

## Elektro-oksidasyon Prosesi ile Methotrexate Gideriminin Yüzey Yanıt Metodu ile Optimizasyonu

Sibel BARIŞCI\*<sup>1</sup>, Özge TÜRKAY<sup>1</sup>, Anatoli DIMOGLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gebze Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 41400, Kocaeli

<sup>2</sup>Düzce Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 81620, Düzce

(Alınış / Received: 05.09.2017, Kabul / Accepted: 13.02.2018, Online Yayınlanma / Published Online: 25.03.2018)

### Anahtar Kelimeler

Methotrexate,  
Elektro-oksidasyon,  
Yüzey yanıt

**Özet:** Atık sularda bulunan ilaç kalıntıları sucul ortam üzerinde oldukça toksik etkilere sebep olmaları nedeniyle birincil kirleticiler kapsamında değerlendirilmeye başlanmıştır. Atık sularda ve yüzeysel sularda ilaç kalıntılarının konsantrasyonları  $\mu\text{g/L}$  ve  $\text{ng/L}$  gibi çok düşük seviyelerde olmasına rağmen kronik etkileri nedeniyle araştırma yapılmasına gerek duyulmaktadır. Bu toksik kimyasallar, biyo-bozunur olmadıklarından dolayı su ve atık sulardan gidermek için klasik biyolojik arıtma yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden ileri arıtma yöntemlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Özellikle elektrokimyasal arıtma yöntemleri bu tür kimyasalları arıtmak için oldukça başarılı yöntemler olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, Methotrexate (MTX) adlı etken maddenin elektro-oksidasyon yöntemi ile arıtımı çalışılmıştır. MTX uzun yıllardır kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır. Çalışmada,  $\text{Ti/IrO}_2/\text{RuO}_2$  karışık metal oksit elektrotu kullanılmıştır. Optimum çalışma şartlarının belirlenmesi amacıyla yüzey yanıt metodu (YYM) kullanılarak elektro-oksidasyon metodunun MTX giderimi için optimizasyonu yapılmıştır.

## The Optimization of Methotrexate Removal by Electro-oxidation Process Using Response Surface Method

### Keywords

Methotrexate,  
Electro-oxidation,  
Response surface

**Abstract:** The pharmaceutical residuals which are found in the wastewater treatment effluents are evaluated as primary pollutants due to their high toxicity. Although the concentration of pharmaceutical residuals in wastewater and surface water are in low levels like  $\mu\text{g/L}$  and  $\text{ng/L}$  levels, because of their chronic effects the researches should be conducted. Those toxic chemicals, due to their non-biodegradable structure, are not amenable to conventional treatment. Hence, it is very important that advanced oxidation processes have to be developed. Especially electrochemical processes to remove such chemicals have attracted attention as very effective methods. In this study, electro-oxidation of Methotrexate (MTX) has been studied. MTX is a chemical agent which has been used for years in cancer treatment. In the study,  $\text{Ti/IrO}_2/\text{RuO}_2$  mixed metal oxide electrode has been used. With the purpose of determination of optimum operation conditions, the optimization of electro-oxidation method for MTX removal has been conducted by response surface method (RSM).

### 1. Giriş

Farmasötik olarak aktif içerikler öncelikli kirleticiler olarak nitelendirilmektedirler [1]. Bu maddelerin biyolojik aktiviteleri, çok düşük konsantrasyonlarda dahi sucul yaşam üzerinde negatif etkilere neden olmaktadır ve içme suyu kaynaklarında potansiyel etkilere sahip olabilmektedirler [2]. Sitotoksik ilaçlar kemoterapide kullanılan ve bütün organizmalar

üzerinde genotoksik/mutajenik potansiyel etkiye sahip ilaç gruplarındandır. Günümüzde, arıtma tesisleri bu tarz maddelerin gideriminde yetersiz kalmaktadır. Bu maddelerin giderilmesi ve içme suyu sistemlerine karışmasının önlenmesi için etkili arıtım teknolojilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Methotrexate (MTX) kemoterapide kullanılan sitotoksik ilaçlar içerisinde en eskilerden biridir.

\*İlgili yazar: sbarisci@gtu.edu.tr

Kimyasal olarak N-[4-[[[2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino]benzoil]-L-glutamic asit olarak tanımlanmaktadır. MTX'in majör kısmı diamino-pretidin zincirine metilen köprüsü ile bağlı para-metilaminobenzoik asitten oluşmaktadır ve bu kısım amid zinciri ile glutamik asite bağlanmıştır. MTX hastane atık sularında 1 µg/L konsantrasyonlarında görülmüştür [3]. Bununla beraber, üretici atık sularında 200 µg/L'ye kadar çıkmaktadır.

