



## YALIN CAMSI KARBON ELEKTROT KULLANARAK FARMASÖTİK FORMULASYON VE İNSAN İDRARINDAN KORTİZOLÜN HIZLI KARE DALGA VOLTAMETRİK ANALİZİ

Ertuğrul KESKİN

Adıyaman Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Bölümü, ADIYAMAN  
keskinertugrul@gmail.com

(Geliş/Received: 11.12.2018; Kabul/Accepted in Revised Form: 28.01.2019)

**ÖZ:** Ticari ilaçlardan ve insan idrarından kortizolün direkt tayini için basit, hızlı ve duyarlı bir elektrokimyasal yöntem geliştirildi. Kortizolün elektrokimyasal indirgenmesi ve nicel analizleri, dönüşümlü voltametri (DV) ve kare dalga voltametri (KDV) kullanılarak yalın camsi karbon elektrot (CKE) ile Britton-Robinson tampon çözeltisinde (BRTÇ) ve pH 2,0'de gerçekleştirildi. Kortizol DV'de, tersinmez ve adsorpsiyon kontrollü bir indirgeme piki gösterdi. Adsorptif kare dalga sıyırma voltametri (Ad-KDSV) kullanıldığında bileşik BRTÇ pH 2,0 içinde ve -1,14 V'de (Ag/AgCl'ye karşı) iyi tanımlanmış bir voltametrik yanıt verdi. Deneysel sonuçlar pik akımı ile  $1-50 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $2,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> -  $4 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) derişim aralığında doğrusal bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Gözlenebilirlik sınırı (GS) ve tayin alt sınırı (TAS) sırasıyla  $0,069 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $1,9 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) ve  $0,229 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $6,32 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) olarak saptandı. Geliştirilen yöntemin kesinliği ve doğruluğu, tablet ve idrar numunelerinden yapılan geri kazanım çalışmaları ile kontrol edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Adsorptif kare dalga sıyırma voltametri, Kortizol, Camsi karbon elektrot, Farmasötik formülasyon, İnsan İdrarı

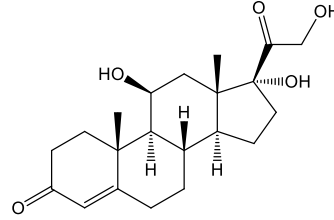
## FAST SQUARE WAVE VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF CORTISOL IN PHARMACEUTICAL FORMULATION AND HUMAN URINE USING THE BARE GLASSY CARBON ELECTRODE

**ABSTRACT:** A simple, fast and sensitive electrochemical method for the direct determination of cortisol in commercial pharmaceutical product and human urine was developed. The electrochemical reduction and quantitative analysis of cortisol were performed in Britton Robinson Buffer Solution (BRBS, pH 2.0) with a bare glassy carbon electrode (GCE) using cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV). The compound showed one irreversible and adsorption-controlled reduction peak in CV. When SWSV mode is used, the compound yielded a well-defined voltammetric response at about -1.14 V (vs. Ag/AgCl) in BRBS at pH 2.0. Experimental results revealed an excellent linear correlation between the peak current and the concentration in the range of  $1-50 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $2.8 \times 10^{-6}$ - $1.4 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>). Detection and quantification limits were found to be  $0.069 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $1.9 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) and  $0.229 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $6.32 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>), respectively. Precision and accuracy of the developed method were checked by recovery studies in spiked tablets and urine.

