17. KP elektrot kullanılarak DPSV ve KDSV yöntemleri ile 4.0×10^{-6} M sefepim içeren serum çözeltilerinden elde edilen geri kazanım verileri

	DPSV	KDSV
İlave edilen saf sefepim konsantrasyonu (μM)	2.000	2.000
Bulunan saf sefepim konsantrasyonu (μM)	1.985	1.994
	2.001	1.994
	2.001	2.010
	2.016	2.018
	2.032	2.026
Bulunan ortalama saf sefepim konsantrasyonu (μM)	2.007	2.009
Ortalama geri kazanım (%)	100.34	100.43
Standart sapma	0.90	0.71
% BSS*	0.90	0.71
% Bağlı hata	0.35	0.45

* Yüzde bağlı standart sapma

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

7.1. Bor-Katkılı Elmas Elektrotla Elde Edilen Sonuçlar

7.1.1. pH Etkisi

Sefepimin bor-katkılı elmas elektrot üzerinde voltametrik teknikler ile yapılan analiz çalışmaları için öncelikle ideal pH ve destek elektrolit belirlendi. Bu amaçla DV, DPV ve KDV yöntemleri ile farklı pH ve tamponlar içerisindeki sefepim çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar incelendi. Şekil 11’de farklı pH ve tamponlar içerisindeki sefepim çözeltilerinin döngülü voltamogramlarında görüldüğü gibi, sefepim etkin maddesi BKE elektrot üzerinde yalnızca yükseltgenme yönünde pik verirken, indirgenme yönünde herhangi bir pik oluşmadı. Böylece, sefepimin redoks reaksiyonunun tersinmez olduğu sonucuna varıldı.

Şekil 11 ve 12’de görüldüğü gibi pH artışı ile yani daha bazik bölgelere gidildikçe sefepim pik potansiyeli daha düşük değerlere doğru kaydı. Bu, destek elektrolitin pH’sı arttıkça sefepimin yükseltgenmesinin daha kolay gerçekleştiğini gösterdi.

pH’ya karşı çizilen pik potansiyeli (E_p) grafiklerinden, pH 2.0 ile 5.0 arasında elde edilen ve Eşitlik 8, 9 ve 10’da sırasıyla -42.6, -48.5 ve -46.3 mV pH^{-1} olarak verilen eğim değerleri, teorik -59.2 mV pH^{-1} değerine (64) yakındır. Bu sonuç, redoks reaksiyonunda yer alan proton sayısının transfer edilen elektron sayısına eşit olduğunu gösterdi. pH 5.0’dan sonra pik potansiyeli pH’dan hemen hemen bağımsız kaldı. Bu durum, yükseltgenmeden sorumlu grup ya da grupların asit-baz dengesinin pK_a 5.0 civarında olduğunu, tamponun pH değeri 5.0’dan büyük olduğunda oluşan konjuge bazın ortamda baskın olduğunu ve daha fazla konjuge baz oluşamadığı için pik potansiyelinin pH’dan bağımsız olduğunu gösterdi. pH 2.0’dan 5.0’a artarken, sefepimin pik potansiyelindeki azalma, bu bölgede asit-baz dengesinin kurulmakta olduğunu gösterdi.

DV, DPV ve KDV yöntemleri ile elde edilen pH’ya karşı pik akımı grafikleri de dikkate alınarak en yüksek pik akımına sahip olan en simetrik sefepim piki pH 2.0 BRT ortamında elde edildi. Bu nedenle, BKE elektrot ile devam eden çalışmalarda destek elektrolit olarak bu ortam kullanıldı.

7.1.2. Hız Taraması

pH taraması sonrasında belirlenen tampon ortamı içerisinde sefepimin yükseltgenme reaksiyon karakterizasyonunun belirlenmesi için hız taraması çalışması yapıldı. Bu çalışma ile sefepimin BKE elektrot üzerindeki yükseltgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü mü yoksa adsorpsiyon kontrollü mü olduğu belirlendi. Bu amaçla, pH 2.0 BRT ve pH 7.0 BRT ortamlarındaki 6.0×10^{-5} M sefepim çözeltilerinin 150 mV s^{-1} ile 5 mV s^{-1} tarama hızı aralığında DV taraması yapıldı. Bu çözeltilerden her bir tarama hızı için elde edilen pik akım değerleri dikkate alınarak çizilen I_p - v grafikleri doğrusal bir değişim gösterdi (Şekil 16A ve 16C, Eşitlik 11 ve 12) ve böylece sefepimin yükseltgenme reaksiyonunda adsorpsiyon etkisinin baskın olduğu sonucuna varıldı.

