T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTİSÜ

DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN VOLTAMETRİK YÖNTEMLE ELEKTROANALİTİK İNCELENMESİ

Yalçın ALTUNKAYNAK

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Nisan – 2021

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Yalçın ALTUNKAYNAK tarafından yapılan "**Diyabet Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçların Voltametrik Yöntemle Elektroanalitik İncelenmesi**" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ömer YAVUZ

Üye : Prof. Dr. Fırat AYDIN

Üye : Prof. Dr. Birol OTLUDİL

Üye : Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

Üye : Prof. Dr. İbrahim TEĞİN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 19/04/2021

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../.....

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanma aşamasından başlayarak tez çalışması ve hazırlanması süresince her türlü ilgi ve yardımlarıyla sürekli yanımda olan, çalışma azmiyle örnek aldığım ve desteğini her an yanımda hissettiğim danışman hocam; Sayın Prof. Dr. Ömer YAVUZ′a teşekkür ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez izleme komitesinin saygıdeğer hocalarından Prof. Dr. Fırat AYDIN ve Prof. Dr. Birol OTLUDİL'e çalışmalarım sürecinde göstermiş oldukları içtenlikleri, bilimsel düşünceleriyle katılımları ve anlayışlarından dolayı sonsuz teşekkürler.

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi birikim ve önerileriyle bana yol gösteren, içten ve samimi davranışlarıyla sürekli yanımda olan, Batman Üniversitesi Fen Edebiyat fakültesi Kimya bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT ve Batman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Meslek Yüksekokulu hocalarından Doktor Öğretim Üyesi Günay ÖNAL'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında, büyük bir sabır ve özveri göstererek destekleriyle bana güç veren, eşim Feryal ile çocuklarım Enes, Azra ve Yusuf'a, sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

2021

Yalçın ALTUNKAYNAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR……. I

İÇİNDEKİLER……..... II

ÖZET……..... VI

ABSTRACT……..... VIII

ÇİZELGE LİSTESİ……..... X

ŞEKİL LİSTESİ……..... XII

KISALTMA VE SİMGELER……. XV

1. GİRİŞ……..... 1

2. 2.KAYNAK ÖZETLERİ …….. 3

2.1. Diyabet ve Diyabet Tedavisinde Kullanılan İlaçlar……. 3

2.1.1. İnsülin ……..... 5

2.1.2. Ağız Yolu İle Kullanılan Tabletler (Oral Antidiyabetik İlaçlar)……. 6

2.1.2.1. İnsülin Salgılatıcı İlaçlar…….. 6

2.1.2.2. İnsülin Duyarlılaştırıcı İlaçlar…….. 6

2.1.2.3. Alfa Glikozidaz İnhibitörleri…… 7

2.1.2.4. İnsülinomimetik İlaçlar…….. 7

2.1.3. Metformin……..... 8

2.1.3.1. Metformin'in Antidiyabetik Etki Mekanizması…….. 9

2.1.4. Vildagliptin…….. 9

2.1.5. Metformin ve Vildagliptin için uygulanan analiz yöntemleri ……. 10

2.1.5.1 Farmasötik Formülasyonlarda Analiz…….. 10

2.1.5.2. Tedavi Öncesi Hazırlanan Formülasyonun Kalite Kontrolü……... 10

2.1.5.3. Formülasyon Çalışmaları……. 11

2.1.5.4. Biyolojik Örneklerde Analiz……..... 11

2.1.6. Metformin Ve Vildagliptin İçin Uygulanan Elektroanalitik Yöntemler ……. 12
2.2. Katı Elektrot Voltametrisi ile İlgili Genel Bilgi…….. 14
2.2.1. Elektrokimyasal Hücreler…… 16
2.2.2. Çözücüler ve Destekleyici Elektrolitler……..…….. 18
2.2.3. Oksijen Giderimi……..... 18
2.2.4. Cihazlar……...…… 18
2.2.5. Çalışma Elektrotları……..... 20
2.2.5.1. Civa Elektrotları…… 20
2.2.5.2. Katı Elektrotlar…… 21
- Karbon Elektrotlar……. 21
- Camsı Karbon Elektrotlar……. 21
- Karbon Pasta Elektrotlar……... 22
- Karbon Fiber Elektrotlar……... 23
- Kalem-Ucu Grafit Elektrot…….……..... 23
- Elmas Elektrotları…….. 24
2.2.5.3. Metal Elektrotlar…….. 25
2.2.5.4. Kimyasal Olarak Modifiye Edilmiş Elektrotlar……... 25
2.2.6. Voltametrik Yöntemler……..... 26
2.2.6.1. Dönüşümlü Voltametri…….…… 26
2.2.6.2. Puls Voltametrisi……..... 28
-Normal Puls Voltammetri……... 29
-Diferansiyel Puls Voltametrisi…… 30
-Kare Dalga Voltametrisi…….……..... 30
2.2.6.3. SıyırmaVoltametrisi…….…… 31
3. MATERYAL ve METOT……. 33
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler…….. 33
3.1.1. Kimyasal Maddeler……. 33

3.1.2. Çözeltilerin Hazırlanması…… 33
3.1.2.1. Vildagliptin Çözeltisinin Hazırlanması…… 33
3.1.2.2. Metformin Çözeltisinin Hazırlanması……..…… 33
3.1.2.3. Destek Elektroliti Çözeltilerinin Hazırlanması…… 34
3.1.2.4. Sürfaktan Çözeltilerinin Hazırlanması……. 34
3.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler……..... 35
3.2.1. Voltametrik Sistem……. 35
3.3. Voltametrik Yöntem……...…..... 37
3.3.1. Voltametrik Yöntemin Gerçek Örneklerde Uygulaması……..... 38
3.3.1.1. Enjektabl Çözeltiler……. 38
3.3.1.2. İdrar Örnekleri……. 38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……. 41
4.1. Vildagliptin'in Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi……. 41
4.1.1. Dönüşümlü Voltametri……. 41
4.1.1.1. Gerilim Tarama Hızının Etkisi…… 43
4.1.2. Sıyırma Voltametrisi…….. 49
4.1.2.1 Destek Elektroliti ve pH Etkisi……. 49
4.1.2.2. Sürfaktan Yükünün Etkisi……..... 54
4.1.2.3. Biriktirme Koşullarının Etkisi…….. 55
4.1.2.4 Kare-Dalga Değişkenlerinin Etkisi…….. 56
4.2. Vildagliptin′in Kalem-ucu Grafit Elektrot Üzerinde Tayini……. 59
4.2.1. Geliştirilen Yöntemin Analitik Performans Özelliklerinin İncelenmesi……. 59
4.2.2. Gerçek Örnek Analizleri…… 62
4.2.2.1. Enjektabl Çözeltiler……. 62
4.2.2.2. İdrar Örnekleri……..... 63
4.2.2.3. Girişim Çalışması …… 65
4.3. Metformin'in Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi……..…. 65

4.3.1. Dönüşümlü Voltametri…….. 66

4.3.1.1. Gerilim Tarama Hızının Etkisi……..…. 68

4.3.2. Sıyırma Voltametrisi…….. 73

4.3.2.1. Destek Elektroliti ve pH Etkisi……... 73

4.3.2.2. Sürfaktan Yükünün Etkisi……... 76

4.3.2.3. Biriktirme Koşullarının Etkisi……. 77

4.3.2.4. Kare-Dalga Değişkenlerinin Etkisi ……..…… 78

4.4. Metformin′in Kalem-ucu Grafit Elektrot Üzerinde Tayini……..…… 81

4.4.1. Geliştirilen Yöntemin Analitik Performans Özelliklerinin Incelenmesi……..... 81

4.4.2. Gerçek Örnek Analizleri…….. 84

4.4.3. Enjektabl Çözeltiler……..…… 84

4.4.4. İdrar Örnekleri…… 85

4.4.5. Metformin Üzerine Girişim Çalışması…….. 87

5. SONUÇ VE ÖNERİLER…….…….…..... 89

6. KAYNAKLAR…….……..... 91

ÖZGEÇMİŞ……... 99

ÖZET

DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN VOLTAMETRİK YÖNTEMLE ELEKTROANALİTİK İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Yalçın ALTUNKAYNAK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2021

Antidiyabetik ajan olarak kullanılan ilaç gruplarından Dipeptidil peptidaz 4 inhibitörü; (DPP4-İ) 2006 yılında ilk olarak stagliptin olarak üretilmiştir. DPP-4 inhibitörü olarak kullanılan ilaçlar genel olarak vildagliptin, saxagliptin, alogliptin ve denagliptin'dir. Metformin, Tip 2 Diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan ağızdan alınan ve insülin duyarlılığını arttıran bir ilaçtır.

Bu çalışmada, Diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlarından Vildagliptin ve Metformin'in tayini için tek kullanımlık kalem ucu grafit (PG) elektrotunun yeni bir uygulaması sunulmuştur. Vildagliptin′in elektrokimyasal yükseltgenmesi dönüşümlü voltametri ile yaklaşık 1.13 V' ta tersinmez ve difüzyon kontrollü bir adsorpsiyon yükseltgenme piki göstermiştir. Özel ilgi ise, geniş bir pH aralığında (2.0-12.0) sürfaktansız ve sürfaktan içeren sulu çözeltilerde PG ve camsı karbon (GC) (kıyas amaçlı) elektrotlarının yüzeyinde kare dalga voltametrisinin kullanılmasına gösterilmiştir. Kare dalga voltametrisi kullanılarak akım, PBS tamponunda, pH 9.0' da 2.94 µM ile 49.98 µM arasında derişim ile doğrusal bir bağıntı göstermiştir. 2.94 µM (n = 9) derişim seviyesinde, 8.20 nM (2.48 ng mL^{-1}) tayin sınırı (LOD) ve % 2.95 bağıl standart sapma hesaplandı.

Antidiyabetik ajan olarak kullanılan ilaçlardan olan Metformin(MET)'in elektrokimyasal özellikleri ve miktar tayini, NaOH (0.1 M) ortamında kalem grafit (PG) elektrot kullanılarak gerçekleştirildi. Bu bileşik yaklaşık 1.28 V'ta tersinmez bir yükseltgenme piki vermiştir. NaOH ortamında, Kare dalga voltametrisi kullanılarak akım, 2.76 – 24.8 µM arasında derişim ile doğrusal bir bağıntı göstermiştir. 2.76 µM (n = 9) derişimde, 9.03 nM (1.495 ng L^{-1}) tayin sınırı (LOD) ve % 3.25 bağıl standart sapma hesaplandı.

Geliştirilen voltametrik yöntem farmasötik preparatlarda ve idrar örneklerinde herhangi bir ayrıma işlemi yapılmadan Vildagliptin ve Metformin analizi için başarılı bir şekilde uygulandı.

Anahtar kelimeler: Vildagliptin, Metformin, Pencil Grafit Elektrot, Voltammetri, İlaç, İdrar

ABSTRACT

ELECTROANALYTIC EXAMINATION OF SOME DRUGS USED IN DIABETES TREATMENT WITH VOLTAMETRIC METHOD

PhD THESIS

Yalçın ALTUNKAYNAK

DİCLE UNIVERSITY
SCIENCE INSTITUTE
CHEMISTRY DEPARTMENT

2021

Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor (DPP4-I), one of the drug groups used as antidiabetic agents; It was first produced in 2006 as stagliptin. Drugs used as DPP-4 inhibitors are generally vildagliptin, saxagliptin, alogliptin and denagliptin. Metformin is an oral drug that is commonly used in the treatment of Type 2 Diabetes and increases insulin sensitivity.

In this study, a new application of a disposable pencil graphite electrode (PGE) for the determination of Vildagliptin and Metformin, which are the drugs used in the treatment of diabetes, is presented. Electrochemical oxidation of vildagliptin showed an irreversible and diffusion-controlled adsorption oxidation peak at approximately 1.13 V by cyclic voltammetry. Particular attention has been paid to the use of square wave voltammetry on the surface of PGE and glassy carbon (GC) electrodes (for comparison) in aqueous solutions without surfactant and surfactant over a wide pH range (2.0-12.0). Using square wave voltammetry, the current showed a linear correlation in PBS buffer at pH 9.0 with a concentration between 2.94 μM and 49.98 μM. At the concentration of 2.94 μM (n = 9), the limit of detection (LOD) of 8.20 nM (2.48 ng mL^{-1}) and a relative standard deviation of 2.95% were calculated.

Electrochemical properties and quantification of Metformin (MET), which is one of the drugs used as an antidiabetic agent, was carried out using pencil graphite electrode (PGE) in NaOH (0.1 M) environment. This compound gave an irreversible peak of oxidation at about 1.28 V. Using square wave voltammetry in NaOH environment, the current showed a linear correlation with a concentration of 2.76 - 24.8 μM. At a concentration of 2.76 μM (n = 9), the limit of detection (LOD) of 9.03 nM (1.495 ng L^{-1}) and a relative standard deviation of 3.25% were calculated.

The developed voltammetric method was successfully applied for Vildagliptin and Metformin analysis in pharmaceutical preparations and urine samples without any separation.

Keywords: Vildagliptin, Metformin, Pencil Graphite Electrode, Voltammetry, Drug, Urine

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 2.1.	Diyabet tedavisinde kullanılan Vildagliptin'in kimyasal yapısı ve genel özellikleri	8
Çizelge 2.2.	Metformin ve Vildagliptin bileşiklerinin diğer ayırma yöntemleriyle analizi	12
Çizelge 2.3.	Kontrollü Potansiyel Tekniklerin Özellikleri	16
Çizelge 3.1.	Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar	33
Çizelge 3.2.	Kullanılan cihaz ve malzemeler	35
Çizelge 4.1.	Vildagliptin voltamogramlarındaki pik akımı ve pik gerilimi üzerinde gerilim tarama hızının etkisi	45
Çizelge 4.2.	Yapılan çalışmada kullanılan teknik, elektrot, çalışma ortamı ve yapılan ölçümler	50
Çizelge 4.3.	Vildagliptin voltamogramlarındaki pik gerilimi (Ep) ve pik akımı (ip) üzerinde pH etkisi	53
Çizelge 4.4.	Vildagliptin tayini için voltametrik yöntem ile elde edilen en iyi deneysel ve aletsel değişkenler	60
Çizelge4.5.	Farklı numunelerden VLDG analizine uygulanan voltametrik yöntemlerden elde edilen verilerin PG elektrot kullanılarak LSV tekniği ile elde edilen analitik değerlerle karşılaştırılması.	61
Çizelge 4.6.	Vildagliptin içeren tabletlerde voltametrik yöntem analiz bulguları.	63
Çizelge 4.7.	Vildagliptin eklenmiş idrar örneğinde voltametrik analiz bulguları	64
Çizelge 4.8.	58.8 mM VLDG için PG elektrot kullanılarak voltametrik girişim sonuçları	65
Çizelge 4.9.	Metformin voltamogramlarındaki pik akımı ve pik gerilimi üzerinde gerilim tarama hızının etkisi	69
Çizelge 4.10.	Yapılan çalışmada kullanılan teknik, elektrot, çalışma ortamı ve yapılan ölçümler	74
Çizelge 4.11.	Metformin tayini için voltametrik yöntem ile elde edilen en iyi deneysel ve aletsel değişkenler	82
Çizelge 4.12.	Farklı numunelerden MET analizine uygulanan voltametrik yöntemlerden elde edilen verilerin PG elektrot kullanılarak farklı yöntemler ile elde edilen analitik değerlerle karşılaştırılması.	83

Çizelge 4.13. Metformin içeren tabletlerde voltametrik yöntem analiz bulguları 85

Çizelge 4.14. Metformin eklenmiş idrar örneğinde voltametrik analiz bulguları 87

Çizelge 4.15. 5.51 mM Metformin'in 0.1M NaOH içinde PG elektrot kullanılarak gerçekleştirilen girişim toleransı 88

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	Diyabet tipleri A) Sağlıklı B) Tip 1 Diyabet C) Tip 2 Diyabet	4
Şekil 2.2.	Voltametrik ölçümler için bir hücrenin şematik diyagramı: çalışma elektrodu (WE), referans elektrodu (RE), karşı (yardımcı) elektrot (CE) , Azot gazı (N_2)	17
Şekil 2.3.	Üç elektrotlu bir potansiyostatın şematik diyagramı	19
Şekil 2.4.	A) Camsı karbon malzemesinin yapısı B) Ticari camsı karbon elektrot C) Ticari camsı karbon elektrot kesit görünümü	22
Şekil 2.5.	A) Ticari kurşun kalem B) Kalem-ucu grafit elektrotunun şematik gösterimi	24
Şekil 2.6.	Yaygın olarak kullanılan voltametrik tekniklerin genel bir sınıflandırması	26
Şekil 2.7.	Dönüşümlü bir voltametrik deneyde potansiyel - zaman grafiği	28
Şekil 2.8.	Tersinir bir O + n ē ↔ R redoks işlemi için tipik dönüşümlü voltamogram	28
Şekil 2.9.	Normal puls voltametri için uyarma sinyali	29
Şekil 2.10.	Diferansiyel puls voltametri için uyarma sinyali	30
Şekil 2.11.	Genliği gösteren kare-dalga dalga formu(Esw), adım yüksekliği (ΔE), kare dalga periyodu (T), gecikme süresi (Td) ve mevcut ölçüm zamanları 1 ve 2'dir	31
Şekil 2.12.	A) Sıyırma voltametrisi tekniğinin şematik gösterimi ve B)Tipik bir sıyırma voltamogramı	32
Şekil 3.1.	A) Autolab PGSTAT 128N elektrokimyasal analizör B) BAS C3 katı elektrot hücre standı ünitesi	36
Şekil 3.2.	Voltametrik hücre bileşenleri	36
Şekil 4.1.	5.88×10^{-3} M Vildagliptin′in PBS (pH 9.0) tamponu içinde dönüşümlü voltamogramı	42
Şekil 4.2.	5.88×10^{-5} M Vildagliptin′in PBS (pH 9.0.0) tamponu içinde iki döngülü voltamogramı	43
Şekil 4.3.	5.88×10^{-4} M Vildagliptin′in PBS (pH 9.0) tamponu içinde 1) 50, 2) 100, 3) 200, 4) 300, 5) 400, 6) 500, 7) 600, 8) 700, 9) 800 mVs^{-1} gerilim tarama hızlarıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramları	44

Şekil 4.4. Vildagliptin′e ait gerilim tarama hızı-pik akımı ilişkisi. 46

Şekil 4.5. Vildagliptin′e ait Log V/ Ep ilişkisi. Vildagliptin derişimi, 5.88×10^{-4} M; yöntem, CV; destek elektroliti, PBS tamponu (pH 9.0); elektrot, PG 48

Şekil 4.6. Vildagliptin molekülünün tahmini yükseltgenme mekanizması 48

Şekil 4.7. SWV ile DPV tekniklerini kullanarak PG ve GC elektrotların karşılaştırılması 51

Şekil 4.8. $5.88\text{x}10^{-4}$ M VLDG'in SWV tekniği ve PG elektrot kullanarak farklı destek elektrolitlerindeki voltamogramları 52

Şekil 4.9. Vildagiptin pik gerilimi (E_p) ve pik akımı (i_p) üzerine pH etkisi 53

Şekil 4.10. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin′in sürfaktansız ya da sürfaktan (CTAB, TRİTON, SDS,) içeren PBS tamponu içinde (pH 9.0) elde edilen SWV eğrileri 55

Şekil 4.11. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in PBS tamponu (pH 9.0) içinde elde edilen SWV eğrileri üzerinde biriktirme süresi (A) ve biriktirme gerilimi (B) etkisi 56

Şekil 4.12. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in PBS tamponu (pH 9.0) içinde PG elektrot yüzeyinde farklı amlitüd SWV akım eğrileri 57

Şekil 4.13. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in PBS tamponu (pH 9.0) içinde PG elektrot yüzeyinde farklı adım potansiyellerindeki SWV akım eğrileri 58

Şekil 4.14. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in PBS tamponu (pH 9.0) içinde PG elektrot yüzeyinde farklı frekanslardaki SWV akım eğrileri 59

Şekil 4.15. (A) Vildagliptin [1) 2.94, 2) 8.82, 3)14.71, 4)20.58, 5) 26.46, 6) 32.37, 7) 38.22, 8) 44.11, 9) 49.98 µM] içeren PBS tamponu (pH 9.0) içerisinde kaydedilen SWV eğrileri 62

Şekil 4.16. A) İdrar örneğinin PBS tamponu (pH 9.0) içerisinde kaydedilen SWV eğrileri (seyrelme oranı 1:100 (h/h): Vildagliptin eklenmemiş (kesikli çizgi), 1) 2.94×10-6 M Vildagliptin eklenmiş, (2–9) 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 µL standart eklemeler sonrası (CVildagliptin = 5.88×10-3 M) 64

Şekil 4.17. 5.51×10-3 M Metformin′in 0.1 M NaOH içinde dönüşümlü voltamogramı. 66

Şekil 4.18. 5.51×10-3 M Metformin'in 0.1 M NaOH çözeltisi içinde iki döngülü voltamogramı. 67

Şekil 4.19. A) 5.51×10-3 M Metformin′in 0.1 M NaOH çözeltisi içinde PG elektrot kullanılarak 1) 25, 2) 50, 3) 100, 4) 200, 5) 300, 6) 400, 7) 500, 8) 600, 9) 700 mVs-1 gerilim tarama hızlarıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramları. B) A'nın büyütülmüş şeklinin bir kesiti C) A ve B'nin birleştirilmiş şekli 68

Şekil 4.20. Metformin′e ait gerilim tarama hızı-pik akımı ilişkisi 70

Şekil 4.21. Metforminin olası yükseltgenme mekanizması 72

Şekil 4.22. Metformin′e ait Log V/ Ep ilişkisi 72

Şekil 4.23. SWV tekniği kullanarak PG ve GC elektrotların karşılaştırılması (Düz çizgi PG, Kesikli çizgi GC) 75

Şekil 4.24. $5.51x10^{-3}$ M Metformin'in PG elektrot yüzeyinde BR 11, BR 12 ve 0.1 M NaOH destek elektrolitleri içinde elde edilen SWV eğrileri 75

Şekil 4.25. 5.51×10^{-3} M Metformin′in sürfaktansız ya da sürfaktan (CTAB, TRİTON, SDS,) içeren NaOH içinde (0.1 M) elde edilen SWV eğrileri 77

Şekil 4.26. 5.51×10^{-3} M Metformin'in 0.1 M NaOH içinde elde edilen SWV eğrileri üzerinde biriktirme gerilimi (A) ve (B) biriktirme süresi etkisi 78

Şekil 4.27. 5.51×10^{-3} M Metformin'in 0.1 M NaOH içinde PG elektrot yüzeyinde farklı amlitüd SWV akım eğrileri 79

Şekil 4.28. 5.51×10^{-3} M Metformin'in 0.1 M NaOH çözeltisi içinde PG elektrot yüzeyinde farklı adım potansiyellerindeki SWV akım eğrileri 80

Şekil 4.29. 5.51×10-3 M Metformin'in 0.1 M NaOH çözeltisi içinde PG elektrot yüzeyinde farklı frekanslardaki SWV akım eğrileri A)10 Hz – 100 Hz arası frekans eğrileri B) 10 Hz – 50 Hz arası frekans eğrileri 81

Şekil 4.30. A) Metformin[1) 2.755, 2) 5.51, 3)8.265, 4)11.02, 5) 13.775, 6) 16.53, 7) 19.285, 8) 22.04, 9) 24.795 μM] içeren NaOH (0.1 M) çözeltisi içerisinde kaydedilen SWV eğrileri 84

Şekil 4.31. A) İdrar örneğinin 0.1 M NaOH içerisinde kaydedilen SWV eğrileri (seyrelme oranı 1:100 (h/h): Metformin eklenmemiş (kesikli çizgi), 1) 2.755×10-6 M Metformin eklenmiş, (2–7) 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 μL standart eklemeler sonrası (CMetformin = 5.51×10-3 M).) 86

Şekil 4.32. Metformin'in Cu(II), Ni(II) ve Co(II) ile karışım halinde 0.1 M NaOH ortamında PG elektrot ile SWV eğrileri 88

KISALTMA VE SİMGELER

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
A	Amper
AC	Alternatif akım
AdSV	Adsorptif sıyırma voltametrisi
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
ASV	Anodik sıyırma voltametrisi
Au	Altın
AuNPs/GCE	Altın nanopartikül/camımsı karbon elektrot
BDD	Bor-katkılı elmas
Bi	Bizmut
Bias	Dizgisel hata
BR	Britton-Robinson tampon Çözeltisi
BSS	Bağıl standart sapma
BTC	1,3,5-benzenetrikarboksilat
C	Derişim
C	Kulon
C^4D	Kapasitif eşleşmiş temassız iletkenlik
Cd	Kadmiyum
CE	Kapiler elektroforez
CF	Karbon-fiber
CMC	Kritik misel derişimi
CME	Kimyasal modifiye elektrot
CNT	Karbon nanotüp
CPE	Karbon pasta elektrot

CSV	Katodik sıyırma voltametrisi
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
Cu	Bakır
CV	Dönüşümlü voltametri
DAD	UV-diyot ışını dedeksiyonu
DC	Doğru akım
DMBA	Dimetilbenz[a]antrasen
DME	Civa damla elektrot
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetilsülfoksit
DP	Diferansiyel puls
DPP	Diferansiyel puls polarografisi
DPP4-İ	Dipeptidil peptidaz 4 inhibitörü
DPV	Diferansiyel puls voltametri
E	Gerilim
E_{acc}	Biriktirme (akümülasyon) gerilimi
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
E_p	Pik gerilimi
E_{pa}	Anodik pik gerilimi
E_{pc}	Katodik pik gerilimi
F	Faraday Sabiti
FIA	akışa-enjeksiyon analizi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi
g	Gram
GC	Gaz kromatografisi
GCE	Camsı karbon elektrot
v	Hacim

HMDE	Asılı civa damla elektrot
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
Hz	Hertz
In	İndiyum
i	Akım
i_p	Pik akımı
i_{pa}	Anodik pik akımı
i_{pc}	Katodik pik akımı
K_a	Asitlik sabiti
L	Litre
LC	Sıvı kromatografisi
log	Logaritma
LS	Doğrusal tarama
m	Eğim
M	Molarite
mA	Miliamper
MFE	Civa film elektrot
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MS	kütle spektrometrisi
mV	Milivolt
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
n	Redoks tepkimesinde aktarılan elektron sayısı
n	Deney sayısı
ng	Nanogram
Ni	Nikel

Nj-CPE	Nujol-temelli karbon pasta elektrot
NP	Normal puls
^{o}C	Santigrat derece
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
Pd	Palladyum
Pt	Platin
R	İdeal Gaz Sabiti
r	Korelasyon katsayısı
RGO-Au/GCE	İndirgen grafit oksit-altın nanokompozit/camsı karbon elektrot
Rh	Rodyum
rpm	Dakikada döngü sayısı
Ru	Rutenyum
s	Saniye
s	Standart sapma
S/N	Sinyal/gürültü
SDS	Sodyum dodesilsülfat
Sn	Kalay
SPC	Perde-baskılı karbon
SPE	Perde-baskılı elektrot
SW	Kare dalga
SW-AdSV	Kare-dalga adsorptif sıyırma voltametrisi
SWV	Kare-dalga voltametrisi
T	Mutlak sıcaklık (298 K)
T2DM	Tip 2 Diyabet
t_{acc}	Biriktirme (akümülasyon) süresi
TRT	Triton

v	Gerilim tarama hızı
V	Volt
VDG	Vildagliptin
α	Yük aktarım katsayısı
ΔE_s	Gerilim adımı
ΔE_{sw}	Puls amplitüdü
µA	Mikroamper
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar

1. GİRİŞ

Diyabet, günümüzde toplum sağlığını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen ve dünya genelinde kamu sağlığı ile ilgili sorunların sıralanmasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bundan dolayı, diyabet tedavisine yönelik ilaçlara günden güne daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda farklılaşan hayat şartları ve beslenme alışkanlıkları ile beraber obezite ve Tip 2 diyabet (T2DM) çok ciddi sağlık sorunları oluşturmaktadırlar. T2DM'in kaynağının insülin direnci olduğu bilinmektedir. Bu sebepten dolayı insülin duyarlandırıcı ajanlarla tedavi son birkaç yıldır daha fazla önem kazanmıştır. Dolayısıyla; diyabet tedavisinde kullanılan bileşiklerin değişik ilaç şekillerinden, biyolojik örneklerden (idrar, kan, doku, vb.) tespit edilmesi ve tayinlerine yönelik yeni bir yöntem geliştirme çalışmaları oldukça önemlidir.

Farmasötik (ilaç) ve klinik örneklerdeki analizler analitik kimyanın önemli bir parçası olup, farklı matris ortamında bulunan bileşiklerin tekli ya da eş zamanlı tayinleri tıp ve eczacılık biliminde son derece önemli bir rol oynar. Bu tür analizlere yönelik kullanılan analitik yöntemlerin; güvenilir ve duyarlı olmasının yanında geniş bir analitik derişim aralığında uygulanabilir olması, hızlı olması, basit olması (çok deneyimli personele gereksinim duymaması) ve donanım açısından maliyetinin düşük olması da çok önemlidir. Elektrokimyasal yöntemlerle özellikle voltametrik tekniklerle gerçekleştirilen farmasötik ve klinik analizler, eser analizlerin yapılabilir olmasına ek olarak örneklerin kolaylıkla ve kısa sürede hazırlanabilmesi ve analizin hızlı olması gibi üstünlükleriyle kaynakçadaki yerini sağlamlaştırmıştır. Öte yandan; farmakolojik değeri olan bileşiklerin yükseltgenme / indirgenme mekanizmalarının aaştırılması oldukça önemlidir. Bu araştırmalar, ilgili moleküllerin karmaşık biyolojik sistemlerle etkileşmesini açıklanabilir hale getirir. Elektroanalitik çalışmalarda yeni bir elektrot tasarlamak ne kadar önemliyse, mevcut bir elektrot üzerinde küçük değişiklikler yaparak ya da yapmadan elektrotun farklı uygulama alanlarının ortaya konulması da oldukça önemlidir.

Diyabet tarihi, genel olarak insülinin keşfi ve gelişim tarihi olarak kabul edilmektedir. İnsülin yaklaşık 100 yıldır diyabet tedavisinde kullanıldığı halde, etki mekanizmaları ve metabolizmaları üzerine çok az şey bilinmektedir. Bu grup antidiyabetik moleküler yapısında redoks etkin grupları yer aldığı halde, yapılarının çok

karmaşık olması nedeniyle elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesine yönelik çalışmaları yok denecek kadar azdır. Anti diyabetik ilaçlardan olan Metformin ve Vildagliptin bileşiklerinin redoks özelliklerinin incelenmesi üzerine kaynakçada Metformin ile ilgili eski tarihli sınırlı sayıda birkaç makale olup ilgili araştırmalarda Metformin için önerilen elektrokimyasal çalışmaların olduğu görülmektedir. Literatürde yer alan bu çalışmaların çoğunda elektrotların modifiye edildiği görülmektedir. Ancak Vildagliptin ile ilgili eski tarihli tek bir makale (Fadr ve ark. 2018) olup ilgili araştırmada CV ve LSV teknikleri ile yapılan incelemede çalışma elektrotu olarak platin (Pt) ve camsı karbon (GC) kullanılmıştır.

Yukarıdaki bilgilerin ışığında belirlenen tez çalışmasında; diyabet tedavisinde kullanımı giderek yaygınlaşan Metformin ve Vildagliptin bileşiklerinin yükseltgenme-indirgenme özelliklerinin incelenmesi ve tayinlerine uygun voltametrik bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde, Metformin ve Vildagliptin moleküllerinin karbon-temelli elektrotlar içinde yer alan kalem-ucu grafit ve camsı karbon (kıyas amaçlı) elektrotlar üzerinde geniş bir pH aralığındaki çeşitli destek elektroliti çözeltileri içerisinde (sürfaktan varlığında) elektrokimyasal davranışları ayrıntılı olarak incelenecektir. İkinci bölümde ise; ilk bölümdeki olumlu bulguların ışığında Metformin ve Vildagliptin tayinine yönelik etkili bir voltametri tekniği tanımlanacak, deneysel ve aletsel koşullar optimize edilecek ve analitik performans özellikleri araştırılacaktır. Son bölümde ise bileşiklerin farmasötik (ilaç) ve biyolojik örneklerdeki miktarının önerilen voltametrik yöntemle tayin edilebilirliği sınanacaktır.

Metformin ve Vildagliptin bileşiklerinin elektrokimyasal özelliklerinin ayrıntılı olarak incelenmesiyle birlikte voltametrik tayininin de gerçekleştirildiği geniş kapsamlı ve yeni bir araştırma konusunun ilk kez literatüre kazandırılması, bu tez çalışmasının asıl özgünlüğünü oluşturacağı açıktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Diyabet ve Diyabet Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

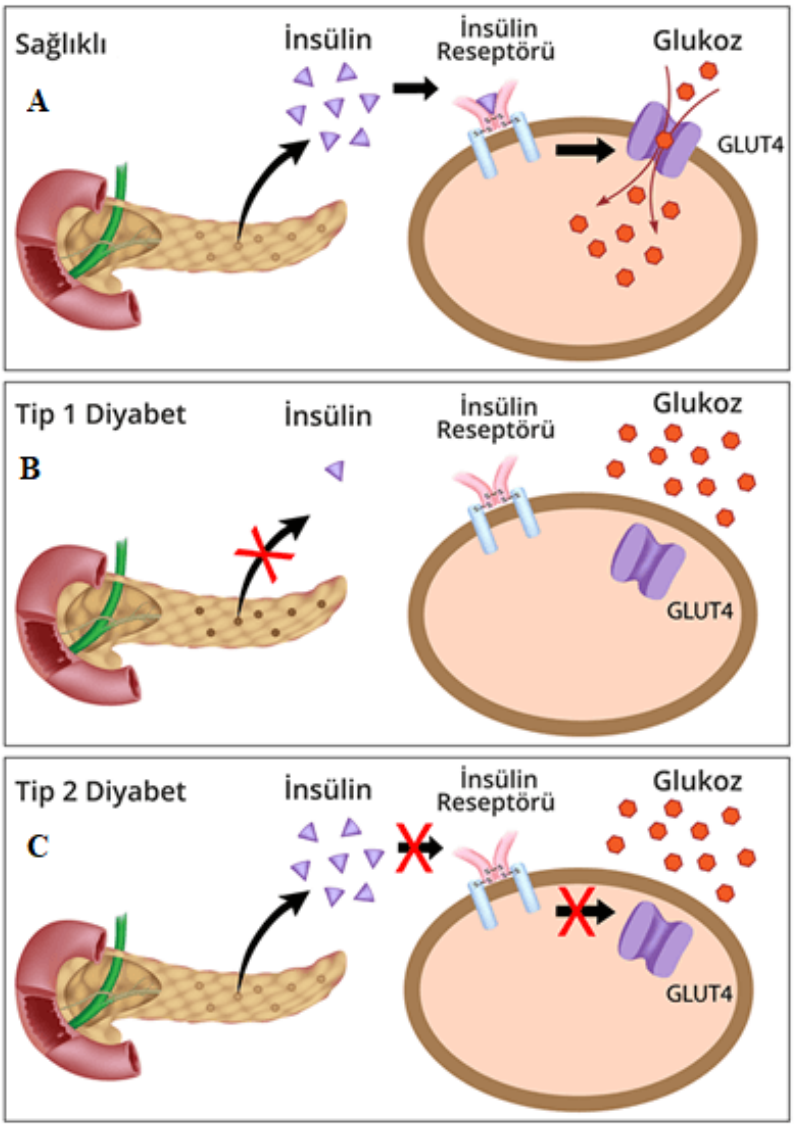
Bu tez çalışmasında geliştirilmesi düşünülen elektroanalitik yöntem, diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlardan Metformin ve Vildagliptin üzerinde çalışılacaktır. Bu bölümde öncelikle ilaç grubu içinde bulunan Metformin ve Vildagliptin bileşiklerinin kimyası ile farmakolojik etkileri tartışılacak; daha sonra ise bu bileşiklerin tayininde kullanılan analitik yöntemler hakkında bilgi verilecektir.

Diyabet, gerçekte bilinen en eski hastalıklar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Mısır, Hint, Çin gibi medeniyetlerin tarihinde bu hastalıktan söz edilmektedir. Hipokrat'ın M.S. 4. yüzyılda diyabet ve beslenme alışkanlıklar ile ilgili konuları araştırdığından söz edilmektedir. Bununla birlikte Mısır papirüslerinden elde edilen bilgilerden yola çıkarak 3. Krallık dönemi hekimi Hesi Ra'nın gerçek anlamda diyabetten söz ettiği görülmüştür. Diyabet ismini ilk defa Kapadokyalı Hekim Aretaeus M.S. 150'li yıllarda kullanmıştır.(Kaya 2019). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gelecekte en sık görülecek hastalıklar arasında bulunacağını ifade ettiği diyabet; Birleşmiş Milletler tarafından 2006 yılında kronik, yan etkileri ile birlikte seyreden, halk sağlığını olumsuz yönde etkileyen, oldukça riskli ve pahalı bir salgın hastalık olarak ifade edilmiştir. Diyabet, yaşam kalitesini düşüren, vücudun birçok yerini olumsuz etkileyen, genç yaşta ölümlere sebep olan ve sağlık giderlerini önemli ölçüde artıran hastalıklardan biridir. Uluslararası Diyabet Federasyonu verilerine göre, 2011 yılında dünya genelinde 366 milyon diyabet hastası varken, 2030 yılında yaklaşık olarak 552 milyona kadar çıkacağı düşünülmektedir. (Anonim 2019). Bölgelere göre farklılıklar gösterse de ülkemizde diyabetlilerin oranı %7 civarındadır (Anonim 2019). Bu oran 20 yaş üzeri insanlarda %13,7 kadardır. (Anonim 2019). Birleşmiş Milletler 20 Aralık 2007 tarihinde diyabeti küresel bir tehlike olarak kabul etmiş ve ilk defa enfeksiyon hastalıkları dışında bir hastalık olan diyabetin salgınından söz etmiştir (Kaya 2019).