Elektro-oksidasyon oldukça etkili bir arıtma yöntemi olarak farklı atık sularda yaygın olarak çalışılmıştır [4-7]. Birçok farklı elektrotun kullanıldığı elektro-oksidasyon prosesinde, son yıllarda özellikle bor katkılı elmas [8] ve karışık metal oksitler [9] ile organiklerin gideriminde oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Yüzey yanıt metodu (YYM) son zamanlarda, deney sayısının azaltılması ve anlamlı sonuçlar vermesi bakımından yaygın olarak kullanılan istatistiksel analizlere dayanan bir programdır.

Bu çalışmada, MTX'in Ti/IrO<sub>2</sub>/RuO<sub>2</sub> elektrotu kullanılarak elektro-oksidasyonu gerçekleştirilmiş, işletme parametrelerinin etkisi belirlenmiş ve YYM kullanılarak proses optimize edilmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Kimyasallar

Methotrexate (MTX) etken maddesinin standardı European Pharmacopoeia firmasından temin edilmiştir. Elektro-oksidasyon deneyleri boyunca destekleyici elektrolit olarak Sigma Aldrich marka Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmıştır. pH'nın giderim verimine etkisinin incelenmesi için yapılan deneylerde seyreltik (%20'lik) Sigma Aldrich marka H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve NaOH kullanılmıştır.

### 2.2. Elektrokimyasal düzenek

Elektro-oksidasyon deneyleri, kesikli sistem olarak, 500 µg/L başlangıç konsantrasyonunda hazırlanan MTX çözeltileri ile yürütülmüştür. Sentetik olarak hazırlanmış etken madde içeren solüsyon reaktöre doldurulduktan sonra elektrotlar, aradaki mesafe 0,5 cm olacak şekilde reaktöre yerleştirilmiş ve güç kaynağına bağlanmıştır. Anot olarak 2 adet Ti/IrO<sub>2</sub>/RuO<sub>2</sub> elektrotu, katot olarak ise paslanmaz çelik kullanılmıştır ve her bir elektrotun boyutu 5x5 cm'dir. Anotun aktif yüzey alanı, bir başka deyişle solüsyon içerisinde kalan etkin alan, 77,18 cm<sup>2</sup> olarak belirlenmiştir. Reaktör boyutları ise 7,5 x 6,5 x 11 cm ve 350 ml hacindedir. Reaktördeki atık su, karıştırma hızı 120 rpm olacak şekilde manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Akım yoğunluğu uygulanan akımın aktif yüzey alanına bölünmesiyle elde edilmiştir.

## 2.3. Analitik yöntemler

pH ve iletkenlik parametreleri Hach-Lange marka multimetre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. MTX konsantrasyonlarının belirlenmesinde Thermo Scientific TSQ Access Max Ultimate 3000 markalı (Triple Quadrupole) LC/MS/MS (Likit kromatografi-tandem kütle spektrometre) kullanılmıştır. Kromatografik şartlar Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** LC/MS/MS analiz koşulları

Mobil Faz:	%50 Metanol, %50 Amonyum Format (5mM), %0,1 (v/v) formik asit
Akış:	0,2 ml/dk.
Fırın:	40 °C
Basınç:	104 bar
Enjeksiyon Hacmi:	30 µl
Analiz Süresi:	2,01 dk.

## 2.4. Matematiksel ve istatistiksel prosedürler

MTX'in elektro-oksidasyon ile gideriminde, pH, akım yoğunluğu ve zaman gibi işletme parametrelerinin optimizasyonu için yüzey yanıt metodu (YYM) kullanılmıştır. Bu programın kullanılması ile farklı işletme parametrelerinin MTX'in elektro-oksidasyonu üzerindeki etkisini görmek ve bu parametrelerinin bireysel ve sinerjetik olarak etkilerinin incelenmesi ve en yüksek verimi elde etmek için uygun işletme şartların belirlenmesidir. Buna göre, akım yoğunluğu, pH ve zamanın bağımsız değişken; etken madde gideriminin bağımlı değişken olarak kabul edildiği Box-Behnken model analizi kullanılmıştır (A: akım yoğunluğu, B: pH ve C: zaman). Proses parametrelerinin çalışma aralıkları; akım yoğunluğu için 15-45 mA/cm<sup>2</sup>, pH için 4-9 ve zaman için ise 10-30 dakika olarak belirlenmiştir. Giderim verimleri eşitlik 1'de belirtilen ikinci derece polinom eşitliğine uyarlanmıştır:

$$R = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Burada, R tahmin edilen cevap, X<sub>i</sub> and X<sub>j</sub> bağımsız değişkenler, β<sub>0</sub> intersept, β<sub>i</sub> lineer katsayı, β<sub>ii</sub> kuadratik katsayı ve β<sub>ij</sub> etkileşim katsayısını belirtmektedir.

