



T.C.

BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**STEROİD-OLMAYAN ANTİİNFLAMATUVAR İLAÇ GRUBUNDA YER
ALAN NEPAFENAK'IN KALEM GRAFİT ELEKTROT
KULLANILARAK ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ VE MİKTAR TAYİNİ**

HÜSEYİN ERSALİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim dalı

NİSAN 2023
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Hüseyin ERSALI tarafından hazırlanan **Steroid-Olmayan Antiinflamatuvar İlaç Grubunda Yer Alan Nepafenak'ın Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi Ve Miktar Tayini**” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

.....

Danışman

Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

.....

Üye

Doç. Dr. Ertuğrul KESKİN

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Yalcın ALTUNKAYNAK

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Osman PAKMA
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması **BATMAN ÜNİVERSİTESİ-BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ BİRİMİ** tarafından **BTÜBAP-2023-YL-02** nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Hüseyin ERSALI

Nisan 2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

STEROİD-OLMAYAN ANTİİNFLAMATUVAR İLAÇ GRUBUNDA YER ALAN NEPAFENAK'IN KALEM GRAFİT ELEKTROT KULLANILARAK ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE MİKTAR TAYİNİ

HÜSEYİN ERSALİ

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

2023, 48 sayfa

Jüri

Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT
Doç. Dr. Ertuğrul KESKİN
Dr.Öğr. Üyesi Yalçın ALTUNKAYNAK

Özet

Bu tez çalışmamızda steroid olmayan anti inflamatuvar ilaç grubunda bulunan ve göz hastalığı cerrahi operasyonlardan sonra kullanılan Nepafenak'ın elektrokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Araştırmada elektroanalitik yöntemlerden voltametri tekniği kullanılmıştır. Elektrokimyasal bir ön işlem ile kurşun kalem elektrot aktive edilmiştir. Dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile kurşun kalem elektrot yüzeyinde Asetat(pH 4.8) destek elektrolit ortamında +1.01 V civarında hassas bir yanıt elde edilmiştir. Kare dalga voltametrisi (SWV) ile asetat (pH=4.8) ortamında 0.3-3.5 μM derişim aralığında gözlemlenebilme ve en düşük tayin sınırları sırasıyla 0.035 μM ve 0.11 μM olarak hesaplanmıştır. Bu teknik yardımıyla Nepafenak bileşiminin miktar tayini çalışması ilaç formuna başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dönüşümlü voltametri, Kare dalga voltametri, Kurşun kalem elektrot, Nepafenak

ABSTRACT

MS THESIS

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR AND DETERMINATION OF NEPAFENAC THAT BELONGS TO NON STEROIDAL ANTI INFLAMMATORY DRUGS, BY USING DISPOSABLE PENCIL GRAPHITE ELECTRODE

HÜSEYİN ERSALİ

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
BATMAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE**

Advisor: Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

2022, 48 PAGES

Jury

**Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT
Associate. Prof. Ertuğrul KESKİN
Dr. Lecturer Yalçın ALTUNKAYNAK**

Abstract

In this thesis, the electrochemical properties of Nepafenac, which is in the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs and used after surgical operations in eye diseases, were investigated. Voltammetry method, one of the electroanalytical methods, was used in the research. The pencil graphite electrode was activated by an electrochemical pretreatment. In (CV) cyclic voltammetry, a sensitive response of around +1.1 V was obtained in the support electrolyte environment of acetate (pH 4.8) on the pencil graphite electrode surface. By (SWV) square wave voltammetry, the detection limit in the concentration range of 0.3-3.5 μM was observed. The limit of detection and the limit of in acetate (pH=4.8) were calculated as 0.035 μM and 0.11 μM respectively. With the help of this technique, the quantification study of the Nepafenac compound was applied to the drug form successfully.

Keywords: Cyclic voltammetry, Nepafenac, Nonsteroidal anti inflammatory drug, PG electrode, Square wave voltammetry,

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda araştıracağım konuyu belirlememde, hazırlık safhasında ve yaşanabilecek tüm olumsuz durumlarda cesaret ve kararlılıkla çözüme odaklanmamda beni destekleyen, değerli zamanını ve mekanını paylaşmayı esirgemeyen duayen bilim insanı Prof.Dr Abdulkadir LEVENT hocama sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim. Aynı dönem içinde bulduğu her fırsatta yardımına koşan beni koşulsuz destekleyen değerli eşim Sevgi AKDUMAN ERSALİ'ya doktora öğrencisi Mehmet ASLAN'a ve Dr. Öğretim Üyesi Günay ÖNAL hocalarıma teşekkür ederim.

Hüseyin ERSALİ
BATMAN-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Elektrokimya	2
1.2. Polarografi	4
1.3. Voltametri	5
1.3.1 Doğrusal taramalı voltametri	4
1.3.2 Dönüşümlü voltametri	4
1.4. Puls voltametrik teknikler	6
1.4.1. Normal Puls Voltametrisi	6
1.4.2. Diferansiyel puls voltametrisi	7
1.4.3. Kare dalga voltametrisi	8
1.5. Sıyırma Voltametrisi	8
1.5.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi	9
1.5.2. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi	9
1.5.3. Katodik Sıyırma Voltametrisi	9
1.6. Elektrokimyasal Sistemler	9
1.7. Voltametriye Kullanılan Çalışma Elektrotları	11
1.7.1. Kalem Grafit Elektrot	11
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	13
2.1. NSAİ İlaçlar	14
2.2. Nepafenak	
2.3. Nepafenak üzerinde Yapılan Bilimsel Çalışmalar	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Voltametrik çalışmalarda kullanılan araç ve gereçler	17
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
3.2. Çözeltilerin hazırlanması	18
3.2.1. Stok çözeltilerin hazırlanması	18
3.2.2. Destek elektroliti çözeltilerinin hazırlanması	18
3.3. Elektrokimyasal ölçümler	19
3.3.1. Voltametrik Yöntem	19
3.4. Gerçek Numunelerin Analize Hazırlanması	20
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	21

4.1. Nepafenak'ın KG Elektrot Üzerindeki Elektrokimyasal davranışın İncelenmesi	21
4.1.1. Dönüşümlü Voltametri	21
4.1.2. Destek elektroliti ve pH etkisi	27
4.1.3. Sürfaktan Etkisi	28
4.1.4. Biriktirme/sıyırma koşullarının etkisi	29
4.1.5. Kare-dalga değişkenlerinin etkisi	29
4.1.6. Analitik Çalışma Koşulları	32
4.1.7. Gerçek Numune Analizleri	34
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	40



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABS	: Asetat tampon çözeltisi
Ag/AgCl	: Gümüş/gümüş klorür elektrot
ASV	: Anodik sıyırma voltametrisi
AdSV	: Adsorbtif sıyırma voltametrisi
BR	: Britton Robinson
BMH	: 1-n-butil-3-metilpiridinyum heksaflorofosfat
COX	: Siklooksijenaz
CP	: Karbon pasta
CPE	: Karbon pasta elektrot
CSV	: Katodik sıyırma voltametrisi
CV	: Dönüşümlü voltametri
DPV	: Diferansiyel puls voltametrisi
Ep	: Pik gerilimi
GCE	: Camsı karbon elektrot
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPTLC	: Yüksek performans ince tabaka kromatografisi
Ip	: Pik akımı
ISE	: İyon seçici elektrot
KGE	: Kalem grafit elektrot
LC	: Sıvı kromatografisi
LSV	: Doğrusal taramalı voltametri
MS	: Kütle spektrometresi
MWCNT	: Çok duvarlı karbon nanotüp
NSAİİ	: Nonsteroidal anti inflamatuvar ilaç

NPV	: Normal puls voltametrısı
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
RP-HPLC	: Ters faz- yüksek performans sıvı kromatografisi
RP-UPLC	: Ters faz ultra performans sıvı kromatografisi
SHE	: Standart hidrojen elektrotu
SWV	: Kare dalga voltametrısı
UHPLC	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV	: Ultra viyole
VTE	: Venöz tromboembolik
V	: Gerilim
v	: Gerilim tarama hızı
WE	: Çalışma elektrodu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1.Katarakt göz rahatsızlığı.....	1
Şekil 1.2. Elektro analitik yöntemlerin şeması.....	3
Şekil1.3. CV tekniğine ait farklı voltamogramlar. (Wang, 2000'den modifiye edilmiştir.....	5
Şekil1.4. Normal puls voltametri uyarma sinyali.....	6
Şekil 1.5. Lineer olarak artan DPV uyarma sinyali	7
Şekil 1.6. SWV uyarma sinyali (Skoog ve ark., 1996).....	7
Şekil 1.7. Voltametride üçlü elektrot sistemi	10
Şekil 3.1. PGSTAT128N potansiyostat ve BASi üçlü hücre cihazı.....	18
Şekil 4.1. 3.93×10^{-4} M Nepafenak Asetat (pH 4.8) tampon çözelti içinde çift döngülü voltamogram. Elektrot, KGE; gerilim tarama hızı, 100 mVs^{-1} . Kesikli çizgi, destek elektroliti.....	20
Şekil 4.2. 3.93×10^{-4} M Nepafenak 0.04 M Asetat tamponu (pH 4.8) içinde ($25- 600$) mVs^{-1} gerilim tarama hızlarıyla elde edilen voltamogramlar.....	21
Şekil 4.3. I_{a1} 'e ait (a) $\sqrt{v}-I_p$, (b) $v-I_p$, (c) $\log v-\log I_p$ ve (d) $\log v- E_p$ grafikleri...25	
Şekil 4.4. I_{a2} ' ye ait (a) $\sqrt{v}/I_p$, (b) v/I_p , (c) $\log v/\log I_p$ ve (d) $E_p/\log v$ grafikleri..25	
Şekil 4.5. 7.86×10^{-5} M Nepafenak 0.04 M fosfat (pH 3.0, 4.0, 7.4 ve 9.0) ve asetat (pH 4.8) tamponları içinde KG elektrot kullanarak elde edilen eğriler SWV değişkenleri: frekans, 50 Hz; adım gerilimi, 9 mV; amplitüd, 40 mV.....	27
Şekil 4.6. 7.86×10^{-5} M Nepafenak ve 0.04 M BR tamponu içinde (pH 2.0-10.0) KG elektrot kullanarak elde edilen SWV eğrileri SWV değişkenleri: frekans, 30 Hz; adım gerilimi, 10 mV; amplitüd, 90 mV.....	27
Şekil 4.7. Nepafenak pik gerilimi (E_p) ve pik akımı (I_p) üzerine pH etkisinin Grafikleri.....	27
Şekil 4.8. KG elektrot yüzeyinde 7.86×10^{-5} M Nepafenak'ın Asetat tamponu (pH 4.8) çözeltisi içindeki farklı adım potansiyelindeki SW voltamogramları ve dağılım grafiği.	28
Şekil 4.9. KG elektrot yüzeyinde 7.86×10^{-5} M Nepafenak'ın Asetat tamponu (pH 4.8) çözeltisi içindeki farklı amplitüd deki kare dalga voltamogramları ve dağılım grafiği	

.....29

Şekil 4.10. KG elektrot yüzeyinde 7.86×10^{-5} M Nepafenakın Asetat tamponu (pH 4.8) çözeltisindeki farklı frekans değerlerindeki kare dalga voltamogramları ve dağılım grafiği.....29

Şekil 4.11. (A) Nepafenak,ın farklı derişimlerinin [(1) 1.0, (2) 1.5, (3) 2.0, (4) 2.5, (5) 3.0, (6) 3.5, (7) 4.0, (8) 4.5 μ M] Asetat tamponu (pH 4.8) içerisinde kaydedilen SW değışkenleri: frekans, 30 Hz; adım gerilimi, 10 mV; amplitüd, 90 mV. Kesikli çizgi, destek elektroliti. Ek (B): I_p/C Nepafenak kalibrasyon eğrisi.....31

Şekil 4.12. Nepafenak (0.2 μ M-0.6 μ M) çözeltilerinin Asetat (pH 4.8) tampon içerisinde idrar numunelerinin kare dalga voltamogramları. Kare dalga parametreleri şekil32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Kimyasal yapılarına göre NSAİ sınıflandırması.....	14
Çizelge 2.2. Nepafenak'ın genel özellikleri	15
Çizelge 2.3. Nepafenak'a ait bazı analitik çalışmalar.....	15
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan malzemeler.....	17
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar.....	17
Çizelge 4.1. 3.93×10^{-4} M Nepafenak etken maddesinin, Ia₁ 'e ait gerilim tarama hızının voltamogramlardaki pik akımı ve pik gerilimi üzerinde etkisi. Teknik, CV; destek elektroliti, Asetat tamponu (pH 4.8); elektrot, KGE.....	22
Çizelge 4.2. Nepafenak etken maddesinin, Ia₂ 'ye ait gerilim tarama hızının voltamogramlardaki pik akımı ve pik gerilimi üzerinde etkisi. 3.93×10^{-4} M Nepafenak içerisinde; Teknik, CV; destek elektroliti, Asetat tamponu (pH 4.8); elektrot, KGE.....	24
Çizelge 4.3. Nepafenak pik gerilimi (Ep) ve pik akımı (ip) üzerine pH etkisi. 7.86×10^{-5} M Nepafenak Asetat tamponu içinde (pH 2.0-8.0) SWV değişkenleri: frekans, 30 Hz; adım gerilimi, 10 mV; amplitüd, 90 mV	27
Çizelge 4.4. Nepafenak'a ait miktar tayini çalışmalarında voltametrik teknikle elde edilen optimum deneysel ve aletsel değişkenler.....	33
Çizelge 4.5. İdrar numunelerinde geri kazanım çalışması.....	35
Çizelge 4.6. Nepafenak içeren Nevanac (%0.1) steril süspansiyon göz damlası SWV analizi sonuçları.....	35

1. GİRİŞ

Göz kusurları, çevre faktörleri veya kalıtsal faktörlere dayanarak ortaya çıkan ve çeşitli görme sorunlarına neden olan fiziksel problemlerdir. Gözümüzü dış ortam koşullarına karşı korunmasını sağlayan göz kapaklarımızda, korneada, gözyaşı kanallarında, göz merceğinde ya da gözümüzü tümünden çevreleyen sinir dokularında oluşan her türlü sorun göz hastalıkları olarak ifade edilir. Göz rahatsızlıklarını doğru ve güvenilir yöntemlerle tedavi etmek oldukça önemlidir (Kim ve ark., 2010). Bu nedenle göz hastalıkları tedavi süreçlerinde oftalmik ilaçlara olan talep yükseliş eğilimindedir. Bu bağlamda nonsteroidal anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), ağrı ve inflamasyonun giderilmesinde oldukça büyük rol oynarlar.

Literatür taraması yapıldığında NSAİ ilaç grubunda yer alan etken maddelerin davranışlarının farklı ortam koşullarındaki optimum etkinlik seviyelerini ölçmek adına çeşitli kimyasal analiz yöntemlerinin bulunduğu belirlenmiştir. Bu yöntemlerin çoğu, doğal yanıt sürelerinin uzunluğu, pahalı ana ve yardımcı enstrümantasyon gerekliliği nedenleriyle zahmetli ve zaman alıcıdır. Özellikle bilimsel araştırmalarda, bu yöntemlere alternatif olarak elektrokimyasal yöntemlerin önerildiği görülmektedir. Elektrokimyasal yöntemler, farmasötiklerdeki çeşitli bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinleri için zaman ve maliyet açısından daha uygun ve son zamanlarda büyük ilgi gören yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Aguilar-Lira ve ark., 2014).