Adsorpsiyon etkisinden dolayı, sefepimin miktar tayini çalışmalarında sıyırma yöntemlerinin kullanılıp kullanılmayacağına karar verilmesi için sıyırma parametrelerinin optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla, biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresinin optimizasyonu çalışmasında, pH 2.0 BRT içerisinde hazırlanan 1.0×10^{-5} M sefepim çözeltisi kullanıldı. Bu çözeltide öncelikle biriktirme süresi 60 s'de sabit tutularak biriktirme potansiyeli değiştirildi ve diğer potansiyellere göre nispeten daha yüksek pik akımını verdiği için hem DPSV hem de KDSV için +0.5 V biriktirme potansiyeli olarak seçildi (Şekil 17). Sonraki aşamada biriktirme süresi optimize edilmeye çalışıldı. Şekil 18'de görüldüğü gibi, her iki yöntem için biriktirme süresi arttıkça orantılı şekilde artan pik akım değerleri elde edilemedi. Deneyler her iki yöntem için tekrarlandı ve yine biriktirme süresine göre düzensiz olarak değişen pik akım değerleri elde edildi. Sonuç olarak biriktirme parametreleri optimize edilemedi ve daha sonraki miktar tayini çalışmalarında BKE elektrot için sıyırma yöntemlerinin kullanılmamasına karar verildi.

7.1.3. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları

Sefepimin kantitatif analizi için DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak kalibrasyon çalışması yapıldı. Kalibrasyon deneylerinde pH 2.0 BRT içerisinde hazırlanan yirmi farklı konsantrasyondaki sefepim çözeltisi kullanıldı. BKE elektrot ile elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık aralığı DPV için $4.0 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-5}$ M ve KDV için $4.0 \times 10^{-7} - 6.0 \times 10^{-5}$ M olarak gözlemlendi. Sefepimin teşhis sınırı DPV için 1.58×10^{-9} M ve KDV için 1.10×10^{-8} M olarak hesaplandı (Tablo 1). Kullanılan DPV ve

KDV yöntemlerinin kesinliği tekrar edilebilirlik çalışması ile incelendi. Her bir yöntem için iki farklı konsantrasyonda üçer adet çözelti hazırlandı ve bulunan pik akımı ve pik potansiyeli değerleri üzerinden kesinlik ile ilgili çıkarımlarda bulunuldu. DPV yönteminin kesinliği için 8.0×10^{-6} M ve 1.0×10^{-5} M; KDV yönteminin kesinliği için ise 8.0×10^{-6} M ve 4.0×10^{-5} M sefepim çözeltileri hazırlandı. Tablo 2 ve 3'te her iki yöntem için verilen %BSS değerleri pik potansiyeli için %0.10 ile %0.30 arasında ve pik akımı için %0.40 ile %1.76 arasında değişti. Böylece, hem DPV hem de KDV yöntemlerinin kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı.

7.1.4. Farmasötiklerden Geri Kazanım Çalışması

Sefepimin kantitatif analizinde kullanılan DPV ve KDV yöntemlerinin doğruluğu, farmasötiklerden tayin ve geri kazanım çalışmaları ile araştırıldı. Öncelikle, sefepimin flakon formda 1.0 g olarak beyan edilen miktarı DPV ile 1.012 g ve KDV ile 1.033 g olarak ve sırasıyla %0.59 ve %0.77'lik %BSS değerleri ile bulundu (Tablo 4). Farmasötik form çözeltisi üzerine ilave edilen saf sefepim çözeltisi ile yapılan geri kazanım çalışmasında da ilave edilen sefepim ile bulunan sefepim miktarlarının DPV için %100.37 ve KDV için %102.07 geri kazanım değerleri ile birbirine yakın olduğu görüldü (Tablo 5). Elde edilen bu sonuçlardan, flakondaki ilaç etkin madde haricindeki katkı maddelerinin uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçları etkilemediği sonucuna varıldı.

Geliştirilen DPV ve KDV yöntemlerinin birbiriyle istatistiksel olarak karşılaştırılması, farmasötik form ve geri kazanım çalışmasından elde edilen sefepim pik akım değerleri üzerinden yapılan hesaplamalar ile gerçekleştirildi. Bu çalışma için hesaplanan *t*-testi ve *F*-testi sonuçları %95 güven seviyesindeki teorik değerlerden (Tablo 4) düşük olduğu için geliştirilen iki yöntem arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı sonucuna varıldı.

7.1.5. Serum Çalışması

Valide edilen DPV ve KDV yöntemleri sefepim içeren serum çözeltilerine uygulandı. pH 2.0 BRT ortamında serum çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verileriyle teşhis sınırı değerleri DPV için 2.45×10^{-8} M ve KDV için 1.30×10^{-7} M olarak hesaplandı (Tablo 6). Tablo 7'de verilen tekrar edilebilirlik deneylerinden her iki yöntem için elde edilen %BSS verileri pik potansiyeli için %0.19 ile %0.36 arasında ve

pik akımı için %0.69 ile %1.55 arasında değişti. Böylece, geliştirilen yöntemlerin serum çözeltilerindeki kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı.

