

AKÜ FEMÜBİD 20 (2019) 011201 (19-29)

AKU J. Sci. Eng 20 (2019) 011201 (19-29)

DOI: 10.35414/akufemubid.621530

Araştırma Makalesi / Research Article

Katyonik Sürfaktan Varlığında Kalem Grafit Elektrot Yüzeyinde Epirubisin'in Sıyırma Voltametrisi ile Miktar Tayini

Pınar TALAY PINAR^{1*}, Yavuz YARDIM¹

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bölümü, Van

Sorumlu yazar e posta: ptalay@yyu.edu.tr

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1027-1456>

yavuz@yyu.edu.tr

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-9587-096X>

Geliş Tarihi: 18.09.2019

; Kabul Tarihi: 22.02.2020

Öz

Anahtar kelimeler

Epirubisin; Katyonik Sürfaktan; Voltametri; Kalem Grafit Elektrot; Biyolojik Örnek

Bu çalışmada, bir antrasiklin ilaç olan epirubisin'in, kalem grafit elektrot kullanarak elektrokimyasal özelliklerini katyonik sürfaktan varlığında Britton-Robinson tampon çözeltisinde (pH 2.0-10.0) araştırılmıştır. Öncelikle kalem grafit elektrotun performansını etkileyen parametreler örneğin, elektrot aktivasyonu, destek elektrolit seçimi, pH etkisi, biriktirme gerilimi ve süresi, sürfaktan etkisi ve kare dalga voltametrik yöntem parametreleri adsorptif sıyırma voltametrisi tekniği kullanılarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. Daha sonra önerilen tekniklerin elde edilen en iyi koşullarında epirubisin için doğrusal aralık (0.01-2.0 µg mL⁻¹) ve gözlenebilir sınıırı (GS; 0.0018 µg mL⁻¹) belirlenmiştir. Geliştirilen kare dalga adsorptif sıyırma voltametri tekniği, insan idrarına standart katma tekniğiyle uygulanmıştır.

Voltammetric Determination of Epirubicin using a Pencil Graphite Electrode in the Presence of Cationic Surfactant

Abstract

Keywords

Epirubicin; Cationic Surfactant; Voltammetry; Pencil Graphite Electrode; Biological Sample

In this study, the electrochemical properties of epirubicin, an anthracycline drug using pencil graphite electrode, were investigated in Britton-Robinson buffer (pH 2.0-10.0) in the presence of cationic surfactant. Firstly, parameters affecting the performance of the pencil graphite electrode, such as electrode activation, support electrolyte selection, pH effect, deposition voltage and duration, surfactant effect, and square-wave voltammetric method parameters were investigated in detail by using adsorptive stripping voltammetry technique. Then, the linearity of epirubicin (0.01-2.0 µg mL⁻¹) was determined as the detection limit (LOD; 0.0018 µg mL⁻¹) in the best conditions obtained in the proposed techniques. The developed square wave adsorptive stripping voltammetry technique was applied to the human urine with standard addition technique.

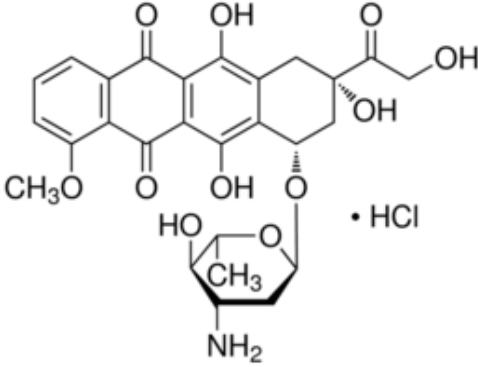
© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Antikanser ilaçların analizi, insan vücudunda ve kanser tedavisinde oynadıkları rol nedeniyle ilaç formülasyonu için çok önemlidir. Antikanser ilaçlarla kemoterapi, çeşitli kanser türlerini tedavi etmenin etkili bir yoludur. Ancak, saç dökülmesi, yorgunluk, halsizlik, öksürük veya ses kısıklığı, ciltte kırmızı lekeler ve sıra dışı kanama veya morarma gibi birçok

yan etki vardır. Bunların hepsi antikanser ilaçların kullanımından sonra gözlemlenmektedir (Alavi-Tabari et al. 2017; Karimi-Maleh et al. 2016; Howard et al. 2015). Epirubisin (EB) (10-(4-amino-5-hidroksi-6-metil-oksan-2-il)oksi-6,8,11-trihidroksi-8-(2-hidroksiasetil) -1-metoksi-9,10-dihidro7H-tetrasen-5,12 dion) kemoterapi için kullanılan bir antrasiklin ilaçtır (Şekil 1) (Kurbanoglu et al. 2014). Epirubisin daha düşük yan etkileri nedeniyle, meme kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte,

kalp yetmezliği gibi kardiyak problemler EB'nin başlıca yan etkileridir. Bu nedenle, kanser terapısından sonra insan vücudundaki EB konsantrasyonunun kontrol edilmesi çok önemlidir (Jain et al. 1985).



Şekil 1. Epirubisin'in kimyasal yapısı

Maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesi ile ortaya çıkan tepkimeleri elektrokimyasal açıdan inceleyen bilim dalı elektrokimya'dır. Elektroanalitik yöntemler ise analizlerde çok düşük tayinlere olanak sağladıkları gibi uygulandıkları alanlar hakkında geniş bilgiler sunar. Çoğu kez mevcut yöntemleri tamamlayıcı niteliğinde ve hatta onlara alternatif olmuştur. Teknolojideki gelişmeler analitik tayin ve kontrol yöntemlerinin gelişimine yön vermekte, analizlerin daha duyarlı, hızlı ve ekonomik olmasına imkan tanımaktadır. Elektroanalitik yöntemlerden olan voltametri, duyarlılığı, seçiciliği, güvenilirliği ve geniş bir çalışma alanına uygulanabilirliği açısından yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Yıldız vd. 1997; Skoog et al. 1998; Fifield et al. 2000; Wang 2000). Voltametrik yöntemlerin diğer yöntemlere göre üstün yanları; ucuz olması, seçici olması, çok az örnekle çalışılması, analiz süresinin kısa olması, çok farklı elektrotlar ile çalışılıyor olması, doğrusallık aralığının geniş olması ve tayin alt sınırının düşük olmasıdır (Talay Pınar and Senturk 2017; Talay Pınar et al. 2018; Yardım et al. 2011; Levent 2017).