**Key Words:** Adsorptive square wave stripping voltammetry, Cortisol, Glassy carbon electrode, Pharmaceutical formulation, Human urine

## GİRİŞ (INTRODUCTION)

Kortizol (11, 17, 21-trihidroksi-4-pregnen-3, 20-dion), böbreküstü bezlerince salgılanan glukokortikoid sınıfının en önemli steroid hormonudur. İlaç olarak kullanıldığında hidrokortizon olarak da bilinen bu hormon pek çok hastalığın teşhis ve tanısında biyolojik bir ayıraç işlevindedir (Şekil 1). Bu işlevselliğini kan basıncı, glikoz düzeyi ve karbonhidrat metabolizması gibi çeşitli fizyolojik süreçleri düzenlemesinin yanında kardiyovasküler, bağışıklık, böbrek fonksiyonları, iskelet ve vücut içi dengenin korunması gibi alanlarda da gösterir (Beale ve Block, 2011; Kaushik ve diğ., 2014; Turpeinen ve Hämäläinen, 2013).



Şekil 1. Kortizolün kimyasal yapısı

Figure 1. Chemical structure of cortisol

Kortizol düzeyindeki anormal bir artış, kandaki yağ ve amino grup asit düzeylerinde artışa, inflamasyonun engellenmesine ve bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olur. Bunun sonucunda obezlik, yorgunluk ve kemik erimesi gibi belirtileri olan Cushing hastalığı oluşur. Kortizol düzeyindeki düşüklük ise deri pigmentleşmesinde artış, yorgunluk ve kilo kaybı belirtileriyle kendini gösteren Addison rahatsızlığına yol açar (Hammer ve Stewart, 2006; Newell-Price ve diğ., 2006; Reimondo ve diğ., 2008; Shibli-Rahhal ve diğ., 2006; Whitworth ve diğ., 1995). Bu yüzden vücuttaki kortizol düzeyinin izlenmesi insan sağlığı açısından son derece önemlidir.

Kortizol, beşeri ve hayvansal tıpta çeşitli iltihabi ve anti-alerjik sonuçların tedavisi ile birlikte depresif bozuklukların ve kronik yorgunluğun tanınmasında yaygın kullanılan bir ilaçtır (Edwards ve diğ., 1974; Konieczna ve diğ., 2010). Kortizol içeren topikal kremler ise döküntülerin neden olduğu kaşıntı ve ağrının dindirilmesinde kullanılır. Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) 2008 yılında kortizolü yasaklı maddeler listesine eklemiş ve tedavi amaçlı kullanımı dışında sporcularda kullanımının doping olarak değerlendirileceğini bildirmiştir (Kämäräinen ve diğ., 2018).

İdrardan (Gatti ve diğ., 2005; Sánchez-Guijo ve diğ., 2014), serumdan (Canalis ve diğ., 1979; Kushnir ve diğ., 2004), tükürükten (Bigert ve diğ., 2005; Perogamvros ve diğ., 2009; Sun ve diğ., 2008; Vieira ve diğ., 2014) ve ilaçlardan (Balaji ve diğ., 2008; Goyal ve diğ., 2010) kortizol düzeylerinin belirlenebilmesi, gerek klinik uygulamalarda gerekse rutin analizlerde oldukça önemlidir. Günümüz klinik uygulamalarında, kortizol düzeyi serbest veya protein bağlı fraksiyonların toplamı olan toplam kortizol düzeyi ile ölçülmektedir. Serbest kortizol, biyolojik olarak aktif olan tek fraksiyondur ve vücuttaki tüm kortizolle ilgili faaliyetlerden sorumludur (Canalis ve diğ., 1979). Bu yüzden kortizol ile ilgili durumların teşhisi ve uygun şekilde tedavisi, serbest kortizolün düzenli olarak tahmin edilmesini gerektirir. Biyolojik örneklerden serbest kortizolün belirlenmesinde, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) (Hu ve diğ., 2005; Rouits ve diğ., 2003; Al Sharef ve diğ., 2007; Tang ve diğ., 2000), florimetri (Appel ve diğ., 2005), radyoimmüno test (RIA) (Lee ve Goeger, 1998), sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi (Frerichs ve Tornatore, 2004; Kushnir ve diğ., 2004; Perogamvros ve diğ., 2009) ve immünoelektrokimyasal sensörü de barındıran pek çok analitik yöntem kullanılmıştır (Sun ve diğ., 2008; Vabbina ve diğ., 2015). Bu yöntemlerin pahalı olmalarının yanı sıra karmaşık numune ön işlemleri (ön deriştirme ve/veya saflaştırma aşaması), nitelikli kullanıcı gereksinimi, kapsamlı kimyasal madde tüketimi ve uzun analiz süresi gibi dezavantajları da vardır. Elektrokimyasal yöntemler ise düşük cihaz maliyeti, işlem basitliği ve diğer analitik yöntemlere nazaran matris etkisine karşı daha düşük duyarlılığa sahip olması gibi avantajlarının yanında analizi yapılan maddenin yükseltgenme-indirgenme süreçlerini aydınlatması ile öne çıkar. Ancak kortizol analizinde elektrokimyasal