Diyabet, kan şekeri olarak isimlendirilen ve kan şekerinin oldukça yüksek olduğu durumlarda ortaya çıkan bir hastalıktır. Kan şekeri başlıca enerji kaynağı olup alınan besinlerden sağlanır. İnsülin pankreasın ürettiği bir hormon olup, besinlerden elde edilen glikozun hücrelerde enerji için kullanılmasına yardımcı olur. Diyabetin

kesin bir tedavisi olmamakla beraber, diyabeti kontrol etmek ve sağlıklı kalabilmek için gerekli önlemler alınabilir.

Diyabet tipleri genel olarak; Tip 1, Tip 2 ve Gestasyonel diyabet olmak üzere üçe ayrılır. Şekil 2.1'de sağlıklı, Tip 1 ve Tip 2 diyabetli bireylerdeki insülin salgılanması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Diyabet tipleri A) Sağlıklı B) Tip 1 Diyabet C) Tip 2 Diyabet

Tip 1 diyabette, vücut insülin üretmez. Bağışıklık sistemi, insülin salgılayan pankreastaki hücrelere saldırarak onları imha eder. Tip 1 diyabet, genel olarak çocuklar ve gençlerde görülsede, her yaş grubunda ortaya çıkabilir. Tip 1 diyabet hastaları yaşamlarını sürdürebilmek için, düzenli olarak her gün insülin almak zorundadırlar.

Tip 2 diyabette, vücut insülini yeterince üretemez veya kullanamaz. Tip 2 diyabet çocukluk dönemi dahil, her yaşta görülebilir. Bununla birlikte, bu tür diyabet genel olarak orta yaşlı ve yaşlılarda görülmektedir. Diyabet türleri arasında en fazla görülen Tip 2 diyabettir (Anonim 2019).

Günümüzde genetik yatkınlık ile birlikte stresli yaşam şartları, dengesiz ve düzensiz beslenme alışkanlıklarının yanısıra obezite ve diyabet önemli sağlık sorunları haline gelmiştir. Diyabet dünya çapında ölüme sebep olan hastalıklar (Kalp damar hastalıkları, Kanser, Solunum yolu hastalıkları, Diyabet, Bunama) arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Diyabetin en çok bilinen şekli, bütün diyabetik vakaların yaklaşık olarak %90-95'ini oluşturan Tip 2 Diyabettir (Ünal 2016).

Diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlar genel olarak ikiye ayrılır.

- İnsülinler
- Ağız yolu ile kullanılan tabletler (Oral antidiyabetik ilaçlar)

2.1.1. İnsülin

Pankreas midenin hemen arkasında bulunan, insülin üreten ve ihtiyaç duyulduğunda ürettiği insülini kan dolaşımına veren organdır. İnsülin, pankreasta bulunan beta hücreleri tarafından üretilen polipeptit yapısında bir hormondur. İnsülinin uyarıcı etkenleri arasında en güçlüsü kan şekerinin yükselmesidir. Kandaki glikoz miktarı karbonhidratlı besinler alındığında yükselir. Böyle bir durumda; insülin üreten hücreler, kan dolaşımına insülin gönderirler. İnsülin kanda bulunan glikozun, kaslara ya da karaciğerde bulunan depolara girmesine yardımcı olur. İnsülinin yetersiz oluğu durumlarda ise; kan glikozu, vücut dokuları tarafından kullanılamaz.

Diyabet hastalarının büyük bir kısmının aşırı dercede kilolu oldukları ve %80 'inden daha fazlasının insülin enjeksiyonuna ihtiyaç duymadıkları bilinmektedir. Diyabet hastası olmazsa dahi aşırı kilolu kişiler aynı yaş grubundaki normal kilolu kişilere göre daha fazla insülin üretmektedirler ve bu kişilerin vücudu insüline karşı dirençlidir. Bu yüzden bu gibi kişilerde kandaki insülin miktarı yüksektir. Ayrıca İnsüline karşı dirençli olanların kilo vermekte zorlandıkları bilinen bir gerçektir.

Diyabet vakalarının yaklaşık %10' u Tip 1 diyabettir. Tip 1 diyabetin asıl sebebi kesin olarak ifade edimemiştir. Bununla birlikte bazı risk faktörleri bulunmaktadır. Bu faktörler:

- Otoimmun hastalık
- Pankreasa zarar veren virüsler
- Aile bireyleri arasında Tip 1 hastası olanlar
- İlaçlar

Tip 1 Diyabetli kişilerde insülin salınımı ya hiç yoktur ya da çok azdır. Bundan dolayı eksik olan insülinin tedavisi deri altı enjeksiyonu ile yapılmaktadır (Aydn 2013).

2.1.2. Ağız Yolu ile Kullanılan Tabletler

İnsüline ihtiyaç duymayan, diyet ile kan şekerleri kontrol edilemeyen hastalarda oral (ağız yolu) antidiyabetik ilaçlar kullanılır. Bu tür ilaçlarla 40 yaşından sonra hastalığın ortaya çıktığı ve 5 yıldan daha kısa süreli geçmişi olan hastalar daha iyi bir şekilde tedavi edilebilmektedir. Bu ilaçlar, Tip 1 diyabetik hastaların tedavisinde kullanılmamaktadırlar (Mycek ve ark. 1998).

Etki mekanizmalarına göre oral antidiyabetik ilaçlar genel olarak dört gruba ayrılırlar (Murphy ve Holder 2000).

1. İnsülin salgılatıcı ilaçlar
2. İnsüline duyarlılaştırıcı ilaçlar
3. Glikozun emilimini yavaşlatan ilaçlar
4. İnsülinomimetik ilaçlar

2.1.2.1. İnsülin Salgılatıcı İlaçlar

Bu grupta, pankreasın β hücrelerinden insülin salınımını arttıran sülfonilüreler ile glinidler bulunmaktadır (Aktunç ve ark 2002).

2.1.2.2. İnsülin Duyarlılaştırıcı İlaçlar

Bu gruptaki ilaçlar genel olarak biguanid ve tiazolidindion olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Biguanidler karaciğer düzeyinde, Tiazolidindion'lar ise daha fazla yağ dokusu düzeyinde insülin duyarlılığını artırıcı etki gösterirler (Lilly ve Godwin 2009).

2.1.2.3. Alfa Glikozidaz İnhibitörleri

Bu ilaçlar bağırsaktan glukoz absorpsiyonunu geciktirmeleri ile gerçek etkilerini gösterirler. Bu tür ilaçlar tokluk hiperglisemi tedavisinde etkilidirler, fakat gastrointestinal yan etkilerinden dolayı uzun bir süre kullanımları güçtür (Chiasson ve ark. 1994).

2.1.2.4. İnsülinomimetik İlaçlar

Bu yeni grup içinde amilin agonistleri ve inkretin mimetik ilaçlar ve yeni geliştirilmekte olan ajanlar bulunmaktadır. Genel olarak endojen insülin sekresyonunu artırarak etkilerini göstermektedirler (Zinman ve ark. 2009).

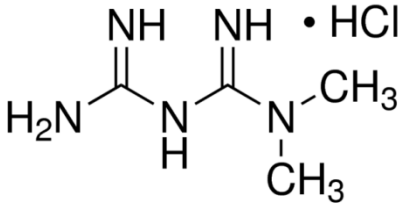
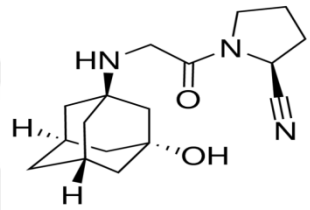
Tip 2 diyabette önemli kusurlardan bir tanesi de inkretin hormonların (glukagon benzeri peptid ve gastrik inhibitor polipeptidin) seviyesi ve/veya etkisinin düşmesi ve glukagon salgılanmasının azalmasıdır. Bu grup içinde bulunan inkretin mimetik ya da glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri ve dipeptidil peptidaz-4 inhibitörleri (DPP4-İ) ilaçlar, inkretin hormonları taklid etmek ya da inkretinlerin parçalanmasını azaltmak için geliştirilmiştir (Crandall ve Knowler 2008).

İnkretin mimetik (Dipeptidil peptidaz 4 inhibitörleri; DPP4-İ) ilaçlar; glukagon benzeri peptid ve gastrik inhibitor polipeptidin'in yıkımını azaltır. Tip 2 diyabet bulunan hastalarda, karbonhidrat alımından sonra genel olarak artması beklenen insülin cevabı azalmakta ya da gecikmektedir. Bu durumda glukagon salınımı artmakta ve postprandiyal hiperglisemi oluşmaktadır (Halimi 2008).

Dipeptidil peptidaz 4 inhibitörleri (Vildagliptin, Sitagliptin, Linagliptin, Saksagliptin) oral olarak verilmekiçin geliştirilmiş ilaçlardır. Ülkemizde; DPP4-İ'ler Sülfonilüre yeterli glisemik cevap alınamayan Tip 2 diyabetli hastalarda takviye ilaç olarak kullanılmaktadır (Turan ve Kulaksızoğlu 2015).

Bu araştırma için seçilen ve antidiyabetik ilaçlar içinde yer alan Meformin ve Vildagliptin bileşiklerinin kimyasal yapısı, isimlendirilmesi, fiziksel ve kimyasal özellikleri çizelge 2.1 ′de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Diyabet tedavisinde kullanılan bazı ilaçların kimyasal yapısı ve genel özellikleri

Bileşiğin ismi	**Molekül formülü**	**Genel Özellikleri**
Metformin		**Kimyasal Formülü:** $C_4H_{11}N_5HCl$ **Molekül Ağırlığı:**165.62 g/mol **Görünüş:** Beyaz ve ya koyu beyaz kristal yapıda **Çözünürlük:** Suda tamamen çözünürken, aseton, eter ve kloroformda çözünmemektedir. **pKa:** 11.5 **Saklama Koşulları:** Nem ve ışıktan korunarak saklanmalıdır. **Erime Noktası:** 223-226ºC
Vildagliptin		**Kimyasal Formülü:** $C_{17}H_{25}N_3O_2$ **Molekül Ağırlığı:** 303.4 g/mol **Görünüş:** Beyaz toz **Çözünürlük:** 1.75 g/L su **pKa:** 14.71(Kuvvetli asidik ortam) 9.03(Kuvvetli bazik ortam) **Saklama Koşulları:** Nem ve ışıktan korunarak saklanmalıdır. **Erime Noktası:** 148-152 ºC

2.1.3. Metformin

Metformin'in (1, 1-dimethylbiguanid hidroklorit,) tıp alanında kullanımı, tarihte Çin tıbbında faydalanılan Galega officinalis (Fransız leylağı) bitkisine dayanmaktadır. Bu bitki Ortaçağ Avrupasında; halitosis ve poliürey gibi hastalıkların tedavinde kullanılmıştır. (Witters 2001). 1800'lü yıllarda gerçekleştirilen çalışmalara göre, hayvanlarda hipoglisemik özellik gösteren bu bitkinin guanidin yönünden zengin olduğu ifade edildiği gibi bitkinin antidiyabetik mekanizması da açıklanmıştır (Watanabe 1918). 1930'lu yılların başlarına kadar Fransa'da diyabeti tedavi etmek amacıyla Metformin kullanılabileceği düşünülmüş; Ancak, guanidinin klinik kullanımının toksik olduğu tespit edilmiştir (Ünal 2016). 1920'li yıllarda isoprenilin bir türevi olan galeginin yan etkisinin çok az olduğu tespit edilmiş ve diyabet tedavisinde kullanılmıştır (Muller ve Rheinwein 1927). Aşağı yukarı aynı yıllarda, dimetil biguanid türevi olan ve in vivo olarak kan şekeri düzeyini önemli derecede azaltma etkisi olan Metformin sentezlenmiş olmasına rağmen (Hesse ve Taubmann 1929), insülinin bulunmasından sonra diyabet tedavisinde Metformin'in kullanımı insüline göre geri planda kalmıştır.

Metformin, Tip 2 Diyabet tedavisinde oldukça fazla kullanılan ağızdan alınan (Hirsch ve ark. 2009) bununla birlikte, kardiyovasküler hastalıklara karşı da koruyucu özellikleri bulunan biguanid grubundan insülin duyarlılığını arttıran bir ilaçtır (Wysham ve Kirkman 2011).

2.1.3.1. Metformin'in Antidiyabetik Etki Mekanizması

Diyabet, insüline bağlı ya da insülinden bağımsız olarak kan şekerinin artmasıyla ortaya çıkan karışık patolojik bir durum olarak kabul edilir (Hoeland ve Mycek 2000). İnsülin direnci sonucu kan şekerinin yükselmesi (hiperglisemi) ile ortaya çıkan bir hastalıktır. T2DM tedavisinde asıl hedef, kan şekeri düzeyini normal sınırlar içinde tutmak ve hastalığın uzun zaman içinde ortaya çıkaracağı olumsuz etkileri ortadan kaldırmaktır (Hoeland ve Mycek 2000).

Metformin kandaki glukoz oranını düşürerek farmakolojik olarak gerçek etkisini göstermektedir. Bundan dolayı T2DM tedavisinde oldukça fazla kullanılmaktadır. Bu etkisini, glukozun asıl kaynağı olan karaciğerden çıkışını azaltmasıyla gerçekleştirmektedir (Inzucchi ve ark.1998). Bundan başka Metformin, insülinin duyarlılığını arttırarak, insülin direncinin kırılmasına yardımcı olaktadır. Bundan dolayı, aşırı kiloya bağlı insülin direnci ya da yağlı karaciğer hastalığı olan kişilerde, Metformin kullanmanın faydalı olduğu tespit edilmiştir (Viollet ve ark. 2012).

2.1.4. Vildagliptin

Antidiyabetik ajan olarak kullanılan ilaç gruplarından Dipeptidil peptidaz 4 inhibitörü(DPP4-İ); yeni bir ilaç olarak 2006 yılında ilk olarak stagliptin olarak üretilmiştir. DPP-4 inhibitörü olarak kullanılan diğer ilaçlar genel olarak vildagliptin, saxagliptin, alogliptin ve denagliptin'dir.

Dipeptidil peptidaz 4 inhibitörü, glukoz seviyesini dengede tutmak için, ince bağırsaktan salınan inkretin hormonlarını parçalayarak pasifleştiren Dipeptidil peptidaz 4 enziminin etkisini ortadan kaldırarak (Bergman ve ark. 2007) glukagon benzeri peptit-I ve glukoz bağımlı insülinotropik peptit düzeylerinin artmasına sebep olmakta ve hastalarda glukoz düzeylerini ve sonuç olarak HbA1c düzeylerini ortalama olarak % 0.5 / 1.1 oranlarında azaltmaktadır (Zerilli ve Pyon 2007). Dipeptidil peptidaz 4 inhibitörü ile gerçekleştirilen tedavilerde, hipoglisemi riski oldukça az gerçekleşmektedir. Diğer

antidiyabetik ilaçlarda görülme olasılığı çok daha fazla olan hipogliseminin inkretine dayalı tedavilerde görülmeyişinin başka bir sebebi de yemeklerden sonra insülin sekresyonunun %70'inden sorumlu olan glukagon benzeri peptit-I'in glukoza bağımlı olarak sentez ediliyor olmasıdır (Gren 2007).

Vildagliptin, Dipeptidil peptidaz 4 üzerine yüksek derecede bir inhibitör etki göstermektedir ve kendisi bu enzimin bir substratıdır. Vildagliptin hızlı bağlanma fazını takip eden yavaş-sıkı bağlanma fazından oluşan komptetif ve geri dönüşümlü bağlanma gösterir. Vildagliptin Dipeptidil peptidaz 4 için yüksek derecede seçicidir ve çok yavaş ayrışma hızları ile sıkı bağlanma kinetiği sergilemektedir (Çolak 2011).

Vildagliptin, insülin miktarını arttırıp, glukagon salınımını azaltarak adacık hücresi fonksiyonunu güçlendirmektedir. Tip 2 diyabeti olan hastalarda Vildagliptin glukagon benzeri peptit-I seviyelerini arttırmaktadır (Balas ve ark. 2007).

2.1.5. Metformin ve Vildagliptin İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri

Genel olarak antidiyabetik ilaçların farklı ortamlarda tespit edilmesine imkan veren seçici, güvenilir ve yüksek hassasiyete ihtiyaç duyulmasının sebepleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Rauf ve ark. 2005; Nussbaumer ve ark. 2011).

2.1.5.1. Farmasötik Formülasyonlarda Analiz

Üretim aşamasında olan ilacın kalite kontrolü esnasında ilaçtaki safsızlıkları ve bozunma ürünlerini eş zamanlı olarak tayin edebilen yöntemler kullanılmalıdır. Kalite kontrol işlemi farmasötik düzenlemelerle uyumlu olmalıdır. Sıvı kromatografisi (LC) ve kapiler elektroforez (CE) bu aşamada sık tercih edilen yöntemlerdendir. Kütle spektrometresi (MS) genel olarak dedeksiyon sistemi olarak kullanılmaktadır. LC-UV, her zaman kulanılsa da tekniğin hassasiyeti safsızlık ve bozunma çalışmalarında yeterli olmayabilir.

2.1.5.2. Tedavi Öncesi Hazırlanan Formülasyonun Kalite Kontrolü

İlacın ticari şekli hastaya verilmeden önce % 9 'luk sodyum klorür (NaCl) yada % 5'lik glukoz içerisinde çözülerek seyreltilir. Seyreltik çözeltilerin dayanma süresi sınırlı olduğundan uygulamadan hemen önce deneyimli biri tarafından taze olarak hazırlanmalıdır. İlaç düzenlemeleri son aşamadaki bu kontrole ihtiyaç duymazsa da,

gerçek derişimde ilaç hazırlamak ve ölümle sonuçlanabilecek hataları ortadan kaldırmak için analiz yapılabilir. Analitik yaklaşımlardan biri UV-diyot ışını dedeksiyonu (DAD) olan akışa-enjeksiyon analizi (FIA), bir diğeri ise Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi uygulamasıdır.

2.1.5.3. Formülasyon Çalışmaları

Farklı formülasyonlarda hazırlanan ilaç etken maddelerinin içerisinde hazırlandığı cam ya da plastik malzeme ile uyumlu olması etken maddenin bozunmasının önlenmesi ya da adsorpsiyonu yönünden oldukça önemlidir. Bu çalışmalarda en çok kullanılan yöntem LC-UV tekniğidir.

2.1.5.4. Biyolojik Örneklerde Analiz

Biyolojik örneklerde (plazma, idrar, dışkı,doku homojenatı, tümör hücreleri) analizde en yaygın olarak kullanılan tekniklerin başında MS dedektörlü gaz (GC) ve LC teknikleri gelmektedir.

Çizelge 2.2′de üzerinde çalışılması planlanan Metformin ve Vildagliptin bileşiklerinin HPLC, CE, UV, FTIR analizlerine ilişkin bazı örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.2. Metformin ve Vildagliptin bileşiklerinin diğer ayırma yöntemleriyle analizi

Analit	Teknik	Dedektör	LOD/LOQ/LLOQ	Kaynak
Metformin	RP-HPLC	UV/Vis	0.391 µg/L (LOD) 1.185 µg/L (LOQ)	Marianne ve ark.2019
Metformin	UPLC-QTOF/MS	UV	0.4 µg/L (MLOD) 1.7 µg/L (LLOQ)	Strugaru ve ark. 2019
Metformin	HPLC-MS/MS	UV	25 (LOD) 2000 ng/ mL(LOQ)	Moussa ve ark. 2019
Metformin	HPLC	photodiode array (PDA)	-	Jang ve ark.2019
Metformin	HPLC	UV	0.8 µg/ml(LOD) 2.45 µg/ml (LOQ)	Gedawy ve ark.2019
Metformin	UV	UV	0.24 µg/ml(LOD) 0.2 µg/ml (LOQ	Moussa ve ark.2018
Metformin	CE	DAD	-	Maher ve ark.2019
Metformin	SERS		0.2 nM µg/ml(LOD)	Guo ve ark.2020
Vildagiliptin	CE/ MS		0.31 ng/ml(LOD)	Attimarad ve ark. 2017
Vildagiliptin	HPLC	-	-	Jiang ve ark.2018
Vildagiliptin	HPLC	UV/Vis	1.74 ng/band (LOD) 5.74 ng/band (LOQ)	Bendale ve ark.2018
Vildagiliptin	FTIR	deuterated triglycine sulfate (DTGS)	0.20 µg/ml(LOD) 0.61 µg/ml (LOQ)	El-Wekil ve ark.2019
Vildagiliptin/Metformin	ATR-FTIR			Eid ve ark. 2020

2.1.6. Metformin ve Vildagliptin İçin Uygulanan Elektroanalitik Yöntemler

Metformin ve Vildagliptin bileşiklerinin içinde bulunduğu antidiyabetik ilaçların miktar tayininde kullanılan ve çizelge 2.2' de verilen yöntemlerden HPLC yüksek duyarlılık, hassasiyet, seçicilik ve doğruluğa sahip olmasına rağmen deneyimli personele, uzun ve zahmetli ön ayırma işlemlerine, organik çözücülere ya da yüksek maliyetli cihazlara (özellikle dedeksiyon biriminde) ihtiyaç göstermektedir. Ancak elektroanalitik yöntemlerden biri olan voltametrinin basit, hızlı düşük maliyetli, matris etkisine düşük duyarlılıkta ve yerinde analize uygun olması nedeniyle; özel olarak Metformin ve Vildagliptin bileşikleri, genelde ise antidiyabetik ilaçların tayinine çok yakın bir zaman içinde alternatif olarak kullanılacağı açık bir gerçektir (Lima ve ark. 2018).

Elektron transferi ve oksidatif baskının antidiyabetiklerin tedavi edici ve bununla birlikte yan etkileri üzerinde büyük rol oynadığı bilinmektedir. İlgili bileşiklerin pek çoğunun moleküler yapısında yükseltgenme/indirgenme etkin gruplarının

bulunmasından dolayı; elektroanalitik araştırmalara ilaveten, elektrokimyasal çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bu grup ilaçların her iki etki mekanizması hakkında önemli bilgiler verecektir (Kovacic 2007).

Yukarıda sözü edilen klasik yaklaşımların dışında, elektrokimyasal teknikler, ilaç tedavisi gören diyabetli hastalarda ilacın hücre düzeyindeki gerçek-zamanlı etkilerini izlemek amacıyla da kullanılmaktadırlar (Wooley ve ark. 2002).

Yapılan kaynak araştırmasında Metformin için önerilen elektrokimyasal çalışmaların olduğu görülmektedir. Literatürde yer alan bu çalışmaların çoğunda elektrotların modifiye edildiği görülmektedir. Vildagliptin için yapılan kaynak araştırmasında sadece bir elektrokimyasal çalışmaya rastlanılmıştır. Aşağıda bu çalışmaların bir kısmı özetlenmiştir.

Metformin'in Dönüşümlü voltametri (CV) ile hidrojen peroksitin elektrokimyasal davranışlarının, Camsı karbon elektrot (GCE) yüzeyini poli aminohipürik asitin elektrodepozisyonu ile modifiye ederek elektro katalitik etkisini CV tekniği ile GCE kullanarak farklı pH değerlerinde fosfat tampon (PBS) ortamında inceledikleri çalışmada uygulanan modifiye elektrot, basit hazırlama yöntemi, yüksek hassasiyet, çok düşük tayin limitleri ve kabul edilebilir kararlılık gibi çeşitli avantajlar gösterdiğini gözlemlediler (Baghayeri ve ark. 2019).

Metformin'in yeni bir kompleksini sentezleyerek yükseltgenme ve indirgenme davranışını CV ile GCE kullanarak 0.1 M tetra butil amonyum heksa fluoro fosfat tampon ortamında Zn(II) kompleksinin elektrokimyasal davranışı 0.0 V – 2.0 V gerilim aralığı ve 100/500 mVs^{-1} değişen tarama hızlarında gerçekleştirilmiştir (Ghasemi ve ark. 2014).

Metformin'in eser miktardaki tayini için Metformin 'in elektrokimyasal sıyırma analizi ile Karbon pasta elektrodu (CPE) kullanarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarını, 50 nM-60 nM analitik çalışma aralığında ve tayin sınırını 9 nM olarak gözlemlediler (Gholivand ve ark. 2013).

Metformin'in bir nikel oksit nanotüp-karbon mikropartikülleri içeren CPE ile CV ve Kronoamperometri teknikleri kullanarak elektrokimyasal özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmalarında İnsan serumu, idrarı ve anne sütündeki ilacın tahlillerinde uygulanabilirliğini gözlemlediler (Sattarahmadya ve ark. 2010).

Metformin''in miktar tayini için geliştirilen voltametrik yöntem, MWCNT/PE ve CPE kullanarak, 0.1 M pH 8.9 NH_3/NH_4Cl tampon ortamında Metformin'in yükseltgenmesine karşı Cu (II) iyonunun katalitik etkisini araştırdıkları çalışmalarında, tayin sınırını 6.7×10^{-8} M olarak gözlemlediler (Tian ve ark. 2007).

Metformin'in elektrokimyasal tayini için Anodik Sıyırma Voltametrisi (ASV) kullanarak CPE yüzeyini SBA-15-Cu (II) ile modifiye ederek geniş pH aralığında (2.0-11.0) basit, seçici ve sağlam bir sensör geliştirdikleri çalışmalarında 30 nM'lik bir tayin sınırı gözlemlediler (Gholivandb ve ark. 2015).

Metformin'in yükseltgenme çalışmalarında CV tekniği ile GCE'u modifiye ettikleri (Cu-BTC, BTC =1,3,5-benzenetrikarboksilat) ve çok duvarlı karbon nanotüp (CNT) kompozitleri geliştirdikleri yer almaktadır. 0.1 M Britton-Robinson tampon ortamında değişen pH(2.59 - 12.65) aralığında 0.12 μM'lik bir tayin sınırı gözlemlediler (Hadi ve ark. 2016).

Modifiye CPE yüzeyinde Metformin'in elektrooksidatif davranışını CV ve diferansiyel puls voltametri (DPV) teknikleri ile incelediler. Çalışmalarında Britton-Robinson (BR) tampon (pH:2-9) ortamında, analitik çalışma aralığını (8.0×10^{-7} -6.0×10^{-6} mol / L) doğrusal olarak değiştiğini gözlemlediler (Attia ve ark. 2014).

Metformin'in bakır (II) içeren moleküler teller, propan, ve MWCNT ile modifiye edilen CPE yüzeyinde çok duyarlı voltametrik sinyallarinin pH 7.2 BR tampon ortamında elde ettiler. Yöntemin seçiciliği ve farmasötik formülasyonda Metformin''in analizi için uygun olduğu görülmüştür (Tian ve ark. 2006).

Vildagilptin CV ve LSV teknikleri ile yapılan incelenmesinde Çalışma elektrotu olarak platin (Pt) ve camsı karbon (GC) kullanılmıştır. KNO_3 (1M) ve fosfat tamponu (NaH_2PO_4 / H_3PO_4) pH 6.8 ortamında Vildagliptin, 0.241 mM'lik bir tayin alt sınırına ve 0.802 mM'lik bir ölçüm sınırına sahip olduğunu gözlemlediler (Fadr ve ark.2018).

2.2. Katı Elektrot Voltametrisi ile İlgili Genel Bilgi

Elektroanalitik teknikler akım, potansiyel veya yük ve bunların kimyasal parametrelerle ilişkisi gibi elektriksel niceliklerin ölçülmesi gibi elektrik / kimya arasındaki etkileşimle ilgilenir. Elektriksel ölçümlerin analitik amaçla kullanılması, çevresel izleme, endüstriyel kalite kontrol veya biyomedikal analiz dahil oldukça çeşitli

kullanım alanları bulmuştur. Ultra mikro elektrotların geliştirilmesi de dahil olmak üzere 1980'lerin ortalarından bu yana kaydedilen ilerlemeler, özel ara yüzlerin ve tek tabakalı moleküllerin tasarımı, biyolojik bileşenlerin ve elektrokimyasal dönüştürücülerin birleştirilmesi, iyonoforların ve moleküler boyutta boşluklar içeren reseptörlerin sentezi, çok duyarlı voltametrik tekniklerin veya yüksek çözünürlüklü tarama probu mikroskoplarının geliştirilmesi ve moleküler cihazların veya verimli akış detektörlerinin mikro üretimi, yeni alanlara ve ortamlara yayılması da elektroanalizin popülaritesinde önemli bir artışa neden olmuştur (Wang 2006).

Homojen hacimli çözeltiler içeren çoğu kimyasal ölçümün aksine, elektrokimyasal işlemler elektrot-çözelti ara yüzeyinde gerçekleşir. Ölçüm için kullanılan elektrik sinyalinin türü çeşitli elektroanalitik teknikler arasındaki farkı yansıtmaktadır. Elektroanalitik ölçümlerin iki ana türü potansiyometrik ve potansiyostatiktir. Her iki tipte de elektrokimyasal hücreyi oluşturan minimum iki elektrot (iletken) ile bunlarla temas eden bir örnek (elektrolit) çözeltisi gereklidir. Bu nedenle elektrot yüzeyi, iyonik bir iletken ile elektronik bir iletken arasındaki bir bağlantıdır. İki elektrottan biri hedef analitlere cevap verir ve bu nedenle gösterge (veya çalışma) elektrotu olarak adlandırılır. Sabit potansiyele sahip olan ikincisi de, referans elektrotu olarak adlandırılır (Wang 2006).

Potansiyometri, bir zar içerisinde oluşturulan potansiyelin ölçülmesinden numune bileşimi ile ilgili bilgilerin elde edildiği statik (sıfır akım) bir tekniktir. Yüksek seçicilik elde etmek için farklı iyon tanıma işlemlerine sahip farklı membran materyal türleri geliştirilmiştir. Bu nedenle elde edilen potansiyometrik problar karmaşık örneklerdeki iyonik türlerin doğrudan izlenmesi için on yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır.

Potansiyostatik teknikler, elektrot-çözelti arayüzünde yük aktarma işlemlerinin incelenmesi ile ilgilenir ve dinamik durumlara dayanmaktadır. Burada, elektrot potansiyeli bir elektron aktarım reaksiyonunun oluşturulması için kullanılmaktadır ve ortaya çıkan akım ölçülmektedir. Potansiyelin rolü, optik ölçümlerde dalga boyununkine benzer. Böyle kontrol edilebilir bir parametre kimyasal türlerin bir elektron kazanması veya kaybetmesini zorlayan “elektron basıncı” olarak düşünülebilir. Buna göre, elde edilen akım şiddeti, elektrot ile çözelti ara yüzeyi boyunca hareket eden

elektronların oranını yansıtmaktadır. Bu yüzden potansiyostatik teknikler indirgenebilen veya yükseltgenebilen elektroaktif olan herhangi bir kimyasal türü ölçebilir. Bir moleküldeki fonksiyonel grubun reaktivitesinin bilinmesi, molekülün elektroaktivitesini tahmin etmek için kullanılabilir. Elektroaktif olmayan moleküller, dolaylı veya türevlendirme işlemleriyle bağlantılı olarak da tespit edilebilir.

Kontrollü potansiyel tekniklerin avantajları arasında yüksek duyarlılık, elektroaktif türlere karşı seçicilik, geniş bir doğrusal aralık, taşınabilme ve maliyeti düşük cihazlar, sıradışı ortamların analizine izin veren çok çeşitli elektrotlar sayılabilir. Bu tekniklerin çeşitli özellikleri Çizelge 2.3'te özetlenmiştir. Çok küçük (5-20 µL) numune hacimleriyle son derece düşük (nanomolar) tayin sınırları elde edilebilir (Wang 2006).

Çizelge 2.3. Kontrollü Potansiyel Tekniklerin Özellikleri

Teknik	**Çalışma Elektrotu**	**Tayin Sınırı (M)**	**Hız (Döngü Başına Süre) (dakika)**	**Yanıt Şekli**
DC polarografisi	DME	10^{-5}	3	Dalga
NP polarografisi	DME	5×10^{-7}	3	Dalga
DP polarografisi	DME	10^{-8}	3	Pik akımı
DP voltametrisi	Katı	5×10^{-7}	3	Pik akımı
SW polarografisi	DME	10^{-8}	0.1	Pik akımı
AC polarografisi	DME	5×10^{-7}	1	Pik akımı
Kronoamperometri	Hareketsiz	10^{-5}	0.1	Geçici dalga
Dönüşümlü voltametrisi	Hareketsiz	10^{-5}	0.1-2	Pik akımı
Sıyırma voltammetrisi	HMDE, MFE	10^{-10}	3-6	Pik akımı
Adsorptif sıyırma voltametrisi	HMDE	10^{-10}	2-5	Pik akımı
Adsorptif sıyırma voltametrisi	Katı	10^{-9}	4-5	Pik akımı
Adsorptif katalitik sıyırma voltametrisi	HMDE	10^{-12}	2-5	Pik akımı

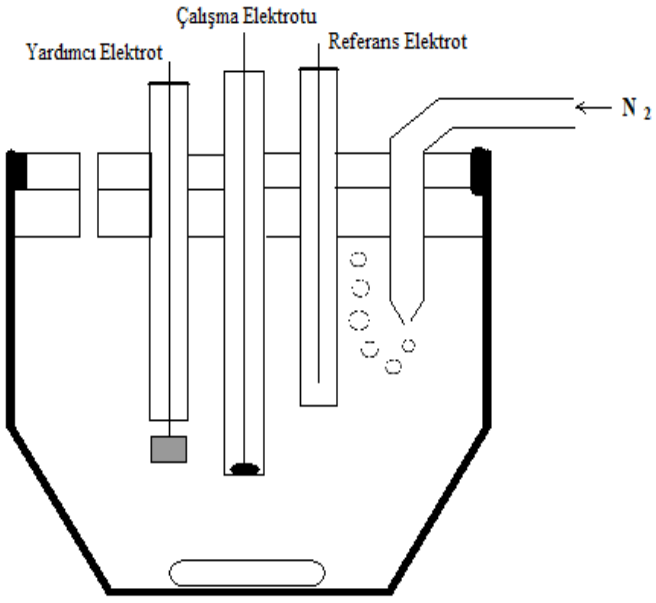
Teknik: (DC) Doğru akım, (NP) Normal puls, (DP) Diferansiyel puls, (SW) Kare dalga, (AC) Alternatif akım. **Çalışma Elektrodu: (**DME) civa damla elektrot**, (**HMDE) Asılı civa damla elektrot, (MFE) Civa film elektrot

2.2.1. Elektrokimyasal Hücreler

Kontrollü potansiyel deneylerde genellikle üç elektrotlu hücreler (Şekil 2.2) kullanılmaktadır. Bu hücreler genel olarak içerisindeki örnek çözeltisine çalışma, referans ve yardımcı elektrot batırılmış 5-50 mL hacminde kapalı sistemlerdir. Çalışma elektrotu, ilgilenilen reaksiyonun gerçekleştiği elektrot olsa da, referans elektrot, çalışma elektrodunun potansiyelinin karşılaştırıldığı, sabit ve tekrar üretilebilir bir

potansiyel (numune bileşiminden bağımsız olarak) sağlar. Potansiyel değişikliklere karşı bu tür "tamponlama", sırasıyla gümüş gümüş klorür ve doymuş kalomel referans elektrotları ile yaygın olarak kullanıldığı gibi, Ag /AgCl veya Hg / Hg_2Cl_2 gibi redoks çiftinin her iki formunun sabit bir bileşimi ile de sağlanır.

Numune çözeltisinin kirlenmesini en az seviyeye düşürmek için, referans elektrot yalıtkan bir boru içerisinden geçirilerek numune ile teması önlenebilir. İnert ve iletken malzemeler(Grafit çubuk ya da Platin tel gibi) genellikle akım taşıyan yardımcı elektrot olarak kullanılır. Bu elektrotların nispi pozisyonları ve elektrokimyasal analizöre düzgün şekilde bağlanmalarına dikkat edilmelidir. Üç elektrot ve ayrıca oksijensizleştirmek için kullanılan gazı kabarcıklandırmak için kullanılan tüp, hücre kapağındaki beş delikte desteklenir. Kullanılan örnek hacmi çok az olduğu durumda, 20µL - 500µL aralığında farklı mikro hücre tipleri kullanılabilir. Özellikle çekici olan, elektrot yüzeyindeki numunenin tamamının ince bir tabaka (10µm kalınlığından az) üzerinde tutulduğu ince tabaka hücreleridir(DeAngelis ve ark. 1977).



Şekil 2.2. Voltametrik ölçümler için bir hücrenin şematik diyagramı[1]

[1]Çalışma elektrodu (WE), referans elektrodu (RE), karşı (yardımcı) elektrot (CE) , Azot gazı (N_2)

2.2.2. Çözücüler ve Destek Elektrolitler

Elektrokimyasal ölçümler genellikle bir destekleyici elektrolit içeren çözücüden oluşan bir ortamda gerçekleştirilir. Çözücü seçimi temel olarak analitin çözünürlüğü ve redoks aktivitesi, elektriksel iletkenlik, elektrokimyasal aktivite, kimyasal reaktivite gibi çözücüye ait özellikler tarafından belirlenir. Çözücü analitle (ya da ürünlerle) reaksiyon vermemeli ve geniş bir potansiyel aralığında elektrokimyasal reaksiyonlar vermemelidir. Çözücü olarak su oldukça fazla kullanılmasına rağmen asetonitril, propilen karbonat, dimetilformamid (DMF), dimetilsülfoksit (DMSO) veya metanol gibi sulu olmayan çözücüler de sıklıkla kullanılmaktadır (Mann 1969).

