

**İVABRADİN ETKİN MADDESİNİN
ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞLARININ
İNCELENMESİ VE VOLTAMETRİK YÖNTEMLER İLE
TAYİNİ**

Bilge Kağan AKÇAY

Analitik Kimya Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Bilal YILMAZ**

Yüksek Lisans Tezi - 2015

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İVABRADİN ETKİN MADDESİNİN ELEKTROKİMYASAL
DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ VE VOLTAMETRİK
YÖNTEMLER İLE TAYİNİ**

Bilge Kağan AKÇAY

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

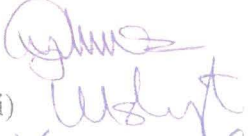

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Bilal YILMAZ**

**ERZURUM
2015**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

İVABRADİN ETKİN MADDESİNİN ELEKTROKİMYASAL
DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ VE VOLTAMETRİK YÖNTEMLER
İLE TAYİNİ

Bilge Kağan AKÇAY

Tez Savunma Tarihi	: 11.06.2015
Tez Danışmanı	: Doç. Dr. Bilal YILMAZ (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Mehmet ASLANOĞLU (Harran Üniversitesi) 
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Zühal GÜVENALP (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi	: Yrd. Doç. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi	: Yrd. Doç. Dr. Alptuğ ATILA (Atatürk Üniversitesi) 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM-2015

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLOLAR DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İvabradin.....	4
2.1.1 Etki Mekanizması.....	4
2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri.....	4
2.2. İvabradin İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	5
2.3. Voltametri ve Voltametrik Yöntemler.....	9
2.3.1. Dönüşümlü Voltametri (CV).....	10
2.3.1.1. Tersinir Sistemler.....	13
2.3.1.2. Tersinmez ve Yarı – Tersinir Sistemler.....	14
2.3.1.3. Adsorbsiyonun Dönüşümlü Voltametri İle İncelenmesi	14
2.3.2. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV).....	15
2.3.3. Kare Dalga Voltametri (SWV).....	16
2.4. Elektrokimyasal Ölçme Sistemi.....	17
2.5. Kullanılan Elektrotlar.....	18
2.6. Kullanılan Çözeltiler.....	18
2.6.1. Destek Elektrolit Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	18

2.6.2. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	19
2.7. Dönüşümlü Voltametri Deneyinin Yapılışı.....	19
2.8. Kare Dalga Voltametri Deneyinin Yapılışı	20
2.9. Diferansiyel Puls Voltametri Deneyinin Yapılışı.....	20
2.10. Yöntem Geçerlilik Testleri.....	21
2.10.1. Doğruluk ve Kesinlik	21
2.10.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite).....	22
2.10.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	22
2.10.4. Duyarlılık.....	23
2.10.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	23
2.10.6. Gözlenebilme (Teşhis) Sınırı (LOD).....	23
2.10.7. Geri Kazanım.....	23
3. MATERYAL VE METOT.....	24
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	24
3.2. Kullanılan Cihazlar	24
3.3. Voltametrik Yöntem Şartları.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Voltametri Yöntemi.....	25
4.1.1. Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları.....	25
4.1.2. İvabradinin Adsorpsiyon Özelliği	29
4.1.3. Pik Akımına pH'nın Etkisi	29
4.1.4. Pik Potansiyeline pH'nın Etkisi	31
4.2. Doğrusal Taramalı Voltametri (LSV) Deneyinin Yapılışı	31
4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	32
4.2.2. Doğrusal Taramalı Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)	33

4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi	33
4.2.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	34
4.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	34
4.2.2.4. Kararlılık (Stabilite).....	35
4.2.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	35
4.2.2.6. Geri Kazanım	36
4.3. Kare Dalga Voltametri (SWV) Deneyinin Yapılışı	37
4.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	37
4.3.2. Kare Dalga Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)	38
4.3.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi	38
4.3.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	39
4.3.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	39
4.3.2.4. Kararlılık (Stabilite)	40
4.3.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	41
4.3.2.6. Geri Kazanım	41
4.4. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Deneyinin Yapılışı	42
4.4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	42
4.4.2. Diferansiyel Puls Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)	43
4.4.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi	43
4.4.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	45
4.4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	45
4.4.2.4. Kararlılık (Stabilite)	45
4.4.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	46
4.4.2.6. Geri Kazanım	47

5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR.....	61
EKLER.....	69
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	69
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	70

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve hazırlanmasında ilgisini, fikirlerini, yardımlarını esirgemeyen ve bu yolda her türlü fedakârlığı yapmaktan kaçınmayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bilal YILMAZ'a, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Voltametri yöntemi çalışmalarımnda yardımcı olan Selçuk KABAN'a, laboratuvar çalışmalarımı kimyasal madde ve malzeme yönünden 2014/35 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, bana her zaman güvenen, inanan ve hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Fikret AKÇAY ve annem Latife AKÇAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilge Kağan AKÇAY

ÖZET

İvabradin Etkin Maddesinin Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Voltametrik Yöntemler ile Tayini

Amaç: Bu çalışmada ivabradinin elektrokimyasal davranışı, camı karbon elektrotta Britton-Robinson tampon (pH 2) ortamında Dönüşümlü Voltametri, Doğrusal Taramalı Voltametri, Kare Dalga Voltametri ve Diferansiyel Puls Voltametri yöntemleri ile incelendi.

Materyal ve Metot: İvabradinin dönüşümlü voltamogramı yaklaşık olarak camı karbon elektrotta +1.21 V da yükseltgenme piki gözlenmiştir. Doğrusallık, kesinlik, doğruluk, stabilite, tayin edilebilme sınırı ve miktar tayin sınırı gibi parametreler ICH Guidelines'e göre çalışıldı.

Bulgular: Doğrusal Taramalı Voltametri, Karedalga Voltametri ve Diferansiyel Puls Voltametri yönteminin kalibrasyon eğrileri 5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında doğrusaldır. İvabradinin için gün-içi ve günler arası kesinlik değerleri %5.34'den ve doğruluk (bağlı hata) %6.29'dan küçüktür.

Sonuç: Geliştirilen bu yöntemler ile ivabradin etkin maddesini içeren Coralan preparatında miktar tayini yapıldı. Elde edilen analiz sonuçları değerlendirildi ve geliştirilen yöntemler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Anahtar Kelimeler: Diferansiyel puls voltametri, doğrusal taramalı voltametri, dönüşümlü voltametri, ivabradin, kare dalga voltametri.

ABSTRACT

Investigation of Electrochemical Behaviors of Ivabradine Effective Substance and Determination with Voltammetric Methods

Aim: In this study, electrochemical behaviors of ivabradine was investigated on glassy carbon electrode in Britton-Robinson buffer (pH 2) by Cyclic Voltammetry, Linear Sweep Voltammetry, Square Wave Voltammetry and Differential Puls Voltammetry methods.

Material and Method: Cyclic voltammogram of ivabradine was observed oxidation peak at about +1.21 V on glassy carbon electrode. Parameters such as linearity, precision, accuracy, stability, limit of detection and limit of quantification were studied according to the ICH Guidelines.

Results: Calibration curves of Linear Sweep Voltammetry, Square Wave Voltammetry and Differential Puls Voltammetry methods were linear between the concentration range of 5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Within- and between-day precision values for ivabradine were less than 5.34% and accuracy (relative error) was better than 6.29%.

Conclusion: Quantitation of ivabradine was performed with these methods which is developed in Coralan pharmaceutical preparation containing the ivabradine effective substance. Obtained analysis results were evaluated and the developed methods were compared as statistics.

Key Words: Cyclic voltammetry, differential puls voltammetry, ivabradine, linear sweep voltammetry, square wave voltammetry.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSS	: Bağıl standart sapma
CV	: Dönüşümlü voltametri
DPV	: Diferansiyel puls voltametri
ICH	: International conference on harmonization
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
LSV	: Doğrusal taramalı voltametri
SWV	: Kare dalga voltametri

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. İvabradinin Kimyasal Yapısı.....	5
Şekil 2.2. Dönüşümlü Voltmetre İçin Uyarma Sinyalinin Dalga Şekli	11
Şekil 2.3. Yük. \leftrightarrow İnd. Reaksiyonuna Ait Tersinir (Eğri 1), Tersilmez ($\alpha=0.5$) (Eğri 2) ve Tersinir Fakat İnd Türünün Elektroinaktif Bir Türe Dönüştüğü Bir Sistem (Eğri 3) İçin Dönüşümlü Voltamogramlar.....	12
Şekil 2.4. Diferansiyel Puls Voltametesinde Puls Tipi Uyarma Sinyalinin Dalga Şekli	16
Şekil 2.5. Kare Dalga Voltametrinde Puls Tipi Uyarma Sinyalinin Dalga Şekli	16
Şekil 4.1. $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ İvabradinin BR Tamponu Ortamında (pH=2) Camsı Carbon Elektrotta Elde Edilen Dönüşümlü Voltamogramları ($v:0.1 \text{ V/s}$, 1:Destek Elektrolit, 2:İvabradine Ait Anodik Pik)	25
Şekil 4.2. $30 \mu\text{g} \text{ ml}^{-1}$ İvabradinin BR Tamponu Ortamında (pH=2) Camsı Carbon Elektrotta Elde Edilen Doğrusal Taramalı Voltamogramları ($v:0.025 \text{ V s}^{-1}$, 0.05 V s^{-1} , 0.1 V s^{-1} , 0.2 V s^{-1} , 0.4 V s^{-1} , 0.6 V s^{-1} , 0.8 V s^{-1}).....	26
Şekil 4.3. $30 \mu\text{g} \text{ ml}^{-1}$ İvabradinin BR Tamponu Ortamında (pH=2) Camsı Carbon Elektrotta Elde Edilen Tarama hızına Karşı Doğrusal Taramalı Pik Akım Grafiği	27
Şekil 4.4. $30 \mu\text{g} \text{ ml}^{-1}$ İvabradinin BR Tamponu Ortamında (pH=2) Camsı Carbon Elektrotta Elde Edilen Tarama hızının Kareköküne Karşı Doğrusal Taramalı Pik Akım Grafiği	28
Şekil 4.5. $30 \mu\text{g} \text{ ml}^{-1}$ İvabradinin BR Tamponu Ortamında (pH=2) Camsı Carbon Elektrotta Elde Edilen Tarama hızının Logaritmasına Karşı Doğrusal Taramalı Logaritmik Pik Akım Grafiği	28
Şekil 4.6. $30 \mu\text{g} \text{ ml}^{-1}$ İvabradinin Farklı Tampon Çözeltilerinde Camsı Carbon Elektrotta Elde Edilen pH İle Doğrusal Taramalı Pik Akımının Değişimi Grafiği	30

Şekil 4.7. 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ İvabradinin Farklı Tampon Çözeltilerinde Camsı Carbon Elektrotta Elde Edilen pH ile Doğrusal Taramalı Pik Potansiyelinin Değişimi Grafiği	31
Şekil 4.8. İvabradin Etkin Maddesinin BR Tamponu Ortamında (pH=2) Doğrusal Taramalı Voltamogramları (5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$).....	32
Şekil 4.9. Doğrusal Taramalı Voltametrik Yöntem Kalibrasyon Eğrisi.....	33
Şekil 4.10. Coralan Farmasotik Preparatının Doğrusal Taramalı Voltametrik Voltamogramları (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	36
Şekil 4.11. İvabradin Etkin Maddesinin BR Tamponu Ortamında (pH=2) Kare Dalga Voltamogramları (5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$).....	38
Şekil 4.12. Kare Dalga Voltametrik Yöntem Kalibrasyon Eğrisi	38
Şekil 4.13. Coralan Farmasötik Preparatının Kare Dalga Voltametrik Voltomogramları (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	41
Şekil 4.14. İvabradin Etkin Maddesinin BR Tamponu Ortamında (pH=2) Diferansiyel Puls Voltamogramları (5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	43
Şekil 4.15. Diferansiyel Puls Voltametrik Yöntem Kalibrasyon Eğrisi	44
Şekil 4.16. Coralan Farmasötik Preparatının Diferansiyel Puls Voltametrik Voltomogramları (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	47

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. Doğrusal Taramalı Voltametik Çalışmada İvabradine Ait Kalibrasyon Eğrisinin İstatistiki Değerleri.....	34
Tablo 4.2. Doğrusal Taramalı Voltametik Yönteminin Güniçi ve Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Değerleri	35
Tablo 4.3. İvabradinin Doğrusal Taramalı Voltametik Yöntemle Belirlenen Kararlılık (Stabilite) Değerleri.....	35
Tablo 4.4. Doğrusal Taramalı Voltametik Yöntemle Belirlenen Farmasötik Preparatların Güniçi ve Günler Arası Geri Kazanım Değerleri.....	37
Tablo 4.5. Kare Dalga Voltametik Çalışmada İvabradine Ait Kalibrasyon Eğrisinin İstatistiki Değerleri.....	39
Tablo 4.6. Kare Dalga Taramalı Voltametik Yönteminin Güniçi ve Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Değerleri	40
Tablo 4.7. İvabradinin Kare Dalga Voltametik Yöntemle Belirlenen Kararlılık (Stabilite) Değerleri.....	40
Tablo 4.8. Kare Dalga Voltametik Yöntemle Belirlenen Farmasötik Preparatların Güniçi ve Günler Arası Geri Kazanım Değerleri.....	42
Tablo 4.9. Diferansiyel Puls Voltametik Çalışmada İvabradine Ait Kalibrasyon Eğrisinin İstatistiki Değerleri.....	44
Tablo 4.10. Diferansiyel Puls Voltametik Yönteminin Güniçi ve Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	45
Tablo 4.11. İvabradinin Diferansiyel Puls Voltametik Yöntemle Belirlenen Kararlılık (Stabilite) Değerleri	46
Tablo 4.12. Diferansiyel Puls Voltametik Yöntemle Bilinen Farmasötik Preparatın Güniçi ve Günler Arası Geri Kazanım Değerleri	48

1. GİRİŞ

Kalp ve damar sistemi hastalıkları, günümüzde, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde başta gelen mortalite (ölüm) ve morbidite (işgörmezlik) nedenlerindedir. Koroner kalp hastalıklarına aynı zamanda “koroner arter hastalığı”, iskemik kalp hastalığı” ve “aterosklerotik kalp hastalığı” isimleri de verilmiştir. Akut miyokard infarktüsü geçiren ve hayatta kalan bir hastanın mortalite ve morbiditesi genel popülasyona göre 1.5-15 kat yükselmektedir. Türkiye’de ölüm nedenleri arasında koroner kalp hastalığına bağlı ölüm birinci sırada gelmektedir.^{1,2} Gerçek bir global kalp damar hastalıkları (KDH) epidemisinin tam ortasında olduğumuz bu çağda, dünyanın tüm bölgelerinde KDH mortalitenin en önde gelen nedenidir. KDH; koroner kalp hastalıkları, inme, konjestif kalp yetersizliği, konjenital kalp hastalıkları, romatizmal kalp hastalıkları, hipertansif hastalıklar ve aritmiler gibi; kalbin ve kan damarlarının tüm hastalıklarını içeren hastalık grubudur. Koroner kalp hastalıkları, kalbi besleyen koroner arterlerdeki daralmaya bağlı olarak gelişir. Koroner daralmalar sıklıkla ateroskleroza bağlı olup kalbin kan dolaşımının bozulmasına ve kalpte iskemi oluşmasına neden olur. Kalpte oluşan iskemi kararlı angina pektoris, kararsız angina pektoris, miyokard infarktüsüne veya ani ölümlere yol açabilir.³⁻⁷

Günümüzde KDH tedavisi uygulamaları değişik klinik durumlar için değişik şekillerde yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan KDH ilaçlarının başında ivabradin etkin maddesini içeren farmasötik preparatlar gelmektedir. İvabradin içeren ilaçlar kalp hastalıklarında yaygın olarak kullanılır. İvabradin içeren ilaçlar günümüzde 5 ve 10 mg tablet dozda Coralan ticari adı ile satılmaktadır

Son yıllarda enstrümantal yöntemler yanında, elektrokimyasal ve biyolojik reaksiyonların arasındaki benzerlikler, elektrot ve metabolizma mekanizmaların

benzer ilkelere sahip olmasından dolayı elektro analitik yöntemler de, ilaç etkin maddelerinin hem nicel tayini hem de etki mekanizmalarının nasıl yürüdüğü hakkında bilgiler edinmek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

İvabradin etkin maddesi için yapılan literatür araştırmasında biyolojik sıvılarda miktar tayinine yönelik floresans dedektörlü HPLC⁸ ve LC-MS^{9,10} yöntemlerine ulaşılmıştır. İvabradinin farmasötik preparatlarda miktar tayini ile ilgili olarak da HPLC yöntemlerine ulaşılmıştır.¹¹⁻¹⁴ Ancak kare dalga voltametri, diferansiyel puls voltametri gibi elektro analitik yöntemlerle tayinlere rastlanmadığından dolayı ivabradin etkin maddesinin tayini için voltametrik yöntemler geliştirilmesi düşünülmüştür.

İlaç etkin maddelerinin fiziksel ve farmakokinetik yapısındaki değişikliklerin hepsi, moleküllerin yükseltgenme/indirgenme davranışlarındaki değişikliklere bağlıdır, dolayısıyla bu değişikliklerin izlenmesinde elektrokimyasal teknikler önemli rol oynamaktadır. Günümüzün modern analitik tekniklerinden olan (yüzeyde tutunma olaylarına dayalı) adsorptif sıyırma, diferansiyel puls ve kare dalga voltametrisi/ polarografisi tekniklerinin kullanılması ile geliştirilmiş olan yöntemlerin duyarlı, seçici, basit, hızlı, bir ön işleme gerek duyulmaması ve uygulamada değişikliğe açık olması ilaç dozaj formlarından (tablet, kapsül, şurup, ampul vb.) ve vücut sıvılarından (kan, idrar, anne sütü vb.) analizlerine uygulanabilirliği açısından özel bir yeri vardır. Özellikle adsorptif sıyırma yöntemleri ilaç etkin maddelerinin düşük derişimlerdeki analizlerini mümkün kılmaktadır.

