T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAPROKSEN'İN VOLTAMETRİ VE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC) TEKNİKLERİ İLE İLAÇ DOZAJ FORMLARINDAN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Suzan YANIK
Kimya Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: **26/06/2014**

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Selehattin YILMAZ

ÇANAKKALE

Suzan YANIK tarafından Prof.Dr. Selehattin YILMAZ yönetiminde hazırlanan ve **26/06/2014** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Naproksen'in Voltametri Ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Teknikleri İle İlaç Dozaj Formlarından Miktarının Belirlenmesi**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Selehattin YILMAZ ……
Başkan

Doç.Dr. Osman DAYAN ……
Üye

Doç.Dr. Murat SADIKOĞLU ……
Üye

Sıra No:……

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Suzan YANIK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunu planlayan ve tez çalışmalarım sırasında her türlü desteğini gördüğüm değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Selehattin YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Kromotografik analizler için laboratuar ve cihaz imkanlarını sağlayan, Kimya Bölümü, Fizikokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve Nanobilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi müdürü Doç. Dr. Nurettin ŞAHİNER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda bana vakit ayıran, yardım eden beni yalnız bırakmayan, tecrübelerinde yararlandığım Araş. Gör. Dr. Gülşen SAĞLIKOĞLU ve Araş. Gör. Dr. Sultan YAĞMUR 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince benden yardım ve desteklerini esirgemeyen arkadaşım Şahin DEMİRCİ'ye sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştiren değerli annem Ulviye YANIK ve her zaman yanımda olan dostlarıma teşekkür ederim.

Suzan YANIK

Çanakkale, Haziran 2014

SİMGELER VE KISALTMALAR

$E_{1/2}$	Yarı Dalga Potansiyeli
E_p	Pik Potansiyeli
i_p	Pik Akımı
i_ℓ	Sınır (Limit) Akım
GCE	Camsı Karbon Elektrot
LOD	Belirme Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Kantitatif Tayin Sınırı (Limit of Quantitation)
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
R	Korelasyon Katsayısı
RSD	Bağıl Standart Sapma
$\upsilon^{1/2}$	Tarama Hızının Karekökü
n	Voltametrik Hücrede Tekrarlanan Ölçüm Sayısı
NPV	Normal Puls Voltametrisi
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
SWV	Kare Dalga Voltametrisi
CV	Dönüşümlü Voltametri
SV	Sıyırma Voltametrisi
ASV	Anodik Sıyırma Voltametrisi
CSV	Katodik Sıyırma Voltametrisi
AdSV	Adsorptif Sıyırma Voltametrisi
PSV	Potansiyometrik Sıyırma Voltametrisi
UTGE	Ultra Trace Grafit Elektrot
NAP	Naproksen

ÖZET

NAPROKSEN'İN VOLTAMETRİ VE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFiSi (HPLC) TEKNiKLERi iLE iLAÇ DOZAJ FORMLARINDAN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Suzan YANIK
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Selehattin YILMAZ
26/06/2014, 61

Bu çalışmada, naproksen adlı ilaç etken maddenin elektrokimyasal yükseltgenme özelliğinden yararlanılarak ultra trace grafit elektrotta (UTGE) ticari formundan miktarı belirlendi. Optimum şartları belirlemek için farklı destek elektrolitlerde diferansiyel puls voltametrisi ve dönüşümlü voltametri ile yükseltgenme özelliği incelendi. Naproksen için ultra trace grafit elektrotta keskin pikin ve maksimum akımın gözlendiği pH=4.50 asetat çözeltisi destek elektrolit olarak seçildi. Pik akımına ve pik potansiyeline pH' ın etkisi diferansiyel puls voltametri tekniği (DPV) ile tarama hızının pik akımına etkisi ise dönüşümlü voltametri tekniği (CV) ile belirlendi. Belirme sınırı (LOD), kantitatif tayin sınırı (LOQ) ve konsantrasyon aralığı gibi analitik analiz parametreleri belirlendikten sonra, ilaç tabletlerindeki naproksen'in miktarı belirlendi. Uygulanan voltametrik yöntemin doğruluk ve kesinliğini kontrol etmek amacı ile ilaç tabletinden naproksen'in geri kazanım çalışmaları yapıldı. Ayrıca naproksen'in yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle doğruluk, kesinlik ve geri kazanım çalışmaları yapılarak bu iki teknik istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Anahtar sözcükler: Naproksen, Voltametrik Yöntem, Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV), Dönüşümlü Voltametri (CV), Ultra Trace Grafit Elektrot (UTGE), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Ticari İlaç Tabletleri, Naproksen (NAP).

ABSTRACT

QUANTITATIVE DETERMINATION OF NAPROXEN FROM DRUG DOSAGE FORMS BY VOLTAMMETRY AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) TECHNIQUES

Suzan YANIK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Chair for Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Selehattin YILMAZ

26/06/2014, 61

In this study, active compounds named naproxen was determined from commercial drug form based on electrochemical oxidation properties at ultra trace graphite electrode (UTGE). In different supporting electrolyte, reduction was examined by differantial pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV) to determine the optimum conditions. Ultra trace graphite electrode, using pH=4.50 asetate solution in which sharp peak and maxium current was observed, at ultra trace graphite electrode for naproxen, was selected as supporting electrolyte. The effects of pH on the peak current and peak potential for material was investigated by differential pulse voltammetry (DPV) and the effect of scan rate on the peak current was investigated by cyclic voltammetry (CV) techniques. After analytical parameters, such as; limit of quantitation (LOQ), limit of detection (LOD) and range of concentration had been determined, quantitative analysis of naproxen was determined from drug tablets. In order to check accucarcy and precision of applied voltammetric method, recovery experiment of naproxen was carried out from the drug tablet. Also naproxen high performance liquid chromatography (HPLC) method, accuracy, precision, and recovery experiment had been done. These two techniques were compared statistically.

Keywords: Naproxen, Voltammetric Method, Differential Pulse Voltammetry (DPV), Cyclic Voltammetry (CV), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ultra Trace Graphite Electrode (UTGE), Commercial Drug Tablets, Naproxen (NAP).

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAV SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xi
BÖLÜM 1 – GİRİŞ 1
1.1. Elektroanalitik Yöntemler 2
1.2. Voltametri 4
1.3. Voltametrinin Çalışma Prensibi 6
1.4. Voltametrik Hücrenin Bileşenleri 6
1.4.1. Voltametrik kap 6
1.4.2. Destek elektrolit 7
1.4.3. Çalışma (İndikatör) elektrot 7
1.4.3.1. Civa kökenli elektrotlar 9
1.4.3.1.1. Damlayan civa elektrot (DCE) 10
1.4.3.1.2. Asılı civa damla elektrot 10
1.4.3.1.3. Civa film (zar) elektrotlar 10
1.4.3.2. Katı elektrotlar 11
1.4.3.2.1. Platin elektrot 12
1.4.3.2.2. Altın elektrot 12
1.4.3.2.3. Bizmut elektrot 12
1.4.3.2.4. Karbon elektrotlar 12
1.4.3.2.4.1. Elmas elektrot 13
1.4.3.2.4.2. Grafit elektrot 13
1.4.3.2.4.3. Karbon pasta elektrot 13
1.4.3.2.4.4. Camsı karbon elektrot 14
1.4.3.2.4.5. Empreyene karbon elektrotlar 14
1.4.3.2.4.6. Pirolitik grafit elektrot 14
1.4.3.2.4.7. Mikro karbon (lif) elektrotlar 14

1.4.3.3. Dönen disk ve halka disk elektrotlar 14
1.4.3.4. Modifiye elektrotlar 15
1.4.3.4.1. Elektrot yüzeylerinin modifikasyonunda kullanılan metodlar 16
1.4.3.4.2. Kompozit elektrotlar 18
1.4.3.4.3. Kimyasal modifiye elektrotlar 18
1.4.4. Karşılaştırma (referans) elektrodu 19
1.4.5. Yardımcı (karşıt) elektrot 20
1.5. Voltametrik Teknikler 21
1.5.1. Polarografi 21
1.5.2. Puls voltametrisi 22
1.5.2.1. Normal puls voltametrisi (NPV) 22
1.5.2.2. Diferansiyel puls voltametrisi (DPV) 23
1.5.2.3. Kare dalga voltametrisi (SWV) 23
1.5.3. Dönüşümlü voltametri (CV) 23
1.5.4. Sıyırma voltametrisi (SV) 24
1.5.4.1. Anodik sıyırma voltametrisi (ASV) 24
1.5.4.2. Katodik sıyırma voltametrisi (CSV) 24
1.5.4.3. Adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV) 24
1.5.4.4. Potansiyometrik sıyırma voltametrisi (PSV) 24
1.6. Kromatografi 25
1.6.1. Adsorbsiyon kromatografisi 27
1.6.2. Dağılma kromatografisi 27
1.6.3. İyon çifti kromatografisi 28
1.6.4. İyon değiştirme kromatografisi 29
1.6.5. Eleme kromatografisi 29
1.6.6. Afinite kromatografisi 30
1.7. Kromatografide Temel Parametreler 30
1.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) 33
1.8.1. HPLC cihazı bölümleri 34
1.8.2. UV/GB dedektör 36
1.9. Voltametrik ve Kromatografik Validayonda Kullanılan İstatistiksel Terimler 37
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 40
2.1. Naproksen'in voltametrik teknikler ile ilaçlardan tayini 40

2.2. Naproksen'in HPLC metoduyla yapılmış çalışmaları 40
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM 42
3.1. Materyal 42
3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler 42
3.1.2. Kullanılan cihazlar 42
3.2. Yöntem 42
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 44
4.1. Naproksen'in Ultra Trace Grafit Elektrotta Çalışma Ortamının Belirlenmesi 44
4.2. Akım Türünün Belirlenmesi 46
4.3. Analitik (Çalışma) Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi 48
4.4. Naproksen'in Ultra Trace Grafit Elektrotta İlaç Formundan Miktarının Belirlenmesi ve Geri Kazanımı 52
4.5. Naproksen'in HPLC Metoduyla İlaç Formundan Miktarının Belirlenmesi 53
4.6. Voltametri ve HPLC teknikleri ile elde edilen analiz sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması 54
BÖLÜM 5 – SONUÇLAR VE ÖNERİLER 57
KAYNAKLAR 58
ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Naproksen'in kimyasal yapısı 1
Şekil 1.2. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması 4
Şekil 1.3. Deney hücresi 6
Şekil 1.4. Çalışma ve referans elektrotlarına örnekler 8
Şekil 1.5. Camsı karbon çalışma elektrodu 8
Şekil 1.6. Voltametrik çalışma elektrotlarının genel bir sınıflandırılması 9
Şekil 1.7. Elektrot yüzeylerinin modifikasyonunda kullanılan teknikler 16
Şekil 1.8. Karşılaştırma elektrotu 20
Şekil 1.9. Yardımcı elektrot 20
Şekil 1.10. Voltametrik tekniklerin sınıflandırılması 21
Şekil 1.11. Polarografide akım potansiyel grafiği 22
Şekil 1.12. Elüsyon kromatografi ile bileşenlerin ayrılma diyagramı 26
Şekil 1.13. HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi 34
Şekil 4.1. $5x10^{-5}$ M naproksen'in pik akımına pH etkisi. 45
Şekil 4.2. $5x10^{-5}$ M naproksen'in pik potansiyeline pH etkisi. 45
Şekil 4.3. $5x10^{-5}$ M naproksen'in 10-1000 mVs^{-1} tarama hızı aralığındaki CV ile voltamogramı 46
Şekil 4.4. $5x10^{-5}$ M naproksen'in pH=4.50 asetat tamponunda pik akımı-karekök tarama hızı ($\upsilon^{1/2}$-i_p) grafiği. 47
Şekil 4.5. $5x10^{-5}$ M naproksen'in pH= 4.50 asetat tamponunda yükseltgenme pik akımının logaritması- tarama hızının logaritması (log υ-log $i_{p)}$ değişimi 48
Şekil 4.6. DPV tekniği ile naproksen'in konsantrasyon-pik akımı değişimi 49
Şekil 4.7. Naproksen'in fosfat (pH=4.50) tamponundaki pik akımı-konsantrasyon (C-$i_{p)}$ grafiği 50
Şekil 4.8. Naproksen'in HPLC metoduyla elde eldilen kromatogramı 53
Şekil 4.9. DAD dedektörle elde edilen NAP standardına ait kalibrasyon doğrusu 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

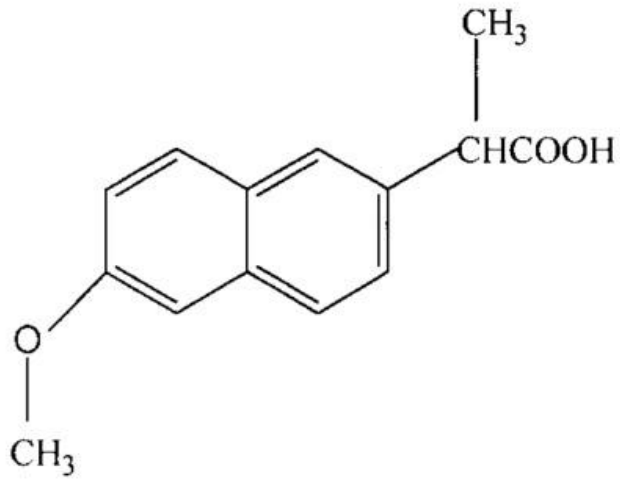
Sayfa No

Çizelge 1.1. Naproksen'in fiziksel ve kimyasal özellikleri 2
Çizelge 1.2. İletken polimer elde edilmesinde kullanılan elektrokimyasal teknikler 18
Çizelge 4.1. $5x10^{-5}$ M naproksen'in farklı destek elektrolitlerdeki akım ve potansiyeline pH etkisi.. 44
Çizelge 4.2. 5×10^{-5} M naproksen'in fosfat tamponunda tarama hızı ile akım ve potansiyel değişimi 48
Çizelge 4.3. Ultra trace grafit elektrotta elde edilen pik akımı değerleri..... 49
Çizelge 4.4. Naproksen'in pH=4.50 asetat tamponunda DPV yöntemi kullanılarak elde edilen analitik tayin parametreleri 51
Çizelge 4.5. Naprosyn tabletlerinde belirlenen naproksen miktarı ve naproksen'in geri kazanımı 52
Çizelge 4.6. Uygulanan HPLC ve voltametri tekniklerinin bazı parametrelerinin karşılaştırılması..... 55

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Naproksen, 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) (NAP), orta ve şiddetli ağrıların giderilmesinde sıklıkla kullanılan non-steroidal anti-inflamatuar bir ilaçtır. Böbrek taşları romatoid artrid ve diğer inflamatuvar hastalıklar gibi koşulların sebep olduğu sertliğin azaltılması içinde yaygın kullanılır (Martin ve ark., 1999). Her ne kadar diğer non-steroidal anti-inflamatuarlara oranla daha büyük bir dozaja ihtiyaç duyulsa da naproksen, albumine kuvvetlice bağlanır ve böylece diğer ilaçlara oranla kanda daha uzun bir yarılanma süresine sahiptir. Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar artan sayıda kardiyovasküler olaylarla ilişkilendirilmiştir. Ancak, son dönemdeki araştırmalar naproksenin kardiyovasküler şartlarda en az zararlı non-steroidal anti-inflamtuar olarak sınıflandırmıştır (Kaynak ve ark., 2008; Suryanarayanan ve ark., 2005).

Naproksen ilk kez 1976'da, reçete ilacı olarak ***Naprosyn*** adıyla satılmaya başlanmıştır. Naproksen sodyum ise ilk kez 1980'de **Anaprox** ismiyle satılmaya başlanmıştır. ABD'deki FDA - Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration) 1991 yılında ilacın reçetesiz olarak da satılmasını onaylasa da, Kanada dahil dünyanın diğer birçok ülkesinde ilaç halen reçete ile satılmaktadır (Suryanarayanan ve ark., 2005).

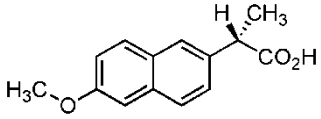


Naproxen

Şekil 1.1. Naproksen'in kimyasal yapısı (Anonim, 2014)

Bu çalışmanın amacı, NAP'ın ultra trace grafit elektrot kullanarak elektrokimyasal özelliklerini araştırmak ve ilaç dozaj formlarından miktarını voltametri ve yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) teknikleri ile hızlı, hassas ve doğru bir biçimde belirlemektir.

Çizelge 1.1. Naproksen'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

NAPROKSEN	
İlaç sınıfı	Antienflamatuar ve Antipiretik
CAS numarası	22204-53-1
Kimyasal ismi (IUPAC)	(+)-(*S*)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) propanoic acid
Kimyasal formülü	$C_{14}H_{14}O_3$
Yapısal formulü	
Moleküler ağırlığı (g/mol)	230.259
UV spektrumu dalga boyu (nm)	240-280 (262)
Erime noktası ($^{\circ}$C)	153
Buhar basıncı (mmHg)	-
Henry yasası sabiti (atm-m^3/mol)	$3.39x10^{-10}$
pKa	4.2
Plazma yarılanma ömrü (sa)	12-15
Çözünürlüğü	Etanol, aseton gibi organik çözücülerde kolay çözünür. Suda çözünmez.
Fiziksel görünümü	Beyaz kristalize toz
Kokusu	Kokusuz

1.1. Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik Kimya, çözeltilerin elektrokimyasal bir hücre içinde elektriksel özelliklerinin ölçülmesi ve bu ölçülen özelliklerinden yararlanılarak maddelerin kalitatif ve kantitatif analizine dayanan teknikleri içeren Analitik Kimyanın önemli bir dalıdır. Bir

başka deyişle ise maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesi sonucu oluşan kimyasal ve fiziksel değişimler ile kimyasal enerjinin elektrik enerjisine dönüştürülmesini inceleyen bilim dalıdır (Yılmaz, 2012).

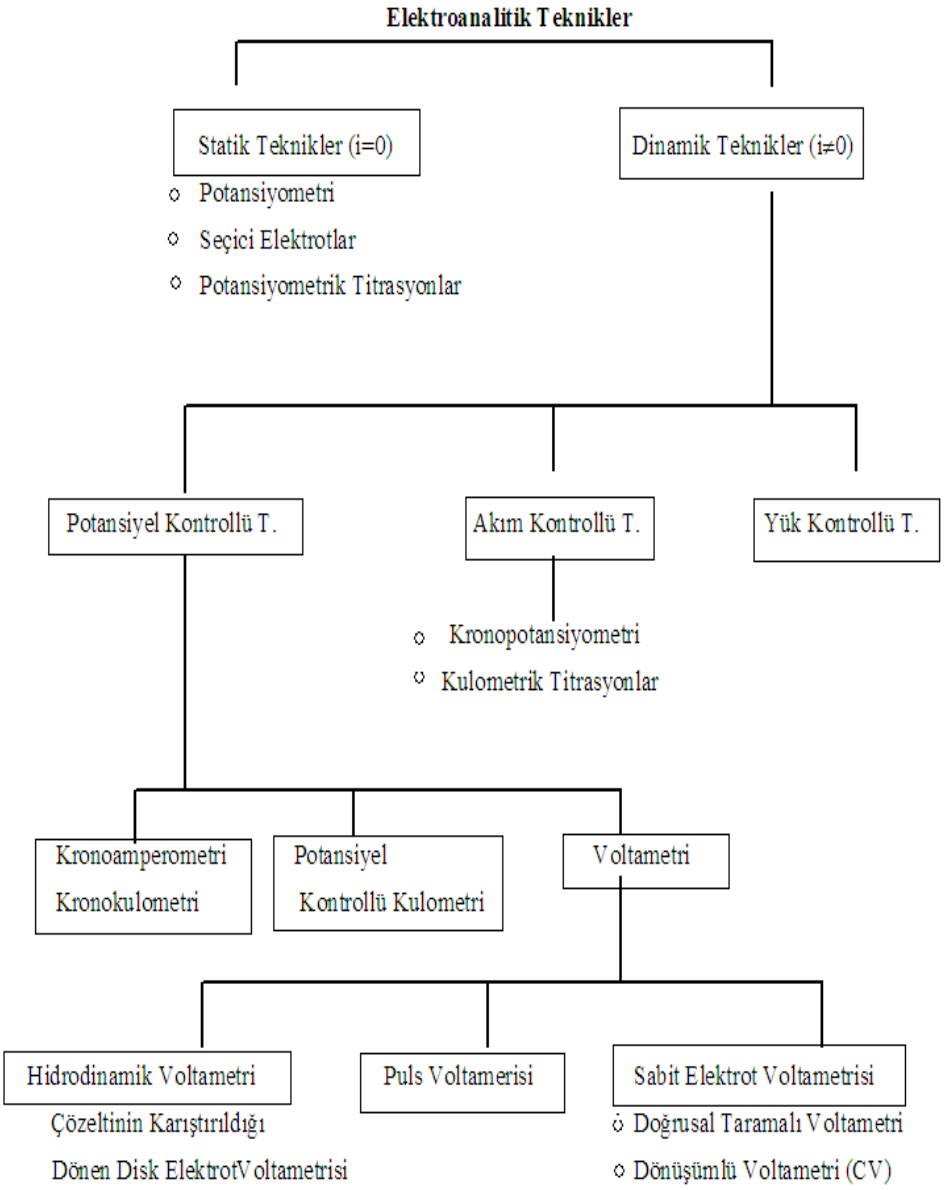
Elektrokimya, çözücülerde homojen ya da elektrot/çözücü ara yüzeyinde heterojen biçimde meydana gelen yük ayrılması ve yük aktarımı ile ilişkili olan olaylarla ilgilenir. Elektrokimyanın temelleri uzun bir geçmişe dayanır ve 200 yıl önce Volta'nın elektrik pilini (1799) keşfi ile başlar. Son yıllardaki ilerlemeler ise oldukça fazladır. Günümüzde, bilim ve teknolojinin yeni alanlarının geliştirilmesinde önemli rol oynar ve küresel enerji ve çevre sorunlarının çözümüne gerekli katkılar yapar (Izutsu 2002).