Design expert, versiyon 8.0.4.1 (STAT-EASE Inc., Minneapolis, USA) deneysel parametrelerin dizaynı ve elde edilen verilerin istatistiksel analizi için kullanılmıştır. Varyans analizi (ANOVA) istatistiksel değerlendirme için kullanılmıştır.

## 3. Bulgular

### 3.1. ANOVA analizi ve model oluşturulması

MTX etken maddesinin Ti/IrO<sub>2</sub>-RuO<sub>2</sub> elektrotu kullanılarak gerçekleştirilen elektro-oksidasyonunda, optimum çalışma şartlarının belirlenmesine yönelik

YYM yürütülmüş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 2'de deneylerde kullanılan dizayn parametreleri ve bu şartlara göre elde edilen giderim verimleri görülmektedir.

**Tablo 2.** MTX elektro-oksidasyonu için deney dizaynı ve elde edilen giderim verimleri

DeneySEL dizayn parametreleri			Cevap (giderim verimi)
A: Akım yoğunluğu (mA/cm <sup>2</sup> )	B: pH	C: zaman (dakika)	C/C <sub>0</sub>
15	6,5	1,0	0,795
45	6,5	30,0	0,000944
15	6,5	30,0	0,00148
30	9,0	1,0	0,505
45	6,5	1,0	0,927
30	6,5	15,5	0,0004047
15	4,0	15,5	0,00323
45	4,0	15,5	0,00252
30	4,0	1,0	1,0291
30	6,5	15,5	0,0004043
30	6,5	15,5	0,0004041
30	6,5	15,5	0,000403
30	9,0	30,0	0,000625
30	6,5	15,5	0,0004047
30	4,0	30,0	0,002141
15	9,0	15,5	0,095537
45	9,0	15,5	0,224809

**Tablo 3.** MTX elektro-oksidasyonuna etki eden faktörlerin kuadratik modele uygunluğu ve ANOVA analizi

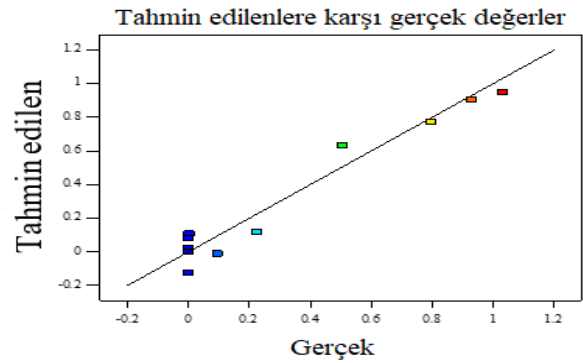
Source	Sum of Squares	F Value	p-value
Model	2,01	16,91	0,0006 (significant)
A-Akım yoğunluğu	8,452E-003	0,64	0,506
B-pH	5,566E-003	0,42	0,5374
C-Zaman	1,32	99,78	< 0,0001
AB	4,224E-003	0,32	0,5898
AC	4,391E-003	0,33	0,5827
BC	0,068	5,16	0,0574
A <sup>2</sup>	0,017	1,30	0,2912
B <sup>2</sup>	1,233E-003	0,093	0,7691
C <sup>2</sup>	0,57	42,76	0,0003
Residual	0,093		
Lack of Fit	0,093		
Pure Error	1,952E-012		
Core total	2,11		

Tablo 3'te görüldüğü üzere, MTX'in elektro-oksidasyonuna etki eden faktörlerin modellenmesi sonucunda elde edilen kuadratik modelin F değeri 16,91 çıkmıştır. F değerinin yanı sıra, p değeri de göz önüne alındığında ("Prob > F" değeri 0,0500'den küçük) modelin anlamlı olduğu görülmektedir. Modelin regresyon katsayısı (R<sup>2</sup>) 0,9560'dır. Modelin

değişkenleri incelendiğinde ise C ve C<sup>2</sup> anlamlı model değerleridir. Regresyon analizi sonucu elde edilen kuadratik denklem aşağıdaki gibidir;

$$\text{Giderim } (C/C_0) = +4.042E - 004 + 0.033A - 0.026B - 0.41C + 0.032AB - 0.033AC + 0.13BC + 0.064A^2 + 0.017B^2 + 0.37C^2 \quad (2)$$