Bu çalışmada ivabradin ilaç etkin maddesinin öncelikle elektrokimyasal davranışı, dönüşümlü voltametri gibi yöntemler ile tersinirlik, aktarılan elektron sayısı, adsorpsiyon özellikleri gibi özelliklerin incelenmesi düşünülmüştür. Bu

verilerin ışığı altında nicel tayini için yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla, pH, derişim, tarama hızı gibi deneysel parametreler değiştirilerek, en uygun deneysel koşullar belirlenmiş ve bu koşullarda nicel tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemler istatistiksel olarak değerlendirilip kesinlik, duyarlık, seçicilik gibi parametreler incelenerek yöntemin analitik amaç için uygunluğu araştırılmıştır. Ayrıca geliştirilen yöntemler ivabradin içeren farmasötik preparatlardan Coralan tablete uygulanmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel açıdan da karşılaştırmış ve elektrokimyasal yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İvabradin

İvabradin, beta bloker ilaçları kullanmaması gereken hastalarda, bu ilaçlara karşı intolerans görünen hastalarda ve tolere edilebilecek en fazla dozda beta bloker kullanan fakat anjinası süren ve kalp hızı dakikada 60'tan fazla olan hastalarda kullanılır.³⁻⁷

2.1.1. Etki Mekanizması

İvabradin izole olarak kalp atım hızını azaltan bir ilaçtır. Kardiyak olarak sinüs düğümünde spontan diyastolik depolarizasyonu kontrol eden ve kalp atım hızını düzenleme yoluyla etki eder. Normal sinüs ritmi olan ve beta blokerler için kontrendikasyonu veya intoleransı olan hastalarda kronik stabil angina pektorisin semptomatik tedavisinde endikedir.

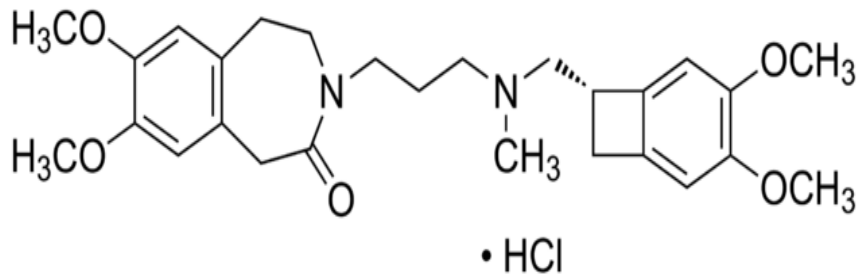
2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

İvabradin oral yoldan alındıktan sonra hızla ve neredeyse tamamen gastrointestinal sistemden emilir ve doruk plazma düzeyine aç karnına yaklaşık 1 saat sonra ulaşılır. Film kaplı tabletlerin mutlak biyoyararlanımı, barsak ve karaciğerdeki ilk geçiş etkisi sebebiyle yaklaşık %40'tır. Gıda alımı emilimi yaklaşık 1 saat geciktirmekte ve plazmaya maruz kalmayı %20-30 artırmaktadır. Maruz kalmada kişiler arası değişkenliği azaltmak amacıyla, tabletlerin yemekle beraber alınması önerilmektedir. İvabradin plazma proteinlerine yaklaşık %70 bağlanır ve hastalarda sabit durumda dağılım hacmi 100 litreye yakındır. Önerilen doz olan günde iki kez 5 mg'ın süre gelen kullanımından sonra maksimum plazma konsantrasyonu yaklaşık 20 ng ml⁻¹'dir. Sabit durumda ortalama plazma konsantrasyonu 10 ng ml⁻¹'dir.

İvabradin, yalnız sitokrom P450 ile karaciğer ve barsakta oksidasyona uğrar ve kapsamlı şekilde metabolize olur. Başlıca aktif metaboliti N-desmetillenmiş türevidir. İvabradinin plazmada esas yarılanma ömrü 2 saattir. Eğri altı alanın %70-75'i ve etkili yarı ömrü 11 saattir. Total klerensi yaklaşık 400 ml dak⁻¹, renal klerensi ise yaklaşık 70 ml dak⁻¹'dir. Metabolitlerin atılımı, aynı oranda dışkı ve idrar ile olur. Oral dozun yaklaşık %4'ü değişmeden idrar yoluyla atılır. İvabradinin farmakokinetiği 0.5 mg-24 mg oral doz aralığında lineerdir.

2.1.3. Kimyasal Yapısı

İvabradin 505.05 g mol⁻¹ molekül kütlesine ve C₂₇H₃₆N₂O₅ · HCl kimyasal formülüne sahiptir. Kimyasal yapısı aşağıda verilmiştir.



Şekil 2.1. İvabradinin kimyasal yapısı

2.2. İvabradin ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Selva ve ark.¹⁵ ivabradinin invitro koşullarda miktar tayini için UV dedektörlü bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada C₁₈ Phenomenex Kinetex ters faz kolon (5 µm, 4.6 mm x 150 mm), 10 mM amonyum asetat tamponu (pH 6.0):metanol (50:50, h/h) mobil fazı, 285 nm dedektör dalga boyu, 1.0 ml dak⁻¹ kolon akış hızı parametreleri ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık için 70.69-131.29 µg ml⁻¹ derişim aralığında kalibrasyon eğrisi türetilmiş olup, eğrinin korelasyon katsayısı 0.999'dan büyük olarak tespit

edilmiştir. Kesinlik çalışması için ivabradinin düşük, orta ve yüksek derişimlerde 3 farklı standart çözeltileri hazırlanmış olup kesinlik BSS ile doğruluk bağıl hata ile verilmiştir. Kesinlik gün içi-günler arası % BSS ile değerlendirilerek % 0.52'den daha küçük, doğruluk bağıl hata ile verilmiş olup % 0.38'den küçük olarak belirlenmiştir. Ayrıca geri kazanım çalışması yapılmış olup ivabradinin geri kazanımı % 99.03 bulunmuştur. Geliştirilen yöntem ile ivabradinin kalite kontrol ve stabilite çalışmalarında kullanılabileceği gösterilmiştir.

Francois-Bouchard ve ark.¹⁶ insan plazmasında ivabradin miktarının tayini için duyarlı ve seçici bir LC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada Kromasil-C₁₈ kolon (5 µm, 250 mm x 3 mm), %0.1 trifloroasetik asit içeren 20 mM amonyum format tamponu-metanol (64:36, h/h) mobil fazı, 0.5 ml dak⁻¹ kolon akış hızı, 20 µl injeksiyon hacmi parametreleri ile ivabradinin insan plazmasındaki tayini için bir LC-MS yöntemi geliştirilmiştir. İvabradin için plazma ve idrardaki kalibrasyon eğrisi 0.1-20 ng ml⁻¹ derişimlerinde türetilmiş olup eğrinin korelasyon katsayısı (r) 0.996'dan büyük olarak bulunmuştur. Kesinlik bağıl standart sapma ile ifade edilmiş olup gün içi ve günler arası BSS % 6.5'dan küçük bulunmuştur. Doğruluk bağıl hata ile ifade edilmiş olup gün içi ve günler arası bağıl hata % 20'den küçük bulunmuştur. Çalışmanın plazmadan geri kazanımı sıvı-sıvı faz ekstraksiyon ile gerçekleştirilmiş olup geri kazanım % 87 olarak bulunmuştur. İvabradinin seri dilüsyonları kullanılarak yöntemin LOQ değeri 0.1 µg ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Geliştirilen ve valide edilen yöntemin uygulaması için 1 sağlıklı gönüllüye 10 mg olacak şekilde oral yoldan ivabradin tableti içirilmiştir. 0 ile 24 saat arası farklı zamanlarda gönüllü hastadan kan alınıp sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonucu kromatogramlar alınmış ve pik alanları oranından kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine koyularak ivabradinin plazmadaki derişimleri bulunmuştur. Sonuç olarak

ivabradinin hassas bir şekilde insan plazmasında LC-MS yöntemi ile tayin edilebileceği gösterilmiştir.

Klippert ve ark.¹⁷ ivabradinin insan plazmasında tayin edilebilmesi için basit ve hassas bir HPLC yöntemi geliştirmişler. Çalışmada ters-faz Nova-Pak C₁₈ kolon, asetonitril- 25 mM fosfat tamponu mobil fazı (22:78), 1 ml dak⁻¹ kolon akış hızı, 328 nm ve 283 nm, eksitasyon ve emisyon dalga boylu floresans dedektör kullanılarak HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Doğrusallık 0.5-75 ng ml⁻¹ derişim aralığında oluşturulmuş ve kalibrasyon eğrisi türetilip her enantiyomer için korelasyon katsayısı (r) 0.99'dan büyüktür. Geliştirilen ve valide edilen yöntemin uygulaması için sağlıklı gönüllülere 8 mg tek doz ivabradin tablet dozu oral yoldan içirilmiştir. Farklı zamanlarda gönüllülerden kan alınıp sıvı sıvı ekstraksiyonu sonucu kromatogramlar alınmış ve pik alanları kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine koyularak ivabradin derişimleri bulunmuştur. Sonuç olarak ivabradinin insan plazmasında farmakokinetiğinin HPLC yöntemi ile tayin edilebileceği gösterilmiştir.

Lu ve ark.¹⁸ insan plazmasında ivabradinin tayini için için doğru, basit ve seçici bir yöntem olan LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada Diamonsil C₁₈ ters faz kolon (5 µm, 150 mm x 4.6 mm), % 0,02 formik asit içeren 5 mM amonyum asetat tamponu ve metanol mobil fazı (80:20, h/h) , 0.3 ml dak⁻¹ kolon akış hızı, 5 µl injeksiyon hacmi kullanılarak plazma örneklerinde ivabradin miktar analizi yapılmıştır. 0.1013-101.3 ng ml⁻¹ derişim aralığında kalibrasyon eğrisi türetilmiş, eğrinin korelasyon katsayısı 0.99, regresyon denklemi $y=0.045181x+0.0001796$, yöntemde ivabradinin miktar tayin alt sınırı 0.1013 ng ml⁻¹, kesinlik % BSS ile değerlendirilmiş ve gün içi % 5.5 günlerarası % 15'den küçük ve plazmadan geri kazanım % 75.7 olarak belirlenmiştir. Ayrıca stabilite

çalışmaları yapılmış olup oda sıcaklığı, + 4 °C de 24 saat, -20 °C bir ay stabil olduğu gözlenmiştir. Önerilen LC-MS/MS yönteminde kullanılan plazma örneği 100 µl'dir. Geliştirilen ve valide edilen yöntemin uygulaması için bir gönüllüye 5 mg olacak şekilde oral yoldan ivabradin tablet içirilmiştir. Farklı zamanlarda hastadan kan alınıp sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonucu kromatogramlar alınmış ve pik alanı kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine koyularak ivabradin derişimleri bulunmuştur. Maksimum derişim 35.98 ng ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak ivabradinin insan plazmasında LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilebileceği gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada Maheshwari ve ark.¹⁹ farmasötik preparatlarda ivabradinin belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada RP C₁₈ ters faz kolon (5µm, 250 mm x 4,6 mm), %0.5 formik asit çözeltisi (pH 7)-asetonitril (65:35; h/h) mobil fazı, 0.7 ml dak⁻¹ kolon akış hızı, 10 µl enjeksiyon hacmi ve 286 nm dedektör dalga boyu çalışma parametrelerini kullanılmıştır. İvabradin etkin maddesinin alıkonma zamanı 8.6 dakika civarındadır. İvabradin etkin maddesinin kromatogramlarının alanı ile derişimi göz önünde bulundurularak kalibrasyon eğrisi türetilmiştir. Eğrinin regresyon denklemi $y=64949x$ ve korelasyon katsayısı (r) 0.9989 olarak tayin edilmiştir. Kesinlik bağıl standart sapma ile ifade edilmiş olup gün içi ve günler arası % BSS % 1.10'dan küçük bulunmuştur. Çalışmanın doğruluğu bağıl hata ile verilmiş olup gün içi ve günler arası bağıl hata % 0.21'den küçük bulunmuştur. Geliştirilen ve valide edilen HPLC yöntemi ivabradin içeren bir farmasötik dozaj formuna uygulanmış ve tablettten geri kazanım % 98 ile % 102 arasında bulunmuştur. Sonuç olarak geliştirilen yöntemin farmasötik preparatlarda ivabradin etkin maddesinin tayininde başarı ile kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

2.3. Voltametri ve Voltametrik Yöntemler

Elektrokimya, çözücülerde homojen olarak ya da elektrot çözücü ara yüzeyinde heterojen olarak meydana gelen yük ayrılması ve yük aktarımı ile ilişkili olan olaylarla ilgilenir. Elektrokimya uzun bir geçmişe sahiptir ve yaklaşık 200 yıl önce Volta'nın elektrik pilini 1799 yılında keşfi ile başlar. Son yıllardaki ilerlemeler oldukça fazladır. Bugün, bilim ve teknolojinin yeni alanlarının geliştirilmesinde önemli rol oynar ve küresel enerji ve çevre sorunlarının çözümüne gerekli katkılar yapar.²⁰

Elektrokimya, elektriksel ve kimyasal etkilerin birbiri arasındaki ilişkileriyle ilgilenen bir kimya dalıdır. Elektrokimyanın büyük bir kısmı, bir elektrik akımının geçmesinin neden olduğu kimyasal değişikliklerin araştırılmasıyla ve kimyasal reaksiyonlar sonucu elektrik enerjisinin üretilmesiyle ilgilenir. Aslında, elektrokimya, çok sayıda farklı olayların, araçların ve teknolojilerin yer aldığı bir daldır.²¹

Voltametri, potansiyel, akım, elektrik yük miktarı ile madde miktarı arasındaki ilişkiye dayanan elektroanalitik bir yöntemdir. Voltametrik yöntemlerin bir kısmında potansiyel sabit tutulur veya çeşitli şekillerde değiştirilerek madde miktarına bağlı olarak oluşan akım miktarı incelenir. Bu elektroanalitik tekniklerle maddelerin, kalitatif ve kantitatif analizleri yapılabileceği gibi elektrot reaksiyonlarının mekanizmaları da incelenebilir.

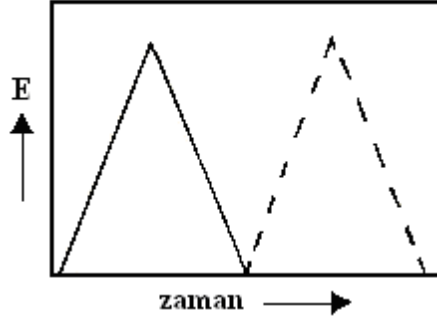
Ayrıca maddelerin çözeltilerdeki kararlılıkları ve çeşitli fizikokimyasal sabitlerinin de tayinini yapmak mümkündür. Voltametrizde, çalışma elektrodunun potansiyeli zamanla değiştirilirken akım ölçülür. Elektroda, zamanın bir fonksiyonu olarak farklı potansiyellerin uygulanmasıyla oluşan farklı şekillerdeki potansiyel-zaman fonksiyonlarına uyarma sinyali denir. Aşağıda, voltametrizde

yaygın olarak kullanılan uyarma sinyallerinden ve kimyasal sistemlerin incelenmesinde uygulanan çeşitli elektrokimyasal yöntemlerden bu tez çalışmasında kullanılanlar kısaca anlatılmaktadır.

2.3.1 Dönüşümlü Voltametri (CV)

Bu yöntemde, potansiyel, üçgensel potansiyel döngüsü verecek şekilde Şekil 2.2'de görüldüğü gibi, E_1 'den E_2 'ye ileri ve E_2 'den E_1 'e geriye doğru doğrusal olarak taranırken oluşan akım ölçülür. Hücrede oluşan akımın potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilmesiyle elde edilen akım-potansiyel eğrilerine dönüşümlü voltamogram denir. Bir voltamogram örneği Şekil 2.2'de verilmiştir. Bu şekilde, $Yük + ne^- \rightarrow İnd$ reaksiyonu için çözeltilerde sadece Yük'ün bulunduğu çeşitli dönüşümlü voltamogram örnekleri görülmektedir. Eğri 1, $Yük + ne^- \rightarrow İnd$ reaksiyonu tersinir olduğunda elde edilir. İleri doğru taramada, doğrusal taramalı voltametrideki (LSV) gibi, Yük'ün İnd'e indirgenmesi ile katodik bir pik elde edilir. Geriye doğru taramada, ileri doğru tarama süresince meydana gelen İnd'in Yük'e tekrar yükseltgenmesinden kaynaklanan, anodik bir pik gözlenir. Tersinir reaksiyonlar için, katodik ve anodik pik akımlarının büyüklükleri ($|ip^k| = |ip^a|$) eşittir ve katodik pik potansiyeli (Ep^k) anodik pik potansiyelinden (Ep^a) $(58/n)$ mV daha negatiftir. Bunlar, tersinirlik için önemli parametrelerdir. Ayrıca, formal redoks potansiyelini elde etmek için kullanılan yarı dalga potansiyeli, $E_{1/2} = (Ep^k + Ep^a)/2$ şeklinde bulunur. Tersinirliğin azalması ile iki pik potansiyeli arasındaki fark artar. Eğri 2, önemli derecede tersinmez olan sistemler içindir. Eğri 1 ile karşılaştırıldığında, katodik pik çok daha negatif, anodik pik ise çok daha pozitif potansiyeldedir. Sistem tamamen tersinmez ise, anodik pik ölçülebilen potansiyel aralığında görünmez. Tersinmez dönüşümlü voltamogram eğrisinden, genellikle bir

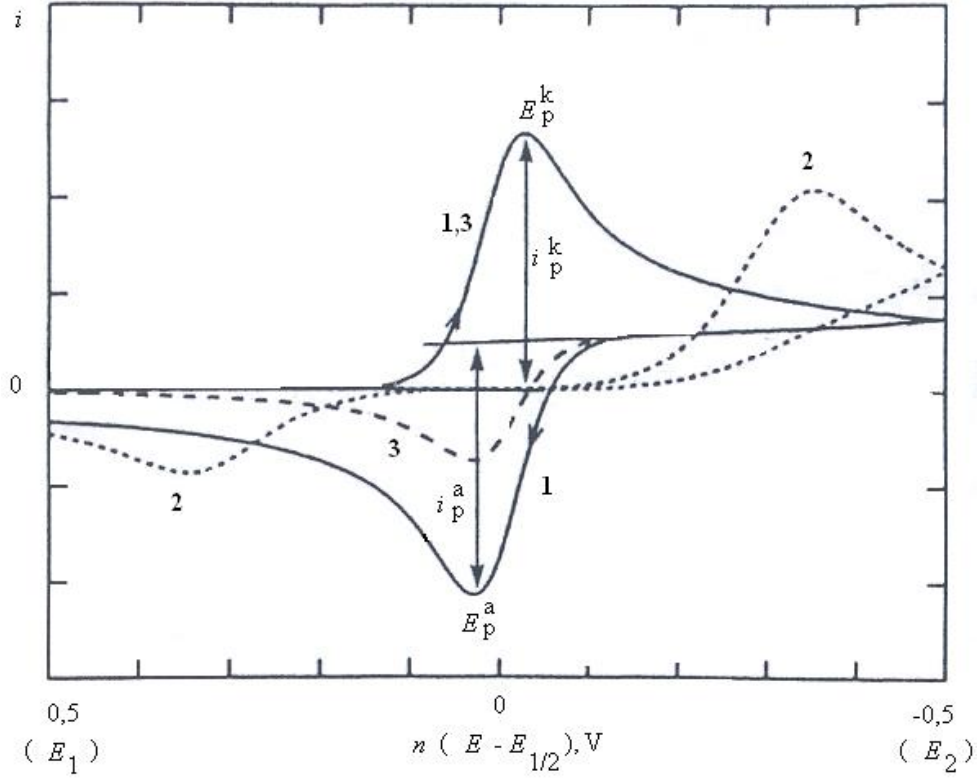
simülasyon yöntemi ile elektrot reaksiyonu için kinetik parametreler (hız sabiti ve transfer katsayısı) hesaplanabilir.