Elektrokimya, elektriksel ve kimyasal etkilerin birbiri arasındaki ilişkilerinin incelenmesine dayanan bir kimya dalıdır. Elektrokimyanın büyük bir kısmı, bir elektrik akımının geçmesinin sebep olduğu kimyasal değişikliklerin araştırılıp incelenmesiyle ve kimyasal reaksiyonlar sonucu elektrik enerjisinin üretilmesiyle ilgilenir. Aslında elektrokimya, çok sayıda farklı olayların, araçların ve teknolojilerin yer aldığı bir daldır (Bard and Faulkner 2001).

Elektroanalitik teknikler, akım, potansiyel veya yük gibi elektrokimyasal büyüklükleri ölçerek ve ölçülen bu kimyasal parametrelerle aralarındaki ilişkilerini araştırarak elektrik ve kimyanın birbiriyle etkileşimini inceler. Elektriksel ölçümlerin bu tip analitik amaçlı kullanımı, çevresel görüntüleme, endüstriyel kalite kontrol ve biyomedikal analiz olmak üzere çok yaygın bir şekilde uygulama alanı bulmaktadır. Kimyasal ölçümlerin çoğu homojen çözeltilerinde yapılırken, elektrokimyasal çalışmalar ise elektrot-çözelti arayüzeyinde gerçekleştirilmektedir (Wang, 2000).

Elektrokimyasal tekniklerde, elektrot-çözelti sistemine bir elektriksel etki uygulanır ve sistemin verdiği cevap ölçülür. Daha çok akım olarak ortaya çıkan bu cevap, sistemin özellikleri hakkında bilgi verir. Hemen hemen bütün elektrokimyasal tekniklerde potansiyel, akım ve zaman parametreleri bulunur. Bu parametrelere tekniğin adında yer verilir. Örneğin, voltametri, kronoamperometri, kronokulometri gibi adlandırmalarda sırasıyla potansiyel-akım, zaman- akım ve zaman-yük parametrelerinden teknik hakkında kabaca bilgi edinilebilir (Tekin, 2008).

Elektroanalitik tekniklerin çok farklı sınıflandırmaları vardır. En yaygın sınıflandırma biçimi Şekil 2.1'de şema halinde verilmiştir.



Şekil 1.2. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması (Özdemir, 2006)

1.2. Voltametri

Voltametri; yükseltgenebilen ve/veya indirgenebilen elektroaktif (elektrot tepkimesine giren) organik ve inorganik maddelerin çeşitli ortamdaki çözeltilerinden uygun olan koşullarda elde edilen akım şiddeti – potansiyel eğrilerinin (voltamogramların) özelliklerini inceleyip, değerlendiren analiz tekniğine denir. Bir başka deyişle ise voltametri, bir indikator veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlarda, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden yararlanılarak analit hakkında bilgi edinilen birçok elektroanalitik tekniği kapsar (Yılmaz, 2012).

Voltametride, çalışma elektrodunun potansiyeli bir potansiyometre yardımıyla referans elektroda karşı değiştirilerek hücreden (üç elektrotlu sistemlerde çalışma elektrotu ile yardımcı elektrot arasından, iki elektrotlu sistemlerde ise çalışma elektrotu ile referans elektrot arasından) geçen akım galvonometre yardımıyla ölçülür. Ölçülen bu akımın uygulanan potansiyele karşı grafiği çizilir. Bu grafikteki akım potansiyel eğrilerine voltamogram adı verilir (Bond, 1980).

Voltametrinin gelişimi, Çekoslovak kimyacı olan Heyrovski tarafından 1922 yılında bulunarak, geliştirilen ve voltametri yönteminin özel bir tipi olan ‘’polarografi’’ ile başlamıştır. Bu buluş sayesinde Heyrovski 1959 yılında Kimya Nobel ödülünü kazanmıştır. Bununla birlikte elektrokimyasal önderiştirmeye ilişkin kimi fikirler öne sürülmekle birlikte, sıyırma teknikleri olarak adlandırılan duyarlı tekniklerin doğuşu ise 1950’li yıllarda Kemula’nın asılı civa damla elektrodunu (ACDE) geliştirmesi ile başlamıştır. Sıyırma tekniklerinin duyarlılığının iyi olmasının sebebi tayin edilecek maddenin elektrot yüzeyinde küçük bir hacimde önderiştirilmesinden ileri gelmektedir. Bu önderiştirme işlemi, elektroda uygulanan potansiyel altında ve çözelti karıştırılarak yürütülür. Ardından potansiyelin anodik veya katodik yönde taranarak yüzeyde deriştirilen maddeye ilişkin akım potansiyel eğrileri incelenerek analiz gerçekleştirilir. 1970’li yıllarda diferansiyel puls yönteminde cihazlarda yer almasıyla birlikte daha duyarlı ölçümlere olanak sağlanmıştır. Böylelikle spektroskopik tekniklerde gözlenen atılımla birlikte laboratuarlardan giderek uzaklaştırılan voltametrik cihazlar, duyarlılık ve seçimlilik yönünden büyük artışlar sağlayan değişikliklerle yeniden laboratuarlara geri dönmüştür (Henden ve Diğ., 2001).

İlaç analizlerinde kullanılan kromatografik ve fotometrik yöntemlere alternatif yöntem olarak nitelendirilen modern voltametri bu yöntemlerle yarışmalı olmaktan çok onları tamamlayıcı niteliktedir. Ayrıca uygulanan yöntemin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile birleştirilmesiyle, kompleks karışımların analizinde de başarıyla uygulanması sağlanmıştır (Wang ve Hutchins, 1985).

Bu yöntemlerin diğer analitik tekniklere üstünlüğü ise; az miktarlardaki maddelerin analiz için yeterli olmaları, ucuz olmaları, kolay uygulanabilir olmaları, analitlerin ön saflaştırma işlemlerine fazla ihtiyaç duyulmaması, fazla çözücü gerektirmemeleri ve yöntemin hassas olmasıdır (Zuman ve Brezina, 1962; Kissinger ve Heineman, 1996).

Modern voltametri yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin yanında, adsorpsiyon işlemleri için de son derece pratik bir metot olarak kullanılmaktadır (Skoog, 1996; 2000).

1.3. Voltametrinin Çalışma Prensibi

Voltametri tekniğinin çalışma prensibi; elektrokimyasal hücrede bulunan ve polarize olabilen bir çalışma (indikatör) elektrodu ile karşılaştırma (referans) elektrodu arasında değeri zamanla değiştirilen potansiyel uygulanarak üç elektrotlu hücrelerde çalışma elektrodu ile yardımcı (karşıt) elektrot, iki elektrotlu hücrelere ise çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasındaki akımın ölçülmesine dayanır (Yıldız ve Genç, 1993; Bond, 1980).

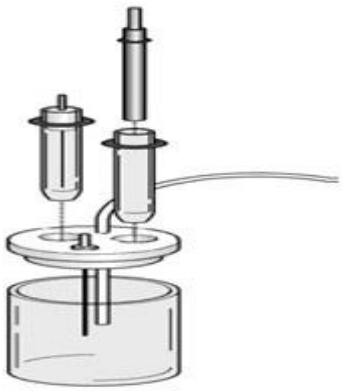
Hücreye uygulanan potansiyel sürekli arttırılarak voltamogram adı verilen potansiyel-akım eğrisi elde edilir. Bu teknikte çalışma elektrodu olarak katı elektrotlar kullanılırsa elde edilecek olan bu eğriye voltamogram, çalışma elektrodu olarak civa elektrodu kullanılırsa elde edilecek bu eğriye polarogram adı verilir (Yılmaz, 2012).

1.4. Voltametrik Hücrenin Bileşenleri

Voltametrik hücrenin bileşenleri; voltametrik kap, destek elektrolit, çözücü, çalışma elektrodu, karşılaştırma (referans) elektrodu ve yardımcı (karşıt) elektrottan oluşur (Yılmaz, 2012).

1.4.1. Voltametrik kap

Voltametrik analizlerde kaplar cam, kuartz veya teflondan oluşur ve bu kaplarda yürütülür. Kabın yapıldığı malzeme ise kirlenme ve adsorpsiyon yanılgılarının en az olduğu maddelerden seçilir (Henden, 2001).



Şekil 1.3. Deney hücresi (Yılmaz, 2012)

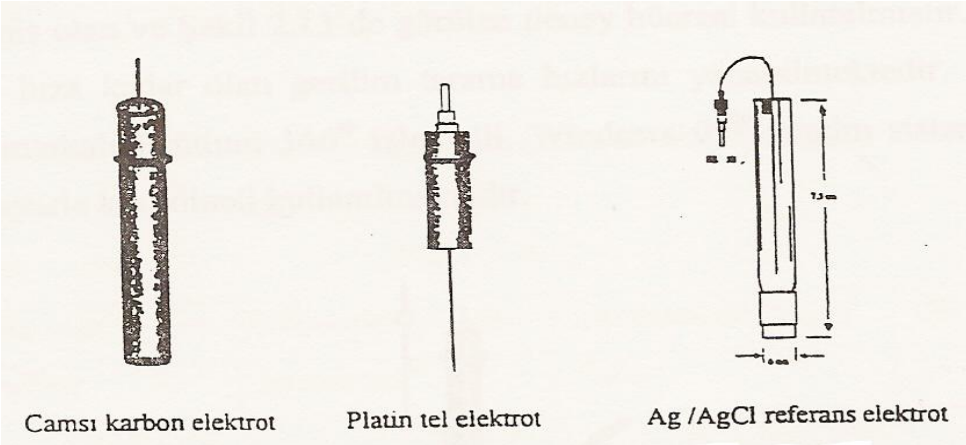
1.4.2. Destek elektrolit

Hücre içindeki çözeltilerde analizi yapılacak maddeden (analitten) başka bir madde daha bulunur. Bu maddeye, destek maddesi veya destek elektroliti denir. Destek elektrolit deney koşullarında elektroaktif olmayan (elektrolizlenmeyen) maddedir. Hidrodinamik voltametride iyonların elektrik çekim etkisiyle elektrotlara göç etmelerini en aza indirmek amacıyla destek elektroliti ilave edilir. Destek elektrolitin konsantrasyonu, analizi yapılan maddenin konsantrasyonunun en az 100 katı olması gerekir. Bu şartlarda analizi yapılanın elektrik etkisiyle elektroda doğru göçü ve bundan dolayı taşıdıkları elektrik miktarı ihmal edilecek seviyeye gelir. Bu da analizi yapılacak iyonun, zıt yüklü elektroda doğru çekiminin veya göçünün elektroda uygulanan potansiyelden artık bağımsız hale geldiğini gösterir (Yılmaz, 2012).

Voltametride destek elektrolit, analit çözeltisine fazla miktarlarda eklenen bir tuzdur. En yaygın olan tuzlar analit analizinde kullanılan potansiyelde mikroelektrotta reaksiyona girmeyen alkali metal tuzlarıdır. Bundan dolayı ortama KCl, KNO_3 gibi bir inorganik tuz, bir mineral asidi veya baz katılabilir. Sitrik asit / sitrat veya asetik asit / asetat gibi tampon sistemleri pH kontrolünü gerektiğinde destek elektrolit olarak kullanılabilir. Destek elektrolitin konsantrasyonu ise genellikle 0.1 M dolayındadır. Bu seviye ise minimum kirlilik ile yüksek iletkenlik arasındaki bir ara değerdir. Çalışmalarda destek elektrolit konsantrasyon aralığı 0.01-1.0 M arasında değişir. Ohmİk düşme değişimlerini engellemek için destek elektrolit konsantrasyonu her örnekte hep aynı şekilde olmalıdır. Destek elektrolit hazırlanmasında kullanılan reaktifler mutlaka çok yüksek saflıkta olmalıdır (Erdoğdu, 1995).

1.4.3. Çalışma (indikatör) elektrodu

Çalışma elektrodu, üzerinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrota denir. Potansiyeli zamanla değişen mikro elektrottur. İndirgenme-yükseltgenme olayı bu elektrotta gerçekleşir (indikatör veya mikro elektrot da denir) (Can, 2013).



Şekil 1.4. Çalışma ve referans elektrotlarına örnekler (Can, 2013)

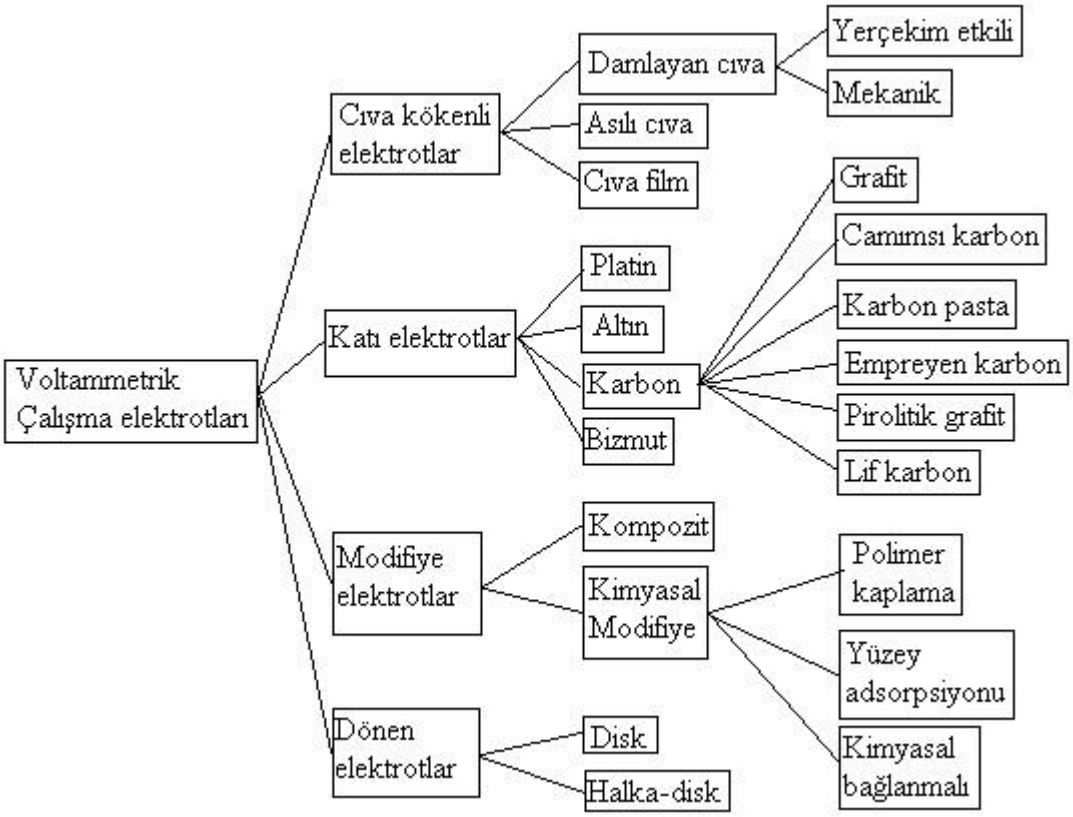
Voltametrik tekniklerde kullanılan çalışma elektrotlarında polarlanmanın olabilmesi için küçük yüzey alanına sahip olmalıdır. Bundan dolayı kullanılacak olan çalışma elektrotları mikro elektrotlardır. Mikro elektrotların kullanılmasından dolayı örnekteki elektroaktif türlerin çok küçük bir miktarı elektrokimyasal tepkimeye girmektedir. Böylece örneğin bileşimi hemen hemen aynı kalmaktadır. Bunun sonucunda ise aynı örneğin defalarca voltamogramı alınabilmektedir (Yılmaz, 2012).

Çalışma elektrotu ile referans elektrot arasında potansiyel uygulanırken buna karşılıkta çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasında ise akım kaydedilir (Türe, 2009).

Genel olarak bir çalışma elektrodu iletken, çalışılan potansiyel aralığında inert, negatif potansiyel sınırı yüksek olmalı, istenilen geometrik şekil kolaylıkla verilebilir ve kolay işlenebilir olmalıdır. Buna camsı karbon çalışma elektrodu örnek olarak verilebilir (Şekil 1.4.).



Şekil 1.5. Camsı karbon çalışma elektrodu (Yılmaz, 2012)



Şekil 1.6. Voltametrik çalışma elektrotlarının genel bir sınıflandırılması (Yılmaz, 2012)

1.4.3.1. Cıva kökenli elektrotlar

Civa elektrotlar, üzerinde hidrojenin çıkış potansiyelinin büyük olması nedeniyle, oldukça geniş bir katodik bölgede çalışma potansiyel aralığına ve her damlada yenilenen elektrot yüzeyine sahiptirler. Metallerle malgama oluşturmasından dolayı, metal iyonlarının metalik halde önderiştirilmesini sağlarlar. Bu özelliklerinden dolayı da voltametride oldukça geniş bir kullanım alanı bulurlar (Yılmaz, 2012).

Voltametri tekniğinde kullanılacak olan civanın çok saf, içindeki safsızlıkların ppm düzeyinden daha düşük olması gerekir (Saf civa ticari olarak temin edilebilir). Ancak bu saflıkta olmayan civa için ise %10'luk nitrik asitle iyice çalkalandıktan sonra saf su ile yıkanıp kurulanır. Daha sonra düşük basınç altında damıtılır. Ancak bu işlemin civa buharlarının zehirli olması nedeniyle, titizlikle yapılması gerekir (Yılmaz, 2012).

Civa mikroelektrotları voltametri tekniğinde birkaç sebepten dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sebeplerden birisi de elektrotlarla kullanılabilecek negatif potansiyel sınırının çok yüksek olmasıdır. Ayrıca kolayca oluşturulabilen yeni bir damla ile taze bir metalik yüzey oluşturulabilir. Buna ek ise pek çok metal iyonu bir civa elektrodunun yüzeyinde amalgam oluşturmak suretiyle tersinir olarak indirgenmektedir ki, olayın

kimyası basittir (Skoog ve diğ., 1996).

Bundan dolayı elektrot yüzeyindeki ürünün çözeltiye geri kazanımı katı elektrotlara oranla civa damla elektrotlarında daha kolay gerçekleşmektedir. Ayrıca civa elektrotlarla çok daha geniş negatif potansiyel aralıklarında çalışmak mümkündür. Konsantrasyonu 1 ppb'den düşük çözeltilerin tayinlerinde civa damla elektrodu, 1 ppb'den daha düşük çözeltilerin tayininde ise civa film elektrodu tercih edilebilir (Riley, T., Watson, A., James, A.M, 1987).

Civa mikroelektrotlar bazı sebeplerden dolayı voltametride yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sebepler;

• Nispeten büyük, negatif potansiyel aralığında çalışma olanağı sağlarlar.

• Oluşan yeni bir damla ile kolayca taze bir metalik yüzey oluşturulabilir. Taze bir yüzey hazırlanabilmesi ise voltametride ölçülen akımların temizliğe ve düzensizliklerin olmamasına duyarlı oldukları için çok büyük önem arz etmektedir.

• Birçok metal iyonunun civa elektrot yüzeyinde indirgenmesi işlemi kimyasal reaksiyonları basitleştirir (Greef ve ark., 1990).

1.4.3.1.1. Damlayan civa elektrot (DCE)

İç çapı 0,03-0,08 mm olan ince bir cam kılcal borunun (kapiler) civa deposuna bağlanması ile oluşturulan bu elektrotlar, bu kılcal borudan civanın damlatılması ise yer çekimin etkisiyle ve mekanik yolla gerçekleştirilebilir ve genelde alanı 2-6 mm^2 olan damlalar oluşturulur (Yılmaz, 2012).

1.4.3.1.2. Asılı civa damla elektrot

Asılı civa damla elektrotları bir civa deposuna bağlı bir kılcal borudan oluşur. Damla bir vida düzeneği yardımıyla kılcal borunun ucunda oluşturulur ve istenilen büyüklükteki civa damlası vidanın belli bir oranda döndürülmesi ile elde edilir. Civa damlasının büyüklüğü ise kılcal boru ucunda oluşan damlanın düşürülüp tartılması ile saptanır (Yılmaz, 2012). Damla analiz boyunca sabit kalır, biriktirme süresi uzadıkça sıyırma piki genişler.

1.4.3.1.3. Civa film (zar) elektrotlar

Civa film (zar) elektrotlar, inert bir destek üzerine, 1-100 μm düzeyinde ince bir civa film kaplanarak oluşturulurlar. İnert destek olarak ise genellikle platin, altın, grafit ve camsı karbon kullanılır. Bu destekler bir tel ya da disk formunda olabilirler. Durağan bir

elektrot olarak kullanılabildikleri gibi ayrıca dönen elektrot olarak da kullanılabilirler (Yılmaz, 2012).

1.4.3.2. Katı elektrotlar

Katı elektrotlar soy metallerden veya karbondan elde edilir (Henden ve Diğ., 2001). Voltametride kullanılan katı elektrotlar; platin, altın, rutenyum gibi inert metaller (Biryol ve ark., 1995; Gerlache ve ark., 1997a; Lu, 2002), pirolitik grafit ve camsı karbon (Özkan ve ark., 1998; Sentürk ve ark., 1998), çinko oksit, iridyum oksit gibi yarı iletken elektrotlardır (McBreen ve Gannon, 1985; Kodintsev ve Trasatti, 1994). Tel, levha, disk şeklinde olan katı elektrotların sabit, döner ya da titreşen tipleri vardır (Biryol ve ark., 1989; Şentürk, Z., 1991; Şentürk ve ark., 2000).

Cıva kökenli elektrotların anodik bölgede çalışma aralığı dardır. Daha pozitif potansiyellerde gerçekleşen yükseltgenme olaylarının incelenmesi gerektiğinde elektrot çalışma penceresinin buna izin vermesi, başka bir ifadeyle elektrot malzemesinin anodik çözünmesinin daha pozitif potansiyellerde olması gerekir. Bu özelliğe sahip olan platin, altın gibi soy metaller ve karbon gibi materyaller elektrot yapımında kullanılır. Bu yöntemle elde edilen katı elektrotlar daha geniş anodik çalışma bölgesi sağlamakla birlikte; kimi sorunlara da neden olur. Deney boyunca elektrot yüzeyine adsorblanmış veya birikmiş safsızlıklardan dolayı katı elektrotlar son derece düzensiz davranış gösterirler. Katı elektrotlarda, cıva elektrotta olduğu gibi elektrot yüzeyinin yenilenmesi özelliği olmadığından tekrar edilebilir sonuçların alınabilmesi için katı elektrotların yüzeyinin her ölçümden önce temizlenmesi gerekir. Ön işlem adı verilen bu işlemler her metal için ise kendine özgü olmaktadır (Wang ve ark., 1985; Fagan ve ark., 1985; Özkan ve ark., 1994).