yöntemlerin kullanıldığı çok az sayıda çalışma mevcuttur. Goyal ve arkadaşları (Goyal ve diğ., 2009) fosfat tamponu pH 7,2'de kortizolün elektrokimyasal davranışlarını dönüşümlü voltametri (DV) ve kare dalga voltametri (KDV) yöntemlerini kullanarak incelemişler ve  $8,8 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> gözlenebilirlik sınırı (GS) düzeyine ulaşmışlardır. Geliştirdikleri bu yöntemi kortizolün ticari ilaç formülasyonunda ve gerçek numune analizinde başarılı bir şekilde kullanmışlardır. Balaji ve arkadaşları, karbon pasta elektrodu (KPE) yalın veya  $\beta$ -siklodekstrin ile modifiye ederek geliştirdikleri yöntemde DV ve diferansiyel puls voltametrisi (DPV) yardımıyla prednisolon, deksametazon ve hidrokortizonun eş zamanlı analizinde kullanmışlardır. GS olarak  $3,7 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> düzeyine ulaşan yöntem, farmasötik ve biyolojik sıvı örneklerinden iyi geri kazanım değerleriyle kortizolün analizinde uygulanmıştır (Balaji ve diğ., 2008). Altın nanoparçacık, çok katmanlı karbon nanotüp ve mikro ölçekteki iyonik sıvıdan oluşan kompozit pasta elektrot (AuNPs / MWCNTs / OPPF) yardımıyla kortizol ve androsteron hormonlarının voltametik tayini Morene ve ark. tarafından tanımlanmıştır (Moreno-Guzmán ve diğ., 2013). KDV yöntemi ile kortizol için oksidasyon pik akımının  $2,76 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> -  $2,76 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal olduğu ve  $4,14 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> GS değerine ulaşıldığı bulunmuştur. Yöntemin uygulanabilirliği sertifikalı kortizol içeren idrar ve serum örneklerinde gösterilmiştir.

Elektrokimyasal analizlerde yükseltgenme-indirgenme süreçleri büyük oranda analizlerde kullanılan elektrot materyaline bağlıdır. Karbon temelli olan elektrotlar düşük zemin akımı, yüksek akım yoğunluğu, hızlı elektron aktarımı ve geniş potansiyel penceresi gibi ayırt edici özellikleri olan yalın veya modifiye edilerek de kullanılabilen elektrot materyalleridir (Van der Linden ve Dieker, 1980; Taylor ve diğ., 2012; Yardım ve diğ., 2013).

Yapılan kaynak araştırmasında kortizolün yalın camı karbon elektrot (CKE) üzerinde elektrokimyasal davranışlarının incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada karbon temelli elektrotlardan biri olan CKE kullanılarak kortizolün elektrokimyasal indirgenme davranışları DV yöntemiyle incelenmiş ve adsorptif kare dalga sıyırma voltametrisi (Ad-KDSV) yöntemi kullanılarak hızlı ve duyarlı elektrokimyasal bir teknik geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem ilaç formülasyonlarından ve idrardan kortizolün saptanmasında başarıyla uygulanmış ve YPSK yöntemiyle elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM (MATERIAL AND METHOD)