2.2.3. Oksijen Giderimi

Oksijenin elektrokimyasal indirgenmesi genellikle iyi ayrılmış iki elektron basamağı ile ilerler. İlk adım hidrojen peroksit oluşumuna karşılık gelir.

$$O_2 + 2H^+ + 2\bar{e} \rightarrow H_2O_2 \quad (2.1)$$

ikinci adım, peroksitin indirgenmesine karşılık gelir:

$$H_2O_2 + 2H^+ + 2\bar{e} \rightarrow 2\,H_2O \quad (2.2)$$

Bu adımların doymuş kalomel elektrotuna karşı yarı-dalga potansiyelleri yaklaşık olarak -0.1 ve 0.9 V'dir. Bu adımların tam stokiyometrisi ortama bağlıdır. Bu kademeli oksijen indirgemesinden elde edilen büyük artık akım birçok indirgenebilir analitin ölçümünü engellemektedir. Ayrıca, oksijen indirgeme ürünleri araştırılmakta olan elektrokimyasal süreci etkileyebilir. Bu nedenle, çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması için çeşitli yöntemler kullanılmıştır (Wallace 1985). En yaygın yöntem, voltammogramın kaydedilmesinden önce 4-8 dakika boyunca bir inert gazla (genellikle saflaştırılmış azot) temizlemektir. Büyük numune hacimleri veya iz ölçümleri için daha uzun temizleme süreleri gerekebilir. Oksijenin yeniden girmesini önlemek için, voltammogram kaydedilirken hücre gazla örtülmelidir.

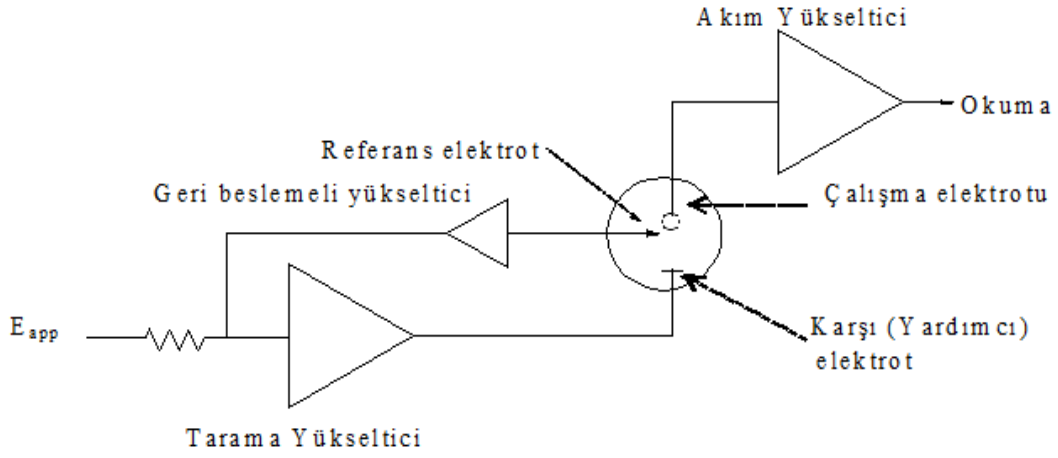
2.2.4. Cihazlar

Modern voltametrik analizörlerin karakteristik özelliği, çalışma elektrotunun potansiyostatik kontrolüdür ve bu da hücre direncine bağlı hataları en aza indirir. Denklem 2.3 bu ohmik bozulmanın nedenini açıklar:

$$E_{app} = E_{WE} - E_{RE} - \text{İ}R \quad (2.3)$$

iR ohmik potansiyel düşüşüdür.

Hücre direncinin büyük bir kısmını telafi etmeyi amaçlayan potansiyostatik kontrol, üç elektrotlu bir sistem ve işlemsel yükselteçlerin ve artık akım döngülerinin bir bileşimi ile gerçekleştirilir (Şekil 2.3). Bu sistemde referans elektrot, çalışma elektroduna mümkün olduğunca yakına yerleştirilir ve cihaza ondan hiçbir akım çekmeyen ve yüksek dirence sahip bir dış devre üzerinden bağlanır. Akış, referans elektrodundan geçemediğinden, mevcut yolu tamamlamak için çözeltiye bir akım taşıyan yardımcı elektrot yerleştirilir. Bu nedenle, akım çalışma ve yardımcı elektrotlar arasındaki çözeltiden akar. Bu elektrotların yerleştirilmesindeki simetri, çalışan elektrot üzerindeki tüm noktalardan gelen akım yollarının eşdeğer olduğu varsayımı için önemlidir. Referans elektrottan hiçbir akım geçmediği ve çalışma elektroduna yakın olmasından dolayı, hücre direncinden kaynaklanan gerilim azalması en az seviyeye düşürülür. Referans elektrot tarafından algılanan potansiyel istenen değerden düşükse, işlemsel yükselteç kontrol döngüsü düzeltici bir potansiyel sağlar. Çalışma elektroduna bir işlemsel yükselteç akım-gerilim dönüştürücüsü (akım izleyici olarak adlandırılır) ekleyerek, kontrol edilen parametreleri bozmadan akımı ölçmek mümkündür. Cihaz ayrıca düzenli olarak değişen çeşitli potansiyel dalga formlarını üretmek için bir rampa üreteci (jeneratör) içerir (Matsue ve ark. 1990).



Şekil 2.3. Üç elektrotlu bir potansiyostatın şematik diyagramı

2.2.5. Çalışma Elektrotları

Voltametrik işlemin performansı, çalışma elektrotunun yapıldığı maddeden kuvvetli bir şekilde etkilenir. Çalışma elektrotu, yüksek sinyal ve gürültü özelliklerinin yanı sıra tekrarlanabilir bir yanıt sağlamalıdır. Bundan dolayı, çalışma elektrodu seçimi öncelikle iki faktöre bağlıdır. Bunlar; hedef analitin yükseltgenme ve indirgenme davranışı ile ölçüm için gereken potansiyel aralık üzerindeki artık akımdır. Diğer özellikler arasında potansiyel fark, elektriksel iletkenlik, yüzey tekrarlanabilirliği, mekanik özellikler, maliyet, bulunabilirlik ve toksisite sayılabilir. Elektroanaliz için çalışma elektrotları olarak çeşitli malzemeler kullanılmaktadır. En popüler civa, karbon veya soy metalleri (özellikle platin ve altın) içerenlerdir.

2.2.5.1. Civa Elektrotları

Civa, elektrot malzemeleri arasında sıklıkla tercih edilmektedir, çünkü katodik potansiyel aralığını önemli derecede genişleten yüksek bir hidrojen aşırı gerilimine sahiptir. Ayrıca büyük oranda yeniden üretilebilir, düzgün bir yüzeye sahip ve kolaylıkla yenilenebilme özelliklerine sahiptir. Elektrokimyasal açıdan, pürüzlülük faktörü bire eşittir. Civa kullanımının dezavantajları, sınırlı anodik aralığı ve toksisitesidir.

Birkaç çeşit civa elektrotu vardır. Bunlardan, civa film elektrotu (MFE), civa damla elektrotu (DME), asılı civa damla elektrotu (HMDE) en fazla kullanılanlarıdır.

Asılı cıva damla elektrot, sıyırma analizi ve döngüsel voltammetri için popüler bir çalışma elektrotudur. Bu durumda, sabit civa damlaları bir rezervuardan dikey bir kılcal tüp içine kaydırılır. İlk asılı civa damla elektrotu tasarımları bir hazneden bir kılcal içerisine mekanik baskıya dayanıyor (Kemula ve Kublik 1958). Modern asılı civa damla elektrotlar gelişmiş tekrarlanabilirlik ve sabit damla oluşumunun elektronik kontrolünü kullanır (Peterson 1979).

Sıyırma analizi veya akış amperometresi için kullanılan civa filmi elektrotu (MFE), inert ve iletken bir desteği kapsayan oldukça ince (10 µm -100 µm) bir civa tabakasından oluşur. Metal yüzeyler üzerindeki yapışkan oksit filmleri ve metallerin civa ile etkileşimi nedeniyle, camsı karbon en çok civa film elektrot için bir substrat olarak kullanılır. Civa film elektrotları, genellikle bir civa nitrat çözeltisinden katodik

biriktirme ile hazırlanır. Bir civa film elektrot kaplama genellikle Sıyırma analizi sırasında kullanılır (Florence 1970).

2.2.5.2. Katı Elektrotlar

Çalışma elektrotu olarak kullanılan çou katı malzemeden en fazla kullanılanları karbon (C), platin (Pt) ve altın (Au)'dır. Bazı özel durumlarda gümüş (Ag), nikel (Ni) ve bakır (Cu)'da kullanılır (Adams 1969). Katı elektrotlar, genellikle düzlemsel bir disk biçiminde sabit veya dönebilirler. Bu tür elektrotlar, yalıtkan bir malzemenin sıkıca montaj edilmiş bir tüpe yerleştirilmiş elektrot malzemesinin kısa bir silindirik çubuğundan oluşur. Katı elektrotlar genel olarak; dönen disk ve dönen halka disk elektrotları, karbon elektrotlar ve metal elektrotlar olmak üzere üçe ayrılır.

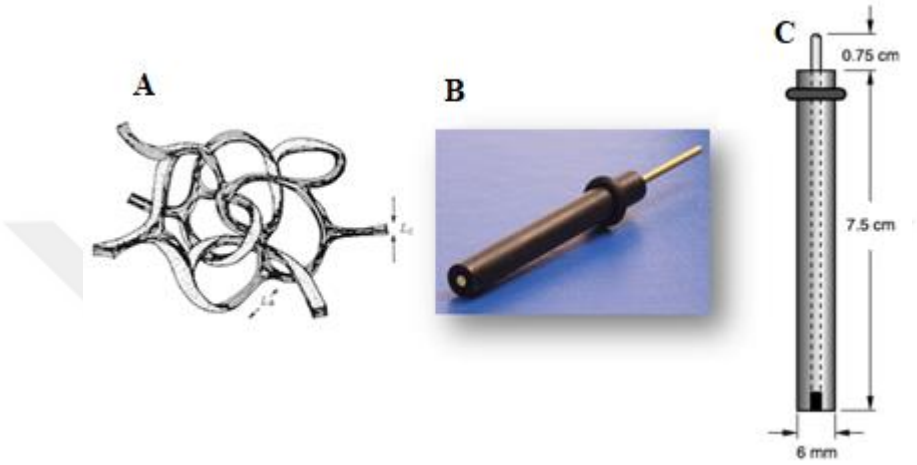
Karbon Elektrotlar

Karbon temelli katı elektrotlar günümüzde elektroanalizde yaygın olarak kullanılmaktadır, çünkü bu elektrotlar geniş potansiyel aralıkları, düşük artık akımı, zengin yüzey kimyası, düşük maliyet, kimyasal eylemsizlik ve çeşitli algılama ve tespit uygulamalarına sahiptirler. Bununla birlikte, karbon yüzeylerinde gözlenen elektron aktarım hızları genellikle metal elektrotlarda gözlenenden daha yavaş olmaktadır. Elektron aktarım reaktivitesi, karbon yüzeyinin kökeninden ve geçmişinden büyük ölçüde etkilenir. Elektron aktarım hızlarını arttırmak için çeşitli elektrot ön işlem yöntemleri önerilmiştir (McCreery 1991). Bu nedenle karbon tipi ve ön işlem yöntemi, analitik performans üzerinde derin bir etkiye sahiptir. En popüler karbon elektrot malzemeleri, camsı karbon, karbon pasta, karbon fiber, ekran baskılı karbon şeritleri, karbon filmleri veya diğer karbon içerenlerdir.

Camsı Karbon Elektrotlar

Camsı (veya "vitröz") karbon, oldukça iyi elektriksel ve mekanik özellikleri, geniş bir potansiyel aralığa sahip olması, kimyasal tepkimelere karşı isteksiz olmasıyla birlikte kısmen tekrarlanabilir performansından dolayı oldukça cazip hale gelmiştir. Cam benzeri bir görünüşü olması nedeniyle *"camsı karbon"* olarak isimlendirilmektedir. Materyal, inert bir atmosferde (Adams 1969) önceden modellenmiş bir polimerik (fenolformaldehit) reçine gövdesinin dikkatli ve kontrollü bir ısıtma programı aracılığıyla hazırlanır. Karbonizasyon işlemi; oksijen, azot ve hidrojeni uzaklaştırmak

için 300 ^{o}C ile 1200 ^{o}C aralığında oldukça yavaş bir şekilde ilerler. Camsı karbonun yapısı, çapraz bağlı grafit benzeri tabakaların ince, karışık şeritlerini içerir. Yüksek yoğunluğu ve küçük gözenek boyutu nedeniyle, aşılama işlemi gerekmez (Engstrom 1984). Elektrot kullanmadan önce deiyonize su ile durulanmalıdır. Performansı artırmak için elektrokimyasal, kimyasal, ısı veya lazer işlemleri gibi ek aktivasyon adımları da kullanılmaktadır (McCreery 1991).



Şekil 2.4. A) Camsı karbon malzemesinin yapısı B) Ticari camsı karbon elektrot C) Ticari camsı karbon elektrot kesit görünümü

Karbon Pasta Elektrotlar

Suya karışmayan, iletken olmayan çeşitli organik bağlayıcılarla (yapıştırma sıvıları) karıştırılmış grafit tozu kullanan karbon pasta elektrotları, kolayca yenilenebilir ve modifiye edilmiş bir yüzey, düşük maliyetli ve çok düşük artık akım katkıları sunar (Rice ve ark. 1983). Çok çeşitli yapıştırma sıvısı seçimi mümkündür, ancak düşük uçuculuk, saflık ve ekonomi konusundaki pratik uygulamalar, seçimi bir kaç sıvıyla sınırlandırır. Bunlar arasında Nujol (mineral yağ), parafin yağı, silikon gresi ve bromo naftalin bulunur. Macun bileşimi, elektrot reaktivitesini kuvvetli bir şekilde etkiler; yapıştırma sıvısı içeriğindeki artış, elektron aktarım hızlarını ve ayrıca artık akım katkılarını azaltır (Rice ve ark. 1983). Yapıştırma sıvısının yokluğunda, kuru grafit elektrot çok hızlı elektron aktarım hızları verir. Artan popülerliklerine rağmen, karbon pasta elektrotların gerçek davranışı tam olarak anlaşılmamıştır.

Karbon Fiber Elektrotlar

Ultra microelektrotlara duyulan ilgi, elektroanalizde karbon fiberlerin yaygın olarak kullanımına yol açmıştır. Bu malzemeler esas olarak yüksek dayanımlı kompozitlerin hazırlanmasında, polimer tekstillerin yüksek sıcaklıktaki pirolizi veya katalitik kimyasal buhar biriktirme yoluyla üretilir. Üretim sürecine bağlı olarak farklı karbon fiber mikro yapıları mevcuttur. Düşük, orta ve yüksek modüllü türler olmak üzere üç geniş grupta sınıflandırılabilir: Sonuncusu, iyi düzenlenmiş grafit benzeri yapısı ve düşük gözenekliliği nedeniyle elektrokimyasal çalışmalar için en uygun olanıdır (Csöregi ve ark. 1993). Fiberin alev veya iyon ışını altında aşındırılmasıyla nanometre boyutunda karbon fiber hazırlanabilir (Edmonds 1985).

Kalem-Ucu Grafit Elektrot

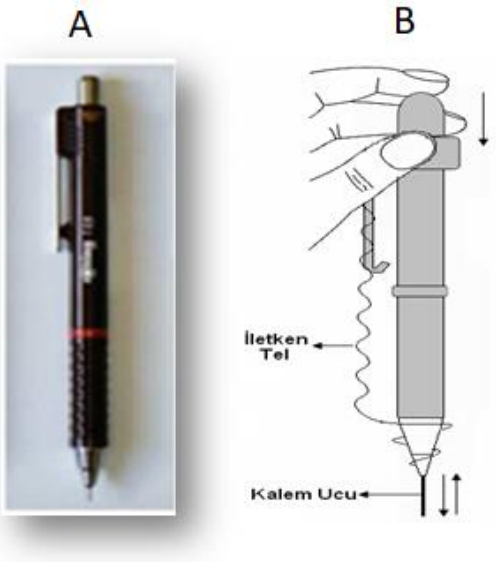
Son zamanlarda GC elektrot üzerinde anodik voltametri tekniği, sıradan analitik tayinlere göre araştırma amaçlı tayinlerde çok daha fazla kullanılmaktadır. Bunun nedeni; elektrot yüzeyinin pasifleşmesinin sonucu olarak yöntemin duyarlılığın azalmasıdır.

Anodik voltametri tekniği uygulamasında, katı elektrot kullanılmasıyla ortaya çıkan en önemli sıkıntı; analiz esnasında bazı moleküllerin yükseltgenme ürünlerinin elektrot yüzeyinde ince bir film tabakası şeklinde toplanması sonucu (elektrot pasifleşmesi); tekniğin hassasiyetinin azalmasıdır. Her ne kadar elektrot temizleme işlemi uygulansa da tekrarlanabilirlik kayıpları oluşmaktadır. 1990′lı yılların sonlarından bu yana el-yapımı kalem-ucu grafit (PG) elektrotlar, özellikle toksik özellik taşıyan moleküllerin basit ve hassas analizlerinde, hem çok ucuz olmaları hem de tek kullanımlık olmalarından dolayı GC ve CP elektrotlara alternatif olmuşlardır. PG elektrotlar, yüksek elektrokimyasal reaktiflik, mekanik olarak sağlamlık, ucuz olma, düşük teknoloji ve kolay hazırlanabilme özelliklerine sahiptir (Wang ve ark. 2000; David ve ark. 2017).

Elektrot olarak değişik çapta ve sertlikte ticari olarak üretilen kurşun kalem uçları kullanılmaktadır(Şekil 2.5). Kalem uçları; kil ve grafitin bal mumu içinde karıştırılması ve daha sonra ısıl işleme maruz bırakılması ile üretilir. Kalem ucunun yumuşaklığı ve siyah olması ticari olarak, grafit ve kil miktarları ile sıcaklığının değiştirilmesi ile sağlanmaktadır. Grafit miktarı arttıkça hem daha yumuşak hem de

daha kalın uç üretilebilmektedir. Kalem uçları en yumuşak (8B) olandan en sert (9H) olana doğru 19 farklı gruba ayrılır. PG elektrot kullanılması ile yapılan tayinlerde doğru kalem sertliğinin seçimi oldukça önemlidir (Tavares ve Barbeira 2008).

PG elektrotlar, GC elektrotlar kadar sert olmadığı gibi, CP elektrotlar kadar da kırılgan değillerdir. Tek kullanımlık olmalarından dolayı elektrotun temizlenmesi aşamalarına ihtiyaç yoktur. Bundan dolayı elektrot cevabının tekrarlanabilirliği çok iyidir. Tek kullanımlık olmalarıyla birlikte oldukça ucuz olmaları ileri teknolojili karbon elektrotlara bir alternatif olarak düşünülebilir. Düşük teknolojiye sahip PG elektrotlar; az miktarda malzeme gereksinimi ve kullanıldıktan sonra, geri dönüşüm için kolay bir şekilde toplanabilmeleri sebebiyle çevre hassasiyeti açısından oldukça cazip elektrotlardır (Demetriades ve ark. 2004).



Şekil 2.5. A) Ticari kurşun kalem B) Kalem-ucu grafit elektrotun şematik gösterimi

Elmas Elektrotları

Elmas yalıtkan bir madde olmasına rağmen, bor katkılı elmas filmler yarı iletkenlikten yarı metalliye kadar değişen elektronik özelliklere sahiptirtirler ve bu özelliklerinden dolayı elektrokimyasal ölçümler için oldukça faydalıdır. Bor katkılı elmas (BDD) film elektrotları, çekici özellikleri nedeniyle yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Compton ve ark. 2003). Bu özellikler arasında geniş bir potansiyel aralığı, düşük ve sabit artık akımları ile uygun sinyal bulunur. Arkaplan özellikleri, organik bileşiklerin ihmal edilebilir adsorpsiyonu, ön işlem yapmadan iyi bir

elektrokimyasal reaktivite, çözünmüş oksijene karşı düşük hassasiyet ve aşırı sertliktir. Bu nedenle elmas elektrotlar, çok yüksek anodik potansiyeller, yüzey aktif madde bakımından zengin ortamlar, asitli ortamlarda polarizasyon veya güç ultrasonu dahil olmak üzere zor koşullar altında çalışma için yeni fırsatlar sunar (Terashima ve ark. 2002).

2.2.5.3. Metal Elektrotlar

Çok çeşitli soy metaller olsa da, platin ve altın en çok kullanılan metalik elektrotlardır. Bu gibi elektrotlar çok uygun elektron aktarım kinetiği ve geniş bir anodik potansiyel aralığı sunar. Buna karşılık, bu elektrottaki düşük hidrojen aşırı gerilimi, katodik potansiyel aralığını sınırlar (pH'a bağlı olarak, - 0.2 V → - 0.5 V bölgesine). Bu tür filmler ayrıca, elektrot reaksiyonunun kinetiğini güçlü bir şekilde değiştirerek yeniden üretilemez verilere yol açabilir. Bu zorluklar, akış amperometrisinde yaygın olduğu gibi, bir puls potansiyel döngüsü ile ele alınabilir (Johnson ve LaCourse 1990). Platin elektrotlara kıyasla, altın elektrotların tepkimeye girme eğilimleri daha azdır ve dolayısıyla kararlı oksit filmlerinin oluşumuna veya yüzey kirlenmesine daha az eğilimlidir. Altın elektrotlar, kendiliğinden monte edilmiş organosülfür tek tabakaları veya eser metallerinin sıyırma ölçümleri için substratlar olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.2.5.4. Kimyasal Olarak Modifiye Edilmiş Elektrotlar

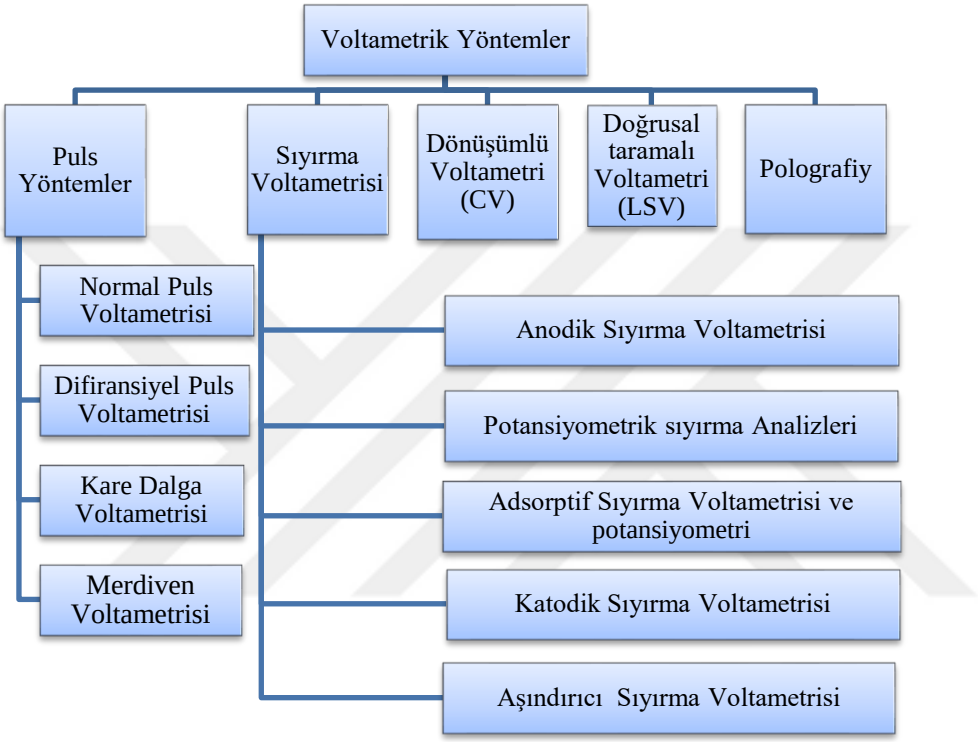
Kimyasal olarak değiştirilmiş elektrotlar (CME) elektrot sistemleri üzerine çağdaş bir yaklaşımı temsil eder. Bu elektrotlar, bir reaktifin davranışını modifiye edilmiş yüzeye kazandırmak için, reaktifin yüzeye yerleştirilmesi temeline bağlıdır. Elektrot yüzeylerinin bu şekilde bilerek değiştirilme işlemi ile çok fazla elektroanalitik problemin ihtiyaçları karşılanabilir. Ayrıca yeni analitik uygulama alanları ile birlikte değişik algılama aletlerinin de temelini oluşturabilir. Moleküler reaktifler kullanılarak elektrotların yüzey işlevselleştirilmesi; enerji dönüşümü, elektrokimyasal sentez ve mikroelektronik aletler dahil olmak üzere başka uygulamalara da sahiptir.

CME'lerin analitik uygulamalardan yararlanabileceği farklı yönler vardır. Bu yönler, elektron transfer reaksiyonlarının hızlandırılmasını, seçimli biriktirmeyi ya da

seçici zar geçirgenliğini içermektedir. Bu adımlar elektrokimyasal cihazlarda daha fazla seçicilik, duyarlılık ya da kararlılık oluşturabilir(Baldwin ve Thomsen 1991).

2.2.6. Voltametrik Yöntemler

Yaygın olarak kullanılan voltametrik yöntemlerin genel bir sınıflandırılması şekil 2.6' de gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Yaygın olarak kullanılan voltametrik yöntemlerin genel bir sınıflandırması

Bu bölümde, sunulan tez çalışmasında kullanılacak olan voltametrik teknikler hakkında kısa bilgi verilecektir.

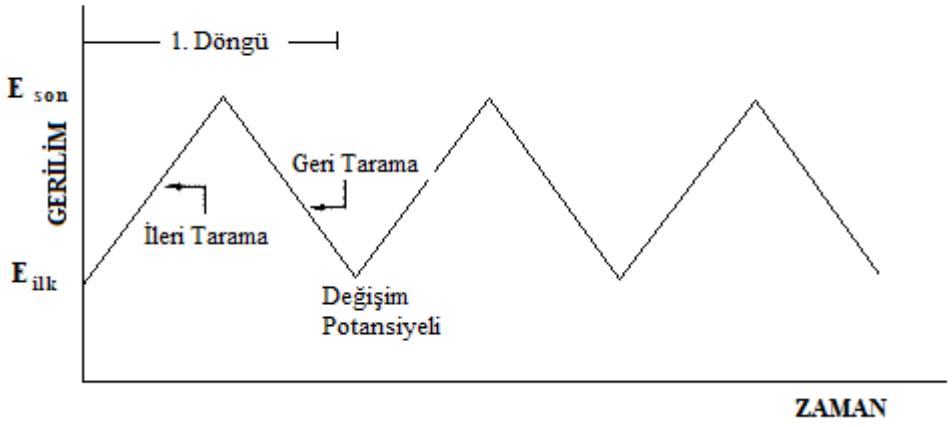
2.2.6.1. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri (CV), elektrokimyasal reaksiyonlar hakkında nitel bilgi elde etmek amacıyla en çok kullanılan yötemlerden biridir. Dönüşümlü voltametrinin gücü, yükseltgenme / indirgenme işlemlerinin termodinamiği ile heterojen elektron aktarım reaksiyonlarının kinetiği ve eşleşmiş kimyasal tepkimeler ya da adsorpsiyon işlemleri hakkında hızlı bir şekilde önemli bilgi sağlama kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. Dönüşümlü voltametri genellikle bir elektroanalitik çalışmada yapılan ilk deneydir.

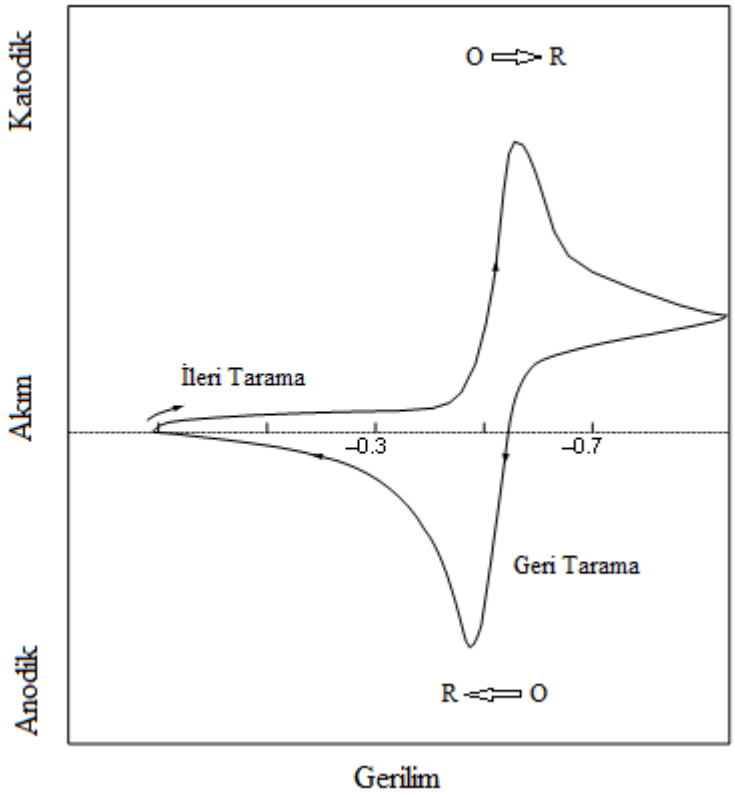
Karmaşık redoks tepkimelerinin mekanizmalarını incelemek, ara-ürün tepkimelerini ve tepkime ürünlerinin dayanıklılığını araştırmak için kullanılır. Duyarlılığı düşük (~10^{-5} M) olduğu için miktar tayini çalışmalarında kullanım alanları sınırlıdır (Önal 2018).

Dönüşümlü voltametri, üçgen potansiyel dalga şekli kullanarak karıştırılmamış çözeltide sabit bir çalışma elektrotunun potansiyelinin doğrusal olarak taranmasından oluşur (Şekil 2.7). Bu teknikte, seçilen çalışma elektrotuna pozitif ya da negatif yönde uygulanan gerilim bir değere kadar belli tarama hızlarında değiştirildikten sonra geri döndürülür. Geri dönüşte başlangıç gerilimine ya da farklı bir gerilime gidilebilir. İstenilen bilgilere bağlı olarak, tekli veya çoklu çevrimler kullanılabilir. Potansiyel taraması sırasında, potansiyostat uygulanan potansiyelden elde edilen akımı ölçer. Elde edilen akım - potansiyel grafiği bir *"dönüşümlü voltamogram''* olarak adlandırılır (Nicholson ve Shain 1964).

Şekil 2.8'de tek bir potansiyel döngü esnasında gtersinireri dönüşümlü bir yükseltgenme / indirgenme çiftinin beklenen cevabı görülmektedir. Oksijenin sadece başlangıç aşamasında bulunan oksitlenmiş halde olduğu kabul edilir. Böylece, negatif bir potansiyel tarama ilk yarı döngü için indirgenmenin olmadığı bir değerden başlayarak seçilir. Redoks işlemi için karakteristik E° uygulanan potansiyele yaklaştığında, bir katodik akım tepeye ulaşılıncaya kadar artmaya devam eder. İndirgeme işleminin gerçekleştirildiği potansiyel bölgeyi geçtikten sonra, Potansiyel taramanın yönü tersine döner. Geri tarama esnasında, indergenme molekülleri (ileri yarım döngüde elde edilir ve yüzeye yakın bölgede birikir) tekrar oksitlenerek anodik bir tepe noktası elde edilir.



Şekil 2.7. Dönüşümlü bir voltametrik deneyde potansiyel - zaman grafiği



Şekil 2.8. Tersinir bir O + n ē ↔ R redoks işlemi için tipik dönüşümlü voltamogram

2.2.6.2. Puls Voltammetrisi

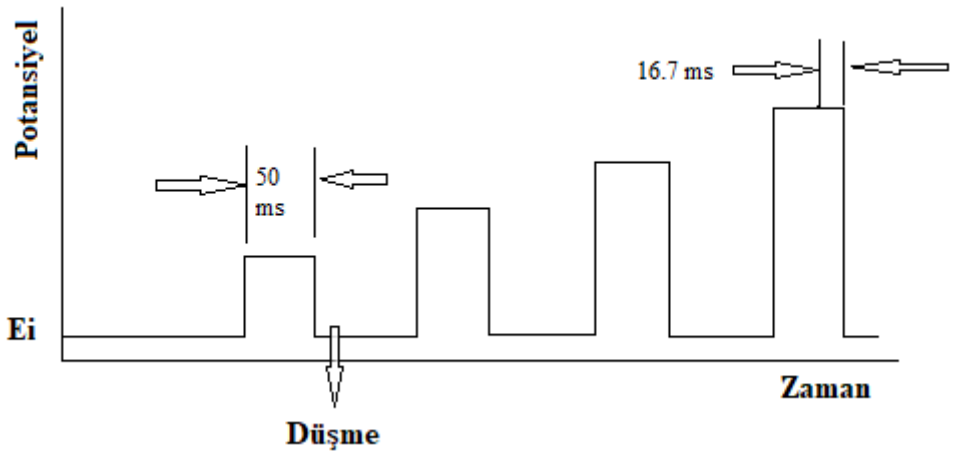
Barker ve Jenkin tarafından sunulan puls voltametrik teknikleri, voltammetrik ölçümlerin tayin sınırlarını düşürmeyi amaçlamaktadır (Barker ve Jenkin 1952).

Faradaik ve faradaik olmayan akımlar arasındaki oranın önemli derecede arttırılmasıyla, bu teknikler 10^{-8}M derişim seviyesine kadar uygun miktar tayinine izin verir. Son derece gelişmiş performansları nedeniyle modern puls teknikleri analitik laboratuvarda klasik polarografiyi büyük ölçüde destekler.

Çeşitli puls voltametrik teknikleri arasındaki fark, uyarım dalga şekli ve mevcut örnekleme sistemidir. Hem normal puls hem de diferansiyel puls voltametrisi ile DME kullanıldığında her bir civa damlası için bir potansiyel puls uygulanır. (Her iki teknik de katı elektrotlarda kullanılabilir.) düşme süresinin kontrol edilmesiyle, puls (titreşim) civa damlasının maksimum büyümesiyle senkronize edilir. Bu noktada, düşüş süresinin sonuna yaklaşırken, faradaik akım maksimum değerine ulaşırken, şarj akımının katkısı minimumdur.

Normal Puls Voltammetri

Normal puls voltametrisi, her damla kullanım süresinin sonuna doğru önceden belirlenmiş bir zaman aralığında arka arkaya düşen damlalara uygulanan artan genlikli bir seri puls'tan oluşur (Barker ve Gardner 1960). Şekil 2.9'da böyle bir normal puls dizisi, görülmektedir.

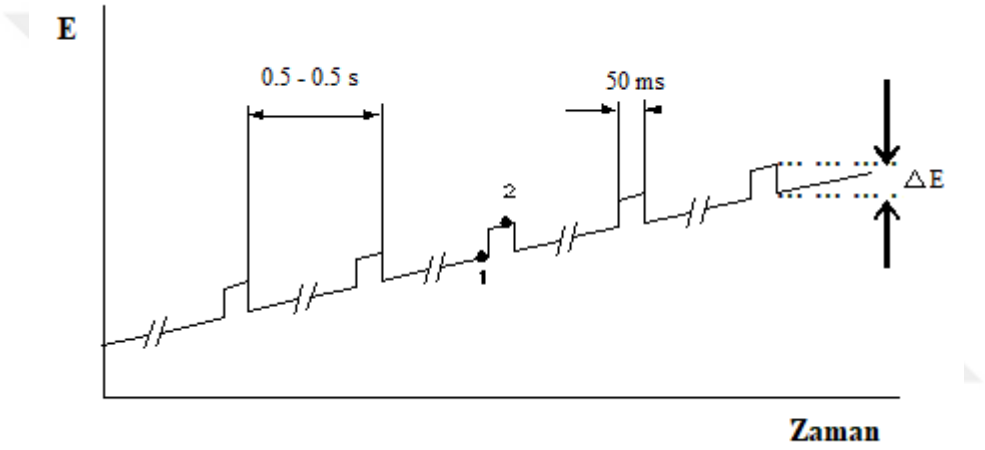


Şekil 2.9. Normal puls voltametri için uyarma sinyali

Pulslar, elektrot, analit arasında reaksiyonunun gerçekleşmediği sabit (baz) bir potansiyelde tutulur. Pulsun genliği, düşen her damla ile doğrusal bir şekilde artar. Puls uygulandıktan yaklaşık 40 ms sonra akım ölçülür. Bu esnada şarj akımının katkısı sıfıra yakındır.

Diferansiyel Puls Voltammetrisi

Diferansiyel puls voltametrisi(DPV), organik ve inorganik moleküllerin eser seviyelerini tayin etmek için oldukça yararlı bir yöntemdir. DPV'de, lineer potansiyel bir rampanın üzerine bindirilen sabit büyüklükteki puls çalışma elektroduna düşmenin tamamlamasından hemen önce bir anda uygulanır (Şekil 2.10). Akım puls uygulanması öncesi ve puls süresi bittikten sonra iki defa örneklenir. İlk akım, enstrümental olarak ikinciden çıkarılır ve bu farkın [$\Delta i = i\ (t_2) - i\ (t_1)$] uygulanan potansiyele karşı grafiği çizilir. Elde edilen DP voltamogramının, yüksekliği analitin derişimi ile doğru orantılı olan akım piklerinden oluşur (Parry ve Osteryoung 1964).