Voltametri de karbon bazlı katı elektrotlar; geniş bir gerilim aralığında çalışmaya imkan sağlaması, yüzey kimyasının zengin olması, kimyasal inertliği, düşük artık akım vermesi, ucuz olması, duyarlılığın yüksek olmasıyla elektrokimyasal analizlerde sıklıkla tercih edilirler. Camımsı karbon, karbon pasta, perde-baskılı karbon, karbon-fiber ve kalem grafit gibi çeşitli karbon türevli elektrotlar bulunmaktadır

(Talay Pınar et al. 2014; Talay Pınar 2018; Ali et al. 2017). Tüm katı elektrotlarda olduğu gibi karbon elektrotlar ile çalışılırken en önemli sorun, analiz esnasında bazı bileşiklerin yükseltgenme ürünlerinin elektrot yüzeyinde ince bir film tabakası olarak birikmesi ve elektrot yüzeyinin aktivasyonu sağlansa bile analitik sinyalin azalması ve dolayısıyla tekraredilebilir sonuçların olmamasıdır. Doksanlı yılların sonunda başlayarak kalem grafit (kalem ucu) elektrotlar (KGE), camımsı karbon ve karbon pasta elektrotlara tek kullanımlık özelliklerinin yanısıra çok ucuz olmalarından dolayı alternatif olmuşlardır (Alpar et al 2017; Özcan et al. 2018; Arvas et al. 2018). Elektrot olarak, her yerde kolaylıkla bulunabilen farklı sertlik ve çapta olan ticari kurşun kalem uçlarından yararlanır. Kalem uçları, doğal grafitin kil ve balmumu karışımı içerisinde dağılması ve ısı işlem uygulanması ile elde edilir. Kil yerine selüloz gibi organik bazlı maddeler kullanılıp, oksijensiz atmosferde yakıldığı zaman selüloz karbon şekline dönüşür. Oluşan yapı son derece elastiktir. KGE'ler, ne karbon pasta ve pirolitik karbon kadar kırılğan, ne de camımsı karbon kadar serttir. Tek kullanımlık olmaları, elektrot temizleme işlemlerine kolaylık sağlar; dolayısıyla yeni bir elektrot yüzeyi oluşturmak çok daha basit ve hızlı olup tekrar edilebilirlik yüksektir. Kaynakçada KGE'lerin pek çok uygulaması görülmektedir. İz metal analizleri (Honeychurch 2015), ürik asit, norepinefrin ve askorbik asitin eş zamanlı analizi (Levent and Onal 2018), nikotin analizi (Levent et al. 2009), kafein analizi (Ly et al. 2004), ilaç analizleri (Purushothama et al 2018; Temerk et al. 2016) ilaç-DNA etkileşim çalışması (Dogan-Topal et al. 2009), fungusit analizi (Aydın et al. 2018) kalem grafit elektrotunun kullanıldığı araştırmalara örnek olarak verilebilir. Yüzey aktif maddeler (surfaktanlar), bir polar kafa grubu ve bir apolar kuyruk bölgesinden oluşur. Yüzey modifiye elektrotlar, sadece organik bileşiklerin çözülmesinde değil, aynı zamanda elektroaktif türlerin elektrokimyasal prosesi büyük ölçüde etkileyen elektrot arayüzündeki moleküllerin spesifik oryantasyonu sağlayarak çok önemli bir rol oynarlar (Abdullah at al. 2018; Dönmez et al. 2018). Farmakolojik, çevresel ve klinik açıdan ilgi çekici organik bileşiklerin elektroanalizinde surfaktanların kullanılmasıyla, tespitin hassasiyeti ve seçiciliğinde

artış sağlanır. Kaynakçada yapılan araştırma sonucunda EB'nin miktar tayini için kromatografik ve spektroskopik yöntemlerinin olduğu görülmektedir (Gopinath et al. 2018; Dodde et al. 2003; Sottani et al. 2008; Souza et al. 2018). EB'nin elektrokimyasal özellikleri inceleyen ve çeşitli çalışma elektrotları kullanılarak yapılan miktar tayini çalışmaları ise Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Epirubisin'in farklı elektrot kullanılarak yapılmış elektrokimyasal çalışmaları

Çalışma Elektrodu	LOD (M)	Kaynak
SWNT/GCE	2.0×10^{-8}	Zhang 2014
BDDE	7.3×10^{-8}	Bozal-palabiyik et al. 2013
CoFe ₂ O ₄ /NPs/1,3-DPIBr/CPE	-----	Karimi et al. 2017
Apt/AuNPs/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ /DABCO/SPE	4.0×10^{-8}	Hashkavayi and Raooof 2017
KGE	3.6×10^{-9}	Bu çalışma

CoFe₂O₄/NPs/1,3-DPIBr/CPE: CoFe₂O₄ nanopartikül 1,3-dipropilimidazolümbromür modifiye karbon pasta elektrot; Apt/AuNPs/Fe₃O₄@SiO₂/DABCO/SPE: aptamer/ altınnanoparçacık/demir(III)oksit@silisyumdioksit diazoniabisiklo modifiye perde baskılı elektrot; BDDE: bor katkılı elmas elektrot; SWNT/GCE: tek duvarlı nano tüp modifiye camsi karbon elektrot; KGE; kalem grafit elektrot

Yapılan kaynakça araştırmasında EB'nin yalnız KGE ve/ya da bir katyonik surfaktan olan setil trimetil amonyum bromür (CTAB) ile modifiye edilmiş KGE üzerinde elektrokimyasal davranışlarının incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. İlk defa tarafımızdan bu çalışmada, epirubisin'in KGE ile elektrokimyasal özellikleri araştırılarak hem daha hızlı, duyarlı, seçici hem de daha ucuz bir voltametri yöntemi geliştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından satın alınmıştır. Deneysel çalışmalar, ultra saf su kullanılarak, oda sıcaklığında gerçekleştirildi. pH 2-10 arasındaki 0.1 M Britton-Robinson (BR) tamponu destek elektroliti

olarak kullanıldı. Epirubisin HCl stok çözeltisi 1000 µg mL⁻¹ olacak şekilde suyla hazırlandı ve kullanılmadığı zaman +4°C'de muhafaza edildi.

2.2 Analiz cihazı ve elektrot

Voltametik çalışmalar, elektrokimyasal analiz cihazı Autolab tip III (GPES 4.9 yazılım paketi (EcoChemie, Hollanda)) ile gerçekleştirildi. Elde edilen yalnız voltamogramlara, 'Savitzky ve Golay' yazılım programı kullanılarak zemin düzeltilmesi yapılmıştır. Referans elektrot olarak MF 2012, BAS kodlu Ag/AgCl, yardımcı elektrot olarak MW 1032, BAS kodlu platin tel elektrot kullanılmıştır. 10 mililitrelik elektrokimyasal pyrex® deney hücreleri (üç elektrot girişli) kullanılmıştır. Düzenegin alt kısmına manyetik karıştırıcı yerleştirilmiştir. WTW, inolab pH 720 ile çözeltilerin pH ölçümleri yapılmıştır. Çalışma elektrodu olarak kullanılan kalem grafit elektrot aşağıdaki yolla hazırlandı. Yerel bir kırtasyeden alınan (Rotring, Almanya) kurşun kalem (Model T 0.5) için uygun uçlar (Tombo, Japonya) kullanıldı. Tüm uçların toplam uzunluğu 60 mm ve çapı 0.5 mm'dir. Kurşunun elektriksel teması, kalemin metalik kısmının etrafına metal bir tel sarılarak gerçekleştirildi. KGE yüzeyi, elektrodun hidrofilik özelliklerini arttırmak amacıyla, +1.40 V'ta 60 s destek elektrolitte karıştırma yapmadan uygulanarak ön işlemden geçirildi.