Voltametride farklı tipte katı elektrotlar kullanılmaktadır. Soy metal elektrotlar, modifiye elektrotlar bunlardan sadece iki tanesidir. Yeni elektrot şekil ve tasarımı amacı ile geliştirilen modifiye elektrotlar, yeni yüzey temizleme yöntemleri, elektroanaliz yöntemleri (puls dalga formları, adsorptif teknikler, sıyırma) sayesinde, farmasötik preparatlardaki ve vücut sıvılarındaki aktif bileşenler, safsızlıklar, ana ürünler ve metabolitler oldukça geniş tayin sınırlarıyla ($\sim 10^{-11}$M) seçicilikte ve hızlı bir şekilde doğrudan analiz edilebilmektedirler (Wang ve ark., Özkan ve ark., 1994).

Voltametri analizinde kullanılan katı elektrotlar; platin elektrot, altın elektrot, bizmut elektrot ve karbon grubu (grafit, camsı karbon, karbon pasta, empreyen karbon, pirolitik grafit ve lif karbon) elektrotlardır.

1.4.3.2.1. Platin elektrot

Platin telden yapılan bu elektrot, voltametride en çok kullanılan elektrotlardan biridir. Platin tel bir cam tübe monte edilmiştir. Eskiden inert olarak dikkate alınmasına karşın; günümüzde, yüzeyinde gaz adsorplaması ve oksit oluşumundan dolayı voltametrik davranışları engelleyebileceği belirtilmektedir. Platin üzerinde oluşan hidrojen aşırı gerilimi pratikçe ihmal edilebilir. Platin elektrotlar, biyolojik örneklerin incelenmesi bakımından da uygundur. Yüksek duyarlılığa sahip olması ve iyi tekrarlanabilirliği nedeniyle dönen platin elektrot amperometrik titrasyonlarda kullanılabilir (Aycan, 1994). Voltametrik yöntemlerde mikro elektrot olarak ya da modifiye edilerek kullanılabilir (Henden ve ark., 2001).

1.4.3.2.2. Altın elektrot

Altın, inert bir metaldir ve voltametride, indikatör elektrot olarak kullanılır. Platin ile karşılaştırıldığında ise hidrojen aşırı geriliminin daha yüksek olduğu görülür. Ayrıca altın önemli miktarda hidrojen adsorplamaz. Böylece bazı katodik prosesleri incelemek amacıyla uygun bir elektrottur (Aycan, 1994).

Altın elektrotlar özellikle civa analizlerinde döner disk veya altın film elektrot şeklinde kullanılır. 1 M $HClO_4$ çözeltisi için altına ilişkin anodik sınır +1,50 V'tur. Ancak pratikte ise bu sınır elektrot yüzeyinde oksit oluşumu nedeniyle +0,80 V olarak bulunmuştur. Klorür varlığında ise bu sınır daha da negatif değerlere kayar (Henden ve ark., 2001).

1.4.3.2.3. Bizmut elektrot

Hidrojenin bizmut üzerinden çıkış aşırı potansiyelinin yüksek olmasından dolayı bizmutun katodik bölgede kullanılma olasılığını ortaya koymuştur. Asetik asit - asetat tamponunda (pH= 4,70) -0,20 ve – 1,20 V potansiyel aralığına sahiptir. Bizmut elektrot uçucu ve zehirli olmaması civaya göre üstünlüğüdür (Tural, 2003).

1.4.3.2.4. Karbon elektrotlar

Karbon elektrotlarla yapılan voltametrik çalışmalarda hem yükseltgenme, hem de indirgenme bölgesinde geniş bir çalışma aralığına imkan tanımaktadır (~ -1,80 V - +1,80 V (sulu ortamda)) (Tunçel ve ark., 1984).

Karbon elektrotlar geniş bir potansiyel aralığında cevap verir. Elektriksel direnci ve artık akım değeri de düşük olmasından dolayı birçok çalışmada yeğlenir (Henden ve ark., 2001).

Karbonun değişik formları, çalışma elektrodu yapımında kullanılır. Bunlar; spektroskopik saflıktaki grafit, karbon pasta, pirolitik grafit (kömürden ısıl yöntemle elde edilen), camsı karbon gibi türlerdir (Aycan, 1994).

Katı elektrotlar grubunda olan karbon elektrotların; geniş gerilim aralığında çalışılmasına olanak sağlamaları, düşük artık akım göstermeleri, zengin yüzey kimyasına sahip olmaları, ucuz olmaları, kimyasal olarak inert olmaları ve dedektör olarak uygulamada yer almaları (elektrokimyasal dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi) nedeniyle elektroanalizde kullanılışı son yıllarda çok büyük bir önem kazanmıştır. Buna karşılık ise karbon yüzeylerde gözlenen elektron aktarım hızları metal elektrotlardan daha yavaştır (Wang, 2000). En popüler olan karbon elektrot materyalleri; camsı karbon, karbon pasta, karbon fiber'dir.

1.4.3.2.4.1. Elmas elektrot

Elmas, elektrik akımını iletmez. Elektrokimyada, metal yüzeylerin temizlenmesinde toz olarak kullanılmasıyla sınırlıdır (Can, 2013).

1.4.3.2.4.2. Grafit elektrot

Elektrokimyasal çalışmalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Grafit doğada doğal olarak oluşur. Doğal olarak bulunan grafit elektrotların kül içeriği (% 5 - % 20) kullanımını sınırlar. Bundan dolayı elektrokimyasal çalışmalarda bu grafiti saflaştırıp kullanmak yerine yapay grafitin kullanımı yeğlenir. Grafit, yumuşak ve gözenekli bir materyal olduğundan yüksek adsorbsiyon kapasitesi vardır (Tural ve ark., 2003).

1.4.3.2.4.3. Karbon pasta elektrot

Karbon pasta elektrotlar ise toz halinde bulunan grafitin nujol gibi bir sıvı ile karıştırılarak hazırlanır. Ayrıca hazırlama sırasında bazı reaktifler eklenerek, modifiye edilebilir ve belli bir türe seçimli hale getirilebilir (Henden ve ark., 2001).

Düşük artık akım verir ve yinelebilirliği iyidir. Elektrodun yüzeyi, pastanın küçük bir kısmının sıyrılmasıyla periyodik olarak yenilenebilir. Bu elektrot ile sulu ortamda iyi sonuç alınmasına karşın, susuz çözücülerde ise pasta dağılıp, bozulabilir (Aycan, 1994).

1.4.3.2.4.4. Camsı karbon elektrot

Camsı karbon, gaz geçirmeyen ve kimyasal etkilere dirençli izotropik bir madde olup elektrik iletkenliği oldukça iyidir. Elektrot, bir cam tüpün ucuna küçük bir camsı karbon çubuğun eklenmesiyle hazırlanır ve yüzeyi alüminyum ile parlatılır (Aycan, 1994).

Gözenek büyüklüğü ise azaltılarak elde edilen camsı karbon elektrotlar da sıyırma tekniklerinde geniş çapta kullanılmaktadır. Sert bir yüzeye sahip oldukları için mekanik yöntemle parlatılabilir ve ayrıca analiz öncesi potansiyel taranarak, koşullama sağlanır. Camsı karbon elektrotlar akışkan sistemlerde ve sıvı kromotografi ile yürütülen amperometrik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Henden ve ark., 2001).

Camsı karbon, mekanik ve elektriksel özelliklerinden dolayı en fazla uygulama alanı olan bir elektrottur. Düşük yükseltgenme hızı ve yüksek kimyasal safsızlığının yanında çok küçük gözenekli olması ve düşük gaz ve sıvı geçirgenliğinden dolayı inert özelliklere sahiptir. Geniş bir gerilim penceresine sahip olup bu elektrotlar, göreceli olarak tekrar edilebilirliği yüksektir (Jenkins ve Kawamura, 1971, Van der Linden ve Dieker, 1986).

1.4.3.2.4.5. Empreyene karbon elektrotlar

Empreyene karbon elektrotlar, grafitin parafin ve uygun reçinelerle karıştırılması ve eritilip homojenleştirildikten sonra ise metalik iletken içeren bir tübe doldurulmasıyla hazırlanır (Can, 2013).

1.4.3.2.4.6. Pirolitik grafit elektrot

Prolitik grafit, karbonun bir başka yapay formudur. 1200 ºC' den yüksek sıcaklıklarda metan gibi bir hidrokarbon içeren maddelerin ısıl işlemle bozundurulması ile elde edilir. Pirolitik grafit elektrodun asitli ortamda doygun kalomel elektroduna karşı çalışma potansiyel aralığı +1,00 V ile -0,80 V' dir (Can, 2013).

1.4.3.2.4.7. Mikro karbon (lif) elektrotlar

Mikro karbon (lif) elektrotlar, yakın zamanda kullanılmaya başlanan elektrotlardır. Daha çok mikroelektrot olarak kullanılıp, çapları 5-10 μm düzeyinde olan lif şeklindeki karbon telciklerdir ve kare dalga voltametrisinde kullanılır (Can, 2013).

1.4.3.3. Dönen disk ve halka disk elektrotlar

Dönen disk ve halka disk elektrotlar genelde platin ve camsı karbondan yapılırlar. Diğer katı elektrotlar ise doğrudan veya civa ile kaplanarak kullanılabilirler. Dönen

elektrotlarla elektrota madde taşınması difüzyonla sağlandığından dolayı durgun elektrotlardan daha büyük akım yoğunluğu sağlarlar (Can, 2013).

1.4.3.4. Modifiye elektrotlar

Voltametride kullanılan elektrotların sınırlı olmasından dolayı elektrotların kimyasal ya da elektrokimyasal özellikleri değiştirilerek çalışma şartları geliştirilmiştir. Modifiye elektrotlar, genel olarak elektrot yüzeyinde önderiştirme sağlayan kimyasallarla işlem veya elektrot yüzeyinin elektron aktarma özelliğini değiştiren işlem (elektrokataliz) yapılarak hazırlanır (Yılmaz, 2012).

Modifiye elektrotların önderiştirme amacıyla kullanımları iki şekilde yürütülebilir;

-Numune (analit) ve destek elektrolitin bulunduğu ortamda biriktirme yapıldıktan sonra yine aynı ortamda voltametrik tayin yapılabilir.

-Numune (analit) ortamında önderiştirme yapıldıktan sonra, elektrot saf su ile yıkanıp, ayrı bir destek elektrolit ortamına aktarılarak da voltametrik tayin yapılabilir (Tural ve ark., 2003).

Modifiye elektrotların özellikleri;

Modifikasyon terim olarak yenilenme anlamına gelmektedir. Voltametride kullanılan elektrotların sınırlı olmasından dolayı elektrotların kimyasal ya da elektrokimyasal nitelikleri değiştirilerek çalışma koşullarının geliştirilmesiyle modifiye elektrotlar hazırlanır (Yılmaz, 2012).

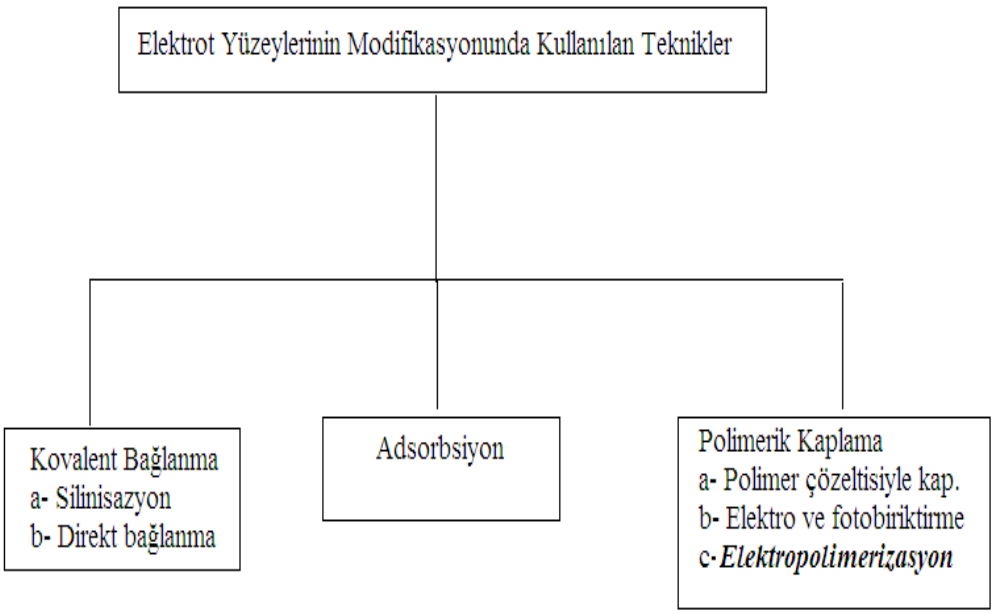
Modifiye edilmemiş katı elektrotların yüzeyleri kararsızdır ve zamanla değişikliğe uğrama olasılığı gibi dezavantajları vardır. Camsı karbon elektrot yüzeyinde oluşması istenen reaksiyon, bir süre sonra yüzeyde meydana gelen oksitlenme ve kirlenme nedeniyle engellenebilir veya farklı mekanizmaya göre yürüyebilir. Bunu önlemek için ise katı elektrotların yüzeyleri modifiye edilir (Yılmaz, 2012).

Genellikle iletken bir substratın modifiye edilmesi işlemiyle modifiye elektrotlar hazırlanır. Böylece modifiye edilmemiş substrattan değişik özellikleri olan istenilen işlevlere uygun elektrotlar elde edilir. Substrat yüzeyleri çok değişik şekillerde modifiye edilerek hazırlanır. Elektrotların hepsi öncelikle elektronik olarak iletken maddeler kullanılarak modifiye edilirler. Karbon, bir metal, bir yarı iletken, bir iletken polimer ya da organometaller substrat madde olarak kullanılabilirler (Yılmaz, 2012).

İyi bir substratın elektriksel iletkenliği yüksek olmalıdır ve korozyona, etkileştiği çözeltiden gelen diğer etkilere karşı iyi bir direnç göstermelidir. Kararlılıkları yüksek olduğundan Pt, Au ve C elektrot metaryali olarak çok kullanılırlar. Kararlılık; çeşitli ortamlarda elektrotlar için oldukça önemlidir. Elektrotlar mekanik bakımdan da kararlı olmalıdır. Kullanım süresince elektrot yüzeyinin değişmemiş olması mekanik ve kimyasal yönden kararlılığını gösterir. Bileşikler substrat yüzeyine kovalent bağlarla bağlanacak ise, substrat bağlanma reaksyonları için elverişli olmalıdır (Yılmaz, 2012).

1.4.3.4.1. Elektrot yüzeylerinin modifikasyonunda uygulanan metotlar

Elektrot yüzeylerinin modifikasyonunda uygulanan teknikler aşağıdaki gibidir.



Şekil 1.7. Elektrot yüzeylerinin modifikasyonunda kullanılan teknikler (Yılmaz, 2012)

Kovalent bağlanma, silinisazyon ve direkt bağlanma diye ikiye ayrılır.

Silinisazyon, tarihte kullanılan ilk yüzey modifikasyon yöntemidir. Yöntem, trialkoksi ya da triklorosilanlar ile tepkimeye girecek olan yüzey hidroksil ya da oksit gruplarının oluşumunu içermektedir. Silinisazyon reaksiyonları için kullanılan elektrot materyallerinin aralığı çok geniştir. Camsı karbon, pirolitik karbon, platin, altın, metal oksitler ve yarı iletkenler kullanılabilir. Bu yönteme bir alternatif yaklaşım elektrot yüzeyinde termal ön işlemler ile karboksilik asit gruplarının oluşturulmasıdır. Böyle reaktif gruplar asit klorürlerine dönüşüm sonrası ya da direkt olarak modifiye elektrotların hazırlanması için yararlı sentetik geçiş yöntemleri sunarlar (Yılmaz, 2012).

Direkt bağlanma ise, çeşitli karbon elektrotlar ve platin elektrot bu teknik ile kaplanabilir. Karbon elektrotların modifikasyonunda en çok başvurulan teknik, bir diazonyum tuzunun aprotik bir çözücü ortamında indirgenmesiyle çözeltide bir aril radikali oluşturulması ve bu radikallerin karbon elektrot yüzeyine kovalent bağlarla bağlanmasıdır. GCE, yüzey modifikasyonuna çok uygun olmasından dolayı bu sahada en çok kullanılan elektrotlar arasındadır. Bununla birlikte elde edilen bir modifiye elektrodun yüzeyine, çeşitli kimyasal reaksiyonlarla çok çeşitli maddeler de tutturulabilir. Böylece çok geniş bir elektrot modifikasyon alanı elde edilir (Yılmaz, 2012).

Adsorpsiyon

Adsorpsiyon birkaç bağlanma şekli ile gerçekleşir. Substratın yapısı türler için hareket etme bakımından çözeltiye göre daha uygun olduğu için pek çok bileşen genellikle çözeltiden substratın yüzeyine adsorbe olur. Örneğin, sülfüriçeren türler; cıva, altın ve diğer metal yüzeylerine kuvvetlice tutunup, yüzeye tutunan türlerin elektrokimyasal olarak yükseltgenme ve indirgenmesi gözlenebilir (Yılmaz, 2012).

Polimerik kaplama

Polimer filmi ile kaplanmış elektrot yapımında ya önceden kimyasal yöntemle sentezlenen polimerler ile kaplama yapılır ya da doğrudan monomer elektrot yüzeyinde polimerleştirilir. Kimyasal yöntemle elde edilen polimerler iki şekilde elektrot yüzeyine kaplanabilir (Yılmaz, 2012).

a)Elektrot yüzeyinde elektrokimyasal çöktürme:

Elektrokimyasal çöktürme tekniğinde polimer çözeltisine daldırılan elektroda uygun bir gerilim uygulanarak yapılan elektroliz ile polimer elektrot yüzeyinde biriktirilir.

b)Daldırıp kurutma ya da damla-döndürerek buharlaştırma (spin kaplama):

Daldırıp kurutma tekniğinde polimerik materyal bir uçucu çözücü de çözülür. Polimer çözeltisi bir mikro pipet yardımıyla bilinen hacimde elektrot yüzeyine aktarılır ve çözücü ondan sonra uzaklaştırılır. Bu havada kurutma ve vakum yoluyla yapılabilir. Eğer düz filmler isteniyorsa çözücü uzaklaştırılması büyük önem taşımaktadır.

Monomerlerin elektrot yüzeyinde doğrudan polimerleştirilmesinde kullanılan üç teknik vardır. Bunlar; a) Elektrokimyasal polimerizasyon, b) Organosilan kondenzasyonu ve c) Plazma polimerizasyonu' dur.

Elektrokimyasal polimerizasyon

Elektrokimyasal polimerizasyon; çözücü, monomer konsantrasyonu, elektrolit çeşidi, sıcaklık, pH, elektrot maddesi ve uygulanan elektriksel koşullar gibi birçok deneysel değişken içerir. Polimer, potansiyostatik, galvonostatik veya döngülü potansiyel taraması ile biriktirilebilir. Uygulanan elektriksel koşullar ve deneysel değişkenler filmin yapısını,

niteliklerini ve polimer üretme hızını etkilemektedir. İletken polimer elde edilmesinde kullanılan elektrokimyasal yöntemler Çizelge 1.2'de verilmiştir (Yılmaz, 2012).

Çizelge 1.2. İletken polimer elde edilmesinde kullanılan elektrokimyasal teknikler

Uygulanan Teknik	**Kontrollü değişken**	**Ölçülen değerler**	**Diğer parametreler**	**Sağlanan bilgiler**
Voltametri	Potansiyel, E	Akım, i	Çözelti bileşimi	Redoks potansiyeli, yük
Potansiyometri	-	Potansiyel, E	Çözelti bileşimi	Redoks potansiyeli, iyon değişim
Kulometri	Potansiyel, E	Yük, Q	Çözelti bileşimi	Elektron stokiyometrisi
AC empedans spektroskopi	Potansiyel, E	Akım, i veya Empedans, Z	Çözelti Bileşimi frekans	Yük transferi ve iyon taşıma kinetiği

Elektrokimyasal biriktirme potansiyeli her bir elektropolimerizasyon için özgüdür. Polimerler direkt olarak yükseltgenmiş iletken şeklinde, elektrodun yüzeyinde birikir. Bu tür modifikasyona örnek ise camsı karbon elektrodun p-aminobenzen sülfonik asitle (p-ABSA) modifikasyonu verilebilir (Yılmaz, 2012).

1.4.3.4.2. Kompozit elektrotlar

Modifiye edici kimyasal madde doğrudan iletken elektrot malzemesine katılıp, karıştırılarak elektrot hazırlanabilir ve bu tür elektrotlara kompozit elektrotlar adı verilir (Can, 2013).

1.4.3.4.3. Kimyasal modifiye elektrotlar

Modifiye edici kimyasal madde elektrot yüzeyine kimyasal bağla veya kimyasal adsorpsiyonla bağlanarak hazırlanabilir. Ayrıca modifiye edici uygun bir monomer elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyona uğratılarak ya da elektrot yüzeyinde doğrudan polimer film oluşturularakta yine bu tür elektrotlar hazırlanabilir (Can, 2013).