Şekil 2.2. Dönüşümlü voltametri için uyarma sinyalinin dalga şekli

Eğri 3, İnd'in tersinir olarak Yük'e tekrar yükseltgenebildiği, tekrar yükseltgenmeden önce, İnd'in bir kısmının elektroaktif olmayan A türüne dönüşebildiği bir durum içindir (Yük ↔ İnd A). Katodik pik Eğri 1'deki gibi aynı şekilde görünür, fakat anodik pik akımı Eğri 1'dekinden daha küçük olur. Anodik pik akımındaki azalmadan, k hız sabitini elde edebiliriz. Dönüşümlü voltametrde, potansiyel tarama hızı geniş bir aralıkta değiştirilebilir.²⁰

Dönüşümlü voltametri, susuz çözeltilerdeki elektrokimyasal çalışmalarda en kullanışlı yöntemlerden biridir. Özellikle, kararsız bir ara ürün veya ürün içeren elektrot reaksiyonlarının incelenmesinde faydalıdır. Elde edilen voltamogramlar incelenerek reaksiyon mekanizmaları tahmin edilebilir ve kararsız türlerin termodinamik ve kinetik özellikleri belirlenebilir. Ayrıca, kimyasal ve elektrokimyasal reaksiyonların her biri farklı reaksiyon hızlarına ve tersinirliklere sahiptir. Bunların hepsi, voltamogramlara yansır. Potansiyel aralığı, tarama hızı, sıcaklık, elektrodun cinsi, çözeltinin bileşimi gibi çeşitli parametreleri değiştirerek bir elektrot reaksiyonunun dönüşümlü voltamogramı alınır ve voltamogramlar uygun bir şekilde analiz edilirse, elektrot reaksiyonu ile ilgili bilgi edinilebilir.²⁰



Şekil 2.3. Yük \leftrightarrow İnd reaksiyonuna ait tersinir (Eğri 1), tersinmez ($\alpha = 0.5$) (Eğri 2) ve tersinir fakat İnd türünün elektroaktif bir türe dönüştüğü bir sistem (Eğri 3) için dönüşümlü voltamogramlar

Dönüşümlü voltametri tekniğinin, nicel amaçla kullanımı seyrek olmakla beraber, elektrokimyasal reaksiyonlar hakkında nitel bilgi edinilmesinde en yaygın olarak kullanılan teknik olmasının nedeni, redoks olaylarının termodinamiği, heterojen elektron-transfer reaksiyonlarının kinetiği ve takip eden kimyasal reaksiyonlar ve adsorpsiyon olaylarıyla ilgili güvenilir bilgileri hızlı bir şekilde sağlamasıdır.

Dönüşümlü voltametri elektroanalitik çalışmalarda genellikle ilk olarak uygulanan deneysel basamaktır. Özellikle, elektroaktif türlerin redoks potansiyellerinin yerinin hızlı bir şekilde belirlenmesini ve ortamın redoks reaksiyonuna etkisinin değerlendirilmesini sağlar.²²

2.3.1.1. Tersinir Sistemler

Tersinir bir çift için pik akımı (25 °C), Randles-Sevcik eşitliğiyle verilir.

$$i_p = (2.69 \times 10^5)^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2}$$

Burada n , aktarılan elektron sayısı; A , elektrodun alanı (cm^2); C , derişim (mol/cm^3); D , difüzyon katsayısı (cm^2/s) ve ν , tarama hızıdır (V/s). Buna göre, akım, derişimle doğru orantılıdır ve tarama hızının kareköküyle artar. Basit bir tersinir çift için, anodik pik akımının katodik pik akımına oranı 1'dir. Bu oran, redoks reaksiyonuna eşlik eden kimyasal reaksiyonların varlığından oldukça güçlü bir şekilde etkilenir.

Potansiyel eksenindeki piklerin konumu, redoks işleminin formal potansiyeline bağlıdır. Bu yüzden, pik potansiyelleri farkı, aktarılan elektron sayısının belirlenmesinde bir davranış kriteri olarak kullanılabilir. Buna göre, hızlı bir elektronlu reaksiyon, 59 mV'luk bir ΔE_p gösterir. Katodik ve anodik piklerin her ikisi de tarama hızından bağımsızdır. Çok elektronlu bir indirgenme gerçekleşiyorsa, sistemin tersinir olması için voltamogramda, birbirinden iyi bir şekilde ayrılmış ve E^0 değerleri birbirinden sırayla artış gösteren çok sayıda pikin olması gerekir.²²

Bir reaksiyonun tersinir olduğunun belirlenmesinde, dönüşümlü voltametri çalışmalarından yararlanılır ve aşağıdaki kriterlerin sağlanması elektrot reaksiyonunun tersinir olduğunu gösterir. Bu kriterler şunlardır:

- $E_p^k - E_p^a = 59/n$ mV veya $E_p - E_p/2 = 57/n$ mV'tur.
- E_p tarama hızı ile değişmez.
- $i_p^a / i_p^k = 1$ 'dir ve bu oran tarama hızıyla değişmez.
- $i_p/\nu^{1/2}$, tarama hızıyla değişmez.
- Dalga şekli tarama hızıyla değişmez.

2.3.1.2. Tersinmez ve Yarı-Tersinir Sistemler

Elektron transferinin yavaş olduğu tersinmez sistemler için, piklerin büyüklüğü tersinir sistemlere göre daha azalır ve pikler birbirinden epeyce ayrılır.²² Tersinmez sistemlerde, tarama hızıyla pik potansiyelinde kayma olur. Yarı-tersinir sistemlerde, pik potansiyelleri, tersinir sistemlerle karşılaştırıldığında, birbirinden oldukça ayrıdır. Bir reaksiyonun yarı-tersinir olduğunun belirlenmesinde de dönüşümlü voltametri çalışmalarından elde edilen verilerden yararlanılır. Bu amaçla, aşağıdaki kriterler incelenir.²³ Yarı tersinir bir sistem için:

- $i_p/v^{1/2}$ tarama hızına bağlı değildir.
- $i_p^a / i_p^k = 1$ 'dir. ($\alpha = 0.5$ ise)
- E_p^k tarama hızı ile değişir. Bu değişme genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.
- $E_p^k - E_p^a$ farkı düşük tarama hızlarında $59/n$ 'e yaklaşır. Yüksek tarama hızlarında bu değerden daha büyüktür ve tarama hızı ile artar.
- Tarama hızı arttıkça pik genişlemesi olur.

2.3.1.3. Adsorpsiyonun Dönüşümlü Voltametri ile İncelenmesi

Dönüşümlü voltametri aynı zamanda, elektroaktif türlerin arayüzeydeki davranışının incelenmesinde de kullanılır. Reaktif ve ürünün her ikisi de, adsorpsiyon-desorpsiyon olayında yer alabilir. Bu durumda, alınan çoklu voltamogramlarda, katodik ve anodik pik akımlarının dereceli olarak artması, elektrot yüzeyinde adsorpsiyonun göstergesidir. Reaktif veya ürünün her ikisi değil de, sadece biri elektrot yüzeyine kuvvetli adsorbe olabilir. Bu durumda, reaktif elektrot yüzeyine kuvvetli adsorpsiyonu varsa difüzyon pikinden daha negatif bir potansiyelde bir arka pik gözlenirken, ürünün elektrot yüzeyine kuvvetli

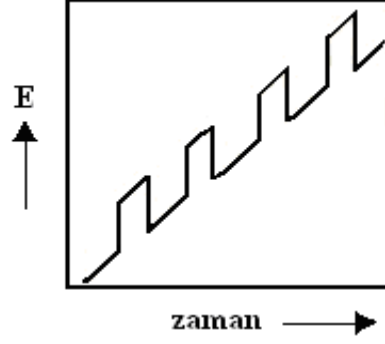
adsorbsiyonu varsa difüzyon pikinden daha pozitif bir potansiyelde bir ön pik gözlenir.²²

2.3.2. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Puls voltametri teknikleri, Barker ve Jenkin tarafından (1952), voltametrik çalışmalarda tayin sınırını düşürmek amacıyla önerildi. Böylece, faradayik ve faradayik olmayan akım arasındaki oran arttırılarak, tayin sınırları 10^{-8} M'a kadar düşürüldü. Kısaca DPV olarak gösterilen diferansiyel puls voltametrisi, organik ve anorganik türlerin eser miktarlarının ölçülmesinde son derece kullanışlı bir tekniktir. Diferansiyel puls voltametrisinde, doğrusal bir potansiyel artışına göre ayarlanmış sabit büyüklükte pulslar (dE/dt), çalışma elektroduna belli bir süre uygulanır (Şekil 2.4). İki kez akım ölçülür. Birincisi, puls uygulanmadan önce yani tam pulsun başladığı anda potansiyelde bir artış olmadan, ikincisi, pulsun bitmesine yakın bir bölgede ölçülür. Bu iki akım arasındaki fark puls olarak verilir. Sonunda, uygulanan potansiyele karşı bu akım farklarının grafiğe geçirilmesiyle diferansiyel puls voltamogramı elde edilir.²² Voltamogramlardaki pik akımlarının yüksekliği, aşağıdaki eşitlikte de görüleceği gibi ilgili analitin derişimiyle doğru orantılıdır:

Burada, $\sigma = \exp[(nF/RT)(\Delta E/2)]$ 'dir ve ΔE puls genişliğidir.

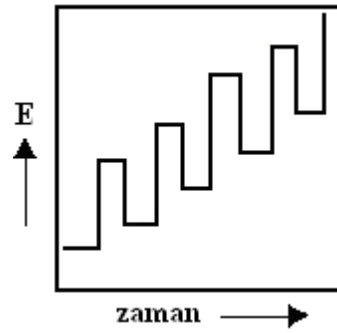
DPV, en çok kullanılan elektroanalitik yöntemlerden biridir. Normal puls voltametrisiyle karşılaştırıldığında iki üstünlüğü vardır. Birincisi, her bir analitin analitik pikleri birbirinden kolayca ayrılabilmesi için tek bir voltamogramda pek çok analitin belirlenebilmesini sağlamaktadır. İkinci üstünlüğü ise, diferansiyel akımla çalışılması ve böylece voltametrik bir pikin elde edilmesiyle analitik duyarlılığın 5.0×10^{-8} M'dan 1.0×10^{-8} M'a gelişmesidir.



Şekil 2.4. Diferansiyel puls voltametrisinde puls tipi uyarma sinyalinin dalga şekli

2.3.3. Kare Dalga Voltametri (SWV)

Kare dalga voltametri, diferansiyel pulsdan daha sık tercih edilen elektroanalitik yöntemdir. Kısaca SWV olarak gösterilir ve çalışma elektroduna uygulanan potansiyel, büyük genişlikli bir diferansiyel teknik olmasını sağlayan simetrik kare dalgalar şeklindedir. Her bir kare dalga döngüsü boyunca, akım iki kez ölçülür. Birincisi, ileri yöndeki pulsun sonunda (t_1) ikincisi ise geri yöndeki pulsun sonundadır (t_2). Bu iki akım arasındaki fark, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde kare dalga voltamogramı elde edilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kare dalga voltametri de puls tipi uyarma sinyalinin dalga şekli

SWV'nin en büyük üstünlüğü oldukça hızlı bir teknik olmasıdır. Etkin tarama hızı, kare dalganın frekansı (f) ve basamak yüksekliği (ΔE_s) değiştirilerek

belirlenir. Böylece, birkaç saniye içinde voltamogramlar kaydedilebilmektedir. Bu, ortalama 2-3 dakikayı bulan diferansiyel puls voltamogramının tamamlanması ile karşılaştırıldığında, kare dalga voltametrisinin analiz süresini oldukça kısalttığı bir göstergesidir.²² SWV yönteminin ikinci büyük üstünlüğü de, kare dalga yoluyla toplam akıma kapasitif katkıların minimuma indirilmiş olmasıdır. Böylece, tarama hızı çarpıcı bir şekilde artırılabilir, 1 V/s'lik tarama hızına kolaylıkla ulaşılabilir. SWV'de net akım (ΔI) hem ileri hem de geri puls akımlarından daha büyüktür. Bu nedenle, voltametrik pik genellikle oldukça kolay okunmaktadır. Bu da, yöntemin doğruluğunu arttırmakta ve diferansiyel puls voltametrisinden daha yüksek duyarlılığın elde edilmesini sağlamaktadır. Böylece 1.0×10^{-8} M'a yakın çok düşük tayin sınırlarına inilebilmektedir. Kare dalga ve diferansiyel puls voltametrisi karşılaştırılırsa, kare dalga akımlarının benzer diferansiyel puls cevaplarından, tersinir ve tersinmez sistemler için sırasıyla 4 ve 3.3 kat daha yüksek olduğu söylenebilir.

2.4. Elektrokimyasal Ölçme Sistemi

İvabradinin elektrokimyasal davranışlarının incelendiği bu çalışmada, dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (SWV) gibi tekniklerden yararlanmak amacı ile Interface 1000 Gamry markalı elektrokimyasal sistem kullanıldı. Uygulanan teknikleri otomatik olarak gerçekleştirmek ve bilgisayar kontrollü olan bu elektrokimyasal ölçme sisteminden elde edilen verileri değerlendirmek için ana üniteye bağlı bilgisayar sistemindeki yazılımından yararlanıldı. Elektrokimyasal sistemde, deneye başlamadan önce hazırlanan çözeltilerden gaz geçirilmesi ve çözeltilerin karıştırılması otomatik olarak yapılabilmektedir. Uygun görülen deney parametreleri sisteme girilip onaylandıktan sonra deney tamamlandığında deney verileri, grafik olarak elde

edilebilmekte ve grafikler, daha önce elde grafiklerle üst üste çakıştırılarak karşılaştırılabilmektedir. Ayrıca, kullanılan yazılımlar, gerektiğinde deney verilerinin kopyalanarak başka bilgisayarlara aktarılıp Microsoft Excel, PowerPoint ve Paint gibi programlardan yararlanma olanağı sağlamaktadır.

2.5. Kullanılan Elektrotlar

Deneylerde, çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot, karşıt elektrot olarak 0.5 mm çapında Pt telden (BAS MW-1032) yararlanıldı. Sulu ortamda gerçekleştirilen elektrokimyasal çalışmalarda, Ag/AgCl referans elektrodu (BAS MF-2052 RE-5B) kullanıldı. Çalışmada kullanılan sulu ortam Ag/AgCl referans elektrodu, kullanılmadığı zaman 3.0 M KCl çözeltisinde saklandı.

2.6. Kullanılan Çözeltiler

2.6.1. Destek Elektrolit Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Elektrokimyasal olaylarda elektro aktif olan maddenin elektrot yüzeyine taşınma basamaklarının aynı anda olmaması olayı basitleştirmektedir. Bu taşıma sistemleri arasında engellenmesi en kolay olanı göç (migrasyon) olayıdır. Bunun için çalışılan ortama kolayca iyonlaşan bir tuz, elektrokimyasal özellikleri incelenen maddeninkinden çok daha yüksek derişimlerde ilave edilir. Bu tuza ya da bu tuzu içeren çözeltiliye “*destek elektroliti*” adı verilir. Destek elektrolitinin derişimi incelenen maddenin derişiminden 100 kat daha fazla olmalıdır. Miktar tayini çalışmalarda ve kinetik incelemelerde analizi yapılacak maddeleri kolayca çözebilen, uygun pH aralığı sağlayan ve oldukça düşük akım veren çözeltiler destek elektroliti olarak seçilmiştir. Deneylerde destek elektroliti olarak 0.1 M LiClO₄, 0.5 M H₂SO₄ ile değişik yapıda asidik ve bazik tampon çözeltiler kullanılmıştır.

2.6.2. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

Deneylerde tampon çözelti olarak asetat, fosfat ve Britton-Robinson tamponları kullanılmıştır.