2.3 Örnek hazırlama

İdrar örneği, deneyden önce (kadın, yaş 30) toplandı. 5 mL idrar örneği, numune tüpünde eşit hacimde asetonitril ile karıştırıldı. Tüp sıkıca kapatılıp, 1 dakika boyunca vorteks ile karıştırıldı. Sonra bilinmeyen endojen kimyasalları uzaklaştırmak için 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst tabakadan alınan 50 µL örnek, voltammetrik hücrede CTAB içeren 0.1 M BR tamponu (pH=3.0) ile karıştırıldı. Daha sonra epirubisin standart çözeltisinden küçük hacimler eklendi ve hemen analiz edildi.

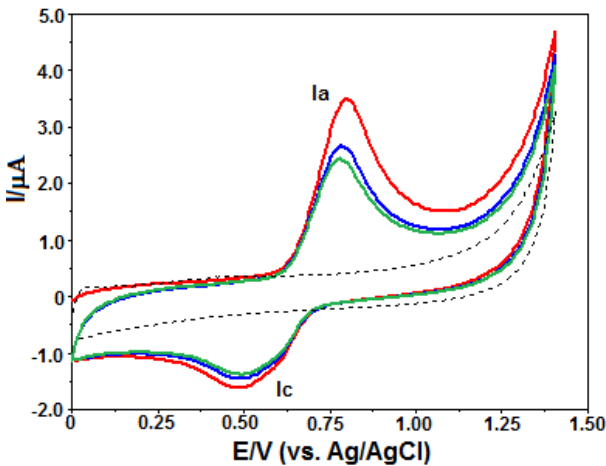
2.3 Deneysel prosedür

İlk olarak, KG elektrot ile EB'nin dönüşümlü voltametri tekniği ile elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi sağlandı. Her analiz öncesi temiz ve

tekraredilebilir bir elektrot yüzeyi oluşturabilmek için KG elektrot, destek elektrolit çözeltisinde +1.40 V'ta 60 s süreyle işleme tabi tutuldu. Çalışılacak voltametrik yöntemin optimizasyonu için çeşitli destek elektrolit çözeltilerinin pH etkisi, elektrot temizleme yönteminin biriktirme süresi ve geriliminin elektrottaki etkisi, kare-dalga voltametri tekniği parametrelerinin elektrottaki etkisi, surfaktan etkisi, kalibrasyon eğrisinin oluşturulması, tekraredilebilirlik çalışmaları ve analitik uygulanması gerçekleştirildi.

3. Bulgular

Kalem grafit elektrot yüzeyinde oluşan elektrokimyasal olayı anlayabilmek için 0.1 M BR tamponu (pH=3.0) içerisinde 20 µg mL⁻¹ EB çözeltisinin anodik yönde 0.0 V ile +1.40 V gerilim tarama aralığında ve 100 mV s⁻¹ gerilim tarama hızı ile elde edilen üç döngülü dönüşümlü voltamogramları Şekil 2'de gösterilmiştir. Destek elektroliti ve 20 µg mL⁻¹ EB içeren çözeltilerin eğrileri kıyaslandığında EB'nin yaklaşık olarak (I_a) +0.793 V'da 2.63 µA'lık anodik bir yükseltgenme piki verdiği, katodik yönde tarama yapıldığında ise (I_c) -0.497 V'da 0.62 µA'lık katodik bir indirgenme piki gözlenmektedir.

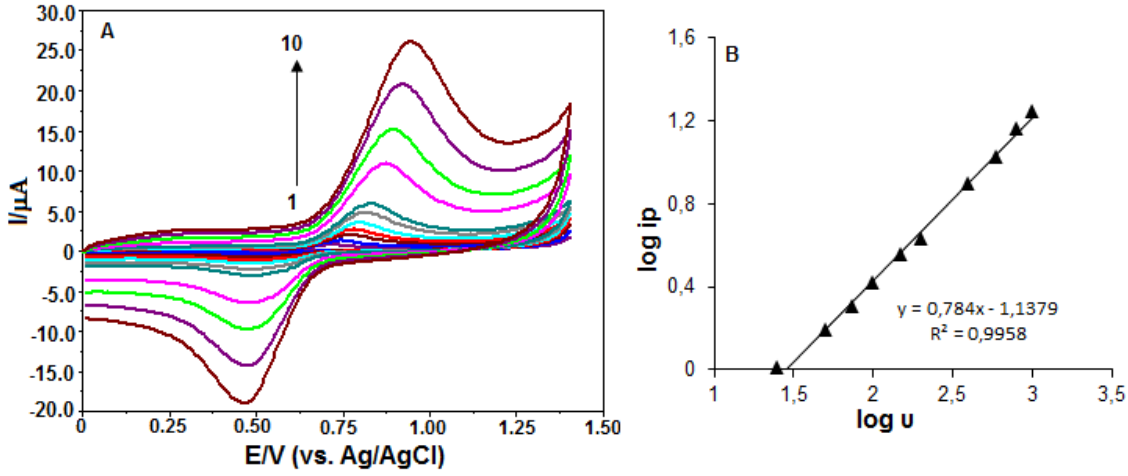


Şekil 2. 20 µg mL⁻¹ epirubisin'in 0.1 M BR tamponu (pH=3.0) içerisinde KG elektrot üzerinde üç döngülü dönüşümlü voltamogramı. Gerilim tarama hızı, 100 mV s⁻¹, kesikli çizgi destek elektrolitini göstermektedir.