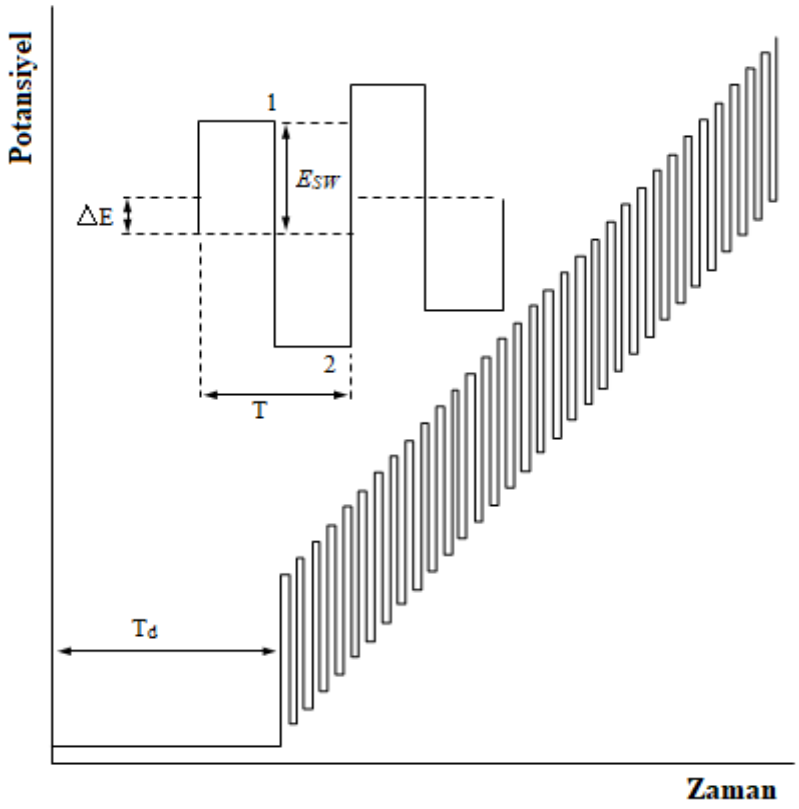
Şekil 2.10. Diferansiyel puls voltametri için uyarma sinyali

Kare Dalga Voltametrisi

Kare dalga voltametrisi(SWV), çalışma elektroduna taban merdiven potansiyeli üzerine bindirilmiş olan simetrik bir SW'den meydana gelen bir dalga formunun uygulandığı, büyük genlikli bir diferansiyel yöntemdir (Osteryoung ve Osteryoung 1985). Şekil 2.11'de görüldüğü gibi akım, her kare dalga döngüsü esnasında bir defa ileri puls sonunda (t_1) bir defa da geri pulsun sonunda (t_2) olmak üzere iki kez örneklenir. Kare dalga modülasyon genliği oldukça büyük olduğundan dolayı, geri pulslar ürünün (ileri pulsun) geri reaksiyonuna sebep olur. İki ölçüm arasındaki fark, taban merdiven potansiyeli ile kıyaslanmıştır.

Tersinir ve tersinmez durumlarda, SW ile DP voltametrileri karşılaştırıldığında, SW akımlarının analog DP yanıtına göre sırasıyla 4 ve 3.3 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Borman 1982).

Kare dalga voltametrisinin en büyük avantajı hızıdır. Etkili tarama oranı f ve ΔE_s tarafından verilir. f terimi kare dalga frekansıdır (Hz) ve ΔEs adım yüksekliğidir. Saniyede 1-100 devir arasındaki frekanslar, son derece hızlı potansiyel tarama hızlarının kullanılmasına izin verir. Örneğin, ΔEs = 10 mV ve f = 50Hz, olursa etkili tarama hızı 0,5 V / s'dir. Sonuç olarak, analiz süresi büyük ölçüde azalır; tam bir voltamogram, diferansiyel puls voltametrisindeki yaklaşık 2-3 dakika ile karşılaştırıldığında birkaç saniye içinde kaydedilebilir (Yarnitzky 1985).



Şekil 2.11. Genliği gösteren kare-dalga dalga formu(Esw), adım yüksekliği (ΔE), kare dalga periyodu (T), gecikme süresi (Td) ve mevcut ölçüm zamanları 1 ve 2'dir (O'Dea ve ark. 1981)

2.2.6.3. Sıyırma Voltametrisi

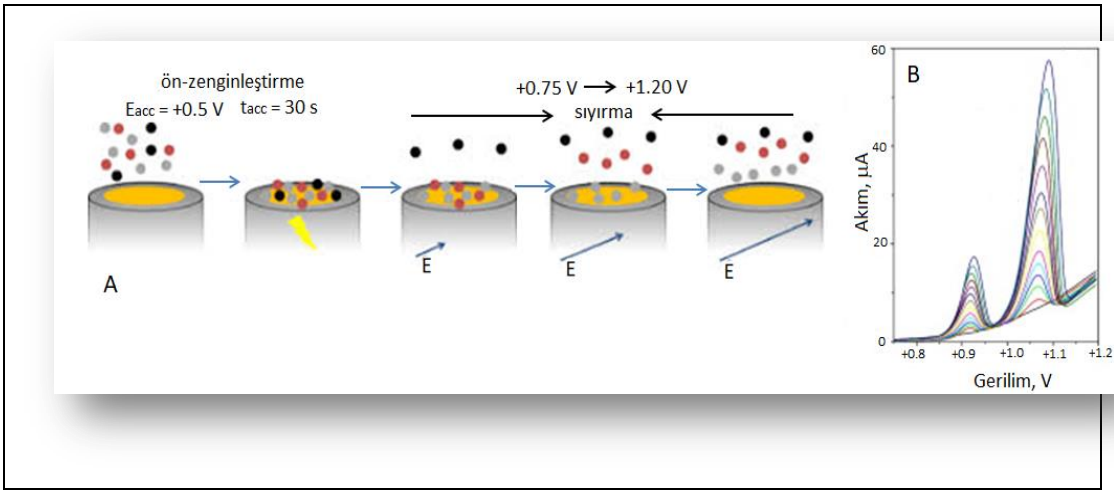
Sıyırma analizleri, eser metalleri ölçmek amacıyla oldukça duyarlı elektrokimyasal bir yöntemdir (Copeland ve Skogerboe 1974). Olağanüstü duyarlılığı,

oldukça uygun bir sinyal üreten gelişmiş ölçüm prosedürleri ile etkili bir ön derişim adımının birleşimine bağlanır. Metaller 100-1000 faktörlerle elektrotta ön deriştirme işlemi yapıldığından, tespit sınırları çözelti fazlı voltametrik ölçümlere göre 2 ile 3 büyüklük seviyesinde düşürülür. Dolayısıyla, 4 ile 6 metal nispeten ucuz enstrümanlar kullanılarak 10^{-10}M'ye kadar düşük derişim seviyelerinde çeşitli matrislerde eş zamanlı olarak ölçülebilir.

Aslında, sıyırma analizi iki aşamada gerçekleşen bir yöntemdir. Birinci ya da biriktirme aşaması, çözelti içinde bulunan metal iyonlarının az bir miktarının çalışma elektrotuna elektrolitik birikmesini içerir. Bu işleme ön zenginleştirme veya ön deriştirme denir. Bunu, birikintinin çözülmesini (sıyırma) içeren sıyırma aşaması (ölçüm aşaması) takip eder. Bu iki basamak arasında ayrıca bekleme basamağı bulunur. Bekleme basamağı, daha sonraki basamağın durağan bir çözelti içerisinde oluşmasını sağlar.

Biriktirme ve ölçüm adımlarının niteliğine göre, değişik sıyırma analiz çeşitleri kullanılmaktadır. En çok kullanılan sıyırma teknikleri; anodik sıyırma voltametrisi (ASV), katodik sıyırma voltametrisi (CSV) ve adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV) teknikleridir.

Şekil 2.12'de sıyırma voltametrisi tekniğinde elektrot yüzeyinde etkin olan iki temel basamak ve normal bir sıyırma voltamogramı verilmiştir.



Şekil 2.12. A) Sıyırma voltametrisi tekniğinin şematik gösterimi ve B)Tipik bir sıyırma voltamogramı

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanmış olduğumuz kimyasal maddeler ve üretici firmaları çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar

Kimyasal Madde	**Üretici Firmanın Adı**
Metformin, $C_4H_{11}N_5HCl$	Sigma
Vildagliptin, $C_{17}H_{25}N_3O_2$	Sigma
Sodyum hidroksit, NaOH	Sigma
Nitrik asit, HNO_3 (% 65, a/a),	Sigma
Hidroklorik asit, HCl (% 37, a/a),	Merck
Fosforik asit, H_3PO_4 (% 85 a/a)	Merck
Asetik asit, CH_3COOH (% 99-100 a/a),	Merck
Borik asit, H_3BO_3	Merck
Disodyum hidrojen fosfat, $Na_2HPO_4.7H_2O$	Merck
Sodyum klorür, NaCl	Sigma
Dimetil sülfoksit (DMSO), C_2H_6OS	Merck
Alüminyum oksit, Al_2O_3	Merck
Sodyum dodesilsülfat (SDS), $C_{12}H_{25}NaO_4S$	Sigma
Polietilen glikol *tert*- oktilfenil eter (TRİTON), t -okt-Cl_6IH_4 - $(OCH_2CH_2)_X$, OH, x= 9-10	Sigma
Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), $CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$	Sigma

Çalışmalarımızda, Milli-Q sistemi (Millipore) ile elde edilen saf su kullanılmıştır.

3.1.2. Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.2.1. Vildagliptin Çözeltisinin Hazırlanması

Bu çalışmada etken madde olarak seçilen Vildagliptin bileşiğinin çözünürlüğü 1.75 g/L su olduğu için (bakınız, Çizelge 2.5) stok çözeltisinin (1 x 10^{-3} M) hazırlanmasında analitik saflıkta su kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler kullanılmadığı sürece +4 ^oC sıcaklığında buzdolabında saklanmıştır. Uygun destek elektroliti içerisinde ölçümü yapılacak çeşitli derişimdeki standart çözeltilerin hazırlanmasında stok çözeltilerden yararlanılmıştır.

3.1.2.2. Metformin Çözeltisinin Hazırlanması

Bu çalışmada etken madde olarak seçilen Metformin bileşiği su içinde tamamen çözündüğü için (bakınız, Çizelge 2.5) stok çözeltisinin (1 x 10^{-3} M) hazırlanmasında su kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler kullanılmadığı sürece +4 ^oC sıcaklığında

buzdolabında saklanmıştır. Uygun destek elektroliti içerisinde ölçümü yapılacak çeşitli derişimdeki standart çözeltilerin hazırlanmasında stok çözeltilerden yararlanılmıştır.

3.1.2.3. Destek Elektroliti Çözeltilerinin Hazırlanması

Deneylerde destek elektroliti çözeltisi olarak pH 2.0 ile pH 12.0 aralığında Britton-Robinson (BR) tamponu, 0.1 M, pH 2.0 ,3.0,7.4 ve 9.0 fosfat (PBS) tamponu ve 0.1 M, pH 4.8 olan asetat tamponu (ABS) çözeltileri kullanılmıştır. BR tampon çözeltileri çizelge 3.1 'de adı geçen 0.04 M H_3BO_3, 0.04 M CH_3COOH ile 0.04 M H_3PO_4 karışımı ile hazırlanmıştır. BR tampon çözeltileri için istenen pH değeri 5 M NaOH ve 5 M HCl çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Fosfat tampon çözeltisi hazırlanırken, 0.1 M'lık $Na_2HPO_4.7H_2O$ çözeltisi üzerine 5 M HCl veya 5 M NaOH çözeltisi ilave edilerek farklı pH değerlerinde tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Asetat tampon çözeltisi 0.1 M CH_3COOH çözeltisi üzerine istenen pH değerine ulaşıncaya kadar 5 M NaOH ilavesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiler buzdolabında 4 ^oC sıcaklıkta Pyrex® cam şişeler içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.1.2.4. Sürfaktan Çözeltilerinin Hazırlanması

Elektrokimyasal çalışmalarda Sürfaktan (yüzey aktif madde) etkisinin incelenmesinde kulanılmak üzere; anyonik sürfaktan olarak SDS, katyonik sürfaktan olarak CTAB ve iyonik olmayan sürfaktan olarakta Triton (TRT) kullanılmıştır. 0.1 M derişimli sürfaktan stok çözeltileri saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Uygun destek elektrolit çözeltisinde farklı derişimde sürfaktan çözeltileri hazırlarken 0.1 M'lık stok çözeltiler kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler çizelge 3.2'de verilmiştir

Çizelge 3.2. Kullanılan cihaz ve malzemeler

Elektrokimyasal analiz cihazı	Autolab PGSTAT 128N (EcoChemie, The Netherlands) (Nova 1.11 yazılımı) + BAS C3 katı elektrot hücre standı ünitesi (Bioanalytical System, BAS, USA)
Elektrokimyasal deney hücresi	10 mL'lik voltametrik hücre (MR 1208, BAS)
Çalışma elektrotu	●Kalem-ucu grafit (PG) elektrot (etkin elektrot alanı: 15.9 mm^2) ●Camsı karbon (GC) elektrot (Ø: 3mm, çap), MF 2012 (BAS)
Karşılaştırma elektrodu	Ag/AgCl (3 M NaCl, MF 2052, BAS)
Yardımcı elektrot	Platin tel (MF 1032 BAS)
Hassas elektronik terazi	Termo scientific Orion 3 star pH meter
pH metre	WTW, Inolab pH 720
Vorteks	IKA MS3 B
Karıştırma ünitesi	Manyetik karıştırıcı (ARE heating magnetic stirrer) Magnet (Spinbar VMR micro)
Santrifüj	Cooled Hettich ROTINA 380R
Ultrasonik banyo	Clifton
Çeşitli boy balonjoje (Pyrex®), pipet (Pyrex®), beher, mezür, deney tüpü, santrifüj tüpü, porselen havan	

3.2.1. Voltametrik Sistem

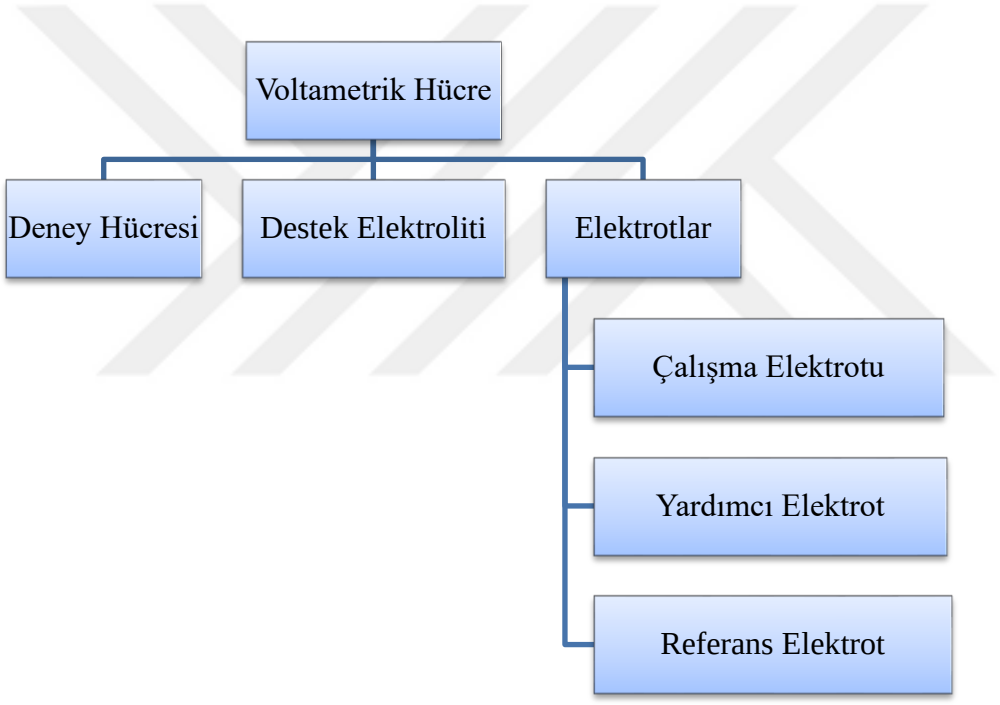
Elektroanalitik çalışmaların gerçekleştirilmesinde kullanılan voltametrik sistemde; elektrokimyasal analiz cihazı (EcoChemie/Autolab PGSTAT 128N) ve üç elektrotlu hücre ünitesi (Bioanalytical System Inc. (BAS)) birlikte kullanılmıştır. Cihaza bağlanan bir bilgisayar ve nova 1.1 yazılımı ile hem cihazın kontrolü hem de elde edilen verilerin değerlendirilmesi kolaylıkla gerçekleştirilmektedir. Çalışmalarımızda kullandığımız sistem Şekil 3.1′de verilmiştir.

Deneysel çalışmamızda kullandığımız voltametrik hücreyi oluşturan bileşenler Şekil 3.2′de görülmektedir.

Elektrokimyasal analiz cihazı için; Pyrex® camdan tek bölmeli ve dört giriş deliği bulunan bir kapağı olan deney hücresi (Şekil 2.2 ve 3.1B) özel olarak üretilmiştir. Deneyde kullanılan elektrotlar hücreye kapağındaki girişlerden yerleştirilir. Katodik bölge çalışmalarında çözeltide çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için kapaktaki dördüncü girişten teflon bir boru yardımıyla çözeltiye azot gazı gönderilir.



Şekil 3.1. A) Autolab PGSTAT 128N elektrokimyasal analizör B) BAS C3 katı elektrot hücre standı ünitesi



Şekil 3.2. Voltametrik hücre bileşenleri

Deneylerde, çalışma elektrotu olarak PG elektrot ile kıyas amaçlı GC elektrot kullanılmıştır.

PG elektrot için kullanılan kalem uçları (Tombo 0.5 /2B Japan) kırtasiyelerden temin edilmiştir. Kullanılan PG elektrotun hazırlanmasında Wang ve ark. (2000)′nın yönteminden faydalanılmıştır. Kırtasiyeden aldığımız Rotring marka kalemin uç kısmındaki metal parça ve kalemin metalik tutacağı bakır bir tel ile bağlanarak elektriksel iletkenlik sağlanmıştır (Şekil 2.6). 6 cm uzunluğundaki kalem uçları 1.5 cm'si dışarda kalacak şekilde kaleme takılmıştır. İçerisinde 10 mL analiz çözeltisi

bulunan elektrokimyasal hücreye kalem ucunun 1 cm'lik kısmı daldırılarak ölçümler yapılmıştır. Yapılan her bir ölçümde yeni bir kalem ucu kullanılmıştır.

PG elektrotun aktivasyon işlemi gerçekleştirilirken; Her ölçümden önce destek elektrolit çözeltisine daldırılan elektrota (çözeltiyi karıştırmadan) 60 s boyunca +1.4 V'luk gerilim uygulanmıştır. CV çalışmalarında aktivasyon işlemi, aynı süre ve +1.8 V gerilim ile gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen verilerin karşılaştırılması amacıyla; kullanılan GC elektrot (Şekil 2.11) üzerinde tekrarlanabilir elektrot yüzeyi elde edebilmek amacıyla her voltamogramın kaydedilmesinden önce mekanik bir temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem BAS firması tarafından üretilmiş kadifemsi parlatma kiti (MF 1040) üzerine dökülen Al_2O_3'ün (alümina, Ø: 0.01 μm, çap) suyla bulamaç haline getirilmesi ve elektrot yüzeyinin bu bulamaç üzerinde dairesel hareketler yapılarak birkaç dakika parlatılması ile gerçekleştirilmiştir (Bott 1997). Alümina kulanıldıktan sonra elektrot yüzeyininin bu maddeden temizlenmesi için su ile ultrasonik temizleme işlemine tabi tutulmuştur.

3.3. Voltametrik Yöntem

Vildagliptin ve Metformin bileşiklerinin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesine yönelik ön çalışmalarda PG elektrotu üzerinde CV tekniği uygulanmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde ilgili bileşiklerin adsorptif voltametrik özellikleri PG ve GC (pH çalışmalarında) elektrotlar üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla; destek elektroliti yapısının ve pH değerinin, sürfaktanların (anyonik ve katyonik), gerilim tarama hızının, biriktirme ve kare-dalga değişkenlerinin elektrot yanıtı üzerine etkileri araştırılmıştır. Son olarak ise geliştirilen voltametrik tekniğin (kare-dalga voltametrisi, SWV) performans özellikleri belirlenmiş (çalışma aralığı, gözlenebilirlik sınırı, kesinlik) ve daha sonra kullanılan yöntem, ticari ilaç şekillerine ve idrar örneklerine uygulanmıştır.

Metformin ve Vildagliptin bileşiklerinin sıyırma voltametrik tayini için izlenen yol aşağıdaki şekilde özetlenebilir: Üç-elektrotlu sistem, sürfaktansız ya da sürfaktan varlığında belirli derişimde adı geçen bileşikleri ihtiva eden destek elektrolit çözeltisine konulur. Daha sonra çözelti 600 rpm sabit hızda karıştırılır ve seçilen biriktirme gerilimi (en uygun, 0.0 V) çalışma elektrotunun yüzeyine seçilen bir ön-zenginleştirme süresince (en uygun, 120 s) uygulanır. Bu sürenin sonunda, karıştırma durdurulur ve 10 s bekleme

süresince çözelti sakinleşmeye bırakılır. Ardından SW dalga formunu kullanarak pozitif yönde belli bir gerilim tarama aralığında (0.0 V ile +1.4 V) voltamogramlar kaydedilir. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanmak koşulu ile laboratuvar sıcaklığında (25 ± 5 °C) alınır.

3.3.1. Voltametrik Yöntemin Gerçek Örneklerde Uygulaması

3.3.1.1. Enjektabl Çözeltiler

Tekniğin, ticari ilaç formuna uygulanması aşamasında eczaneden satın alınan her bir film kaplı tablet 50 mg Vildagliptine eşdeğer VİDAPTİN® 50 mg film tablet ve her bir film kaplı tablet 780 mg metformin baza eşdeğer 1000 mg metformin hidroklorür içeren GLİFOR® 1000 mg film tablet kullanılmıştır. Tabletlerden belirli derişimlerde Vildagliptin ve Metformin çözeltileri hazırlandı ve ardından en uygun çalışma şartları için belirlenen destekleyici elektrolit bulunduran voltametrik hücre içerisine bu karışımdan µL seviyesinde ilaveler yapılmıştır. Örnek çözeltiler direkt analiz edilmiş ve miktar tayini kalibrasyon metodu ile gerçekleştirilmiştir. Her deney üç defa tekrar edilmiştir.

3.3.1.2. İdrar Örnekleri

İdrar örneği, sigara içmeyen ve ilaç kullanmayan sağlıklı bir gönüllüden aç karnına ve deneylerden hemen önce toplanmıştır. Bilinmeyen endojen kimyasalları uzaklaştırmak için örnek, 5000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki berrak kısımdan alınan 250, 500, 1000 µL, 10 mL PBS tamponu (pH 9.0) çözeltisi içeren voltametrik hücreye aktarılmıştır (seyrelme derecesi 1:40, 1:20 ve 1:10 h/h). Hücre içindeki bu çözeltiye model idrar örneği oluşturmak üzere 10 µL Vildagliptin standart çözeltisinden (5.88×10^{-2} M) eklenmiştir. Vildagliptin'in tayini, elektrokimyasal hücreye standart çözeltiden 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL eklemek suretiyle standart katma yöntemi kullanarak gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem Vildagliptin katılmayan idrar örneğiyle de (kör) yapılmıştır. Her deney üç kez tekrar edilmiştir. Vildagliptin için uygulanan işlemlerin aynısı Metformin için 0.1 M NaOH ortamında gerçekleştirilmiştir. Hücre içindeki çözeltiye model idrar örneği oluşturmak üzere 10 µL Metformin standart çözeltisinden (5.51×10^{-2} M) eklenmiştir. Metformin'in tayini, elektrokimyasal hücreye standart çözeltiden 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 µL eklemek suretiyle standart katma yöntemi kullanarak gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem

Metformin eklenmeyen idrar örneğiyle de (kör) yapılmıştır. Her deney üç kez tekrar edilmiştir.

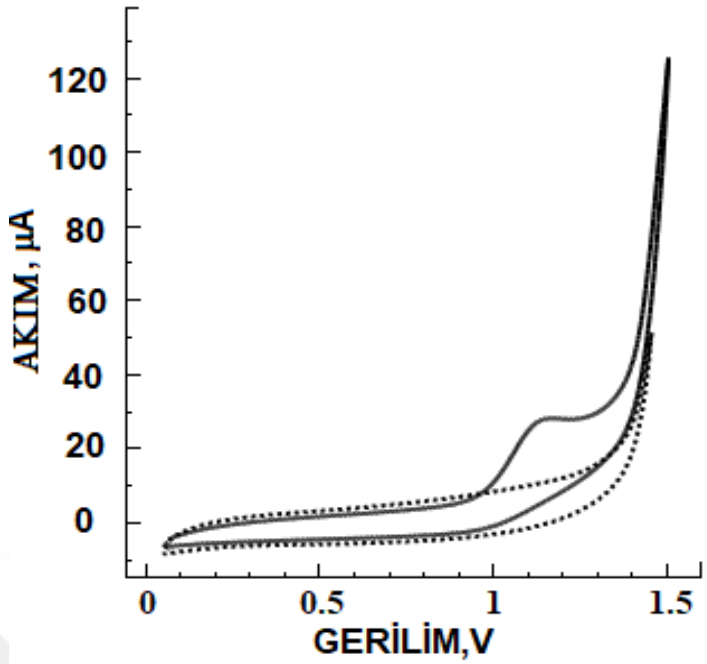
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Vildagliptin'in Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

Karbon-temelli elektrotlardan PG ve GC (kıyas amaçlı) elektrotlarının kullanılması durumunda Vildagliptin molekülünün pik akım sinyali ve gerilimi üzerindeki elektrokimyasal davranışını anlamak için başlangıç deneyleri, farklı pH değerlerine sahip sulu ya da sürfaktan içeren sulu çözeltilerde CV, SWV ve DPV teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. (Not: Bölüm 3.1.2′de anlatıldığı gibi Vildagliptin′in sudaki çözünürlüğü iyi olduğu için molekülün stok çözeltileri analitik saflıkta saf su kullanılarak hazırlanmıştır).

4.1.1. Dönüşümlü Voltametri

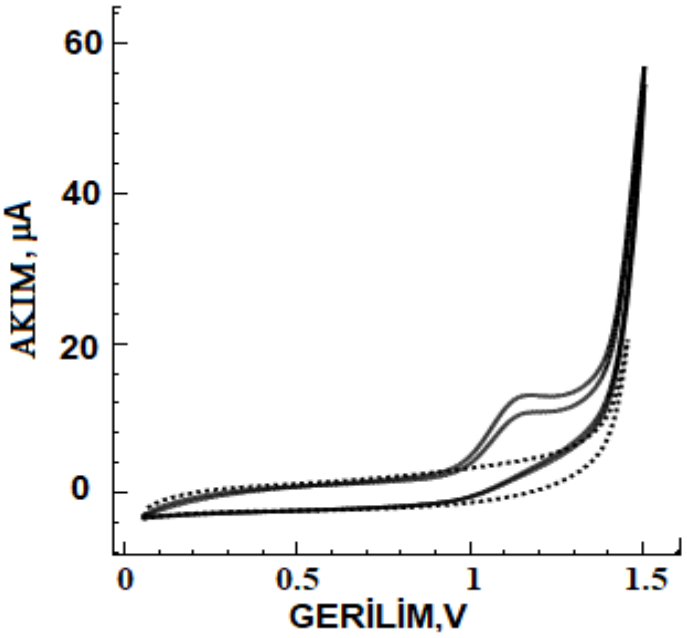
Çalışmanın başlangıç aşamasında PG elektrot kullanarak $5.88x10^{-3}$M Vildagliptin'in PBS tampon (pH 9.0) çözeltisinde (0.0 V) - (+1.4 V) - (0.0 V) tarama aralığı ve 100 mVs^{-1} tarama hızında, dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir. İlgili voltamogramlar Şekil 4.1′de verilmiştir. Voltamogramlar incelendiğinde; Vildagliptin molekülünün, çözelti ortamının pH değerine bağlı olarak yükseltgendiği görülmektedir. Asidik ve nötral bölgelerde, piklerin birbirinden iyi ayrılmadığı ve belirginliklerinin düşük olduğu gözlemlemlenmiştir. Ancak bazik bölgede voltamogramın keskinliği önemli ölçüde artmıştır. Vildagliptin molekülünün yükselgenmesinden sonra katodik bölgede gerilim taramasına devam edildiğinde çalışılan gerilim aralığında herhangi bir indirgenme basamağına rastlanmamıştır. Bu durum, Vildagliptin molekülünün PG elektrotu üzerindeki yükseltgenmesinin tüm pH değerlerinde tam olarak tersinmez olduğunun göstergesidir.



Şekil 4.1. 5.88×10^{-3} M Vildagliptin′in PBS (pH 9.0) tampon çözeltisinde dönüşümlü voltamogramı [1]

Şekil 4.2′de Analitik çalışmalar için en uygun ortam olan PBS tamponu (pH 9.0) içerisinde Vildagliptin bileşiğinin aynı koşullarda iki döngülü voltamogramı görülmektedir. İlk döngüde, pik gerilimi ve akımı sırasıyla + 1.126 V ve 7.279 µA iken ikinci döngüde bu değerler +1.129 V ve 9.81 µA olarak belirlenmiştir. Bu oluşum, molekülün yükseltgenme ürünlerinin elektrot yüzeyine kuvvetle adsorbe olduğunun önemli bir göstergesidir. Bu nedenle elektrot etkinliği büyük ölçüde azalmıştır. Bununla biirlikte PG elektrotunun tek-kullanımlık olması nedeniyle çalışmanın analitik bölümünde tekrarlanabilir voltametrik yanıt elde etmek açısından herhangi bir olumsuzluğun gerçekleşmeyeceği açıktır.

[1] Elektrot; PG, gerilim tarama hızı; 100 mVs^{-1}, Noktalı çizgi; destek elektrolit çözelti

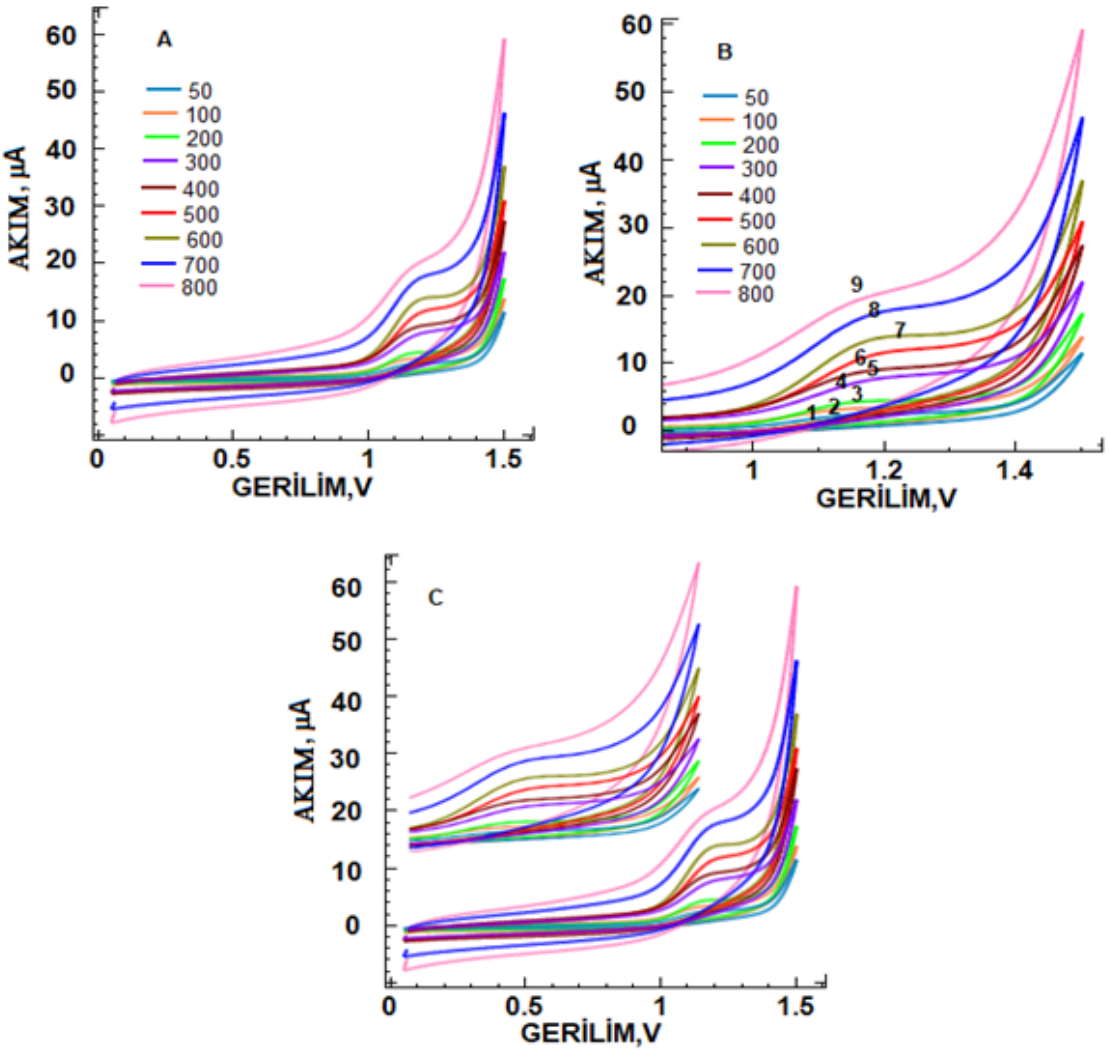


Şekil 4.2. 5.88×10^{-3} M Vildagliptin′in PBS (pH 9.0.0) tampon çözeltisinde iki döngülü voltamogramı[1]

4.1.1.1. Gerilim Tarama Hızının Etkisi

Gerilim tarama hızının Vildagliptin molekülü üzerine elektrokimyasal yükseltgenme etkisini araştırmak için, 5.88×10^{-4} M Vildagliptin çözeltisinin PBS tampon (pH 9.0) çözeltisinde (0.0 V)-(+1.5 V)-(0.0 V) tarama aralığı, 0.0 V başlangıç gerilimi ve 50-800 mVs^{-1} aralığında tarama hızlarında, dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir. Şekil 4.3' te görüldüğü gibi tarama hızının artmasıyla yükseltgenme basamağının belirginliğide artmaktadır. Bundan dolayı çalışmanın devamında analitik sinyal olarak bu basamak seçilmiştir. Şekil 4.3' te verilen voltamogramlar yardımıyla tespit edilen pik akımı (i_p), pik gerilimi (E_p) ve gerilim tarama hızı (v) arasındaki ilişki Çizelge 4.1'de verilmiştir.

[1] Elektrot; PG, gerilim tarama hızı; 100 mVs^{-1}, Noktalı çizgi; destek elektrolit çözelti



Şekil 4.3. A) 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in PBS (pH 9.0) tamponu içinde PG elektrot kullanılarak 1) 50, 2) 100, 3) 200, 4) 300, 5) 400, 6) 500, 7) 600, 8) 700, 9) 800 mVs^{-1} gerilim tarama hızlarıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramları [1]

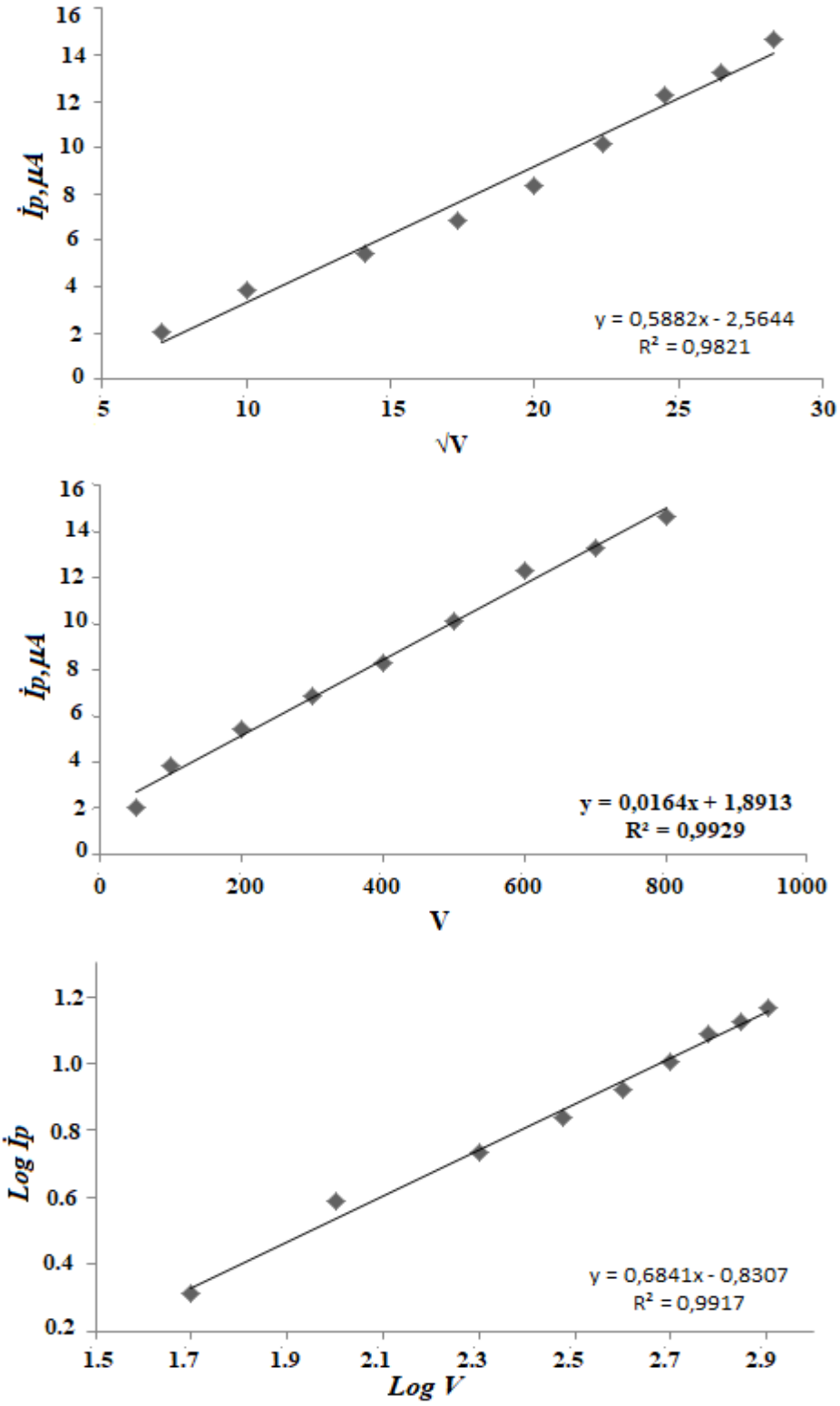
[1] B) A'nın büyütülmüş şeklinin bir kesiti C) A ve B'nin birleştirilmiş şekli

Çizelge 4.1. Vildagliptin voltamogramlarındaki pik akımı ile pik gerilimi üzerindeki gerilim tarama hızının etkisi [1]

v (mVs^{-1})	$\sqrt{v}$	log v	i_p (µA)	logi_p	E_p (V)
50	7.07	1.70	2.05	0.311754	1.128
100	10.00	2.00	3.88	0.588832	1.142
200	14.14	2.30	5.46	0.737193	1.157
300	17.32	2.48	6.88	0.837588	1.167
400	20.00	2.60	8.33	0.920645	1.175
500	22.36	2.70	10.16	1.006894	1.179
600	24.50	2.78	12.28	1.089198	1.184
700	26.46	2.85	13.28	1.123198	1.187
800	28.28	2.90	14.68	1.166726	1.191

Çizelge 4.1′deki bulgulardan yararlanarak çizilen $\sqrt{v}$ - i_p, v - i_p ve log$v$ - logi_p grafikleri Şekil 4.4′te verilmiştir.