1.4.4. Karşılaştırma (referans) elektrodu

Voltametride karşılaştırma (referans) elektrot olarak ikinci sınıftan metal-metal iyonu elektrotları kullanılır. Bu elektrotlar küçük akım şiddetlerinde polarlanmazlar. Akım şiddeti artınca ideal konumlarından saparlar. Ençok kullanılanlar kalomel ve Ag/AgCl elektrotlardır. Bu elektrotlardan anodik akım geçtiğinde metaller yükseltgenir ve ortamdaki aşırı klorürle çökeldiklerinden, elektrot yüzeyindeki derişimleri değişmez ve böylece potansiyelleri akımdan bağımsız olur. Bu elektrotlardan katodik akım geçtiğinde ise, çözünürlükten gelen metal iyonları inirgenir, elektrot yüzeyinde çökelek ayrışarak tekrar aynı denge düzeyinde metal iyonu oluşturur, böylece potansiyel yine değişmeden kalır (Kandaz ve ark., 2011).

Elektroanalitik kimyada karşıt elektrot çalışma elektrodu ile bir çift oluşturan fakat ölçülen potansiyelin büyüklüğünün belirlenmesinde rol oynamayan bir elektrottur (Skoog ve ark., 1996).

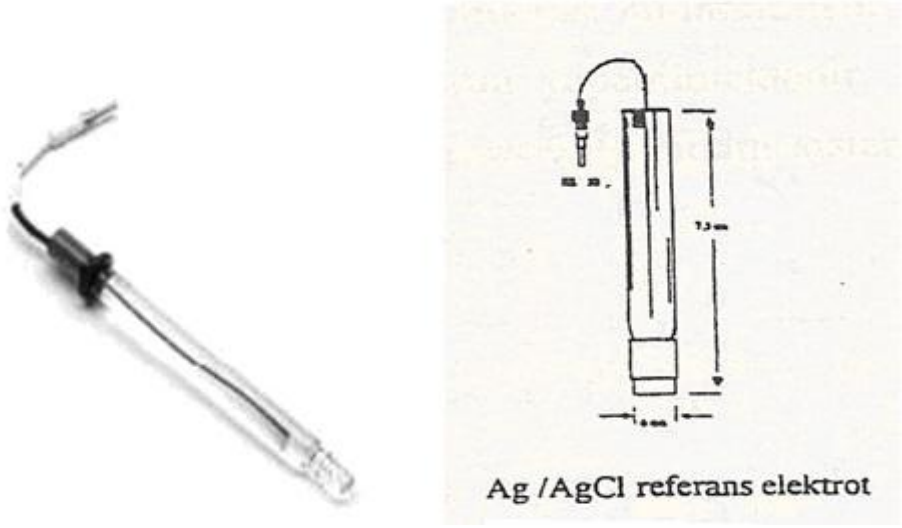
Karşılaştırma elektrotları, bilinen ve sabit bir potansiyel değeri sağlayan ve incelenen çözeltinin bileşiminden etkilenmeyen elektrotlardır. Karşılaştırma elektrodunun bileşimi değişmez ve analiz süresince polarlanmadan kalır. Bundan dolayı Ag/AgCl veya dolgun kalomel elektrot (DKE) kullanılır (Henden ve ark., 2001).

Bu elektrotlardan anodik akım geçince metaller yükseltgenir ve ortamdaki aşırı klorürle çökeldiklerinden, elektrot yüzeyindeki derişimleri değişmez ayrıca potansiyelleri akımdan bağımsız olur. Katodik akım geçtiğinde ise, çözünürlükten gelen metal iyonları indirgenir, elektrot yüzeyinde çökelek ayrışarak metal iyonu oluşturur ve potansiyel yine değişmeden kalır (Kandaz ve ark., 2011).

Sudan başka çözücülerde çalışıldığında ise başka uygun karşılaştırma elektrotları kullanılır. Örneğin asetonitrilde çalışmalarında Ag/ Ag^+ (Ag/ $AgNO_3$) elektrodu kullanılır (Tural ve ark., 2001).

İyi bir referans elektrot;

- Tersinir (reversibl) olmalı ve Nerst eşitliğine uymalıdır,
- Zamanla bağımlı olmayan sabit bir potansiyel vermelidir.
- Az miktarlarda akım elde edildikten sonra yine eski haline kısa sürede dönmelidir,
- Sıcaklık değişmelerinde önemli bir değişiklik göstermemelidir (Yılmaz, 2012).



Şekil 1.8. Karşılaştırma elektrotu (Yılmaz, 2012)

1.4.5.Yardımcı (karşıt) elektrot

Çalışma elektrodunun potansiyelini kontrol eden hücre direncinden gelebilecek yanılgıları ise en aza indirmek için üçüncü bir elektrot kullanılır. Yardımcı elektrot kimyasal açıdan inert ve iletken maddelerden belli bir yüzey alanına sahip olacak şekilde yapılır. Platin ve grafit çubuklar ise en çok kullanılan türleridir (Henden ve ark., 2001).



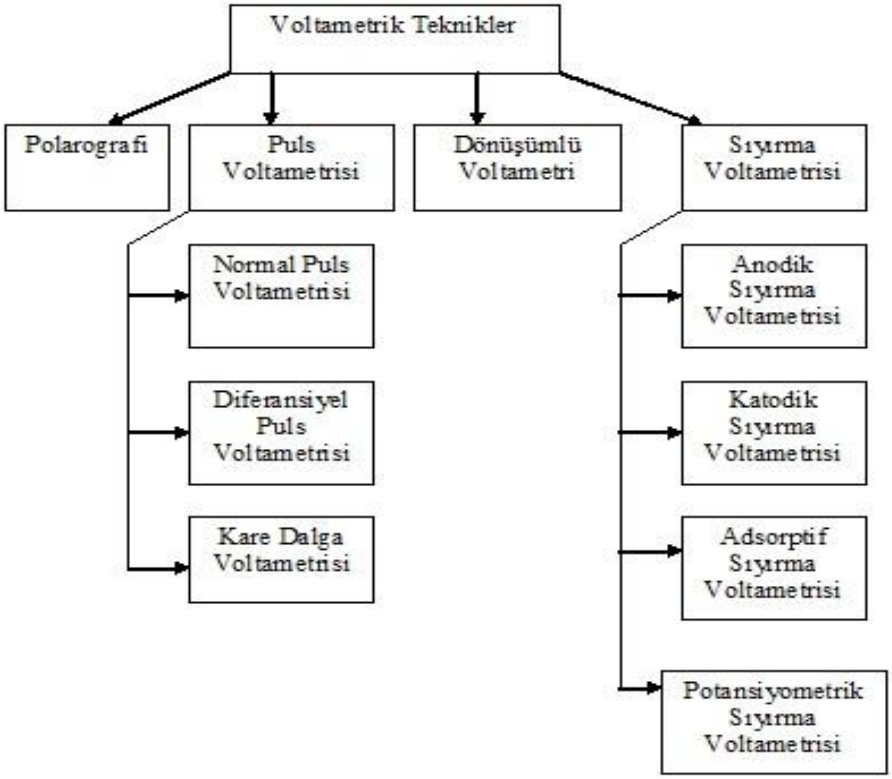
Şekil 1.9. Yardımcı elektrot (Yılmaz, 2012)

İki elektrotlu sistemlerdeki polarlanmayan elektrot, üzerinden akım geçtiğinden dolayı yüksek akımlarda polarlanır. Çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli görülen potansiyel (IR) önemli bir düzeye çıkar. Bu iki nedenden dolayı çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyeli yanılgılı algılanır, bunun sonucu olarak i = f (E) eğrileri yatıklaşırlar ve belirli bir noktadan pikler kaybolur. Bu sorun ise sistemde üçüncü bir elektrot kullanılarak çözümlenir. Akım, çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot

ikilisinden geçirilir ve çalışma elektrodunun potansiyeli karşılaştırma elektroduna karşı sıfır akım altında düzeyde saptanır. Akım yardımcı elektrot üzerinden geçtiği için bu elektrotların soy metal olmaları gerekir. Bundan dolayı daha çok platin, grafit, tantal ya da tungsten tel çubuklar kullanılır. Yardımcı elektrotların alanı çalışma elektrodu alanının en az 50 katı olmalıdır. Ayrıca küçük hacimlerle çalışıldığında ise yardımcı elektrotta oluşan ürünlerin, çalışma elektrodunda girişim yapmayacağı elektrot türü seçilmelidir (Tural ve ark., 2001; Yağmur, 2005).

1.5. Voltametrik Teknikler

Voltametrik tekniklerin şematik sınıflandırılması Şekil 1.10' da verilmiştir.



Şekil 1.10. Voltametrik tekniklerin sınıflandırılması (Yılmaz, 2012)

1.5.1. Polarografi

Voltametri tekniğinde çalışma elektrodu olarak damlayan cıva elektrodun kullanıldığında (DCE) yönteme polarografi denir. DCE, 0,05 - 0,08 mm iç çaplı bir kılcal cam borudan damlayan civadan oluşur.

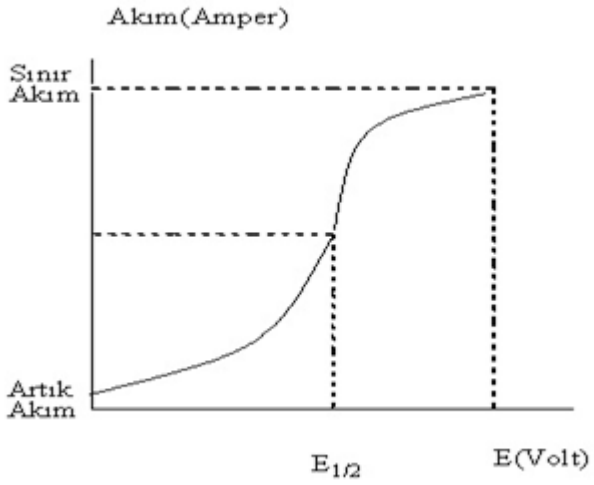
Damlayan cıva elektrot ile referans elektrot arasına bir potansiyometri yardımıyla

potansiyel uygulanır. Hücreden geçen akım bir galvanometre yardımıyla ölçülür. Ölçülen bu akımın uygulanan potansiyele karşı grafiği polarogram adını alır (Yılmaz, 2012).

Polarografide akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi (katodik akım +) veya yükseltgenmesi (anodik akım, -) sonucunda oluşur (Yılmaz, 2012).

Şekil 1.11' deki polarogramdan görüldüğü gibi belli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı bir plato bölgesine ulaşılmaktadır ve bu akıma sınır akımı (i_l) adı verilir. Elektrot üzerinde henüz reaksiyon olmadığı zaman küçükte olsa bir akım gözlenir. Bu akıma artık akım denir. Sınır akımı ile artık akım arasındaki yükseklik dalga yüksekliğidir. Dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar. Bu özellik nedeniyle polarografi, kantitatif analizlerde kullanılabilmektedir (Yılmaz, 2012).

Akımın, sınır akımı değerinin yarısına eşit olduğu potansiyel yarı dalga potansiyelidir ve yarı dalga potansiyeli $E_{1/2}$ ile gösterilmektedir. $E_{1/2}$ değeri genellikle elektroaktif maddenin konsantrasyonuna bağlı değildir ve standart yarı hücre potansiyeli ile yakından ilişkilidir. Yarı dalga potansiyelinin her madde için karakteristik olması özelliğinden dolayı polarografi kalitatif analizlerde de kullanılabilmektedir (Yılmaz, 2012).



Şekil 1.11. Polarografide akım potansiyel grafiği (Yılmaz, 2012)

1.5.2. Puls voltametrisi

1.5.2.1. Normal puls voltametrisi (NPV)

Normal polarografide bir cıva damlasının oluşma ve kopma süresi içerisinde uygulanan potansiyel değişimi çok düşük olduğundan dolayı (2–3mV) potansiyel sabit kabul edilir. Puls polarografisinde ise damla ömrü sonuna doğru potansiyel pulsları

uygulanır ve oluşan bu akım ölçülür. Puls uygulaması iki farklı şekilde olabilir (Yılmaz, 2012).

Normal puls voltametrisinde (NPV) başlangıç potansiyeli temel alınarak her damla ömrü sonunda artan genlikli pulslar uygulanır. Her puls uygulanmasından sonra ise başlangıç potansiyeline geri dönülür. Bu teknik normal puls voltametrisi (NPV) adını alır (Yılmaz, 2012).

1.5.2.2. Diferansiyel puls voltametrisi (DPV)

Normal puls voltametrisinde pulsun sonunda saptanan akım az da olsa sığasal bileşen içerir. Bu bileşenin ölçülen akımdaki payını daha da azaltmak ve seçimliliği arttırmak için pulsun başında ve sonundaki akımları ölçüp, farklarını alma yoluna gidilmiştir. Bu teknikle çalışan yönteme diferansiyel puls voltametrisi denir (Kandaz ve ark.; 2011)

Bu teknik normal puls tekniğinden daha duyarlı olup, duyarlılığı ise 10^{-7}– 10^{-8}M düzeyindedir. Buna ek olarak seçimliliği de yüksektir. Doğru akım ve normal puls polarografilerinde yan yana analizler için, genelde yarı dalga potansiyelleri arasındaki farkın 120–240 mV olması gerekirken, diferansiyel puls polarografisinde ise bu farkın, alternatif akım polarografisinde olduğu gibi, 30–60 mV kadar olması yeterlidir (Tural ve ark.; 2003).

1.5.2.3. Kare dalga voltametrisi (SWV)

Kare dalga voltametrisi, son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir yöntemdir. Voltamogramın tamamı 10 ms'den daha kısa bir zamanda elde edilir. Damlayan cıva elektrodu ile tarama, bir damla ömrünün son birkaç saniyesi içinde, yükleme akımı hemen hemen sabitken gerçekleştirilir. Kare dalga voltametrisi, asılı civa damla elektrodu ve kromatografik dedektörler ile kullanılmaktadır (Yılmaz, 2012). Bu teknik, 10^{-7} – 10^{-8} M gibi yüksek duyarlığa sahiptir.

1.5.3. Dönüşümlü voltametri (CV)

Normal polarografide potansiyel tarama hızı damla ömrüne göre çok yavaştır. Mesela 5 mV/s tarama hızında damla süresi 1 s ise bir damla ömrü esnasında potansiyeldeki değişme 5 mV kadardır. Tarama hızı bir damla ömrü için 100-200 mV/s civarında tutulursa ve belli bir potansiyelden sonra ilk tarama yönünde tarama yapılırsa bu voltametrik yönteme dönüşümlü voltametri (CV) denir (Yılmaz, 2012).

1.5.4. Sıyırma voltametrisi (SV)

Sıyırma yöntemleri çok seyreltik çözeltilerin (10^{-10} M'a kadar) analizlerinde başvurulan; başlangıç basamağı ortak ve karakteristik olan çok sayıdaki elektroanalitik yöntemi kapsar. Bütün bu işlemlerde ise analit genellikle karıştırılan bir çözeltide önce bir mikroelektrot üzerine biriktirilir. Yeterli biriktirme süresi sonunda karıştırma durdurulur ve birikmiş bu analit daha önceden anlatılan voltmetrik tekniklerden (DPV, SW, CV) biri ile analiz edilir. Analizin bu ilk basamağında analit mikroelektrot yüzeyinden çözülür ve sıyrılır; bu yüzden bunlara sıyırma teknikleri denir (Yılmaz, 2012).

1.5.4.1. Anodik sıyırma voltametrisi (ASV)

Anodik sıyırma voltametrisi (ASV) yönteminde mikroelektrot biriktirme basamağı sırasında bir katot olarak; analitin ilk haline tekrar yükseltgendiği sıyırma basamağında ise anot olarak davranır. Sıyırmanın yapıldığı voltametri yönteme göre adını alır. Örneğin diferansiyel puls tekniğiyle sıyırma yapılırsa uygulanan bu tekniğe diferansiyel puls anodik sıyırma voltametrisi (DPASV) denir (Yılmaz, 2012).

1.5.4.2. Katodik sıyırma voltametrisi (CSV)

Katodik sıyırma voltametrisi (CSV) yönteminde ise; mikroelektrot biriktirme sırasında bir anot gibi; sıyırma sırasında da bir katot gibi davranır. Biriktirme basamağında, analit elektrokimyasal olarak bir önderiştirilme (zenginleştirme) işlemine uğrar, yani mikroelektrot yüzeyindeki analit konsantrasyonu, çözeltideki konsantrasyonundan çok daha büyüktür (Yılmaz, 2012).

1.5.4.3. Adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV)

Adsorptif Sıyırma Voltametrisi (AdSV) ise maddenin çalışma elektrodu üzerine kısa sürede adsorbe edilmesi esasına dayanan bir tekniktir. Voltametrik veri, adsorbe edilen maddenin yüzeydeki konsantrasyonuna doğrudan bağlıdır. AdSV tekniğinde biriktirme işleminde madde herhangi bir kimyasal reaksiyona tabi tutulmaz. AdSV ile tıbbi ve biyolojik önemi olan birçok organik molekülün sulu çözeltilerde cıva yüzeyinde adsorbe olma özelliğinden yararlanarak analizleri yapılabilmektedir (Yılmaz, 2012).

1.5.4.4. Potansiyometrik sıyırma voltametrisi (PSV)

Bu teknik özellikle önderiştirme aşaması anodik sıyırma voltametrisine benzer. Sıyırma aşamasında farklı olarak elektrot yüzeyinde önderiştirilen metallerin çözündürülmesi kimyasal yöntemle sağlanır (Can, 2013).

1.6. Kromatografi

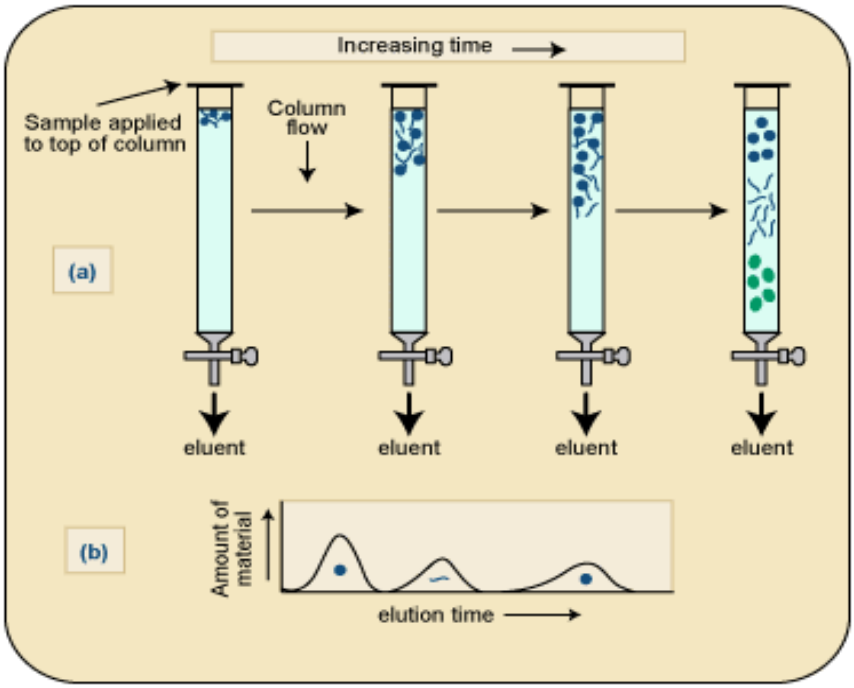
Kromatografi, kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan bir analitik yöntemdir. Kromatografik ayırımda maddeler karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Bir kolon içinde veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza sabit faz, sabit fazın üzerinden veya arasından geçen analiti de içeren faza hareketli faz adı verilir (Adataş, 2011).

Kromatografi, gaz veya sıvı haldeki bir hareketli fazla ilerleyen karışımdaki bileşenlerin, sabit fazdan geçme hızlarına bağlı olarak ayrıldıkları bir tekniktir. Karışımı oluşturan bileşenlerin birbirlerinden ayrılmasıyla nitel ve nicel analizleri mümkün olur.

1892'de Reed tarafından ortaya atılmış olan ilk kuramda, kolon yardımı ile bir karışımın ayrılabileceği söylenmiştir. 1906 yılında Tswett adlı araştırmacı, kolon kromatografisini kullanarak klorofili pigmentlerine ayırmıştır. Adsorban olarak $CaCO_3$'ın kullanıldığı bu ayırım ile ilk kez katı-sıvı kromatografisi kullanılmıstır. Türk asıllı Rus arastırıcı olan Izmailov 1938'de ince tabaka kromatografisini keşfetmiş ve bu yöntem 1950 yılında Stahl tarafından pratikte kullanılış şekli ile tanıtılmıştır. Martin-Synge (1941) kolon dağılma kromatografisi esaslarından bahsetmiş ve sıvı-sıvı kromatografisi ortaya çıkmıştır. Martin-James (1952) gaz-sıvı kromatografisini geliştirmiş ve diğer yöntemlerden farklı olarak hareketli fazda gaz kullanılmış ve bu çalısma Nobel ödülüne layık görülmüştür. Huber ve Hulsman (1967) adlı araştırıcılar kolon teknolojisini geliştirerek yüksek performanslı pompa sistemleri ve duyarlı dedektörlerin kullanılması ile yüksek performanslı sıvı kromatografisinin temellerini ortaya atmışlardır.

Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. Birincisinde, hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettikleri esas alınır. Kolon kromatografisinde, sabit faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz yerçekim veya basınç altında bu sabit fazın arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya madde aktarımını sağlayan yer çekimi etkisiyle hareket eder. Her iki kromatografinin de dayandığı ilkeler aynıdır. Kromatografinin bir diğer sınıflandırılması, kullanılan hareketli fazın tipine göredir; sıvı kromatografi, gaz kromatografi ve süper kritik akışkan kromatografi. Kullanılan hareketli fazlar sırasıyla sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Sadece sıvı kromatografi, hem kolonlarla hem de düzlemsel yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir; gaz kromatografi ve süperkritik akışkan kromatografi yalnız kolonlarda gerçekleştirilebilir. Elüsyon işlemi bir kolondan sürekli taze çözücü geçirerek çözünmüş bileşenin sabit faz boyunca hareket ettirilerek ayrılması ve

kolon sonunda toplanmasıdır. Kolona katılan hareketli faz, numunenin bir bölümünü içeren çözücüyü kolonda ilerlemeye zorlar ve bu arada hareketli fazla sabit fazın yeni bölümleri arasında numune tekrar bölüşülür. Kolona sürekli çözücünün verilmesi, hareketli ve sabit faz arasında sürekli madde aktarımı yaparak, çözünen madde moleküllerini kolonda aşağıya taşır. Fakat çözünen madde hareketi sadece hareketli fazda olduğu için, çözünen maddelerin kolonda göç ettiği ortalama hızı, onun hareketli fazda geçirdiği zaman ile orantılıdır. Sabit fazın kuvvetle tuttuğu maddeler kolondan daha geç elüe olurlar. Hızlarda oluşan bu fark sonucu, karışımdaki bileşenler kolon boyunca bant veya bölgeler şeklinde ayrılırlar. Ayrılan bileşenler kolondan yeterli miktarda hareketli faz geçirilmesiyle izole edilirler (Adataş, 2011).