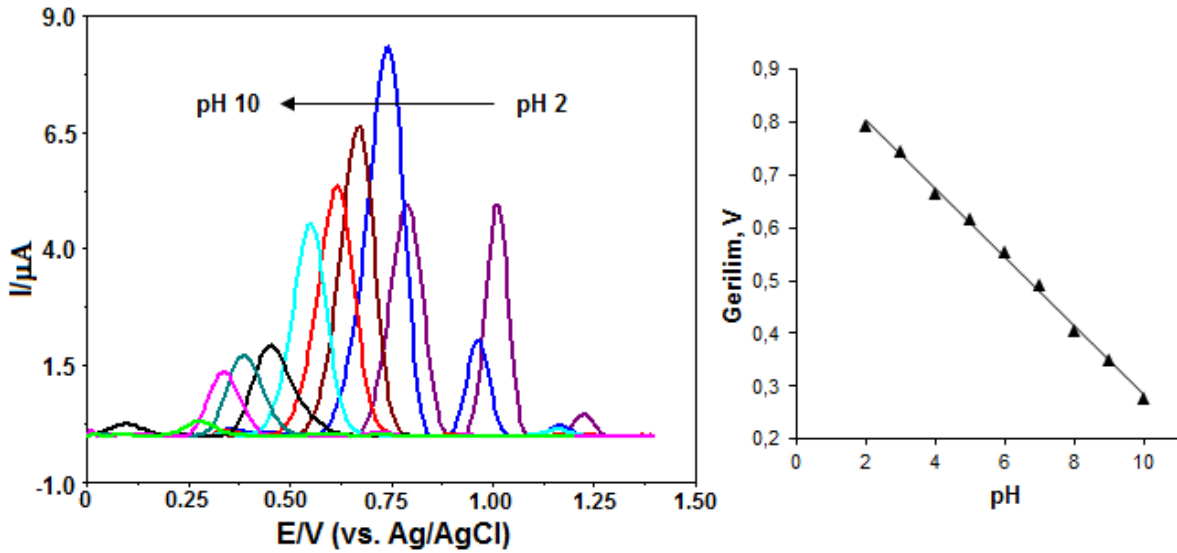
Gerilim tarama hızının EB'nin anodik yükseltgenme pik gerilimleri ve pik akım şiddeti üzerine etkisini incelemek için; 20 µg mL⁻¹ epirubisin'in, 25-1000 mV

s⁻¹ gerilim tarama hız aralığında, 0.1 M BR tamponu (pH=3.0) destek çözeltisi içinde dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 3A). Gerilim tarama hızı ile yükseltgenme pik akımı şiddeti arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir ($ip (\mu A) = 0.0169 v (mV s^{-1}) + 0.831, r = 0.999$). Aynı zamanda, tarama hızının logaritması ile yükseltgenme pik akımının logaritması arasındaki bağıntıdan ($\log ip (\mu A) = 0.784 \log v - 1.14, r = 0.998$) elde edilen eğimin 0.5'den büyük olması EB'nin elektrokimyasal yükseltgenme tepkimesinin adsorpsiyon kontrollü bir proses olduğunu göstermektedir. Buna ait ilgili grafik Şekil 3B'de verilmiştir.

EB'nin daha duyarlı ve seçici voltametrik tayini için, daha keskin ve iyi belirlenmiş pikler kare dalga adsorptif sıyırma voltametri (KD-ASV) tekniği ile elde edilmiştir. Destek elektroliti ve pH'nin EB'nin voltametrik davranışı üzerine etkisini araştırmak için en uygun destek elektrolit çözeltisi içerisinde hazırlanan 2.0 µg mL⁻¹ EB çözeltilerinin +0.0 ile +1.4 V gerilim tarama aralığında KD-AS voltamogramları kaydedilmiştir. Bu amaç için, destek elektroliti 0.1 M BR tamponu (pH 2-10) çözeltileri kullanılmıştır. Şekil 4'de açık devrede 60 s biriktirmeye bırakılmış 2.0 µg mL⁻¹ EB çözeltilerinde kaydedilen kare-dalga voltamogramları üstünde pH'nin etkisini göstermektedir. Şekil 4'te görüldüğü gibi pH değeri artıkcça EB'e ait yükseltgenme piki daha negatif gerilime doğru kaymakta ve pik akım şiddeti nötral ve bazik pH'lerde azalmaktadır. Ayrıca, BR tamponu pH 2.0 ve 3.0 çözeltilerinde EB molekülü iki yükseltgenme basamağına sahipken, diğer pH değerlerinde tek basamakta yükseltgenmektedir. Dolayısıyla, KG elektrot üzerinde protonların elektrokimyasal mekanizmaya katkı sağladığı söylenebilir. EB'e ait pH ile pik gerilimi (E_p) ilişkisi incelendiğinde pH 2-10 aralığında tek eğimli bölge olduğu $E_p (V) = -0.0648pH + 0.932, r=0.999$ eşitliğinden görülmektedir. Elde edilen eğimin (-64.8 mV) teorik olarak bilinen 59 mV'a (Nerst eşitliği) yakın olması elektrot mekanizmasındaki elektron-proton sayısının eşit olduğunu göstermektedir. Şekil 4'den de anlaşılacağı üzere BR tamponu pH=3.0 çözeltisi, keskin pik ve yüksek pik akımı verdiği için dolayı en uygun ortam olarak seçilmiştir.



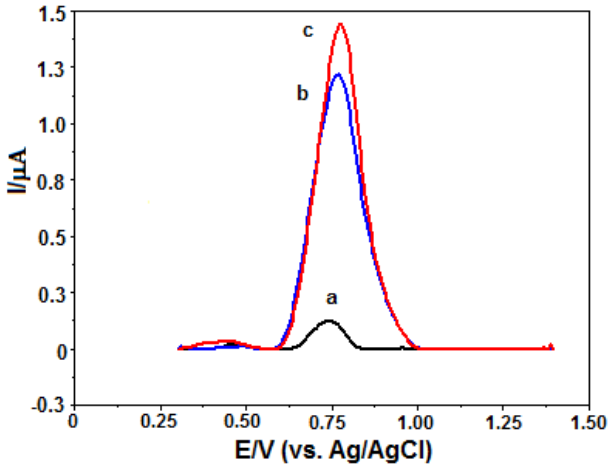
Şekil 3. 20 µg mL⁻¹ epirubisin'in 0.1 M BR tamponu (pH=3.0) içerisinde KG elektrot ile farklı hızlarda alınan dönüşümlü voltamogramları (1: 25, 2: 50, 3: 75, 4: 100, 5: 150, 6: 200, 7: 400, 8: 600, 9: 800, 10: 1000 mV s⁻¹).



Şekil 4. BR tamponunda (pH:2-10) 2.0 µg mL⁻¹ epirubisin'in kare-dalga adsorptif sıyırma voltamogramları. Kare dalga değişkenleri; puls amplitüd, 30 mV, frekans, 50 Hz, gerilim adımı, 8 mV. Elektrokimyasal biriktirme süresi, 60 s (açık devrede, 500 rpm)