[1] Vildagliptin konsantrasyonu, 5.88×10^{-4} M; teknik, CV; destek elektrolit, PBS (pH 9.0); elektrot, PG



Şekil 4.4. Vildagliptin′e ait gerilim tarama hızı-pik akımı ilişkisi [1]

[1] Vildagliptin derişimi, 5.88×10^{-4} M; teknik, CV; destek elektrolit, PBS tamponu (pH 9.0); elektrot, PG

50 mVs^{-1} ile 800 mVs^{-1} aralığında pik akımı ve tarama hızı ilişkisinden bulunan doğrusallık denklemleri aşağıdaki gibidir:

i_p (μA) = 0.5882 $\sqrt{v}$ (mVs^{-1}) – 2.5644	r = 0.991
i_p (μA) = 0.0164 v (mVs^{-1}) + 1.8913	r = 0.996
logi_p = 0.6841 log$v$ – 0.8307	r = 0.996

Farklı tarama hızlarından elde edilen yükseltgenme piki Şekil 4.4'te verilmiştir. Kontrollü bir difüzyon elektrot tepkimesi incelendiği zaman i_p / $\sqrt{v}$ ilişkisinin doğrusal, i_p / v grafiğinin de üstel bir artış göstermesi beklenir. İdeal koşullarda; adsorpsiyon kontrollü bir pikte; i_p/v grafiği doğrusal ve logi_p/log$v$ grafiğinin eğimi ise 1 bulunur. Difüzyon kontrollü bir adsorpsiyon gerçekleştiğinde eğimin 0.5 ile 1 aralığında olması beklenir. Elektrot tepkimesi tamamen difüzyon kontrollü olursa eğim 0.5 olur (Laviron ve ark. 1980). Bu sonuçlara göre; i_p/v ilişkisindeki doğrusallık bulgusu, Vildagliptin molekülünün yükseltgenme olayının çalışılan şartlarda difüzyon kontrollü adsorpsiyon olduğunu ifade eder.

Diğer taraftan, voltamogramlardan ve çizelgeden de görüldüğü üzere; 50-800 mVs^{-1} arasında pik gerilimleri hafif bir şekide negatif bölgeye doğru kaymıştır. Bu durum, tersinmez veya yarı-tersinir elektrokimyasal tepkimmeler için karakteristiktir (Bard ve Faulkner 2000).

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi E_p/log$v$ ilişkisi; çalışılan tarama hızı aralığında, aşağıdaki şekide açıklanabilir (Laviron 1979).

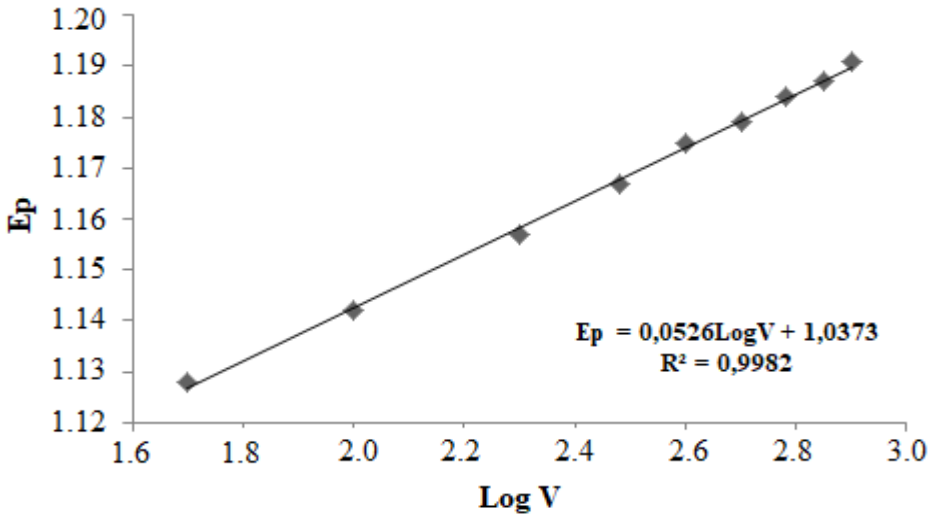
E_p (V) = 0.0526 log ν (mVs^{-1}) + 1.0373 (r = 0.999)

Tersinmez bir elektrot tepkimesi için, E_p ile v arasındaki ilişki ise aşağıdaki gibi ifade edilir (Laviron, 1979).

$$E_p = E^0 + (2.303RT / \alpha nF) \log (RTk^0 / \alpha nF) + (2.303RT / \alpha nF) \log v$$

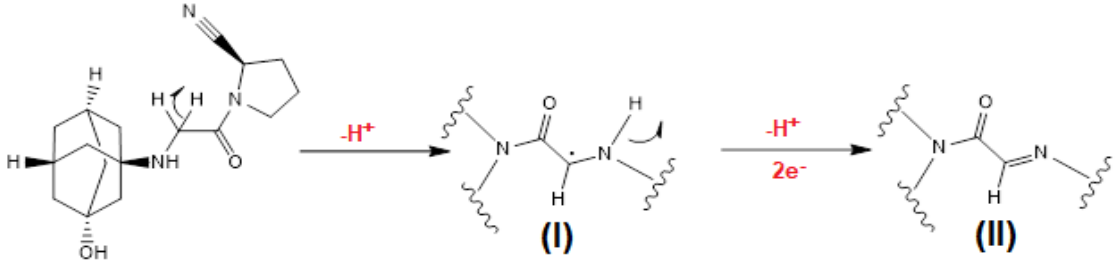
Eşitlikte bulunan α, yük transfer katsayısını ve n, yükseltgenme / indirgenme tepkimelerinde aktarılan elektronların sayısını gösterir. R (8.314 J K^{-1} mol^{-1}), T (298 K) ve F (96480 C mol^{-1}) ise bilinen sabitlerdir. E_p - log v ilişkisindeki eğim değeri 0.0526′ olarak bulunmuştur. Yukarıdaki eşitliklikten yararlanarak αn değeri, 1.12 olarak hesaplanmıştır. Tamamen tersinmez elektrot tepkimesinde çoğu sistem için, α = 0.5

olarak kabul edilir. Böylece, n = 2.24 (≈ 2) değeri bulunur. Bu değer, PG elektrot yüzeyinde tersinmez olarak ilerleyen Vildagliptin molekülünün yükseltgenmesi tepkimesinde, molekül başına 2 elektron aktarıldığını göstermektedir. Elde edilen sonuç, camsı karbon elektrot kullanılarak Vildagliptinin PBS tamponu içerisinde gerçekleştirilen SWV tayini bulgularıyla uyumludur (Fadr ve ark. 2018).



Şekil 4.5. Vildagliptin'e ait Log V/ Ep ilişkisi [1]

PG elektrot yüzeyinde tersinmez olarak yürüyen Vildagliptin molekülünün yükseltgenmesi işleminde, molekül başına 2 elektronun aktarıldığı tahmini yükseltgenme mekanizmasının iki adımda gerçekleştiği düşünülmektedir(Şekil 4.6). Bu mekanizmanın birinci adımında karbonile komşu asidik alfa proton bileşikten koparak karbon radikali oluştururken ikinci adımda radikaldeki serbest tek elektron azot ile pi bağı oluşturur, azot üzerindeki bir elektron hidrojen ile beraber yapıdan uzaklaşır ve toplamda iki elektron vererek yükseltgenir.



Şekil 4.6. Vildagliptin molekülünün tahmini yükseltgenme mekanizması

[1] Vildagliptin derişimi, 5.88×10^{-4} M; yöntem, CV; destek elektroliti, PBS tamponu (pH 9.0); elektrot, PG

4.1.2. Sıyırma Voltametrisi

Yukarıda elde edilen verilerden yola çıkarak, çalışmanın bu aşamasında Vildagliptin molekülünün elektrokimyasal olarak yükseltgenmesi, sürfaktan içeren ve içermeyen destek elektroliti çözeltilerinde PG ve GC elektrotlar kullanılarak SWV ve DPV teknikleri ile ayrı ayrı araştırılmıştır.

4.1.2.1. Destek Elektroliti ve pH Etkisi

Voltametrik çalışmalarda analizi yapılacak bileşiğin (analit) elektrokimyasal davranışının açıklanmasında kullanılacak destekleyici elektrolitin derişimi ve pH değerinin belirlenmesi çok önemlidir. Çok geniş bir çalışma aralığına sahip olmasından dolayı BR tamponu bu tür çalışmalarda en çok tercih edilen bir karma tampon çözeltisidir. Ayrıca doğru çalışma aralıkları seçilme şartıyla fosfat ve asetat tampon çözeltileride sıklıkla kullanılmaktadır.

Voltametrik teknikler arasında SWV tekniği DPV tekniğine göre daha hızlı, daha hassas ve duyarlı olmasıyla birlikte elektrot yüzeyinin daha az kirlenmesi gibi avantajlara sahiptir.

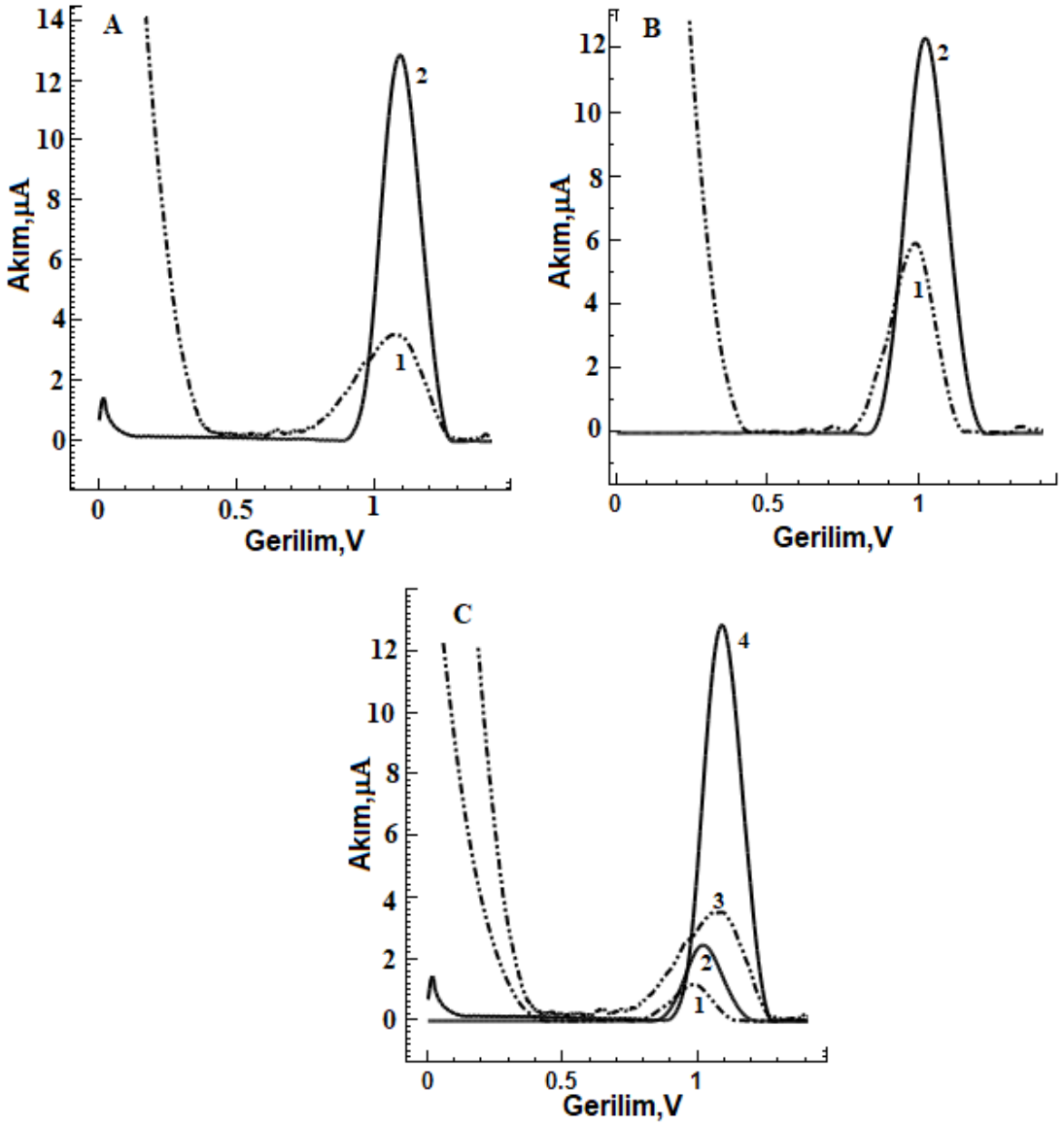
Yukarıdaki elde ettiğimiz bilgilerden yola çıkarak, bu işlem için destek elektroliti olarak belli pH aralığında Britton Robinson (BR) tampon **(**pH 2-12) çözeltileri, değişik pH' lar da fosfat tampon (PBS) çözeltileri **(**pH 2-3-7.4-9) ve Asetat tampon (ABS) çözeltisi **(**pH 4.8) kullanılarak voltametri yöntemiyle miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada öncelikle en uygun çalışma tekniği, çalışma elektrodu ve optimum çalışma koşullarını belirlemek için Çizelge 4.2' de belirtildiği gibi her bir destek elektroliti SWV ve DPV teknikleri ile hem Kalem ucu grafit elektrot (PG) hem de Camsı karbon elektrot (GCE) ile ayrı ayrı çalışılmıştır.

Çizelge 4.2. Yapılan çalışmada kullanılan teknik, elektrot, çalışma ortamı ve yapılan ölçümler

Kullanılan Teknik	**Kullanılan Çalışma Elektrotları**	**Çalışma Ortamı (Destek Elektrolit)**	**Yapılan Ölçümler**
Kare Dalga Voltametrisi (SWV)	Kalem Ucu Grafit Elektrot (PGE)	BR **(**pH 2-12) PBS **(**pH 2-3-7.4-9) ABS **(**pH4.8) Tampon çözeltileri	10 mL Destek Elektrolit (1 ölçüm) Destek elektrolit ortamında hazırlanmış 10 mL $5.88x10^{-4}$M Vildagliptin (3 ölçüm)
	Camsı Karbon Elektrot (GCE)	BR **(**pH 2-12) PBS **(**pH 2-3-7.4-9) ABS **(**pH4.8) Tampon çözeltileri	10 mL Destek Elektrolit (1 ölçüm) Destek elektrolit ortamında hazırlanmış 10 mL $5.88x10^{-4}$M Vildagliptin (3 ölçüm)
Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)	Kalem Ucu Grafit Elektrot (PGE)	BR **(**pH 2-12) PBS **(**pH 2-3-7.4-9) ABS **(**pH4.8) Tampon çözeltileri	10 mL Destek Elektrolit (1 ölçüm) Destek elektrolit ortamında hazırlanmış 10 mL $5.88x10^{-4}$M Vildagliptin (3 ölçüm)
	Camsı Karbon Elektrot (GCE)	BR **(**pH 2-12) PBS **(**pH 2-3-7.4-9) ABS **(**pH4.8) Tampon çözeltileri	10 mL Destek Elektrolit (1 ölçüm) Destek elektrolit ortamında hazırlanmış 10 mL $5.88x10^{-4}$M Vildagliptin (3 ölçüm)

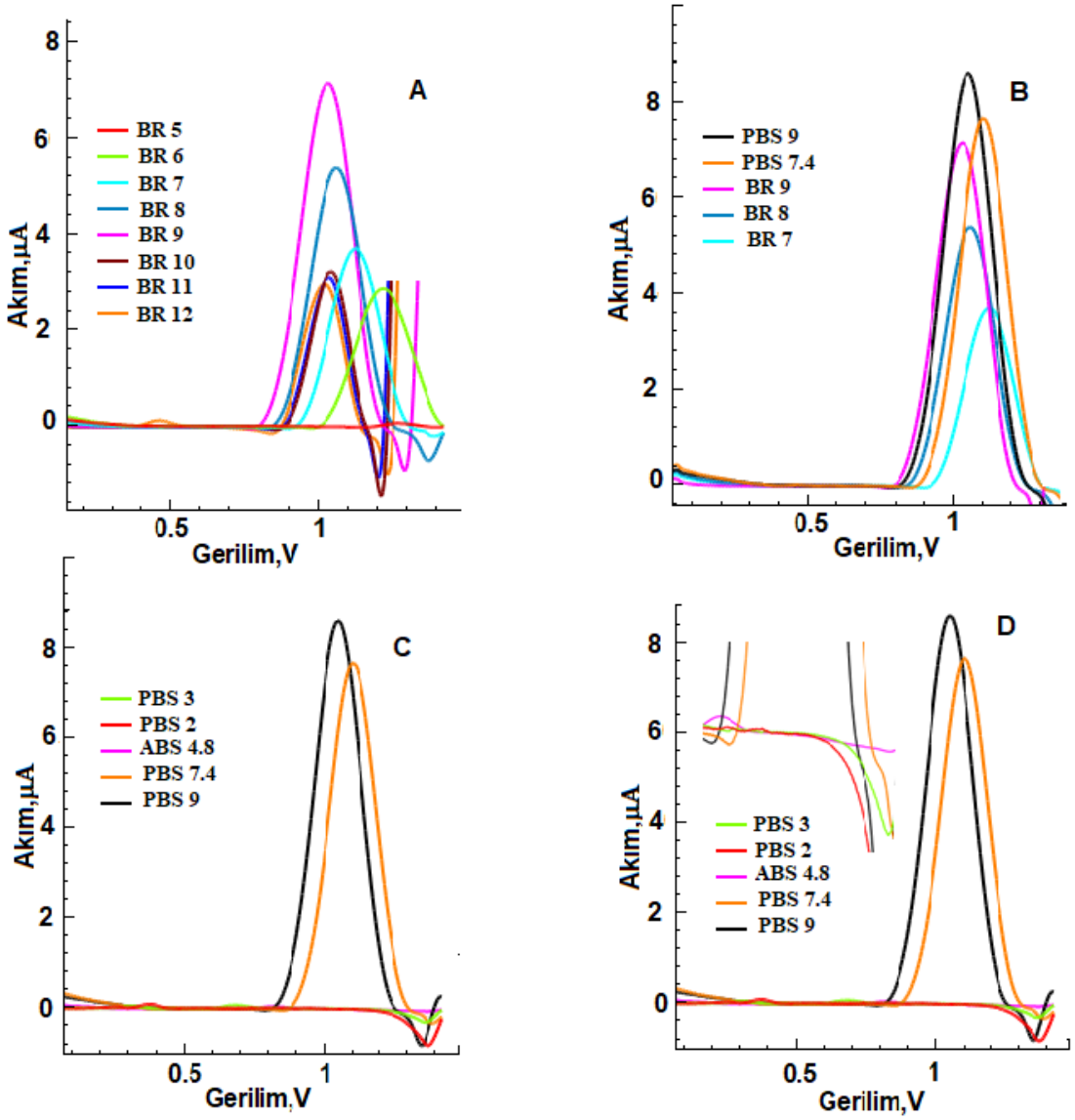
Bu çalışmalar sonucunda elde edilen voltogramlar karşılaştırıldığında $5.88x10^{-4}$ M Vildagliptin için; Çalışma tekniği SWV, çalışma elektrodu PG ve destek elektrolit çözeltisi olarak da PBS pH 9.0'ın en uygun çalışma koşulları olduğu tespit edilmiştir (Şekil4.5 ve 4.6).

BR tamponu içinde her iki elektrot üzerinde elde edilen voltamogramlardan görüldüğü üzere Vildagliptin molekülünün anodik yükseltgenme mekanizması, pH'ye bağımlı olup karmaşık pek çok elektron aktarım işlemini kapsamaktadır. Özellikle pH 5.0-12.0 aralığında omuz şeklinde çok sayıda yükseltgenme basamağı belirmiş olup bu basamakların değerlendirilmesi çok zordur. Asetat ve fosfat tamponları içinde tekrarlanan deneylerde elde edilen bulgular aynı pH değerlerine karşılık gelen BR tamponu bulgularıyla uyum içindedir.



Şekil 4.7. SWV ile DPV tekniklerini kullanarak PG ve GC elektrotların karşılaştırılması [1]

[1] A) 1. SWV/GC, 2. SWV/PG B) 1. DPV/GC, 2. DPV/PG C) 1. DPV/GC, 2. DPV/PG, 3. SWV/GC, 4. SWV/PG.



Şekil 4.8. 5.88x10^{-4} M VLDG'in SWV tekniği ve PG elektrot kullanarak farklı destek elektrolitlerindeki voltamogramları [1]

BR (pH 5.0-12.0) tampon çözeltileri içerisinde PG elektrot kullanılarak elde edilen SWV eğrilerinde saptanan en temel yükseltgenme basamağına ilişkin pik akımı (i_p) ve pik gerilimi (E_p) değerleri Çizelge 4.3′de ve i_p - pH ve E_p - pH grafikleri Şekil 4.8′de verilmiştir.

[1] A) BR (pH 5.0 – 12.0) B) BR (pH 7.0 , 8.0, 9.0) ile PBS (pH 7.4, 9.0) C) PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4, 9.0) ile ABS (pH 4.8) D) C'nin büyütülmüş şekli

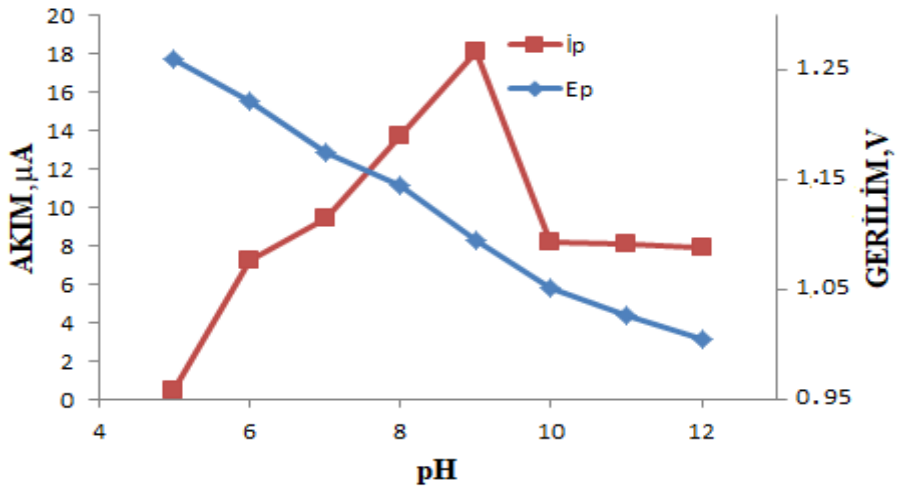
Çizelge 4.3. Vildagliptin voltamogramlarındaki pik gerilimi (Ep) ile pik akımı (ip) üzerindeki pH etkisi [1]

pH	***E*p (V)**	***İ*p (µA)**
5	1.2607	0.489
6	1.2218	7.229
7	1.1757	9.443
8	1.1454	13.679
9	1.0953	18.131
10	1.0513	8.223
11	1.0263	8.096
12	1.0052	7.915

BR tampon çözeltileri içerisinde PG elektrot kullanılarak bulunan akım değerleri Şekil 4.8' de verilmiştir. Vildagliptin'in yükseltgenme mekanizması, pH değerine bağımlı olup elektron transfer işlemi içermektedir. pH 9.0' da, yükseltgenme basamağı belirgin net bir şekilde görülmektedir. Çizelge 4.3' te görüldüğü gibi pH değeri artıkça pik potansiyel değeri daha negatif değerlere doğru kaymaktadır. Elde edilen bu sonuçlardan yola çıkarak Vildagliptin'in yükseltgenme süresince proton aktarımının da olduğunun göstergesidir.

Vildagliptin'in elektrokimyasal süreçte elektrot yüzeyinde gerçekleşen Ep – pH ilişkisi incelendiğinde çalışılan pH aralığındaki eğim değeri (-38 mV – pH) sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre proton katkısının elektron sayısına eşit olduğı olduğu görülmektedir.

pH (5.0 -12.0) Ep(mV) = -38pH + 1445.4 r = 0.9951



Şekil 4.9. Vildagiptin pik akımı (i_p) ile pik gerilimi (E_p) üzerine pH etkisi [2]

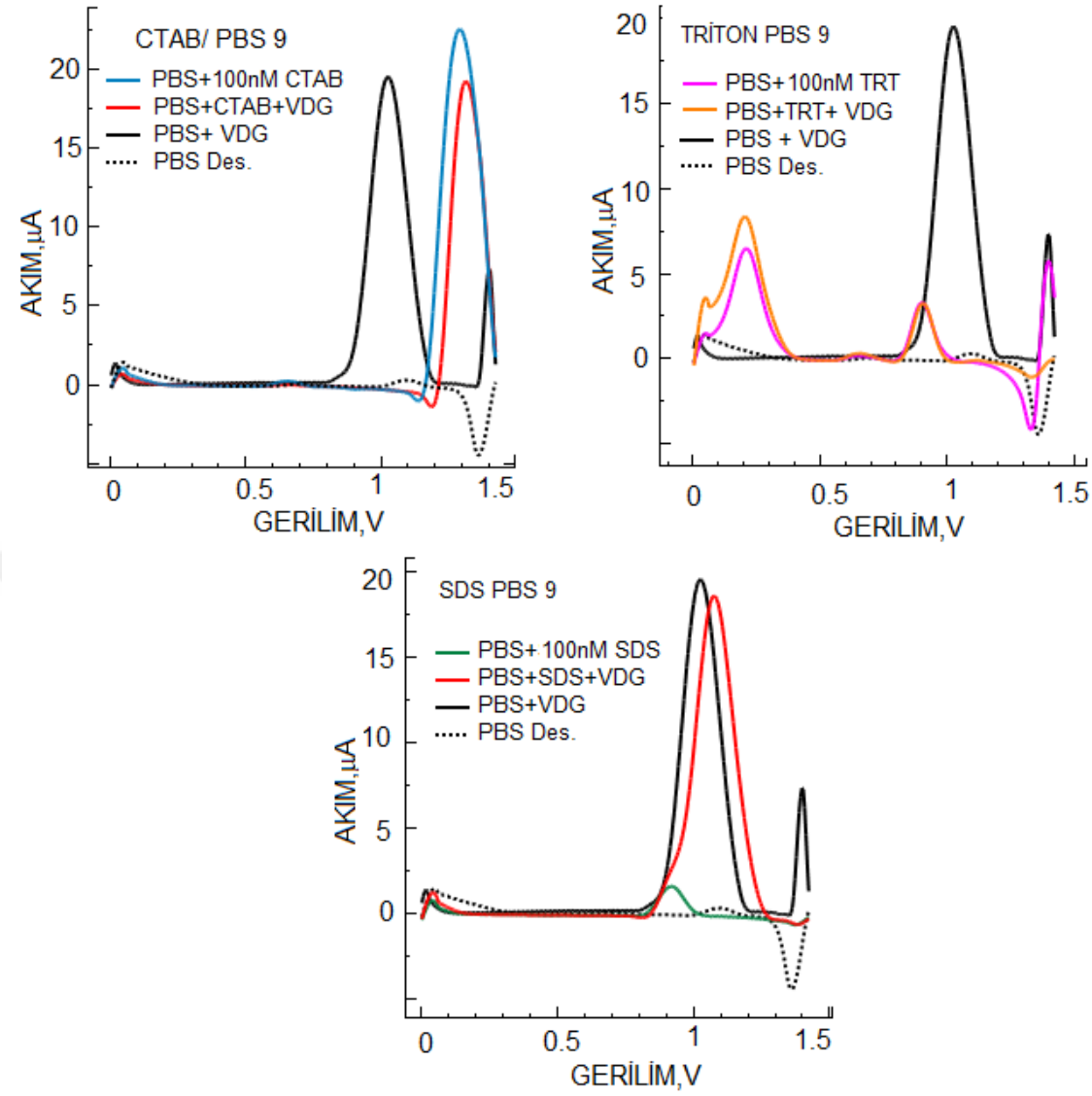
[1] Vildagliptin konsantrasyonu; $1.176x10^{-3}$ M, destek elektroliti; BR, elektrot; PG, teknik; SWV
[2] Vildagliptin; 5.88×10^{-4} M, destek elektrolit; BR, elektrot; PG, teknik; SWV, SW değişkenleri: frekans; 40 Hz, adım gerilimi; 4 mV, amplitüd; 90 Mv

4.1.2.2. Sürfaktan Yükünün Etkisi

Vildagliptin molekülünün sulu çözeltilerdeki elektrokimyasal yükseltgenmesinin incelenmesinden sonra, belirlenen optimum çalışma koşullarında anyonik (negatif yüklü) sürfaktan 0.1M SDS, katyonik (pozitif yüklü) sürfaktan 0.1 M CTAB ve iyonik olmayan sürfaktan 0.1 M TRİTON' un elektrokimyasal davranış üzerine etkisi incelenmiştir. sürfaktanlar ile ayrı ayrı aşağıdaki işlemler yapılarak sürfaktan etkisi araştırıldı. Bu işlem için; 5.0×10^{-3} M sürfaktan bulunduran PBS tamponu (pH 9.0) çözeltisinde SWV tekniği kullanılarak Vildagliptin′in (5.88×10^{-4} M) PG elektrotu üzerinde voltamogramları kaydedilmiştir. Sürfaktan etkisinin olup olmadığı aşağıdaki adımlar takip edilerek araştırılmıştır.

1. 10 mL PBS (pH 9.0) destek elektroliti (1 ölçüm)
2. 10 mL PBS (pH 9.0) + CTAB (500 nM) (3 ölçüm)
3. 10 mL PBS (pH 9.0) + Vildagliptin ($5.88x10^{-4}$M) (3 ölçüm)
4. 10 mL PBS (pH 9.0) + CTAB + Vildagliptin (3 ölçüm)

CTAB ile yapılan işlemlerin aynısı SDS ve TRİTON içinde tekrar edildi. Yapılan bu çalışmada elde edilen voltamogramlar karşılaştırıldığında sürfaktan etkisinin olmadığı tespit edildi (Şekil 4.9).



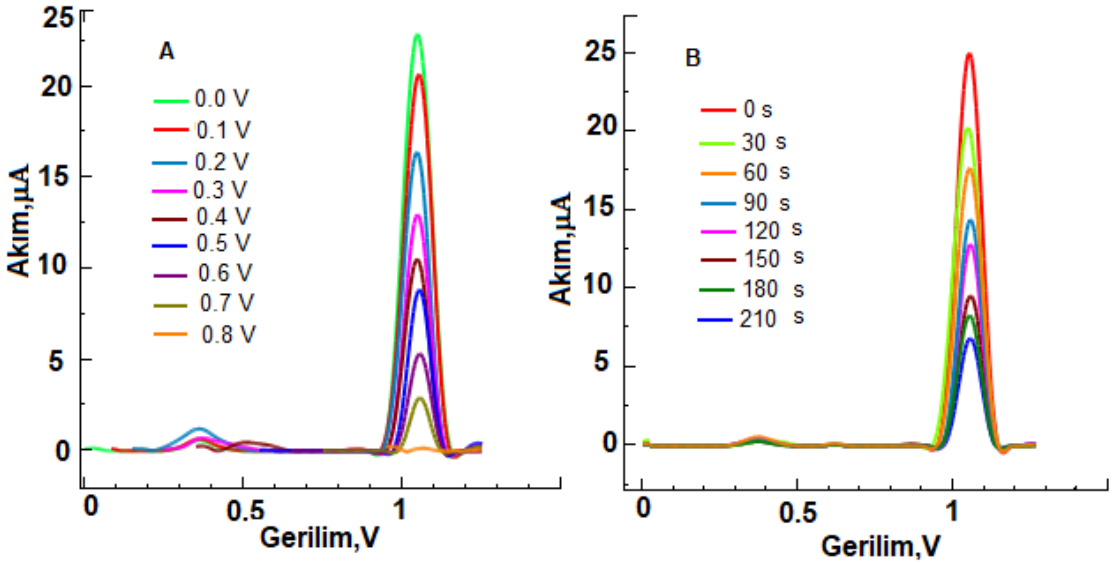
Şekil 4.10. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in sürfaktansız ya da sürfaktan (CTAB, TRİTON, SDS,) içeren PBS tamponu içinde (pH 9.0) elde edilen SWV eğrileri [1]

4.1.2.3. Biriktirme ve Sıyırma Koşullarının Etkisi

Araştırmanın bu bölümünde, vildagliptin molekülünün PG elektrot üzerindeki adsorptif karakteristikleri analiz edilmiştir. 5.88×10^{-4} M derişimindeki vildagliptin için PBS tamponu (pH 9.0) içinde biriktirme (akümülasyon) zamanı (t_{acc}) ve biriktirme gerilimi (E_{acc}) koşullarının etkileri Şekil 4.10'da verilmiştir.

[1] Sürfaktan derişimi, 5.0×10^{-3} M; elektrot, PG; SW değişkenleri: frekans; 25 Hz, adım gerilimi; 5 mV, amplitüd; 20 mV

Analitik sinyal üzerinde t_{acc} etkisi, E_{acc} değeri 0.0 V'de sabit tutularak 0s - 210 s zaman aralığında incelenmiştir. Süre arttıkça sinyalde düşme olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, elektrot yüzeyinin analit molekülü ile doygun hale geldiğinin göstergesidir. Diğer taraftan, sıyırma pik akım sinyal şiddeti -E_{acc} arasındaki ilişki, t_{acc} = 0 s olmak koşuluyla 0.0 V ile +0.8 V gerilim aralığında analiz edildiği zaman; pik gerilimi arttıkça pik akımının azaldığı gözlenmiştir. Böylece, analitik incelemenin devamında t_{acc} = 0 s ve E_{acc} = 0.0 V olarak kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.11. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in PBS tampon (pH 9.0) çözeltisinde elde edilen SWV eğrileri, üzerinde biriktirme süresi (A) ve biriktirme potansiyeli (B) etkisi [1]

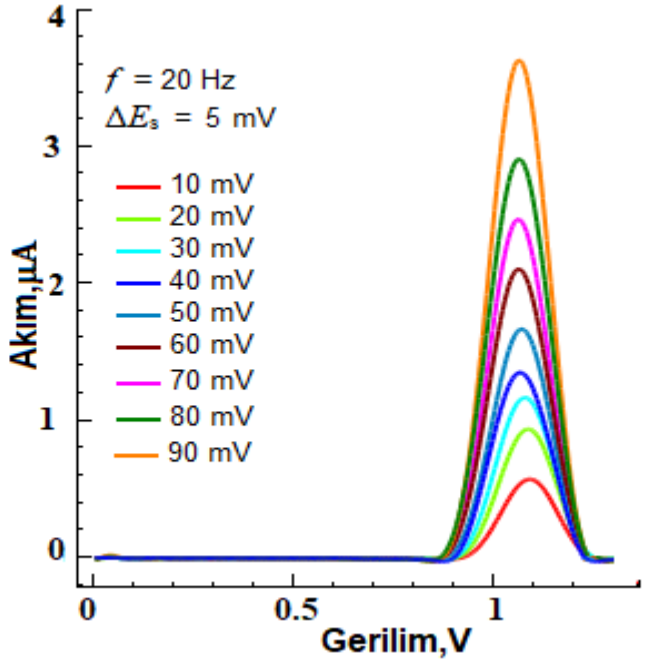
4.1.2.4. Kare Dalga Değişkenlerinin Etkisi

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, en uygun akım eğrileri elde edilebilmek amacıyla en uygun SW değişkenlerini belirlemek için SW değişkenlerinin (kare-dalga amplitüdü; ΔE_{sw} = 10-90 Mv, adım gerilimi; ΔE_s = 1-9 Mv, kare-dalga frekansı; f = 10-70 Hz) etkisi incelenmiştir.

[1] Elektrot; PG, SW değişkenleri: frekans; 40 Hz, adım gerilimi; 4 mV, amplitüd; 90 mV

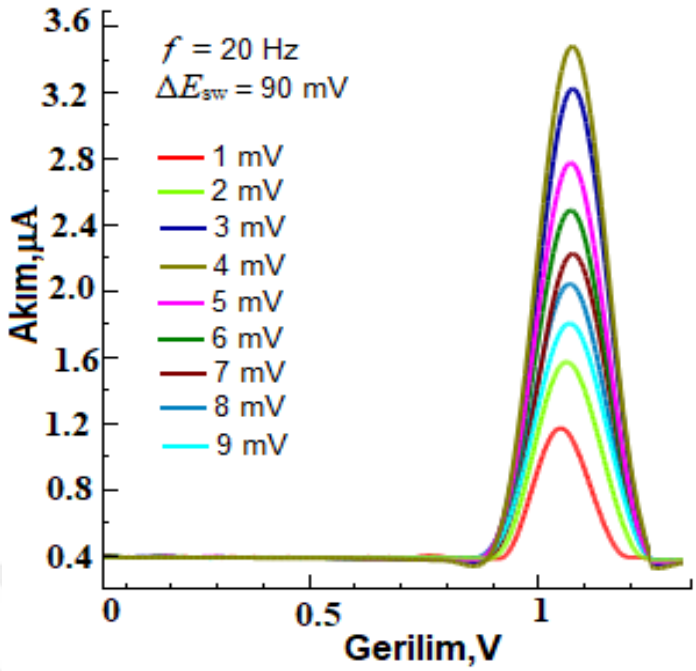
Deneylerdeki elektrokimyasal ölçümler; 5.88×10^{-4} M Vildagliptin bulunduran PBS tamponu (Ph 9.0) çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Her değişkenin değerini belirlemek için, diğer değişkenlerin değerleri sabit tutularak belirlenen şartlarda voltamogramlar kaydedilmiştir. SWV tekniğinde tarama hızı, amplitüd, adım gerilimi ve frekans ile ilişkilidir. Üçer kez tekrar edilen deneylerden elde edilen SW akım değerleri voltamogramları Şekil 4.11'de verilmiştir.