Şekil 1.12. Elüsyon kromatografi ile bileşenlerin ayrılma diyagramı (Anonim,2014)

Şekil 1.12 (a)'da görüleceği gibi, büyük moleküller sabit faz tarafından A'ya göre daha kuvvetli tutulduğu için göç sırasında geçikmektedir. Kolondan aşağıya hareketleri sırasında aralarındaki uzaklığın arttığı açıkça görülmektedir. Çözünenin herhangi bir özelliğine cevap veren bir dedektör kolonun sonuna konulur ve sinyal zamana (veya eklenen hareketli faz hacmine) karşı grafiğe geçirilirse, bir dizi pik elde edilir (Şekil 1.12 (b)). Böyle bir grafiğe kromatogram adı verilir ve hem nitel hem de nicel analizde kullanılır.

Kromatografik yöntemlerde sabit faz, hareketli faz ve numune arasındaki

etkileşimlere bağlı olarak çeşitli mekanizmalar kullanılır. Bu mekanizmalara dayanarak kromatografi, adsorpsiyon, dağılma, iyon değiştirme, moleküler eleme, iyon çifti ve afinite kromatografisi şeklinde sınıflandırılır (Hamilton ve Sewel, 1982).

1.6.1. Adsorbsiyon kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisinin esası ayrılacak olan molekülleri tersinir olarak adsorplayan bir katı faz ile sıvı veya gaz hareketli faz arasındaki gerçekleşen olaydır. Sabit fazda bulunan tutunma gözenekleri için madde ve hareketli faz molekülleri yarışma halindedir. Silika ve alumina gibi adsorban maddelerin yüzeyleri polar olduğundan, polar moleküller bu yüzeylere ilgi gösterirler ve dipol-dipol, dipol indirgenmiş dipol ve hidrojen bağı gibi etkileşmelerle tutulurlar. Polar maddeleri ayırmak için polar sabit faz, apolar maddeleri ayırmak için apolar sabit faz kullanılır. Bir maddenin tutunma gücü, molekülündeki fonksiyonel grup türüne ve sayısına bağlıdır.

1.6.2. Dağılma kromatografisi

Dağılma kromatagrafisi eylemsiz (inert) bir destek malzemesine tutturulmuş veya destek katıya kimyasal olarak bağlanmış sıvı bir sabit faz ile sıvı hareketli faz arasında maddelerin dağılması esasına dayanır. Ayrılacak maddeler sabit ve hareketli faz arasında dağılma katsayılarına göre dağılırlar. Bu dağılma sonucunda farklı hızlarda göçerler ve ayırma bu teknik sıvı-sıvı ve sıvı-bağlı faz kromatografi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. İki teknik arasındaki fark, katı parçacıklar yüzeyine sabit fazın tutturulmasındaki yöntem farkından kaynaklanır. Sıvı-sıvı tekniğinde sabit faz katı yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla; bağlı faz tekniğinde ise kovalent kimyasal bağlarla tutunur. Bağlı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir. Yüzeye fiziksel olarak tutturulan fonksiyonel gruplar zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklenebilir ve etkisizleştirilebilir. Bağlı faz dolgu maddelerinin sakıncası ise; biraz daha sınırlı numune kapasitesine sahip olmalarıdır (Skoog ve diğerleri, 1999).

Sabit faz ile hareketli fazın polaritelerine göre normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki tip dağılma kromatografisinden söz edilir.

a) Normal Faz Sıvı Kromatografisi: Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha yüksek olduğu durumda sıvı kromatografisi normal faz olarak tanımlanır. Normal faz yüksek performanslı sıvı kromatografide sıklıkla kullanılan kolon dolgu maddeleri silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar, ise daha düşük polariteli hekzan, izo-propil,

metilen klorür, metil bütil eter, kloroform ve bunların karışımları olabilir (Meyer, 1988). Silika üzerine farklı polaritelerdeki CN, -NO_2 ve -NH_2 gibi gruplar bağlanarak farklı sabit fazlar elde edilebilir. Normal faz sıvı kromatografisi ile polarlığı en az olan madde kolondan en önce elüe olur (Skoog ve ark., 1999).

b) Ters Faz Sıvı Kromatografisi: Sabit faz polaritesinin hareketli faz polaritesinden düşük olduğu bu yöntemde polarlığı en çok olan madde kolondan önce elüe olur. Bu yöntem apolar sabit fazda tutunmayı tercih eden maddeleri ayırmada başarılıdır. Alkil zincirlerinin kimyasal olarak bağlanmasıyla oluşturulan sabit fazlardan en sık kullanılanı oktil veya oktadesil silan bağlı dolgu maddeleridir. Bu tür dolgu maddelerinde uzun zincirli hidrokarbon grupları parçacık yüzeyine dik ve birbirine paralel şekilde yerleştirilerek apolar bir yüzey elde edilmiş olur. C_8 veya daha kısa zincirli hidrokarbonlar, siklohekzil ve fenil bağlı sabit fazlar da kullanılmaktadır. Fenil grupları alkil gruplarına göre daha polardır (Meyer, 1988). Hareketli faz ise, metanol, asetonitril veya terahidrofuran gibi çözücüleri içeren sulu çözeltilerdir (Skoog ve ark., 1999).

Ters-faz sıvı ve normal-faz sıvı kromatografisinde madde, polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakın olan maddeler kolonu önce terk eder.

HPLC ile ilaç analizi yapabilmek için yaygın olarak dağılma kromatografisi uygulanır. Bu kromatografi türünde uygun bir analiz yapabilmek için maddenin belli bir çözücüde çözünmüş olması gerekir. Maddenin apolar veya polar olmasına göre maddenin polaritesine yakın bir sabit faz seçilir. Örneği oluşturan bileşenlerin iyi ayrılabilmesi için sabit faz ile hareketli faz polaritesi farklı olmalıdır. ilaç analizlerinde ilaçların genellikle kısmen apolar maddeler olmalarından dolayı ters faz sıvı kromatagrafisi tercih edilir.

1.6.3. İyon çifti kromatografisi

İyon çifti (veya eşleşmiş iyon) kromatografisi, iyonik türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür ters faz dağılma kromatografisidir. Hareketli faz metanol, asetonitril gibi bir organik çözücü içeren sulu tampon ve tayin edilecek bileşik ile zıt yüklü karşıt iyon içeren bir iyonik bileşikten meydana gelmiştir (Skoog ve ark., 1999). Karşıt iyon analitle birleşerek ters faz dolgu maddesi ile alıkonulabilen nötral iyon çifti oluşturan bir iyondur. Karşı iyonlar numune iyonlarının polar olamayan sabit fazda alıkonmasını arttıracak alkil grupları içerirler. İyonize olabilen maddelerin dağılma kromatografisiyle iyi bir ayırımı genellikle sorunludur. Hareketli faz pH'sının denetlenmesiyle sulu ortamda iyonlaşabilen

bu maddelerin ters faz kolonla ayrımı sağlanabilir. Bu işleme iyon bastırma denir ve hareketli faz pH'sı analitin pKa değerine yakın olduğunda pH'da yapılan küçük değişiklikler alıkonma süresinde büyük değişikliklere yol açabilir. İyon bastırma tekniği, analitin kuvvetli asidik ($pKa \leq 3$) ve kuvvetli bazik ($pKa \geq 8$) olduğu koşullarda uygulanır. Ancak aşırı pH değerleri çelik kolonda korozyona, bağlanmış sabit fazın ayrılmasına veya silika destek maddesinin çözülmesine neden olabilir. Böyle durumlarda, hareketli faza, karşı iyon adı verilen maddeler eklenerek ayırım iyileştirebilirler. Hareketli faza eklenen iyon, ya iyon çifti oluşturarak ya da ayrılan madde ile kromatografik etkileşme için yarışarak veya dolgu maddesindeki silanol uçlarının dinamik olarak kapatarak kromatografik ayrımı gerçekleştirebilirler.

İyon çifti oluşumuna etki eden faktörler;

1. Karşı iyon tipi ve ayrılan maddeyle etkileşme derecesi,
2. Karşı iyonun boyutu,
3. Karşı iyon derişimi,
4. Ortamın pH'sı,
5. Hareketli fazdaki organik çözücü tipi ve miktarı,
6. Sıcaklık,
7. Sabit faz yüzeyinin karşı iyonla kaplanma derecesidir.

1.6.4. İyon değiştirme kromatografisi

İyonların (katyon-anyon) yer değiştirmesine dayanan bu kromatografide, sabit fazda bulunan iyonlarla numunedeki aynı yüklü iyonlar yer değiştirir. İyonik halde veya iyonlaşabilen madde ya da pH'ya bağlı olarak iyonlaşabilen moleküllerin ayrımı için kullanılan bir yöntemdir. İyon değiştirici dolgu maddeleri silika üzerine iyonik fonksiyonel grupların bağlanmasıyla elde edilir. İyon değiştirme mekanizmasında hareketli fazın pH'sı ve iyonik gücü alıkonma süresi üzerinde, hareketli fazın organik çözücü içeriğine oranla daha fazla etkilidir. Ayrılacak madde ile sabit faz arasında ne kadar kuvvetli bağ ve elektrostatik çekim oluşursa alıkonma o kadar güçlü olur (Meyer, 1988; Snyder ve ark., 1988).

1.6.5. Eleme kromatografisi

Eleme kromatografisi, molekül ağırlık farkı çok büyük olan bileşikleri içeren karışımları ayırmak için kullanılır (Skoog ve ark., 1998). Eleme kromatografisinde esas olarak sabit faz ile fizikokimyasal etkileşim olmaktadır. Dolgu maddesinin gözenek

büyüklüğü ve numunede bulunan moleküllerin boyutu alıkonma süresini etkiler. Büyük moleküller dolgu maddesinin gözeneklerine (porlarına) girmeyerek hareketli faz ile birlikte hızla sürüklenir ve kolonu önce terkederler. Küçük moleküller porları dolduran hareketli faza difüze olurlar. Bunların ortalama hızları porlarda geçirdikleri zamana bağlıdır. Orta büyüklükteki moleküller ise sadece bazı porlara difüze olurlar, bu nedenle ortalama bir hızla hareket ederler. Eleme kromatografisi genellikle polimerleri ayırmak için kullanılır. Alıkonma zamanı ile molekül ağırlığı arasında çizilen grafikten bir polimerin molekül ağırlık dağılımı bulunabilir.

1.6.6. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi sabit faz olarak modifiye edilen ligant bağlı jel matriks ile protein molekülü arasındaki spesifik etkileşime dayanır. Sabit faz bir antikor gibi davranarak sadece etkileşen antijen yüzeyi olan protein molekülünün bağlanmasına izin verir. Hareketli faz bileşimi veya pH değiştirilerek bu proteinin kolonda elüe olması sağlanır (Skoog ve ark., 1998).

1.7. Kromatografide Temel Parametreler

i. Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü

Numunenin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir (t_R). Alıkonma zamanı terimi yerine alıkonma hacmi de kullanılır. Bir maddenin alıkonma hacmi (V_R) bir bileşenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup, alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızından (F) hesaplanabilir.

$$\mathbf{V_R = t_R F} \qquad \mathbf{(1.1)}$$

Alıkonma hacmi temel kromatografik parametre olan dağılım katsayısı (K) ile aşağıdaki eşitlik gereği doğrudan ilişkilidir.

$$\mathbf{V_R = V_M + K V_S} \qquad \mathbf{(1.2)}$$

V_M: Kolondaki hareketli faz hacmi

V_S: Kolondaki sabit faz hacmidir.

Dağılım katsayısı (K) ise; analitin sabit fazdaki molar derişiminin (Cs) hareketli fazdaki derişimine (C_M) oranıdır.

$$\mathbf{K = C_S / C_M} \qquad \mathbf{(1.3)}$$

Bir maddenin alıkonma hacmi, ölü hacim (Vo) terimini içerecek biçimde de tanımlanabilir. Kapasite faktörü (k') olarak bilinen bu kavram eşitlik 1.4' de verilmiştir.

$$k' = (VR - V_0)/V_0 \quad (1.4)$$

Elüsyon sırasında hacimsel akış hızı (F) sabitse eşitlik;

$$k' = (t_R - t_0)/t_0 \quad (1.5)$$

biçiminde yazılabilir. Kolon ile herhangi bir etkileşmeye girmeyen maddeler ölü zamanda elüe edilirler. Eşitlik 1.5'te t_0 sırası ile ölü hacim ve ölü zaman olarak tanımlanmıştır. Kapasite faktörü dağılımdaki derişimlere bağlı olup dağılım katsayısı ile ilişkilidir.

$$k' = K \times V_S/V \quad (1.6)$$

Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve uygun bir hareketli faz-sabit faz çifti seçildiğinde belirli bir karışımdaki her bir bileşen için farklı kapasite faktörü değerleri elde edilir. İyi bir ayrım için kapasite faktörünün 1-10 arasında olması beklenir. Hesaplanan $k' < 1$ ise maddenin kolonda çok az tutunduğu, $k' > 10$ ise maddenin kolonda çok fazla tutunarak analiz süresini aşırı uzattığı düşünülür.

ii. Seçicilik

İki maddeye ait kapasite faktörlerinin oranı seçicilik (α) veya ayırım faktörü olarak adlandırılır ve aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$A = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - to) / (t_{R1} - t_o) \quad (1.7)$$

Bu eşitlikte, k'_1 kısa alıkonma zamanlı maddenin, k'_2 ise daha uzun alıkonma zamanlı maddenin kapasite faktörü olarak tanımlanmıştır. Seçicilik, esas olarak sabit faz özelliklerine bağlıdır ancak hareketli faz bileşimi de seçiciliği etkiler. Deneysel çalışmada iki pikin seçiciliğinin 1'den büyük olması beklenir.

iii. Kolon etkinliği

Kromatografik kolonun etkinliği teorik tabaka sayısı arttıkça ve teorik tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Kolon tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve akış hızına bağlı olarak kolon etkinliği değişmektedir. Teorik tabaka sayısını elde edebilmek için aşağıdaki formül kullanılabilir.

$$N = 16 / (t_R/w)^2 \quad (1.8)$$

t_R: Alıkonma zamanı

w: Pik zemin genişliği

Pik genişliğinin ölçülmesinde karşılaşılacak hatalardan kaçınmak için N değeri

hesaplamada başka bir seçenek, $w_{1/2}$, yani yarı yükseklikteki pik genişliği değerinin kullanılmasıdır.

$$N = 5.54 (t_R/w_{1/2})^2 \quad (1.9)$$

Kromatografik kolondaki ayırma olaylarına matematiksel yaklaşım, 1950'li yıllarda Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter'in kendi adı ile anılan eşitliğin bulunması ile sonuçlanan incelemeleri ile başlamıştır.

$$H = A + B/u + Cu \quad (1.10)$$

H: Teorik tabaka yüksekliği (cm)

A: Çoklu akış yolları

B: Boyuna difüzyon

C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u: Çizgisel hız

Bir kromatografi kolonunun etkinliğinin sağlanması için önce bu kolon için kullanılacak optimum akış hızının saptanması gerekir. H değerinin küçültülmesi için bir dizi önlem alınarak kolonun etkinliği arttırılabilir.

iv. Ayırıcılık

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırıcılık kavramıyla ifade edilir. Ayırıcılık (R), genel olarak aşağıdaki eşitlikle verilmektedir.

$$R = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (1.11)$$

t_{R1}=Birinci numunenin alıkonma zamanı

t_{R2}=İkinci numunenin alıkonma zamanı

w_1=Birinci numunenin oluşan pik aralığının genişliği

$w_{2=}$İkinci numunenin oluşan pik aralığının genişliği

Ayırıcılığın; kapasite faktörü (k'), seçicilik (α) ve kolon etkinliği (N) terimleriyle ilişkisi aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir

$$R = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k' /(k'+1)] N1/2 \quad (1.12)$$

Nicel kromatografik analizler için iki pikin birbirinden tamamen ayrıldığı $R \geq 1.5$ değeri en uygundur. Genel olarak seçicilik arttıkça ayırıcılığın da artması beklenir. Fakat belli bir seçicilik değerinden sonra toplam ayırıcılıkta gerçek bir iyileşme olmadan farklı

alıkonma sürelerine sahip madde pikleri elde edilebilir. Seçicilik dışında kalan terimler sabit kabul edilerek seçiciliğe karşı ayırıcılık grafiğe işaretlendiğinde bu davranış açıkça görülmektedir. Kromatografik ayırımın başarı ile gerçekleşmesi için $\alpha > 1$ olmalıdır, $\alpha = 1$ olduğunda iki bileşik ayrılamaz. Seçicilik, hareketli ve sabit fazın bileşimi ile değişir. Birbirine yakın piklerde seçicilik 1'e yakındır. Ayırıcılığın seçicilikle ve kapasite faktörü ile değişimi Etkinlik faktörü olarak da tanımlanan N, akış hızı, kolon uzunluğu veya dolgu maddesinin tanecik boyutu ile değişir. Etkinlik faktörü, pik genişliği ile ilgilidir. Ayırıcılık, N'in karekökünün bir fonksiyonu olduğu için N'deki büyük artışlar ayırıcılıkta küçük değişiklikler meydana getirir. Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi bu kavramdan türetilmiş olan seçiciliğin etkisine benzer. k'=0 olduğunda herhangi bir ayırma işlemi gerçekleşmez. Ayrıca k' değeri arttıkça k'/(k'+1) değeri bire yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın toplam ayırıcılığa etkisi kalmaz. Kapasite faktörü için en uygun değerler 1 ile 10 arasındadır ve daha çok hareketli faz özelliklerine göre değişir (Adataş, 2011).

v. Pik simetrisi

Analitin hareketli faz denge derişimi (Cm) sabit fazdaki denge derişimine (C8) arasında doğrusal ilişki olup grafiğe geçirildiğinde eğimi dağılım katsayısını verir. Bütün Cm değerlerinde K sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik bir elüsyon piki elde edilir. İç bükey ilişki kolonda fazla miktarda madde olduğunu gösterir. Bu durumda sabit fazdaki madde-madde etkileşmeleri madde çözücü etkileşmelerinden daha baskındır. Bu durum K değerinin artmasına ve doğrusal olmayan ilişki elde edilmesine neden olur. Elüsyon eğrisinin önünde bir alan oluşur. Bu duruma ön kuyruklanma ya da yüklenme denir ve ayrılan maddenin alıkonma süresi derişimle artar. Eğer moleküller arası kuvvetler maddeyi sabit faz yüzeyinde bir katman oluşturacak biçimde tutuyorsa ilişki dışbükey olur ve elüsyon eğrisinde pik kuyruklanması görülür, böylece artan madde derişimiyle alıkonma zamanı azalır. Doğrusallıktan sapma nicel analizi güçleştirdiği ve alıkonma sürelerinin nitel analizde kullanımını engellediği için kromatografik koşullar simetrik elüsyon piki sağlanacak şekilde düzenlenir (Adataş, 2011).

1.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı hareketli fazın basınç yardımıyla kolona gönderildiği sistemlere yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) denir. Yüksek performans; yüksek hız ve yüksek ayırıcılığı ifade eder. Yüksek performans çok küçük çaplı (< 20 mikron) kolon dolgu

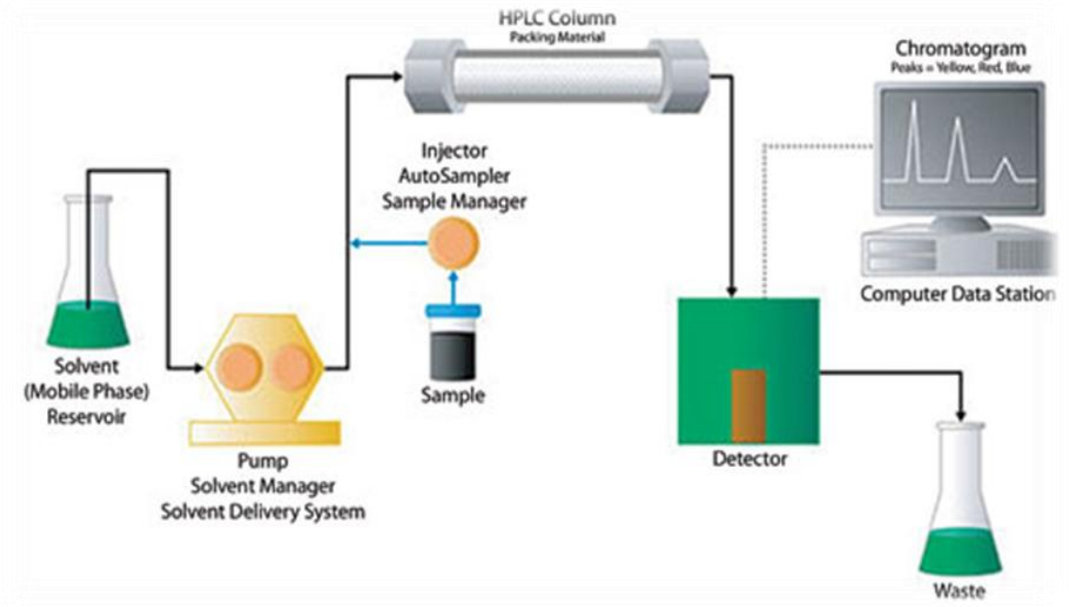
maddeleri kullanılarak bant genişlemesinin azaltılması ve daha dar piklerin elde edilmesi ile sağlanır. Kolon boyunca hareketli fazın ilerlemesini sağlamak için yüksek basınç gereklidir. Bu nedenle yöntem, HPLC, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olarak da adlandırılır.