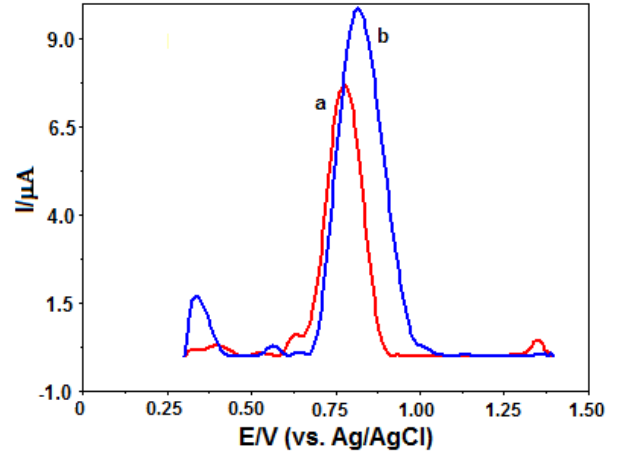
EB'nin biriktirme süresi ve geriliminin etkisi kalem grafit elektrot üzerinde incelendiğinde, biriktirme süresinin etkisi karıştırılan 0.25 µg mL⁻¹ EB çözeltilerinde 0 - 360 s aralığında uygulanmış, 60 s değerine kadar pik şiddeti artmış, sonraki sürelerde pek bir artış gözlenmemiştir. 60 s biriktirme uygulanan 0.25 µg mL⁻¹ EB çözeltilerinde biriktirme geriliminin etkisi ya açık devre'de ya da +0.0 V'dan +0.5 V'a kadar değişen gerilim aralığında çalışılmıştır. Elektroaktif maddelerin adsorptif

karakter göstermesi durumlarında, madde karıştırılan bir ortamda belirlenen bir sürede ya açık devrede ya da belirli bir potansiyelde elektrot yüzeyine biriktirilerek duyarlılığının artması sağlanır. Şekil 5'te görüldüğü gibi +0.1 V gerilimde en yüksek pik akımı görülmüştür dolayısı ile en iyi duyarlılık burada elde edilmiştir.



Şekil 5. BR tamponu (pH 3) çözeltisinde $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ epirubisin'in kare-dalga voltamogramları. a, biriktirme yapmadan; b, açık devrede 60 s biriktirme; c, 0.1 V, 60 s biriktirme. Kare dalga değişkenleri Şekil 4'deki gibidir.

Voltametrik tekniklerde meydana gelen sinyaller, kullanılan cihazın değişkenleri ile değişebileceğinden, bu değişkenleri de optimize etmek gerekmektedir. Bu amaç için, $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ EB'nin, pH 3.0 BR tamponu içerisinde, +0.1 V gerilimde 60 s süreyle biriktirme işlemi uygulandıktan sonra frekans $f = 15-175$ Hz, gerilim adımı $\Delta E = 2-14$ mV ve puls amplitüd $E_{SW} = 10-50$ mV aralıklarında değiştirilerek kare-dalga voltametri tekniği değişkenlerini incelenmiştir. Frekans'ın artırılması ile 150 Hz'e kadar pik akımında artış sağlanmış ancak 150 Hz'den sonra pik akımı artmış fakat pik morfolojisi bozulmuştur. Bu nedenle en uygun frekans değeri olarak 150 Hz olarak belirlenmiştir. 2–14 mV gerilim aralığında pik şekli ve pik akım değeri bakımından en iyi sonuç, $\Delta E = 8$ mV değerinde, 10-50 mV puls amplitüd aralığında pik akımı 40 mV'da en iyi sonuç elde edilmiştir. Daha sonra bir katyonik yüzey aktif madde sınıfından olan setil trimetilamonyum bromür (CTAB) maddesinin elektrokimyasal sinyale etkisi incelenmiştir. Bu amaç için BR tamponu (pH 3.0) çözeltisi içinde KD-ASV ile $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ EB'nin elektrokimyasal sinyali üzerinde araştırılmıştır. Katyonik surfaktan, EB içeren destek elektrolit çözeltisi farklı derişimlerde (1×10^{-4} - 7×10^{-4}) ilave edilmiş en iyi sonuç 3×10^{-4} M CTAB ile elde edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. BR tamponu (pH 3) çözeltisinde $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ epirubisin'in kare-dalga voltamogramları. a; CTAB olmadan, b; 3×10^{-4} M CTAB içeren ortamda. Elektrokimyasal biriktirme süresi, 60 s (+0.1 V, 500 rpm). Kare dalga değişkenleri; puls amplitüd, 40 mV, frekans, 150 Hz, gerilim adımı, 8 mV.

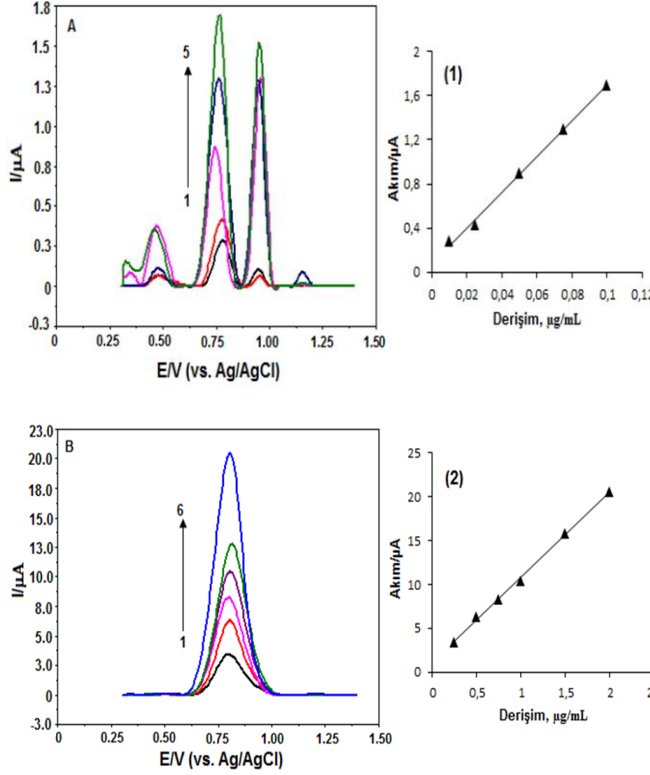
3.1. Analitik Yöntem Validasyonu

Çalışılan voltametrik yöntemle ait duyarlılık, seçicilik, tekraredilebilirlik ve doğrusalık aralığı detaylı bir şekilde araştırılmıştır. En iyi deneysel koşullarında EB derişiminin yükseltgenme pik akımı üzerine etkisini incelemek için, farklı derişimlerdeki EB çözeltilerinin voltamogramları alınmıştır. $0.01-0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1.72 \times 10^{-8} - 1.72 \times 10^{-7}$ M) (Şekil 7A) ve $0.25-2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4.30 \times 10^{-7} - 3.45 \times 10^{-6}$ M) (Şekil 7B) çalışma aralıklarında standart epirubisin çözeltilerinin, BR tamponu (pH 3.0) ve CTAB içeren çözeltilerinde KG elektrodu kullanılarak, +0.75 V gerilimde elde edilen yükseltgenme pik voltamogramlarının ve bunlara karşılık gelen kalibrasyon grafiği Şekil 7 (1) ve (2)'te verilmiştir. Şekil 7A'da görüldüğü gibi çok düşük derişimlerde maddenin yükseltgenme sinyalinin yarıldığı ancak derişim arttıkça sinyalin tek bir sinyale dönüştüğü tespit edilmiştir (Şekil 7B). Derişime karşılık yükseltgenme pik akım değerleri kalibrasyon grafiğine geçirildiği zaman elde edilen doğru denkleminin eşitlikleri aşağıdaki gibidir.

$$[i_p (\mu\text{A}) = 16.195 C (\mu\text{g mL}^{-1}) + 0.079], r=0.998 \quad (1)$$

$$[i_p (\mu\text{A}) = 9.7013 C (\mu\text{g mL}^{-1}) + 1.089], r=0.999 \quad (2)$$

Yukarıda verilen (1) eşitliği 1.72×10^{-8} - 1.72×10^{-7} M, (2) eşitliği ise 4.30×10^{-7} - 3.45×10^{-6} M derişim aralığına sahiptir.