### Kimyasallar ve Cihazlar (Chemicals and Apparatus)

Kortizol standardı ve çalışmada kullanılan diğer kimyasallar Sigma Aldrich firmasından temin edildi. Etken maddesi kortizol olan tablet dozaj formlar, yerel ticari eczaneden tedarik edildi. Standart kortizol stok çözeltisi metanol içerisinde  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti amber şişe içerisinde  $4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Daha seyreltik çözeltiler Britton-Robinson (BR) destek elektroliti (pH 2,0-9,0) ile istenilen derişim düzeyine getirildi. YPSK analizlerinde hareketli faz olarak metanol-su (60:40 v/v) karışımı kullanılarak, pH değerleri %85'lik (w/w) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ile 3,0'a ayarlandı. Bütün çözeltiler  $0,45 \mu\text{m}$  membran filtreli Agilent marka vakum filtresinden geçirildi. Mobil faz içinde kortizolün  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  stok çözeltisi hazırlanarak tüm seyreltme işlemleri de mobil faz kullanılarak gerçekleştirildi. Bütün çözeltiler analitik saflıktaki kimyasallarla ve Milli-Q ultra saf su kullanılarak hazırlandı. DV ve Ad-KDSV ölçümleri genel amaçlı elektrokimyasal yazılıma (GPES 4,9) sahip  $\mu\text{Autolab}$  type III elektrokimyasal analizör (EcoChemie, The Netherlands) ile gerçekleştirildi. KD ham voltamogramlarına yazılım içinde bulunan Savitzky-Golay filtresi (düzey 2) ve 0,01 pik genişliğindeki zemin düzeltmesi (moving average) işlemleri uygulandı. Çalışmalar 10 mL hacimli ve üç elektrotlu hücrede gerçekleştirildi. Yardımcı elektrot olarak platin tel (MW-1032, BAS, USA), referans elektrodu olarak Ag/AgCl (3 M NaCl) (BAS Model MF-2052, USA) ve çalışma elektrodu olarak da 3 mm çapında CKE (BAS model MF-2012, USA) kullanıldı. pH ölçümleri için WTW inoLab pH 720 model pH metre kullanıldı. Kromatografik analizler 250 nm'ye ayarlı diyot dizinli dedektörlü (DAD) ve oto örnekleyicili sisteme sahip Agilent 1100 model sistemde gerçekleştirildi. Bu analizlerde Nucleosil C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) kolonu kullanıldı ve ölçümler dakikada 1,0 mL akış hızında gerçekleştirildi.

### **Voltametrik Yöntem (Voltammetric Procedure)**

Voltametrik ölçümler KDV yöntemi ile CKE üzerinde kortizolün biriktirilmesiyle gerçekleştirildi. Kullanım öncesi tersinir elektrot yüzeyi oluşturabilmek için her voltamogram kaydından önce CKE yüzeyine mekanik ön işlem uygulandı. Mekanik ön işlem adımında CKE saf suyla yıkanıp sonrasında suyla bulamaç haline getirilen alüminyum oksit (alümina,  $Al_2O_3$ , çapı:  $0,3 \mu m$ ) süspansiyonu üzerinde dairesel hareketler yapılarak birkaç dakika parlatıldı. Bu işlem sonrasında suyla yıkanıp, temiz ve yumuşak bir kurutma kâğıdı ile kurulandı. Mekanik ön işlem adımı sonrasında elektrot dakikada 500 devirle dönen karıştırıcının olduğu hücreye yerleştirilerek elektrota belirli bir süre gerilim uygulandı. Bu önderiştirme adımı sonrasında karıştırma durduruldu ve tamamen hareketsizliğin sağlanması için 10 s beklendi. Bu aşamanın sonunda ise seçilen voltametrik teknikle negatif doğrultuda gerilim taraması gerçekleştirildi.