Serum içerisindeki sefepimin doğruluk çalışmaları geri kazanım çalışmaları ile elde edildi (Tablo 8). Buna göre, serum çözeltilisine ilave edilen saf sefepim miktarı DPV için %100.03 ve KDV için %100.21 ortalama geri kazanım ile elde edildi. Bu nedenle, serumda bulunan türlerin sefepimin bu çalışma ile geliştirilen voltametrik yöntemlerle analizine herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

7.2. Karbon Pasta Elektrotla Elde Edilen Sonuçlar

7.2.1. Karbon Pasta Bileşiminin Seçilmesi

Karbon pasta elektrot ile sefepimin analizi için öncelikle ideal pasta bileşimi belirlendi. Bu amaçla, %15 ile %40 arasında değişen oranlarda mineral yağ içeren karbon pastalar hazırlandı. Her bir oran için üç farklı tampon ortamında sefepimin DV, DPV ve KDV voltamogramları alındı. Elde edilen voltamogramların pik akım değerleri ve pik simetrisi değerlendirildi. %15 ve %20 pasta oranlarının, yapılan deneyler süresince stabil kalamamaları nedeniyle daha sonraki tüm deneyler %25 ve üzeri mineral yağ oranına sahip pasta bileşimleriyle yapıldı ve optimum karbon pasta bileşimleri %25 ve %30 olarak belirlendi. Bu iki pasta bileşiminden hangisinin kullanılacağına pH çalışmaları sırasında karar verildi.

7.2.2. pH Etkisi

Sefepimin KP elektrot üzerindeki oksidasyon reaksiyonuna pH etkisi, önceki çalışmada belirlenen %25 ve %30'luk KP bileşimleri için incelendi. Yapılan pH taraması sonucunda sefepimin karbon pasta elektrot üzerinde yalnızca yükseltgenme yönünde pik verdiği görüldü. Böylece, KP elektrot için de sefepimin redoks reaksiyonunun tersinmez olduğu sonucuna varıldı.

Tampon ortamının artan pH değeri ile elde edilen sefepim pik potansiyel değerleri Şekil 23 ve 24'te de görüldüğü gibi daha düşük değerlere doğru kaydı. Bu durum, destek elektrolit pH'sı arttıkça sefepimin oksidasyonunun daha kolay gerçekleştiğini gösterdi.

pH taraması sonucunda hem %25'lik hem de %30'luk KP elektrot için elde edilen DPV ve KDV voltamogramları da ayrıca incelendi (Şekil 24). pH taraması

sonrasındaki çalışmalarda DPV ve KDV için %25'lik ve %30'luk pasta bileşimlerinden hangisinin daha ideal olduğuna bakıldı. Bu amaçla, her iki bileşim için pH taraması ile elde edilen tüm voltamogramlar incelenerek %25'lik KP elektrot ile daha yüksek pik akım değerlerinin elde edildiği görüldü. Sonuç olarak, %25 mineral yağ oranına sahip pasta bileşimiyle çalışılmasına karar verildi.

pH'ya karşı çizilen E_p grafiklerinde (Şekil 25) pH 2.0 ile 5.0 arasında DV, DPV ve KDV yöntemleri için sırasıyla -48.4, -48.7 ve -51.2 mV pH^{-1} olarak negatif eğim değerleri elde edildi (Eşitlik 13-15), Bu verilerin teorik -59.2 mV pH^{-1} değerine (64) yakın olması, redoks reaksiyonunda yer alan proton ve elektron sayısının eşit olduğunu gösterdi. pH 5.0'dan sonra pH arttıkça gözlenen pik potansiyellerindeki azalma oranı düştü. Bu durum, yükseltgenmeden sorumlu grup ya da grupların asit-baz dengesinin pK_a 5.0 civarında kurulduğunu gösterdi. Bu sonuç, BKE elektrot ile elde edilen sonuçla uyum gösterdi.

Şekil 26'da verilen I_p -pH grafiklerinden, daha sonraki çalışmalar için kullanılmak üzere, en yüksek pik akım değerinin görüldüğü ve en simetrik pikin elde edildiği tampon çözeltiler DPV için pH 5.0 FT ve KDV için pH 10.0 BRT olarak belirlendi.

7.2.3. Hız Taraması ve Sıyırma Parametrelerinin Belirlenmesi

Hız taraması çalışmasında, farklı tarama hızları için hem pH 5.0 FT hem de pH 10.0 BRT içerisindeki sefepim çözeltilerinin döngülü voltamogramları elde edildi (Şekil 27). Her iki ortam için de, I_p - v grafiklerinin (Şekil 28A ve 28C) doğrusal olması, sefepimin KP elektrot üzerindeki oksidasyon sürecinin adsorpsiyon kontrollü olduğunu gösterdi. Bu nedenle, sonraki çalışmaların sıyırma yöntemleri ile yapılması uygun görüldü. DPSV ve KDSV yöntemleri için optimum biriktirme potansiyeli ve biriktirme süresini belirlemek üzere sıyırma optimizasyonu çalışması yapıldı. En yüksek pik akımına sahip en simetrik pik DPSV için +0.2 V biriktirme potansiyeli ve 40 s biriktirme süresi ile (Şekil 29); KDSV için 0.0 V biriktirme potansiyeli ve 30 s biriktirme süresi ile (Şekil 30) elde edildi.