Deney dizaynı kapsamında yürütülen deney sonuçları ile tahmin edilen deney sonuçlarının arasındaki ilişki Şekil 1'de görüldüğü gibidir. Modelin regresyon katsayısının 0,95 olması ile gerçek deney sonuçlarıyla beklenene oldukça yakın sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

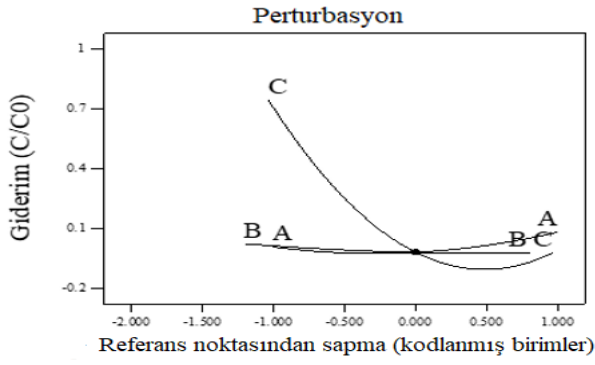


**Şekil 1.** DeneySEL ve tahmin edilen koşulların karşılaştırılması

### 3.2. Modelin grafiksel olarak değerlendirilmesi

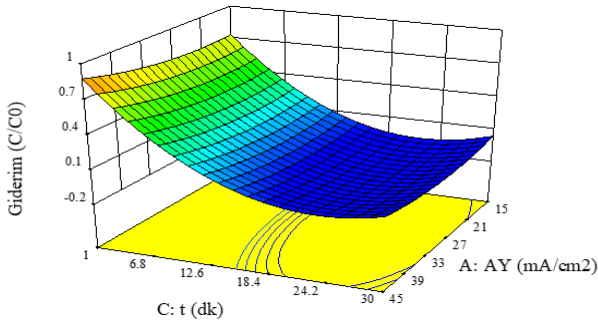
ANOVA analizi sonuçlarından elde edildiği üzere, modelin istatistiksel olarak anlamlı tek parametresi C'dir. Şekil 2'deki grafiğe göre 3 değişkenin kesiştiği noktalar, parametrelerin orta değerlerini ifade etmektedir. Buna göre, reaksiyon zamanı arttıkça giderim verimi artmış ancak belirli bir zamandan sonra reaksiyon süresi artışının verime etkisi olmamıştır. A ve B değişkenlerinin ise yani sırasıyla akım yoğunluğu ve pH değişiminin verim üzerinde çok fazla bir etkisi olmadığı görülmektedir. Akım yoğunluğunun artması, MTX giderimini az bir oranda arttırmıştır. Uygulanan akım yoğunluklarına göre, 30 dakika proses süresi sonunda aynı giderim verimleri elde edilmiştir. Fakat 30 mA/cm<sup>2</sup> akım yoğunluğunda 5 dakika sonunda MTX %99,9 oranında giderilirken, aynı giderim verimine 15 mA/cm<sup>2</sup> akım yoğunluğunda 30 dakika sonunda ulaşılmıştır. Akım yoğunluğunun 45 mA/cm<sup>2</sup> değerine çıkartılması ise giderim verimini arttırmamıştır. Bu durum, anodun artan akım yoğunluğuna bağlı olarak oksit tabakalarının oluşması sonucu pasivizasyonu ve anot yüzeyinde O<sub>2</sub> oluşumunun artması sonucu ortaya çıkabilir.