Asetat tamponu için 1 M asetik asit çözeltisi hazırlanmış ve 5 M NaOH ile istenen pH değerlerine ayarlanmıştır. Bu tamponla pH 3.5-5.99 aralığında çalışılmıştır.

Fosfat tamponu için 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ çözeltisine 5.0 M NaOH çözeltisi eklenerek istenen pH'ya ayarlanmıştır. Bu tamponla pH 2-12 aralığında çalışılmıştır.

Britton-Robinson tamponu için 0.04 M H_3BO_3 , 0.04 M H_3PO_4 ve 0.04 M CH_3COOH içeren 1000 mL çözelti bidistile su kullanılarak hazırlanmış ve 5.0 M NaOH çözeltisi ile istenen pH değerine ayarlanmıştır. Bu tamponla pH 2-12 aralığında çalışılmıştır. Sulu ortam çalışmalarında, pH 2-12 arasında kullanılabilen Britton-Robinson (BR) tamponu destek elektrolit ortamı tercih edilmiştir.

2.7. Dönüşümlü Voltametri Deneyinin Yapılışı

İvabradin etkin maddesinin dönüşümlü voltametri deneyleri için hücre standına, deneyde kullanılacak çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrot yerleştirilerek üçlü elektrot sistemi oluşturuldu. Çalışma elektrotu camsı karbon elektrot, referans elektrotu Ag/AgCl elektrot, karşıt elektrot olarak da platin tel kullanılmıştır. Çözeltiden 5 dakika argon veya azot gazı geçirilerek ortamdan oksijenin uzaklaşması sağlandıktan sonra farklı potansiyel aralıklarında dönüşümlü voltamogramları alındı. Akımın pratik olarak çok düşük olduğu ve değişmediği potansiyel aralığı, potansiyel penceresi olarak belirlendi.

Daha sonra çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrot, incelenen ivabradin çözeltilerine daldırılarak sistemden 5 dakika azot gazı geçirildi.

Ardından, belirlenen potansiyel aralıklarında dönüşümlü voltamogramları alındı ve ivabradinin indirgenme ve yükseltgenme piklerinin incelenmesi için en uygun potansiyel aralığı seçildi.

İvabradinin voltamogramlarına tarama hızının etkisini incelemek amacıyla, deney çözeltilerinin, farklı tarama hızlarında ve her tarama hızı çalışmasından önce çözeltiden belirli bir süre azot gazı geçirilerek voltamogramları alındı. Ayrıca, aynı çözeltiler kullanılarak çoklu voltamogramları da elde edildi. Her tarama öncesinde camsı karbon elektrot temizlendi.

2.8. Kare Dalga Voltametri Deneyinin Yapılışı

İvabradinin kare dalga voltametri çalışmaları, dönüşümlü voltametri çalışmalarında kullanılan aynı elektrokimyasal hücrede, daha önceden belirlenen potansiyel aralığında, SWV tekniğinin en önemli parametresi olan frekansı 15 Hz değerinde, kare dalga genliğini 25 mV değerinde ve basamaklı adım yüksekliğini 4 mV değerinde sabit tutarak voltamogramlar alındı. Elde edilen voltamogramlardaki pik akımı ve pik potansiyelleri kaydedildi. Pik akımının derişimle ilişkisini belirlemek amacıyla, farklı derişimlerdeki ivabradin çözeltileri için elde edilen pik akımları derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi.

2.9. Diferansiyel Puls Voltametri Deneyinin Yapılışı

İvabradin için gerçekleştirilen diferansiyel puls voltametri çalışmaları, dönüşümlü voltametri çalışmalarında kullanılan aynı elektrokimyasal hücrede gerçekleştirilmiştir. DPV kullanılarak ivabradin çözeltisinin adsorptif diferansiyel puls voltametri ile analizinde ve puls voltametrisi ile analizinde puls genliği 5, 10, 25, 50 ve 100 mV değerler denenmiş ve puls genliğinin artmasıyla pik potansiyelinin pozitif değerlere kaydığı ve pik akımının arttığı gözlenmiştir. Ancak çok küçük ve çok büyük puls genlikleri ile tekrarlanabilir sonuçlar alınamaması

üzerine çalışmalarda 50 mV puls genliği değerinde voltamogramlar alınmıştır. Elde edilen voltamogramlardaki pik akımı ve pik potansiyelleri kaydedilmiştir. Pik akımının derişimle ilişkisini belirlemek amacıyla, farklı derişimlerdeki ivabradin çözeltileri için elde edilen pik akımları derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

2.10. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Geçerlilik Testi (Validasyon), ürünlerin değerlendirme prosesinde, kalitatif veya kantitatif analizlerde seçilen yöntem yada yöntemlerin bu analiz işlemlerinde uygulanabilir olduğunu göstermek için yapılan testlerin tümüdür.^{24,25} Seçilen analitik yöntemin geçerliliğini göstermek için kullanılan parametreler:

1. Doğruluk
2. Kesinlik
3. Saklanan Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)
4. Doğrusallık
5. Seçicilik
6. Duyarlılık
7. Geri Kazanım

Farmasötik preparatlarda ve biyolojik ortamlarda etkin maddelerin miktarlarının belirlenmesinde uygulanan yöntemlerin geçerlilik testlerinin yapılmış olması gerekmektedir.

2.10.1. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, bir analitik yöntemde sonuçların gerçek değere veya gerçek olarak kabul edilen değere yakınlığı olarak ifade edilir ve bağıl ya da mutlak hata ile verilir. Kesinlik ise, analitik bir işlemden önceden belirlenmiş koşullar altında aynı homojen örnekten birçoğ örnekleme yapılır ve bu örneklerin herbirinden

alınan bir seri ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir ve % BSS (bağıl standart sapma) ile verilir.

i) Güniçi kesinlik: Bir birinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin aynı gün içerisinde tekrarlayan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı ($n=6$, n :ölçüm sayısı) % BSS değeri ile verilir.

ii) Günler arası kesinlik: Bir birinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin farklı günler (en az altı gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az $n=6$) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsüdür. Bu çalışmayla elde edilen değerler aynı zamanda yöntemin uygulanabilirliğinin de bir ölçüsüdür.

2.10.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)

Saklanan örneklerin analiz süresince bozunmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Etkin maddeyi içeren kan örneklerinin normal laboratuvar koşullarında nem, sıcaklık, hava ve örneklerin dondurulup-eritilmesi (-20 °C bekletilmesi) gibi etkilere maruz kaldığında etkin maddenin bozunmadan sabit kaldığı süre tespit edilmeli ve aynı zamanda elde edilen bilgilerin literatür bilgileri ile de desteklenmesi gerekmektedir.

2.10.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenme işlemine doğrusallık denir. Bu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür.

2.10.4. Duyarluluk

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir lsdr.

2.10.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin tayin alt sınırı değeri numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Kromatografik çalışmalarda tayin alt sınırı değeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranının 10 olduğu derişim olarak belirlenir.

2.10.6. Gözlenebilme (Teşhis) Sınırı (LOD)

Bir analitik yöntemin gözlenebilme (teşhis) sınırı, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer olamayıp sadece bir sınır değeridir. Kromatografik çalışmalarda gözlenebilme sınırı değeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranının 3 olduğu derişim olarak ifade edilir.

2.10.7. Geri Kazanım

Analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

İvabradin (Merck, Almanya)

Coralan tablet (Eczane, Erzurum, Türkiye)

Asetonitril (HPLC grade, Merck, Almanya)

Deiyonize su (Millipore)

Azot gazı (N₂) (% 99.9 saflıkta, Erzurum, Türkiye)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Etüv (Mettler)

Ultrasonik banyo (Elma LC 30)

Terazi (Mettler Toledo)

Karıştırıcı (Vorteks, IKA)

3.3. Voltametrik Yöntem Şartları

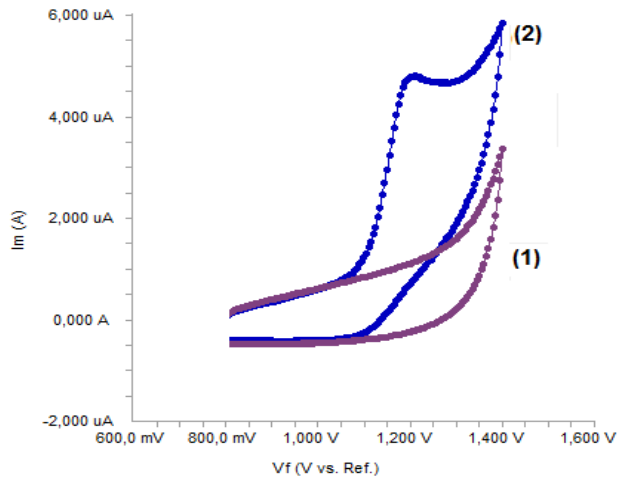
Voltametrik ölçümler dönüşümlü, doğrusal taramalı, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemleri kullanılarak 0.8-1.4 V potansiyel aralığında Gamry Interface 1000 markalı potansiyostatta gerçekleştirildi. Çalışmada camsı karbon elektrot indikatör elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanıldı. Elektrotlar her ölçümden sonra farklı partikül büyüklüğüne sahip alimüna ile temizlendi. 0.8-1.4 Volt potansiyel aralığında backraund ve ivabradin çözeltilerinin dönüşümlü ve doğrusal taramalı voltametri taraması 100 mV tarama hızında gerçekleştirildi. Voltamogramda +1.21 Volt potansiyelde bir tane oksidasyon piki gözlemlendi. +1.21 Volt potansiyeldeki pik akımlarının değerlerinde doğrusallık sağlandığından +1.21 Volttaki potansiyelde derişime karşı pik akım değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetildi.

4. BULGULAR

4.1. Voltametri Yöntemi

4.1.1. Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

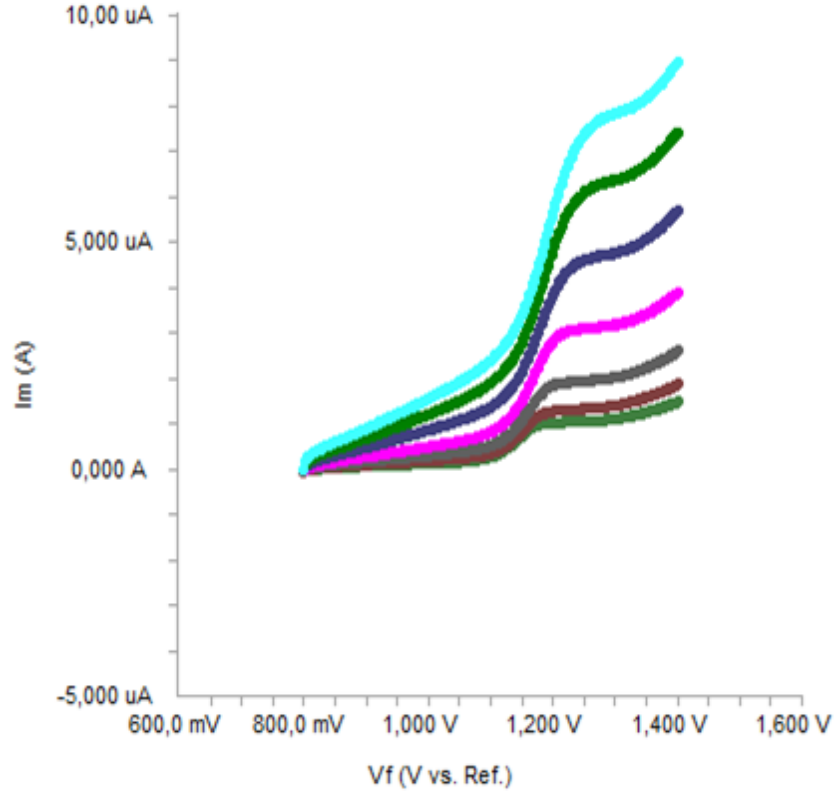
İvabradinin elektrokimyasal davranışlarını incelemeye başlamadan önce, Britton-Robinson (BR) ortamı için potansiyel penceresi belirlendi. Bu amaçla, BR tamponu ortamında $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak hazırlanan ve pH'sı 2 olan çözeltinin dönüşümlü voltamogramı alındı ve Şekil 4.1'de verildi. Şekil 4.1'den de görüleceği gibi 0.8 ile 1.4 V aralığında çözücü sistemine ait herhangi bir indirgenme-yükseltgenme pikine rastlanmadı. Bu nedenle, çalışmaya uygun potansiyel penceresinin 0.8-1.4 V olarak seçilmesine karar verildi. BR tamponu ile hazırlanan ivabradin çözeltilerinin, 0.1 V/s tarama hızında, 0.8-1.4 V potansiyel aralığında camı karbon elektrot kullanılarak alınan dönüşümlü voltamogramı Şekil 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1. $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradinin BR tamponu ortamında (pH 2) camı karbon elektrotta elde edilen dönüşümlü voltamogramları (v : 0.1 V s^{-1} , 1: destek elektrolit, 2: ivabradine ait anodik pik)

Şekil 4.1'de elektrokimyasal davranışı incelenen ivabradine ait, asidik bölgede elde edilen voltamogramda, bir anodik pik gözlenirken katodik pike

rastlanmadı. Asidik ortamda (pH 2) anodik pik potansiyeli için +1.21 V'dur. Voltamogramlarda bir katodik pikin gözlenmemesi, ivabradinin yükseltgenmesinin tersinmez olabileceğinin bir göstergesidir. Ancak, katodik pike rastlanmaması mutlaka elektron aktarım basamağının tersinmez olduğunu göstermez. Çünkü elektron aktarım basamağını takip eden hızlı bir kimyasal reaksiyon gerçekleşirse, katodik pik gözlenemeyebilir. Ayrıca, farklı tarama hızlarında alınan doğrusal taramalı voltametri deneylerinden elde edilen voltamogramlardan yararlanılarak da bu düşüncemiz doğrulandı (Şekil 4.2).

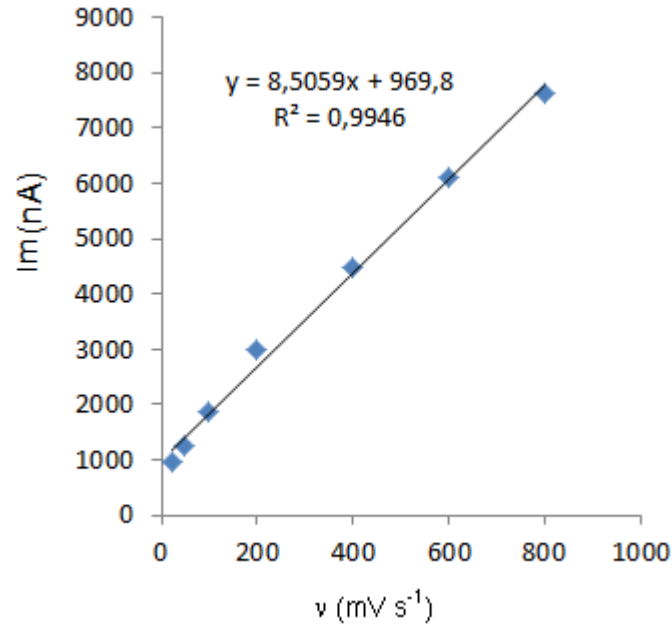


Şekil 4.2. $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradinin BR tamponu ortamında (pH 2) camsı karbon elektrotta elde edilen doğrusal taramalı voltamogramları (v : 0.025 V s^{-1} , 0.05 V s^{-1} , 0.1 V s^{-1} , 0.2 V s^{-1} , 0.4 V s^{-1} , 0.6 V s^{-1} , 0.8 V s^{-1})

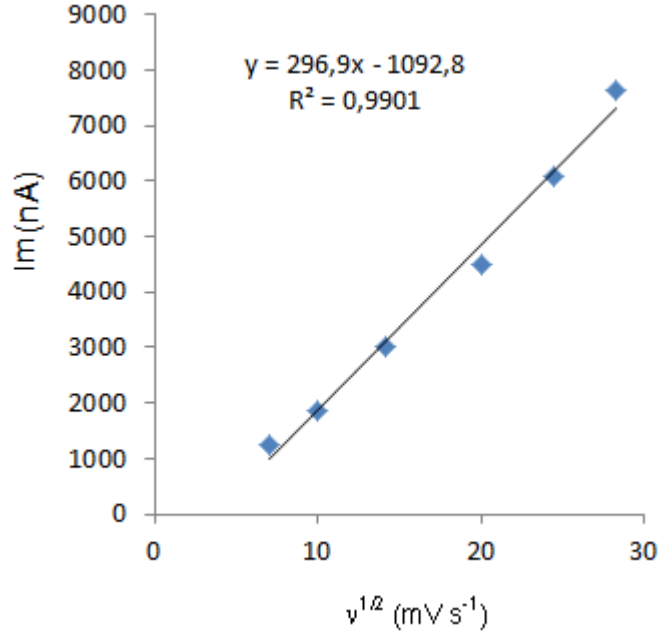
30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradin maddesinin, BR ortamında, camısı karbon elektrotta, 0.025-0.8 V s^{-1} arasındaki farklı tarama hızlarında alınan doğrusal taramalı voltamogramlarında, tarama hızı arttıkça pik akımlarının arttığı ve pik potansiyellerinin pozitifte kaydığı gözlemlendi (Şekil 4.2).

Pik potansiyelinin yüksek tarama hızlarında pozitifte kayması kriteri de, sistemin tersinmezliğinin bir göstergesidir.^{21,23} Ayrıca $v-I_m$, $v^{1/2}-I_m$ ve $\log v-\log I_m$ grafiklerinde akım fonksiyonunun tarama hızına bağlı olması da sistemin tersinmez olabileceğini düşündürdü.