Oftalmik rahatsızlıklarla mücadele etmek için çeşitli NSAİİ'ler kullanılmaktadır. Bu ilaçlardan bir tanesi de etken maddesi Nepafenak olan NSAİİ grubunda olduğu bilinen bir ilaçtır (Kessel ve ark., 2014). Nepafenak katarakt ameliyatını takiben gözde ortaya çıkan ağrı ve inflamasyonun engellenmesinde ve tedavi edilmesinde kullanılmaktadır (James ve ark., 2016).

Şekil 1.1' de katarakt göz rahatsızlığına ait bir görsel verilmiştir.



Şekil 1.1. Katarakt göz rahatsızlığı.

Yaptığımız literatür araştırmasına göre Nepafenak'ın kaynakçada yer alan iki tane elektrokimyasal çalışmasına rastlanmıştır. Bu tez çalışmasında Nepafenak'ın elektrokimyasal özelliklerinin farklı bir çalışma elektrotu kullanılarak gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. Elektrokimyasal yöntemlerin hızlı yanıtları, düşük maliyetleri, yeşil kimya teknolojilerini minyatürleştirmeleri ve on-line saha izleme olanakları sayesinde, ilaçların analizi için çok hassas ve yararlı oldukları kanıtlanmıştır (Uslu ve Özkan, 2011; Nigovic ve ark., 2018). Buna rağmen bildiğimiz kadarıyla, nepafenak molekülünün yalnız KG (kalem grafit) elektrot kullanılarak elektrokimyasal yöntemle tayinine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı KG elektrot kullanarak (CV) dönüşümlü voltametri ve (SWV) kare dalga voltametri teknikleri yardımıyla Nepafenak'ın voltametrik davranışlarının incelenmesidir. Bu çalışmada elde edilecek veriler farmasötik formülasyonlarda elektrokimyasal analizler için basit, hızlı ve ucuz yöntem geliştirmek için kullanılacaktır.

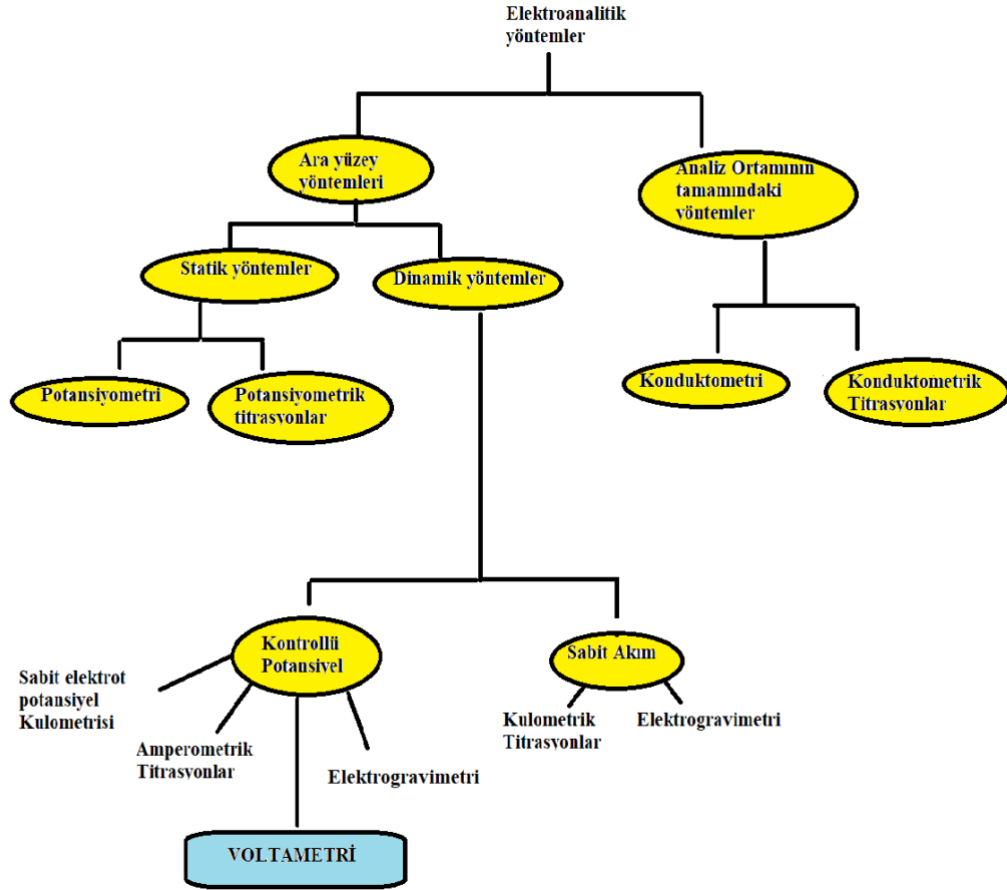
Bu çalışmada çalışma elektrotu olarak ucuz, basit ve pratik olan KG elektrot kullanılmıştır. KGE sağladığı üstün kabiliyet ve performans değerleriyle birçok avantajı sunmaktadır. Test edilecek ilaç miktarının ve KGE yüzeyinde biriken etken maddenin elektroanalitik tekniklerle analizinin yapılabilmesi için geliştirilmiş olan bu yöntemin istatistiksel değerlendirilmesinin sonuçları yorumlanmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak tez kapsamında Nepafenak'ın elektrokimyasal yöntemle tayini için hassas ve seçici olan bir voltametrik yöntem tanımlanmıştır.

1.1. Elektrokimya

Elektrokimya bir iletken (metal, grafit, veya yarı iletken) ile iyonik bir iletken (elektrolit) arayüzeyinde meydana gelen reaksiyonların incelenmesine dayanır. Elektrokimya, polarize şartlar altında elektrot yüzeyinde yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonlarındaki elektron hareketinin incelenmesidir. Elektrokimyanın amacı kimyasal enerji ve elektrik enerjisi arasındaki değişimi incelemektir. Elektrokimyanın sağladığı bilimsel veriler, elektrik enerjisi ile maddenin etkileşimi sonucu oluşan reaksiyonların kimyasal açıdan incelenmesi ve anlaşılmasıyla elde edilmiştir.

Elektro analitik yöntemler ise analizlerde analite çok düşük miktarlarda tayin izni vermekte ve uygulama alanları hakkında geniş bilgi sağlamaktadır. Bu yöntemler potansiyometrik ve potansiyostatik yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Potansiyometri, akım sıfırlandığında potansiyelin belirlendiği bir tür elektrokimyasal analiz yöntemi olup akım geçişi olmamaktadır. Potansiyel ölçmeye dayanılarak çözeltide gerçekleşen elektrokimyasal değişim açıklanır. Potansiyostatik yöntemler ise potansiyel kontrolünde olup, çözelti ve elektrot arasındaki yük transferi incelenir. Akım ölçülerek reaksiyon hakkında bilgiler elde edilir ve analitin derişimi hakkında bilgiler sunar (Wang, 2006).

Elektrokimyasal yöntemlerin genel özellikleri; duyarlılık, hızlılık, seçici olma, düşük tayin sınırı ve ekonomik olma gibi pozitif niteliklere sahip olmalarıdır. Bu yöntemler spektroskopik ve kromatografik yöntemlere göre son zamanlarda oldukça hızlı gelişen ve uygulama alanları artan tekniklerdir. Günümüz itibarıyla bu teknikler, spektroskopik ve kromatografik tekniklere iyi bir alternatif olmaktan öteye geçmiş daha çok tercih edilmeleri mümkün olmuştur (Henden ve ark., 2001). Şekil 1.2’de elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması verilmiştir.



Şekil 1.2.Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması (Aslan, 2019’dan modifiye edilmiştir).

1.2. Polarografi

Polarografi, uygulanan gerilimin işlevi olarak polarize olabilen bir elektrotta, analitin elektrolizinden kaynaklanan akımı ölçmek için kullanılan bir elektrokimyasal analiz yöntemidir. 20. Yüzyılın başında Çek bilim insanı Yaroslav Heyrovsky'nin polarografi tekniğini bulmasıyla voltametrinin alanı oluşturuldu. Polarografi yöntemin diğer elektroanalitik yöntemlerden farkı, damlayan civa elektrotun kullanılıyor olmasıdır. Polarografide verilerin hesaplanması, özel bir elektrokimyasal hücreye uygulanacak olan gerilimin fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayanır. Oluşan akım-potansiyel eğrilerine polarogram adı verilir; eğriler elektrotların daldırıldığı çözeltinin kalitatif ve kantitatif bileşiminin açıklanmasında kullanılır (Wang, 2006).

1.3 Voltametri

Voltametri, polarize olmuş bir çalışma elektrotunun varlığında, elektrokimyasal bir hücreye uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesidir (Choudhary ve ark., 2017). Bu teknik analitik kimyada ve çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılan bir elektro analitik yöntemdir. Voltametrik teknikler stabil sonuçlarıyla ve önemli miktarda termodinamik ve kinetik bilgi sağlama yetenekleri sayesinde analitin nitel ve nicel özellikleri hakkında bilgiler sunar (Pašti ve ark., 2014). Voltametrik çalışmalarda çeşitli elektrot türleri kullanılır. Bu elektrotlar, polarizasyonun artması için çok düşük yüzey alanına sahip elektrotlardan seçilir.

1.3.1. Doğrusal Taramalı Voltametri

Doğrusal taramalı voltametri (LSV) çalışma elektrotu ile referans elektrot arasındaki potansiyelin zaman içinde doğrusal olarak tarandığı bir voltametrik tekniktir (Rossi ve ark., 2020). Akım ve gerilim tarama hızı, arasındaki ilişkiden elde edilen bağıntıların eğiminden faydalanan tepkime mekanizması hakkında bilgi elde edilebilir. Doğrusal taramalı voltamogramın özellikleri, elektron transfer reaksiyonlarının hızı, elektroaktif türlerin kimyasal reaktivitesi ve gerilim tarama hızı ile ilişkilidir (Andrienko, 2008).

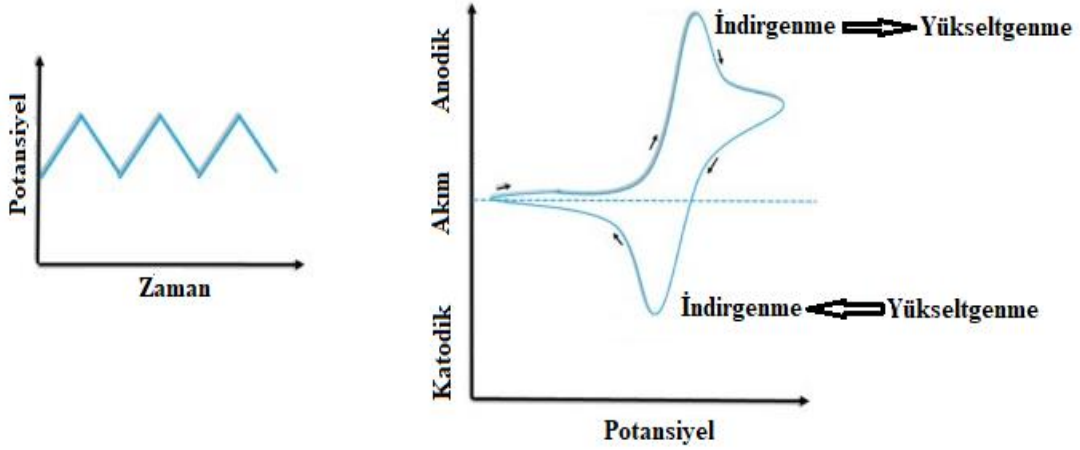
Bu teknik, organik ve inorganik bileşiklerin elektrokimyasal özelliklerini belirlemenin yanında kimyasal reaksiyonlardaki yük transfer adımlarıyla birlikte kimyasal reaksiyonların incelenmesi için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Bontempelli ve ark., 2005).

1.3.2. Dönüşümlü Voltametri

CV, bir bileşiğin elektrokimyasal mekanizmasını aydınlatmak için potansiyelin belli bir noktaya kadar ileri ve bu noktadan geriye doğru taranmasıyla akım değişimlerinin ölçülmesine dayanır (Şekil 1.3). CV'nin üstünlüğü; redoks işlemlerinin termodinamiği, heterojen elektron transferi, kimyasal reaksiyonlar ve adsorpsiyon işlemleri hakkında hızlı bir yanıt alma yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Heinze, 1984). CV ile özellikle, elektroaktif türlerin redoks potansiyelleri ve ortamın redoks süreci üzerindeki etkisi hızlı bir şekilde belirlenebilmektedir.

CV, üçgen bir potansiyel dalga formu kullanılarak sabit çalışan bir elektrotun (karıştırılmamış bir çözeltide) potansiyelinin doğrusal olarak taranmasından oluşur.

Potansiyel tarama sırasında, uygulanan potansiyelden kaynaklanan akım ile ortaya çıkan akım potansiyel grafiği, dönüşümlü voltamogram olarak adlandırılır. CV'nin voltamogramı, karmaşık ve aynı zamanda çok sayıda fiziksel ve kimyasal parametrenin, zamana bağlı bir işlevidir (Wang, 2006).



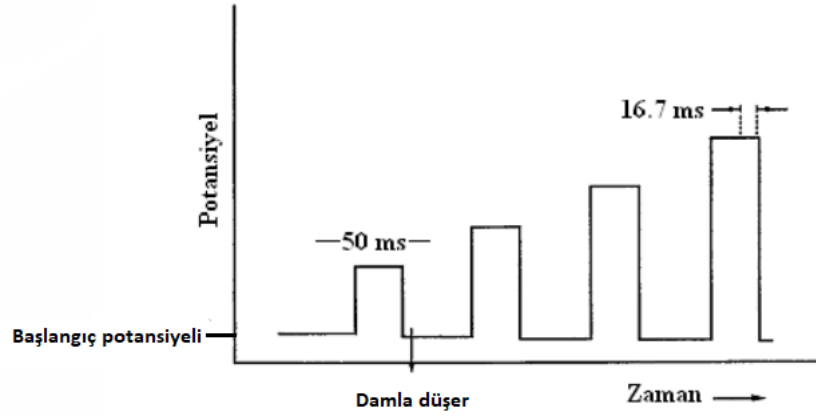
Şekil 1.3. CV tekniğine ait farklı voltamogramlar (Wang, 2000'den modifiye edilmiştir).

1.3. Puls Voltametrik Teknikler

Puls voltametrik teknikler sabit veya değişen bir akım sinyali üzerine bir kare dalga biniştirilmesi ile oluşan uyarıcı bir sinyalin uygulandığı tekniklerdir. Bu tekniklerinin avantajı akımın örneklediği noktalarda kapasitif akımın minimum olmasıdır. Bu nedenle sinyal/gürültü oranı iyileştirilmiş olup, 10^{-7} – 10^{-8} M değerleri arasındaki miktar tayinine imkan vermektedir. Puls teknikleri SWV, diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve normal puls voltametrisi (NPV) şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bu tekniklerden SWV ve DPV tekniklerinin çok çeşitli uygulama alanları olup günümüzde en çok kullanılanlarıdır (Wang, 2000; Skoog ve ark., 1998).