Şekil 7. BR pH 3.0'de KGE'de epirubisin'in değişen derişimlerine A (0.01 - $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) ve B (0.25 - $2.00 \mu\text{g mL}^{-1}$) karşılık elde edilen kare dalga absorptif sıyırma voltamogramları ve ilgili kalibrasyon eğrileri. Değişkenler şekil 6'daki gibidir.

Bu çalışmada seçilen voltametik metodun analitiksel duyarlılığını belirtmek için gözlenebilir sınıırı (GS, LOD) ($3 s/m$ oranına göre), tayin alt sınıırı (TAS, LOQ) ($10 s/m$ eşitliğine göre) hesaplanmıştır. Eşitlikte yer alan "s", destek elektroliti çözeltisinin zemin çizgisinde okunabilen en küçük on sinyal gürültüsünün standart sapmasını, "m" ise kalibrasyon eğrisinin eğimini göstermektedir. Kalibrasyon eğrisi denkleminde elde edilen sonuçlara göre LOD; $0.0018 \mu\text{g mL}^{-1}$ (3.6×10^{-9} M) ve LOQ; $0.0062 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1.1×10^{-8} M) olarak bulunmuştur. Elde edilen analitiksel sonuçlar çizelge 2'de detaylı olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada, EB tayini için surfaktan ortamında KG elektrot kullanılarak geliştirilen KD-ASV yöntemi ile hesaplanan LOD, çizelge 1'de verilen çalışmalarda elde edilen sonuçlardan oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir.

Yöntemin kesinlik değerleri EB pik akım değerlerinin hem gün içi hem de günler arası tekraredilebilirliği bağıll standart sapmaları (BSS) ile değerlendirildi. KD-ASV yöntemi kullanılarak, aynı günde ve farklı günlerde beş farklı çözeltide sekiz kez tekrar alındı. Epirubisin'e ait yükseltgenme pik akımlarının gün-içi ve günler arası % BSS değerleri sırasıyla % 3.3 ve % 3.6 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar bize, yükseltgenme pik akım ve pik gerilim değerlerindeki tekraredilebilirliğinin oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

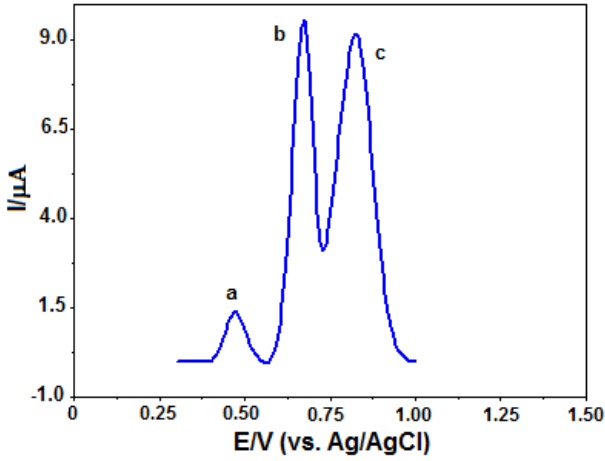
Çizelge 2. Epirubisin'in tayinine dayalı validasyon parametreleri

	1.Kalibrasyon eğrisi	2.Kalibrasyon eğrisi
Çalışma ortamı	BR, pH 3.0	BR, pH 3.0
Elektrot	PGE	PGE
Ölçülen gerilim (V)	0.75	0.77
Çalışma aralığı (M)	1.72×10^{-8} - 1.72×10^{-7}	4.30×10^{-7} - 3.45×10^{-6}
Kesişim±%RSD	0.079 ± 3.56	1.089 ± 1.41
Eğim±%RSD	16.195 ± 2.97	9.7013 ± 2.37
Korelasyon katsayısı	0.998	0.999
LOD (M)	3.6×10^{-9}	
LOQ (M)	1.1×10^{-8}	
Akımın gün-içi tekraredilebilirliği (% R.S.D.)	3.3	
Gerilimin gün-içi tekraredilebilirliği (% R.S.D.)	2.6	
Akımın günlerarası tekraredilebilirliği (% R.S.D.)	3.6	
Gerilimin günlerarası tekraredilebilirliği (% R.S.D.)	3.2	

3.2. Yöntemin Seçiciliği

Geliştirilen voltametik metodun seçicilik çalışması için $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ EB çözeltisinde girişim yapabilecek maddeler üzerinde test edilmiştir. Seçicilik çalışmasında Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Na^+ , NO_3^- , Cl^- , ürik asit ve dopamin bileşikleri varlığında EB'e ait pik geriliminde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Şekil 8'de EB'nin dopamin ve ürik asit ile eş zamanlı olarak alınan voltamogramdan da görüldüğü gibi, EB

miktar tayini için surfaktanlı ortamda KG elektrot ile tasarlanan KD-ASV yöntemin seçici olduğunu söylenebilir. Şekil 8'deki voltamogramda dopamin 0.48 V (1.40 μA) gerilimde, ürik asit 0.67 V (9.52 μA) ve EB ise 0.83 V (9.12 μA) gerilimde yükseltgenmiştir. Bu verilerden de anlaşılacağı üzere ürik asidin yüksek derişimlerinde EB sinyali ile örtüşme olacaktır, EB'nin idrar örneklerinde tayininde geliştirilen yöntemin uygulanmasında elektrokimyasal hücreye düşük hacimlerde idrar örneği katılmalıdır. Bu bilgi göz önünde bulundurulduğunda geliştirilen yöntemin LOD değerinin düşük olması (LOD; 0.0018 $\mu\text{g mL}^{-1}$) düşük hacim ilaveli idrar örneklerinde EB tayinine imkan tanımaktadır.