Amplitüd için en iyi çalışma koşullarını belirleyebilmek amacıyla yapılan deneylerde adım gerilimi (ΔE_s) 5 Mv, frekansı (f) 20 Hz olarak sabit tutulmuştur. SW akım eğrilerinde Amplitüd değerleri (ΔE_s =10-90) Mv arasında çalışılmış ve Şekil 4.11'de görüldüğü gibi Amplitüd için en iyi çalışma koşulları 90 Mv olarak elde edilmiştir.



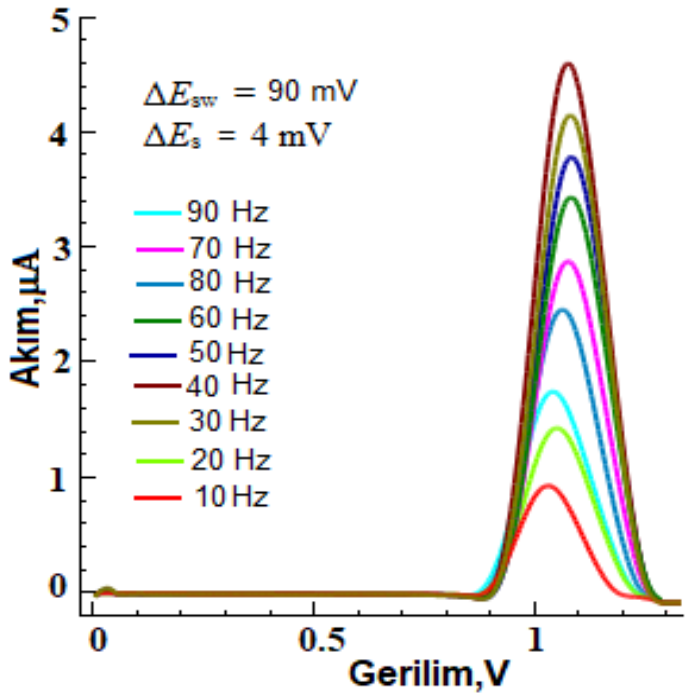
Şekil 4.12. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in PBS tamponu (Ph 9.0) içinde PG elektrot yüzeyinde farklı amlitüd SWV akım eğrileri

Vildagliptin bileşiği içim en iyi adım potansiyeli değerini belirlemek için Amplitüd değeri (ΔE_{sw}) 90 Mv, frekansı (f) 20 Hz olarak sabit tutulmuştur. SW akım eğrilerinde adım potansiyeli (ΔE_s) 1-9 Mv arasında çalışılmış ve elde dilen voltamogramlar kaydedilmiştir. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi adım potansiyeli için en iyi çalışma koşulu 4 Mv olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in PBS tamponu (Ph 9.0) içinde PG elektrot yüzeyinde farklı adım potansiyellerindeki SWV akım eğrileri

Vildagliptin bileşiğine ait yapılacak çalışmalarda en iyi frekans değerini belirlemek için Amlitüd değeri 90 Mv, adım gerilimi 4 Mv olarak sabit tutularak çalışmalar 10-90 Hz aralığında yapıldı. Pikin şekli ve şiddeti bakımından 10 – 40 Hz arasında artışın görüldüğü, 50 – 90 Hz aralığında pikin şiddetinde düşme olduğu tespit edilmiştir. Pik şiddetindeki artışa göre en iyi çalışma şartları 40 Hz olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.14. 5.88×10^{-4} M Vildagliptin'in PBS tamponu (Ph 9.0) içinde PG elektrot yüzeyinde farklı frekanslardaki SWV akım eğrileri

4.2. Vildagliptin'in Kalem-ucu Grafit Elektrot Üzerinde Tayini

Vildagliptin bileşiğinin PG elektrot kullanarak PBS tampon (pH 9.0) çözeltiler içerisinde optimum çalışma koşullarında elektrokimyasal davranışlarının ayrıntılı olarak incelenmesinden sonra tez çalışmasının bu bölümünde ilgili bileşiğin ilaç analizlerinde ve biyolojik örneklerde (idrar örneği) analitik uygulanabilirlik koşulları araştırılmıştır.

4.2.1. Geliştirilen Yöntemin Analitik Performans Özelliklerinin İncelenmesi

Gerçekleştirilen çalışmada; PG elektrot kullanılarak geliştirilen voltametrik tekniğin analitik performans özellikleri (çalışma aralığı, tekrarlanabilirlik, hassasiyet), destek elelektrolit çözeltisi olarak optimum pH (pH 9.0) değerinde PBS tampon çözeltisi kullaılarak araştırılmıştır. Vildagliptin molekülünün tayini ile ilgili en uygun voltametrik ve analitik şartlar Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Vildagliptin tayini için voltametrik teknik ile bulunan en iyi deneysel ve aletsel değişkenler

Teknik	SWV
Elektrot	PG
Destek Elektroliti	PBS (pH 9.0)
Adsorptif sıyırma değişkenleri	
Biriktirme potansiyeli (E_{acc})	0 V
Biriktirme süresi (t_{acc})	0 s
Kare-dalga değişkenleri	
Frekans (f)	40 Hz
Adım potansiyeli (ΔE_s)	4 mV
Amplitüde (ΔE_{sw})	90 mV

Vildagliptin standart çözeltisinden elektrokimyasal hücre içine belirli hacimde ilave edilmiş ve Çizelge 4.4.'te verilmiş olan çalışma şartlarında voltamogramlar (üç defa tekrar edilerek) kaydedilmiştir. Her ilaveden sonra eğriler üzerinde +1.047 V değerindeki SWV yanıt değerlendirilmiştir. İlgili voltamogramlar ile derişim-pik akım sinyal şiddeti arasındaki ilişki Şekil 4.14′te verilmiştir.

Şekil 4.14 B′de verilen analitik eğri, 2.94×10^{-6} – 4.99×10^{-5} M konsantrasyon aralığında [i_p (µA) = 0.0366 C (nM) - 0.0091 (r = 0.999, n = 9)] doğrusal bir cevap vermektedir. Eşitlikte; i_p adsorptif sıyırma piki, C Vildagliptin derişimi, r korelasyon katsayısıdır.

Analitik eğriler yardımıyla bulunan değerlerden yararlanarak gözlenebilirlik sınırı (LOD) 3 s/m ile en düşük tayin sınırı (LOQ) 10 s/m eşitliklerine göre hesaplanmıştır. Eşitliklerde bulunan s, doğrusallık aralığına bulunan en düşük konsantrasyona denk gelen pik akım sinyalinin (3 değerin ortalaması) standart sapması, m ise ilgili kalibrasyon eşitliğinin eğim değerini göstermektedir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 8.20×10^{-9} M ve 2.73×10^{-8} M olarak bulunmuştur.

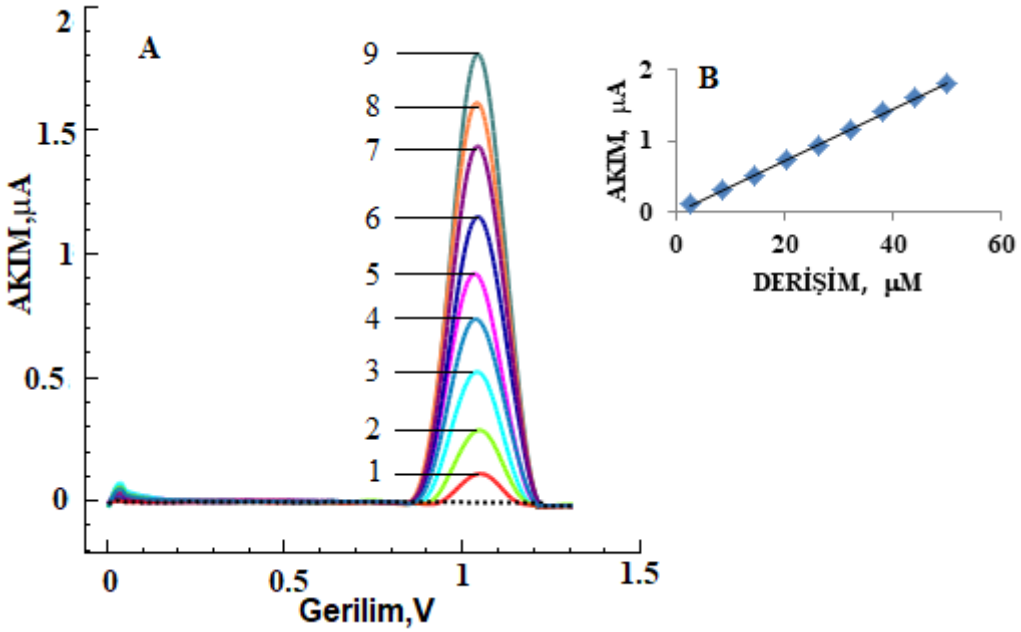
Yapılan çalışmalarda elde edilen verilerden de görüldüğü gibi PG elektrot hiçbir kimyasal modifikasyon işlemine tabi tutulmadan kullanıldığında; Vildagliptinin oldukça düşük derişimlerinde dahi çok iyi sonuçlar elde edilmiştir. Elektrotun elektrokimyasal ön işlemi, diğer yüzey modifikasyon işlemlerine göre oldukça hızlı, basit ve ucuz olmasıyla birlikte hiç bir toksik ve kimyasal maddeye ihtiyaç duyulmadan çalışılması yönüyle de çevre dostudur. PGE; çevre dostu, ucuz, tek kullanımlık olması, ölçüm sırasında temizlenmeye ihtiyaç göstermemesi ve analitik performansının çok iyi olması gibi avantajlara sahiptir. Yaptığımız literatür taramasına göre PG elektrot kullanılarak

Vildagliptin′in voltametrik yöntemle miktar tayini üzerine kaynakçada tek bir çalışmaya rastlanmıştır. İlk kez tarafımızdan geliştirilen voltametrik yöntemin duyarlılık açısından analitik performansı, Çizelge 2.2′de verilen ayırma yöntemlerinin bir kısmı ile kıyaslanabilir düzeydedir.

Çizelge 4.5. Farklı numunelerden VLDG analizine uygulanan voltametrik yöntemlerden elde edilen verilerin PG elektrot kullanılarak LSV tekniği ile elde edilen analitik değerlerle karşılaştırılması

Elektrot	Teknik	Destek elektrolit	Çalışma aralığı (µmol L-1)	LOD (mM/nM)	Örnek	Kaynak
GCE	LSV	PBS (pH 6.8)	2 – 10 mM	0.320 mM	İlaç	Fadr ve ark.
PG	SWV	PBS (pH 9.0)	2.94–49.98µM	8.20 nM	İlaç ve idrar	Bu Çalışma

Geliştirilen voltametrik yöntemin VLDG için tekrarlanabilirlik düzeyini belirlemek için PG elektrot ve PBS (pH 9.0) tampon çözelti ortamında 26.46 $x10^{-6}$ M derişime sahip çözeltiler, en uygun deney şartlarında hazırlandı. VLDG için bu çözeltilerin aynı gün içinde 9 defa voltamogramları kaydedilmiştir. Bu voltamogramlar üzerinde yükseltgenme pik akım ve gerilimleri okunmuş, elde edilen değerler gün-içi kesinlik olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, yükseltgenme pik akım sinyali ve gerilim için Bağıl standart sapma (BSS) değerleri sırasıyla % 6.40 ve % 0.42 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, çalışma koşulları altında PG elektrotunun tekrar edilebilirliğinin çok iyi olduğu söylenebilir.



Şekil 4.15. (A) Vildagliptin [1) 2.94, 2) 8.82, 3)14.71, 4)20.58, 5) 26.46, 6) 32.37, 7) 38.22, 8) 44.11, 9) 49.98 µM] içeren PBS tampon (pH 9.0) çözeltisinde kaydedilen SWV eğrileri [1]

4.2.2. Gerçek Örnek Analizleri

Geliştirilen tekniğin gerçek örneklerdeki performans özelliklerini doğrulamak amacıyla, uygulanabilirliği ticari ilaç şekillerine ve biyolojik sıvı (idrar) örneklerine tatbik edilmiştir.

4.2.2.1. Enjektabl Çözeltiler

Tekniğin ticari ilaç formuna uygulama aşamasında eczaneden satın alınan Vidaptin® tablet (50 mg Vildagliptin) kullanılmıştır. Bölüm 3.3.1.1′de anlatıldığı yöntemle hazırlanan tablet çözeltisinin voltamogramları, standart maddeler için hazırlanan şartlarda kaydedilmiştir. Tablet analizine ait voltamogramlar ile standart Vildagliptin′e ait voltamogramlar kıyaslandığında eğrilerin birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Voltamogramlardan okunan yükseltgenme pik akım sinyal şiddeti değerleri, kalibrasyon eğrilerindeki yerlerine konularak tabletlerin içeriğinde bulunan Vildagliptin miktarları hesaplanmıştır. Bulunan değerler gerçek değerlerle kıyaslanmıştır. Geliştirilen tekniğin doğruluk ve kesinliğini kontrol etmek için geri

[1] Elektrot; PG, biriktirme süresi; 0 s, biriktirme gerilimi; 0.0 V. SW değişkenleri: frekans; 40 Hz, adım gerilimi; 4 mV, amplitüd; 90 mV. Noktalı çizgi; destek elektroliti. Ek (B): i_p / $C_{Vildagliptin}$ eğrisi.

kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için, aynı enjektabl çözeltisine standart Vildagliptin çözeltisinden doğrusallık sınırlarını geçmemek şartı ile ard arda ilaveler yapılmış ve her ilaveden sonra voltamogramlar tekrar kaydedilmiştir. Pik akım sinyal şiddetleri; hem orijinal enjektabl çözeltisinde, hem de ardışık ilavelerden sonra tekrar ölçülmüştür. Daha sonra enjektabl çözelti numunesine eklenen saf maddenin ne kadarının tayin edilebildiği hesaplanmıştır. Geliştirilen voltametrik teknikle bulunan analiz sonuçları çizelge 4.6′da verilmiştir. Sonuçlar, %89- %112 arasındaki kazanımla PG elektrotu üzerinde geliştirilen voltametrik yöntemin doğruluğunun bilimsel açıdan geçerli olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.6. Vildagliptin içeren tabletlerde voltametrik yöntem analiz bulguları

Eklenen (μM) [1,2]	**Bulunan(μM)** [1,2]	**Geri Kazanım**[2]**(%) ± %BSS**
2.94	2.71	92.17 ± 5.13
8.82	7.92	89.79 ± 4.62
14.71	16.51	112.24 ± 5.60
20.58	21.38	103.89 ± 3.33
26.46	26.35	99.58 ± 1.43
32.37	32.96	101.82 ± 2.02
38.22	37.87	99.08 ± 1.15
44.11	43.89	99.51 ± 1.33
49.98	49.51	99.06 ± 1.40

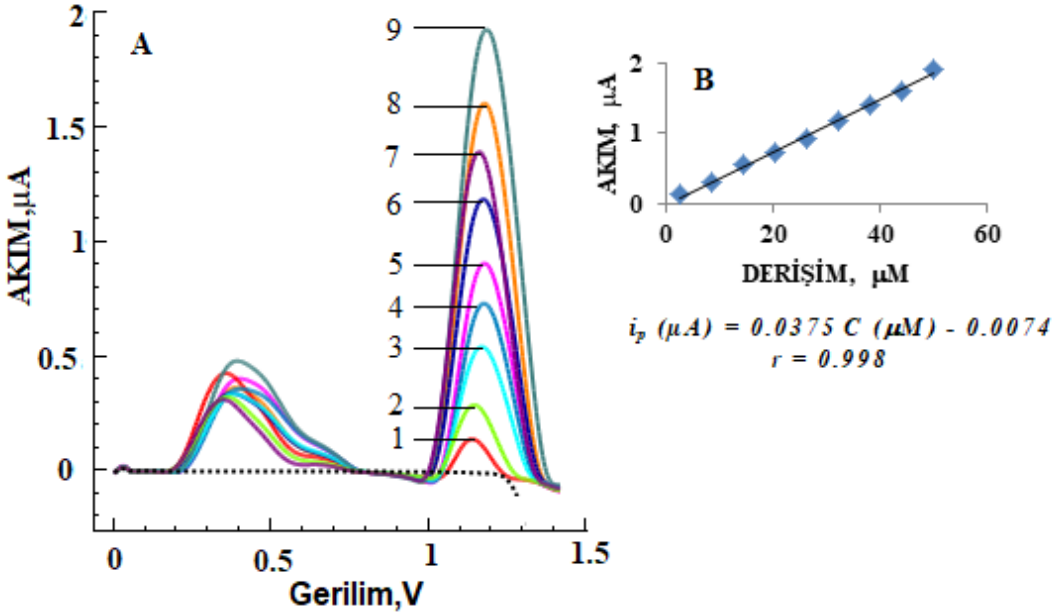
4.2.2.2. İdrar Örnekleri

Vildagliptin tayini için tek-kullanımlık PG elektrot üzerinde PBS (pH 9.0) çözeltisinde geliştirilen voltametrik yöntemin yüksek duyarlılığa ve tekrarlanabilirliğe sahip olması nedeniyle, idrar örneği gibi karmaşık matris ortamlarında (su, tuz ve biyomoleküller içerir) da kullanılma koşulları araştırılmıştır.

Deneylerin başlangıcında, Bölüm 3.3.1.2′de anlatılan yol izlenerek hazırlanmış ve Vildagliptin katılmamış idrar örneklerinde (kör örnek) voltamogramlar destek elektroliti çözeltisi (PBS tampon, pH 9.0) içerisinde PG elektrot kullanılarak alınmıştır. Çözeltilerde Vildagliptin pik akım sinyalinin gözlendiği gerilim aralığında idrarda bulunan biyomoleküllere (ürik asit, askorbik asit, dopamin) ait hiçbir yükseltgenme basamağı gözlenmemiştir. SWV yöntemi ile idrar numunelerinde ürik asit piki, PBS tampon (pH 9.0) çözeltisinde yaklaşık olarak +0.40 V dolayında belirlenmiştir.

[1] Her bir tablet 50 mg Vildagliptin içerir içerir.
[2] Sonuçlar, üç analizin ortalamasıdır.

Vildagliptin eklenmiş idrar numunesi, hiçbir karmaşık ön işlem ve ayırma metodu kullanmadan yalnızca santrifüj sonrası belirlenen destekleyici elektrolit ile seyreltilip analiz edilmiştir. Kaydedilen sıyırma voltamogramları Şekil 4.16′da görülmektedir. Yaklaşık +1.12 V dolayında gözlenen pik, her Vildagliptin standart eklenmesi sonunda düzgün olarak artmıştır. Çizelge 4.6′de görüldüğü gibi, bulunan değerle idrara katılmış Vildagliptin derişimi arasındaki uyum (yeterli geri kazanım değeriyle birlikte) tavsiye edilen tekniğin Vildagliptin′in idrar numunelerinden de doğru olarak tayin edilebileceğini göstermiştir.



Şekil 4.16. A) İdrar örneğinin PBS tamponu (pH 9.0) içerisinde kaydedilen SWV eğrileri [seyrelme oranı 1:100 (h/h)] [1]

Çizelge 4.7. Vildagliptin eklenmiş idrar örneğinde voltametrik analiz bulguları

Eklenen (µM)[2]	Bulunan(µM)[2]	Geri Kazanım (%)	BSS (%)	Bias (%)
2.94	3.19	108.66	4.14	-8.66
8.82	8.76	99.34	6.81	+0.66
14.71	15.67	106.51	3.12	-6.51
20.58	20.16	97.96	1.33	+2.04
26.46	26.37	99.67	1.06	+0.33
32.37	33.15	102.42	1.71	-2.42
38.22	37.84	99.02	2.63	+0.98
44.11	44.16	100.12	1.20	-0.12
49.98	52.79	105.63	1.44	-5.63

[1] Vildagliptin eklenmemiş (kesikli çizgi), 1) 2.94×10^{-6} M Vildagliptin eklenmiş, (2–9) 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 µL standart eklemeler sonrası ($C_{Vildagliptin}$ = 5.88×10^{-3} M). Elektrot; PG, biriktirme süresi; 0 s, biriktirme gerilimi; 0.0 V. SW değişkenleri: frekans; 40 Hz, adım gerilimi; 4 mV, amplitüd; 90 mV. (B) Standart ekleme tekniğiyle analiz sonucu

[2] Standart ekleme yöntemiyle hesaplanan değer, aynı örneğin farklı üç bağımsız analizinin ortalamasıdır.

4.2.2.3. Girişim Çalışması

Vücutta bulunma ihtimali olan maddelerin Vildagliptin tayini üzerindeki etkisini araştırmak için bir girişim çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, dopamin, ürik asit, gibi biyolojik moleküller ile NaCl, $CaCl_2$ gibi maddelerle 58.8 mM sabit Vildagliptin derişiminde optimum çalışma koşularında girişim çalışmaları yapılmıştır. Tolerans sınırı, maksimum ± %5'lik bir nispi hatayla sonuçlanan maksimum yabancı tür derişimi olarak alınmıştır (Heyrovsky ve Kuta 1966). Çizelge 4.8.'de ortalama tolerans seviyesi oranı seçildi ve değerlendirildi. Örneğin, NaCl'nin varlığı önemli bir değişiklik oluşturmazken, Progesteron varlığı VLDG miktarında önemli bir değişikliğe neden oldu. Çizelge 4.8.'de verilen sonuçlardan görüldüğü gibi geliştirilen voltametrik yöntem ile PG elektrotu VLDG'nin miktar tayini için oldukça seçici olduğunu tespit ettik.

Çizelge 4.8. 58.8 mM VLDG için PG elektrot kullanılarak voltametrik girişim sonuçları

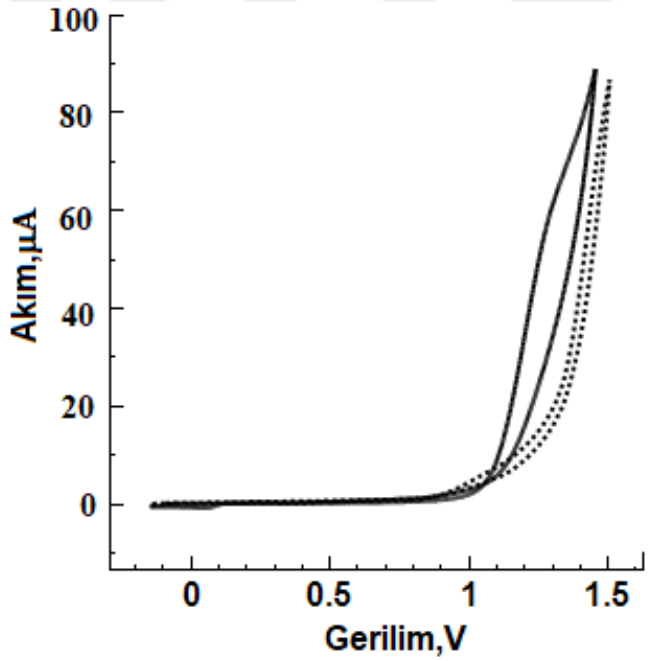
Madde	Tolerans seviyesi oranı (yabancı madde VLDG)	± % Hata
Na^+	10:1	3.08
Mg^{2+}	10:1	2.09
Fe^{3+}	10:1	3.73
Cu^{2+}	10:1	0.89
Ürik asit	10:1	4.43
Dopamine	10:1	3.08
Epinefrin	10:1	3.92
Norepinefrin	10:1	0.64
Testesteron	10:1	3.85
Progesteron	10:1	4.96

4.3. Metformin'in Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

Karbon-temelli elektrotlardan olan PG ve GC (kıyas amaçlı) elektrotlarının kullanılması ile Metformin molekülünün pik morfolojisi ve gerilimi üzerindeki elektrokimyasal yanıtını anlamak için öncelikle, farklı pH değerlerine sahip sulu ya da sürfaktan içeren sulu çözeltilerde CV, SWV ve DPV teknikleri kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. (Not: Bölüm 3.1.2′de anlatıldığı gibi Metformin′in sudaki çözünürlüğü iyi olduğu için molekülün stok çözeltileri analitik saflıkta saf su kullanılarak hazırlanmıştır).

4.3.1. Dönüşümlü Voltametri

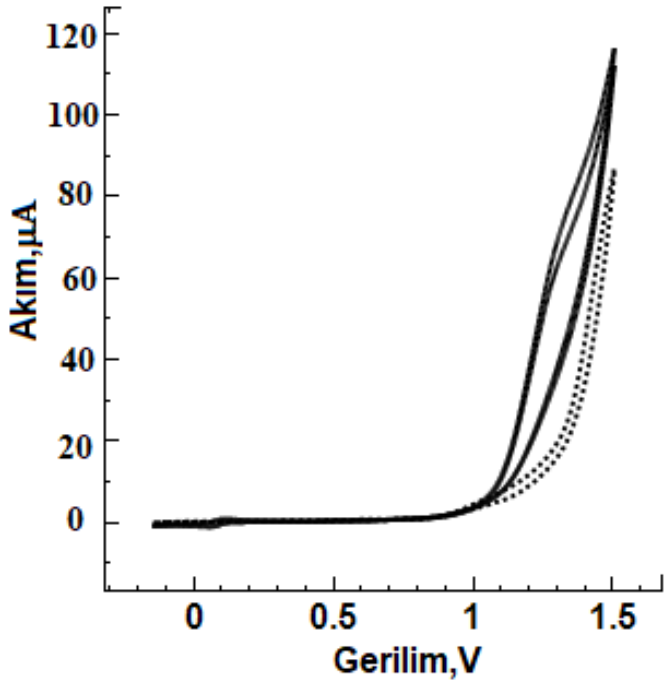
Araştırmanın başlangıcında PG elektrot kullanılarak 5.51×10^{-2} M Metformin'in 0.1 M NaOH (Bazik ortam) çözeltisinde (0.0 V) - (+1.4 V) - (0.0 V) tarama aralığı ile 100 mVs^{-1} tarama hızında, dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir. İlgili voltamogramlar Şekil 4.16′da verilmiştir. Elde edilen voltamogramlar incelendiğinde; Metformin molekülünün, çözelti ortamının pH değerine bağlı olarak yükseltgendiği görülmektedir. Asidik ve nötral bölgelerde, piklerin birbirinden iyi ayrılmadığı ve belirginliklerinin düşük olduğu gözlemlemlenmiştir. Ancak bazik bölgede voltomogramın keskinliği önemli ölçüde artmıştır. Metformin molekülünün yükselgenmesinden sonra katodik bölgede gerilim taramasına devam edildiğinde çalışılan gerilim aralığında herhangi bir indirgenme basamağına rastlanmamıştır. Bu gözlem, Metformin molekülünün PG elektrotu üzerindeki yükseltgenmesinin tüm pH değerlerinde tam olarak tersinmez olduğunun göstergesidir.



Şekil 4.17. 5.51×10^{-3} M Metformin′in 0.1 M NaOH içinde dönüşümlü voltamogramı [1]

[1] Elektrot; PG, gerilim tarama hızı; 100 mVs^{-1}. Noktalı çizgi; destek elektrolit

Şekil 4.17′de Analitik çalışmalar için en uygun ortam olan 0.1 M NaOH çözeltisi içerisinde 5.51×10^{-3} M Metformin molekülünün aynı koşullarda iki döngülü voltamogramı görülmektedir. İlk döngüde, pik gerilimi ve akımı sırasıyla +1.272 V ve 0.565 µA iken ikinci döngüde bu değerler + 1.287 V ve 0.771 µA olarak belirlenmiştir. Bu oluşum, molekülün yükseltgenme ürünlerinin elektrot yüzeyine kuvvetle adsorbe olduğunun önemli bir göstergesidir. Bu nedenle elektrot etkinliği büyük ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte PG elektrotunun tek-kullanımlık olması nedeniyle çalışmanın analitik bölümünde tekrarlanabilir voltametrik yanıt elde etmek açısından herhangi bir olumsuzluğun gerçekleşmeyeceği açıktır.

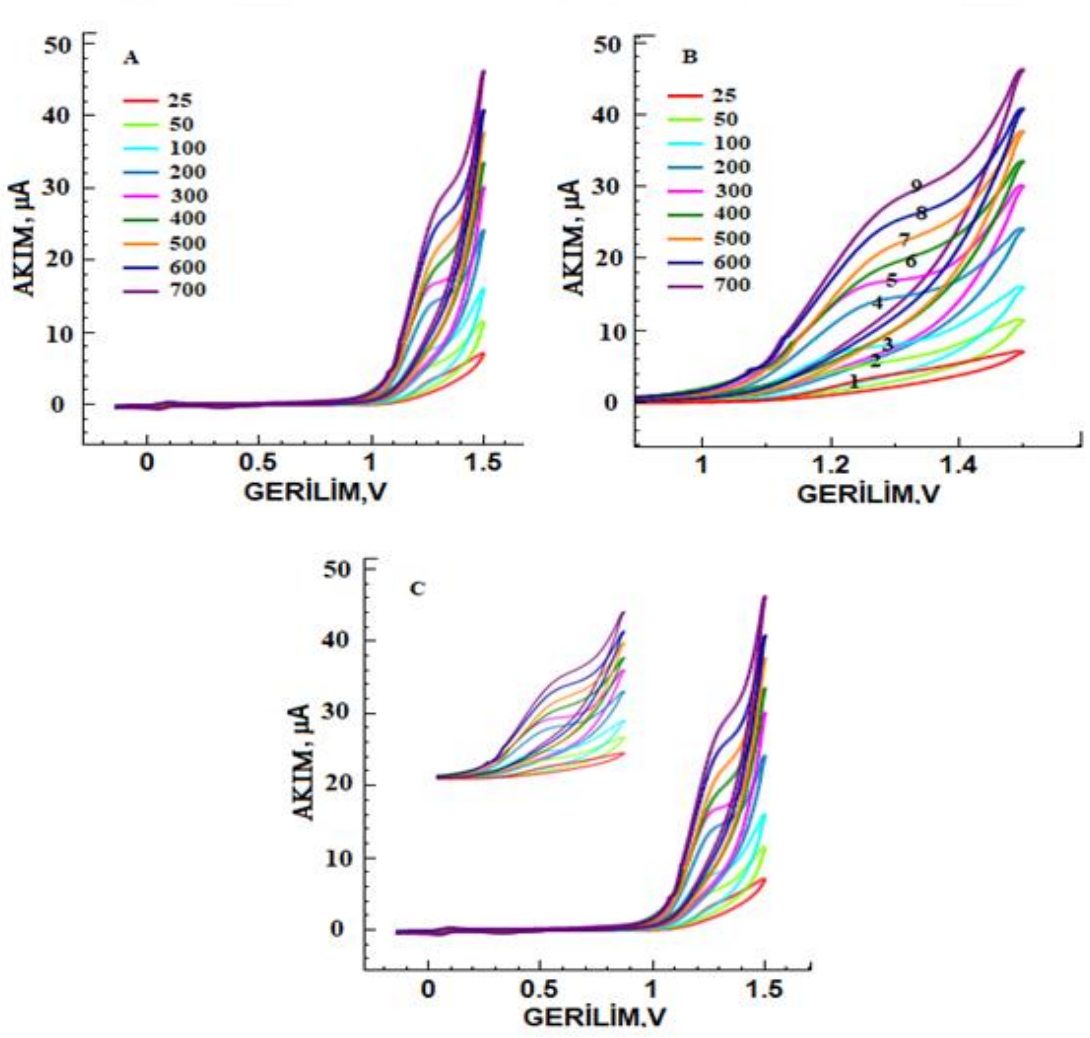


Şekil 4.18. 5.51×10^{-3} M Metformin'in 0.1 M NaOH çözeltisinde iki döngülü voltamogramı [1]

[1] Elektrot; PG, gerilim tarama hızı; 100 mVs^{-1}. Noktalı çizgi; destek elektrolit

4.3.1.1. Gerilim Tarama Hızının Etkisi

Gerilim tarama hızının Metformin molekülü üzerine elektrokimyasal yükseltgenme etkisini araştırmak için 5.51×10^{-3} M Metformin çözeltisinin 0.1 M NaOH çözeltisinde (0.0 V)-(+1.5 V)-(0.0 V) tarama aralığında, 0.0 V başlangıç geriliminde ve 25 - 700 mVs^{-1} aralığındaki gerilim tarama hızlarında, dönüşümlü voltamogramları alınmış ve kaydedilmiştir. Şekil 4.18 ′de görüldüğü gibi hızın artmasıyla orantılı olarak yükseltgenme basamağının belirginliğinin artmasından dolayı çalışmanın devamında analitik sinyal olarak bu basamak seçilmiştir. Şekil 4.18′de verilen voltamogramlar yardımıyla tespit edilen pik akımı (i_p), pik gerilimi (E_p) ve gerilim tarama hızı (v) arasındaki ilişki Çizelge 4.9' da verilmiştir.



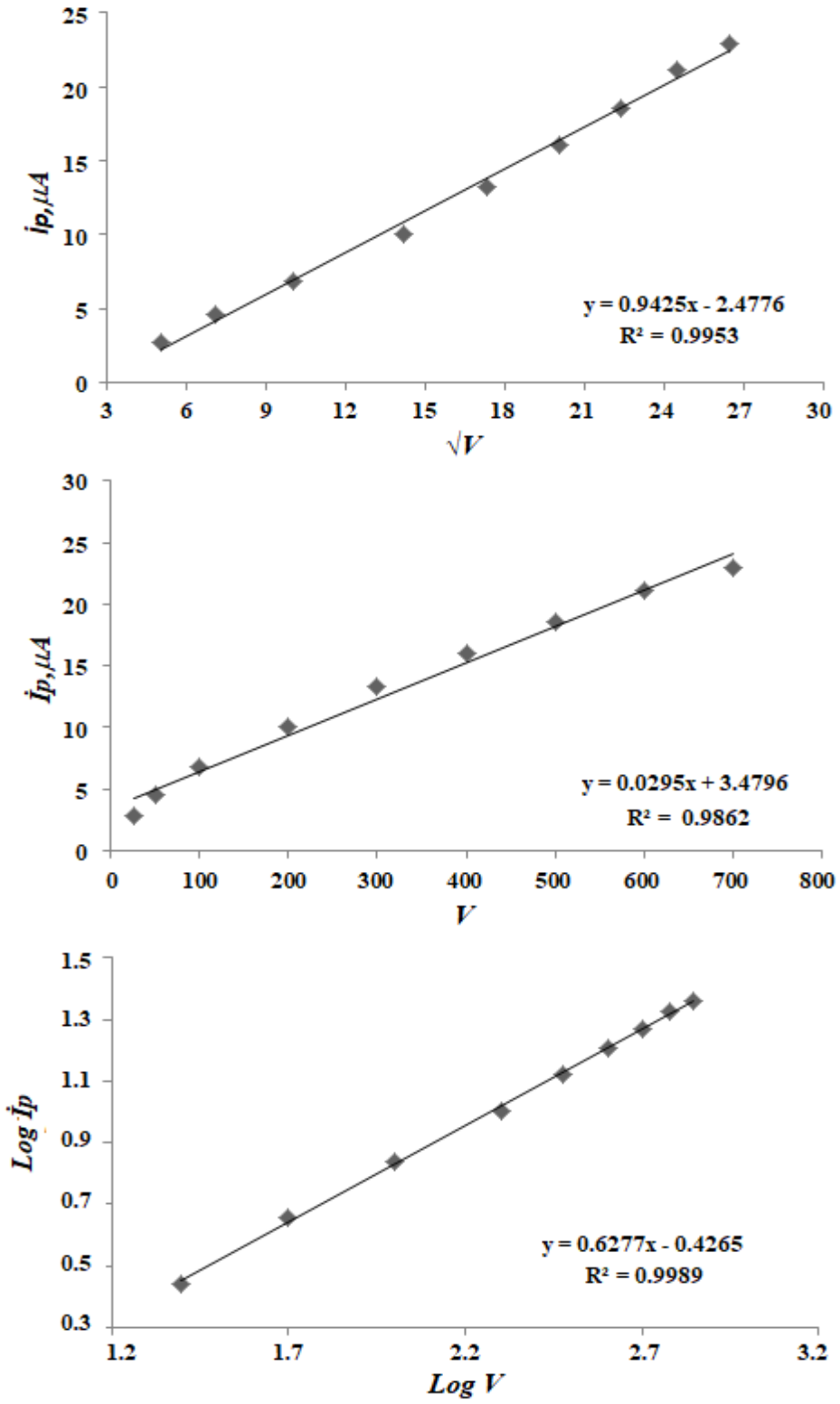
Şekil 4.19. A) 5.51×10^{-3} M Metformin′in 0.1 M NaOH çözeltisi içinde PG elektrot kullanılarak 1) 25, 2) 50, 3) 100, 4) 200, 5) 300, 6) 400, 7) 500, 8) 600, 9) 700 mVs^{-1} gerilim tarama hızlarıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramları. B) A'nın büyütülmüş şeklinin bir kesiti C) A ve B'nin birleştirilmiş şekli

Çizelge 4.9. Metformin voltamogramlarındaki, pik akımı ile pik gerilimi üzerindeki gerilim tarama hızının etkisi [1]

v (mVs^{-1})	$\sqrt{v}$	log v	i_p (µA)	logi_p	E_p (V)
25	5.00	1.40	2.75	0.439333	1.253
50	7.07	1.70	4.56	0.658965	1.206
100	10.00	2.00	6.85	0.835691	1.209
200	14.14	2.30	10.04	1.001734	1.240
300	17.32	2.48	13.26	1.122544	1.235
400	20.00	2.60	16.05	1.205475	1.255
500	22.36	2.70	18.56	1.268578	1.262
600	24.50	2.78	21.09	1.324077	1.258
700	26.46	2.85	22.95	1.360783	1.267

Çizelge 4.9′daki bulgulardan yararlanarak çizilen $\sqrt{v}$ - i_p, v - i_p ve log$v$- logi_p grafikleri Şekil 4.19′da verilmiştir.