### **YPSK Yöntemi (HPLC procedure)**

Kalibrasyon eğrisi  $125 \mu g mL^{-1}$  kortizol stoğundan kolona  $1-70 \mu L$  aralığında eklenmesi ve sonrasında elde edilen kromotogramın pik alanının ölçülmesi yoluyla elde edildi (Aburuz ve diğ., 2003). Standart kortizol derişimleri çalışılan derişim aralığında doğrusal bir yanıt verdi ( $R^2 = 0,9998$ ). Tablet numunelerinin kromotografik analizleri,  $0,45 \mu m$  filtre kâğıdından filtre edildikten sonra gerçekleştirildi. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak tabletteki kortizol içeriği hesaplandı.

### **Gerçek Numunelerin Hazırlanışı (Preparation of Real Samples)**

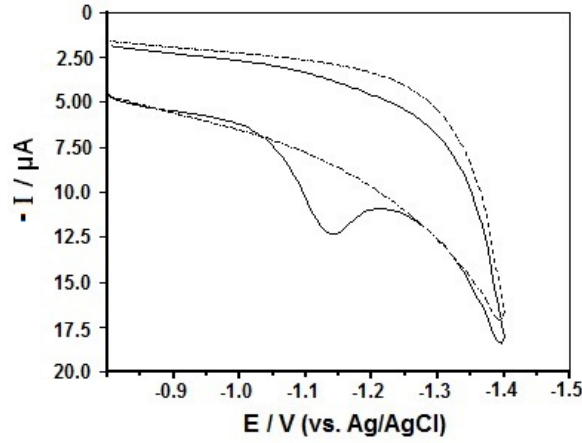
Çalışmalarda her bir tablette 10 mg hidrokortizon (kortizol) içerdiği etiketinde belirtilen Genkort® (Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri, Türkiye) tabletleri kullanıldı. On tablet tartıldı ve her bir tabletin ortalama ağırlığı belirlendi. Sonrasında bir havan içerisinde ezilerek ince bir toz haline getirildi. Oluşan bu tozun belli bir miktarı tartıldı ve 10 mL hacmindeki balon jöjeye aktararak metanolde çözüldü. Bu çözeltiden belirli hacimlerde alınarak içinde BR destek elektrolitinin olduğu hücreye aktarıldı ve daha önceden geliştirilen yöntemle göre analizler gerçekleştirildi. Tablet içeriğindeki kortizolün miktar analizinde standart ekleme yöntemi kullanıldı. YPSK analizleri için, tabletin havadaki tozundan belli bir miktar tartılıp mobil faz içinde hazırlandı. Oluşan çözelti filtre edildi ve daha sonra YPSK cihazına enjekte edildi.

İdrar numuneleri 36 yaşında sağlıklı bir erkekten alındı. 3,0 mL idrar örneğine 1,0 mL stok kortizol çözeltisinden ( $1000 \mu g mL^{-1}$ ) eklendi. Karışım bir dakika karıştırıldı ve oluşan nihai karışımdan  $40 \mu L$  ile  $400 \mu L$  arasında değişen hacimlerde voltametrik hücreye aktararak  $1 \mu g mL^{-1}$  ile  $10 \mu g mL^{-1}$  arasında kortizol standardı içeren idrar numuneleri elde edilmiş oldu. Bağlı geri kazanım değerleri eklenen kortizol derişimleriyle karşılaştırılarak hesaplandı. Voltamogramlar kortizol için önerilen yöntemle göre kaydedildi.