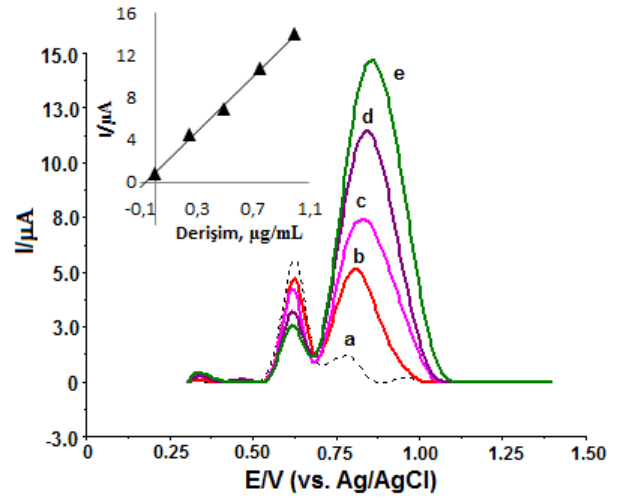


Şekil 8. 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ epirubisin'in (c) eş zamanlı olarak 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dopamin (a) 0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ürik asit (b) ile BR tamponu (pH 3.0) içerisindeki kare dalga absorptif sıyırma voltamogramları. Değişkenler şekil 6'daki gibidir.

3.3. Analitiksel Uygulama

Geliştirilen yöntemin uygulaması, farmasötik formülasyonlarla karşılaştırıldığında esas olarak su, tuzlar ve biyomoleküllerden oluşan daha karmaşık matrislere sahip idrar numunesi üzerinde test edilmiştir. İdrar örnekleri 30 yaş dolayında sağlıklı bir kadın gönüllüden alınmıştır. İdrar örneğine son derişimi 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde stok EB çözeltisinden uygun miktarda katılmıştır. Bu karışıma daha sonra 4.95 mL asetoneitril eklenmiş ve karışım aynı idrar örneğiyle 10 mL'ye tamamlanmıştır. Örnek tüpleri karıştırıldıktan sonra 5000 rpm hızda 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Aynı işlem analit katılmamış idrar örneğiyle de (kör) tekrar edilmiştir. 50 μL idrar

örneği BR (pH 3.0) tamponuna ilave edildikten sonra, sırasıyla 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EB çözeltisinden ilave edilerek standart ekleme yöntemi yapılmıştır (Şekil 9). Her standart EB ilavesinden sonraki pik akımının artışı, yaklaşık +0.80 V'de görülen yükseltgenme pikinin EB yükseltgenmesine bağlı olduğu sonucuna varılabilir. Şekil 9'da görülen ilk sinyalin (yaklaşık +0.64 V) idrar örneklerindeki ürik asitten kaynaklandığı, ikinci sinyalin (yaklaşık +0.80 V) EB sinyali olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 9. İdrar örneğinin kare dalga adsorptif sıyırma voltamogramları. (a) 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ epirubisin varlığında, (b-e) 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ standart epirubisin'in 3×10^{-4} M CTAB'li ortamda BR tamponu (pH 3.0)'de elde edilen voltamogramları. Değişkenler şekil 6'daki gibidir. (Kalibrasyon eğrisi şekil içinde gösterilmiştir).

Derişime karşılık pik akım değerleri grafiğe yerleştirildikten sonra doğrusal bir bağıntı elde edilmiştir [i_p (μA) = 13.086 C ($\mu\text{g mL}^{-1}$) + 0.836 $r=0.998$]. Bu doğrusal bağıntıdan faydalanılarak Çizelge 3'de % geri kazanım ve % BSS değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3. İdrar örneğinin geri kazanım ve bağıl standart sapma sonuçları

Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%Geri kazanım± %BSS
0.25	0.28	112±2.35

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, ilk defa KG elektrot ile anti kanser ilaç olan EB'nin elektrokimyasal özellikleri incelendi, duyarlılığı katyonik surfaktan olan CTAB ile artırılarak, miktar tayini için bir kare-dalga adsorptif sıyırma yöntemi geliştirildi. Geliştirilen bu voltametik yöntemin duyarlılığı, doğruluğu, seçiciliği, tekrar edilebilirliği, uygulanabilirliği bulgularla gösterildi. Geliştirilen yöntem, EB tayinine yönelik kaynakçada yer alan diğer elektrokimyasal yöntemlerle kıyaslandığında (tablo 1) daha duyarlı (LOD; 3.6×10^{-9}) ve ucuzdur (KGE elektrotun kullanılması). Geliştirilen elektrokimyasal yöntem, hem hızlı hem de bir ön-deriştirme işlemine gerek kalmadan, ucuz, duyarlılık bakımından oldukça başarılı, küçük hacimli örnek ile çalışılması ve zaman alıcı olan ayırma işlemlerine gerek duymadan analiz yapılabilmesinin yanı sıra kaynakçada yer alan, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlere alternatif olabilir.

Teşekkür

5. Kaynaklar

- Abdullah, AA, Yardım, Y, Şentürk, Z, 2018. The performance of cathodically pretreated boron-doped diamond electrode in cationic surfactant media for enhancing the adsorptive stripping voltammetric determination of catechol-containing flavonoid quercetin in apple juice. *Talanta*, **187**, 156-164.
- Alavi-Tabari, SAR, Khalilzadeh, MA, Karimi-Maleh, H, Zareyee, D, 2017. An amplified platform nanostructure sensor for the analysis of epirubicin in the presence of topotecan as two important chemotherapy drugs for breast cancer therapy. *New Journal of Chemistry*, **00**, 1-4.
- Ali, HS, Abdullah, AA, Talay Pınar, P, Yardım, Y, Şentürk, Z, 2017. Simultaneous voltammetric determination of vanillin and caffeine in food products using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode: Its comparison with HPLC-DAD. *Talanta*, **170**, 384-391.
- Alpar, N, Talay Pınar, P, Yardım, Y, Şentürk, Z, 2017. Voltammetric method for the simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in dietary supplements using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis*, **29**, 1- 10.