[1] Metformin konsantrasyonu, 5.51×10^{-3} M; yöntem, CV; destek elektroliti, 0.1 M NaOH, elektrot, PG



Şekil 4.20. Metformin′e ait gerilim tarama hızı-pik akımı ilişkisi [1]

[1] Metformin derişimi, 5.51×10^{-3} M; yöntem, CV; destek elektroliti, 0.1 M NaOH çözelti ortamı, elektrot, PG

25 mVs^{-1} ile700 mVs^{-1} aralığında pik akımı ve gerilim tarama hızı ilişkisinden bulunan doğrusallık denklemleri aşağıdaki gibidir:

i_p (μA) = 0.9425 $\sqrt{v}$ (mVs^{-1}) – 2.4776	r = 0.997
i_p (μA) = 0.0295 v (mVs^{-1}) + 3.4796	r = 0.993
logi_p = 0.6277 log$v$ – 0.4265	r = 0.999

Farklı tarama hızlarından bulunan yükseltgenme piki Şekil 4.18'de verilmiştir. Kontrollü bir difüzyon elektrot tepkimesi incelendiği zaman i_p / $\sqrt{v}$ ilişkisinin doğrusal, i_p / v grafiğinin de üstel bir artış göstermesi beklenmektedir. İdeal koşullarda; adsorpsiyon kontrollü bir pikte; i_p/v grafiği doğrusal ve logi_p/log$v$ grafiğinin eğimi ise 1 bulunur. Difüzyon kontrollü bir adsorpsiyon gerçekleştiğinde eğim 0.5 ile 1 aralığında olması beklenir. Elektrot tepkimesi tamamen difüzyon kontrollü olursa eğim 0.5 olur (Laviron ve ark. 1980). Bu sonuçlara göre; i_p/v ilişkisindeki doğrusallık bulgusu, Metformin molekülünün yükseltgenme olayının çalışılan şartlarda difüzyon kontrollü adsorpsiyon olduğunu ifade eder.

Diğer taraftan, voltamogramlardan ve çizelgeden de görüldüğü üzere; 25-700 mVs^{-1} arasında pik gerilimleri hafif bir şekilde negatif bölgeye doğru kaymıştır. Bu durum, tersinmez ya da yarı-tersinir elektrokimyasal tepkimeler için karakteristiktir (Bard ve Faulkner 2000).

Şekil 4.20'de görüldüğü gibi E_p/log$v$ ilişkisi, çalışılan gerilim tarama hızı aralığında aşağıdaki gibi açıklanabilir (Laviron 1979).

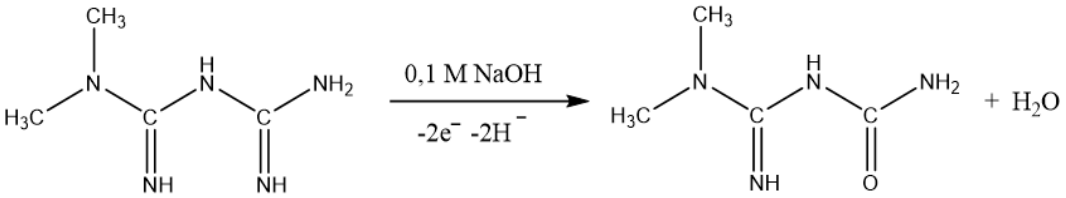
E_p (V) = 0.0511 log ν (mVs^{-1}) + 1.1201 (r = 0.998)

Tersinmez bir elektrot tepkimesi için, E_p ile v arasındaki ilişkinin aşağıdaki biçimde olduğu ifade edilir (Laviron, 1979).

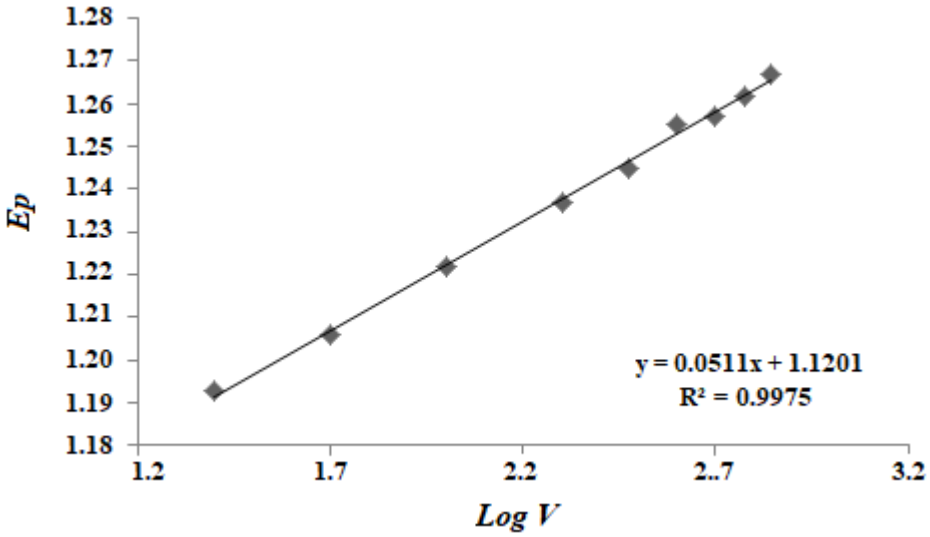
$$E_p = E^0 + (2.303RT / \alpha nF) \log (RTk^0 / \alpha nF) + (2.303RT / \alpha nF) \log v$$

Eşitlikte bulunan α, yük transfer katsayısını ve n, yükseltgenme / indirgenme tepkimelerinde transfer edilen elektronların sayısını gösterir. R (8.314 J K^{-1} mol^{-1}), T (298 K) ve F (96480 C mol^{-1}) ise bilinen sabitlerdir. E_p - log v ilişkisindeki eğim değeri

0.0511olarak bulunmuştur. Yukarıdaki eşitlikten yararlanarak αn değeri 1.16 olarak hesaplanmıştır. Tamamen tersinmez elektrot tepkimesinde çoğu sistem için, $\alpha = 0.5$ olarak alınabilir. Böylece, $n = 2.32$ (≈ 2) değeri bulunur. Bu değer, PG elektrot yüzeyinde tersinmez olarak ilerleyen Metformin molekülünün yükseltgenme tepkimesinde, molekül başına 2 elektron aktarıldığını göstermektedir. Elde edilen verilere göre Metforminin yükseltgenme mekanizmasının Şekil 4.20'deki gibi olduğu ve literatürde önerilen mekanizmalarla uyumlu olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12). Elde edilen sonuç, camsı karbon elektrot kullanılarak Metforminin NaOH çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen SWV tayini bulgularıyla uyumludur.



Şekil 4.21. Metforminin olası yükseltgenme mekanizması



Şekil 4.22. Metformin'e ait Log V/ Ep ilişkisi [1]

[1] Metformin derişimi, 5.51×10^{-3} M; yöntem, CV; destek elektroliti, NaOH çözeltisi (0.1 M); elektrot, PG

4.3.2. Sıyırma Voltametrisi

Yukarıda elde edilen verilerden yola çıkarak, çalışmanın bu aşamasında Metformin molekülünün elektrokimyasal yükseltgenmesi, sürfaktan içeren ve içermeyen sulu çözeltilerde PG ve GC elektrotlar kullanılarak SWV ve DPV teknikleri kullanılarak araştırılmıştır.

4.3.2.1. Destek Elektroliti ve pH Etkisi

Voltametrik çalışmalarda analizi yapılacak bileşiğin (analit) elektrokimyasal davranışının açıklanmasında kullanılan destekleyici elektrolitinin derişimi ve pH değerinin belirlenmesi çok önemlidir. Çalışma aralığının çok geniş olmasından dolayı BR tamponu bu tür çalışmalarda en çok tercih edilen bir karma tampon çözeltisidir. Ayrıca doğru çalışma aralıkları seçilme şartıyla fosfat ve asetat tampon çözeltileride sıklıkla kullanılmaktadır.

Voltametrik teknikler arasında SWV tekniği DPV tekniğine göre daha hızlı, daha duyarlı (dolayısıyla düşük madde tüketimi) ve elektrot yüzeyinin daha az kirlenmesi gibi avantajlara sahiptir

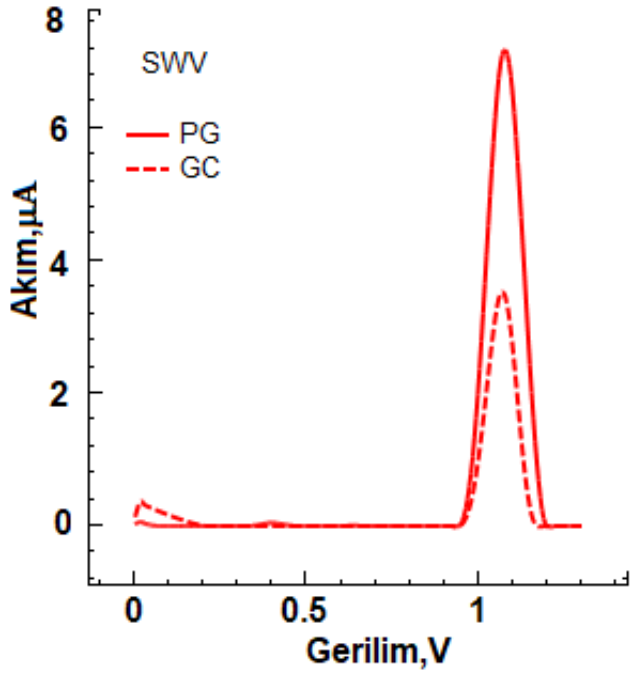
Yukarıdaki elde ettiğimiz bilgilerden yola çıkarak, bu işlem için destek elektroliti olarak belli pH aralığında Britton Robinson (BR) tampon **(**pH 2-12) çözeltileri, değişik pH' lar da fosfat tampon (PBS) çözeltileri **(**pH 2-3-7.4-9), Asetat tampon (ABS) çözeltisi **(**pH 4.8), 0.1 M NaOH veya 0.1 M H_2SO_4 çözeltisi kullanılarak voltametri yöntemiyle miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada öncelikle en uygun çalışma tekniği, çalışma elektrodu ve optimum çalışma koşullarını belirlemek için Çizelge 4.10' da belirtildiği gibi her bir destek elektroliti SWV ve DPV teknikleri ile hem Kalem ucu grafit elektrot (PG) hem de Camsı karbon elektrot (GCE) ile ayrı ayrı çalışılmıştır.

Çizelge 4.10. Yapılan çalışmada kullanılan teknik, elektrot, çalışma ortamı ve yapılan ölçümler

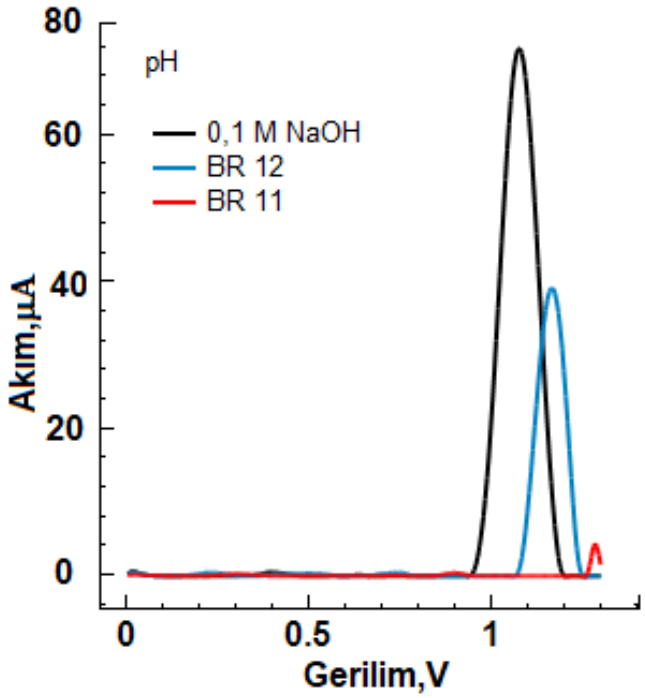
Kullanılan Teknik	**Kullanılan Çalışma Elektrotları**	**Çalışma Ortamı (Destek Elektrolit)**	**Yapılan Ölçümler**
Kare Dalga Voltametrisi (SWV)	Kalem Ucu Grafit Elektrot (PGE)	BR **(**pH 2-12) PBS **(**pH 2-3-7.4-9) ABS **(**pH4.8) Tampon çözeltileri ile 0.1 M H_2SO_4 çözeltisi 0.1 M NaOH çözeltisi	10 mL Destek Elektrolit (1 ölçüm) Destek elektrolit ortamında hazırlanmış 10 mL $5.51x10^{-3}$M Metformin (3 ölçüm)
	Camsı Karbon Elektrot (GCE)	BR **(**pH 2-12) PBS **(**pH 2-3-7.4-9) ABS **(**pH4.8) Tampon çözeltileri ile 0.1 M H_2SO_4 çözeltisi 0.1 M NaOH çözeltisi	10 mL Destek Elektrolit (1 ölçüm) Destek elektrolit ortamında hazırlanmış 10 mL $5.51x10^{-3}$M Metformin (3 ölçüm)
Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)	Kalem Ucu Grafit Elektrot (PGE)	BR **(**pH 2-12) PBS **(**pH 2-3-7.4-9) ABS **(**pH4.8) Tampon çözeltileri ile 0.1 M H_2SO_4 çözeltisi 0.1 M NaOH çözeltisi	10 mL Destek Elektrolit (1 ölçüm) Destek elektrolit ortamında hazırlanmış 10 mL $5.51x10^{-3}$M Metformin (3 ölçüm)
	Camsı Karbon Elektrot (GCE)	BR **(**pH 2-12) PBS **(**pH 2-3-7.4-9) ABS **(**pH4.8) Tampon çözeltileri ile 0.1 M H_2SO_4 çözeltisi 0.1 M NaOH çözeltisi	10 mL Destek Elektrolit (1 ölçüm) Destek elektrolit ortamında hazırlanmış 10 mL $5.51x10^{-3}$M Metformin (3 ölçüm))

Bu çalışmalar sonucunda elde edilen voltogramlar karşılaştırıldığında tüm destek elektrolitleri içinde pH 2.0 – pH 10.0 aralığında akım sinyali ve pik görülmemiştir. Şekil 4.22'de açıkça görüldüğü gibi $5.51x10^{-3}$ M Metforminin yükseltgenmesi üzerine pH'nin ve farklı destekleyici elektrolitlerinin incelenmesi sonucu PG elektrot üzerinde 0.1 M NaOH ortamında yüksek sinyal ve iyi belirmiş pikler elde edildiğinden, en uygun ortam olduğu görülmektedir.

Elde edilen bu verilere göre; çalışma tekniği SWV, çalışma elektrodu PG ve çalışma ortamı olarak da 0.1 M NaOH'in en uygun çalışma koşulları olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.21 ve 4.22).



Şekil 4.23. SWV tekniği kullanarak PG ve GC elektrotların karşılaştırılması (Düz çizgi PG, Kesikli çizgi GC)



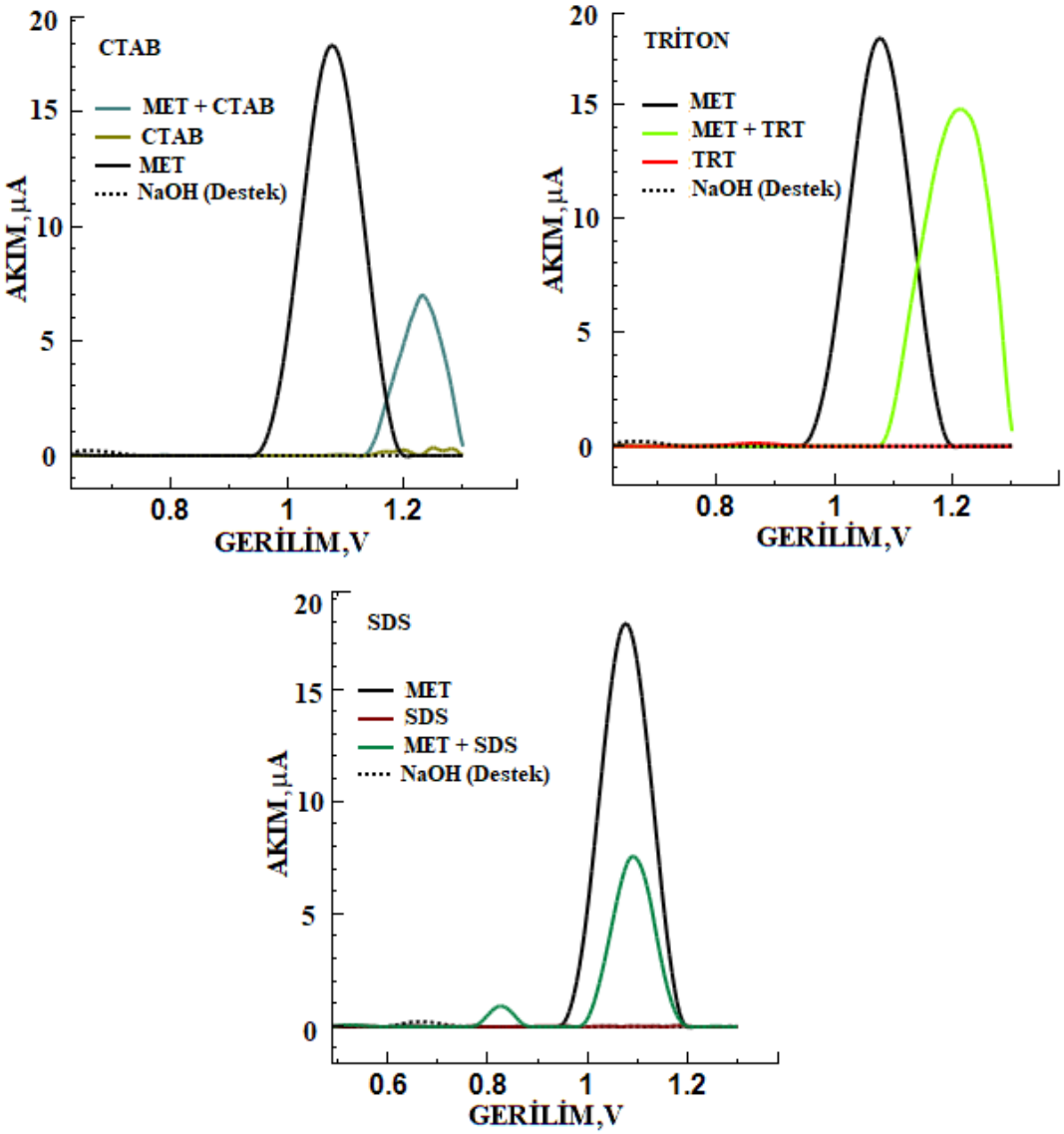
Şekil 4.24. 5.51x10^{-3} M Metformin'in PG elektrot yüzeyinde BR 11, BR 12 ve 0.1 M NaOH destek elektrolitleri içinde elde edilen SWV-AdSV eğrileri

4.3.2.2. Sürfaktan Yükünün Etkisi

Metformin molekülünün sulu çözeltilerdeki elektrokimyasal yükseltgenmesinin incelenmesinden sonra, belirlenen çalışma koşullarında anyonik (negatif yüklü) sürfaktan 0.1M SDS, katyonik (pozitif yüklü) sürfaktan 0.1 M CTAB ve iyonik olmayan sürfaktan 0.1 M TRİTON' un elektrokimyasal davranış üzerine etkisi incelenmiştir. sürfaktanları ile ayrı ayrı aşağıdaki işlemler yapılarak sürfaktan etkisi araştırıldı. Bunun için; 5.0×10^{-3} M sürfaktan bulunduran 0.1 M NaOH çözeltisinde SWV tekniği kullanılarak Metformin'in (5.51×10^{-3} M) PG elektrotu üzerinde voltamogramları kaydedilmiştir. Sülfaktan etkisinin olup olmadığı aşağıdaki adımlar takip edilerek araştırılmıştır.

1. 10 mL 0.1 M NaOH destek elektroliti (1 ölçüm)
2. 10 mL 0.1 M NaOH + CTAB (500 nM) (3 ölçüm)
3. 10 mL 0.1 M NaOH + Metformin ($5.51x10^{-3}$M) (3 ölçüm)
4. 10 mL 0.1 M NaOH + CTAB + Metformin (3 ölçüm)

CTAB ile yapılan işlemlerin aynısı SDS ve TRİTON içinde tekrar edildi. Yapılan bu çalışmada elde edilen voltamogramlar karşılaştırıldığında sülfaktan etkisinin olmadığı tespit edildi (Şekil 4.23).



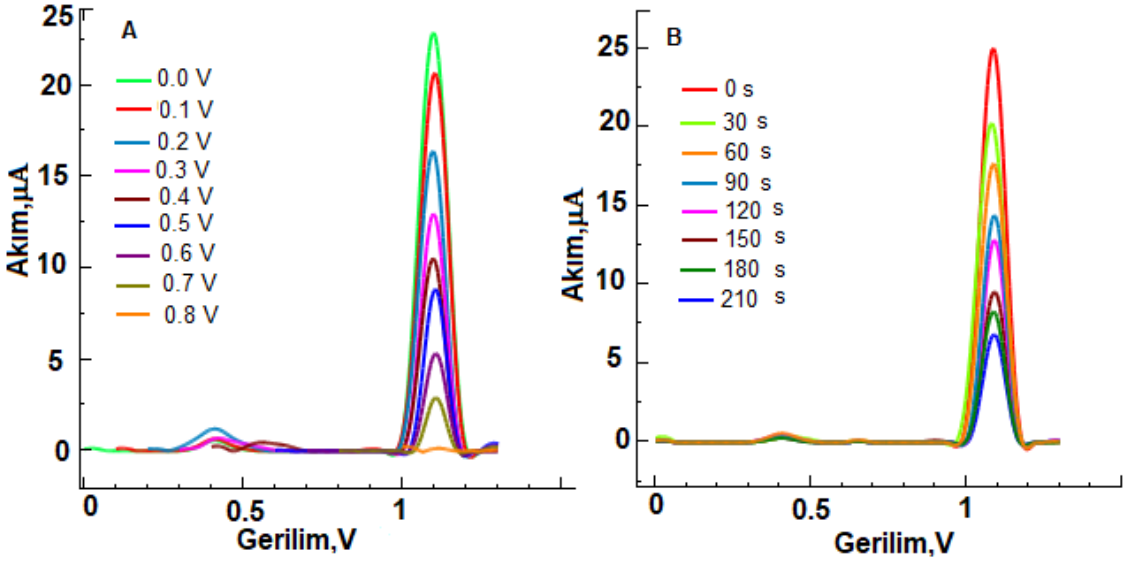
Şekil 4.25. 5.51×10^{-3} M Metformin′in sürfaktansız ya da sürfaktan (CTAB, TRİTON, SDS,) içeren NaOH içinde (0.1 M) elde edilen SWV eğrileri [1]

4.3.2.3. Biriktirme Koşullarının Etkisi

Araştırmanın bu bölümünde, Metformin molekülünün PG elektrot üzerindeki adsorptif karakteristikleri analiz edilmiştir. 5.51×10^{-3} M derişimindeki Metformin için 0.1 M NaOH çözeltisi içinde biriktirme (akümülasyon) zamanı (t_{acc}) ile biriktirme gerilimi (E_{acc}) koşullarının etkisi şekil 4.24′te verilmiştir.

[1] Sürfaktan derişimi, 5.0×10^{-3} M; elektrot, PG; SW değişkenleri: frekans; 25 Hz, adım gerilimi; 5 mV, amplitüd; 20 mV

Analitik sinyal üzerinde; t_{acc} etkisi, E_{acc} değeri 0.0 V′de sabit tutularak 0 ile 210 s zaman aralığında incelenmiştir. Süre arttıkça pik akım sinyal şiddetinde düşme olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, elektrot yüzeyinin analit molekülü ile doygun hale geldiğinin göstergesidir. Diğer taraftan, sıyırma pik akım sinyal şiddeti ile E_{acc} ilişkisi, t_{acc} = 0 s olması koşuluyla 0.0 V ile + 0.8 V gerilim aralığında analiz edildiğinde; pik gerilimi arttıkça pik akımının azaldığı gözlenmiştir. Böylece, analitik incelemenin devamında t_{acc} = 0 s ve E_{acc} = 0.0 V olarak kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.26. 5.51×10^{-3} M Metformin'in 0.1 M NaOH çözeltisinde elde edilen SWV eğrileri üzerinde biriktirme gerilimi (A) ile biriktirme süresi (B) etkisi [1]

4.3.2.4. Kare Dalga Değişkenlerinin Etkisi

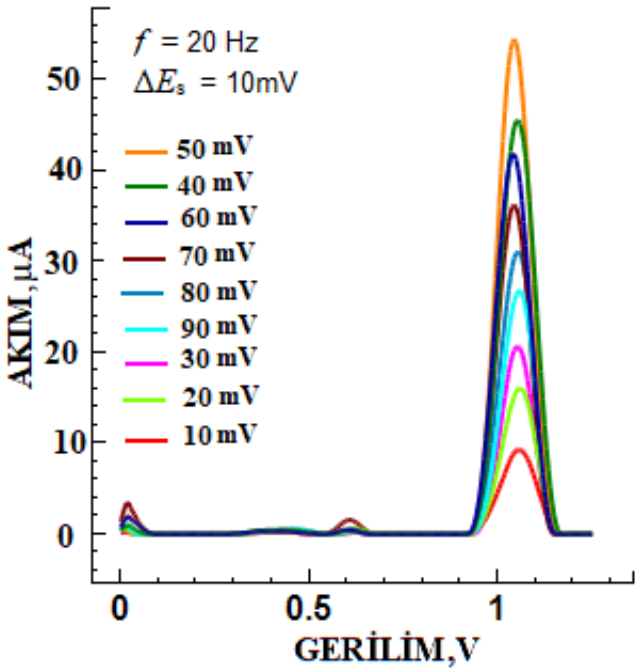
Elektrokimyasal çalışmalarda en hassas ve simetrik voltamogramları elde etmek amacıyla en uygun cihaz değişkenlerini belirleyebilmek için; kare-dalga amplitüdü, (ΔE_{sw}) adım gerilimi, (ΔE_s) ve kare-dalga frekansı, (f) parametrelerinin pik akım sinyali üzerine etkisi incelendi. Elektrokimyasal ölçümler 5.51×10^{-3} M MET derişimine sahip 0.1 M NaOH çözeltisinde PG elektrot kullanılarak yapılmıştır.

Her değişkenin değeri belirlenirken; diğer değişkenlerin değerleri sabit tutularak belirlenen şartlarda voltamogramlar kaydedilmiştir. SWV tekniğinde tarama hızı; Amplitüd, adım gerilimi ve frekans ile ilişkilidir.

[1] Elektrot; PG, SW değişkenleri: frekans; 40 Hz, adım gerilimi; 8 mV, amplitüd; 50 mV

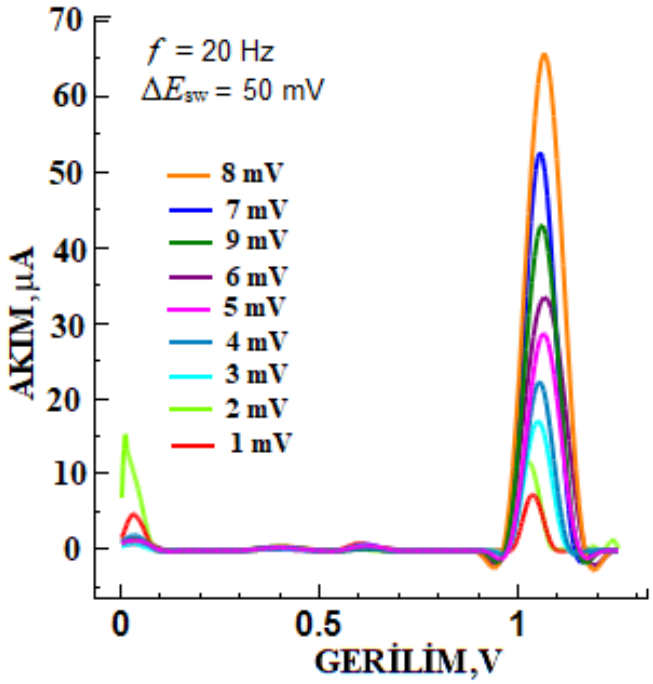
Metformin için farklı Amplitüd değerleri 0.1 M NaOH çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Üçer kez tekrar edilen deneylerden elde edilen SW akım değerleri voltamogramları Şekil 4.25'de verilmiştir.

Amplitüd için en iyi çalışma koşullarını belirleyebilmek amacıyla yapılan deneylerde adım gerilimi (ΔE_s) 10 mV, frekansı (f) 20 Hz olarak sabit tutulmuştur. SW akım eğrilerinde Amplitüd değerleri (ΔE_{sw} =10-90) mV arasında çalışılmış ve Şekil 4.25'de görüldüğü gibi Amplitüd değerleri 50 mV'ta kadar artarken sonrasında azalmıştır.Elde edilen bu verilere göre Amplitüd için en iyi çalışma koşulları 50 mV olarak elde edilmiştir.



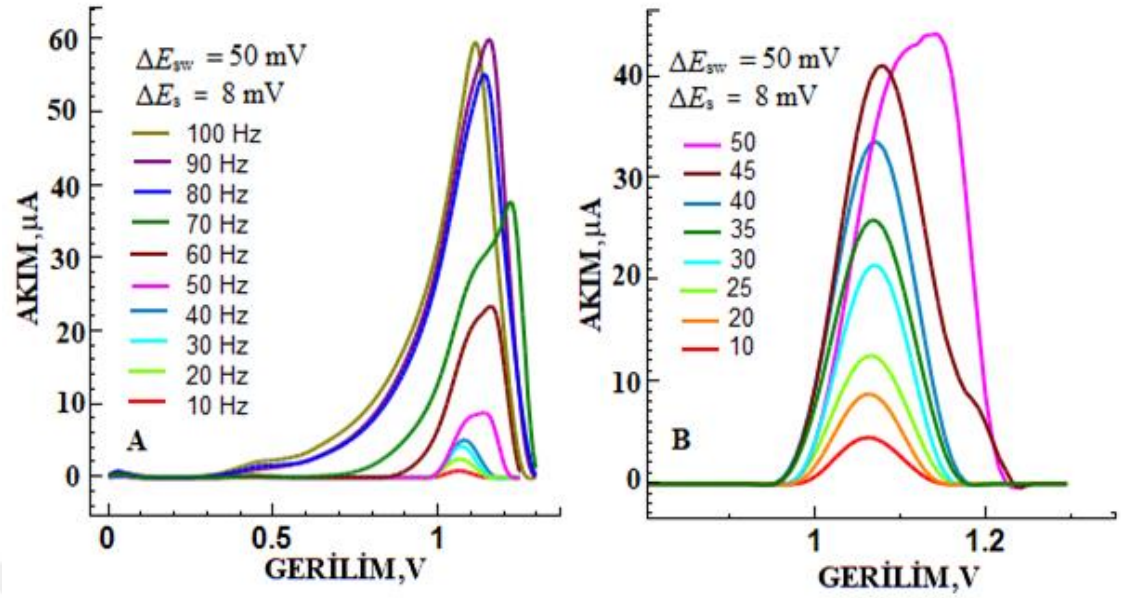
Şekil 4.27. 5.51×10^{-3} M Metformin'in 0.1 M NaOH içinde PG elektrot yüzeyinde farklı amlitüd SWV akım eğrileri

Metformin bileşiği için en iyi adım potansiyeli değerini belirlemek için Amplitüd değeri (ΔE_{sw}) 50 mV, frekansı (f) 20 Hz olarak sabit tutulmuştur. SW akım eğrilerinde adım potansiyeli (ΔE_s) 1-9 mV arasında çalışılmış ve elde dilen voltamogramlar kaydedilmiştir. Şekil 4.26'te görüldüğü gibi adım potansiyeli 8 mV'a kadar düzenli bir şekilde artarken devamında azlmıştır. Bu sonuçlara göre adım potansiyeli için en iyi çalışma koşulu 8 mV olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.28. 5.51×10^{-3} M Metformin'in 0.1 M NaOH çözeltisi içinde PG elektrot yüzeyinde farklı adım potansiyellerindeki SWV akım eğrileri

Metformin bileşiğine ait yapılacak çalışmalarda en iyi frekans değerini belirlemek için Amlitüd değeri 50 mV, adım gerilimi 8 mV olarak sabit tutularak çalışmalar 10-100 Hz aralığında gerçekleştirildi. Pikin şekli ve şiddeti bakımından 10 - 40 Hz arasında artışın görüldüğü, 50 - 100 Hz aralığında pikin şiddetinde artma olmakla birlikte pikte yayvanlaşma ve bozulmaların olduğu tespit edilmiştir. Pik şiddetindeki artışa göre en iyi çalışma şartları 40 Hz olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.29. 5.51×10^{-3} M Metformin'in 0.1 M NaOH çözeltisi içinde PG elektrot yüzeyinde farklı frekanslardaki SWV akım eğrileri [1]

4.4. Metformin'in Kalem-ucu Grafit Elektrot Üzerinde Tayini

Metformin molekülünün PG elektrot kullanarak 0.1 M NaOH çözeltisi içerisinde optimum çalışma koşullarında elektrokimyasal davranışlarının ayrıntılı olarak incelenmesinden sonra tez çalışmasının bu bölümünde ilgili bileşiğin ilaç analizlerinde ve biyolojik örneklerde (idrar örneği) analitik uygulanabilirlik koşulları araştırılmıştır.

4.4.1. Geliştirilen Tekniğin Analitik Performans Özelliklerinin Araştırılması

Sunulan tez çalışmasında PG elektrot kullanılarak geliştirilen voltametrik tekniğin analitik performans özellikleri (çalışma aralığı, tekrarlanabilirlik, hassasiyet), destek elelektrolit çözeltisi olarak 0.1 M NaOH çözeltisinde araştırılmıştır. Metformin molekülünün tayinine ait uygun voltametrik ve analitik şartlar Çizelge 4.11'de verilmiştir.

[1] A)10 Hz – 100 Hz arası frekans eğrileri B) 10 Hz – 50 Hz arası frekans eğrileri

Çizelge 4.11. Metformin tayini için voltametrik metot ile elde edilen en uygun deneysel ve aletsel değişkenler

Teknik	SWV
Elektrot	PG
Destek Elektrolit	0.1 M NaOH çözeltisi
Adsorptif sıyırma değişkenleri	
Biriktirme potansiyeli (E_{acc})	0 V
Biriktirme süresi (t_{acc})	0 s
Kare dalga değişkenleri	
Frekans (f)	40 Hz
Adım potansiyeli (ΔE_s)	8 mV
Amplitüde (ΔE_{sw})	50 mV

Metformin standart çözeltisinden elektrokimyasal hücreye belirli hacimde ilave edildikten sonra Çizelge 4.11.'de verilen optimun çalışma koşullarında voltamogramlar (üç defa tekrar edilerek) kaydedilmiştir. Her ilaveden sonra eğriler üzerinde +1.078 V değerindeki SWV yanıt değerlendirilmiştir. İlgili voltamogramlar ile derişim / pik akımsinyal şiddeti ilişkileri Şekil 4.28′de verilmiştir.

Şekil 4.28 B′de verilen analitik eğri, 2.76×10^{-6} – 2.48×10^{-5} M konsantrasyon aralığında [i_p (μA) = 0.1916 C (μM) - 0.2858 (r = 0.9988, n = 9)] doğrusal bir cevap vermektedir. Eşitlikteki i_p adsorptif sıyırma piki, C Metformin derişimi ve r korelasyon katsayısıdır.

Analitik eğrilerin kullanılmasıyla bulunan verilerden yararlanarak gözlenebilirlik sınırı (LOD) 3 s/m ile en düşük tayin sınırı (LOQ) 10 s/m eşitliklerine göre hesaplanmıştır. Eşitliklerde bulunan s, doğrusallık aralığında olan en düşük konsantrasyona denk gelen pik akım şiddetinin (3 ölçümün ortalaması) standart sapması, m ise kalibrasyon eşitliğinin eğim değerini göstermektedir. LOD ile LOQ değerleri sırasıyla 9.03×10^{-9} M ve 3.01×10^{-8} M olarak bulunmuştur.

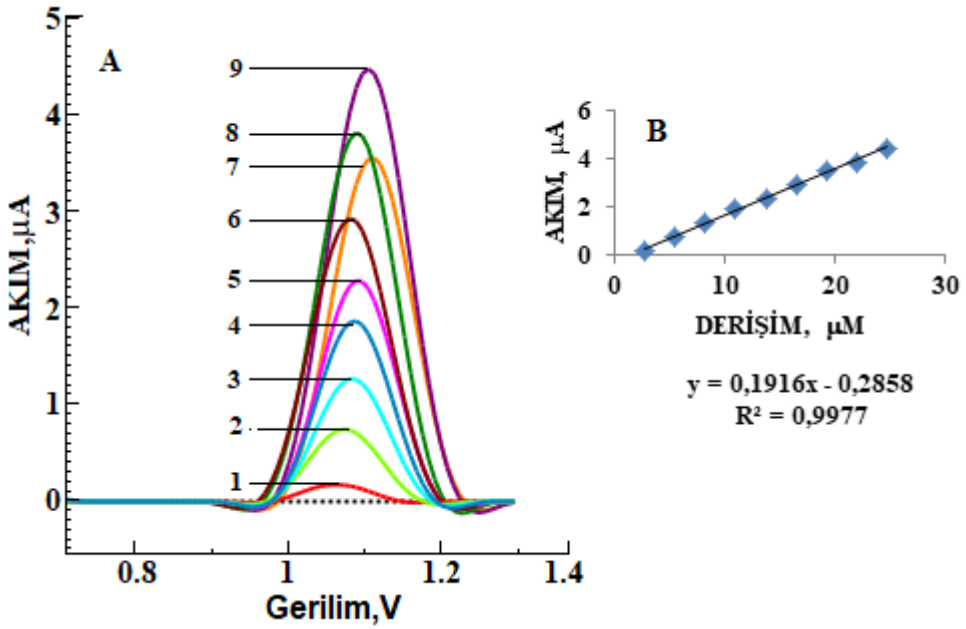
Yapılan çalışmalarda elde edilen verilerde görüldüğü gibi PG elektrota hiçbir kimyasal modifikasyon işlemi uygulanmadan, Metforminin oldukça düşük derişimlerinde dahi çok iyi sonuçlar elde edilmiştir. Elektrodun elektrokimyasal ön işlemi, diğer yüzey modifikasyon işlemlerine göre oldukça hızlı, basit ve ucuz olmasıyla birlikte hiç bir toksik ve kimyasal maddeye ihtiyaç duyulmadan çalışılması yönüyle de çevre dostudur. Yaptığımız literatür taramasına göre PG elektrot kullanılarak Metformin′in voltametrik yöntemle miktar tayini üzerine kaynakçada bugüne dek yapılan hiçbir çalışma yer almamaktadır. İlk kez tarafımızdan geliştirilen voltametrik

yöntemin duyarlılık açısından analitik performansı, Çizelge 2.2′de verilen ayırma yöntemlerinin bir kısmı ile kıyaslanabilir düzeydedir.