1.4.1. Normal Puls Voltametrisi

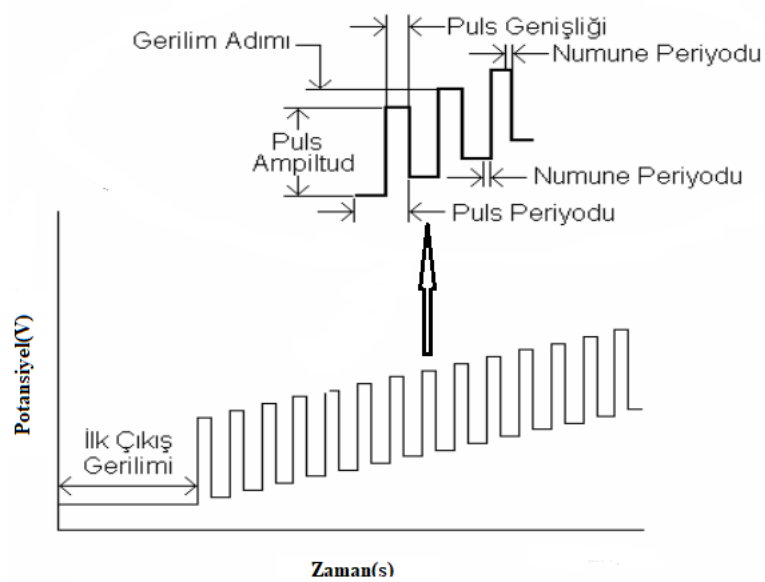
NPV tekniğinde giderek artan ardışık gerilim pulsar uygulanır ve akım her bir puls uygulamasının bitimine yakın ölçülür, bu sayede akımın şarj olması sağlanır. Ölçüm esnasında, analitin reaksiyona girmemesi için pulsar arasında gerilim sabit tutulur (Bard ve Faulkner, 2001). Şekil 1.4' te NPV uyarı sinyali şekli gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Normal puls voltametri uyarı sinyali (Wang, 2006' dan modifiye edilmiştir).

1.4.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi

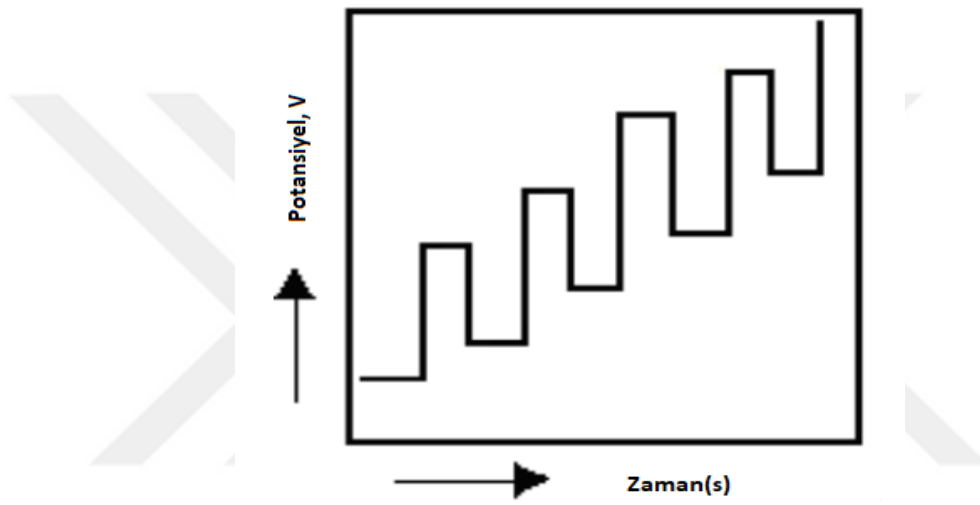
DPV tekniğinde normal puls voltametrisi tekniğinde olduğu gibi gerilim bir dizi seri puls olarak uygulanır ama normal puls voltametrisinden farklı olarak her bir gerilim puls sabit şiddetlidir ve doğrusal şekilde artar (Bard ve Faulkner, 2001). Şekil 1.5'te lineer olarak artan DPV örneği mevcuttur.



Şekil 1.5. Lineer olarak artan DPV uyarı sinyali (Aslan, 2019' dan modifiye edilmiştir).

1.4.3. Kare Dalga Voltametrisi

SWV puls gerilimlerinin üst üste bindirilmesiyle oluşturulup şematize edilir. Bu teknikte, her bir kare dalga dönüşümünde ileri ve geri yöndeki pulsların sonunda çift ölçüm alınarak akım farkları hesaplanır. Oluşan akım farklarıyla analite uygulanan gerilimin grafiği oluşturulduğunda pik biçiminde bir voltamogram elde edilir (Şekil 1.6). Bu voltamogramda pike ait tepe noktasının gerilim ve yükseklik değerleri analitin elektrokimyasal özelliği hakkında bilgiler sunar (Wang, 2006; Skoog ve ark., 1998).



Şekil 1.6. SWV uyarma sinyali (Skoog ve ark., 1996).

1.4. Sıyırma Voltametrisi

Sıyırma voltametrisi elektroanalitik kimyada oldukça önemli bir tekniktir. Bu teknik çok düşük derişimlerde (10^{-5} - 10^{-9} M) hazırlanan numunelere ait bileşenlerinin hassas ve seçici bir şekilde analiz edilmesine olanak sağlar (Batley ve Florence, 1974). Bu teknik iki adımdan oluşur:

- a) Analitin yoğunlaştırılarak çalışma elektrotu üzerinde veya içinde biriktirildiği adım;
- b) Elektrot yüzeyinde biriktirilen analitin çözünerek çözelti içine geri sıyrıldığı adımlardan oluşur (Abollino ve ark., 2019).

Sıyırma voltametrisi anodik sıyırma voltametrisi (ASV), katodik sıyırma voltametrisi (CSV) ve adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV) olmak üzere 3 başlık altında incelenebilir.

1.5.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi

Bu teknikte anodik akımların oluşmasını sağlayan pozitif yönde bir gerilim uygulanarak indirgenen maddenin çalışma elektrotunda birikmesi sağlanır. Daha sonra ölçüm alınır. Etkili birikmenin sağlanması için biriktirme gerilimi indirgenme geriliminden daha negatif değerlerde olmalıdır (Correia ve ark., 2003).

1.5.2. Katodik Sıyırma Voltametrisi

CSV sulu çözeltilerde düşük seviyedeki analitlerin (temel olarak iz metaller ve kükürt içeren organik bileşikler) analizi için kullanılır. Potansiyelin bir fonksiyonu olarak daha negatif potansiyellere doğru taramalarda indirgeyici akım yanıtının ölçülmesine dayanır. Bu teknik, sıyırma adımından önce bir zenginleştirme adımının uygulanması sayesinde 10^{-10} – 10^{-12} mol L⁻¹ sınırları aralığında oldukça hassastır. Elektrotta çözünmeyen organik ve inorganik bileşiklerin belirlenmesi için negatif bir gerilim ve indirgeyici akım kontrolünde analitin birikimine olanak sağlayan bir tekniktir.

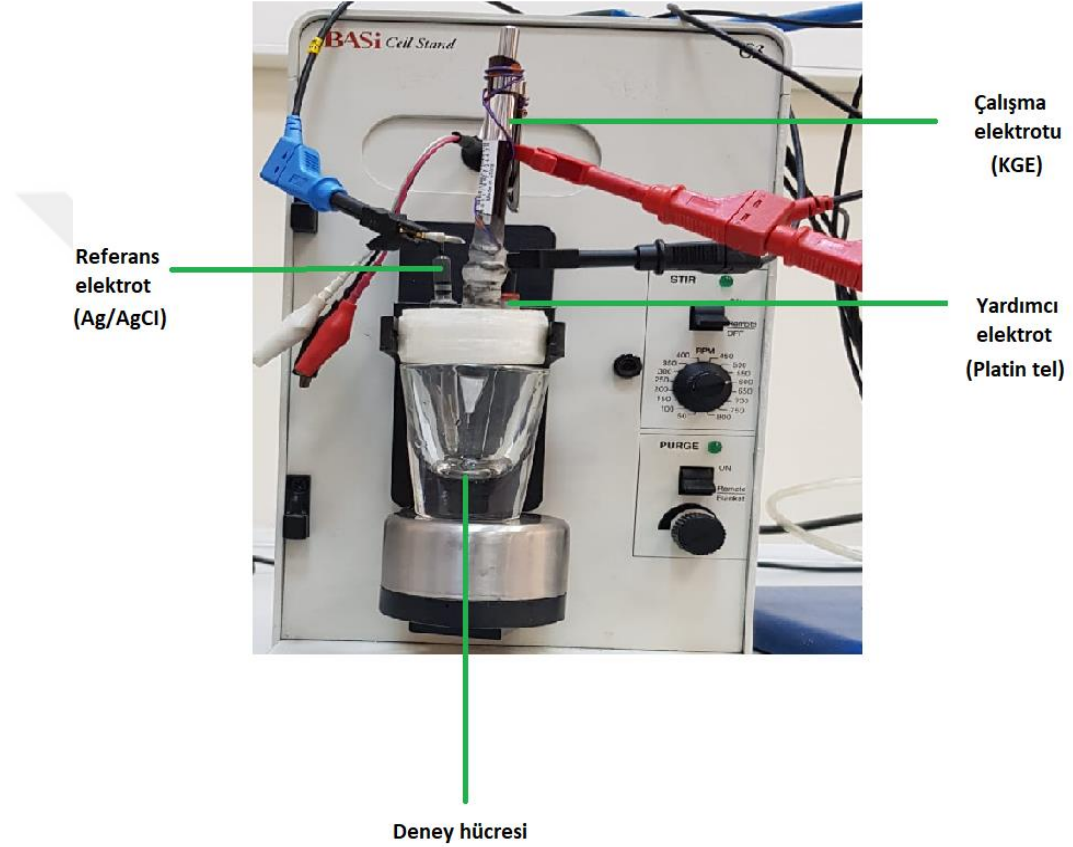
1.5.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi

AdSV sıyırma analizinin kapsamını iz metallere doğru genişlettiği ve diğer metalleri izlemek için etkili alternatif bir yöntem sunduğu için yaygın olarak kabul gören analitik bir tekniktir (Shams ve ark., 2004). Diğer sıyırma teknikleri ve AdSV tekniği arasındaki temel fark, ön zenginleştirme adımı sırasında kendiliğinden bir adsorpsiyon işleminin kullanılmasıdır. Potansiyel, denge süresinden sonra incelenen ilaç bileşiklerinin redoks özelliklerine bağlı olarak anodik veya katodik yönde taranır (Uslu ve Özkan, 2011).

1.5. Elektrokimyasal Sistemler

Elektrokimyasal sistem bir veya daha fazla elektrolit içinde, uzamsal olarak ayrı duran, iki veya daha fazla elektrottan oluşan bir hücreyi ve düzeneği kapsamaktadır. Bir elektrokimyasal sistemdeki elektrotlar, akım üreten elektronların hareketi ile yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonlarına girerek, iyonların ortam boyunca hareket

etmesiyle sistem içinde genel bir yük transferi dengesi oluşturlar (Spinner ve Mustain, 2012). Voltametrik yöntemlerin çoğunda üçlü elektrot kullanılmaktadır. Bu sistemde kullanılan elektrot çeşitleri: 1. Çalışma (indikatör) elektrotu, 2. Referans elektrot ve 3. Yardımcı (karşıt) elektrot olarak sıralanabilir. Şekil 1.7’de üçlü elektrot sistemine ait örnek gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Voltametri için üçlü elektrot sistemi.

Çalışma elektrotu: Analite ait redoks tepkimelerinin gerçekleştiği elektrot olarak görev yapar. Uygulanan potansiyele bağlı olarak anot veya katot görevini üstlenir.

Referans elektrot: Daldırıldığı çözeltinin niteliğinden etkilenmeyen ve potansiyeli net sayılan dış koşullardan bağımsız olan elektrot çeşididir. Potansiyeli sabit olup indirgenme/yükseltgenme tepkimesinin gerçekleştiği gerilimi ölçer.

Karşıt(Yardımcı) elektrot: Sinyal kaynağında oluşan elektriğin, çözeltiden geçerek mikro elektrota aktarılmasını ve pilden akım geçmesini sağlayan elektrottur. Akım akışı,

çalışma ve yardımcı elektrot arasındaki ölçümdür. Bu elektrot çalışma elektrotunun davranışına bağlı olarak anot veya katotun rolünü üstlenir (Arras ve ark., 2012).

1.6. Voltametrizde Kullanılan Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrotu, üzerinde ilgili reaksiyonun meydana geldiği elektrokimyasal sistemdeki elektrottur. Yani indirgenme/yükseltgenme tepkimelerinin olduğu elektrotlardır. Çalışma elektrotu üç elektrotlu bir sistemde genellikle bir yardımcı elektrot ve bir referans elektrot ile birlikte kullanılır. Voltametrik işlemin verimi büyük ölçüde çalışma elektrotu üzerinden belirlenir. Geniş bir gerilim aralığı, minimal direnç, tekrar oluşturulabilir yüzey, yüksek sinyal ve minimum gürültü bu elektrotun ideal özellikleri arasında gösterilebilir (Uslu ve Özkan, 2007).

Bir voltametrik çalışmada kullanılan çalışma elektrotları kısaca aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir;

1. *Katı Elektrotlar*: Platin, Altın, Bizmut, Karbon, Bor katkılı elmas elektrot,
2. *Civa kökenli elektrotlar*: Damlayan civa, Asılı civa, Civa film,
3. *Modifiye elektrotlar*: Kompozit, Kimyasal modifiye,
4. *Dönen elektrotlar*: Disk, Halka disk

1.7.1. Kalem Grafit Elektrotlar

Elektrokimyasal ve ekonomik özelliklerinden dolayı, KGE'ler son yıllarda çok farklı matrislerden çeşitli inorganik ve organik bileşiklerin analizinde büyük bir uygulanabilirlik kazanmıştır (Ly ve ark., 2004). Bu tip çalışma elektrotlarının elektrot malzemesi, iyi bilinen ve piyasadan kolayca temin edilebilen grafit kalem uçlarından oluşur. KGE'ler ucuz ve çevre dostudur. Ayrıca ölçümler arasında katı elektrot yüzey temizliğinin zaman alıcı adımını ortadan kaldıran tek kullanımlık özelliğe sahiptirler (Wang ve ark., 2000). Diğer çalışma elektrotlarıyla karşılaştırıldığında, KGE'ler daha düşük arka plan akımları, daha yüksek hassasiyet ve ayarlanabilir bir elektroaktif yüzey alanı sunar. Herhangi bir biriktirme/ön konsantrasyon aşaması olmaksızın düşük konsantrasyonların ve küçük numune hacimlerinin analizine izin verir. Çok çeşitli numunelerden çeşitli analitleri ölçmek için farklı voltametrik teknikler uygulanarak kullanılan KGE'ler, uyumlu sinyaller göstererek iyi tanımlanmış voltametrik pikler verirler. Bu elektrotların uygulanabilir, yenilenebilir ve ekonomik bir araç olarak iyi bir

hassasiyet ve tekrarlanabilirlik sağladığı kanıtlanmıştır (Wang ve ark., 2000; Wang ve Kawde, 2001).