Şekil 3'te, MTX çözeltisinin başlangıç pH'sının 7 olduğu durumda zaman ve akım yoğunluğunun bütünleşik etkisi görülmektedir. Pertürbasyon eğrisi ve ANOVA analizinden hatırlanacağı gibi, modele göre sisteme etki eden tek parametre C yani zaman olarak elde edilmiştir. ANOVA analizinde de herhangi bir



**Şekil 2.** Seçilen faktörlerin minimum değerden maksimum değere olan değişimi (Perturbasyon Eğrisi) (A: Akım Yoğunluğu=30 mA/cm<sup>2</sup>, B: pH=7, C: Zaman=16 dk)

bütünleşik etkinin (AB, AC, BC) p değeri anlamlı çıkmamıştır. AC bütünleşik etkisi Şekil 3'te örnek olarak sunulmuş, ancak zamanın bireysel etkisi, zeminde yer alan paralel kontür çizgilerinden görülmektedir. Diğer yandan, tek başına zamanın değişiminin giderimi oldukça değiştirdiği eğrinin yapısının görülmektedir ve eğrinin bu trendi her akım yoğunluğu için benzerdir. Bu sebeple, MTX giderimi üzerinde iki bileşenin sinerjetik etkisi olmadığı gözlenmiştir. Diğer bütünleşik etkiler de istatistiksel olarak anlamsız olduğu için grafiklerine yer verilmemiştir.



**Şekil 3.** Zaman ve Akım yoğunluğuna bağlı olarak MTX'in giderim grafiği (DeneySEL koşullar: [MTX]<sub>0</sub>=0,5 mg/L; pH=7) (A: Akım Yoğunluğu; C:Zaman).

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, anti-kanser ilacı olan MTX'in yüksek karahlığa sahip Ti/IrO<sub>2</sub>/RuO<sub>2</sub> elektrotu kullanılarak elektro-oksidasyonu incelenmiştir. Yüzey yanıt metodu (YYM) ile, akım yoğunluğu, pH ve zaman gibi elektro-oksidasyon prosesine etki eden en önemli işletme parametrelerinin ve optimum çalışma değerlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Yürütülen çalışmalar sonucunda MTX giderimi için geliştirilen model anlamlı bulunmuştur (F değeri ve p<0,005). Model değerlerinin bireysel etkisi olarak reaksiyon süresinin MTX gideriminde anlamlı ve en etkili olduğu tespit edilmiştir. MTX 30 dakika proses süresi sonucunda %99,9 oranında giderilmiştir. pH ve akım yoğunluğu değişiminin MTX giderimi üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Ayrıca, MTX giderimi üzerinde pH ve akım yoğunluğu bileşenlerinin sinerjetik etkisi olmadığı gözlenmiştir.

#### Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenen 114Y606 nolu proje kapsamında yapılan çalışmalar sonucu gerçekleştirilmiştir. Proje desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

#### Kaynakça

- [1] Vitaku, E., Smith, D.T., Njardarson, J.T. 2014. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among US FDA approved pharmaceuticals: miniperspective. *Journal of medicinal chemistry*, 57(2014), 10257-10274.
- [2] Fabbri, E., Franzellitti, S. 2016. Human pharmaceuticals in the marine environment: focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(2016), 799-812.
- [3] Aherne, G., English, J., Marks, V. 1985. The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. *Ecotoxicology and environmental safety*, 9(1985), 79-83.
- [4] Hirose, J., Kondo, F., Nakano, T., Kobayashi, T., Hiro, N., Ando, Y., Takenaka, H., Sano, K. 2005. Inactivation of antineoplastics in clinical wastewater by electrolysis. *Chemosphere*, 60(2005). 1018-1024.
- [5] Kobayashi, T., Hirose, J., Sano, K., Kato, R., Ijiri, Y., Takiuchi, H., Tanaka, K., Goto, E., Tamai, H., Nakano, T. 2012. Application of electrolysis for detoxification of an antineoplastic in urine. *Ecotoxicology and environmental safety*, 78(2012), 123-127.
- [6] Pérez, G., Fernández-Alba, A., Urtiaga, A., Ortiz, I. 2010. Electro-oxidation of reverse osmosis concentrates generated in tertiary water treatment. *Water research*, 44(2010), 2763-2772.
- [7] Soni, B., Patel, U., Agrawal, A., Ruparelia, J. 2017. Application of BDD and DSA electrodes for the removal of RB 5 in batch and continuous operation. *Journal of Water Process Engineering*, 17(2017), 11-21.
- [8] Thiam, A., Sirés, I., Garrido, J.A., Rodríguez, R.M., Brillas, E. 2015. Effect of anions on electrochemical degradation of azo dye Carmoisine (Acid Red 14) using a BDD anode and air-diffusion cathode. *Separation and Purification Technology*, 140(2015), 43-52.
- [9] Shestakova, M., Bonete, Gómez, P.R., Sillanpää, M., Tang, W.Z. 2014. Novel Ti/Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SnO<sub>2</sub> electrodes for water electrolysis and electrocatalytic oxidation of organics. *Electrochimica Acta*, 120(2014), 302-307.