7.2.4. Kalibrasyon ve Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları

Seçilen sıyırma parametreleri ile şartlandırılan DPSV ve KDSV yöntemleri kullanılarak kalibrasyon çalışması yapıldı. Bu amaçla hazırlanan yirmi farklı sefepim

çözeltilisinden, DPSV ve KDSV yöntemlerinin doğrusallık aralıkları sırasıyla, $8.0 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-5}$ M ve $4.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$ M olarak bulundu. Sefepimin teşhis sınırı DPSV için 3.73×10^{-9} M ve KDSV için 2.21×10^{-8} M olarak hesaplandı (Tablo 10). Yöntemlerin kesinliği tekrar edilebilirlik çalışması ile incelendi. Tablo 11 ve 12’de her iki yöntem için verilen %BSS değerleri pik potansiyeli için %0.30 ile %0.53 arasında ve pik akımı için %0.37 ile %1.47 arasında değişti. Böylece, hem DPSV hem de KDSV yöntemlerinin kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı.

7.2.5. Farmasötiklerden Geri Kazanım Çalışması

Sefepimin KP elektrot ile kantitatif analizi için kullanılan DPSV ve KDSV yöntemlerinin doğruluğu, farmasötiklerden tayin ve geri kazanım çalışmaları ile araştırıldı. Farmasötiklerden tayin çalışmasında, tablette beyan edilen 1.0 g’lık sefepim miktarı, geliştirilen DPSV için %0.59’luk %BSS ile 1.005 g ve KDSV için %0.55’lik %BSS ile 1.001 g olarak bulundu (Tablo 13). Farmasötik sefepim çözeltisi üzerine ilave edilen saf sefepim çözeltisi için DPSV ile %101.17 ve KDSV ile %100.04 geri kazanım sonuçları elde edildi (Tablo 14). Elde edilen bu verilerden, sefepimin analizi için her iki yöntemin de doğru ve kesin sonuçlar verdiği ve ilaç etkin madde dışındaki katkı maddelerinin uygulanan yöntemlerin sonuçlarını etkilemediği sonucuna varıldı.

DPSV ve KDSV yöntemlerinin birbiriyle istatistiksel olarak karşılaştırılması için farmasötik form ve geri kazanım çalışmasından elde edilen sefepim pik akım değerleri kullanıldı. Hesaplanan *t*-testi ve *F*-testi sonuçları %95 güven seviyesindeki teorik değerlerden (Tablo 13) düşük olduğu için geliştirilen iki yöntem arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı sonucuna varıldı.

7.2.6. Serum Çalışması

Geliştirilen DPSV ve KDSV yöntemleri sefepim içeren serum çözeltilerine uygulandı. Serum çözeltileriyle elde edilen kalibrasyon verileriyle teşhis sınırı değerleri DPSV için 3.01×10^{-8} M ve KDSV için 2.11×10^{-8} M olarak hesaplandı (Tablo 15). Tablo 15’te verilen tekrar edilebilirlik deneylerinden her iki yöntem için elde edilen %BSS verileri pik potansiyeli için %0.25 ile %0.58 arasında ve pik akımı için %0.52 ile %1.47 arasında değişti. Böylece, geliştirilen yöntemlerin serum çözeltilerindeki kesinliğinin iyi olduğu sonucuna varıldı.

Serum içerisindeki sefepimin doğruluk çalışmaları %25'lik KP elektrot kullanılarak geri kazanım çalışmaları ile elde edildi (Tablo 17). Buna göre, serum çözeltisine ilave edilen saf sefepim miktarı DPSV için %0.90'lık %BSS ile %100.34 ve KDSV için %0.71'lik %BSS ile %100.43 ortalama geri kazanım olarak elde edildi. Bu nedenle, serumda bulunan türlerin sefepimin bu çalışma ile geliştirilen voltametrik yöntemlerle analize herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

7.3. Sefepim Verilerinin Karşılaştırılması

Sefepim için bu tez kapsamında elde edilen veriler literatürdeki diğer voltametrik çalışmalardaki verilerle karşılaştırıldı (Tablo 18). Sadece Pt nanopartikül modifiyeli camı karbon elektrotla (68) yapılan çalışmanın doğrusallık aralığının bu tez kapsamında elde edilen doğrusallık aralıklarından daha geniş olduğu görüldü, ancak kalibrasyon eğimi (duyarlık) hakkında herhangi bir bilgi verilmemiştir. Ayrıca, aynı çalışmada elde edilmiş teşhis sınırı, bu tez kapsamında BKE elektrotla DPV yöntemi kullanılarak elde edilen teşhis sınırıyla oldukça yakın değerdedir. Pt nanopartikül modifiyeli camı karbon elektrotla yapılmış çalışma (68) dışındaki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, BKE elektrotla DPV yöntemi kullanılarak en geniş doğrusallık aralığı ve en düşük teşhis sınırı elde edildi. Kalibrasyon doğrusunun en yüksek eğim değeri de yine bu tez kapsamında BKE elektrotla KDV yöntemi kullanılarak elde edildi.

Böylece, literatürde bulunan az sayıdaki çalışmalara göre daha hassas ve etkin yöntem geliştirilmiş oldu.