Literatürlerde KGE'nin farklı matris ortamlarında organik ve inorganik bileşiklerin analizlerinde başarılı bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Kısaca bu çalışmalar, nükleik asitlerin analizinde (Wang ve ark., 2000; Wang ve ark., 2001; Erdem ve ark., 2005; Hejazi ve ark., 2007) ve Cd(II), Pb(II) ve Zn(II) gibi eser elementleri aynı anda tayinlerinde (Demetriades ve ark., 2004) kullanılmışlardır. Ayrıca farklı farmasötik ilaç (Levent ve ark., 2009; Levent ve ark., 2011; Levent A., 2017; Levent A., 2018 Özer, 2019; Atay,2022) ve polisiklik aromatik hidrokarbonların analizinde (Yardım ve ark., 2010; Keskin ve ark., 2010) KG elektrot kullanılmış olup başarılı sonuçlar elde edilmiştir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. NSAİ İlaçlar

NSAİİ'ler analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkileri olan, ağrıyı gidermek, iltihabı ortadan kaldırmak ve yüksek ateşi azaltmak için kullanılan ilaçlardır (Semeraro ve ark., 2015). Çoğunlukla, ağrının geçmediği dönemler, burkulma, incinme, soğuk algınlığı, grip, artrit ve uzun süreli ağrıların semptomlarını azaltmak üzere, dokularda araşidonik asitten prostaglandinlerin oluşmasını sağlayan siklooksijenaz enzimleri, COX-1 ($C_{23}H_{25}N_3O_3S$) ve COX-2 ($C_{18}H_{16}ClNO_4S$)'yi inhibe ederek sağlarlar (Furst, 1997). NSAİİ'ler kimyasal yapılarına göre çeşitli sınıflara ayrılır (Çizelge 2.1). NSAİİ'ler yüksek oranda albümine bağlanırlar, dağılma hacmi ve aktif ilaç miktarı nispeten düşüktür (Özbudak ve ark., 2016). Bu ilaçların büyük bir kısmı karaciğerde oksidasyon ve konjugasyon ile aktif olmayan metabolitik bileşenlerine metabolize olur ve idrarla atılırlar (Østensen ve ark., 2004).

NSAİİ'lerin ana etki mekanizması, siklooksijenaz enzimlerini COX-1 ve COX-2'yi bloke etmekten oluşsa da, klinik ve deneysel veriler ek mekanizmaların varlığını göstermektedir. COX'lardan bağımsız etkilerin bazıları, NSAİİ'lerin biyolojik membranlara nüfuz etme, hücre yapışması vs. başta olmak üzere çok çeşitli hücresel işlevler için gerekli olan önemli moleküler etkileşimleri bozma yeteneği ile ilgilidir. Bu etkiler, özellikle inflamatuvar yanıt sırasında nötrofillerde l-selektin fonksiyonuna müdahale eder ve NSAİİ'lerin in vivo uyguladığı anti-inflamatuvar özelliklere katkıda bulunabilir. Benzer şekilde omurilikteki ve beyindeki fonksiyonların işlevleri yürütülürken periferik sistemdekine benzer şekilde COX enzimleri kullanılır. Omurilikteki yüksek prostaglandin seviyeleri, periferik duyuşal sinir uç sinapslarından sinir mediyatörlerinin salınımını arttırır ve stimülasyon artar. Çok küçük dozlarda aspirinin hipotalamusun preoptik alanına ve indometazinin üçüncü ventriküllere sistematik etki yaratmayacak kadar uygulanmasının antinosiseptif etki ürettiği görülmüştür (Miladiyah, 2012).

Bu araştırma sonuçlarına dayanarak, NSAİİ'lerin merkezi sinir sistemindeki ağrı ile ilgili sinapslarda prostaglandin aktivitesini azaltarak kısmi analjezik etkiler gösterdiği düşüncesi oluşmuştur. Kimyasal yapılarına göre NSAİİ sınıflandırılması çizelge 2.1'de kısa bir şekilde özetlenmiştir.

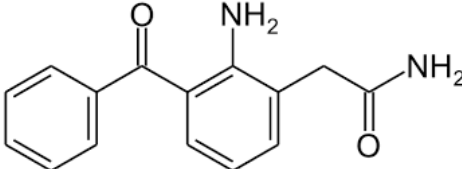
Çizelge 2.1. Kimyasal yapılarına göre NSAİ sınıflandırması (Şentürk, 2014'ten modifiye edilmiştir).

Kimyasal Grup	İlaç
Salisilik Asit deriveleri	Aspirin, Sodyum salisilat, Salasalat, Sulfasalazin
Para-aminol	Asetaminofen
Propionik asit deriveleri	İbuprofen, Naproksen, Fenoprofen
Asetik asit deriveleri	Nepafenak, Diklofenak, İndometazin, Tolmetin
Enolik asit deriveleri	Pirazolonlar ve Oksikamlar
Fenamik asit deriveleri	Mefamik asit, Meklofamik asit
Selektif COX-2 inh.(Koksibler)	Selekoksisib

2.1. Nepafenak

Nepafenak ($C_{15}H_{14}N_2O_2$) 2-(2-Amino-3-benzoilfenil) asetamid, benzofenonlar olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, iki fenil grubuna bağlı bir keton içeren organik bileşiklerdir. Nepafenak, bir ön ilaç olarak korneaya nüfuz ettikten sonra, COX-1 ve COX-2 aktivitesini eşit şekilde inhibe eder. Nepafenak bir ön ilaç formunda olup aktifleşmesi amfenak ($C_{15}H_{13}NO_3$) bileşiğine dönüşümüne bağlıdır. Amfenak benzofenonlar grubuna ait bir monokarboksilik asit olup güçlü bir NSAİİ ilaçtır. Nepafenak ilk aşamada amfenak için hızlı bir biyoaktivasyona uğrar. Daha sonra, göz içi hidrolazlar tarafından siliyer cisim epitelinde, retinada ve koroidde amfenak'a (aktif bileşik) deamine edilir (Jones ve ark., 2013). Amfenak'ın da diğer NSAİİ ilaçlar gibi siklooksijenaz etkisini inhibe ettiği düşünülmektedir (Sheppard ve ark., 2018). Nepafenak pKa (1,83) sı itibariyle asidik karakterli olup, katarakt ameliyatından sonra gözde meydana gelen şiddetli inflamasyon ve ağrıların bloke edilmesinde ve maküler ödem oluşması riskini azaltmada kullanılan, etkili bir NSAİİ'dir. Çizelge 2.2'de Nepafenak'a ait genel özellikler gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Nepafenak'ın genel özellikleri.

Moleküler Yapısı	Genel Özellikleri
	• Mol kütlesi: 254.284 g/mol • Kimyasal formül: C₁₅H₁₄N₂O₂ • Yoğunluk: 1.3±0.1 g/cm³ • Kaynama noktası: 562.5±50.0 °C at 760 mmHg • Erime noktası: 177-181°C • Çözücü: DEMSO • pKa:1.83(go.drugbank.com/drugs/D B06802)

2.2. Nepafenak Üzerinde Yapılan Bilimsel Çalışmalar

Farmasötik analiz, analitik araştırmaları içeren terapötik süreçteki aşamalarda, aktif farmasötik bileşenlerin ve farmasötik dozaj formlarının yüksek ölçeklerde etkinliğini sağlamak üzere ciddi ve önemli bir konu haline gelmiştir. NSAİİ'lerin elektroanalitik incelenmesi de geniş kullanım alanı ve sağladığı olumlu etkiler bakımından önemlidir (Nigović ve ark., 2018).

Nepafenak'ın miktar tayini çalışmaları, katarakt cerrahisi sonrasında sağladığı analjezik faydalar bakımından önemini korumaktadır. Bu sebeple Nepafenak ile ilgili analitik çalışmaların sağladığı veriler araştırılmıştır. Literatür tarandığında nepafenak ile ilgili genel olarak ilaç matrislerinde çeşitli dedektörler yardımıyla elde edilen kromatografik ve spektroskopik tekniklerin sonuçlarına ait bazı analitik çalışma verileri çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Nepafenak’a ait bazı analitik çalışma verileri.

Analit	Teknik	Dedektör	LOD	Matris	Kaynak
Nepafenak	UV		4.62 µg/L	İlaç	Wagh ve ark., 2017
Nepafenak	UV/RP-HPLC		-	İlaç	Rajput ve ark., 2015
Nepafenak	HPTLC		2.08 ng/band	İlaç	Padhye ve ark., 2022
Nepafenak	RP-HPLC	UV-VIS	-0.0195µg/mL	İlaç	Usman ve ark., 2014
Nepafenak	HPLC	UV-Vis	15–30 ng/mL	ilaç	Lipiec ve ark., 2014
Nepafenak	RP-UPLC	UV	0.020 µg/mL	İlaç	Balaji ve ark., 2021

UV: Ultraviyole, UV/VIS: Ultraviolet/visible RP-HPLC:Ters faz- yüksek performans sıvı kromatografisi, HPTLC: Yüksek performans ince tabaka kromatografisi, RP-UPLC: Ters faz ultra performans sıvı kromatografisi

Çizelge 2.3’te belirtilen çalışmalar haricinde Nepafenak’a ait elektrokimyasal yöntemlerin kullanıldığı iki çalışma mevcuttur. Bunlardan ilkinde Nigovic ve ark. (2018)’de AdS-WV tekniğini kullanarak; Nepafenak’ın (0.04 M BR, pH 6.0) (0-1.2 V) aralığında destek çözelti ortamında 0.78 V’da anodik sinyal verdiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada Nepafenak’ın Grafen Nanoplatelet ve karbon nanofiberler kullanılarak modifiye camısı karbon elektrot (GCE) ile miktar tayini yapılmış olup 6.3×10^{-8} M alt tayin sınırı elde edilmiştir.

İkinci çalışmada ise Daabees ve ark., 2018’de Nepafenak’ın miktar tayini için farmasötik dozaj formunda ve kabul edilen doğruluk ve kesinliğe sahip serumda, Nepafenak’ın rutin analizi için SWV tekniği geliştirmişlerdir. Nepafenak’ın analizi için karbon pasta elektrot (CPE), çok duvarlı karbon nanotüp (CMWNT), 1-n-butyl-3-metilpiridinyum heksaflorofosfat kristali (BMH) ve sodyum dodesil sülfat (SDS) ile modifiye edilerek (CMWNT-BMH-SDS) elektrotu geliştirilmiş ve (0.04 M BR, pH 7.0) ortamında 0.272 µg/mL alt tayin sınırı elde edilmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Volatametrik çalışmalarda kullanılan araç ve gereçler

Tez çalışmasında kullanılan araç-gereç ve malzemeler çizelge 3.1’de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan malzemeler.

a) Elektrokimyasal analiz cihazı	(AUTOLAB, PGSTAT128N) (Şekil 3.1)
b) Elektrotlar	Çalışma elektrotu: KGE Karşılaştırma elektrotu: Ag/AgCl (3 M NaCl) (MF 1063; BAS); Yardımcı elektrot: Platin tel (MF 1032, BAS)
c) Deney hücresi	10 mL 3 bölmeli kapaklı standart cam Hücre (MR1208)
d) Karıştırma sistemi	Manyetik karıştırıcı (ARE heating magnetic stirrer) Magnet (Spinbar VMR micro)
e) pH metre	Termo scientific Orion 3 star pH metre
f) Duyarlı terazi	Precisa 320XB 220A
g) Otomatik makro ve mikro pipetler	(Çeşitli ölçülerde)
h) Çeşitli ölçülerde cam malzemeler (pres®)	Farklı hacimlerde tampon çözelti şişeleri, balonjoje, pipet, mezür, deney tüpleri, beher, erlen ve cam tüpler.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan kimyasal maddelerin listesi çizelge 3.2’de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar.

Maddenin Adı	Üretici Firma Adı
Nevanac	Novartis
Nepefenak	Sigma
Sodyum Hidroksit	Merck
Borik Asit	Merck
Fosforik Asit	Merck
Glasiyel Asetik Asit (%99-100)	Merck
Di sodyum monohidrojen fosfat	Merck
Sodyum klorür	Sigma
Nitrik asit (%65)	Sigma

3.2. Çözeltilerin hazırlanması

3.2.1. Stok çözeltilerin hazırlanması

Bu tez çalışmasında kullanılan etken madde Nepafenak'ın uygun koşullar altında metanol içinde 3.93×10^{-3} M stok çözeltisi hazırlanmıştır. Etken maddesi gün ışığından etkilendiği için alüminyum folyo ile kaplanarak $+4^{\circ}\text{C}$ de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Destek elektrolit çözeltilerin hazırlanması

Yapılan deneylerde destek elektrolit çözelti olarak (BR) Britton Robinson tampon çözeltisi (0.04 M, pH 2.0-10.0), (PBS) fosfat tampon çözeltisi, (0.1 M, pH 3.0, 4.0, 7.4, 9.0) ve (ABS) asetat tampon çözeltisi (0.04 M, pH 4.8) kullanılmıştır. BR tampon çözeltisi için 0.04 M H_3BO_3 (2.472 g), 0.04 M H_3PO_4 (2.69 mL) ve 0.04 M CH_3COOH (2.29 mL) karışımı ihtiva eden çözeltiye 5.0 M NaOH çözeltisi eklenerek hedeflenen pH değeri ayarlanmıştır. PBS tamponu için 1 litrede 5.6784 g 900 mL 0.10 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine 5.0 M NaOH ya da 5.0 M HCl çözeltisi ilavesi yapılarak hedeflenen pH değeri ayarlanmıştır. Asetat tampon çözeltisi için ise, 0.1 M CH_3COOH çözeltisine 5.0 M NaOH ilavesi yapılarak hedeflenen pH değeri ayarlanmıştır. Milli-Q su (Millipore)

kullanılarak hazırlanan bu tampon çözeltiler uygun koşullar altında pyrex® cam şişelerde hazırlanarak buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.3. Elektrokimyasal ölçümler

Üçlü elektrot sistemi kullanılarak elektrokimyasal ölçümler yapılmıştır. Çalışma elektrotu olarak KG elektrot, karşılaştırma elektrotu olarak, gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) ve yardımcı elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler bölmeli, kapaklı 10 mL'lik elektrokimyasal deney hücresi (MR 1208) içeren AUTOLAB PGSTAT 128N (Şekil 3.1) cihazında yapılmıştır.



Şekil 3. 1. PGSTAT128N potansiyostat ve BASİ üçlü hücre cihazı.

3.3.1. Voltametrik Yöntem

Bu tez çalışmasında elektrot aktivasyonu, elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve yenilenmesi sayesinde elektrot performansının artırılmasını ve ölçüm hatalarının azaltılmasını sağladığı için önemli bir parametredir. Bundan dolayı elektrokimyasal analize başlamadan önce KG elektrot (Asetat pH 4.8) destek elektrolit çözeltisi ortamında + 1.4 V'ta 60 s bekletilerek aktive edilmiştir. KG elektrot yüzeyine uygulanan bu elektrokimyasal aktivasyon prosesinden dolayı elektrot yüzeyi oldukça aktif olmuştur. Bu elektrokimyasal aktivasyon sürecinin, diğer elektrot modifikasyon

süreçlerinden farklı tarafı daha basit düzeyde, daha az toksik kimyasallar gerektirmesidir. Bu nedenle çevre dostu elektrokimyasal bir ön işlem olarak adlandırılabilir. Aktivasyonu yapılmış olan KG elektrot kullanılarak CV ve SWV teknikleri uygulanmış olup elektrokimyasal ölçümler alınmıştır. Elektrokimyasal analizlerde, CV ve SWV için +1.4 V/ 40 s elektrot aktive edilmiş olup, CV analizlerinde (-0.2V)-(+1.5 V)-(-0.2 V) potansiyel aralığında ve (25 mV/s- 600 mV/s) tarama hızlarında ölçümler alındı.

3.4. Gerçek Numunelerin Analize Hazırlanması

Yöntemin gerçek numune örneklerine uygulanması için eczaneden alınan *Nevanac* (%0.1 nepafenak içerir) steril süspansiyon göz damlası kullanıldı. Optimum koşullar için seçilmiş destek elektroliti içeren voltametrik hücreye bu karışımdan μL düzeyinde eklemeler yapılmıştır. Örnek çözeltisi doğrudan analiz edilmiş ve miktar tayini işlemi kalibrasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Her analiz için ölçümler üç kez tekrar edilmiştir.