1.8.1. HPLC cihazı bölümleri

HPLC cihazının kısımları enjektör, pompa, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur ve Şekil 1.13.'te şematik olarak gösterilmiştir. Organik çözücü ve tampondan etkilenmemesi için bütün materyal korozyona dayanıklı malzemelerden yapılır.

i. Pompalar

Hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamak için kullanılırlar. Akışın sabit ve deneylerin tekrarlanabilir olması için hareketli fazın pompalanma hızı sabit olmalıdır.



Şekil 1.13. HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi (Anonim, 2014)

ii. Hareketli faz

Hareketli fazın bileşimi alıkonmayı ve seçiciliği en çok etkileyen faktördür. Hareketli fazın;

1. Ayrımı etkileyen çözücü özellikleri: Elüsyon gücü ve seçicilik.
2. İşletime bağlı özellikler: Vizkozite, bastırılabilirlik, dedektörle geçimlilik, kolon ile geçimlilik, numune ile etkileşmeler, saflık ve içinde çözünmüş gaz oranı.
3. Güvenirlik özellikleri: Buharlaşabilme özelliği.

iii. Enjektörler

Manuel enjeksiyon valfleri: Enjeksiyon valfleri yüksek basınçlı bir ortama numune aktarmak amacıyla kullanılan sistemlerdir. Enjeksiyon valfinin numune yükleme ve enjeksiyon olmak üzere iki konumu vardır. Yükleme konumunda "Ioop" (kangal) basınçlı ortamdan izole edilir ve bir şırınga yardımı ile istenilen numune miktarı "Ioop"a doldurulur. Enjeksiyon konumunda "loop" tekrar yüksek basınçlı ortama dönerek numuneyi sisteme aktarır.

Basit otomatik enjektörler: Manuel enjeksiyon valfine benzer bir valf kullanılır. Bu sistemde numune şişesine azot basıncı uygulayarak "loop" doldurulur ve valfin dönmesi ile numune enjekte edilir.

Programlanabilen otomatik enjeksiyon sistemleri: Numune "Ioop"unu doldurmak için hassas bir motor ile hareket ettirilen şırıngalar kullanılır. Enjektörle çekilen hacim kontrol edilerek istenilen miktarda numune "Ioop"a doldurulur. Böylece küçük miktarlardaki numune enjeksiyonları gerçekleştirilebilmekte ve numune kayıpları en düşük olmaktadır. İstenilen sayıda enjeksiyonu peş peşe yapmak mümkündür.

iv. Kolonlar

Sabit fazı taşıyan kolonlar genellikle paslanmaz çeliktir, 4-10 mm iç çapında ve 10-30 cm boyunda olabilirler. Son yıllarda uzunluğu 3-7.5 cm ve iç çapı 1-4.6 mm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Dolgu maddesi taneciklerinin çapı 1.7-10 μm kadardır ve sistemin performansını büyük ölçüde belirleyen niteliktir.

v. Dedektörler

HPLC sisteminin en önemli parçalarından biridir ve iki grup altında toplanırlar.

a. Maddeye Yönelik Dedektörler: Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir:

1. Fotometrik dedektörler (UV, GB, IR fotometreleri)
2. Floresans dedektörler
3. Elektrokimyasal dedektörler
4. Ayırım sonrası tepkime dedektörleri
5. Radyoaktivite dedektörleri
6. Elektron yakalayıcı dedektörler
7. Kütle spektrometresi

b. Çözeltiye Yönelik Dedektörler: Çözeltinin içindeki maddeye değil, maddenin çözeltisine özgü dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Refraktif indeks dedektörleri
2. Dielektrik sabiti dedektörleri
3. Kondüktivite dedektörleri
4. Yoğunluk dedektörleri

Bu çalışmada UV/GB dedektörü kullanılmıştır.

1.8.2. UV/GB dedektör

En çok kullanılan dedektör tipi UV/GB dedektörlerdir. Birçok organik bileşiğin absorbsiyonu yüksek olduğundan ve yüksek duyarlılıkta ölçüm yapılabildiğinden duyarlılık ve seçicili yüksektir. Sıcaklık ve akış hızı değişikliklerine fazla duyarlı olmadığı için gradient elüsyon için idealdir. Bu dedektörler sabit veya değişken dalga boylu olabilir.

Değişken dalga boylu dedektörlerde ışık kaynağı olarak 190-400 nm'de kuartz-iyot veya tungsten halojen lambaları kullanılır.

Dizi diyot dedektör (DAD) bir tür UV/GB dedektörüdür. Optik sistemi, döteryum lambasından yayılan polikromatik ışığı, akış hücresinin üzerine yollar. Bu ışık daha sonra optik ağ üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşer. DAD 200-700 nm dalga boyu aralığının 0.1 sn aralıklarla tespit edebilmektedir. Analiz edilecek maddelerin maksimum dalga boyları farklı olduğunda DAD'ler birden fazla dalga boyunda ölçüm alabilir. Kromatografik piklerin saflık kontrolünde veya birden fazla pikten oluşup oluşmadıklarının tayininde oldukça sık kullanılır. Bu amaçla, piklerin elüsyonu sırasında birkaç spektrum kayıt edilerek, spektrumlar üst üste konup karşılaştırılabilir. Bütün dalga boylarında spektrumlar üst üste çakışıyorsa madde piki saftır. Eğer enjekte edilen piklerin sayısından daha az pik elde edilmişse saflık kontrolleri yararlı ipuçları verir. DAD'in özellikleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. Aynı anda spektrumun bütün dalga boylarında piklerin ölçümü yapılabilir.
2. Tek bir enjeksiyonla maksimum dalga boyları saptanabilir.
3. Aynı anda birden fazla dalga boyunda kromatogramlar ve kromatogramlardaki piklerin UV/GB spektrumları alınabilir.
4. Kromatografik olarak ayrılamamış piklerin nicel analizi yapılabilir (Referans dalga boyu kullanılarak maddelerin ayrılması sağlanır).
5. Spektrumların çakıştırılması yöntemi ile pik saflığının tespiti yapılabilir.
6. Pik kimliğinin doğrulanması yapılabilir.

1.9. Voltametrik ve Kromatografik Validasyonda Kullanılan İstatistiksel Terimler

Voltametrik validasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan terimler şunlardır (Yılmaz, 2012):

Ortalama Değer: Bir analizde elde edilen tüm sonuçlarının (genel olarak ölçüm değerleri) toplamının analiz sayısına (N) bölünmesiyle elde edilen sayıya denir. Ortalama değer kendisinin hesaplanmasında kullanılan herhangi bir değer veya sonuçtan daha güven vericidir ve analiz sayısına göre değişir. Analiz sayısı arttıkça ortalama değer doğru değere yaklaşır.

Kesinlik: Bir analizde (ölçmede) elde edilen sonuçların bir birine yakınlığına veya ortalama değerle herhangi bir değer arasındaki farka denir ve kesinliği yüksek olan sonuçların doğruluk dereceleride genelde yüksektir. Kesinlik çeşitli şekillerde verilebilir.

a) Standart sapma (s): Numune standart sapması her hangi bir yöntemin kesinliğini belirtmeye yarayan en önemli kriterdir ve aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$s = \sqrt{\frac{(\Sigma(x_i-\bar{x})^2)}{N-1}} \qquad \textbf{(1.13)}$$

s= numune standart sapması

x_i= analiz sonuçları

$\bar{x}$ = analiz sonuçlarının ortalaması

N= analiz sayısı

b) Bağıl standart sapma (s/$\bar{x}$): Standart sapma (s), ortalama değere ($\bar{x}$) bölünürse bulunan değere bağıl standart sapma denir ve RSD ile gösterilir. Bağıl standart sapmaya varyasyon katsayısı (VK) da denir ve genelde % RSD olarak verilir.

$$\% \text{ RSD} = \left(\frac{}{\bar{x}} \right) \text{x } 100 \qquad \textbf{(1.14)}$$

c) Varyans: Numune standart sapmasının karesi (s^2) olarak ifade edilen bir parametredir.

$$s^2 = \frac{(\Sigma(x_i - x)^2)}{N-1}$$

(1.15)

d)Yayılma (W): Bir analizde en büyük değerle en küçük değer arasındaki farka denir ve W ile gösterilir. Bu fark ne kadar küçük olursa kesinlik o kadar yüksek olur.

e) Doğruluk: Bir analizde (ölçmede) elde edilen en güvenilir sonuçlarla doğru değer veya doğru olarak kabul edilen değer arasındaki farka denir. Başka bir deyişle doğruluk, deneyle bulunan bir analiz sonucunun doğru (gerçek) değere yakınlık derecesidir. Kesinlikle doğruluk arasındaki en önemli fark, kesinlik az sayıda analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı iken, doğruluk ise analiz sonuçlarının çok sayıda (sonsuz sayıda numune üzerinde, sonsuz zamanda, sonsuz sayıda alınan tekrar) analiz sonucunda elde edilen gerçek değere yakınlığı olup, iki şekilde ifade edilir.

Ortalamanın mutlak hatası (ortalamanın doğru değerden farkı), E_a ile gösterilir.

$$E_a = X - \mu$$

(1.16)

Ortalamanın bağıl hatası ise aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$\%\ \text{Bağıl hata} = \frac{(X - \mu)}{\mu} \times 100$$

(1.17)

f) Bias: Analitik bir metodun sistematik hatasının bir ölçüsü olup metodun doğruluk derecesiyle ilgilidir ve şu şekilde ifade edilir.

$$\text{bias} = (\mu - X_t)$$

(1.18)

μ= Analizi yapılan maddenin popülasyon ortalaması (doğru veya gerçek değer)

X_t= Analizi yapılan maddenin bulunan konsantrasyonudur.

g) Hassaslık (Duyarlılık): Herhangi bir analizde uygulanan yöntemin veya cihazın hassaslığı (duyarlılığı) analizi yapılan maddenin (analitin) en küçük konsantrasyonu bile ayırt edebilme özelliğidir. 2 türlü ifade edilir.

Kalibrasyon hassaslığı, kalibrasyon doğrusuna dayanır ve kalibrasyon doğrusunun

eğimine eşittir. Aynı maddenin tayininde kullanılan iki metotdan hangisinin kalibrasyon eğimi daha büyük olan metot, daha hassastır denir.

Analitik hassaslık ise kalibrasyon doğrusunun eğiminin, maddenin ölçüm sinyallerinden elde edilen standart sapmaya bölümüdür ve γ ile gösterilir.

h) Seçicilik (Spesifiklik): Analitik bir tekniğin analiz ortamında bulunan diğer türlerden (yüklü ve yüksüz taneciklerden) sadece birinin kantitatif analizi için kullanılabilme özelliğidir.

ı) Çalışılabilir konsantrasyon aralığı: Analitik bir yöntemin kantitatif sonuçlar verdiği aralığa, çalışılabilir konsantrasyon aralığı denir.

i) Tayin alt sınırı (LOD): Bir analizde en küçük sinyalin gözlendiği konsantrasyona tayin alt sınırı denir ve LOD ile gösterilir ve aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$LOD = 3\ s / m \qquad \textbf{(1.19)}$$

Burada m: kalibrasyon doğrusunun eğimi; s, ise numune standart sapmasıdır.

j) Kantitatif tayin sınırı (LOQ): Bir analizde kantitatif analizin yapıldığı en küçük konsantrasyonu ifade eder ve LOQ ile gösterilir ve aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$LOQ = 10\ s / m \qquad \textbf{(1.20)}$$

k) Geri kazanım: Numune ortamı içindeki analitin tayini ile elde edilen miktarın, saf analitin çözeltisine göre % ne kadar geri kazanıldığının analiz edilmesi gerekir. Alt, orta ve üst bilinen derişimdeki standart çözeltiler, matrikse eklenir varsa bir ayırma işlemi ile geri elde edilir ve tayin edilerek bilinen miktarla karşılaştırılarak sonuç % hata ile verilir.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Naproksen'in Voltametrik Teknikler ile İlaçlardan Tayini

Yapılan literatür araştırmalarında naproksen'in voltametrik teknikler ile kantitatif analizi ile ilgili ultra trace grafit elektrotta çalışmasına rastlanmamıştır.

Nafaâ ve ark. (2003), NAP'in Pt elektrot kullanarak cyclic voltametri(CV), lineer voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi (DPV) teknikleriyle yükseltgenme özelliğini araştırmıştır. Bundan yararlanılarak naproksen'in çeşitli ilaç formlarından analizini DPV tekniğiyle gerçekleştirmiştir.

Suryanarayanan ve ark. (2005) da ilk olarak boron-doped diamond elektrot (BDD) ile susuz destek elektrolit sisteminde diferansiyel puls voltametrisi (DPV) tekniğiyle naproksen'in analizini gerçekleştirmişlerdir. Camsı karbon elektrot (GCE) ve BDD elektrodun zemin sinyallerini karşılaştırmıştır. BDD elektrot ile NAP'in 0.5-50 μM arası konsantrasyonları ölçülmüş ve çeşitli ilaç dozaj formlarıyla karşılaştırması yapılmıştır.

Norouzi ve ark. (2009), disprozyum nanoteller kullanarak modifiye ettiği karbon pasta elektrotla (DyNW/CPE), kare dalga voltametri (SWV) tekniği ile NAP'in ve parasetamolün kalibrasyon grafiğini oluşturarak gerçek numunelerden analizlerini yüksek doğruluk ve hassasiyetle gerçekleştirmişlerdir.

2.2. Naproksen'in HPLC Metoduyla Yapılmış Çalışmaları

Yi-Hsin ve ark. (2005) naproksen'in metanol içerisinde fotodegradasyon ürünlerinin belirlenmesi için hızlı, doğru ve güvenilir bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiştir. UV dalga boyunu 230 nm olarak belirlemişlerdir. Geliştirilen yöntem ilaç etkeni ve fotoürünlerle karşılaştırılmış; gün içi ve günlerarası standart sapmaları ve yüzde geri kazanımlarını belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlars LC-ESI MS ile ile karşılaştırmışlardır.

Kayıran ve ark. (2010) Naproksen sodyumun poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) (50:50) doku iskelelerinden tayini için basit, özgün ve güvenilir bir HPLC metodu geliştirmişlerdir. Çalısmada ters faz kolon (ODS2 C 18 200x4.6mm), mobil faz olarak metanol ve asetat tamponu (pH 5.1) (55:45 v/v) kullanmışlar, akis hızını ise 1 mL/dakika olarak belirlemişlerdir. Dedektör olarak 254 nm eksitasyon/ 352 nm emisyon dalga boyunda floresans dedektörü kullanmışlardır. Naproksen sodyum için alıkonma zamanı 9.3

dakika olarak bulmuşlardır. Kalibrasyon garafiğini 0.08-75 g/mL derişim aralığında doğrusal olarak oluşturmuşlardır. Gün içi ve günler arası kesinlik için bağıl standart sapma değerini % 3.71'den, doğruluk için bağil hata değeri 2.96'dan düşük olarak belirlemişlerdir. Geliştirilen HPLC metoduyla naproksen sodyumun PLGA (50:50) doku iskelelerinden miktar tayini gerçekleştirmişlerdir.

Amrohi ve ark. (2012) naproksen'in RP-HPLC metoduyla duyarlı ve spesifik kantitatif tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Kolon olarak C18, 250x4.6 mm 5µm ; mobil faz (40:60) fosfat tamponu, metanol olarak belirlemişlerdir. Akış hızı 1.3 mL/dakika olarak belirlemişlerdir. Önerilen yöntem standart çözeltiyle kontrol edilip duyarlılığı, tekrarlanabilirliği, doğruluğu gibi çeşitli uygunluk parametreleri incelemişlerdir.

Bu çalışmanın amacı, naproksen'in elektrokimyasal yükseltgenme özelliğini ilk defa ultra trace grafit elektrot (UTGE) kullanarak araştırmak ve ilaç dozaj formlarından miktarını voltametrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) teknikleri ile hızlı, hassas ve doğru biçimde belirlemektir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler

Bu çalışmada $C_2H_4O_2$ (Riedel-de Haen, %99), C_2H_3N (Merck %99), CH_3OH (Merck, %99,5), NaOH (Merck, %99,8), etanol, 0,05 μm boyutlu Alümina (CH Instruments ve metkom) kimyasal maddeleri kullanıldı. Ayrıca ilaç etken madde naproksenin ilaç dozaj formu Naprosyn, Abdi İbrahim firmasından temin edildi.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Voltamogramlar, Metrohm 757 VA Trace Analyzer ve cihazı ile alındı. Voltametrik ölçümler; ultra trace grafit [(elektrodun yüzey boyutu (ϕ) 7 mm; disk çapı (R) 2 mm] çalışma elektrodu, platin tel yardımcı elektrot, Ag/AgCl referans elektrodundan oluşan bu üçlü elektrot sisteminde yapıldı. Elektrokimyasal hücredeki oksijenin uzaklaştırılması işlemi için % 99 saflıkta argon gazı kullanıldı.

Voltametrik hücre ve diğer cam malzemelerin ön yıkaması ve sulu çözeltilerin hazırlanması için kullanılan saf su, TKA Smart2 pure marka ultrasaf su (0,055μS/cm iletkenliği ile) cihazından elde edildi.

Kromatogramlar Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 HPLC cihazı ile C18 ThermoAcclaim kolon (3 μM; 4.6 mmx150 mm) ve Diod-Array Dedektörü (DAD) kullanılarak elde edildi.

Çözeltilerin pH'ları EZDO 5011 A marka pH metre ile ölçüldü.

İlaç tablet çözeltilerinin hazırlanmasında Electro.mag M 4812 P marka santrifüj cihazı kullanıldı.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada öncelikle ilaç firmasından (Abdi İbrahim) Naproksen etken maddesi ve ilaç formu (naprosyn®) temin edildi. Naproksen'in etanolde çözündüğü belirlendikten sonra bu çözücüdeki $1x10^{-2}$ M konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiden istenilen konsantrasyonlarda seyreltik çözeltileri ($1x10^{-3}$ ve 10^{-4} M) hazırlandı. Çalışma ortamını belirlemek amacıyla pH taraması yapıldı. Bu amaçla fosfat (0.067 M; pH 4.50-7.50), asetat (0.2 M; pH 3.50-5.50) ve Britton-Robinson (0.04 M; pH 2.0-12.0)

tampon çözeltileri içerisinde diferansiyel puls (DPV) ve dönüşümlü voltametri (CV) teknikleri ile voltamogramları alındı. DPV tekniği ile pH 4.50 asetat tamponunda, naproksenin yükseltgenmesine ait 0.894 V' da belirgin, keskin ve maksimum akımın gözlendiği bir pik elde edildi. Bu nedenle bundan sonraki voltametrik ölçümler pH 4.50 asetat tamponunda yapıldı. Seçilen bu ortamda öncelikle tarama hızı-akım ($v^{1/2}$-i_p ve logv-logi) grafiklerinin eğim ve korelasyon (r) değerlerine bakılarak akım türü belirlendi ve bundan sonraki çalışmalar buna göre yürütüldü.

Daha sonra aynı çözücü-destek elektrolit sisteminde değişik konsantrasyonlarda etken maddenin voltamogramları alınarak, akım-konsantrasyon değerlerinden kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Bu grafikten yararlanılarak doğrusallığın gözlendiği konsantrasyon aralığı belirlendi. Kalibrasyon grafiğinin eğim ve standart sapma değerlerinden belirme sınırı (LOD) ve kantitatif tayin sınırı (LOQ) hesaplandı. Akım değerlerinin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğine, ölçümlerin doğruluğuna ve kesinliklerine bakılarak validasyon parametreleri belirlendi ve elde edilen analitik verilerden NAP'ın analizi için geliştirilen yöntemin hızlı, ekonomik, duyarlı ve kolay bir yöntem olup olmadığı sonucuna varıldı. Daha sonra bu deney şartlarında NAP'ın ticari ilaç dozaj formlarından analizi gerçekleştirildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında naproksen adlı etken maddenin analizi aynı zamanda yüksek-performanslı sıvı kromatografik teknik (HPLC) ile yapıldı. Mobil faz olarak % 1'lik asetik asit, metanol ve asetonitril (40:20:40 v/v); dedektör olarak ise Diod-Array Dedektörü (DAD) ve C18 ThermoAcclaim (3 μM; 4.6 mmx150 mm) kolonu kullanılarak, naproksen için alıkonma zamanı (t_R) 6.35 dakika olarak belirlendi.

Kalibrasyon eğrisi kullanılarak naproksen'in ilaç tablet formundan miktarı belirlendi. Ayrıca uygulanan iki tekniğin analiz sonuçları istatistiksel olarak birbirleriyle karşılaştırılarak doğruluğu ve avantajları belirlendi.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Naproksen'in Ultra Trace Grafit Elektrotta Çalışma Ortamının Belirlenmesi

Naproksen'in yükseltgendiği optimum şartları belirlemek amacı ile tüm destek elektrolitlerde DPV tekniği kullanarak pik akımının ve pik potansiyelinin pH ile değişimi incelendi (Çizelge 4.1).