Çizelge 4.12. Farklı numunelerden MET analizine uygulanan voltametrik yöntemlerden elde edilen verilerin PG elektrot kullanılarak farklı yöntemler ile elde edilen analitik değerlerle karşılaştırılması

Elektrot	Teknik	Destek elektrolit	Çalışma aralığı (μmol L-1)	LOD (mM/nM)	Örnek	Kaynak
CuMW/CNT/PE	SWV	BR (pH 7.2)	0.9 – 50 μM	0.65μM	İlaç	Tian ve ark. 2006
MWCNT/PE	SWV	$NH_3 \cdot H_2O$–NH_4Cl (pH 8.9)	0.2 - 10 μM	67 nM	İlaç	Tian ve ark. 2007
CPE	Amperometric	NaOH (100 mM)	4.0–63 μM	0.45 μM	İdrar,Kan serumu ve anne sütü	Sattarahmadya ve ark. 2010
CPE	DPV	PBS (pH 12.0)	50 nM – 60 μM	9 nM	İlaç ve idrar	Gholivand ve ark. 2013
GCE	CV	TBAH(0.1 M)				Ghasemi ve ark. 2014
PYCPE Pyrogallol (PY)	DPV	BR (pH 2.0)	0.8 - 6 μM	0.0663 μM	İlaç ve idrar	Attia ve ark. 2014
Cu-BTC/CNT	CV	KOH (0.1 M)	0.5 μM -- 25 μM	0.12 μM	İlaç	Hadi ve ark. 2016
GCE	CV	PBS (pH 9.0)	15 – 200 μM	0.076 μM	Yağmur suyu	Baghayeri ve ark. 2019
PG	SWV	NaOH (0.1 M)	2.76– 24.8 μM	9.03 nM	İlaç ve idrar	Bu Çalışma

Geliştirilen voltametrik yöntemin Metformin için tekrarlanabilirlik düzeyini belirlemek için PG elektrot ve 0.1 M NaOH çözeltisi içerisinde 13.775 $x10^{-6}$ M derişime sahip çözeltiler, en uygun deney şartlarında hazırlandı. Metformin için bu çözeltilerin gün içinde 9 defa sıyırma voltamogramları kaydedilmiştir. Bu voltamogramlar üzerinde yükseltgenme pik akımı ve gerilim değerleri okunmuş ve elde edilen değerler gün-içi kesinlik olarak kabul edilmiştir. Elde edilen verilere göre yükseltgenme pik akımı ve gerilimi için bağıl sıtandart sapma değerleri, sırasıyla % 1.20 ve % 0.48 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, çalışma koşulları altında PG elektrotunun tekrar edilebilirliğinin çok iyi olduğu söylenebilir.



Şekil 4.30. A) Metformin[1) 2.755, 2) 5.51, 3)8.265, 4)11.02, 5) 13.775, 6) 16.53, 7) 19.285, 8) 22.04, 9) 24.795 µM] içeren NaOH (0.1 M) çözeltisi içerisinde kaydedilen SWV eğrileri [1]

4.4.2. Gerçek Örnek Analizleri

Geliştirilen tekniğin gerçek numuneler üzerinde performans özelliklerini doğrulamak amacıyla, ticari ilaç şekilleri ve biyolojik sıvı (idrar) numuneleri üzerinde çalışılmıştır.

4.4.3. Enjektabl Çözeltiler

Tekniğin ticari ilaç formuna uygulama aşamasında eczanelerden alınan her bir film kaplı tablet 1000 mg Metformine eşdeğer GLİFOR® 1000 mg film tablet kullanılmıştır. Bölüm 3.3.1.1′de anlatıldığı şekliyle hazırlanmış tablet çözeltilerinin voltamogramları standart maddeler için hazırlanan şartlarda kaydedilmiştir. Tablet analizine ait voltamogramlar ile standart Metformin′e ait voltamogramlar kıyaslandığında eğrilerin birbiriyle uyum içinde olduğu görülmüştür. Voltamogramlar üzerinde okunan yükseltgenme pik akım değerleri, kalibrasyon eğrilerindeki yerlerine yerleştirilerek tabletlerin içerdiği Metformin miktarları hesaplanmıştır. Bu değerler ile gerçek değerler karşılaştırılmıştır. Geliştirilen tekniğin doğruluk ve kesinliğini kontrol

[1] Elektrot; PG. SW değişkenleri: frekans; 40 Hz, adım gerilimi; 8 mV, amplitüd; 50 mV. Kesikli çizgi; destek elektrolit. Ek (B): i_p / $C_{Metformin}$ eğrisi.

etmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu işlem için, aynı enjektabl çözeltisine standart Metformin çözeltisinden doğrusallık sınırlarını geçmemek şartı ile ard arda ilaveler yapılmış ve her ilaveden sonra voltamogramlar yeniden kaydedilmiştir. Pik akımlarının ölçümü hem orijinal enjektabl çözeltisinde, hem de ardışık ilavelerden sonra yapılmıştır. Daha sonra enjektabl çözelti numunesine eklenen saf maddenin ne kadarının tayin edilebildiği hesaplanmıştır. Voltametrik teknikle gerçekleştirilen analiz sonuçları çizelge 4.13′te verilmiştir. Sonuçlar, %96- %110 arasındaki kazanımla PG elektrotu üzerinde geliştirilen voltametrik yöntemin doğruluğunun bilimsel açıdan geçerli olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.13. Metformin içeren tabletlerde voltametrik yöntem analiz bulguları

Eklenen (μM) [1,2]	**Bulunan(μM) [1,2]**	**Geri Kazanım [2](%) ± %BSS**
2.755	3.036	110.199 ± 4.46
5.510	5.879	106.696 ± 3.91
8.265	8.196	99.165 ± 6.69
11.020	10.997	99.791 ± 5.97
13.775	13,344	96.871 ± 2.79
16.530	17.003	102.861 ± 1.87
19.285	19.296	100.057 ± 2.85
22.040	22.271	101.048 ± 1.68
24.795	24.600	99.213 ± 1.59

.

4.4.4. İdrar Örnekleri

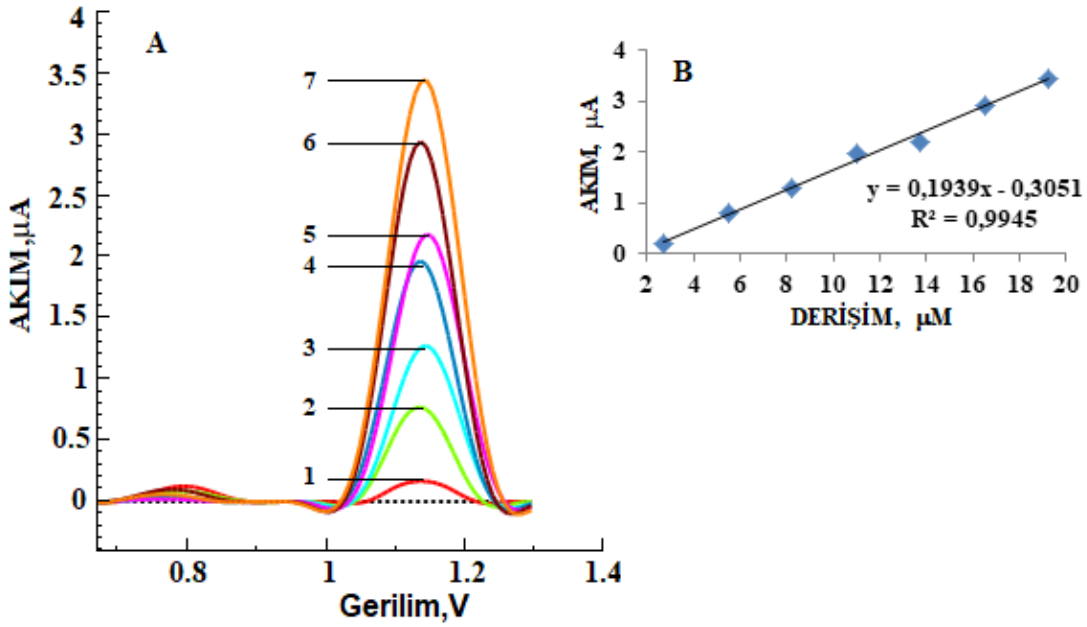
Metformin tayini için tek kullanımlık PG elektrot üzerinde geliştirilen voltametrik tekniğin yüksek duyarlılığa ve tekrarlanabilirliğe sahip olması nedeniyle, idrar örneği gibi karmaşık matris ortamlarında (su, tuz ve biyomoleküller içerir) da kullanılma koşulları araştırılmıştır.

[1]Her bir tablet 1000 mg Metformin içerir.

[2]Sonuçlar, üç analizin ortalamasıdır

Deneylerin başlangıcında, Bölüm 3.3.1.2′de anlatılan yol izlenerek hazırlanmış ve Metformin eklenmemiş idrar örneklerinde (kör örnek) voltamogramlar destek elektroliti çözeltisi (0.1 M NaOH) içerisinde alınmıştır. Çözeltilerde Metformin sinyalinin gözlendiği gerilim aralığında idrarda bulunan biyomoleküllere (ürik asit, askorbik asit, dopamin) ait hiçbir yükseltgenme basamağı gözlenmemiştir. SWV yöntemi ile idrar numunelerinde ürik asit piki NaOH (0.1 M) çözeltisi içerisinde yaklaşık olarak +0.80 V dolayında belirlenmiştir.

Metformin ilave edlmiş idrar örneği, hiçbir karmaşık ön işlem ve ayırma tekniği kullanılmadan yalnızca santrifüj sonrası belirlenen destekleyici elektrolit ile seyreltilerek analiz edilmiştir. Elde edilen sıyırma voltamogramları Şekil 4.29′da görülmektedir. Yaklaşık +1.14 V dolayında gözlenen pik, her Metformin standart eklenmesi sonunda düzgün olarak artmıştır. Çizelge 4.10′da görüldüğü gibi, bulunan değerle idrara katılmış Metformin derişimi arasındaki uyum önerilen tekniğin Metformin′in idrar numunelerinden de doğru olarak tayin edilebileceğini göstermiştir.



Şekil 4.31. A) İdrar örneğinin 0.1 M NaOH içerisinde kaydedilen SWV eğrileri [(seyrelme oranı 1:100 (h/h)] [1]

[1] Metformin eklenmemiş (kesikli çizgi), 1) 2.755×10^{-6} M Metformin eklenmiş, (2–7) 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 µL standart eklemeler sonrası ($C_{Metformin} = 5.51\times10^{-3}$ M).). Elektrot; PG. SW değişkenleri: frekans; 40 Hz, adım gerilimi; 8 mV, amplitüd; 50 mV. (B) Standart ekleme metoduyla analiz sonucu

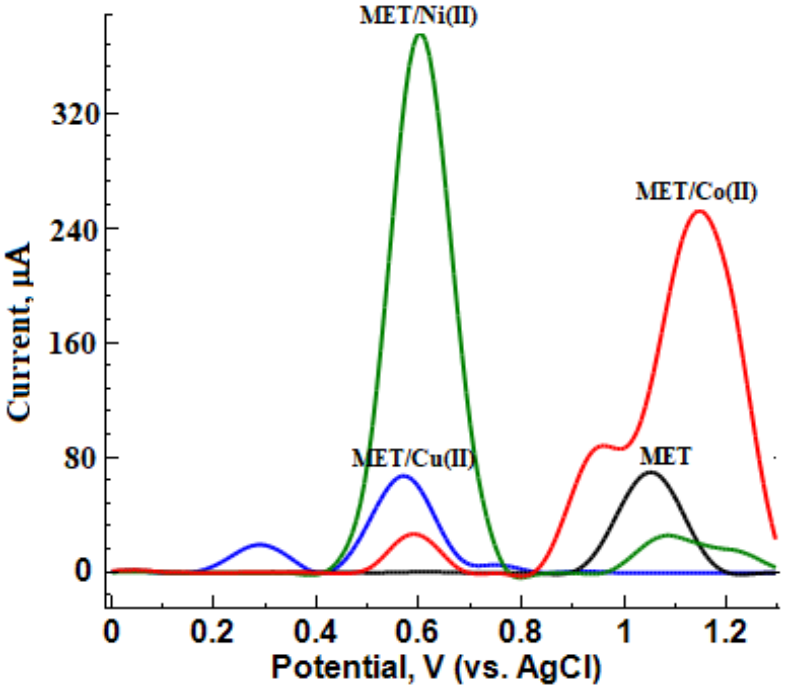
Çizelge 4.14. Metformin eklenmiş idrar örneğinde voltametrik analiz bulguları

Eklenen (μM)[1]	**Bulunan(μM)[1]**	**Geri Kazanım (%)**	**BSS (%)**	**Bias (%)**
2.755	2.711	98.403	2.92	+ 1.597
5.510	5.652	102.577	2.13	- 2.577
8.265	8.152	98.633	2.70	+ 1.367
11.020	11.506	104.410	2.57	- 4.410
13.775	13.231	96.051	4.96	+ 3.949
16.530	16.473	99.655	1.76	+ 0.345
19.285	18.889	97.946	1,32	+ 2.054

4.4.5. Metformin Üzerine Girişim Çalışması

Geliştirilen voltametrik yöntemin duyarlılık, doğruluk ve tekrar edilebilirlik sonuçları oldukça iyi olduğu için vücutta olması muhtemel olan türlerin Metformin tayini üzerindeki etkisini araştırmak için bir girişim çalışması yapılmıştır. 5.51 mM Metformin derişimi sabit tutularak optimum çalışma koşullarında metformin derişiminin 10 katı olacak şekilde girişim yapan türler ilave edilerek voltamogramlar kaydedildi. Bu amaçla, dopamin, ürik asit, gibi biyolojik moleküller ile NaCl, $CaCl_2$ gibi moleküller incelenmiştir. Tolerans sınırı, maksimum $\pm$ %5'lik bir nispi hatayla sonuçlanan maksimum yabancı tür konsantrasyonu olarak alınmıştır. Çizelge 4.15 ve Şekil 4.30'da verilen sonuçlardan görüldüğü gibi Co^{2+}, Cu^{2+} ve Ni^{2+} hariç biyolojik sıvılarda 0.1 M NaOH ortamında geliştirilen voltametrik yöntemin PG elektrot üzerinde metforminin seçici olarak tayin edilebileceğini göstermiştir.

[1]Standart ekleme yöntemiyle hesaplanan değer, aynı örneğin farklı üç bağımsız analizinin ortalamasıdır.



Şekil 4.32. Metformin'in Cu(II), Ni(II) ve Co(II) ile karışım halinde 0.1 M NaOH ortamında PG elektrot ile SWV eğrileri

Çizelge 4.15. 5.51 mM Metformin'in 0.1M NaOH içinde PG elektrot kullanılarak gerçekleştirilen girişim toleransı

Madde	Tolerans seviyesi oranı (yabancı madde Metformin)	± % Hata
Na^{+}	10:1	34.17
Mg^{2+}	10:1	0.48
Ca^{2+}	10:1	24.92
P^{3+}	10:1	-
Fe^{3+}	10:1	-
Co^{2+}	10:1	101.76
Cu^{2+}	10:1	98.97
Ni^{2+}	10:1	87.61
Ürik asit	10:1	12.53
Dopamine	10:1	19.33
Epinefrin	10:1	3.77
Norepinefrin	10:1	5.01
Testesteron	10:1	60.81
Progesteron	10:1	26.41

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

″Kaynak araştırması″ bölümünde açıklandığı üzere, Vildagliptin ve Metformin moleküllerinin voltametrik tayinine yönelik Bölüm 2.1.6.'da özetlenen ve çizelge 4.5'te verilen; Vildagliptin ile ilgili kaynakçada elektrokimyasal temelli tek bir makale bulunmaktayken Metformin ile ilgili (Çizelge 4.11.) sınırla sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Yapılmış olan bu elektrokimyasal çalışmalarda; yükseltgenme temelli süreçte, farklı elektrot (CuMW/CNT/PE, MWCNT/PE, CPE, GCE, PYCPE, Pyrogallol (PY),Cu-BTC/ CNT) ve teknikler (SWV, Amperometric, DPV, CV) kullanarak biyolojik sıvı ve ilaçlarda Vildagliptin ve Metformin moleküllerinin miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Bu tez kapsamında sunulan araştırmada, farklı destek elektrolitleri kullanılarak sulu karbon-temelli malzemeler (GC ve PG elektrotlar) üzerinde Vildagliptin ve Metformin moleküllerinin yükseltgendiği ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Çalışmada elde edinilen sonuç Vildagliptin ve Metformin gibi moleküllerin yükseltgenme mekanizmalarının belirlenmesinde yol gösterici olması bakımından oldukça önemlidir. Ayrıca bu moleküller için ilk defa kullanılan voltametrik yöntemlerin; genel olarak benzer yapılı tüm antidiyabetik ilaçların biyolojik örneklerdeki tayinlerinde oldukça fazla kullanılan ve çizelge 2.2'de özetlenen maliyeti yüksek, zaman alıcı, deneyim ve tecrübe gerektiren HPLC, UV, Elektroforez, FTIR gibi yöntemlere alternatif olacağı düşünülmektedir.

Bu tezin deneysel aşamasında, çalışma elektrodu olarak ilk defa kullanılan PG elektrot, herhangi bir kimyasal işlem uygulanmaksızın Vildagliptin ve Metformin moleküllerinin oldukça düşük derişimlerinin belirlenebilmesine olanak sağlamıştır. PG elektrodun aktivasyonu ile elektrot yüzeyi aktifleşir ve hedef analitin yükseltgenme / indirgenme olayında elektrodun elektrokatalitik etkinliği artırmaktadır. Bu elektrokimyasal aktivasyon işlemi; oldukça hızlı, düşük maliyetli, kolay ve toksik kimyasal madde içermedi için çevre dostu, elektrokimyasal bir ön işlemdir. Tek-kullanımlık, ekonomik ve çevre-dostu PG elektrotun kullanılması ile geliştirilen yöntemlerin, yalnızca Vildagliptin ve Metformin için değil tüm antidiyabetik ilaçların miktar tayinlerinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir. Vildagliptin ve Metformin moleküllerinin idrar ve farmasötik ilaç şekillerinde tayini için önerilen

elektrokimyasal çalışmalar; çizelge 4.5. ve çizelge 4.11'de özetlenen çalışmalarla karşılaştırıldığınada elde edilen duyarlılık sonuçlarının ya çok yakın ya da daha iyi olduğu görülmektedir. Ayrıca tarafımızdan ilk defa geliştirilen bu voltametrik tekniğin analitik performansı, çizelge 2.2'de verilen kromatografik ve spektroskopik teknikler ile karşılaştırılabilir düzeydedir.

Vildagliptin için PBS (pH 9.0) ortamında, Metformin için 0.1 M NaOH ortamında LOD değerleri sırasıyla 8.20 nM(2.48 ng mL^{-1}) / 9.03 nM (1.495 ng mL^{-1}) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçların gelecekteki araştırmalar için umut verici olduğu görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Adams, R.N.1969.Electrochemistry at Solid Electrodes. Dekker, ***M.analytıcal Electrochemıstry***. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken,262,New York.

Aktunç, E., Ünalacak, M., Demircan, N. 2002.Tip II Diyabet'te Patofizyoloji ve Akılcı Tedavi Yaklaşımı. ***STED***,11 (9): 334–336.

Anonim, 2019. Diyabet nedir? Erişim:[http://www.diabetcemiyeti.org/c/diyabet-nedir]. Erisim Tarihi: 12.04.2019

Anonim, 2019. Diyabet nedir? Erişim:[https://www.memorial.com.tr/saglik-rehberleri/diyabet-nedir/], Erisim Tarihi: 10.04.2019

Attia, A.K., Salem, W.S., Mohamed, M.A.2015. Voltammetric Assay of Metformin Hydrochloride Using Pyrogallol Modified Carbon Paste Electrode. ***Acta chimica Slovenica***, 62 (3): 588–594.

Baghayeri, M. , Amiri, A., Razghandi H. 2019. Employment of Pd nanoparticles at the structure of poly aminohippuric acidas a nanocomposite for hydrogen peroxide detection. ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 832 ( ) :142–151

Balas, B., Baig, M.R., Watson, C., Dunning, B.E., Ligueros-Saylan, M., Wang, Y., He, Y.L., Darland, C., Holst, J.J., Deacon, C.F., Cusi, K., Mari, A., Foley, J.E., DeFronzo, R.A., 2007. The dipeptidil peptidaz IV inhibitor VİLD suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients. ***J. Clin. Endocrinol Metab***. 92: 1249–1255.

Baldwin, R. P., Thomsen, K.N.1991. Chemically modified electrodes in liquid chromatography detection. ***Talanta***, 38(1):1-16.

Bard, A.J., Faulkner, L.R. 2000. Electrochemical Methods: Principles and Applications, 2nd ed.; ***Wiley, J and Sons***: 850,New York.

Barker, G. C., Gardner, A.W. 1960. Pulse Polarography.***Z. Anal. Chem***, 173 (1) :79-83.

Barker, G. C., Jenkin, I. L.1952. Squarel-Wave Polarography.***Analyst***, 77 (920):685-696.

Bendale, A. R., Singh, R.P., Vidyasagar, G. 2018. Development and valıdatıon stabılıty ındıcatıng hptlc method for determınatıon of vıldaglıptın and metformın hydrochlorıde ın the pharmaceutıcal dosage forms.***International Journal of Applied Pharmaceutics***, 10(1): 36-45.

Bergman, A.J., Cote, J., Yi, B., Marbury, T., Swan, S.K., Smith, W., Gottesdiener, K., Wagner, J., Herman, G.A. 2007. Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor. ***Diabetes Care***, 30(7): 1862-1864.

Borman, S. 1982. New electroanalytical pulse techniques. ***Anal. Chem***., 54(6): 698-705.

Bott, A.W. 1997. Practical problems in voltammetry 4: Preparation of working electrodes. ***Current Separation***, 16(): 79-83.

Chiasson, J.L., Josse R.G., Hunt J.A. 1994.The efficacy of acarbose in the treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A multicenter controlled clinical trial. ***Annals of Internal Medicine***, 121(12): 928-935.

Compton, R. G., Foord, J. S.,Marken, F. 2003. Electroanalysis at Diamond-Like and Doped-Diamond Electrodes.***Electroanalysis***, 15(): 1349-1363.

Copeland, T. R., Skogerboe, R. K. 1974.Anodic stripping voltammetry. ***Analytical Chemistry***, 46(14): 1257-1268.

Crandall J.P., Knowler W.C., Kahn, S.E., Marrero,D., Florez,J.C., Bray,G.A., Haffner, S.M., Hoskin ,M., Nathan,D.M. 2008.Diabetes Prevention Program Research Group. The prevention of type 2 diabetes. ***Nature Clinical Practice Endocrınology & Metabolısm***, 4(7): 382-393.

Csöregi, E., Gorton, L.,Varga, G.M.1993.Carbon fibres as electrode materials for the construction of peroxidase-modified amperometric biosensors. ***Analytica Chimica Acta***, 273 (1-2): 59-70.

Çolak, R. 2012. Tip 2 diabetes mellitus tedavisinde inkretinler. ***Journal of Experimental and Clinical Medicine***, 29 (1) :30-38.

David, I.G., Popa, D.E., Bulendra, M. 2017. Pencil graphite electrodes: a versatile tool in electroanalysis. ***Journal of Analytical Methods in Chemistry***, 1-23.

DeAngelis, T. P., Bond, R. E., Brooks, E. E., Heineman, W. R. 1977.Thin-layer differential pulse voltammetry. ***Analytical Chemistry***, 49 (12): 1792-1797.

Demetriades, D., Economou, A., Voulgaropoulos, A. 2004. A study of pencil-lead bismuth-film electrodes for the determination of trace metals by anodic stripping voltammetry. ***Analytica Chimica Acta***, 519 (2): 167-172.

Edmonds, T.E.1985.Electroanalytical applications of carbon fibre electrodes. ***Analytica Chimica Acta***, 175:1-22.

El-Wekil, M.M., Abdelhady, K.K., Abdel Salam, R.A., Hadad, G.M. 2019. Applications of Fourier transform infrared spectroscopic method for simultaneous quantitation of some hypoglycemic drugs in their binary mixtures. Spectrochimica Acta- Part A: ***Molecular and Biomolecular Spectroscopy***,213: 249-253.

Engstrom, R. C.1984.Spatial resolution of electrode heterogeneity using iontophoresis. ***Analytical Chemistry,***56(6): 890-894.

Fadr, M., Amro, A.N., Aoun,S.B.2018. Voltammetric determination of vildagliptin in a pharmaceutical formulation. ***Tropical Journal of Pharmaceutical Research***, 17 (9): 1847-1852.

Florence, T. M.1970. Anodic stripping voltammetry with a glassy carbon electrode mercury-plated in situ. ***Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry***, 27(2): 273-281.

Gedawy, A., Al-Salami, H., Dass, C.R.2019. Development and validation of a new analytical HPLC method for simultaneous determination of the antidiabetic drugs, metformin and gliclazide. ***Journal of Food and Drug Analysis***, 27(1): 315-322.

Ghasemi, K. , Rezvani, A.Z. , Rosli , M.M. , Razak, İ.A.R., Moghimi, A., Ghasemi, F. 2014. Potential antidiabetic drug involving a zinc anionic complex of dipic and metformin as counter ions: Synthesis, characterization, crystal structure and electrochemical studies. ***Journal of Molecular Structure***, 1074: 79–84.

Gholivand, M.B., Behzad, L.M. 2013. Differential pulse voltammetric determination of metformin using copper-loaded activated charcoal modified electrode. ***Analytical Biochemistr***, 438(1): 53-60.

Gren, B., Flatt, P., Bailey,C. 2007.Gliptins: DPP-4 inhibitors to treat type 2 diabetes. ***Future Prescriber***, 8(3): 6-12.

Hadi,M., Poorgholi, H.,Mostaanzadeh, H.2016. Determination oF metformin at metal-organic framework (Cu-BTC) Nanocrystals/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. ***South African Journal of Chemistry***, 69:132–139.

Halimi, S. 2008.DPP-4 inhibitors and GLP-1 analogues: for whom? Which place for incretins in the management of type 2 diabetic patients?. ***Diabetes & metabolism***, 34: 91-95.

Hesse, E., Taubmann, G. 1929.Die Wirkung des Biguanids und seiner Derivate auf den Zuckerstoffwechsel. ***Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie***,142 :290-308.

Heyrovsky, J., Kuta, J. 1966.Principles of polarography. Academic Press,580, New York.

Hirsch, H.A., Iliopoulos, D., Tsichlis, P.N., Struhl, K. 2009.Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. ***Cancer research***, 69(19):7507-7511.

Inzucchi, S.E., Maggs, D.G., Spollett, G.R., Page, S.L., Rife,F.S., Walton V., Shulman, G.I. 1998. Efficacy and Metabolic Effects of Metformin and Troglitazone in Type II Diabetes Mellitus. ***New England Journal of Medicine***, 338:867-873.

Jang, H.H., Kim, H.W., Kim, S.Y., Kim, S.M., Kim, J.B., Lee, Y.M. 2019. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of cyanidin 3-caffeoyl-p-hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside, an anthocyanin isolated from purple-fleshed sweet potato. ***Food Chemistry***,.272: 688-693.

Jiang, S.Y., Tong, J.C., Hu, H., Shen, J., Chen, F.H.2018. Bioequivalence of vildagliptin tablets in healthy volunteers. ***Chinese Journal of New Drugs***, 27(7): 803-806.

Johnson, D.C. LaCourse, W.R. 1990. Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. ***Analytical Chemistry***, 62(10): 589-597.

Kaya, A. 2019. Diyabetin Tarihi. Erişim: [http://diyabet.com/diyabet/diyabet hakkinda/turkiyede diyabet/diyabetin-tarihi/]. Erisim Tarihi:10.04.2019

Kemula,W., Kublik, Z. 1958.Application de la goutte pendante de mercure à la détermination de minimes quantités de différents ions: communiqué préliminaire. ***Analytica Chimica Acta*****, 18**: 104-111.

Kovacic, P. 2007. Unifying mechanism for anticancer agents involving electron transfer and oxidative stress: Clinical implications. ***Medical Hypothese***, 69(3): 510-516.

Laviron, E., 1979. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 101(1): 19-28.

Laviron, E., Roullier, L., Degrand, C. 1980. A multilayer model for the study of space distrubuted redox modified electrodes. ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 112(1): 11-23.

Lilly, M., Godwin, M. 2009. Treating prediabetes with metformin Systematic review and meta-analysis. ***Canadian Family Physician***, 55(4): 363-369.

Lima, H.R.S., da Silva, J.S., de Oliveira Farias, E.A., Teixeira, P.R.S., Eiras, C., Nunes, L.C.C., 2018. Electrochemical sensors and biosensors for the analysis of antineoplastic drugs. ***Biosensors and Bioelectronics***, 108: 27-37.

Maher, H.M., Abdelrahman, A.E., Alzoman, N.Z., Aljohar, H.I. 2019. Stability-indicating capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of metformin

hydrochloride, saxagliptin hydrochloride, and dapagliflozin in pharmaceutical tablets. ***Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies***,42(5-6):161-171.

Mann, C.K. 1969. Nonaqueous solvents for electrochemical use in electroanalytical chemistry. Bard, A.J. Electroanalytical chemistry. vol 3. Marcel Dekker, 57,New York.

Matsue, T., Aoki, A., Ando, E., Uchida, I. 1990. Multichannel electrochemical detection system for flow analysis. ***Analytical Chemistry***, 62(4):407- 409.

McCreery,R. L. 1991. Carbon electrodes: Structural effects on electron transfer kinetics. Bard, A. J. Electroanalytical Chemistry. Vol. 18. Marcel Dekker, New York.

Moussa ve ark. 2019. A validated LC-MS/MS method for simultaneous determination of linagliptin and metformin in spiked human plasma coupled with solid phase extraction: Application to a pharmacokinetic study in healthy volunteers. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, 163: 30 153-161

Moussa, B.A., Mahrouse, M.A., Fawzy, M.G. 2018. Different resolution techniques for management of overlapped spectra: Application for the determination of novel co-formulated hypoglycemic drugs in their combined pharmaceutical dosage form. ***Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, 205: 235-242.

Muller, H., Rheinwein, H. 1927. Pharmacology of galegin. ***Arch Expll Path Pharm***, 125: 212-228.

Murphy, G.J., Holder, J.C. 2000.PPAR-y agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. ***Trends in Pharmacological. Sciences***, 21(12): 469-474.

Mycek JM, Harvey AR, Champe CP. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Farmakoloji, Çeviri-Ed; Oktay Ş, Nobel Tıp Kitabevi, 2. Baskı, İstanbul, 1998; s: 255 262.

Nicholson, R. S., Shain, I. 1964. Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. ***Analytical Chemistry***, 36 (4):706-723.

Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.L., Souverain, S.F. 2011. Analysis of anticancer drugs: A review. ***Talanta***, 85(5): 2265-2289.

O'Dea, J. J., Osteryoung, J., Osteryoung, R. A. 1981. Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. ***Analytical Chemistry***, 53(4): 695-701.

Osteryoung, J.G., Osteryoung, R. A. 1985. Square wave voltammetry**.** ***Analytical Chemistry***, 57(1): 101-110.

Önal,G.2018. Kanser kemoterapisinde kullanılan bazı ilaçların voltametrik yöntemle elektroanalitik incelenmesi. Doktora tezi, Yüzüncü yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van,107.

Peterson, W.M. 1979. Static mercury drop electrode. ***Pascal and Francis Bibliographic Databases***, 11(12), 69-78.

Rauf, S., Gooding, J.J., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anwar, M.A., Khalid, A.M., 2005. Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, 37(2): 205-217.

Rice, M., Galus, Z., Adams, R. N. 1983. Graphite paste electrodes: Effects of paste composition and surface states on electron-transfer rates. ***Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistr***y, 143(1-2): 89-102.

Sattarahmadya, N., Heli, H., Faramarzi, F. 2010. Nickel oxide nanotubes-carbon microparticles/Nafion nanocomposite for the electrooxidation and sensitive detection of metformin. ***Talanta***, 82 (4): 1126-1135.

Sherif M.Eid, Shymaa S.Soliman., Mohamed R.Elghobashy.,Ola M.Abdalla. ATR-FTIR coupled with chemometrics for quantification of vildagliptin and metformin in pharmaceutical combinations having diverged concentration ranges. ***Vibrational Spectroscopy***. Volume 106, January 2020, 102995

Strugaru, A.M., Kazakova, J., Butnaru, E., Caba, I.C., Bello-López, M.Á., Torres, R.F. 2019. Simultaneous determination of metformin and glimepiride in human serum by ultra high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry detection. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, 165: 276-283.

Tavares, P.H.C.P., Barbeira, P.J.S. 2008. Influence of pencil lead hardness on voltammetric response of graphite reinforcement carbon electrodes. ***Journal of Applied Electrochemistry***, 38: 827-832.

Terashima, C., Rao, T. N., Sarada, B.V., Tryk, D. A., Fujishima, A. 2002. Electrochemical Oxidation of Chlorophenols at a Boron-Doped Diamond Electrode and Their Determination by High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection. ***Analytical Chemistry***, 74(4): 895-902.

Tian, X. J., Song, J.F., Luan, X.J.,Wang, Y.Y., Shi, Q.Z. 2006. Determination of metformin based on amplification of its voltammetric response by a combination of molecular wire and carbon nanotubes. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***. 386: 2081–2086.

Tian, X.J., Song, J.F. 2007. Catalytic action of copper (II) ion on electrochemical oxidation of metformine and voltammetric determination of metformine in pharmaceuticals. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, 44 (5): 1192-1196.

Turan, E.,Kulaksızoğlu, M. 2015. Tip 2 Diyabet Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. ***Okmeydanı Tıp Dergisi*** 31(Ek sayı):86-94.

Ünal, A. Z. 2016. Metforminin Bazı Kemoterapötik İlaçlarla Etkileşmesinin İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 124.

Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N.S., Leclerc, J., Foretz, M., Andreelli, F. 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. ***Clinical science***, 122(6):253- 270.

Wallace, G. G. 1985. Dissolved oxygen: the electroanalytical chemists dilemma. ***TrAC Trends in Analytical Chemistry***, 4(6): 145-148.

Wang, J. 2006. Analytical Electrochemistry. John Wiley & Sons. Inc., 262, New Jersey, USA.

Wang, J., Kawde, A.N., Sahlin, E., 2000. Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. ***Analyst***, 125: 5-7.

Watanabe, C.K. 1918.Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases***. Journal of Biological Chemistry***, 33: 253-265.

Witters, L.A. 2001. The blooming of the French lilac. ***The Journal of clinical investigation***, 108(8):1105-1107.

Wooley, D.E., Tetlow, L.C., Adlam, D.J., Gearey, D., Eden, R.D., Ward, T.H., Allen, T.D. 2002. Electrochemical Monitoring of Anticancer Compounds on the Human Ovarian Carcinoma Cell Line A2780 and Its Adriamycin- and Cisplatin-Resistant Variants. ***Experimental Cell Research***, 273(1): 65-72.

Wysham CH, Kirkman MS. 2011. Response to Comment on: American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. ***Diabetes care***, 34(5): 11-61..

Yarnitzky, C.N. 1985. Automated cell: a new approach to polarographic analyzers. ***Analytical Chemistry***, 57(9): 2011-2015.

Zerilli, T., Pyon, E.Y. 2007. Sitagliptin phosphate: A DPP- 4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. ***Clinical Therapeutics,*** 29(12): 2614-2634.

Zinman, B., Gerich, J., Buse, J.B., Lewin, A., Schwartz, S., Raskin, P., Hale, P.M., Zdravkovic, M., Blonde, L. 2009. Efficacy and Safety of the Human Glucagon-Like Peptide-1 Analog

Liraglutide in Combination With Metformin and Thiazolidinedione in Patients With Type 2 Diabetes (LEAD-4 Met+TZD). ***Diabetes Care***, 32(7): 1224-1230.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Yalçın ALTUNKAYNAK
ÖĞRENCİ NO	17803504
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Kimya
PROGRAM	Doktora
TEZ KONUSU	Diyabet Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçların Voltametrik Yöntemle Elektroanalitik İncelenmesi
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	119
BENZERLİK ORANI	%.22
RAPORLAMA TARİHİ	19/04/ 2021

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 119 sayfalık kısmına ilişkin, 19/04/2021 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin*.adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 22'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☐Kabul/Onay sayfaları hariç,
☐Kaynakça hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Yalçın ALTUNKAYNAK

(İMZA/TARİH)

Prof. Dr. Ömer YAVUZ **Tez Danışmanı** (İMZA/TARİH)	**Prof. Dr. Sait ERDOĞAN** **Anabilim Dalı Başkanı** (İMZA/TARİH)

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.