İdrar numuneleri, gönüllü ve sağlıklı bir kişiden deneylerden hemen önce alınmıştır. 10 mL idrar numunesi deney tüpüne alınarak IKA MS 3 basic Vorteks tüp karıştırıcı ile 3000 rpm de 5 dakika karıştırıldı. İdrar numunelerinde Nepafenak etken maddesinin idrar numunelerinde analizi standart katma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. 100 μL saf idrar numunesi 10 mL destek elektrolit çözeltisi (Asetat pH 4.8) ile seyreltildi ve optimum koşullar altında her deney 3 kez tekrarlanarak voltamogramlar kayıt altına alındı.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

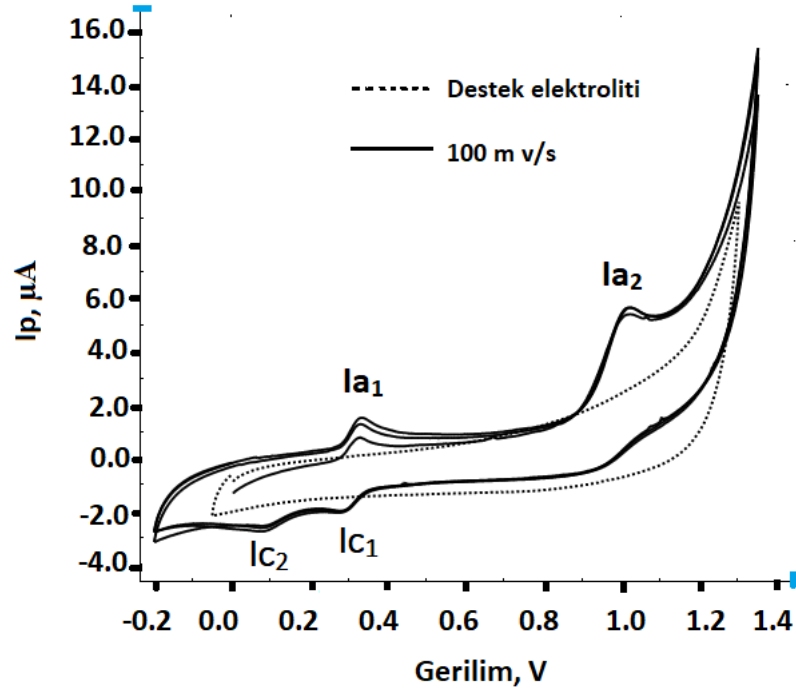
4.1. Nepafenak'ın KG Elektrot Üzerindeki Elektrokimyasal davranışının İncelenmesi

Nepafenak etken maddesinin pik yapısı ve gerilimi üzerinde meydana gelen elektrokimyasal değişimleri aydınlatmak üzere, KG elektrot kullanılarak farklı pH ve farklı destek elektrolitlerde CV ve SWV teknikleri uygulanmıştır.

4.1.1. Dönüşümlü Voltametri

Çalışmanın başında KG elektrot kullanılarak 3.93×10^{-4} M Nepafenak'ın Asetat tamponu (pH 4.8) içerisinde (-0.2 V)-(+1.5 V)-(-0.2 V) gerilim tarama aralığında ve 100 mVs^{-1} gerilim tarama hızında 3 döngülü CV'leri kayıt altına alınmıştır. CV'de pik akımı, pik gerilimi ve tarama hızının değişimiyle elektrot yüzeyinde bir takım elektrokimyasal değişimler meydana gelir. Bu durum adsorpsiyon difüzyon ve/veya elektron transferi mekanizmaları gibi elektrokimyasal olayların tespitine dair fikirler sunar.

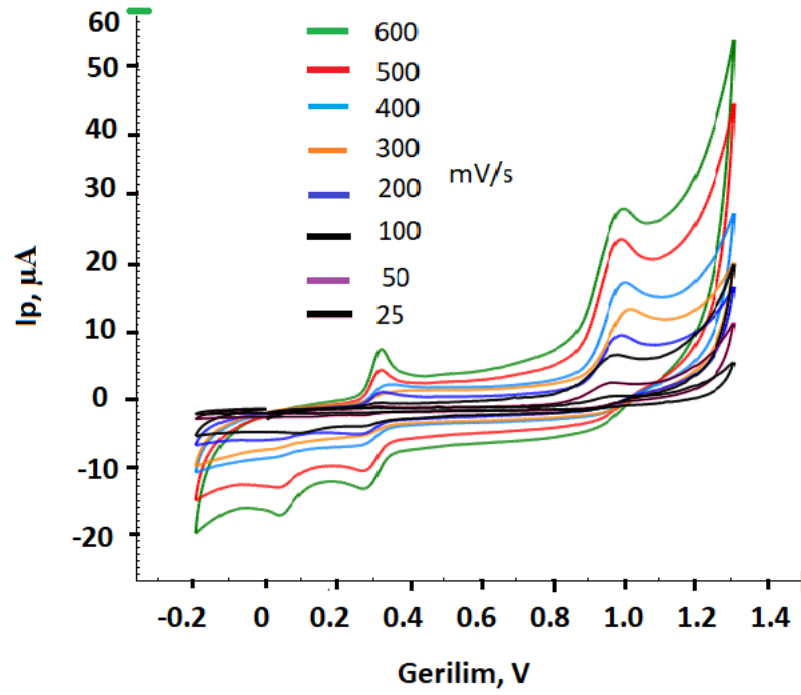
Şekil 4.1'de (Asetat pH 4.8) tamponu içinde Nepafenak'a ait 3 döngülü voltamogram gösterilmiştir. Voltamogram incelendiğinde **Ia₁** ve **Ia₂** anodik piklerine ait 0.329 V ve 1.003 V 'de anodik sinyaller, **Ic₁** ve **Ic₂** katodik piklerine ait 0.29 V ve 0.12 V'de katodik sinyaller gözlenmiştir.



Şekil 4.1. 3.93×10^{-4} M Nepafenak Asetat (pH 4.8) tampon çözelti içinde üç döngülü voltamogram. Elektrot, KGE; gerilim tarama hızı, 100 mVs^{-1} . Kesikli çizgi, destek elektroliti.

Gerilim tarama hızının Nepafenak'ın yükseltgenme durumundaki etkilerini araştırmak için 3.93×10^{-4} M nepafenak çözeltisinin asetat tamponu (pH 4.8) içerisinde (-0.2V)-(+1.5 V)-(-0.2 V) gerilim tarama aralığında ve (25-600) mVs^{-1} aralığındaki gerilim tarama hızlarının CV'leri Şekil 4.2'de kayıt altına alınmıştır.

Şekil 4.2 ve çizelge 4.1 incelendiğinde artan tarama hızıyla yükseltgenme pik geriliminin daha pozitif değerlere doğru kayma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir.

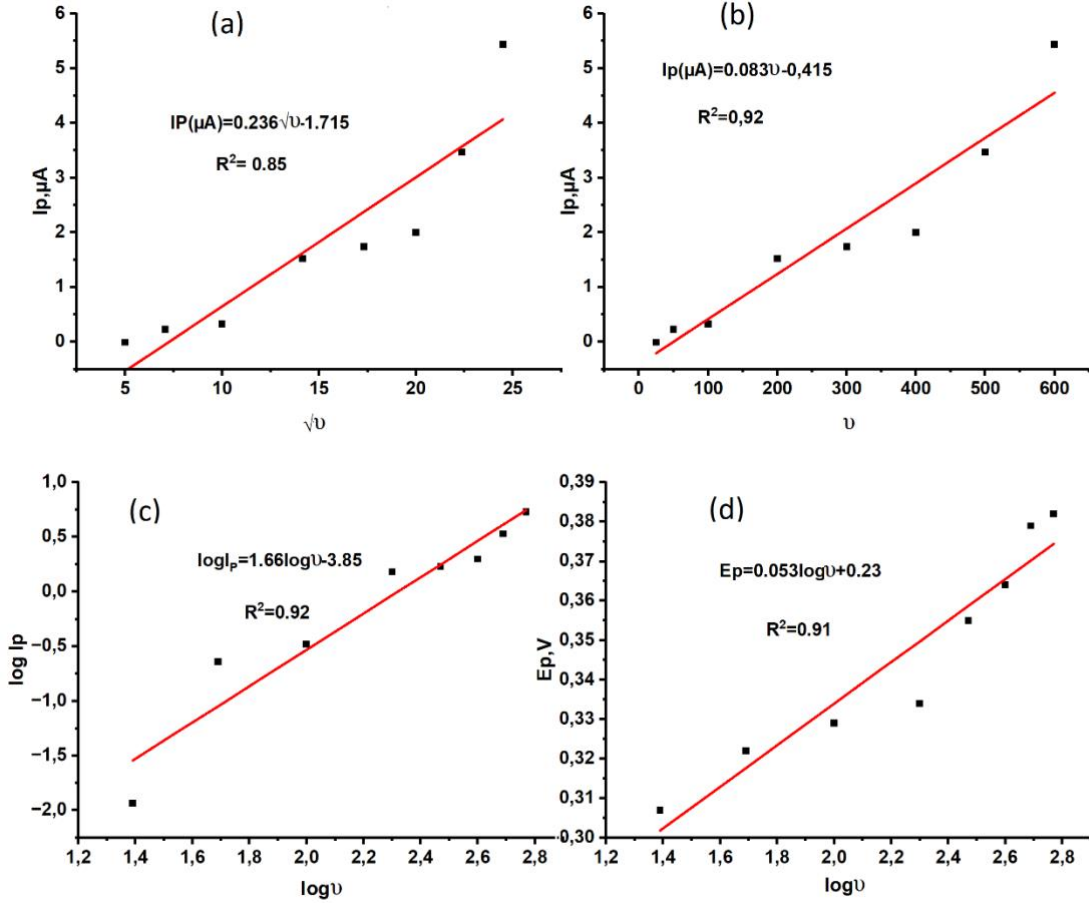


Şekil 4.2. 3.93×10^{-4} M Nepafenak 0.04 M Asetat tamponu (pH 4.8) içinde (25- 600) mVs^{-1} gerilim tarama hızlarıyla elde edilen voltamogramlar.

Çizelge 4.1. 3.93×10^{-4} M Nepafenak etken maddesinin, I_{a1} 'e ait gerilim tarama hızının voltamogramlardaki pik akımı ve pik gerilimi üzerinde etkisi. Teknik, CV; destek elektroliti, Asetat tamponu (pH 4.8); elektrot, KGE.

$v(\text{mVs}^{-1})$	$I_p(\mu\text{A})$	$\sqrt{v}(\text{mVs}^{-1})$	$E_p(\text{mV})$	$\text{Log}v(\text{mVs}^{-1})$	$\text{Log}I_p(\mu\text{A})$
25	0.0116	5	0.307	1.39	-1.935
50	0.229	7.0711	0.322	1.69	-0.64
100	0.327	10	0.329	2	-0.48
200	1.52	14.142	0.334	2.3	0.18
300	1.735	17.321	0.355	2.47	0.23
400	1.996	20	0.364	2.6	0.3
500	3.464	22.361	0.379	2.69	0.53
600	5.44	24.495	0.382	2.77	0.73

Çizelge 4.1'deki verilerden faydalanarak $\sqrt{v}$ - I_p , v - I_p , $\text{log}v$ - $\text{log}I_p$ ve $\text{log}v$ - E_p grafikleri şekil 4.3'de görülmektedir.



Şekil 4.3. I_{a1} ' e ait (a) $\sqrt{v} - I_p$, (b) $v - I_p$, (c) $\log v - \log I_p$ ve (d) $\log v - E_p$ grafikleri

I_{a1} 'e ait veriler yorumlanırken, KG elektrotta meydana gelen değişimlerin açıklanabilmesi farklı tarama hızlarından elde edilen yükseltgenme piklerinin alınmasına dayanır. Bu durum şekil 4.3'te açıklanmıştır. Difüzyon kontrolündeki bir elektrotun tepkimesinde $I_p - \sqrt{v}$ ilişkisi doğrusalken I_p/v grafiğinde üstel bir biçimde artış olacağı beklentisi mevcuttur. Adsorpsiyon kontrolündeki bir pikin varlığında $I_p - v$ grafiği doğrusal ve $\log I_p - \log v$ grafiğinin eğimi optimum şartlarda 1' e yakın çıkar (Laviron ve ark., 1980). Difüzyon destekli bir adsorpsiyon mevcutsa eğim 0.5-1 arasında iken tamamen difüzyon kontrolündeyse eğim 0.5 olur. Bu verilerden ortaya çıkan sonuca göre; I_p/v ilişkisinde oluşan doğrusallık, $I_p/\sqrt{v}$ ilişkisinde oluşan kısmi üstel değişim ve $\log I_p - \log v$ ilişkisinde oluşan eğimin 1.66 çıkması, KG elektrot üzerinde meydana gelen elektrokimyasal sürecin adsorpsiyon kontrolünde olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

Öte yandan, çizelge 4.1' de ve şekil 4.3' te gösterildiği gibi; 25-600 $mV s^{-1}$ arasında I_{a1} 'e ait pik gerilimleri pozitif bölgeye hafifçe kaymıştır ve tersinir bir mekanizma geliştirmiştir.

$E_p - \log v$ arasında meydana gelen ilişki aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:

$$E_p(V) = 0,053 \log v (mV s^{-1}) + 0.23 (R^2 = 0,91)$$

E_p ve $\log v$ arasında meydana gelen ilişki, tesinmez elektrot işleminde aşağıdaki şekilde ifade edilebilir. (Laviron, E., 1979)

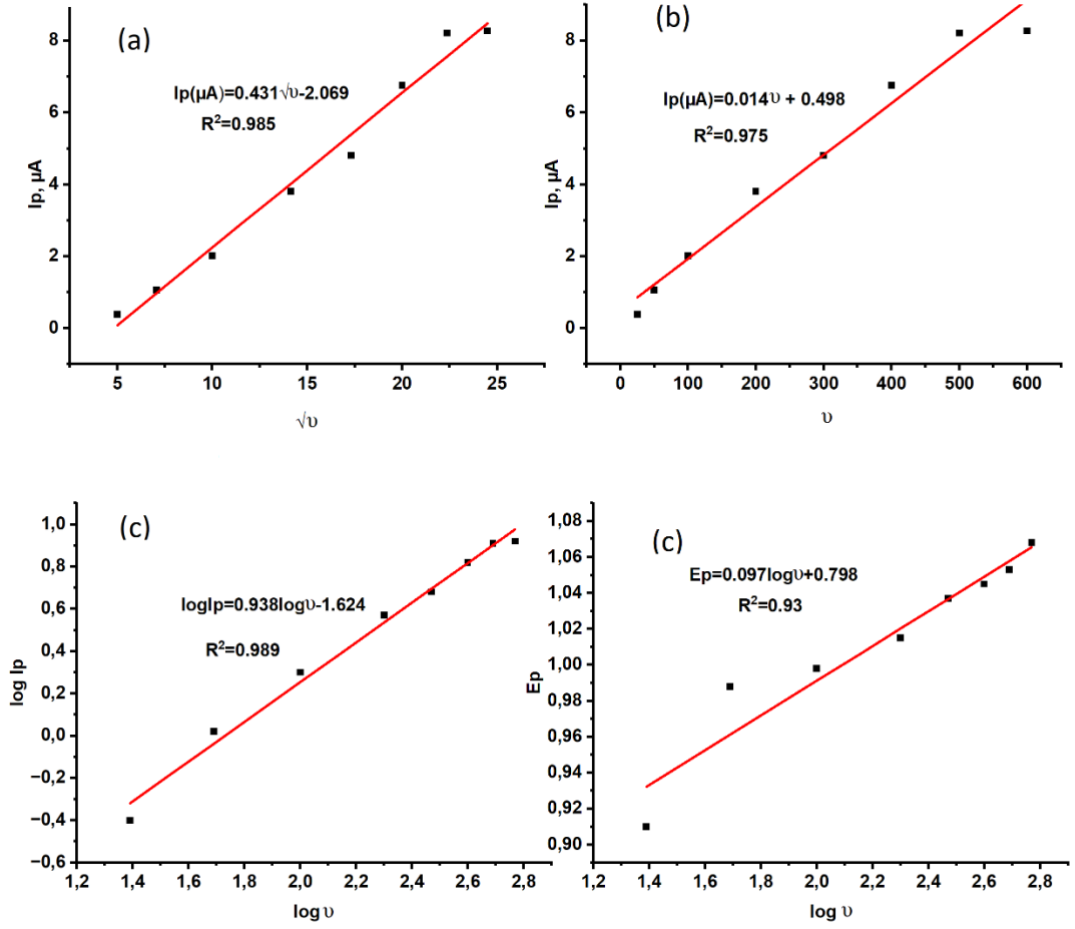
$$E_p = E^0 + (2.303RT / \alpha nF) \log (RTk / \alpha nF) + (2.303RT / \alpha nF) \log v$$

Bu denklemdeki α , yük aktarım katsayısı ve n , bir redoks reaksiyonunda aktarılan elektron sayısını ifade etmektedir. R ($8.314 J K^{-1} mol^{-1}$), T (298 K) ve F ($96480 C mol^{-1}$) ise bilinen sabitlerdir. E_p - $\log v$ ilişkisinde yer alan eğim değeri 0,053 'tür. Yukarıdaki denklem kullanılarak αn değeri 1.116 olarak hesaplanmıştır. Tam tersinmez elektrot olayında birçok sistem için, $\alpha = 0,5$ olarak kabul edilebilir. Burada, $n = 1.115 (\approx 1)$ değeri bulunur.