## **SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)**

### **Camsı Karbon Elektrotta Kortizolün Elektrokimyasal Davranışı (Electrochemical Behaviors of Cortisol on GCE)**

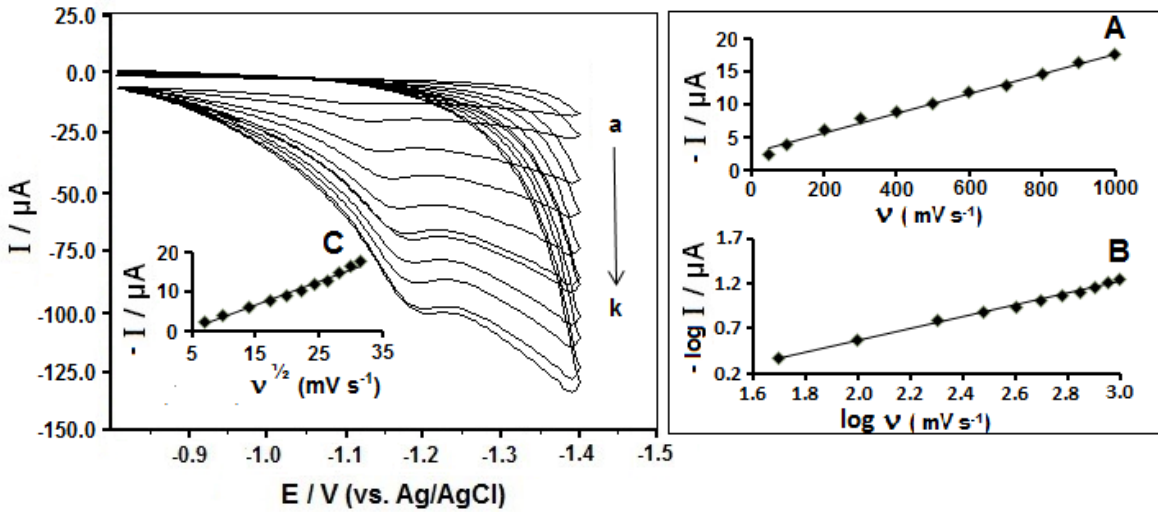
Mekanik ön işlem adımı sonrasında kortizolün elektrokimyasal davranışı DV tekniği kullanılarak incelendi. Şekil 2'de  $50 \mu g mL^{-1}$  ( $1,38 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ ) derişimdeki kortizolün CKE üzerinde, BR pH 2,0 destek elektrolitinde ve  $100 mV s^{-1}$  tarama hızında ( $-0,8 V$  ile  $-1,5 V$  arasında) elektrokimyasal indirgenme piki görülmektedir. Şekilden negatif doğrultudaki taramada kortizolün indirgenme pikinin  $-1166 mV$  potansiyelinde gerçekleştiği ancak çalışılan gerilim aralığında ve ters yöndeki taramada ise herhangi bir yükseltgenme olayını gösteren bir pikin oluşmadığı görülmektedir. Kortizolün CKE üzerindeki bu davranışı, daha önceden farklı elektrot çalışmalarındaki literatür bulgularıyla uyum içinde olduğunu göstermektedir (Balaji ve diğ., 2008; Goyal ve diğ., 2010).



**Şekil 2.** CKE üzerinde  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $1,38 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) kortizolün  $100 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızında ve BRTÇ pH 2,0 destek elektrolitindeki DV'si. Kesikli çizgi: destek elektroliti

*Figure 2.* CV curves of  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  for cortisol at GCE electrode. Electrode, GCE; supporting electrolyte, BRBS (pH 2.0); scan rate:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ ; Dashed lines represent background current

Gerilim tarama hızının ( $v$ ), CKE üzerinde kortizolün indirgenme piki yüksekliğine ( $I_p$ ) etkisi yine DV yöntemi ile incelendi (Şekil 3).  $50$ - $1000 \text{ mV s}^{-1}$  aralığında değişen gerilim tarama hızlarında kortizolün voltamogramları kaydedildi. Pik akımı yükseklikleri ile gerilim tarama hızlarının değişiminin (Eşitlik 1) ve pik akımı yüksekliklerinin logaritması ( $\log I_p$ ) ile tarama hızlarının logaritmasının ( $\log v$ ) değişiminin doğrusal olduğu bulundu (Eşitlik 2). Ancak pik akımı yükseklikleri ile gerilim tarama hızlarının karekökü değişiminde bu doğrusallıktan uzaklaşıldığı gözlemlendi (Eşitlik 3).