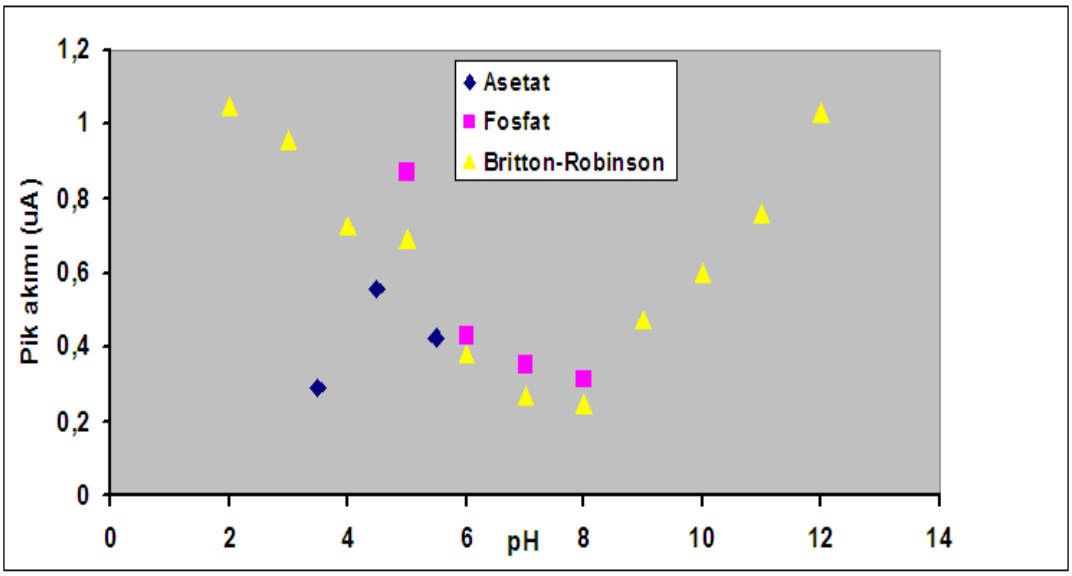
Çizelge 4.1. $5x10^{-5}$ M naproksen'in farklı destek elektrolitlerdeki akım ve potansiyeline pH etkisi

pH	Pik Akımı (µA)	Pik Potansiyeli(V)
Asetat 3.50	2.720	0.909
Asetat 4.50	3.630	0.873
Asetat 5.50	1.400	0.828
Fosfat 4.35	2.890	0.882
Fosfat 5.50	1.610	0.819
Fosfat 6.50	0.884	0.819
Fosfat 7.50	1.180	0.810
Fosfat 8.20	1.720	0.810
BR 2.10	3.490	0.999
BR 3.02	3.580	0.954
BR 4.05	2.790	0.891
BR 5.01	1.760	0.837
BR 6.02	1.030	0.792
BR 7.02	0.816	0.801
BR 8.01	1.140	0.792

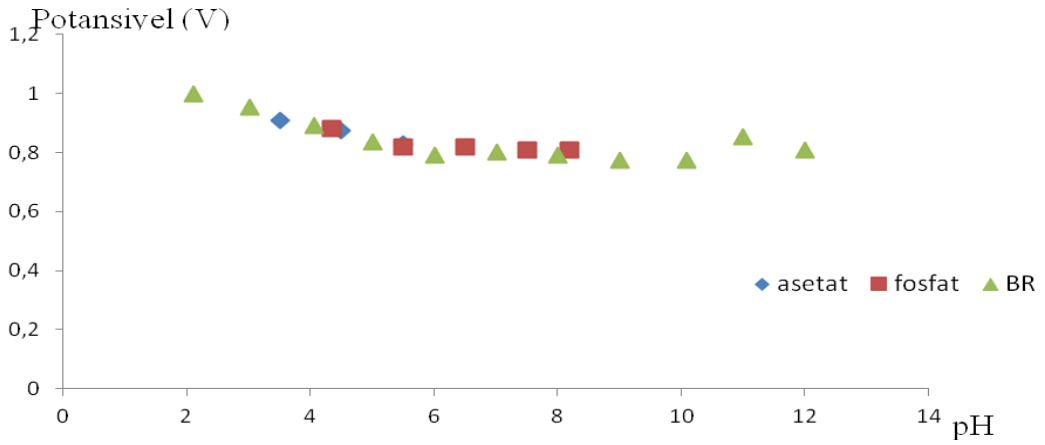
Çizelge 4.1'in devamı

BR 9.01	1.100	0.774
BR 10.08	0.770	0.774
BR 11.00	5.110	0.885
BR 12.00	5.350	0.810

Çizelge 4.1' deki veriler kullanılarak naproksen'in pik akımına ve pik potansiyeline etkisini gösteren grafikler oluşturuldu (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. $5x10^{-5}$ M naproksen'in pik akımına pH etkisi

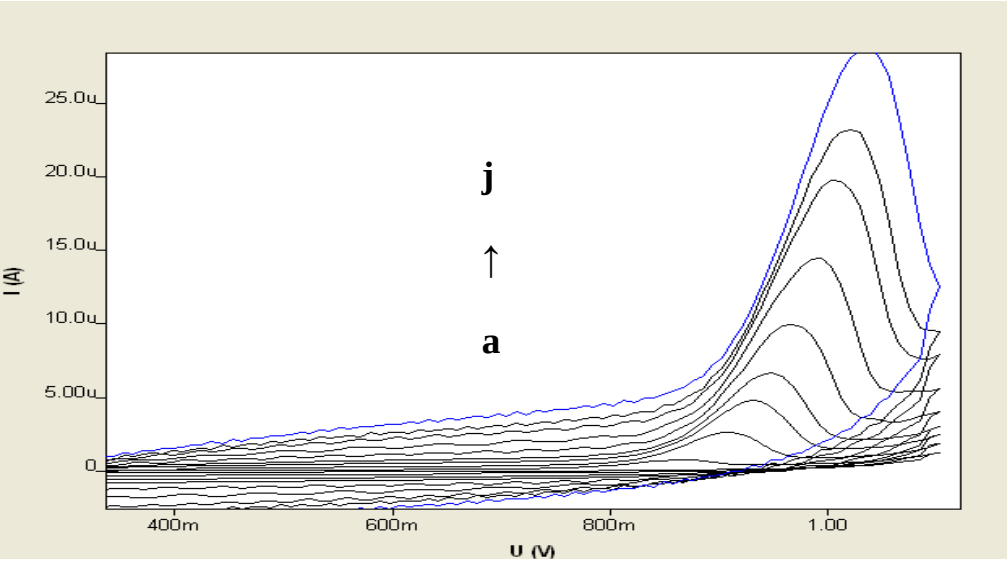


Şekil 4.2. $5x10^{-5}$ M naproksen'in pik potansiyeline pH etkisi

Çizelge 4.1, Şekil 4.1. ve Şekil 4.2. incelendiğinde pH=4.50' asetat tamponunda yüksek ve keskin pik akımı (3.63 µA) görülmektedir. Buna göre çalışma ortamı pH=4.50 asetat tampon olarak belirlendi. Bundan sonraki voltametrik ölçümler bu tampon çözelti ve pH' da yapıldı.

4.2. Akım Türünün Belirlenmesi

$5x10^{-5}$ M Naproksen'in asetat tamponunda, CV tekniği ile 10-1000 mVs^{-1} tarama hızlarındaki voltamogramları alındı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. $5x10^{-5}$ naproksen'in 10-1000 mVs^{-1} tarama hızı aralığındaki CV ile voltamogramı; a) 10, b) 25, c)50, d) 100, e) 150, f) 250, g) 400), h) 600, i)750, j)1000 mV/s

Yukarıdaki Şekil 4.3'teki voltamogramların akım-tarama hızı verilerinden Çizelge 4.2 oluşturuldu.

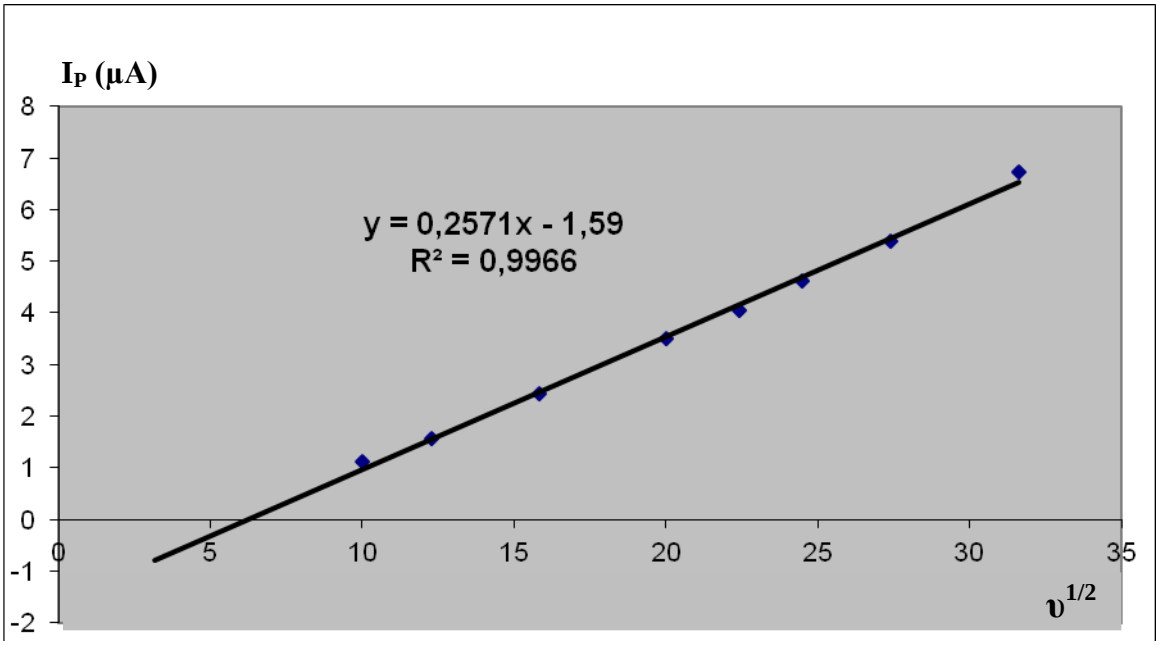
Çizelge 4.2. 5 x 10^{-5} M naproksen'in asetat (pH 4.50) tamponunda tarama hızı ile akım değişimi

Tarama Hızı, υ (mVs^{-1})	Tarama Hızının Karekökü, $\upsilon^{1/2}$	Tarama Hızının Logaritması, Log υ	Pik Akımı, I_p (µA)	Pik Akımının Logaritması, Log I_p
100	10.00	2.00	1.13	0.33
150	12.30	2.18	1.56	0.47

Çizelge 4.2.'nin devamı

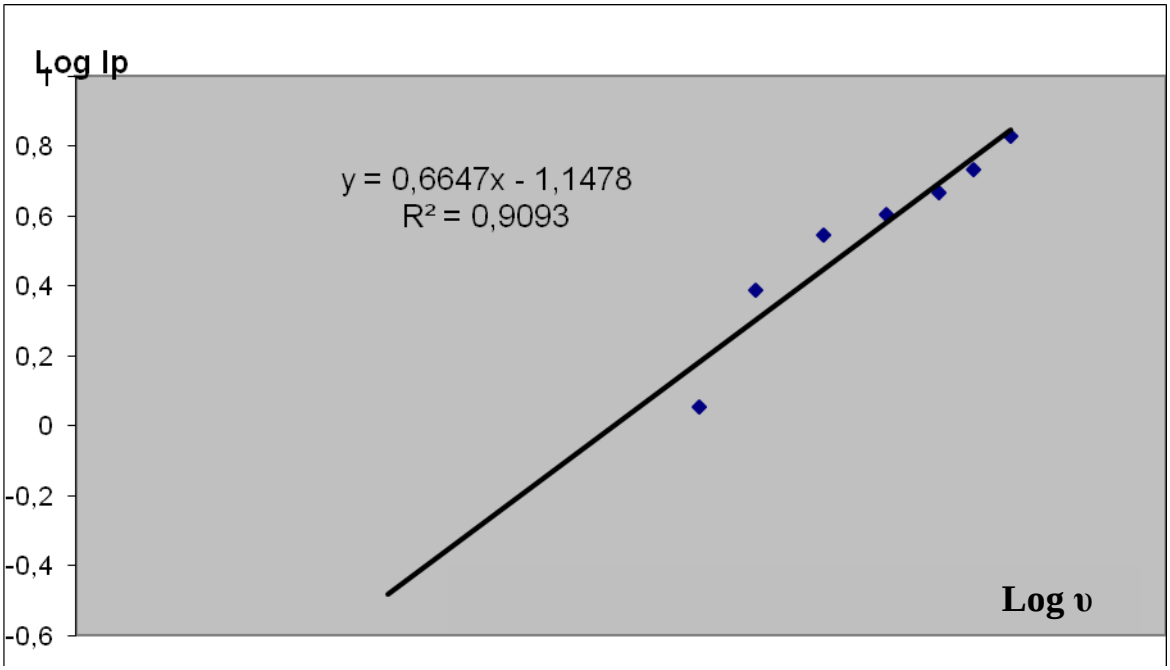
250	15.81	2.40	2.44	0.66
400	20.00	2.60	3.51	0.79
500	22.40	2.77	4.04	0.94
600	24.49	2.88	4.63	1.00
750	27.38	3.00	5.40	1.10

Çizelge 4.2 deki değerler kullanılarak Şekil 4.4. ve Şekil 4.5 çizildi.



Şekil 4.4. $5x10^{-5}$ M naproksen'in pH=4.50 asetat tamponunda pik akımı- karekök tarama hızı ($\upsilon^{1/2}$-i_p) grafiği

Şekil 4.4.'te yükseltgenme pik akımının, hızın karekökü ile doğrusal olarak artmasından elde edilen $\upsilon^{1/2}$-i_p grafiğinin korelasyon katsayısının, R= 0.9974 (1.00' a yakın) olması akımın difüzyon kontrollü olduğunun bir göstergesidir (Skrzpek, 2005).

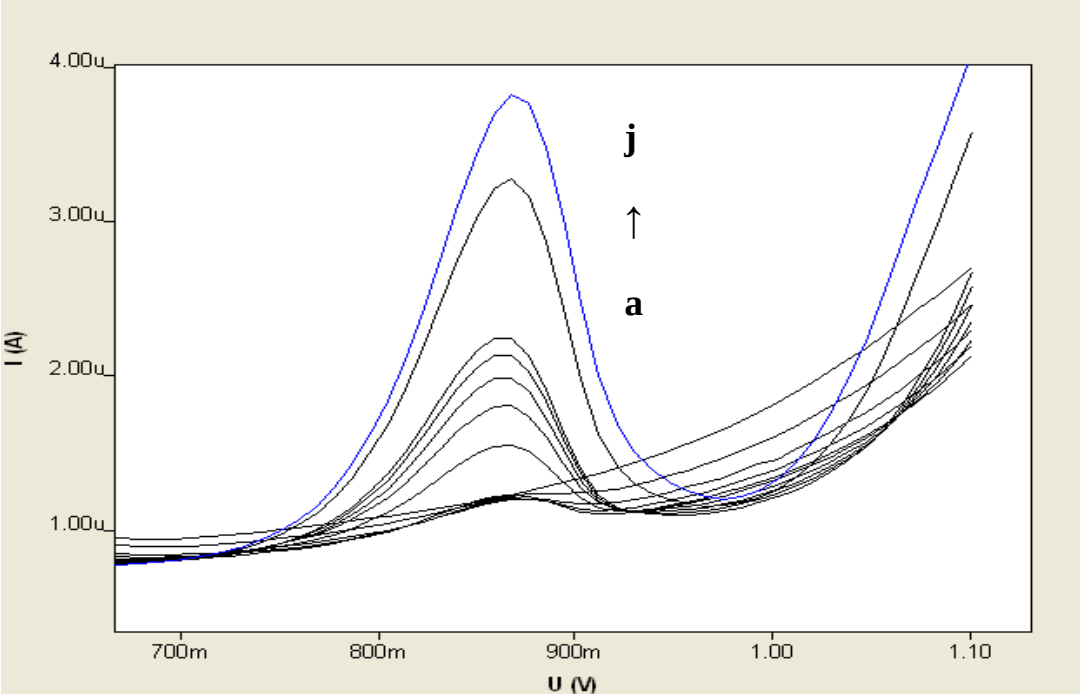


Şekil 4.5. $5x10^{-5}$ M naproksen'in pH= 4.50 asetat tamponunda yükseltgenme pik akımının logaritması- tarama hızının logaritması (log υ-log $i_{p)}$ değişimi

Şekil 4.5.'te akımının logaritması-tarama hızının logaritması (log υ-log $i_{p)}$ grafiğinden eğiminin 0.66 olması akımın difüzyon kontrollü olduğununun diğer bir göstergesidir. Eğimin 0.5-0.75 arasında olması akımın difüzyon, 0.75-1.00 olması ise akımın adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

4.3. Analitik (Çalışma) Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi

Analitik konsantrasyon aralığını belirlemek için naproksen'in farlı konsantrasyonlarda, asetat (pH=4.50) tamponunda DPV tekniği ile voltamogramları alındı (Şekil 4.6.).



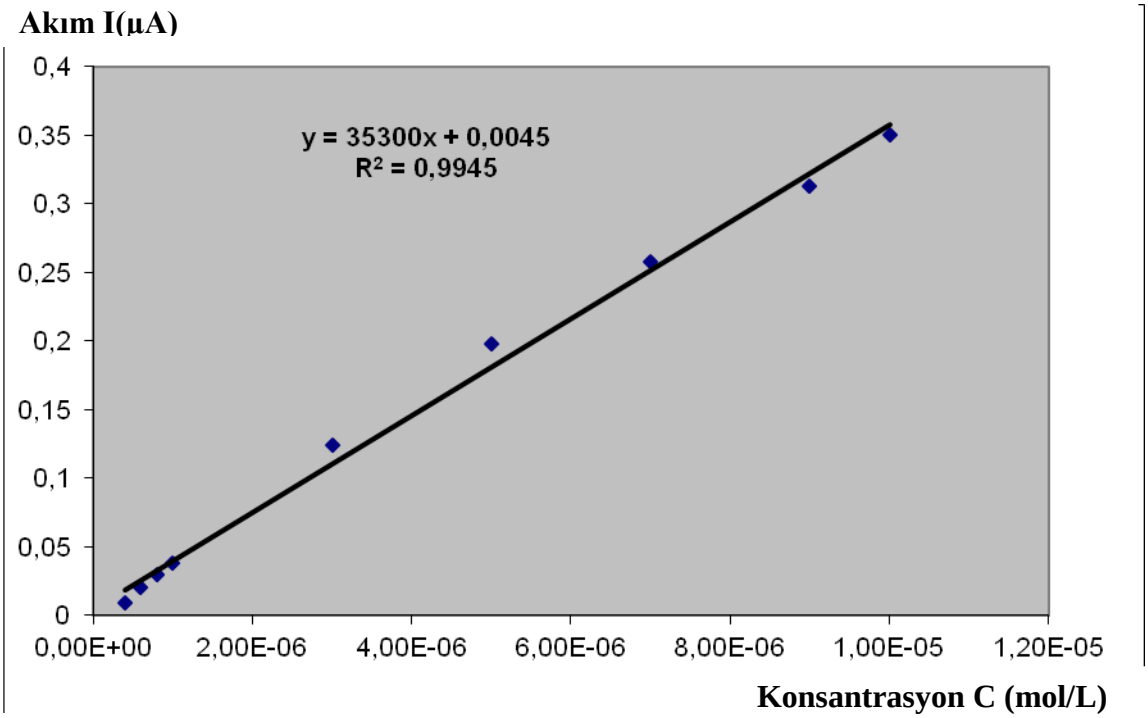
Şekil 4.6. DPV tekniği ile naproksen'in konsantrasyon-pik akımı değişimi a) Destek elektrolit (asetat tamponu, pH=4.50); b) $4.0x10^{-7}$; c) $6.0x10^{-7}$; d) $8.0x10^{-7}$; e) $1.0x10^{-6}$; f) $3.0x10^{-6}$; g) $5.0x10^{-6}$; h) $7.0x10^{-6}$; i) $9.0x10^{-6}$; j) $1.0x10^{-5}$M naproksen

Şekil.4.6.'daki naproksen'in voltamogramlarından elde edilen doğrusallığın gözlendiği konsantrasyon-akım değerleri ise çizelge 4.3'te verildi.