Çizelge 4.2. Nepafenak etken maddesinin, I_{a2} ' ye ait gerilim tarama hızının voltamogramlardaki pik akımı ve pik gerilimi üzerinde etkisi. 3.93×10^{-4} M Nepafenak içerisinde; Teknik, CV; destek elektroliti, Asetat tamponu (pH 4.8); elektrot, KGE.

$v(mVs^{-1})$	$I_p(\mu A)$	$\sqrt{v}(mVs^{-1})$	$E_p(mV)$	$\log v(mVs^{-1})$	$\log I_p(\mu A)$
25	0.39	5	0.91	1.39	-0.4
50	1.06	7.0711	0.988	1.69	0.02
100	2.02	10	0.998	2	0.3
200	3.801	14.142	1.015	2.3	0.57
300	4.81	17.321	1.037	2.47	0.68
400	6.76	20	1.045	2.6	0.82
500	8.21	22.361	1.053	2.69	0.91
600	8.27	24.495	1.068	2.77	0.92

Çizelge 4.2' de verilen verilerin kullanılmasıyla ($\sqrt{v}/I_p$), (v/I_p), ($\log v/\log I_p$) ve ($E_p/\log v$) grafikleri şekil 4.4' te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. I_{a2} 'ye ait (a) $\sqrt{v}/I_p$, (b) v/I_p , (c) $\log v/\log I_p$ ve (d) $E_p/\log v$ grafikleri.

I_{a1} 'deki verilerde olduğu gibi I_{a2} 'ye ait veriler yorumlanırken, $i_p/\sqrt{v}$ ilişkisinde oluşan kısmi üstel değişim ve $\log I_p - \log v$ ilişkisinde oluşan eğimin 0.93 çıkması KG elektrot üzerinde meydana gelen elektrokimyasal sürecin adsorpsiyon kontrolünde olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

Öte yandan, çizelge 4.2' de ve şekil 4.4' te gösterildiği gibi; 25-600 mV s^{-1} arasında I_{a2} 'ye ait pik gerilimleri pozitif bölgeye hafifçe kaymıştır ve tersinir bir mekanizma geliştirmiştir. $E_p - \log v$ arasında meydana gelen ilişki aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:

$$E_p(\text{V}) = 0,097 \log v (\text{mV s}^{-1}) + 0.798 (R^2 = 0,93)$$

E_p ve $\log v$ arasında meydana gelen ilişki, tesinmez elektrot işleminde aşağıdaki şekilde ifade edilebilir (Laviron, E., 1979).

$$E_p = E_0 + (2.303RT / \alpha nF) \log (RTk / \alpha nF) + (2.303RT / \alpha nF) \log v$$

Bu denklemdeki α , yük aktarım katsayısı ve n , bir redoks reaksiyonunda aktarılan elektron sayısını ifade etmektedir. R ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T (298 K) ve F (96480 C mol^{-1})

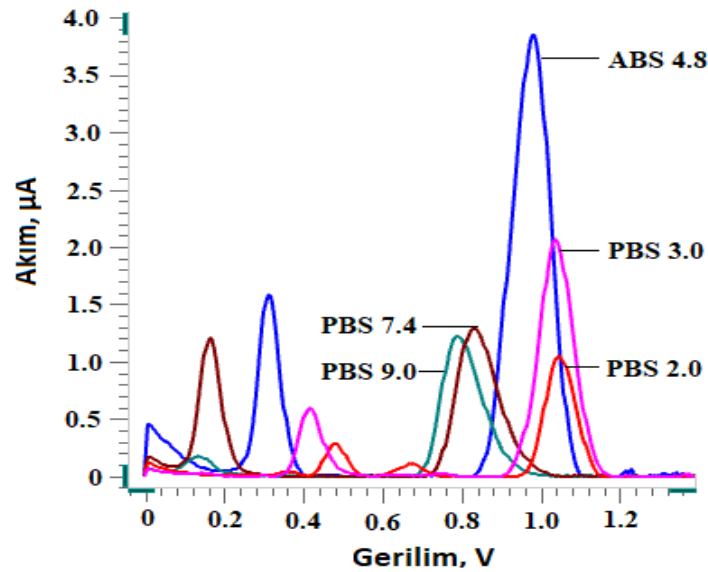
ise bilinen sabitlerdir. Ep-logu ilişkisinde yer alan eğim değeri 0,097 'dir. Yukarıdaki denklem kullanılarak αn değeri 0,61 olarak hesaplanmıştır. Tam tersinmez elektrot olayında birçok sistem için, $\alpha = 0,5$ olarak kabul edilebilir. Burada, $n = 1.22 (\approx 1)$ değeri bulunur.

4.1.2. Destek elektroliti ve pH etkisi

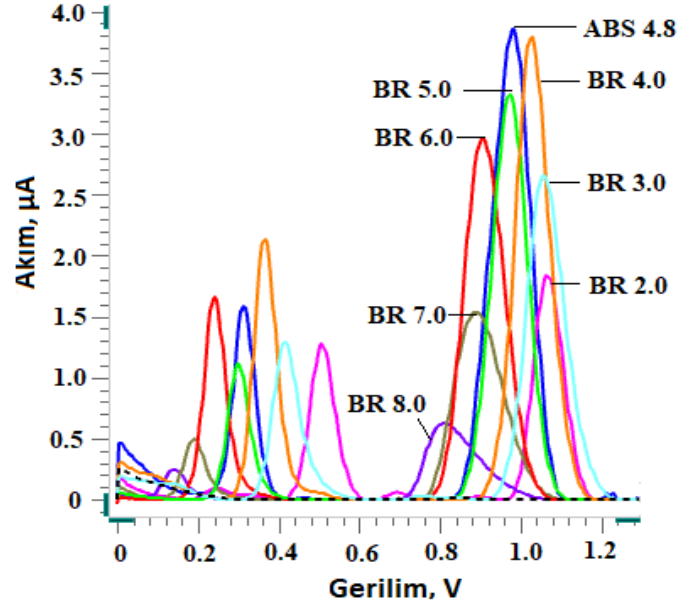
Voltametri çalışmalarında analitin elektrot üzerindeki elektrokimyasal davranışının açıklanabilmesi için kullanılacak destek elektroliti bileşiminin türü ve pH'nın belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu anlamda başarılı sonuçlar elde etmek için SWV tekniği kullanılarak pH'nın ve destek elektrolitin etkileri araştırılmıştır. BR tamponu, oldukça geniş çalışma aralığı sebebiyle elektrokimyasal araştırmalarda oldukça tercih edilen bir tampon sistemidir. Ayrıca; Asetat ve PBS tamponları da doğru çalışma aralığı seçildiğinde destek elektroliti olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Yukarıdaki bilgilere dayanarak; çalışmanın bu bölümünde, şekil 4.5'te PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4, 9.0) ve Asetat (pH 4.8) tamponları, şekil 4.6' da (pH 2.0-8.0) aralığında BR tamponu içerisinde SWV tekniği kullanılarak 7.86×10^{-5} M Nepafenak'a ait KG elektrot üzerinde akım eğrileri ve gerilim arasındaki ilişki incelenmiştir.

Şekil 4.5 ve şekil 4.6 ayrıntılı bir şekilde incelendiğinde farklı pH değerlerine sahip destek elektrolitlerin KG elektrot üzerinde araştırılması sonucunda en yüksek pik akımı sinyal şiddeti ve en belirgin pik değerlerinin asetat (pH 4.8) ortamında meydana geldiği görülmektedir.

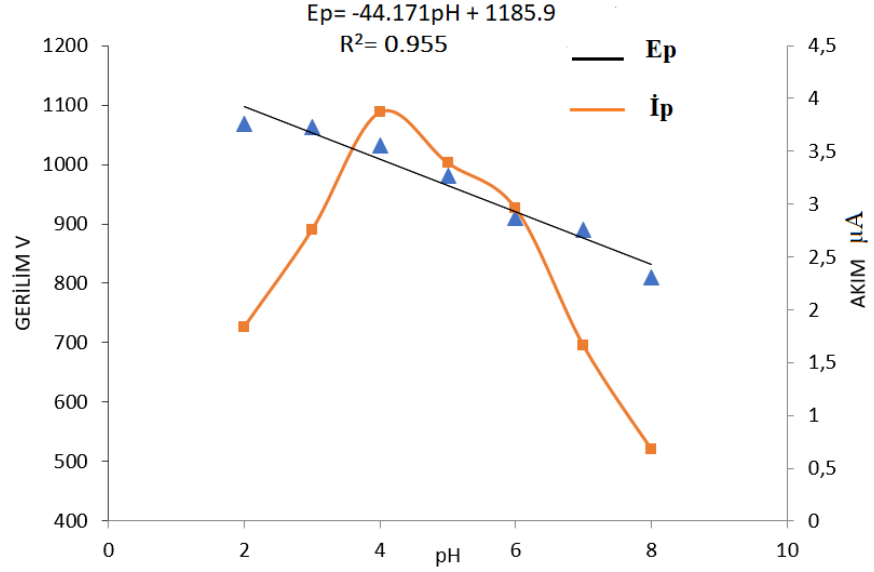


Şekil 4.5. $7.86 \times 10^{-5} \text{ M}$ Nepafenak 0.04 M PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4 ve 9.0) ve asetat (pH 4.8) tamponları içinde KG elektrot kullanarak elde edilen eğriler. SWV değişkenleri: frekans, 50 Hz; adım gerilimi, 9 mV; amplitüd, 40 mV.



Şekil 4.6. $7.86 \times 10^{-5} \text{ M}$ Nepafenak ve 0.04 M BR tamponu içinde (pH 2.0-10.0) KG elektrot kullanarak elde edilen SWV eğrileri. SWV değişkenleri: frekans, 30 Hz; adım gerilimi, 10 mV; amplitüd, 90 mV.

Bulunan sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, pH değeri arttıkça pik gerilimi daha negatif değerlere doğru gitmektedir. Bu gözlemlerimiz, Nepafenak'ın yükseltgenmesi durumunda proton aktarımının oluştuğunu kanıtlar. Şekil 4.7'de görüldüğü üzere KG elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal süreçte E_p/pH ilişkisinde eğim değeri -44.171 mV/pH olarak elde edilmiştir. Bu verilerden pH (2-8) arasında proton katkısının elektron sayısına eşit olduğunu varsayabiliriz.



Şekil 4.7. Nepafenak'ın pik gerilimi ve pik akımı üzerine pH etkisinin grafikleri.

Öte yandan çizelge 4.3' te Nepafenak pik gerilimi ve pik akımı üzerine pH etkisi sonuçları detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Nepafenak pik gerilimi ve pik akımı üzerine pH etkisi.

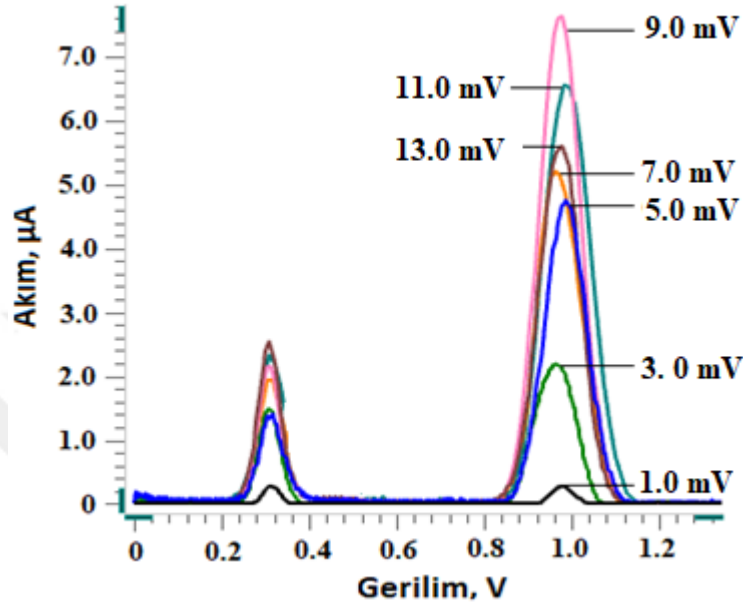
pH(Asetat)	Ep(mV)	Ip(µA)
2	1067.5	1.84
3	1062.5	2.76
4	1032.3	3.87
5	981.4	3.39
6	910.3	2.96
7	890.6	1.66
8	810.5	0.68

4.1.4. Kare-dalga değişkenlerinin etkisi

SWV değişkenleri kullanılarak, oldukça yüksek duyarlılıkta ve seçicilikte voltamogramlar elde etmek mümkündür. Bu sebeple en elverişli cihaz parametrelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, SW değişkenlerinin frekans değeri $f = (5-60)$ Hz aralığında, adım gerilimi $\Delta E_s = (1-13)$ mV aralığında ve kare dalga amplitüdü, $\Delta E_{sw} = (10-100)$ mV aralığında olmak üzere etkinlik seviyeleri belirlenmeye çalışılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler 7.86×10^{-5} M Nepafenak içeren optimum asetat (pH 4.8) destek çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Her parametre için diğer iki parametreye ait değerlerin

sabitlendiği ve diğer parametrenin değiştirildiği koşullarda voltamogramlar kayıt altına alınmıştır.