**Şekil 3.** CKE'de ve BRTÇ içinde  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  kortizolün ; (a) 50, (b) 100, (c) 200, (d) 300, (e) 400, (f) 500, (g) 600, (h) 700, (i) 800, (j) 900 ve (k)  $1000 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızlarındaki DV'leri. (A) Pik akımına karşı tarama hızı değişimi. (B) Pik akımının logaritmasına karşı tarama hızının logaritmasının değişimi. (C) Pik akımına karşı tarama hızının karekökünün değişimi.

*Figure 3.* CVs of  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  cortisol in BR buffer solution (pH 2.0) at GCE for series of scan rates ( $v$ ): (a) 50, (b) 100, (c) 200, (d) 300, (e) 400, (f) 500, (g) 600, (h) 700, (i) 800, (j) 900 ve (k)  $1000 \text{ mV s}^{-1}$ . (A) Variation of peak current vs. scan rate. (B) Variation of the logarithm of peak current vs. the logarithm of scan rate. (C) Variation of peak current vs. the square root of scan rate.

Yine ikinci eşitliğin eğiminin  $0,7$  civarında olması ( $0,659$ ) elektrot üzerindeki akımın adsorbsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Abdel Gaber ve diğ., 2017; Laviron ve diğ., 1980). İlgili eşitlikler aşağıda gösterilmiştir (Eşitlik (1)-(2)-(3)).

$$I_p (\mu A) = -0,015v (mVs^{-1}) - 2,428 \quad (R^2 = 0,9917) \quad (1)$$

$$\log I_p (\mu A) = -0,659 \log v + 0,753 \quad (R^2 = 0,9966) \quad (2)$$

$$I_p (\mu A) = -0,602\sqrt{v} + 2,577 \quad (R^2 = 0,9839) \quad (3)$$

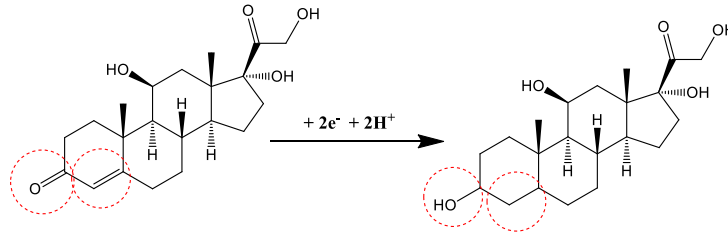
Tarama hızı artışı ile pik potansiyellerinin daha negatif değerlere doğru kaymasının yarı tersinir ve tersinmez sistemlerin tipik davranışları olduğu bilinmektedir (Sochr ve diğ., 2014). Kortizolün pik potansiyellerinin tarama hızının logaritması ile değişimi ilişkisi Eşitlik (4)'te gösterilmiştir.

$$E_p (V) = -0,0566 \log v (mV s^{-1}) - 1,0076 \quad (R^2 = 0,958) \quad (4)$$

Laviron Eşitliği'nin en genel ifadesi olan Eşitlik (5), Eşitlik (4) ile karşılaştırıldığında;

$$E_p = E^0 + (2,303RT/anF) \log(RT\kappa^0/anF) + (2,303RT/anF) \log v \quad (5)$$

Eşitlikteki  $\alpha$ , yük aktarım katsayısı ve n, alınıp verilen elektron sayısıdır. R (8,314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), T (298 K) ve F (96480 C mol<sup>-1</sup>) ise bilinen sabitlerdir. Ep - logv ilişkisindeki eğim değeri -0,0566 'dır. Yukarıdaki eşitlik kullanılarak  $\alpha n$  değeri -1,044 olarak hesaplandı. Tam-tersinmez elektrot olayında pekçok sistem için,  $\alpha = 0,5$  olarak kabul edilebilir. Böylece, n = 2,089 ( $\approx 2$ ) değeri elde edilir. Bu değer, CKE yüzeyinde tersinmez olarak yürüyen kortizol bileşiğinin indirgenmesinde, her molekül için 2 elektron aktarıldığını göstermektedir. Bu bilgiler ışığında kortizol için olası indirgenme mekanizması Şekil 4'te gösterilmiştir.