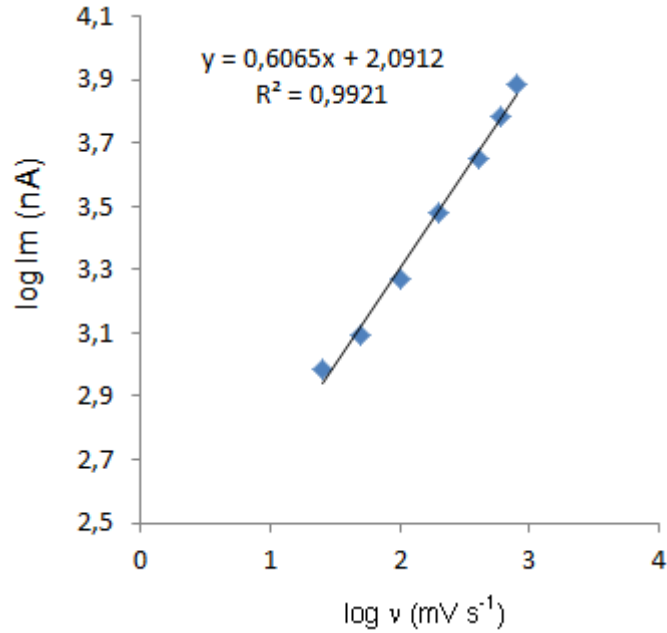
Aşağıdaki şekillerde 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradinin BR tamponu ortamında (pH 2) camısı karbon elektrotta, doğrusal taramalı voltamogramlarından elde edilen pik potansiyellerinin tarama hızına göre değişimleri verilmiştir (Şekil 4.3-5).



Şekil 4.3. 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradinin BR tamponu ortamında (pH 2) camısı karbon elektrotta elde edilen tarama hızına karşı doğrusal taramalı pik akım grafiği



Şekil 4.4. $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradinin BR tamponu ortamında (pH 2) camı karbon elektrotta elde edilen tarama hızının kare köküne karşı doğrusal taramalı pik akım grafiği



Şekil 4.5. $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradinin BR tamponu ortamında (pH 2) camı karbon elektrotta elde edilen tarama hızının logaritmasına karşı doğrusal taramalı logaritmik pik akım grafiği

4.1.2. İvabradinin Adsorpsiyon Özelliği

Organik maddelerin önemli bir kısmı, elektrot yüzeyine adsorbe olur ve bu moleküllerin elektrot yüzeyine adsorbe olması elektrot reaksiyonlarını önemli ölçüde etkilemektedir. Çeşitli voltametrik teknikler için geliştirilmiş olan difüzyon eşitlikleri ise, adsorpsiyon olayı söz konusu olduğunda geçerli olmaz. Bazı durumlarda ise maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olması bir avantaj haline dönüştürülerek hassas olarak tayin edilebilmesi mümkündür. Bu nedenle, ivabradinin elektrot yüzeyine adsorplanıp adsorplanmadığının belirlenmesi gerekir. Bu amaçla kullanılan en önemli elektrokimyasal yöntemlerden biri dönüşümlü veya doğrusal taramalı voltametridir. İvabradinin elektrot yüzeyine adsorbe olup olmadığı farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları alınarak pik akımlarının tarama hızıyla değişiminden yararlanıldı.

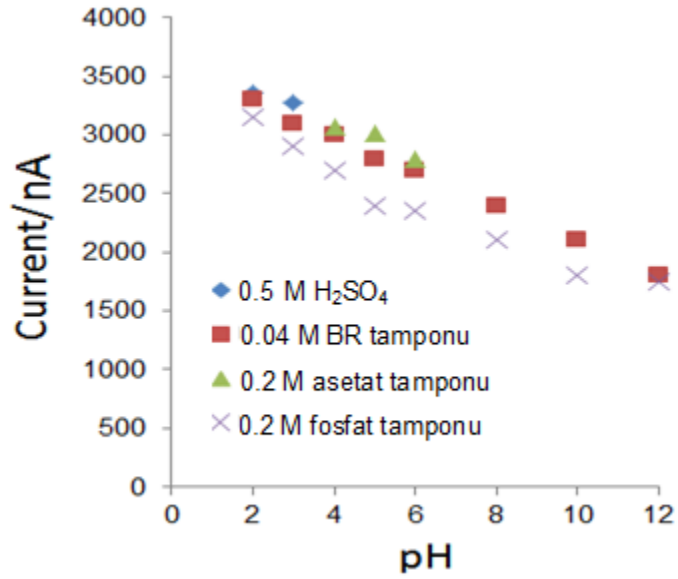
Bu amaçla $\log i_p$ - $\log v$ grafikleri Şekil 4.5'te çizildi. Bilindiği gibi, difüzyon dikkate alınarak türetilen ve dönüşümlü voltamogramdaki pik akımını veren Randles-Sevcik eşitliğinden, $\log i_p$ ve $\log v$ arasında, eğimi 0.5 olan bir doğru elde edilir. Maddenin elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu söz konusu ise, bu bağıntıdan ve dolayısıyla 0.5'den sapmalar meydana gelir ve genellikle bu durumda grafiklerin eğimi 0.5'den büyük olur.²¹ Ayrıca çoklu CV deneylerinde ilk döngüde akım 2000 nA iken ikinci ve sonraki döngülerde akım azalmakta ve sabit kalmaktadır. Bu durum reaktifin elektron yüzeyine adsorbe olması neticesinde pik akımında bir azalmaya sebep olduğu düşünülmüştür.²¹

4.1.3. Pik Akımına pH'nın Etkisi

Organik moleküllerin elektrot tepkimelerinin çoğunda proton görev alır. Bu nedenle akım-potansiyel ilişkileri pH'ya bağımlı olur. Voltametrik çalışmalarda bu bağımlılığın oluşturacağı hatalardan kurtulmak için çözeltilerin tamponlanması

gerekir. Seçilen tampon çalışma penceresini daraltmayacak nitelikte olmalıdır. Analitlerin akım potansiyel ilişkilerinin pH'ya bağlılığı göz önüne alındığında, destek elektrolitin pH'sı ayarlanmalıdır.

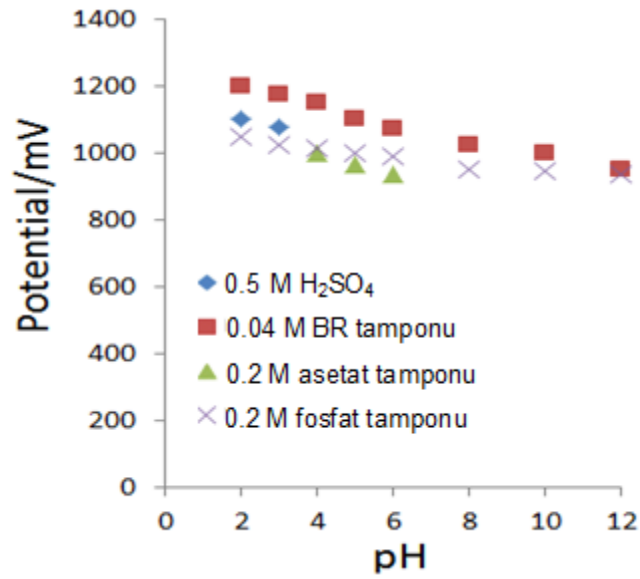
30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradinin pik akımına, pH'nın etkisini incelemek amacıyla, doğrusal taramalı voltamogramlarından yararlanıldı. BR tamponu ve 1 M NaOH kullanılarak farklı pH'larda hazırlanan 10 ml'lik çözeltilerde çalışıldı. Pik akımlarının pH ile değişimi grafiğe geçirildi (Şekil 4.6). Şekil 4.6'da görüldüğü gibi pH 2-12 arasında pik akımı değerleri birbirine yakındır. pH 2'de ise en yüksek pik akımı değeri elde edilmiştir. Bu verilere göre en yüksek akım değerinin elde edildiği pH optimum pH olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradinin farklı tampon çözeltilerinde camısı karbon elektrotta elde edilen pH ile doğrusal taramalı pik akımının değişimi grafiği

4.1.4. Pik Potansiyeline pH'nın Etkisi

Şekil 4.7'deki doğrusal taramalı voltametri yöntemi ile potansiyelin pik akımı ile değişim grafiğine bakıldığında 1200 mV'da pik akımının maksimum değerde olduğu görülmektedir. 1200 mV'dan 1000 mV'a kadar akım belli bir ölçüde azalmış ve 1050 mV ve 1000 mV değerleri arasında sabit kaldığı görülmüştür. Bu nedenle en uygun potansiyel 1200 mV olarak belirlenmiştir.



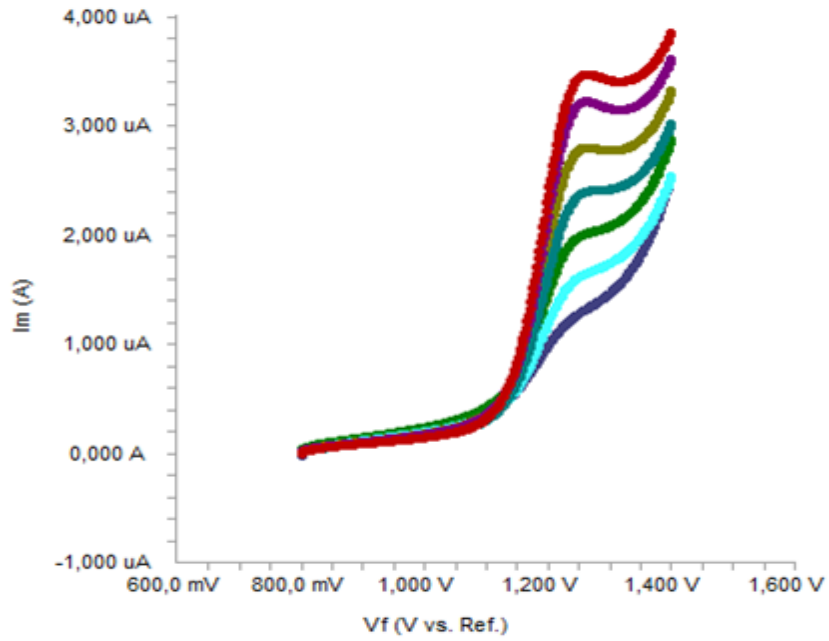
Şekil 4.7. 30 µg ml⁻¹ ivabradinin farklı tampon çözeltilerinde camısı karbon elektrotta elde edilen pH ile doğrusal taramalı pik potansiyelinin değişimi grafiği

4.2. Doğrusal Taramalı Voltametri (LSV) Deneyinin Yapılışı

Doğrusal taramalı voltametri deneylerinde kullanılan elektrokimyasal hücrede, daha önce yapılan LSV deneylerinde belirlenen potansiyel penceresinde, LSV yöntemi için gerekli parametreler ayarlandıktan sonra çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İvabradinin stok standart çözeltisinden elde edilen farklı derişimler için voltamogramların pik akımları kaydedilmiştir.

4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

İvabradin, BR tamponu (pH 2) içinde $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp BR tamponu (pH 2) çözeltisi ile seyreltilerek 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde ivabradin standart çalışma çözeltileri hazırlandı. İvabradinin +1.21 Volt potansiyeldeki voltamogramları alındı (Şekil 4.8).



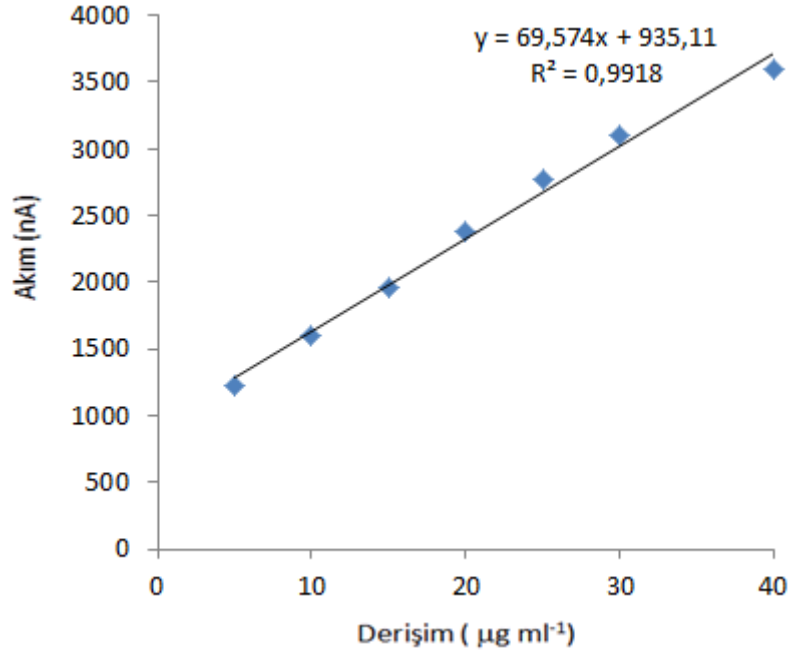
Şekil 4.8. İvabradin etkin maddesinin BR tamponu ortamında (pH 2) doğrusal taramalı voltamogramları ($5, 10, 15, 20, 25, 30$ ve $40 \mu\text{g ml}^{-1}$)

4.2.2. Doğrusal Taramalı Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi

(Validasyonu)

4.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında ivabradin çözeltilerinin derişimlerine karşı +1.21 V potansiyelde okunan pik akım değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Doğrusal taramalı voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi

Doğrusal taramalı voltametrik yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.8'de verildi.

Tablo 4.1. Doğrusal taramalı voltametrik çalışmada ivabradine ait kalibrasyon eğrisinin istatistikî değerleri

Parametreler	Doğrusal Taramalı Voltametri
Potansiyel (E: V)	+1.21
Doğrusal aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	5-40
Regresyon doğrusu denklemi	$A=69.574x+935.11$
S_a	9.43
S_b	0.542
Korelasyon katsayısı (r)	0.9918
S_r	1.93×10^{-3}

S_a : Kaymanın standart sapması, S_b : Eğimin standart sapması, S_r : Korelasyon katsayısının standart sapması

4.2.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

İvabradin için kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapma (% BSS) değerleri belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı değeri olarak tespit edildi. Doğrusal taramalı voltametrik yöntemin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulundu.

4.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği günüçi ve günler arası değışkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimdeki ivabradin çözeltilerinin günüçi ve günler arası (farklı günlerde en az iki gün) pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da bağıl hata ile Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2. Doğrusal taramalı voltametik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Günüçi			Günler arası			
Eklene (µg ml ⁻¹)	Bulunan±std. sapma	% bağıl hata	% BSS	Bulunan ±std. sapma	% bağıl hata	% BSS
7.5	7.29±0.19	-2.80	2.61	7.88± 0.23	5.06	2.91
17.5	18.60±0.32	6.29	1.72	18.13±0.30	3.60	1.65
37.5	35.50±0.79	-5.33	2.22	39.44±0.81	5.17	2.05

4.2.2.4. Kararlılık (Stabilite)

İvabradin stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için ivabradinin üç farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, 4 ve -20 °C’de 24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik akımları ölçüldü ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım ile Tablo 4.3’de verildi.

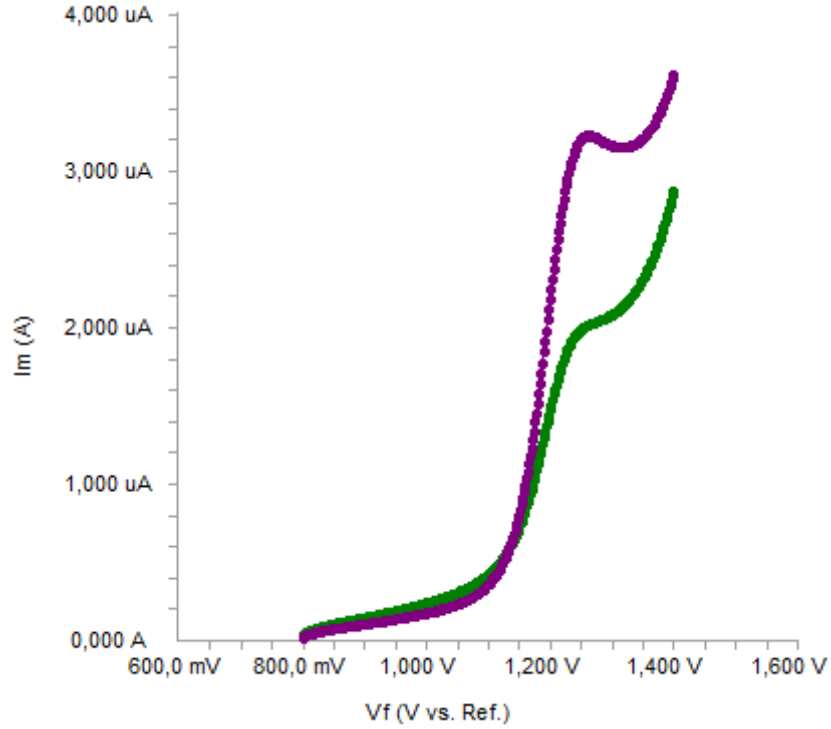
Tablo 4.3. İvabradinin doğrusal taramalı voltametik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklene (µg ml ⁻¹)	Oda sıcaklığı	Oda sıcaklığı	4 °C	4 °C	-20 °C	-20 °C
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
10	98.2 ± 4.27	101.3 ± 4.78	99.4 ± 3.74	101.2 ± 4.26	97.4 ± 4.25	101.2 ± 3.92
20	99.6 ± 5.84	99.2 ± 3.49	98.2 ± 4.98	99.6 ± 3.48	101.2 ± 3.84	98.6 ± 4.68
30	98.4 ± 3.43	98.6 ± 4.09	101.3 ± 3.62	101.4 ± 3.64	102.3 ± 4.68	101.4 ± 5.06

4.2.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testi (validasyonu) yapılan yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla ivabradin içeren farmasötik preparatda etkin madde miktarı analizi yapıldı. Bu çalışma için ivabradin içeren Coralan tabletten sırasıyla

20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Çözeltilerin doğrusal taramalı voltamogramları alınıp pik akımları okundu. Voltamogramlar standart çözeltilerin voltamogramları ile karşılaştırıldı ve Şekil 4.10'da verildi.