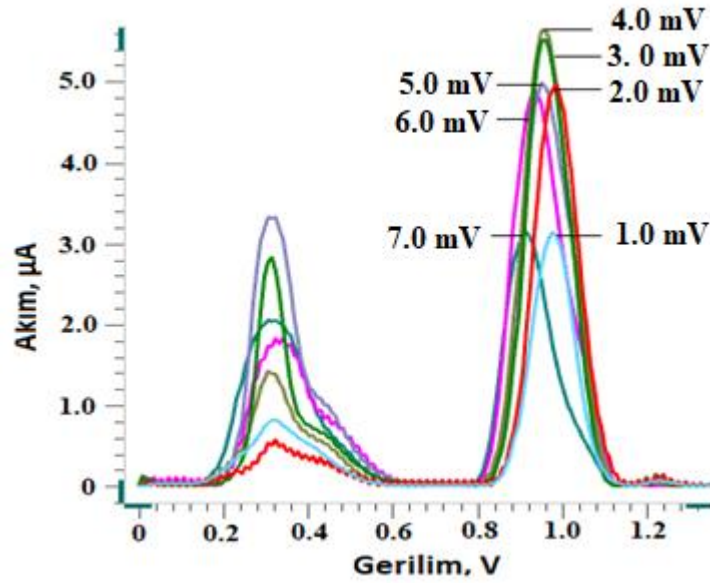
Nepafenak bileşiğinin farklı adım potansiyelinin (1-13) mV aralığında optimum Asetat tamponunda (pH 4.8) SWV voltamogramları şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. KG elektrot yüzeyinde 7.86×10^{-5} M Nepafenak’ın Asetat tamponu (pH 4.8) çözeltisi içindeki farklı adım potansiyelindeki SW voltamogramları ve dağılım grafiği.

Frekans (50 Hz) ve amlitüd (4 mV) değerlerinde sabitken, adım potansiyeli (1-13) mV aralığında değiştirilmiştir. Adım gerilimi 9 mV’ değerine kadar arttıkça pik sinyal şiddeti de artmış, ancak 9 mV’ den sonra azalmıştır. Optimum pik şekli ve şiddeti 9 mV’ de elde edilmiş ve akım şiddeti 7.65 μ A olarak ölçülmüştür.

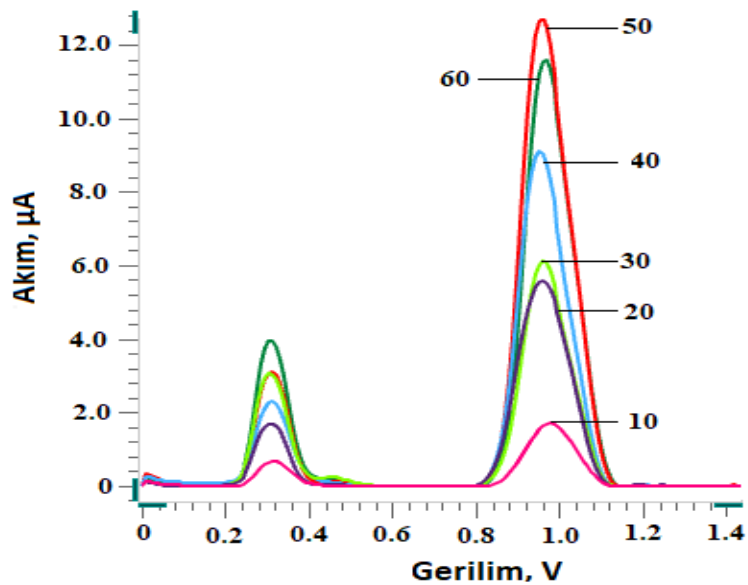
Araştırma sürerken, Nepafenak bileşiğinin farklı amplitüdlerinin (1-10) mV aralığında optimum asetat tamponunda (pH 4.8) kare dalga voltamogramları şekil 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. KG elektrot yüzeyinde 7.86×10^{-5} M Nepafenak'ın Asetat tamponu (pH 4.8) çözeltisi içindeki farklı amplitüd deki kare dalga voltamogramları ve dağılım grafiği.

Frekans (50 Hz) ve adım potansiyeli (9 mV) değerlerinde sabitken amplitüd (1-10) mV aralığında değiştirilmiştir. Amplitüd 4.0 mV değerine kadar çıktığında pik sinyal şiddeti de artmış, ancak 4.0 mV'den sonra azalmıştır. Optimum pik şekli ve şiddeti 4.0 mV'de elde edilmiş ve akım şiddeti $5.63 \mu\text{A}$ olarak ölçülmüştür.

Araştırmamızda, Nepafenak'a ait farklı frekanslarının (5-60) Hz aralığında asetat tamponunda (pH 4.8) SWV voltamogramları şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. KG elektrot yüzeyinde 7.86×10^{-5} M Nepafenakın Asetat tamponu (pH 4.8) çözeltisindeki farklı frekans değerlerindeki kare dalga voltamogramları ve dağılım grafiği.

Adım potansiyeli (9 mV) ve amplitüd (4 mV) değerlerinde sabitken, frekans (5-60) Hz aralığında değiştirilmiştir. Frekans, 50 Hz değerine kadar arttıkça pik sinyal şiddeti de artmış, ancak 50 Hz'den sonra azalmıştır. Optimum pik şekli ve şiddeti 50 Hz'de elde edilmiş ve akım şiddeti $12.71 \mu\text{A}$ olarak ölçülmüştür

Elde edilen bu sonuçlar incelendiğinde en uygun SW parametreleri aşağıdaki gibi kabul edilmiştir; $f = 50$ Hz, $\Delta E_s = 9$ mV ve $\Delta E_{sw} = 4.0$ mV

4.1.5. Analitik Çalışma Koşulları

Tez araştırmamızda KG elektrot yüzeyinde uygulanan voltametrik tekniğin analitik performansı, çalışma aralığı, hassasiyet ve tekrar edilebilme gibi fonksiyonları araştırılmıştır. Bu anlamda en elverişli destek çözeltisi olarak asetat (pH 4.8) ortamında incelenmiş olup Nepafenak'a ait optimum analitik koşullar çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

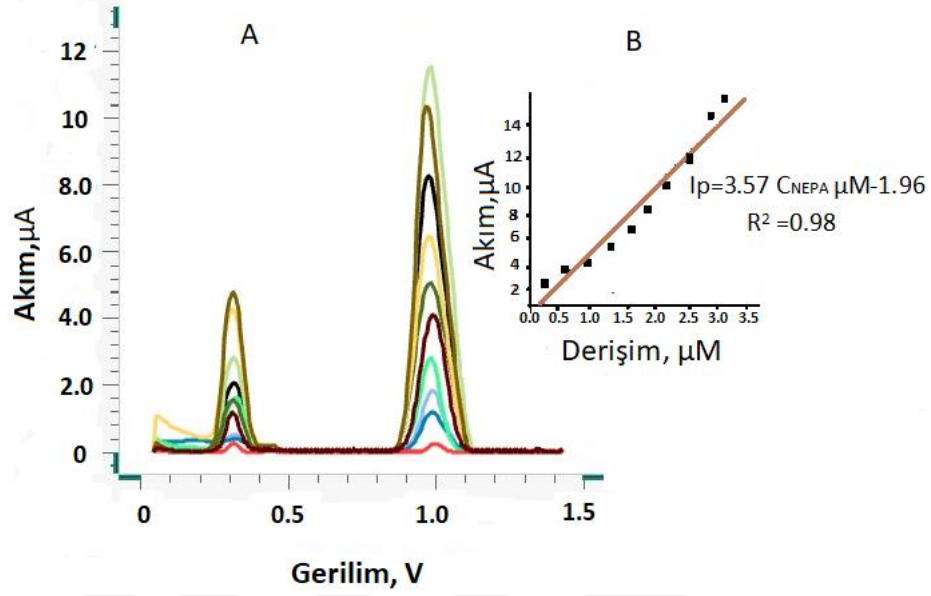
Çizelge 4.4. Nepafenak'a ait miktar tayini çalışmalarında voltametrik teknikle elde edilen optimum deneysel ve aletsel değişkenler.

Yöntem	SWV
Elektrot	KGE
Destek elektroliti	Asetat tamponu (pH 4.8)
Kare-dalga değişkenleri	
f	50 Hz
ΔE_s	9.0 mV
ΔE_{sw}	4.0 mV

Nepafenak'ın 3.93×10^{-3} M standart çözeltisinden elektrokimyasal hücreye uygun hacimlerde ilaveler yapılmıştır. Yukarıdaki verilerden yola çıkılarak elde edilen voltamogramları (3 tekrarlı) kayıt altına alınmıştır. Her ilaveden sonra elde edilen yaklaşık +1.01 V civarındaki yükseltgenme pikleri incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlar ve derişim- pik akımı korelasyonu şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Şekil 4.11 B'de belirtilen analitik eğri (0.3-3.5) μM derişim değerleri aralığında $[I_p(\mu\text{A}) = 3.9845 C(\mu\text{M}) - 1.67 \text{ (} R^2 = 0.98, n=7 \text{)}]$ doğrusal bir yanıt oluşturmaktadır.

Denklemdaki I_p yükseltgenme pik şiddeti, C Nepafenak derişimi ve r korelasyon sabitidir.



Şekil 4.11. (A) Nepafenak,ın farklı derişimlerinin [(0.3- 3.5) μM] Asetat tamponu (pH 4.8) içerisinde kaydedilen SW değişkenleri: frekans, 50 Hz; adım gerilimi, 9.0 mV; amplitüd, 4.0 mV. Ek (B): I_p/C Nepafenak kalibrasyon eğrisi.

Analitik eğrilerin varlığında elde edilen gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri; $\text{LOD} = 3s/m$; $\text{LOQ} = 10s/m$ denklemleri yardımıyla hesaplanmıştır. Denklemdaki s , doğrusallık aralığındaki en düşük derişime karşılık gelen pik akımının (3 değer ortalaması olarak) standart sapmasını, m ise ilgili kalibrasyon eşitliğinin eğim değerini ifade etmektedir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.035 μM ve 0.11 μM olarak saptanmıştır.

Bulunan LOD değeri bölüm 2.2' de açıklanan nepafenak ile ilgili elektrokimyasal çalışmalardaki LOD değerleriyle karşılaştırılması sonuçlar ve öneriler kısmında ayrıca belirtilecektir.

Ortaya çıkan verilerden de görülebileceği gibi, KG, elektrotlarda kimyasal modifikasyon olmaksızın (basit elektrokimyasal ön işlem hariç) düşük nepafenak derişimini tespit etmek için kullanılabilir. Bu çalışmada KG elektrot yüzeyleri üzerinde sunulan sonuçlar bu görüşü desteklemektedir.

Nepafenak bileşiği için KG elektrot yüzeyinde Asetat (pH 4.8) ortamda araştırılan voltametrik tekniğin tekrarlanabilirlik seviyesini ölçmek üzere 0.3 μM derişimdeki çözeltiler, elverişli deney ortamında hazırlanmış ve aynı gün içerisinde 9 kez tekrar

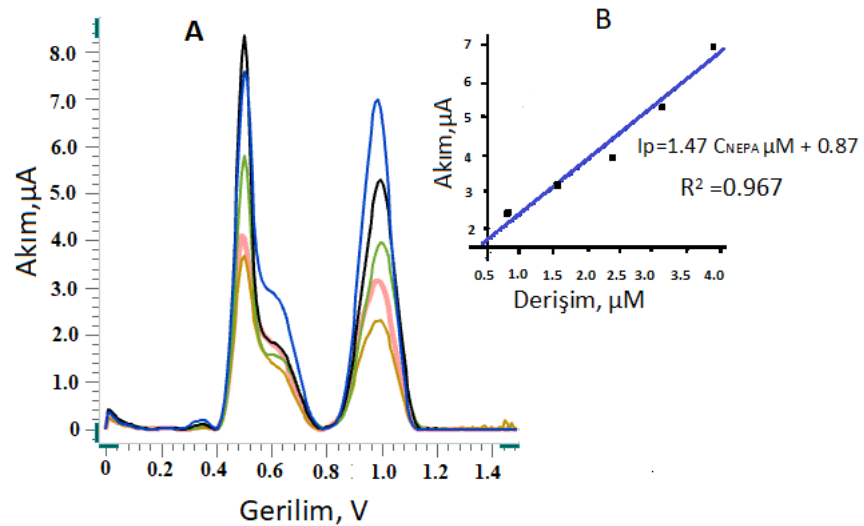
edilerek SWV voltamogramları kayıt altına alınmıştır. Bu voltamogramların yükseltgenme pik akımları ve gerilim değerleri tespit edilerek ortaya çıkan verilerin gün içinde kesinlik dereceleri değerlendirilmiştir. Ortaya çıkan verilerden anlaşılabileceği üzere yükseltgenme pik akımı ve gerilimi için BSS değerleri sırasıyla % 1.45 ve % 0.43 olarak bulunmuştur

4.1.7. Gerçek Numune Analizleri

4.1.7.1. İdrar Numuneleri

Bu tezde voltametrik yöntemin idrar numunelerindeki uygulanabilirliği de araştırılmıştır. İdrar numuneleri, gönüllü ve sağlıklı bir kişiden deneylerden hemen önce alınmıştır. 3.4. no'lu bölümde numunenin nasıl hazırlandığı belirtilmiş olup optimum koşullarda SW voltamogramları kayıt altına alınmıştır.

Çalışmamızda en elverişli şartlarda yapılan analitik çalışmada KG elektrotun yüzeyinde girişim oluşturabilecek Askorbik asit, Ürik asit, Dopamin vs. bileşiklerine ait bir analitik sinyal saptanmamıştır. Şekil 4.12'de idrar preperatlarının SWV voltamogramı gösterilmiştir. KG elektrotun yüzeyinde +0.98 V civarında görüntülenen pik değeri idrar preperatlarına eklenen standart Nepafenak ile orantılı şekilde artış sergilemiştir. Nepafenak'ın insan idrarındaki analizinin olumlu sonuçları çizelge 4.5'teki verilere dayandırılarak gösterilmiştir. Nepafenak'ın insan idrarındaki farklı derişimleri Asetat tampon çözeltisinde (pH 4.8) kaydedilmiş olup I_p/C_{NEPA} Nepafenak kalibrasyon eğrisi şekil 4. 12'de belirtilmiştir.



Şekil 4.12. Nepafenak (0.2 μ M-0.6 μ M) çözeltilerinin Asetat (pH 4.8) tampon içerisinde idrar numunelerinin kare dalga voltamogramları. SW değişkenleri: frekans, 50 Hz; adım gerilimi, 9.0 mV;amplitüd, 4.0 mV.

Çizelge 4.5. İdrar numunelerinde geri kazanım çalışması

İlave edilen	Bulunan (μ M) ^{a,b}	Geri kazanım ^b (%) $\pm$ %BSS
0	0.61	± 3.45
1.57	2.16	98.72 ± 4.58
3.14	3.73	99.36 ± 4.75

^ason çözeltideki derişim. ^bsonuçlar, beş analizin ortalamasıdır.

4.1.7.2 Flakon Analizi

Yöntemimizin, Nepafenak'ın ticari ilaç olarak satılan şekline uygulanması için *Nevanac* steril süspansiyon göz damlası (%0.1 nepafenak içerir) eczaneden satın alınmıştır. Numunenin nasıl hazırlandığı 3.4. no'lu bölümde belirtilmiş olup belirtilen koşullarda SW voltamogramları kayıt altına alınmıştır.