- Arvas, MB, Gürsu, H, Gençten, M, Sahin, Y, 2018. Electrochemical formation of molybdenum phosphate on a pencil graphite electrode and its potential application for the detection of phosphate ions. *Analytical Methods*, **10**, 4282-4291.
- Aydın, İ, Pelit, L, Ertaş, FN, 2018. Adsorptive cathodic stripping voltammetric determination of boscalid in the presence of cobalt ions at a pencil lead electrode. *Analytical Letters*, **51**, 209-220.
- Bozal-palabiyik, B, Kurbanoglu, S, Gumustas, M, Uslu, B, Ozkan, SA, 2013. Electrochemical approach for the sensitive determination of anticancer drug epirubicin in pharmaceuticals in the presence of anionic surfactant. *Revue Roumaine de Chimie*, **58**, 647-658.
- Dodde, WIW, Maring, JG, Hendriks, G, Wachters, FM, Groen, HJM, Vries, E, Elisabeth, GU, Donald, R, 2003. A determination of epirubicin and its metabolite epirubicinol in saliva and plasma by HPLC therapeutic drug monitoring. **25**, 433-440.
- Dogan-Topal, B, Uslu, B, Ozkan, SA, 2009. Voltammetric studies on the HIV-1 inhibitory drug Efavirenz: The interaction between dsDNA and drug using electrochemical DNA biosensor and adsorptive stripping voltammetric determination on disposable pencil graphite electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 2358-2364.
- Donmez, F, Yardım, Y, Şentürk, Z, 2018. Electroanalytical determination of enrofloxacin based on the enhancement effect of the anionic surfactant at anodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, **84**, 95-102.
- Fifield, FW, Kealey, D, 2000. Principle and Practice of Analytical Chemistry. 3rd Edition. UK: Blackwell Science.
- Gopinath, P, Veluswami, S, Thangarajan, R, Gopisetty, G, 2018. RP-HPLC-UV method for estimation of fluorouracil-epirubicin-cyclophosphamide and their metabolite mixtures in human plasma. *Journal of Chromatographic Science*, **56**, 488-497.
- Hashkavayi, AB, Raoof, JB, 2017. Design an aptasensor based on structure-switching aptamer on dendritic gold nanostructures/Fe₃O₄@SiO₂/DABCO modified screen printed electrode for highly selective detection of epirubicin. *Biosensors and Bioelectronics*, **91**, 650-657.
- Honeychurch, KC, 2015. The voltammetric behaviour of lead at a hand drawn pencil electrode and its trace determination in water by stripping voltammetry. *Analytical Methods*, **7**, 2437-2443.

- Howard, DH, Bach, PB, Berndt, ER, Conti, RM, 2015. Pricing in the market for anticancer drugs. *Journal of Economic Perspectives*, **29**, 139-162.
- Jain, K, Casper, E, Geller, N, Hakes, T, Kaufman, R, Currie, V, Schwartz, W, Cassidy, C, Petroni, G, Young, C, 1985. *Journal of Clinical Oncology*, **3**, 818-826.
- Karimi, F, Shojaei, AF, Tabatabaeian, K, Shakeri, S, 2017. CoFe₂O₄ nanoparticle/ionic liquid modified carbon paste electrode as an amplified sensor for epirubicin analysis as an anticancer drug. *Journal of Molecular Liquids*, **242**, 685–689.
- Karimi-Maleh, H, Shojaei, AF, Tabatabaeian, K, Karimi, F, Shakeri, S, Moradi, R, 2016. Simultaneous determination of 6-mercaptopruine, 6-thioguanine and dasatinib as three important anticancer drugs using nanostructure voltammetric sensor employing Pt/MWCNTs and 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluoro phosphate. *Biosensors and Bioelectronics*, **86**, 879-884.
- Kurbanoglu, S, Bozal Palabiyik, B, Gumustas, M, Sanli, S, Uslu, B, Ozkan, SA, 2014. Development and validation of a stability-indicating rp-lc method for the determination of anticancer drug epirubicin in pharmaceuticals. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **37**, 1583–1596.
- Levent, A, 2017. Bor katkılı elmas elektrot ile naftalin'in voltammetrik davranışı: Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi ile miktar tayini. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **21**, 948-955.
- Levent, A, Onal, 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**, 460 – 471.
- Levent, A, Yardim, Y, Senturk, Z, 2009. Voltammetric behavior of nicotine at pencil graphite electrode and its enhancement determination in the presence of anionic surfactant. *Electrochimica Acta*, **55**, 190-195.
- Ly, SY, Jung, YS, Kim, MH, Han, IK, Jung, WW, Kim, SH, 2004. Determination of caffeine using a simple graphite pencil electrode with square-wave anodic stripping voltammetry. *Microchimica Acta*, **146**, 207-213.
- Ozcan, A, Gürbüz, M, Özcan, AA, 2018. Preparation of a disposable and low-cost electrochemical sensor for protham detection based on over-oxidized poly(thiophene) modified pencil graphite electrode. *Talanta*, **187**, 125-132.
- Purushothama, HT, Nayaka, YA, Vinay, MM, 2018. Manjunatha P, Yathisha RO, Basavarajappa KV. Pencil graphite electrode as an electrochemical sensor for the voltammetric determination of chlorpromazine. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, **3**, 161-166.
- Skoog, DA, Holler, FJ, Nieman, TA, 1998. Principles of Instrumental Analysis. (Çeviri Editörleri: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. Enstrümental Analiz İlkeleri) 1. baskı. Bilim Yayıncılık Ltd. Şti, Ankara.
- Sottani, C, Rinaldi, P, Leoni, E, Poggi, G, Teragni, C, Delmonte, A, Minoia, C, 2008. Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **22**, 2645–2659.
- Souza, DM, Reichert, JF, Martins, AF, 2018. A simultaneous determination of anti-cancer drugs in hospital effluent by DLLME HPLC-FLD, together with a risk assessment. *Chemosphere*, **201**, 178-188.
- Talay Pınar, P, Şentürk, Z, 2017. Voltammetric investigation of antiviral drug valacyclovir at a boron-doped diamond electrode in different electrolyte media: Its determination enhanced by anionic surfactant in pharmaceuticals and biological fluids. *Current Pharmaceutical Analysis*, **13**, 175–187.
- Talay Pınar, P, Ali, HS, Abdullah, AA, Yardım, Y, Şentürk, Z, 2018. Electroanalytical determination of salbutamol in pharmaceutical formulations using cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Marmara Pharmaceutical Journal*, **22**, 460-468.
- Talay Pınar, P, Yardım, Y, Şentürk, Z, 2018. Electrochemical oxidation of ranitidine at poly(dopamine) modified carbon paste electrode: Its voltammetric determination in pharmaceutical and biological samples based on the enhancement effect of anionic surfactant. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, **273**, 1463–1473.
- Talay Pınar, P, 2018. Electrochemical behaviour of ofloxacin in pharmaceutical and biological samples using a boron-doped diamond electrode in using anionic surfactant. *Gazi University Journal of Science*, **31**, 66-80.
- Temerk, YM, Ibrahim, HSM, Schuhmann, W, 2016. Square wave cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of the anticancer drugs flutamide and

irinotecan in biological fluids using renewable pencil graphite electrodes. *Electroanalysis*, **28**, 372–379.

Yardım, Y, Levent, A, Keskin, E, Şentürk, Z, 2011. Voltammetric behavior of benzo[a]pyrene at boron-doped diamond electrode: A study of its determination by adsorptive transfer stripping voltammetry based on the enhancement effect of anionic surfactant, sodium dodecylsulfate. *Talanta*, **85**, 441-448.

Yıldız, A, Genç, Ö, Bektaş, S, 1997. Enstrümental analiz yöntemleri, 2. baskı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, Ankara.

Wang, J, 2000. Analytical Electrochemistry. Second Edition. John Wiley & Sons., Inc., New York, USA.

Zhang, H, 2004. Fabrication of a single-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode and its application in the electrochemical determination of epirubicin. *Journal of Nanoparticle Research*, **6**, 665–669.