Şekil 4.10. Coralan farmasötik preparatının doğrusal taramalı voltametrik voltamogramları (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$)

4.2.2.6. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Coralan tabletten 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözeltileri hazırlanarak pik akımları okundu. Sonra bu çözeltiler üzerine ivabradinin 3 farklı derişimdeki standart çözeltileri eklendi ve günüçi ve günler arası (farklı günlerde en fazla iki gün) pik akımları belirlendi. Belirlenen pik akımı değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik akımı değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.4'de verildi.

Tablo 4.4. Doğrusal taramalı voltametrik yöntemle belirlenen farmasötik preparatların günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

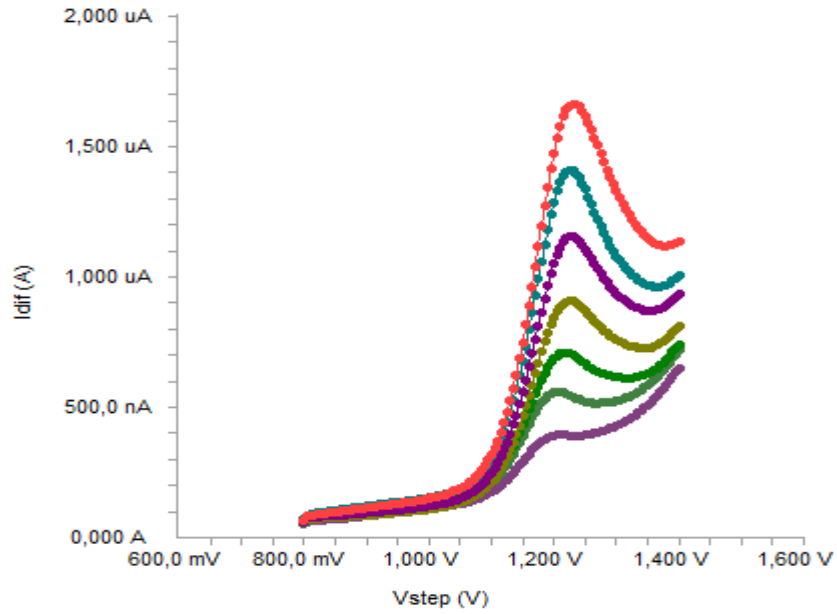
Preparat	Günüçi				Günler arası		
	Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan \pm std. sapma	Geri kazanım	% BSS	Bulunan \pm std. sapma	Geri kazanım	% BSS
Coralan ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$)	5	4.9 ± 0.13	98.0	2.65	5.1 ± 0.18	102.0	3.53
	15	14.8 ± 0.27	98.7	1.82	14.8 ± 0.25	98.7	1.69
	35	35.4 ± 0.73	101.1	2.06	35.2 ± 1.67	100.6	4.74

4.3. Kare Dalga Voltametri (SWV) Deneyinin Yapılışı

Kare dalga voltametri deneylerinde kullanılan elektrokimyasal hücrede, daha önce yapılan SWV deneylerinde belirlenen potansiyel penceresinde, SWV yöntemi için gerekli parametreler ayarlandıktan sonra çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İvabradinin stok standart çözeltisinden elde edilen farklı derişimler için voltamogramların pik akımları kaydedilmiştir.

4.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

İvabradin BR tamponu (pH 2) içinde $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp BR tamponu (pH 2) çözeltisi ile seyreltilerek 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde ivabradin standart çalışma çözeltileri hazırlandı. İvabradinin +1.20 Volt potansiyeldeki voltamogramları alındı (Şekil 4.11).

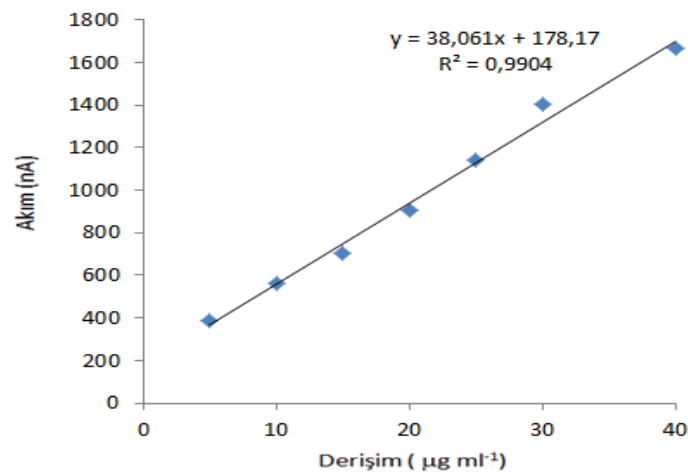


Şekil 4.11. İvabradin etkin maddesinin BR tamponu ortamında (pH 2) kare dalga voltamogramları (5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$)

4.3.2. Kare Dalga Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.3.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında ivabradin çözeltilerinin derişimlerine karşı +1.20 V potansiyelde okunan pik akım değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Kare dalga voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi

Kare dalga voltametik yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5’de verildi.

Tablo 4.5. Kare dalga voltametik çalışmada ivabradine ait kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri

Parametreler	Kare Dalga Voltametri
Potansiyel (E: V)	+1.20
Doğrusal aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	5-40
Regresyon doğrusu denklemi	$A=38.061x+178.17$
S_a	9.241
S_b	0.436
Korelasyon katsayısı (r)	0.9904
S_r	1.06×10^{-3}

S_a : Kaymanın standart sapması, S_b : Eğimin standart sapması, S_r : Korelasyon katsayısının standart sapması

4.3.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

İvabradin için kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapma (% BSS) değerleri belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20’den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10’dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı değeri olarak tespit edildi. Kare dalga voltametik yöntemin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 0.9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulundu.

4.3.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği günüçi ve günler arası değışkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimdeki ivabradin çözeltilerinin günüçi ve günler arası (farklı günlerde en az iki gün) pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi.

Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da bağıl hata ile Tablo 4.6’da verildi.

Tablo 4.6. Kare dalga voltametik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Günüçi				Günler arası		
Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan \pm std. sapma	% bağıl hata	% BSS	Bulunan \pm std. sapma	% bağıl hata	% BSS
7.5	7.67 \pm 0.41	2.26	5.34	7.31 \pm 0.31	-2.53	4.24
17.5	17.95 \pm 0.62	2.57	3.45	16.47 \pm 0.81	-5.88	4.92
37.5	39.44 \pm 0.81	5.17	2.05	35.50 \pm 0.79	-5.33	2.22

4.3.2.4. Kararlılık (Stabilite)

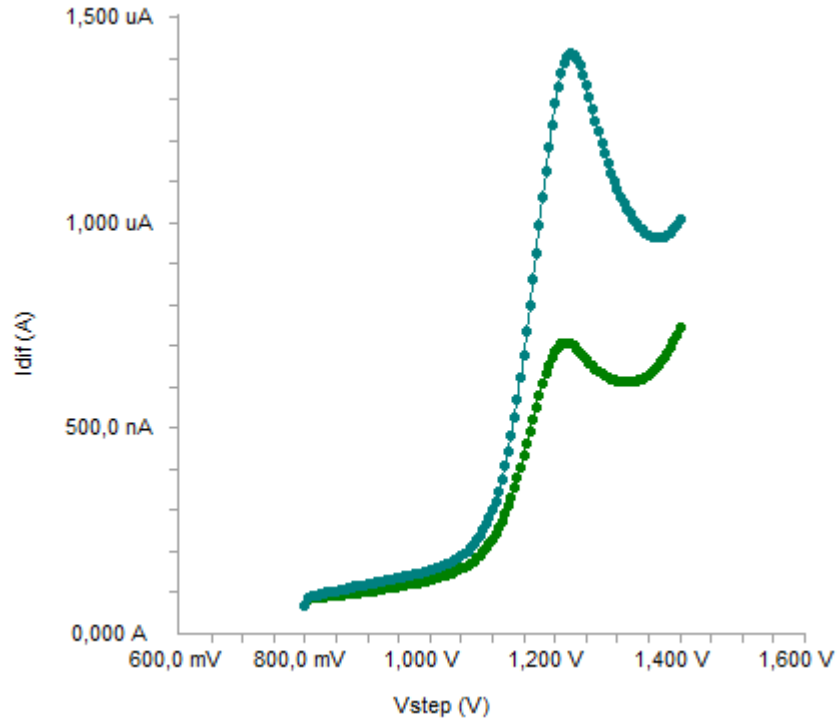
İvabradin stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için ivabradinin üç farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, 4 ve -20 $^{\circ}\text{C}$ ’de 24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik akımları ölçüldü ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım ile Tablo 4.7’de verildi.

Tablo 4.7. İvabradinin kare dalga voltametik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Oda sıcaklığı		4 $^{\circ}\text{C}$		-20 $^{\circ}\text{C}$	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
10	97.4 \pm 4.25	99.6 \pm 5.84	99.2 \pm 3.49	101.2 \pm 4.26	102.3 \pm 4.68	101.4 \pm 5.06
20	101.2 \pm 3.84	98.2 \pm 4.27	101.3 \pm 4.78	99.6 \pm 3.48	98.6 \pm 4.09	101.3 \pm 3.62
30	98.4 \pm 3.43	101.2 \pm 3.92	99.4 \pm 3.74	101.4 \pm 3.64	98.6 \pm 4.68	98.2 \pm 4.98

4.3.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testi (validasyonu) yapılan yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla ivabradin içeren farmasötik preparatda etkin madde miktar analizi yapıldı. Bu çalışma için ivabradin içeren Coralan tabletten sırasıyla $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Çözeltilerin kare dalga voltamogramları alınıp pik akımları okundu. Voltamogramlar standart çözeltilerin voltamogramları ile karşılaştırıldı ve Şekil 4.13'te verildi.



Şekil 4.13. Coralan farmasötik preparatının kare dalga voltametrik voltamogramları
($20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $30 \mu\text{g ml}^{-1}$)

4.3.2.6. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Coralan tabletten $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözeltileri hazırlanarak pik akımları okundu. Sonra bu çözeltiler üzerine ivabradinin 3 farklı derişimdeki standart çözeltileri eklendi ve günüçi ve günler arası (farklı günlerde en fazla iki

gün) pik akımları belirlendi. Belirlenen pik akımı değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik akımı değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.8’de verildi.

Tablo 4.8. Kare dalga voltametrik yöntemle belirlenen farmasötik preparatların günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

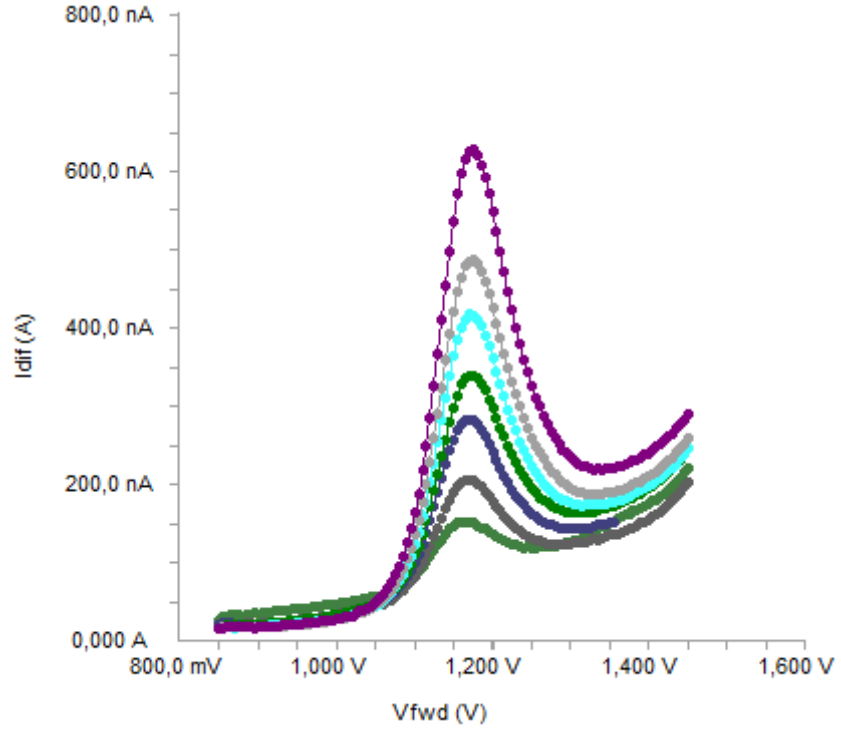
Preparat	Günüçi				Günler arası		
	Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan \pm std. sapma	Geri kazanım	% BSS	Bulunan \pm std. sapma	Geri kazanım	% BSS
Coralan (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	5	5.1 \pm 0.18	102.0	3.53	4.9 \pm 0.13	98.0	2.65
	15	14.8 \pm 0.25	98.7	1.69	14.8 \pm 0.27	98.7	1.82
	35	35.2 \pm 1.67	100.6	4.74	35.4 \pm 0.73	101.1	2.06

4.4. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Deneyinin Yapılışı

Diferansiyel puls voltametri deneylerinde kullanılan elektrokimyasal hücrede, daha önce yapılan DPV deneylerinde belirlenen potansiyel penceresinde, DPV yöntemi için gerekli parametreler ayarlandıktan sonra çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İvabradinin stok standart çözeltilisinden elde edilen farklı derişimler için voltamogramların pik akımları kaydedilmiştir.

4.4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

İvabradin BR tamponu (pH 2) içinde 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp BR tamponu (pH 2) çözeltilisi ile seyreltilerek 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde ivabradin standart çalışma çözeltileri hazırlandı. İvabradinin +1.18 Volt potansiyeldeki voltamogramları alındı (Şekil 4.14).

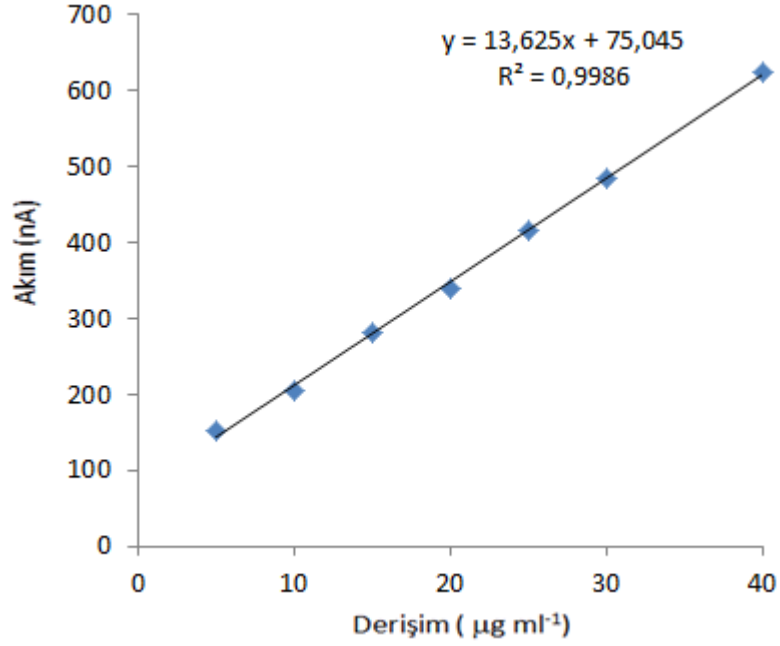


Şekil 4.14. İbuprofen etkin maddesinin BR tamponu ortamında (pH 2) diferansiyel puls voltamogramları (5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$)

4.4.2. Diferansiyel Puls Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.4.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında ibuprofen çözeltilerinin derişimlerine karşı +1.18 V potansiyelde okunan pik akım değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Diferansiyel puls voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi

Diferansiyel puls voltametrik yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.9’da verildi.

Tablo 4.9. Diferansiyel puls voltametrik çalışmada ivabradine ait kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri

Parametreler	Diferansiyel Puls Voltametri
Potansiyel (E: V)	+1.18
Doğrusal aralık (µg ml ⁻¹)	5-40
Regresyon doğrusu denklemi	A=13.625x+75.045
S _a	5.47
S _b	1.246
Korelasyon katsayısı (r)	0.9986
S _r	2.44x10 ⁻³

S_a: Kaymanın standart sapması, S_b: Eğimin standart sapması, S_r: Korelasyon katsayısının standart sapması

4.4.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

İvabradin için kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapma (% BSS) değerleri belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı değeri olarak tespit edildi. Diferansiyel puls voltametik yöntemin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulundu.

4.4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimdeki ivabradin çözeltilerinin günüçi ve günler arası (farklı günlerde en az iki gün) pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da bağıl hata ile Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.10. Diferansiyel puls voltametik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Günüçi				Günler arası		
Eklene ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan \pm std. sapma	% bağıl hata	% BSS	Bulunan \pm std. sapma	% bağıl hata	% BSS
7.5	7.69 \pm 0.25	2.53	3.25	7.79 \pm 0.34	3.86	4.36
17.5	16.81 \pm 0.71	-3.94	4.22	18.42 \pm 0.77	5.25	4.18
37.5	39.44 \pm 0.81	5.17	2.05	35.50 \pm 0.79	-5.33	2.22

4.4.2.4. Kararlılık (Stabilite)

İvabradin stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için ivabradinin üç farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, 4 ve -20°C 'de

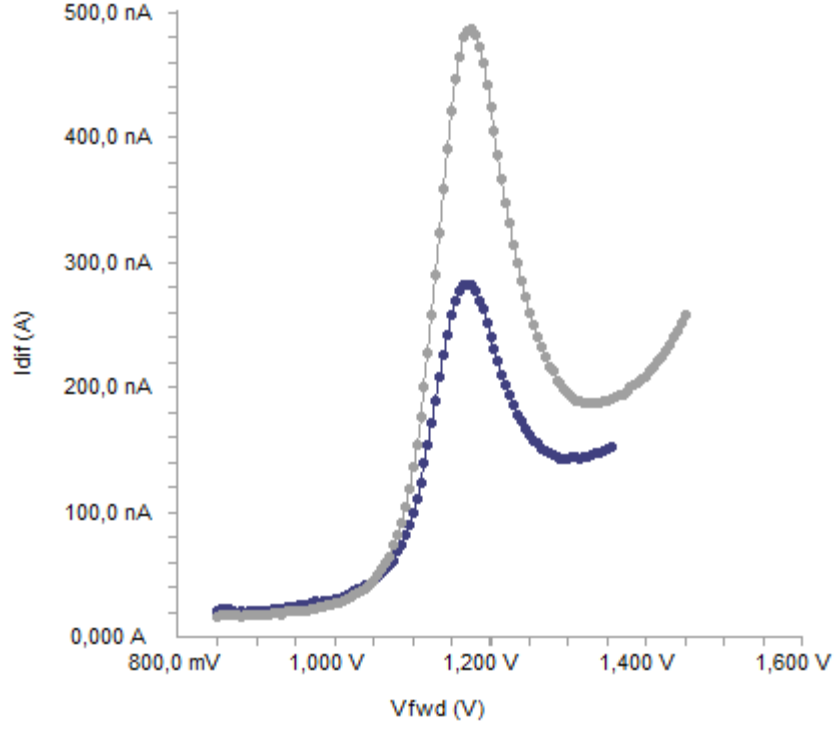
24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik akımları ölçüldü ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım ile Tablo 4.11’de verildi.