Çizelge 4.3. Naproksen'in ultra trace grafit elektrotta DPV tekniğyle elde edilen pik akımı değerleri

Konsantrasyon (M)	Pik akımı (µA)
$4x10^{-7}$	0.031
$6x10^{-7}$	0.072
$8x10^{-7}$	0.104
$1x10^{-6}$	0.135
$3x10^{-6}$	0.408
$5x10^{-6}$	0.638
$7x10^{-6}$	0.835
$9x10^{-6}$	1.010
$1x10^{-5}$	1.140

Çizelge 4.3' deki konsantrasyon (C) ve pik akım (i) değerlerinden doğrusallığın gözlendiği kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Naproksen'in fosfat (pH=4.50) tamponundaki pik akımı- konsantrasyon (C-$i_{p)}$ grafiği

Şekil 4.7. de görüldüğü gibi analitik konsantrasyon aralığı $4x10^{-7}$ - $1x10^{-5}$ M olarak belirlendi. Konsantarsyon-akım grafiğinin eğimi 88737, korelasyon katsayısı ise 0.9945 hesaplandı. Buna göre kalibrasyon grafiğindeki en düşük konsantrasyonun bir üstündeki konsantrasyon olan $6x10^{-7}$ M' da voltamogram alınarak akım değerlerinin standart sapması s, $4.46x10^{-3}$ olarak bulundu. Bu değer 3s/m ve 10s/m eşitliklerinde yerine konularak belirme sınırı LOD, $8.66x10^{-8}$ ve kantitatif tayin sınırı LOQ, 2.88×10^{-7} M olarak hesaplandı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Naproksen'in pH=4.50 asetat tamponunda DPV yöntemi kullanılarak elde edilen analitik tayin parametreleri

Parametreler	Sonuçlar
Ölçülen Potansiyel (V)	0.875
Konsantrasyon Aralığı(M)	$4x10^{-7}$ - $1x10^{-5}$
Eğim ($\mu A\ M^{-1}$)	88737
Eğimin Standart Sapması	3158
Kayma (nA)	0.0397
Kaymanın Standart Sapması	$4.46x10^{-3}$
Ölçüm Sayısı, n	5
Korelasyon katsayısı (R)	0.99
Belirme Sınırı, LOD (M)	$8.66x\ 10^{-8}$
Kantitatif Tayin Sınırı, LOQ (M)	$2.88\ x\ 10^{-7}$
Gün İçi Pik Akımının Tekrarlanabilirliği (%RSD)	$5x10^{-6}$ M için 2.83
Günler Arası Pik Akımının Tekrarlanabilirliği (% RSD)	$5x10^{-6}$ M için 0.91

4.4. Naproksen'in Ultra Trace Grafit Elektrotta İlaç Formundan Miktarının Belirlenmesi ve Geri Kazanımı

Geliştirilen yöntem ile naprosyn tabletlerinde naproksen'in miktarını belirlemek için, naprosyn tabletlerinden 5 tablet tartılıp toz haline getirilip $5x10^{-6}$ M naproksen içeren çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin voltamogramı alınarak, ölçülen akım değeri konsantrasyon grafiği eşitliğinde yerine konularak 1 tabletteki naproksen miktarı 247.40 mg olarak hesaplandı. Bu değer, tablet üzerinde belirtilen değer (250 mg) ile karşılaştırıldı (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Naprosyn tabletlerinde belirlenen naproksen miktarı ve naproksen'in geri kazanımı

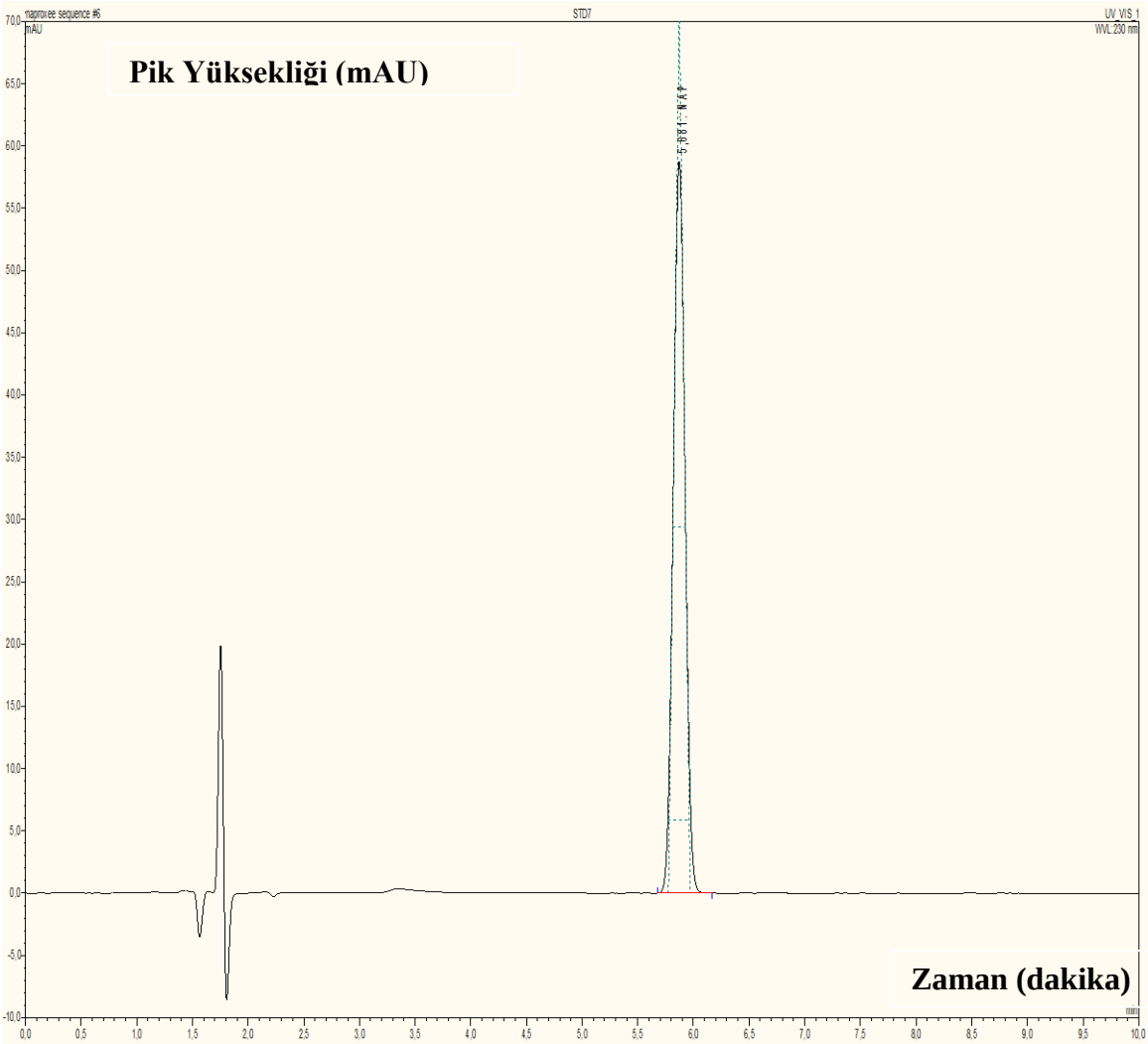
Tablette belirtilen Naproksen Miktarı (mg)	250.00
Bulunan Naproksen Miktarı (mg)	247.40
Bağıl Standart Sapma, % R.S.D.	0.81
Doğruluktan Sapma, % Bias	1.04
Eklenen Naproksen (mg)	40.00
Bulunan Naproksen (mg)	39.64
Geri Kazanım (%)	99.10
Geri Kazanımın Bağıl Standart Sapması, % R.S.D.	2.17
Geri Kazanımın Doğruluktan Sapma, % Bias	0.90

Uygulanan voltametrik yöntemin doğruluk ve kesinliğini kontrol etmek amacı ile geri kazınım çalışması yapıldı. Bu amaçla, $7x10^{-6}$ M naproksen'in pik akımı ölçüldü. Elde edilen akım değeri kalibrasyon grafiğinin eşitliğinde yerine konularak naprosyn tabletindeki naproksen etken madde miktarı hesaplandı. Daha sonra aynı çözeltiye 40 mg

naproksen etken maddesi eklendi. Eklenen naproksen'in miktarı ile bulunan naproksen miktarı karşılaştırılarak, naproksen'in geri kazanımı % 99.00 olarak hesaplandı (Çizelge 4.5). Geri kazanım % 99.00 olarak bulunmasından, uygulanan voltametrik yöntemin doğruluğunu ve ilaç katkı maddelerinin analiz yöntemizi etkilemediği sonucuna varıldı.

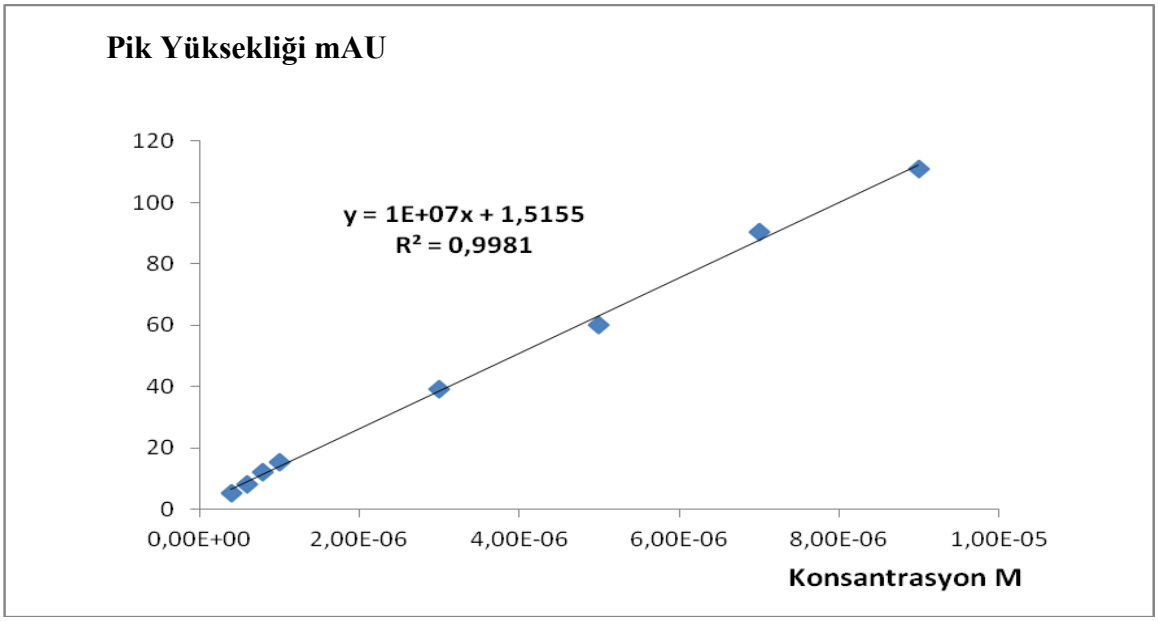
4.5. Naproksen'in HPLC Metoduyla İlaç Formundan Miktarının Belirlenmesi

Mobil faz olarak %1'lik asetik asit, metanol ve asetonitril (40:20:40 v/v); dedektör olarak ise Diod-Array Dedektörü (DAD) ve C18 ThermoAcclaim (3 µM; 4.6 mmx150 mm) kolonu kullanılarak, naproksen için alıkonma zamanı (t_R) 6.35 dakika olarak belirlendi. 5x10-6 M Naproksen'e ait kromotogram Şekil 4.8.' de verilmiştir.



Şekil 4.8. 5x10^{-6} M Naproksen'in HPLC metoduyla elde eldilen kromatogramı

Analitik konsantrasyon aralığını belirlemek için naproksen'in farklı konsantrasyonlarda kromatogramları alındı. Bu kromatogramların konsantrasyon- pik yüksekliği değerlerinden kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. DAD dedektörle elde edilen Naproksen standardına ait kalibrasyon doğrusu

4.6. Voltametri ve HPLC Teknikleri İle Elde Edilen Analiz Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması

Uygulanan herhangi bir yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için aynı analizlerin birbaşka yöntem ile de yapılması gerekmektedir. Bu amaçla Voltametri ve HPLC tekniğinde kullanılan analiz ve geçerlilik parametreleri hesaplanarak bunların karşılaştırılması yapıldı (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. Uygulanan voltametri ve HPLC tekniklerinin bazı parametrelerinin karşılaştırılması

ANALİZ VE GEÇERLİLİK PARAMETRELERİ	**VOLTAMETRİ**	**HPLC**
DOĞRUSALLIK ARALIĞI	$4x10^{-7} – 1x10^{-5}$	$4x10^{-7} – 1x10^{-4}$
LOD(M)	$8.66x10^{-8}$	$1.55x10^{-7}$
LOQ(M)	$2.88x10^{-7}$	$5.16x10^{-7}$
Tablette belirtilen Naproksen Miktarı (mg)	250.00	250.00
Bulunan Naproksen Miktarı (mg)	247.40	253.80
Eklenen Naproksen (mg)	40.00	40.00
Bulunan Naproksen (mg)	39.64	40.61
% GERİ KAZANIM	99.10	101.52

Çizelge 4.6. dan da görüleceği gibi voltametri metoduyla elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin HPLC tekniğiyle elde edile değerlerden daha düşük olması voltametrik tekniğin daha avantajlı olduğunu göstermektedir.

Voltametri ve HPLC teknikleri ile yapılan farmasötik preparat analiz sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Buna göre iki tekniğin analiz sonuçlarının ortalamaları

arasında fark olup olmadığını belirlemek ve voltametrik tekniğin geçerliliğini(doğruluğunu) göstermek amacıyla **t-testi** uygulandı. N=6 serbestlik derecesi ve % 95 güven aralığına göre belirlenen $\mathbf{t_{kritik}}$ değeri hesaplanan değerden büyük bulunduğundan ($\mathbf{t_{hesap}} < \mathbf{t_{kritik}}$, 0.0085 < 2.45) iki metodun analiz sonuçları arasında anlamlı fark olmadığı sonucuna varıldı (Yılmaz, 2012; Skoog ve ark., 2000; Skoog ve ark., 2013).

Uygulanan iki metodun ölçüm sonuçlarının kesinliklerini karşılaştırmak amacıyla **F testi** uygulandı. 6 serbestlik derecesiyle $\mathbf{F_{kritik}} > \mathbf{F_{hesap}}$, 4.28 > 0.057 olarak belirlendi. $\mathbf{F_{kritik}}$ değeri hesaplanan $\mathbf{F_{hesap}}$ değerinden büyük bulunduğundan, iki metodun kesinliği arasında önemli bir farkın olmadığı sonucuna varıldı (Yılmaz, 2012; Skoog ve ark., 2000; Skoog ve ark., 2013).

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, naproksen adlı etken maddenin elektrokimyasal yükseltgenme özelliği, ultra trace (eser) grafit elektrot kullanılarak, diferansiyel puls ve dönüşümlü voltametri teknikleri ile incelendi. Farklı pH'lardaki (pH=3.50-5.50) asetat tamponunda 0.3 ile 1.1 V potansiyel aralığında alınan voltamogramlarda 0.894 V'da yükseltgenme piki belirlendi.

Aynı zamanda uygulanan voltametrik yöntem ile naproksen'in ticari ilaçlardaki miktarı belirlenerek (LOD, LOQ gibi) validasyon parametreleri değerlendirildi. Ayrıca uygulanan yöntemin doğruluğunu belirlemek için geri kazanım çalışmaları yapılarak iyi bir geri kazanım elde edildi. Böylece ilaç katkı maddelerinin uygulanan yöntemleri etkilemediği sonucuna varıldı.

Uygulanan voltametrik tekniğin geçerliliğini kanıtlamak amacıyla aynı analizler HPLC tekniği ilede gerçekleştirildi. Her iki teknikle elde edilen analiz sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu görüldü. Dolayısıyla uygulanan voltametrik tekniğin geçerliliği HPLC tekniği ile kanıtlanmış oldu.

Uygulanan voltametrik teknikler; ekonomik, hızlı ve duyarlı olması, az miktarda numune ile çalışılması ve ayırma gibi zaman alıcı işlemlere gerek duyulmadan tayin yapılabilmesi gibi üstünlükleri nedeni ile HPLC, gibi kromatografik yöntemlerle yarışır düzeyde olduğu hatta HPLC metoduna tercih edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada elde edilen başarılı analiz sonuçları nedeniyle voltametik ve kromatografik (HPLC) yöntemler diğer ilaçların, insan idrarı, insan serumu gibi biyolojik sıvıların rutin analizlerinde de rahatlıkla uygulanabilir.

KAYNAKLAR

Adataş C.,2011. Parasetamol Tablet Preparatlarından EtkinMaddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Yakın Doğu Üniversitesi, K.K.T.C.

Anonim, 2014. http://en.wikipedia.org/wiki/Naproxen.

Aycan S., 1994. *Polarografik ve Voltametrik Teknikler***.** Yıldız Teknik Üniversitesi Yayını. İstanbul. s. 307.

Bard A.J., Faulkner L. R., 2001. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley and Sons. Inc. New York.

Biryol İ., Kabasakaloğlu M., Şentürk Z., 1989. Investigation of Mechanism of the Electrochemical Oxidation of Bamipine Hydrochloride by Voltammetry. *Analyst*. 114, 181 – 184.

Bond A.M., 1980. *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*. Marcel Dekker Inc. N.Y.

Can S., 2013. Asiklovir'in Poli (p-Aminobenzen Sülfonik Asit)-Modifiye Camsı Karbon Elektrotta İlaç Formlarından Miktarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.

Erdoğdu G., 1995. Bazı Biyokimyasal Moleküllerin İletken Polimer Elektrotlardaki Voltametrik Davranışlarının İncelenmesi. Doktora Tezi. İnönü Üniversitesi, Malatya.

Fagan D.T., Hu I.F., Kuwana T., 1985. Vacuum Heat Treatment for Activation of Glassy Carbon Electrode. *Analytical Chemistry*. 57: 2759 – 2763.

Gerlache M., Sentürk Z., Quarin G., Kauffmann J.M., 1997. Electrochemical Detection of H_2O_2 on a Gold Electrode. *Electroanalysis*. 9:1082-1092.

Greef R., Peat R., Peter L.M., Pletcher D., Robinson J., 1990. *Instrumental Methods in Electrochemistry*. London. Ellis Harwood Series in Physical Chemistry.

Hamilton R. J., Sewell P. A., 1982. *Introduction to High Performance Liquid Chromatography* (2bs.). London: Chapman and Hall.

Henden E., Gökçel H.İ., Ertaş F.N., 2001. Eser Analiz Yaz Okulu. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilimdalı. İzmir. 151 – 160.

Izutsu K., 2002. *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

Jenkinks G.M., Kawamura K., 1971. Structure of Glassy Carbon. *Nature*. 231:175-176.

Kandaz M., Sözbilir M., 2011. Kalem Grafit Elektrotla C Vitamini Tayini. Kimya Lisans Öğrencileri Araştırma Projesi Eğitimi Çalıştayı. Tübitak – Bideb. Çomü.

Kissinger P., Heineman W. R., 1996. Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry.

Kayıran S., Bozdağ Pehlivan S., Çelebier M., Ünlü N. 2010. Determination of Naproxen Sodium from Poly (Lactide-Co-Glycolide) Corneal Scaffolds. *Turk J. Pharma. Sci.* 7 (1): 57-68

Kaynak M.S., Şahin S.A., 2008. A New Hplc Approach for Determination of In-Vitro Solubility of Naproxen Sodium. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 28 (1): 49-62.

Meyer, V.R., 1988. *Practical High Performance Liquid Chromatography* (V. Cottrell, Çev.): John Wiley and Sons.

M.J., Pablos F., Gonza A.G., 1999. Simultaneous Determination of Caffeine and **Non**-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Pharmaceutical Formulations and Blood Plasma by Reversed-Phase HPLC from Linear Gradient Elution**.** *Talanta.* 49 (2): 453–459.

Nafaˆa A., Lotfi M., Meriem T., Khaled B., 2003. Determination of Naproxen in Pharmaceuticals by Differentialpulse Voltammetry at a Platinum Electrode. *Analytica Chimica Acta* 495 : 69–75.

Özdemir N., 2006. Karbon ve Metal Elektrotların Bazı Aromatik Aminlerle Elektrokimyasal Modifikasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.

Özkan S.A., Özkan Y., Şentürk Z., 1998. Electrochemical Reduction of Metronidazole at Activated Glassy Carbon Electrode and Its Determination in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 17: 3299 – 3305.

Özkan S.A., Biryol İ., Şentürk Z., 1994. An Activation Method for Glassy Carbon Electrode. *Turkish Journal of Chemistry.* 18: 34–38.

Skoog D.A., Leary J.J., 1996. *Principles of Instrumental Analysis*. 4th Ed. Saunders College Publishing, New York, p. 538.

Skoog D.A., Holler F.J., West D.M., 2000. *Enstrümental Analiz İlkeleri 7. Baskı*. Çeviri Editörleri Kılıç E. ve Ark., Bilim Yayıncılık – Ankara. s. 489 –492.

Skoog D.A., Holler F.J., West D.M., Crouch S.R., 2013. *Analitik Kimya Temel İlkeler* 8. Baskı. Çeviri Editörleri Kılıç E. ve Yılmaz H. Bilim Yayıncılık – Ankara. s. 142 – 174.

Snyder L.R., Glajch, J.L., Kirkland, J.J.,1988. *Practical HPLC Method Development*. New York: John Wiley and Sons.

Suryanarayanan V., Zhang Y., Yoshihara S., Shirakashi T., 2005. Voltammetric Assay of Naproxen in Pharmaceutical Formulations Using Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis.* 17 (11): 925-932.

Şentürk Z., Özkan S.A., Uslu B., Biryol I., 1996. Anodic Voltammetry of Fluphenazine at Different Solid Electrodes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 15: 365-370.

Tekin S., 2008. Platin Elektrot Yüzeylerine Tutturulmuş Organik Moleküllerin Elektrokimyasal Tekniklerle pKa Değerlerinin Tayini. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi.

Tunçel T., Bergisadi M., Akın L., Otuk G., Kuşcu İ., 1996. In-Vitro and In-Vivo Studies on Micro Capsules and Tabletted Micro Capsules Cephradine. *Pharmazie*. 51, 168-171.

Tural H., Gökçel H.İ., Ertaş F.N., 2003. *Enstrümental Analiz 1 Elektroanalitik Yöntemler*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir. 132 –144.

Türe M., 2009. Fenilefrin Hidroklorür'ün Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi ve Ticari İlaç Formlarından Miktarının Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.

Van der Linden W.E., Dieker J.W., 1986. Glassy Carbon as Electrode Material in Electroanalytical Chemistry. *Analytica Chimica Acta*. 199**:**1-24.

Wang J., 2000. *Analytical Electrochemistry***.** Copyright John Wiley δ Sons, Inc. 2nd Edition ISBN 0-471-28272-3.

Wang J., Hutchins L.D., 1985. Activation of Glassy Carbon Electrodes by Alterning Current Electrochemical Treatment. *Analytica Chimica Acta*. 167, 325 – 334.

Wang J., 2000. *Analytical Electrochemistry*. 2nd Edition. John Wiley and Sons. Inc. New York.

Yağmur S., 2005. Famotidin ve Natamisin'in Voltametrik Teknikler ile Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve İlaçlarda Kantitatif Tayinleri. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.

Yıldız A., Genç Ö., 1993. *Enstrümental Analiz*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları 1.Baskı, s. 352.

Yılmaz S., 2012. *Elektroanalitik Kimya*, Kriter Yayınları, İstanbul.

Yi-Hsin H., Yi-Bo L., Jen-Ai L., Chau-Yang C., An-Bang W, 2005. Assay of Naproxen by High-Performance Liquid Chromatography and Identification of Its Photoproducts by LC-ESI MS. *Biomedical Chromatography*. 20: 787–793.

Zuman P., Brezina M., 1962. *Polarographic Analysis in Pharmacy Progress in Polarography*. Vol. 2th Ed. Zuman P., Kolthoff I.M., New York, Intersence Publishers.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Suzan YANIK

Doğum Yeri : Rusçuk / BULGARİSTAN

Doğum Tarihi : 06.06.1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Balıkesir Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakültesi

Kimya Bölümü (2012)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakültesi

Kimya Anabilim Dalı (2014)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İLETİŞİM

E-posta Adresi : suzan.yanik@gmail.com