Tablo 18. BKE ve KP elektrot ile elde edilmiş kalibrasyon verilerinin literatürdeki voltametrik yöntemlerle karşılaştırılması

Elektrot	Yöntem	Tampon	Doğrusallık aralığı (μM)	Eğim (μA μM ⁻¹)	TS (μM)	Kaynak
GCE*	Doğrusal voltametri	0.1 M KH ₂ PO ₄ -NaOH, pH 8.0	5.2 – 26.0	–	5.13×10 ⁻³	65
GCE*	KDV	AT, pH 5.0	1.0 – 10.0	0.134	5.00×10 ⁻¹	66
Pt elektrot	DPV	0.1 M AT, pH 4.5	25.0 – 150.0	–	15.0	67
Modifiyeli GCE*	–	–	0.008 – 6.0	–	1.20×10 ⁻³	68
BKE elektrot	DPV	0.04 M BRT, pH 2.0	0.04 – 10.0	0.013	1.58×10 ⁻³	Tez
BKE elektrot	KDV	0.04 M BRT, pH 2.0	0.4 – 60.0	0.165	1.10×10 ⁻²	Tez
KP elektrot	DPV	0.2 M FT, pH 5.0	0.08 – 10.0	0.098	3.73×10 ⁻³	Tez
KP elektrot	KDV	0.04 M BRT, pH 10.0	0.4 – 10.0	0.105	2.21×10 ⁻²	Tez

*Camsı karbon elektrot

8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sefepimin kalitatif ve kantitatif analizi için literatürde birçok yöntem mevcuttur. Sefepimin analizi için sıklıkla kullanılan analitik yöntemler kromatografi (69-74), spektrofotometri (75-77), akış enjeksiyonlu kemilüminesans (78) ve kapiler elektroforezdir (79). Bu yöntemler tatmin edici hassasiyete ve seçiciliğe sahip olmalarına rağmen, numunenin hazırlanması için zahmetli ön işlemler gerekmekte ve bu da analizi daha zaman alıcı, daha pahalı ve karmaşık bir hale getirmektedir. Elektroanalitik teknikler, kromatografik ve spektrofotometrik analizlerde gerekli olan ön işlemlere gerek duyulmadan hedeflenen maddenin analizinin seçici ve hassas bir şekilde yapılmasına imkân tanımasından dolayı tercih edilmektedir. Sefepimin elektrokimyasal analizinin bazı elektrotlar ile yapıldığı az sayıda çalışma literatürde mevcuttur. Sefepimin, camısı karbon elektrot (65, 66), platin mikroeletrot (67) ve grafen nanoplaka-karbon nanoküre tabanlı nanokompozit film/platin nanopartikül modifiyeli camısı karbon elektrot (68) ile yükseltgenme yönündeki voltametrik; civa elektrot (80-82) ve gümüş-civa amalgam elektrot (83) ile indirgenme yönündeki polarografik; camısı karbon elektrot ile hem yükseltgenme hem de indirgenme yönündeki (84) bazı elektrokimyasal analiz çalışmaları literatürde mevcuttur. Bu tez kapsamında, sefepimin yükseltgenme yönündeki voltametrik elektrokimyasal kantitatif analizi bor-katkılı elmas ve karbon pasta elektrotlar ile ilk kez çalışıldı. Seçilen elektrotlar, sefepimin herhangi bir elektrot modifikasyonuna gerek olmadan yükseltgenme yönündeki kantitatif analizinin hızlı, hassas ve seçici bir şekilde yapılmasına imkan sağladı. Ayrıca, bu elektrotlar ile sefepimin biyolojik sıvılardan (serum) ve farmasötik dozaj formlarından analizi de bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirildi. Sonuç olarak hızlı, ekonomik ve literatürdeki yöntemlere göre tercih edilebilecek daha hassas bir yöntem geliştirilerek literatüre katkıda bulunuldu.

9. KAYNAKLAR

1. Brett CMA, Brett AMO (1993). *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. Oxford: Oxford University Press.
2. Santos MCG, Tarley CRT, Dall'Antonia LH, Sartori ER (2013). Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations. *Sens Actuators B* 188: 263-270.
3. Svorc L, Sochr J, Rievaj M, Tomcik P, Bustin D (2012). Voltammetric determination of penicillin V in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond electrode. *Bioelectrochemistry* 88: 36-41.
4. Jain R, Gupta VK, Jadon N, Radhapyari K (2010). Voltammetric determination of cefixime in pharmaceuticals and biological fluids. *Anal Biochem* 407: 79-88.
5. Ozkan SA, Uslu B, Aboul-Enein HY (2003). Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Crit Rev Anal Chem* 33: 155-181.
6. Uslu B, Ozkan SA (2007). Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Anal Lett* 40: 817-853.
7. Gupta VK, Jain R, Radhapyari K, Jadon N, Agarwal S (2011). Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals-A review. *Anal Biochem* 408: 179-196.
8. Preeti N, Harish CJ (2010). On-chip electrochemical determination of cefepime. *Instrum Sci Technol* 38: 376-383.
9. Hancock RE, Bellido F (1992). Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 29: 1-6.
10. Barbhaiya RH, Knupp CA, Forgue ST, Matzke GR, Halstenson CE, Opsahl JA, Pittman KA (1991). Disposition of the cephalosporin cefepime in normal and renally impaired subjects. *Drug Metab Dispos* 19: 68-73.
11. Palacios FJJ, Mochon MC, Sanchez JCJ, Carranza JH (1999). Electrochemical reduction of cefepime at the mercury electrode. *Electroanal* 12: 296-300.
12. Dural EAÖ (2008). *Farmakoloji*. Dördüncü baskı. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul.