Tablo 4.11. İvabradinin diferansiyel puls voltametrik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Oda sıcaklığı		4 $^{\circ}\text{C}$		-20 $^{\circ}\text{C}$	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
10	99.6 \pm 3.48	101.2 \pm 3.84	98.6 \pm 4.68	101.2 \pm 4.26	97.4 \pm 4.25	101.2 \pm 3.92
20	101.3 \pm 4.78	99.4 \pm 3.74	101.4 \pm 5.06	98.2 \pm 4.27	101.4 \pm 3.64	102.3 \pm 4.68
30	99.2 \pm 3.49	98.2 \pm 4.98	101.3 \pm 3.62	99.6 \pm 5.84	98.4 \pm 3.43	98.6 \pm 4.09

4.4.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testi (validasyonu) yapılan yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla ivabradin içeren farmasötik preparatda etkin madde miktar analizi yapıldı. Bu çalışma için ivabradin içeren Coralan tabletten sırasıyla 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Çözeltilerin diferansiyel puls voltamogramları alınıp pik akımları okundu. Voltamogramlar standart çözeltilerin voltamogramları ile karşılaştırıldı ve Şekil 4.16’da verildi.



Şekil 4.16. Coralan farmasötik preparatının diferansiyel puls voltametrik voltamogramları ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $30 \mu\text{g ml}^{-1}$)

4.4.2.6. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Coralan tabletten $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözeltileri hazırlanarak pik akımları okundu. Sonra bu çözeltiler üzerine ivabradinin 3 farklı derişimdeki standart çözeltileri eklendi ve günüçi ve günler arası (farklı günlerde en fazla iki gün) pik akımları belirlendi. Belirlenen pik akımı değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik akımı değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.12’de verildi.

Tablo 4.12. Diferansiyel puls voltametric yöntemle belirlenen farmasötik preparatın günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

Preparat	Günüçi				Günler arası		
	Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan \pm std. sapma	Geri kazanım	% BSS	Bulunan \pm std. sapma	Geri kazanım	% BSS
Coralan (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	5	5.1 \pm 0.18	102.0	3.53	5.2 \pm 0.21	104.0	4.04
	15	14.6 \pm 0.28	97.3	1.92	14.8 \pm 0.25	98.7	1.69
	35	35.6 \pm 1.02	101.7	2.87	35.2 \pm 1.67	100.6	4.74

5. TARTIŞMA

Analitik kimya, kimyasal analizle uğraşan bir bilim dalıdır. Analitik kimyada herhangi bir maddeyi analiz etmek için kullanılacak analitik yöntemlerin üstünlükleri ve sınırlamaları hakkında yeteri kadar bir bilgi donanımına ve iyi bir karar verme yetisine sahip olmak gerekir. Ayrıca analizi yapılacak madde ile ilgili iyi bir literatür taramasının yapılmış olması da gerekmektedir. Aslında analitik bir yöntemin nasıl seçileceği konusunda net bir şey söylemek mümkün değildir; çünkü laboratuvar koşullarına bağlı olarak kullanılacak yöntemler değişebildiğinden dolayı her zaman en iyi yol sadece bir tane olamayabilir. Koşullara bağlı olarak kullanılacak yöntemler değişebilmektedir. Bundan dolayı analitik kimya çalışmaları çok büyük bir çeşitlilik arz eder.

İlaç analizlerinde kullanılacak yöntem seçimi analizin gerçekleştirildiği ortama (farmasötik preparat veya biyolojik materyal) ve laboratuvar koşullarına göre yapılmaktadır. Bir analiz için analitik yöntem geliştirildikten sonra bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için doğrusal aralık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı, tayin alt sınırı, geri kazanım ve stabilite parametreleri incelenerek yöntemin geçerlilik testinin (validasyonunun) yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada ivabradin ilaç etkin maddesinin öncelikle elektrokimyasal davranışı, dönüşümlü voltametri yöntemi ile tersinirlik ve adsorpsiyon özellikleri gibi özelliklerinin incelenmesi amaçlandı. Bu düşünceyle pH, derişim, tarama hızı gibi deneysel parametreler değiştirilerek, en uygun deneysel koşullar belirlenmiş ve bu koşullarda nicel tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elektroanalitik metotların hepsinde elektrot çözelti sistemine elektriksel etki yapılarak sistemin verdiği cevap ölçülür. Bu cevap sistemin özellikleri hakkında bilgi verir. Genel olarak bütün elektrokimyasal tekniklerde akım, potansiyel ve zaman parametreleri bulunur ve bu

parametreler tekniğın adını belirler. Mesela, voltametri, kronoamperometri ve kronokulometri gibi tekniklerde sırası ile potansiyel-akım, zaman akım ve zaman-yük parametreleri arasındaki ilişki anlatılmaktadır. Elektroanalitik metotlar genel olarak net akımın sıfır olduğu denge durumundaki statik metotlar ve denge durumundan uzakta net akımın gözlendiği dinamik metotlar olmak üzere ikiye ayrılır. Elektroanalitik tekniklerin çok büyük bir kısmı net akımın sıfır olmadığı dinamik metotlardır ve bunlar da potansiyel kontrollü veya akım kontrollüdür.²⁶

Akım kontrollü teknikler kronopotansiyometri ve kulometrik titrasyonlar olmak üzere iki kısımda incelenir. İyon seçici elektrotların kullanıldığı metotlar akımın sıfır olduğu statik elektroanalitik metotlardır. Voltametrizde deneyler üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirilmektedir. Üç elektrottan birisi zamanla potansiyeli değiştirilen indikatör elektrot veya çalışma elektrotudur.

Voltametrizde indikatör elektrot olarak, civa, platin, altın, paladyum, karbon elektrot (grafit, karbon pasta elektrot, camsı karbon elektrot) gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Elektrot sistemindeki ikinci elektrot, potansiyeli deney süresince sabit kalan referans elektrottur. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrottur. Elektrot sistemindeki üçüncü elektrot ise karşıt veya yardımcı elektrottur. Karşıt elektrot olarak ise genellikle Pt tel kullanılır.²⁷ Voltametrizde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir.

İvabradin etkin maddesi için yapılan literatür araştırmasında biyolojik sıvılarda miktar tayinine yönelik floresans dedektörlü HPLC⁸ ve LC-MS^{9,10} yöntemlerine ulaşılmıştır. İvabradinin farmasötik preparatlarda miktar tayini ile ilgili olarak da HPLC yöntemlerine ulaşılmıştır.¹¹⁻¹⁴ Çalışmalarda tampon sistemi

içeren mobil faz kompozisyonları kullanılmıştır. pH'sı bilinen tampon mobil faz sistemi günlük hazırlanması gerekmekte ve bu durum kolon ömrünü azaltmaktadır. Floresans ve kütle dedektörleri kullanılarak duyarlılık arttırılmaya çalışılmış; ancak bu dedektörler her laboratuvarında bulunamamaktadır. HPLC çalışmasında analizin yapılması, kolonun şartlandırılması, analiz öncesi HPLC sisteminin çalışmaya optimize edilmesi için çok fazla zaman harcanmaktadır. 15 yıldan beri HPLC yöntemi ile farklı etkin maddelerinin farmasötik preparatlarda ve biyolojik materyallerde yöntem geliştirme, yöntem validasyonu ve gerçek numunelerde uygulamasını yaptığımızdan dolayı HPLC sistemi ile çalışmanın zorluklarını bilmekteyiz.²⁸⁻³⁸ İvabradinin farmasötik preparatlarda, insan serum ve idrarında tayinine yönelik kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemleri ile ilgili bir çalışmaya da ulaşamamıştır. Bundan dolayı ivabradin etkin maddesinin farmasötik preparatlarda, insan serum ve idrarında tayinine ilişkin kolay, ekonomik ve hızlı yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir.

Farmasötik dozaj formlarında ivabradin ilaç etkin maddesinin fiziksel ve farmakokinetik yapısındaki değişiklikler, bu moleküllerin yükseltgenme veya indirgenme davranışlarındaki değişikliklere bağlıdır. Bu nedenle bu değişikliklerin izlenmesinde elektrokimyasal yöntemler önem taşımaktadır. Ancak üzerinde çalışılması düşünülen bu ilaç etkin maddesinin oldukça yeni olması nedeniyle literatür araştırmasında elektrokimyasal yöntemler ile analizi için bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca bu etkin maddenin elektrokimyasal mekanizması hakkında da literatürde bir bilgiye ulaşamamıştır.

Bu nedenle tez kapsamında yer alan ivabradin maddesinin yükseltgenme/indirgenme mekanizmaları üzerinde de çalışmalar yapılarak, analiz sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir. Bu tezde kullanılan elektrokimyasal

yöntem olan voltametri 1970'li yıllardan bu yana elektronikteki gelişmelerle doğrusal olarak ilaç analizlerinde sağladığı bazı üstünlükler nedeni ile giderek artan bir uygulama alanına yayılmıştır.³⁹⁻⁴¹ Özellikle sonradan geliştirilen tekniklerle çok düşük derişimlerde bile (10^{-10} - 10^{-12} M) farmasötik analizler yapılabilmektedir.⁴²⁻⁴⁴

Voltametrik yöntemlerin günümüzde çok sayıda kullanım alanı vardır. Temel olarak en önemli kullanım alanı madde miktar tayinidir. Bu nedenle özellikle klinik amaçla kullanımları çok yaygındır. İlaçların içindeki etkin maddelerin tabletlerden, biyolojik sıvılardan izole edildikten sonra miktarlarının tayininde oldukça hassas tayinler yapılabildiğinden analizlerde tercih edilen yöntemler olmuşlardır.

Modern elektro analiz yöntemler (kare dalga ve diferansiyel puls voltametri) sayesinde biyolojik sıvılardan ilaç etkin maddeleri ve metabolitlerinin direkt olarak analizinin yapılabilmesi sağlanmaktadır.^{39,41,45-47} Bu yöntemler diğer pek çok yöntemle (HPLC, LC-MS, GC-MS vb.) göre oldukça kolay olup çoğu kez herhangi bir ayırmaya gerek kalmadan gerçekleştirilebilmektedir.

Voltametri yöntemlerinin üstün yanlarından biri de, ilaç etkin maddelerinin indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarındaki rolü ile moleküler biyoloji alanında ve dolayısıyla fizyolojik önem taşıyan pek çok bileşiğin farmakolojik etki mekanizmalarının açıklanmasında kullanılmasıdır. İlaç etkin maddelerinin elektrot yüzeyindeki oksido-redüktif davranışları, ilaçların vücuda alındığı zaman vücutta uğradıkları *invivo* redoks davranışlarına benzetilmekte ya da başka bir deyişle metabolizmaları hakkında bilgi verebileceği düşünülmektedir.^{41,48}

Voltametrik analizde kullanılan katı elektrotlarla yapılan çalışmalardaki en önemli engel elektrot yüzeyinin, maddelerin yüzeyde tutulmaları nedeniyle kolayca temizlenememesi ve bu nedenle tekrar edilebilirliğin sağlanmasının oldukça zahmetli parlatma veya biraz vakit alan elektrokimyasal ön işlemler

gerektirmesidir. Bu tekrar edilebilirliğin sağlanabilmesi için son yıllarda bazı kimyasal, elektrokimyasal veya her ikisinin de bir arada kullanıldığı ön işlemlerle elektrot materyalinin aktive edilerek temizlenmesi⁴⁹ veya özellikleri değiştirilerek geliştirilmiş elektrot dizayn çalışmaları^{50,51} sayesinde yapılan analizlerde duyarlık ve seçicilik arttırılmış hatta elektroaktif yapıdaki moleküllerin analizlerinin yapılabilmesi sağlanmıştır.⁵²

İvabradin ile ilgili yapılan literatür taramasında doğrusal taramalı, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemleriyle farmasötik preparatlarda ivabradin miktar tayinine yönelik bir çalışmaya ulaşılamadı. Bu sebeple çalışmada, ivabradinin farmasötik preparatlarda miktar tayini için yeni bir yöntem olan doğrusal taramalı, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemleri geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Yöntemlerden elde edilen sonuçların özeti aşağıda verildi.

İvabradinin elektrokimyasal davranışlarını incelemeye önce, Britton-Robinson (BR) ortamı için potansiyel penceresi belirlendi. Bu amaçla, BR tamponu ortamında $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak hazırlanan ve pH'sı 2 olan çözeltinin dönüşümlü voltamogramı alındı ve Şekil 4.1'de verildi. Şekil 4.1'den de görüleceği gibi 0.8 ile 1.4 V aralığında çözücü sistemine ait herhangi bir indirgenme-yükseltgenme pikine rastlanmadı. Bu nedenle, çalışmaya uygun potansiyel penceresinin 0.8 – 1.4 V olarak seçilmesine karar verildi. BR tamponu ile hazırlanan ivabradin çözeltilerinin, 0.1 V/s tarama hızında, 0.8-1.4 V potansiyel aralığında camı karbon elektrot kullanılarak alınan dönüşümlü voltamogramı Şekil 4.1'de görülmektedir.

Şekil 4.1'de elektrokimyasal davranışı incelenen ivabradine ait, asidik bölgede elde edilen voltamogramda, bir anodik pik gözlenirken katodik pike rastlanmadı. Asidik ortamda (pH 2) anodik pik potansiyeli için +1.21 V'dur.

Voltamogramlarda bir katodik pikin gözlenmemesi, ivabradinin yükseltgenmesinin tersinmez olabileceğinin bir göstergesidir. Ancak, katodik pike rastlanmaması mutlaka elektron aktarım basamağının tersinmez olduğunu göstermez. Çünkü elektron aktarım basamağını takip eden hızlı bir kimyasal reaksiyon gerçekleşirse, katodik pik gözlenemeyebilir. Ayrıca, farklı tarama hızlarında alınan doğrusal taramalı voltametri deneylerinden elde edilen voltamogramlardan yararlanılarak da bu düşüncemiz doğrulandı (Şekil 4.2).

30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradin maddesinin, BR ortamında, camısı karbon elektrotta, 0.025-0.80 V s^{-1} arasındaki farklı tarama hızlarında alınan doğrusal taramalı voltamogramlarında, tarama hızı arttıkça pik akımlarının arttığı ve pik potansiyellerinin pozitifeye kaydığı gözlemlendi (Şekil 4.2).

Pik potansiyelinin yüksek tarama hızlarında pozitifeye kayması kriteri de, sistemin tersinmezliğinin bir göstergesidir.^{21,23} Ayrıca $v-I_m$, $v^{1/2}-I_m$ ve $\log v-\log I_m$ grafiklerinde akım fonksiyonunun tarama hızına bağlı olması da sistemin tersinmez olabileceğini düşündürdü.

Aşağıdaki şekillerde 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ivabradinin BR tamponu ortamında (pH 2) camısı karbon elektrotta, doğrusal taramalı voltamogramlarından elde edilen pik potansiyellerinin tarama hızına göre değişimleri verildi (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).

İvabradinin elektrot yüzeyine adsorplanıp adsorplanmadığının belirlenmesi için dönüşümlü ve doğrusal taramalı voltametri yöntemi kullanıldı. İvabradinin elektrot yüzeyine adsorbe olup olmadığı farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları alınarak pik akımlarının tarama hızıyla değişiminden yararlanıldı. Bu amaçla $\log i_p-\log v$ grafikleri Şekil 4.5'te çizildi. Bilindiği gibi, difüzyon dikkate alınarak türetilen ve dönüşümlü voltamogramdaki pik akımını veren

Randles-Sevcik eşitliğinden, $\log i_p$ ve $\log \nu$ arasında, eğimi 0.5 olan bir doğru elde edilir. Maddenin elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu söz konusu ise, bu bağıntıdan ve dolayısıyla 0.5'den sapmalar meydana gelir ve genellikle bu durumda grafiklerin eğimi 0.5'den büyük olur.²¹ Ayrıca çoklu CV deneylerinde ilk döngüde akım 2000 nA iken ikinci ve sonraki döngülerde akım azalmakta ve sabit kalmaktadır. Bu durum reaktifin elektron yüzeyine adsorbe olması neticesinde pik akımında bir azalmaya sebep olduğu düşünülmüştür.²¹

Yapılan çalışmada Şekil 4.5'te çizilen ivabradin için $\log i_p$ ve $\log \nu$ arasındaki grafikte eğimin 0.6065 olması difüzyon kontrollü mekanizma yanında ivabradinin elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu da söz konusudur.