Teknik uygulanırken, oluşan sonuçların doğruluğu ve kesinliği denetlenerek uygulanabilirlik düzeyi ölçülmüş olup geri kazanım çalışmasıyla kontrol sağlanmıştır. Nepafenak flakon çözeltisine standart çözeltiden art arda eklemeler yapılarak her bir ilaveden sora elde edilen voltamogramlar kayıt altına alınmıştır. Yöntemin flakon çalışmasında elde edilen SWV eğrileri ve ilaveler sonrasında derişimde oluşan değişimin sonuçları çizelge 4.6'da gösterilmiştir

Çizelge 4.6. Nepafenak içeren *Nevanac* (%0.1) steril süspansiyon göz damlası SWV analizi sonuçları

İlave edilen	Bulunan (μ M) ^{a,b}	Geri Kazanım (%) $\pm$ % BSS
0	0.031	± 4.21
0.549	0.616	106.50 ± 3.97
0.915	0.893	94.25 ± 3.86

^aSon çözeltideki derişim. ^bSonuçlar, beş analizin ortalamasıdır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bölüm 2.2’de açıklanan nepafenak ile ilgili elektrokimyasal çalışmalarda voltametri yönteminin kullanıldığı, iki tane çalışma mevcuttur. Birinci çalışmada, Nigovic ve ark. 2018’de AdSWV tekniğini kullanarak; Nepafenak’ın (0.04M BR, pH 6.0) ortamında modifiye camı karbon elektrot (GCE) ile 6.3×10^{-8} M alt tayin sınırı elde etmişlerdir. İkinci çalışmada ise Daabees ve ark. 2018’de Nepafenak’ın miktar tayini için SWV tekniğini kullanarak modifiye CPE ile (0.04 M BR, pH 7.0) ortamında 0.272 µg/mL alt tayin sınırı elde etmişlerdir.

Bu tez araştırmamızda Nepafenak’ın yükseltgenmesinde kullanılan KG elektrotun elektrokimyasal olarak ön işleminden geçmesi çok iyi düzeyde elektrokatalitik bir etki yaratmıştır. Bu çalışmanın birinci bölümünde nepafenakın KG elektrotun yüzey alanında oksidasyon eğilimlerini araştırmak için, SWV ve CV teknikleri kullanılmış olup sonuçları yorumlanmıştır. pH değeri, destek elektroliti cinsi ve ilgili materyal derişiminin oksidasyon düzeyine etkisi hassas bir biçimde incelenmiştir. Bunun için PBS tampon çözeltisi (pH:2.0, 4.0, 7.4 ve 9.0), Asetat tampon çözeltisi (pH 4.8), BR tampon çözeltisi (pH 2.0-10.0) kullanılarak denenmiştir. Araştırma sonuçları, tekrarlanabilir ve çok hassas bir pikin en elverişli olduğu ortamın net bir şekilde, (pH 4.8) Asetat tampon çözeltisi olduğunu göstermiştir (Şekil 4.5). Nepafenak’ın CV tekniği ile pH 4.8. Asetat tampon çözeltisinde 25-600 mVs⁻¹ tarama hızlarında kinetik incelemesi araştırılmıştır. (Şekil 4.2 ve şekil 4.3). Bu hesaplamalarda $\sqrt{v}/i_p$, v/i_p ve $\log v/\log i_p$ verileri araştırılmıştır. Nepafenakın KG elektrot üzerinde +0.3 V ve +1.1 V civarında bir yükseltgenme dalgası verdiği (Şekil 4.1), bu dalganın 25-600 mV/s⁻¹ tarama hızları arasında pozitif bölgeye kayarak yükseltgenme olayının pik derecesinin adsorpsiyon kaynaklı kontrol altında olduğunu göstermiştir. Destek elektrolit çözeltisinin seçilmesiyle en elverişli SWV cihaz parametreleri belirlenmesi için adım potansiyeli, amplitüd ve frekans parametreleri çalışılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda optimum cihaz parametreleri (f = 50 Hz, $\Delta E_s = 9$ mV ve $\Delta E_{sw} = 40$ mV) bulunmuştur.

Nepafenak’ın 0.3 µM-3.5 µM arasında doğrusal çalışma aralığı sunduğu gözlemlenirken LOD ile LOQ değerleri sırasıyla sırasıyla 0.035 µM ve 0.11µM olarak hesaplanmıştır. Yalın KG elektrot kullanılarak uygulanan SWV tekniği ile ulaşılan LOD değeri bölüm 2.2 de açıklanan elektrokimyasal çalışmalardaki LOD verileriyle kıyaslanırsa, modifiye GCE (Nigovic ve ark., 2018) ile elde edilen LOD (0.063 µM) ve

modifiye CPE (Daabees ve ark., 2018) ile elde edilen LOD ($0.272 \mu\text{g/ml}$) değerlerine göre oldukça makul sayılabilir.

Önerilen yöntemin önceki elektrokimyasal yöntemlere göre iyi bir hassasiyet ve doğruluk, düşük tespit limiti, makul tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik, kolay kullanım ve düşük maliyet gibi çeşitli avantajları vardır. Ek olarak, ortak katı elektrotlarda gözlemlenen zaman alan cilalama ve modifikasyon prosedürleri, tek tek yüzeyler için iyi bir tekrarlanabilirlik sağlayan yenilenebilir bir yüzey sağlayan bir KGE kullanılarak ortadan kaldırılmıştır. Önerilen bu yöntemin, farmasötik dozaj formlarında Nepafenak'ın doğru ve hassas bir şekilde belirlenmesi için ucuz, hızlı ve basit bir prosedür sergilediği sonucuna varılabilir.



KAYNAKLAR

- Abollino, O., Malandrino, M., Berto, S., La Gioia, C., Maruccia, V., Conca, E., & Giacomino, A. (2019). Stripping voltammetry for field determination of traces of copper in soil extracts and natural waters. *Microchemical Journal*, 149, 104015.
- Andrienko, D. (2008). Cyclic voltammetry. *John Wiley & Sons publication*, New York, 3-12.
- Aguilar-Lira, G. Y., Romero, G. Á., Rojas-Hernández, A., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez-Ávila, J. A., & Romero-Romo, M. A. (2014). Voltammetric analysis of naproxen in graphite electrodes and its determination in pharmaceutical samples. *Electroanalysis*, 26(7), 1573-1581.
- Arras, M. M., Grasl, C., Bergmeister, H., & Schima, H. (2012). Electrospinning of aligned fibers with adjustable orientation using auxiliary electrodes. *Science and technology of advanced materials*.
- Aslan, M. (2019). Okzaliplatinin elektrokimyasal özellikleri ve miktar tayini (Master's thesis, *Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*).
- Aslan, M., & Levent, A. (2020). New voltammetric method for determination and electrochemical behaviors of oxaliplatin by CPT-BDD electrode.
- Atay, B. (2022). Kurşun kalem elektrot ile etoposide'nin elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve miktar tayini (Master's thesis, *Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü*).
- Balaji, T. S., Gavaskar, D., & Somanathan, T. (2021). Analytical method development and validation for the analysis of nepafenac and its related substances using ultra performance liquid chromatography. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 14(8), 4178-4184.
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). Fundamentals and applications. *Electrochemical methods*, 2(482), 580-632
- Batley, G. E., & Florence, T. M. (1974). An evaluation and comparison of some techniques of anodic stripping voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 55(1), 23-43.
- Bontempelli, G.; Toniolo, R. (2005 Voltammetry - Linear sweep and cyclic, Second Edition *Encyclopedia of Anal Chem*, London, 188-197
- Choudhary, N., Li, C., Moore, J., Nagaiah, N., Zhai, L., Jung, Y., & Thomas, J. (2017). Asymmetric supercapacitor electrodes and devices. *Advanced Materials*, 29(21), 1605336.
- Correia, A. N., & Machado, S. A. S. (2003). Anodic linear sweep voltammetric analysis of Ni-Co alloys electrodeposited from dilute sulfate baths. *Journal of applied electrochemistry*, 33, 367-372.

- Daabees, H.G.a,Talaat, W.,El-Shal, M.Ahmed, K.,2018, Highly sensitive voltammetric sensors based on modified gold nanoparticles electrode for determination of nepafenac in bulk powder, pharmaceutical dosage form and blood serum, *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry*.10,851-872.
- Demetriades, D., Economou, A. and Voulgaropoulos, A. 2004. A study of pencil-lead bismuth-film electrodes for the determination of trace metals by anodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 519:167–172.
- Furst, D. E. (1997, June). Meloxicam: selective COX-2 inhibition in clinical practice. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 26, pp. 21-27). WB Saunders.
- Heinze, J. (1984). Cyclic voltammetry—“electrochemical spectroscopy”. New analytical methods (25). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 23(11), 831-847.
- Hejazi, M. S., Alipour, E., & Pournaghi-Azar, M. H. (2007). Immobilization and voltammetric detection of human interleukine-2 gene on the pencil graphite electrode. *Talanta*, 71(4), 1734-1740.
- Henden, E., Gökçel, H. İ., Ertaş, F. N. 2001. Eser Analiz Yaz Okulu. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim dalı*, 151-160.
- James E.C., Mark, E.S., Michael A.C., Nagendra V.C., Martha E., Gadd, Michael, A. Kapin, Kerry, L.M., David, C.D., 2016, Distribution of topical ocular nepafenac and its active metabolite amfenac to the posterior segmentof, *Experimental Eye Research*, 145, 8-67.
- Jones,B.M.,Neville,M.W., Nepafenac: An Ophthalmic Nonsteroidal Antiinflammatory Drug for Pain After Cataract Surgery,2013, *The Annals of Pharmacotherapy*, 47, 892-895.
- Keskin, E., Yardım, Y., & Şentürk, Z. (2010). Voltammetry of Benzo [a] pyrene in aqueous and nonaqueous media: adsorptive stripping voltammetric determination at pencil graphite electrode. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 22(11), 1191-1199.
- Kessel, L., Tendal, B., Jørgensen, K. J., Erngaard, D., Flesner, P., Andresen, J. L., & Hjortdal, J. (2014). Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops: a systematic review. *Ophthalmology*, 121(10), 1915-1924.
- Laviron, E., 1979. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 101: 19-28.
- Laviron, E., Roullier, L., Degrand, C., 1980. A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 112: 11-23

- Levent A, Yardim Y, Senturk Z. Voltammetric behavior of nicotine at pencil graphite electrode and its enhancement determination in the presence of anionic surfactant. *Electrochimica Acta*. 2009;55(1):190-195
- Levent, A., Keskin, E., Yardım, Y., & Şentürk, Z. (2011). Electrooxidation of thiourea and its square-wave voltammetric determination using pencil graphite electrode. *Reviews in Analytical Chemistry*, 30(1), 45-51.
- Levent, A. (2017). Voltammetric behavior of acebutolol on pencil graphite electrode: highly sensitive determination in real samples by square-wave anodic stripping voltammetry. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 14, 2495-2502.
- Levent, A., & Önal, G. (2018). Application of a pencil graphite electrode for voltammetric simultaneous determination of ascorbic acid, norepinephrine, and uric acid in real samples. *Turkish Journal of Chemistry*, 42(2), 460-471.
- Lipiec, E.A., Jedynak, L, Formelab, A., Roszczynski, J., Cybulskib, M., Puchalskaa, M., chromatography with a spectrophotometric detection method for the chemical purity and assay of Joanna Zagrodzkaa, 2014, Development and validation of high performance liquid nepafenac, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91, 1-6.
- Ly, S. Y., Jung, Y. S., Kim, M. H., Han, I. K., Jung, W. W., & Kim, H. S. (2004). Determination of caffeine using a simple graphite pencil electrode with square-wave anodic stripping voltammetry. *Microchimica Acta*, 146, 207-213.
- Miladiyah, I. (2012). Therapeutic Drug Monitoring (TDM) in The Use of Aspirin as Antirheumatoid Drugs. Sains Medika: *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 4(2), 210-226.
- Nigović, B., Jurić, S., Mornar, A., 2018, Electrochemical determination of nepafenac topically applied nonsteroidal anti-inflammatory drug using graphene nanoplatelets- carbon nanofibers modified glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 817, 30-35.
- Østensen, M. E., & Skomsvoll, J. F. (2004). Anti-inflammatory pharmacotherapy during pregnancy. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(3), 571-580.
- Özbudak, H., Zeynep, Ü. N. A. L., & SABUNCUOĞLU, S. (2016). GEBELİKTE NON-STEROİDAL ANTIİNFLAMATUVAR İLAÇLARIN KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 20(2), 64-71.
- Özer, M. (2019). Kurşun kalem elektrot ile podofilotoksin' in elektroanalitik özelliklerinin incelenmesi ve miktar tayini (Master's thesis, *Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*).
- Padhye H., Sonawane, B., Munipalli, V. K., Warde, S. U., Singh, R. M., Nayak, S., & Bhaskar, (2022) V. Development and Validation of HPTLC Method for Estimation of Nepafenac in Ophthalmic Suspension-

- Pašti, L. A., Gavrilov, N. M., & Mentus, S. V. (2014). Voltammetric techniques in electrocatalytic studies. *Voltammetry theory, types and applications*, 1-337.
- Rajput, S., Shrimali, C., & Baghel, M. (2015). Development and validation of UV and RP-HPLC method for estimation of Nepafenac in bulk drug and ophthalmic formulation. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research Jan-Mar*, 5(1).
- Rossi, R., Pant, D., & Logan, B. E. (2020). Chronoamperometry and linear sweep voltammetry reveals the adverse impact of high carbonate buffer concentrations on anode performance in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 476, 228715.
- Semeraro, F., Russo, A., Gambicorti, E., Duse, S., Morescalchi, F., Vezzoli, S., & Costagliola, C. (2015). Efficacy and vitreous levels of topical NSAIDs. *Expert opinion on drug delivery*, 12(11), 1767-1782.
- Shams, E., Barbei, A. and Soltaninezhad, M. 2004. Simultaneous determination of copper, zinc and lead by adsorptive stripping voltammetry in the presence of Morin. *Anal.Chim. Acta*, 501,119-124.
- Sheppard, J. D., Cockrum, P. C., Justice, A., & Jasek, M. C. (2018). In vivo pharmacokinetics of bromfenac ophthalmic solution 0.075%, bromfenac ophthalmic solution 0.07%, and nepafenac/amfenac ophthalmic suspension 0.3% in rabbits. *Ophthalmology and Therapy*, 7, 157-165.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A. 1998. Principles of Instrumental Analysis *Bilim Yayıncılık Ltd.Şti*, Ankara.
- Spinner, N., & Mustain, W. E. (2012). Influence of non-conducting zirconia on the electrochemical performance of nickel oxide in alkaline media at room temperature. *Journal of The Electrochemical Society*, 159(12), E187.
- Şentürk, T. (2014). Non-Steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ). *İç Hastalıkları Derg*, 2(490-495).
- Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2011). Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments. *Analytical letters*, 44(16), 2644-2702.
- Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2007). Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Analytical Letters*, 40(5), 817-853.
- Usman, S., Akram, M., Aziz, A., Ramesh, V., & Sarheed, O. A. (2014). Development and validation of HPLC analytical method for Nepafenac in ophthalmic dosage form (suspension). *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 27.
- Vane, J.R., 1996. Introduction: Mechanism of Action of NSAIDs, *British Journal Rheumatology*, 35, 1-3.
- Yardı, Y., Keskin, E., Levent, A., Özsöz, M., & Şentürk, Z. (2010). Voltammetric studies on the potent carcinogen, 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene: Adsorptive

stripping voltammetric determination in bulk aqueous forms and human urine samples and detection of DNA interaction on pencil graphite electrode. *Talanta*, 80(3), 1347-1355.

Wagh, D., Shahi, S. R., Dabir, P. D., & Deore, S. (2017). Spectrophotometric method for the determination of nepafenac in ophthalmic formulation. *World J. Pharm. Res*, 6(6), 623-630.

Wang J (2006). Analytical Electrochemistry. 3rd Ed. *John Wiley and Sons*.

Wang, J. (2005). Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 17(1), 7-14.

Wang, J., Kawde, A.N., 2001. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Anal. Chim. Acta*, 431: 219-224.

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