13. Rule R, Lacchini R, Mordujovich P, Antonini A (2004). Evaluation of cefepime kinetic variables and milk production volume in goats. *Arq Bras Med Vet Zootec* 56: 116-118.
14. Elliott TSJ, Greenwood D (1984). The morphological response of *Pseudomonas aeruginosa* to azthreonam, cefoperazone, ceftazidime and N-formimidoyl thienamycin. *J Med Microbiol* 17: 159-169.
15. Hayes MV, Ward JB (1986). The role of penicillin-binding proteins in the antibacterial activity of β -lactam antibiotics. *Antibiotics in laboratory medicine*. 2nd ed. Baltimore: Williams Wilkins, Baltimore, 722-756.
16. Yu LV, Merigan TC, Barriere SL (1999). *Antimicrobial therapy and vaccines*. 1st ed. USA: Williams Wilkins.
17. Rayaman E (2010). Bazı antibiyotik kombinasyonlarının post antibiyotik etkileri ve post antibiyotik lökosit aktivite artışı üzerine etkisi. Doktora tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
18. Lodise Jr TP, Rhoneyb DH, Tam VH, McKinnond PS, Drusano GL (2006). Pharmacodynamic profiling of cefepime in plasma and cerebrospinal fluid of hospitalized patients with external ventriculostomies. *Diagn Microbiol and Infect Dis* 54: 223-230.
19. Akova M, Kayaalp SO (2012). Beta-laktam antibiyotikler II: Sefalosporinler ve diğerleri. *Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* (Ed: Kayaalp SO). Ankara, 203-213.
20. Yıldız A, Genç Ö (1993). *Enstrümental Analiz*. Birinci baskı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara; 352.
21. Bard A, Faulkner, LRJ (2001). *Electrochemical methods: Fundamentals and application*. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc, 19-20.
22. Çakmak Z (2013). Aklonifen pestisitinin elektrokimyasal tekniklerle incelenmesi ve tayini. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
23. Harris DC (2015). *Quantitative Chemical Analysis*. Nicel Kimyasal Analiz. 8th ed. Çeviren: Türker AR, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti., Ankara, 279-385.

24. Kaya B (2014). Antipsikotik ilaç ketiapin fumaratın karbon nanotüp modifiyeli camısı karbon elektrot ile elektrokimyasal analizi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
25. Goodridge F, King CJH (1974). Technique of electroorganic synthesis. Part 1 (Ed: Weinberg, NL). NewYork.
26. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2004). Fundamentaly of Analytical Chemistry. Analitik Kimya Temel İlkeler. 8th ed. Çeviren: Kılıç E, Yılmaz H, Bilim Kitap Kırtasiye Ltd. Şti., Ankara, 633-664.
27. Gündüz T (2007). İnstrümental Analiz. Onuncu baskı. Gazi Kitabevi Tic. Ltd. Şti, Ankara; 849-1113.
28. Henden E, Gökçel Hİ, Ertaş FN (2001). Eser Analiz Yaz Okulu, İzmir, 25-29 Haziran 2001, 151-160.
29. Sarıkoç S (2009). Kil ile modifiye edilmiş elektrot kullanarak bazı ağır metallerin voltametrik yöntemle tayin edilmesi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
30. 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.
31. Çorbacıoğlu F (2013). Kondanse 1,4-dihidropiridin türevlerinin antioksidan kapasitelerinin elektrokimyasal yöntemle incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
32. Urhan BK (2015). PbO-indirgenmiş grafen oksit nanokompozitlerinin elektrokimyasal sentezi ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
33. Umacı B (2014). Grafen modifiye bakır ve Ag, Cd, Cu tek tabakalı Au elektrotlar üzerinde nitratın elektrokimyasal indirgenmesi. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
34. Tural H, Gökçel Hİ, Ertaş FN (2003). Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler. Birinci baskı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No.186, İzmir; 131.