Voltametrik ölçümler doğrusal taramalı, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemi kullanılarak 0.8-1.4 V potansiyel aralığında Gamry Interface 1000 markalı potansiyostatta gerçekleştirildi. Çalışmada camsı karbon elektrot indikatör elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanıldı. Elektrotlar her ölçümden sonra farklı partikül büyüklüğüne sahip alimüna ile temizlenmiştir. 0.8-1.4 Volt potansiyel aralığında kör ve ivabradin çözeltilerinin dönüşümlü voltametride taraması 100 mV tarama hızında gerçekleştirildi. Voltamogramda +1.21 Volt potansiyelde bir tane oksidasyon piki gözlemlendi. +1.21 Volt potansiyeldeki pik akımlarının değerlerinde doğrusallık sağlandığından +1.21 Volttaki potansiyelde derişime karşı pik akım değerleri dikkate alındı.

Doğrusal taramalı voltametri yönteminde +1.21 Volt potansiyeldeki 5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişime sahip ivabradin standart çözeltilerinin voltamogramları alındı (Şekil 4.8). Ayrıca yöntemin doğrusal olduğu derişim aralığında (5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ivabradin çözeltisi derişimine karşı okunan pik akımları şiddeti değerleri grafiğe

geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Voltametri yönteminin kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden regresyon doğrusu denklemi ve korelasyon katsayısı (r) sırasıyla $A=69.574x+935.11$ (A: Pik akım şiddeti, x: derişim) ve 0.9918 olarak, yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) değeri $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise $1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası kesinlik belirlenmesinde yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk belirlenmesinde bağıl hata değerleri, sırasıyla % 2.91 ve % 6.29'dan küçük olarak tespit edildi. Yöntemin uygulaması ivabradin içeren farmasötik preparatlardan Coralan tablette miktar analizi yapılarak gerçekleştirildi. Yöntemlerin farmasötik preparatdan geri kazanım değerleri % 98 ile % 102 arasında olduğu belirlendi.

Kare dalga voltametri yönteminde +1.20 Volt potansiyeldeki $5-40 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişime sahip ivabradin standart çözeltilerinin voltamogramları alındı (Şekil 4.11). Ayrıca yöntemin doğrusal olduğu derişim aralığında ($5-40 \mu\text{g ml}^{-1}$) ivabradin çözeltisi derişimine karşı okunan pik akımları şiddeti değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Voltametri yönteminin kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden regresyon doğrusu denklemi ve korelasyon katsayısı (r) sırasıyla $A=38.061x+178.17$ (A: Pik akım şiddeti, x: derişim) ve 0.9904 olarak, yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) değeri $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası kesinlik belirlenmesinde yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk belirlenmesinde bağıl hata değerleri, sırasıyla % 5.34 ve % 5.17'den küçük olarak tespit edildi. Yöntemin uygulaması ivabradin içeren farmasötik preparatlardan Coralan tablette miktar analizi yapılarak gerçekleştirildi. Yöntemlerin farmasötik preparatdan geri kazanım değerleri % 98.7 ile % 102 arasında olduğu belirlendi.

Diferansiyel puls voltametri yönteminde +1.18 Volt potansiyeldeki 5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişime sahip ivabradin standart çözeltilerinin voltamogramları alındı (Şekil 4.14). Ayrıca yöntemin doğrusal olduğu derişim aralığında (5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ivabradin çözeltisi derişimine karşı okunan pik akımları şiddeti değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Voltametri yönteminin kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden regresyon doğrusu denklemi ve korelasyon katsayısı (r) sırasıyla $A=13.625x+75.045$ (A: Pik akım şiddeti, x: derişim) ve 0.9986 olarak, yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise 0.9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası kesinlik belirlenmesinde yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk belirlenmesinde bağıl hata değerleri, sırasıyla % 4.36 ve % 5.33'den küçük olarak tespit edildi. Yöntemin uygulaması ivabradin içeren farmasötik preparatlardan Coralan tablette miktar analizi yapılarak gerçekleştirildi. Yöntemlerin farmasötik preparatdan geri kazanım değerleri % 97.3 ile % 104 arasında olduğu belirlendi.

Farmasötik preparatlarda ivabradin için geliştirilen doğrusal taramalı, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yönteminin güniçi ve günler arası yüzde bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri yaklaşık olarak % 6.0'dan küçük olduğundan dolayı oldukça iyi bir değerdedir. Bu sebeple geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan her üç yöntemin yüzde bağıl standart sapma ve bağıl hata değerlerine göre yöntemlerin kesinliği, doğruluğu ve tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu söylenebilir. Ayrıca her üç yöntemin farmasötik preparatlardan geri kazanım değerleri de oldukça yüksektir. Farmasötik preparatlarda ivabradin miktar tayini için uygulanan doğrusal taramalı, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemlerinin birbiriyle karşılaştırılması amacıyla da F-testi yapıldı. Bu test

sonucunda her üç yöntemin arasında herhangi bir farkın olmadığı görülmektedir ($F_{\text{hesap}}: 2.047$ ve $F_{\text{cetvel}}: 0.05 (2, 18): 3.55$; $F_{\text{hesap}} < F_{\text{cetvel}}$ olduğundan $P > 0.05$).

Ayrıca geliştirilen yöntemlerin farmasötik preparatlardan geri kazanım değerleri de oldukça yüksektir. Bu yöntemlerin başka bir avantajı da herhangi bir ön zenginleştirme, ekstraksiyon veya uzun bir numune hazırlama işlemine gerek duyulmadan doğrudan ölçüm yapılabilmesine izin vermesidir. Bu nedenle ilaç endüstrisinde kalite kontrol çalışmalarında doğrusal taramalı, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemi başarıyla uygulanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ivabradin etkin maddesinin standart çözeltilerde ve farmasötik preparatlarda miktar tayini için literatürdeki yöntemlere alternatif olacak doğrusal taramalı, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı.

Geliştirilen bu yöntemler hassas, duyarlı, seçici, doğru ve kesin olduğu geçerlilik testleri ile gösterildiğinden dolayı yöntemlerin farmasötik preparatlarda ivabradinin miktar tayini için uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ileriki çalışmalara da yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Bunlar;

Önerilen kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemleri kalp-damar sistemi hastalıklarında ülkemizde ve bölgemizde yaygın olarak kullanılan ivabradin etkin maddesinin insan serum ve idrarında duyarlı ve ekonomik tayinlerinin gerçekleştirilmesine imkan verebilir.

Kalp damar sistemi hastalıklarında kullanılan ilaçların analizleri için kromatografik sistemler pahalı organik solvanları kullanırken, geliştirilen yöntemlerde minimum solvan sarfiyatı bulunmaktadır. Bunun için ön zenginleştirme, ekstraksiyon veya türevlendirme gibi basamaklara ihtiyaç duyulmadan kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemleri ile direkt ölçüm yapılmasıyla literatürdeki diğer yöntemlere alternatif olabilir. Bu anlamda yapılan tez özgün bir çalışmadır.

Ayrıca yürütülen araştırmanın bilimsel katkısı ve pratik sonuçları şunlardır:

- Seçilen ivabradin etkin maddesinin yükseltgenme ve indirgenme mekanizması aydınlatılmış, böylece bu etkin maddenin vücutta nasıl bir mekanizma ile metabolize olduğu hakkında in vitro olarak bilgi sahibi olunmaya çalışılmıştır.

- İvabradin etkin maddesinin ileride insan serum ve idrarında tayini için önerilecek ekonomik ve rutin analizlere uygulanabilecek özgün iki yöntem geliştirilmiş oldu. Bu nedenle özellikle tıp alanında rutin analizlerin yapılması kolaylaşmakta ve çok sayıda analiz kısa sürede ve az numune ihtiyacı ile yapılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Onat A, Uğur M, Tuncer M, Ayhan E, Kaya Z, Küçükdurmaz Z. Age at death in the Turkish adult risk factor study: temporal trend and regional distribution at 56,700 person-years follow-up. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 2009, 37:155-60.
2. Abacı A. The current status of cardiovascular risk factors in Turkey. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 2011, 39:1-5.
3. Yusuf S, Camm AJ. The sinus tachycardias. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2005, 2:44-52.
4. Borer JS, Fox K, Jaillon P, Lerebours G. Ivabradine investigators group. Anti-anginal and antiischemic effects of ivabradine, an if inhibitor, in stable angina. *Circulation*, 2003, 107:817-823.
5. Tardif JC, Ford I, Tendera M, Bourassa MG, Fox K. Efficacy of ivabradine, a new selective If inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina. *European Heart Journal*, 2005, 26:2529-2536.
6. Savelieva I, Camm AJ. If inhibition with ivabradine: electrophysiological effects and safety. *Drug Safety*, 2008, 31:95-107.
7. Schulze V, Steiner S, Hennersdorf M, Strauer BE. Ivabradine as an alternative therapeutic trial in the therapy of inappropriate sinus tachycardia: a case report. *Journal of Cardiology*, 2008, 110:206-208.
8. Klippert P, Jeannot JP, Polve S, Lefevre C, Merdjan H. Determination of ivabradine and its N-demethylated metabolite in human plasma and urine, and in rat dog plasma by a validated high-performance liquid chromatographic method fluorescence detection. *Journal of Chromatography B Biomedical Science Applied*, 1998, 719:125-133.

9. Francois BM, Simonin G, Bossant MJ, Boursier NC. Simultaneous determination of ivabradine and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B Biomedical Science Applied*, 2007, 745:261-269.
10. Riesen SC, Ni W, Carnes CA, Lindsey KJ, Phelps MA, Schober KE. Pharmacokinetics of oral ivabradine in healthy cats. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*, 2011, 34:469-475.
11. Rahman R, Asaduzzaman MD, Ashraful SM. Development and validation of RP-HPLC method for analysis of ivabradine hydrochloride in tablet dosage forms. *Research Journal of Pharmaceutical Biological Chemical Science*, 2012, 3:1034-1043.
12. Seerapu S, Srinivasan BP. Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of ivabradine hydrochloride in tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 72:667-671.
13. Maheshwari S, Khandhar AP, Jain A. Quantitative determination and validation of ivabradine HCL by stability indicating RP-HPLC method and spectrophotometric method in solid dosage form. *European Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 5:53-62.
14. Karuppiyah SP, Analytical method development for dissolution release of finished solid oral dosage forms. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2012, 4:48-53.
15. Selva Kumar P, Pandiyan K, Rajagopal K. Development and validation of stability indicating rapid HPLC method for estimation of ivabradine hydrochloride in solid oral dosage form. *International Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences*, 2014, 16:378-382.

16. Francois-Bouchard M, Simonin G, Bossant MJ, Boursier-Neyret C. Simultaneous determination of ivabradine and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2000, 745:261-269.
17. Klippert P, Jeannot JP, Sabine P, Lefevre C, Merdjan H. Determination of ivabradine and its *N*-demethylated metabolite in human plasma and urine, and in rat and dog plasma by a validated high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 1998, 719:125-133.
18. Lu C, Jia Y, Yang J, Jin X, Song Y, Liu W, Ding Y, Sun X, Wen A. Simultaneous determination of ivabradine and *N*-desmethyivabradine in human plasma and urine using a LC-MS/MS method: application to a pharmacokinetic study. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2012, 2(2):205-212.
19. Shweta M, Amit P, Khandhar A J. Quantitative determination and validation of ivabradine hcl by stability indicating RP-HPLC method and spectrophotometric method in solid dosage form. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 2010 5(1):53-62.
20. Izutsu K. Electrochemistry in nonaqueous solutions. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.
21. Bard AJ, Faulkner LR. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. John Wiley and Sons. Inc. New York, 2001.
22. Wang J. *Analytical Electrochemistry*. 2nd edition. John Wiley and Sons. Inc. New York, 2000.

23. Nicholson RS and Shain I. Theory of stationary electrode polarography: Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Journal of Analytical Chemistry*, 1964, 36(4):706-724
24. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>. (15 Nisan 2012).
25. Validation of Analytical Procedures. Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH). *Commission of the European Communities*, 1996.
26. Uslu B, Özkan SA, Şentürk Z. Electrooxidation of the antiviral drug valacyclovir and its square wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 555:341-347.
27. Zuhri AZ, Al- Khalil S, Shubietah RM, El- Hroub I. Electrochemical study on the determination of tinidazole in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 21:881-886.
28. Yılmaz B, Kadioğlu YY, Aksoy Y. Simultaneous determination of gemcitabine and its metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2003, 791:103-109.
29. Yılmaz B, Kadioğlu Y, Aksoy Y. Investigation of the pharmacokinetics of gemcitabine and 2',2'-difluorodeoxyuridine in human plasma by liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 2004, 332:234-237.

30. Yilmaz B, Asci A, Arslan S, Determination of metoprolol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 2010, 33:1904-1908.
31. Yilmaz B, Asci A, Palabiyik SS. Determination of ibuprofen in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi*, 2010, 16:1005-1010.
32. Yilmaz B, Asci A, Palabiyik SS. HPLC method for determination of diclofenac in human plasma and its application to a pharmacokinetic study in Turkey. *Journal of Chromatography Science*, 2011, 49:422-427.
33. Yilmaz B, Meral K, Asci A, Onganer Y. Determination of metoprolol in pure and pharmaceutical dosage forms by spectrofluorometry and high performance liquid chromatography. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 2011, 17:25-31.
34. Yilmaz B, Kadioglu Y. Determination of insulin in rabbit plasma using high-performance liquid chromatography. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi*, 2012, 18:31-36.
35. Yilmaz B, Kadioglu Y, Capoglu I. Determination of insulin in humans with insulin-dependent diabetes mellitus patients by HPLC with diode array detection. *Journal of Chromatography Science*, 2012, 50:586-590.
36. Yilmaz B, Kadioglu Y, Meral K, Onganer Y. Determination of human growth hormone in pure and pharmaceutical dosage form by spectrofluorometry and high performance liquid chromatography. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 2012, 18:399-405.

- 37.** Yilmaz B, Arslan S, Asci A. HPLC method for determination of atenolol in human plasma and its application to a pharmacokinetic study in Turkey. *Journal of Chromatography Science*, 2012, 50:914-919.
- 38.** Yilmaz B, Kadioglu Y. Quantitation of 17 β -estradiol in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2013, 36:1126-1137.
- 39.** Bramer SL, Tata PNV, Vengurlekar SS, Brisson JH. Method for the quantitative analysis of cilostazol and its metabolites in human plasma using LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 26:637-650.
- 40.** Kanthi KVS, Varanasi V, Sridhar SPR, Shraddha SPN, Sivakumar S, Kanaga Sabapathi TRS, Satheeshmanikandan VVS, Swaroop K. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of nateglinide, cilostazol and its active metabolite 3,4-dehydro-cilostazol in Wistar rat plasma and its application to pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 2008, 865:91-98.
- 41.** Wassel AA, Amin AS, Ahmed IS, Dessouki HA, Hendawy HAM. Electrochemical behavior and determination of cilostazol in pure, urine and in pharmaceutical formulations. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry*, 2012, 4:197-211.
- 42.** Bersier PM. Application of polarography and voltammetry to drug analysis in industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1983, 1:475-490.

43. Bersier PM, Bersier J. Polarographic, voltammetric, and HPLC-EC of pharmaceutically relevant cyclic compounds. *Electroanalysis*, 1994, 6(14):171-191.
44. Kauffmann JM, Vire JC. Pharmaceutical and biomedical applications of electroanalysis. *Analytica Chimica Acta*, 1993, 273:329-336.
45. Tuzhi P, Zhongping Y, Rongshan L. Voltammetric measurement of haloperidol following adsorptive accumulation at glassy-carbon electrodes. *Talanta*, 1991, 38:741-745.
46. Vire JC, Zhang H, Quarin G, Patriarche GJ, Şentürk Z, Christian GD. Electrochemical behavior of zopiclone. *Talanta*, 1993, 40:313-323.
47. Sentürk Z. Analysis of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): An overview of modern electroanalytical techniques and their applications. *Current Drug Delivery Journal*, 2013, 10:76-91.
48. Yilmaz S, Uslu B, Ozkan SA. Anodic oxidation of etodolac and its square wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum. *Talanta*, 2001, 54:351-360.
49. Ozkan SA, Ozkan Y, Senturk Z. Electrooxidation of pimozide and its differential pulse voltammetric and HPLC-EC determination. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 453:221-229.
50. Vilchez JL, Araujo L, Prieto A, Navalon A. Differential-pulse adsorptive stripping voltammetric determination of the antibacterial lomefloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 26: 23-29.
51. Wang J. (Ed.) *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, VCH Publishers, Inc. New York, 1988.

- 52.** Ozkan S, Biryol I, Senturk Z. An activation method for glassy carbon electrode. *Turkish Journal of Chemistry*, 1994, 18:34-40.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
<p>Adı Soyadı: Bilge Kağan AKÇAY Doğum tarihi: 01.10.1987 Doğum yeri: Erzurum Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0442 240 03 50 Faks: 04422315201 E-mail: ezgin20@hotmail.com</p>
Eğitim
<p>Lise: Erzurum Mehmet Akif Ersoy Lisesi (2005) Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2009-2012) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2013-2015)</p>
Yabancı Dil Bilgisi
<p>İngilizce : -</p>
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
<p>---</p>
Sürücü Belgesi
<p>B Sınıfı</p>
İlgi Alanları ve Hobiler
<p>Kitap okuma, araştırma, spor</p>

EK-2. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/ 276
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

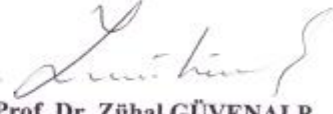
28/02/2014

Sayın: Doç. Dr. Bilal YILMAZ

İlgi : 26.02.2014 tarih ve 220 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Etik Alt Kurulunun 28.02.2014 tarihinde almış olduğu 2'nolu karar ile "İvabradin Etkin Maddesinin Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Voltametrik Yöntemler ile Tayini" başlıklı yüksek lisans öğrenciniz Bilge Kağan AKÇAY ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulumuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Etik Alt Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ: 28.02.2014
TOPLANTI SAYISI: 2

Karar -2- Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Bilal YILMAZ'ın yürütücülüğünde Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarlarında yürütülecek olan "İvabradin Etkin Maddesinin Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Voltametrik Yöntemler ile Tayini" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 26.02.2014 tarih ve 220 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne (Doç. Dr. Bilal YILMAZ oylamaya katılmadı) karar verildi.