35. Baycan F (2006). Zopiklon'un voltametrik metotlar ile elektrokimyasal davranışının incelenmesi ve ilaçlarda kantitatif tayini. Yüksek lisans tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
36. Adams RN, McClure JH, Morris JB (1958). Chronopotentiometric studies at solid electrodes. Anal Chem 30: 471-475.
37. Skoog DA, Leary JJ (1996). Principles of instrumental analysis. 4th ed. Saunders College Publishing, 538.
38. Wudarska E, Chrzescijanska E, Kusmieriek E, Rynkowski J (2015). Voltammetric study of the behaviour of N-acetyl-p-aminophenol in aqueous solutions at a platinum electrode. C R Chim 18: 993-1000.
39. Wei J, Yang D, Chen H, Gao Y, Li H (2014). Stripping voltammetric determination of mercury(II) based on SWCNT-PhSH modified gold electrode. Sens Actuators B 190: 968-974.
40. Gerent GG, Spinelli A (2016). Environmentally-friendly in situ plated bismuth-film electrode for the quantification of the endocrine disruptor parathion in skimmed milk. J Hazard Mater 308: 157-163.
41. Lee AF (1983). Modern applications of polarography and voltammetry to inorganic analysis. Mintek No.M95: 1-32.
42. Karabudak F (2013). Voltametrik yöntemler ve uygulamaları. Bitirme tezi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri.
43. Flechsig GU, Korbut O, Gründler P (2001). Investigation of deposition and stripping phenomena at the heated gold wire electrode in comparison to the rotating disk electrode: Copper(II), mercury(II), and arsenic(III). Electroanalysis 13: 786-788.
44. Bagotsky VS (2015). Fundamentals of Electrochemistry. Elektrokimyanın Temelleri. 2nd ed. Çeviren: Tapan NA, Aksu ML, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 1-417.
45. Güney S (2010). Modifiye elektrotların geliştirilmesi ve voltametrik tayinlerde kullanılmalarının incelenmesi. Doktora tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

46. Şaka T (2009). Yeni tip epoksi matriks voltametrik elektrotların geliştirilmesi; ürik asit, askorbik asit ve dopamin gibi biyolojik moleküllerin tayinine uygulanması. Doktora tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
47. Kounaves SP (1997). Voltammetric techniques. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry (Ed: Settle FA). New Jersey, 709-725.
48. Özkan SA, Uslu B, Aboul-Enein HY (2010). Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. Crit Rev Anal Chem 33: 155–181.
49. Gürler B (2011). Bazı tetrasiklinlerin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi ve voltametrik tayinleri için moleküler baskılanmış polimer modifiye elektrotların hazırlanması. Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
50. Wang J (2000). Analytical Electrochemistry. İkinci baskı. John Wiley and Sons, Inc.,USA; 1-190.
51. Greef RG, Peat R, Peter LM, Pletcher D, Robinson J (1990). Instrumental methods in electrochemistry. 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1-443.
52. Wopschall RH, Shain I (1967). Effects of adsorption of electroactive species in stationary electrode polarography. Anal Chem 39: 1514-1527.
53. Bontempelli G, Toniolo R (2005). Voltammetry | Linear sweep and cyclic. Encyclopedia of Analytical Science (Ed: Townshend A, Poole CF, Worsfold PJ). San Diego, 188-197.
54. Kontoyannis CG, Antimisiaris SG, Douroumis D (1999). Simultaneous quantitative determination of diazepam and liposomes using differential pulse polarography. Anal Chim Acta 391: 83–88.
55. Scholz F (2010). Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Applications. İkinci baskı. Springer-Verlag GmbH, Germany; 366.
56. Kissinger PT, Heineman WR (1984). Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry. İkinci baskı. Marcel Dekker, Inc., New York.
57. Copeland TR, Skogerboe RK (1974). Anodic stripping voltammetry Anal Chem 46: 1257–1268.

58. Cheize M, Sarthou G, Croot PL, Bucciarelli E, Baudoux AC, Baker AR (2012). Iron organic speciation determination in rainwater using cathodic stripping voltammetry. *Anal Chim Acta* 736: 45-54.
59. Campos MLAM (1997). New approach to evaluating dissolved iodine speciation in natural waters using cathodic stripping voltammetry and a storage study for preserving iodine species. *Marine Chemistry* 57: 107-117.
60. Skrzypeka S, Ciesielskia W, Sokołowska A, Yilmaz S, Kaźmierczaka D (2005). Square wave adsorptive stripping voltammetric determination of famotidine in urine. *Talanta* 66: 1146–1151.
61. Korolczuk M, Moroziewicz A, Grabarczyk M (2005). Determination of subnanomolar concentrations of cobalt by adsorptive stripping voltammetry at a bismuth film electrode. *Anal Bioanal Chem* 382: 1678-1682.
62. Jaber AMY, Lounici A (1994). Adsorptive differential-pulse stripping voltammetry of norfloxacin and its analytical application. *Analyst* 119: 2351-2357.
63. Kul D, Uslu B, Özkan SA (2011). Electrochemical determination of anti-hyperlipidemic drug ezetimibe based on its oxidation on solid electrodes. *Anal Lett* 44: 1341-1357.
64. Camposa RC, Cestarollia DT, Mulatob M, Guerraa EM (2015). Comparative sensibility study of WO₃ pH sensor using EGFET and cyclic voltammetry. *Mat Res* 18: 15-19.
65. Ye RH, Qiu B, Liu GC (2009). Study on electrochemical behaviour of cefepime at glassy carbon electrode. *Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition)* 37: 430-434.
66. Stirbet D, Stoica AI, Radu GL (2013). Studies on the electrochemical behaviour of cephalosporins at different types of working electrodes. *Revista de Chimie* 64: 974-977.
67. Nigam P, Joshi HC (2010). On-chip electrochemical determination of cefepime. *Instrum Sci Technol* 38: 376-383.

68. Shahrokhian S, Hosseini-Nassab N, Ghalkhani M (2014). Construction of Pt nanoparticle-decorated graphene nanosheets and carbon nanospheres nanocomposite-modified electrodes: Application to ultrasensitive electrochemical determination of cefepime. *RSC Adv* 4: 7786-7794.
69. El-Rabbat NA, Abdel-Wadood HM, Sayed M, Mousa HS (2010). High-performance liquid chromatographic determination and pharmacokinetic study of cefepime in goat plasma and milk after pre-column derivatization with Hg(I). *J Sep Sci* 33: 2599-2609.
70. Duan W, Xia D, Guo T (2008). Determination of cefepime in human plasma by HPLC. *Zhongguo Yaofang* 19: 2262-2264.
71. Gonzalez JAO, Mochon MC, Rosa FJB (2005). Simultaneous determination of cefepime and the quinolones garenoxacin, moxifloxacin and levofloxacin in human urine by HPLC-UV. *Microchimica Acta* 151: 39-45.
72. Cherti N, Kinowski JM, Lefrant JY, Bressolle F (2001). High-performance liquid chromatographic determination of cefepime in human plasma and in urine and dialysis fluid using a column-switching technique. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 754: 377-386.
73. Chang YL, Chou MH, Lin MF, Chen CF, Tsai TH (2011). Determination and pharmacokinetic study of unbound cefepime in rat bile by liquid chromatography with on-line microdialysis. *J Chromatogr A* 914: 77-82.
74. Chen YR, Lin SJ, Chou YW, Wu HL, Chen SH (2005). Simultaneous determination of cefepime and L-arginine by micellar electrokinetic chromatography and applications to commercial injections. *J Sep Sci* 28: 2173-2179.
75. Sankar DG, Krishna MV, Kumar DVSP, Latha PVM (2005). UV spectrophotometric determination of tolterodine tartrate and cefepime. *Asian J Chem* 17: 2028-2030.
76. Sankar DG, Latha PVM, Kumar BA, Babu PJ (2006). Spectrophotometric determination of cefepime and ezetimibe. *J Inst Chem (India)* 78: 129-131.
77. Minu S, Abraham S, Divakar MC (2010). Visible spectrophotometric method for the estimation of cefepime. *Hygeia* 2: 32-37.

78. Zhang S (2007). Determination of cefepime hydrochloride by flow injection chemiluminescence based on NBS-fluorescein reaction. *Huaxue Yanjiu Yu Yingyong* 19: 118-120.
79. Liu H, Sunderland VB (2004). Validated method for simultaneous determination of cefepime and L-Arginine in cefepime for injection by capillary zone electrophoresis. *J Liq Chromatogr Rel Tech* 27: 3065-3076.
80. Palacios FJJ, Mochon MC, Sanchez JCJ, Carranza JH (2000). Electrochemical reduction of cefepime at the mercury electrode. *Electroanal* 12: 296-300.
81. Palacios FJJ, Mochon MC, Sanchez JCJ, Carranza JH (2003). Adsorptive stripping voltammetric determination of cefepime at the mercury electrode in human urine and cerebrospinal fluid, and differential pulse polarographic determination in serum. *J Pharm Sci* 92: 1854-1859.
82. Balaji K, Reddaiah K, Reddy TM, Reddy SRJ (2011). Voltammetric reduction behavior and electrode kinetics. *Port Electrochim Acta* 29: 177-185.
83. Barbosa AMJ, de Araujo TA, Trindade MAG, Ferreira VS (2012). Direct cefepime determination in human milk using solid mercury amalgam electrode manufactured with silver nanoparticles. *J Electroanal Chem* 681: 127-132.
84. Ozkan SA, Uslu B, Zuman P (2002). Electrochemical reduction and oxidation of the antibiotic cefepime at a carbon electrode. *Anal Chim Acta* 457: 265-274.

10. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ BİLİMSSEL
ARAŞTIRMALAR
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

Sayı: 24237859- 505
Konu: Onay Belgesi

Tarih:15/09/2015

Sayın; Y.Doç.Dr.Dilek KUL
Analitik Kimya ABD.

“Antibakteriyel İlaç Sefepimin Karbon Esaslı Elektrotlar ile Elektrokimyasal Oksidasyonu ve Farmasötiklerden ve Serumdan Kantitatif Tayini” başlıklı etik kurul 2015/109 no.lu tez çalışması raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik Kurul Başkanı

Eki : 1 onay belgesi

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : Öztürk, Gökçe
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 07.11.1989 / Sürmene
Medeni hali : Bekâr
E-Posta : gokceozturk@ktu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı	2016
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2012
Lise	Sürmene Lisesi	2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2016-

YABANCI DİL

İngilizce