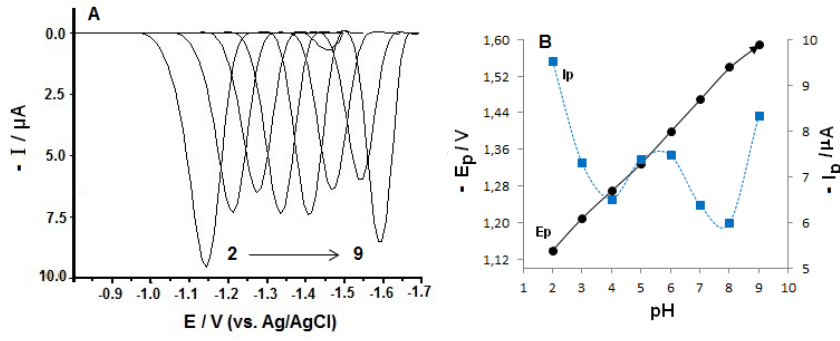


Şekil 4. Kortizol için önerilen elektrokimyasal indirgenme mekanizması

Figure 4. The electrochemical reduction mechanism for cortisol

#### Destek Elektroliti ve pH'nin Elektrokimyasal Yanıt Etkisi (Effect of Support Electrolyte and pH To Electrochemical Response)

Kortizolün elektrokimyasal yanıtı üzerinde BR, asetat ve fosfat gibi farklı destek elektrolitlerinin etkileri pH 2,0'dan pH 7,0'a Ad-KDSV yöntemi ile incelendi. En düşük zemin akımının yanı sıra, tekrarlanabilirlik özelliği, pik morfolojisi ve yüksekliği açısından da en iyi sonuçlar BR desteğinde elde edildiğinden dolayı kortizol analizi için çalışmanın devamında BR desteği kullanılmıştır. Ortam pH'sinin elektrokimyasal yanıt üzerindeki etkisi ise BR pH 2,0 ile pH 9,0 arasında incelenmiştir (Şekil 5A). Kortizol pikinin pH'ye bağlı değişimi, pH'nin bazik bölgeye kaydıca piklerin de daha negatif gerilim bölgelerine kaydığı hem ilgili voltamogram şekillerinden hem de kaymadaki değişimin incelendiği Şekil.5B'den açıkça anlaşılmaktadır. pH değişimi ile gerilimdeki kayma ilişkisinin ( pH 2,0 ve 9,0 arası ) Ep (mV) = -65,1 pH - 1010,6 (r = 0,999) eşitliğiyle gösterilen doğrusal bir eşitliğe sahip olduğu bulunmuştur. Bu doğrunun eğiminin 59 mV değeri civarında olması (çalışmamızda 65,1 bulunmuştur) elektrot reaksiyonuna katılan proton ve elektron sayılarının eşit olduğunu göstermektedir (Materon ve diğ., 2018). En yüksek ve en iyi pik morfolojisine BRTÇ pH 2,0 ortamında ulaşıldığından çalışmaların devamının BRTÇ ortamında ve pH 2,0 de yapılmasına karar verildi.



**Şekil 5.** (A) Açık devre geriliminde ve 60 s biriktirme uygulayarak  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  kortizolün BRTC ortamında ve farklı pH'lerindeki (2-9) KDV'leri. (B) Farklı pH'ler üzerinde pik yüksekliği ve pik geriliminin değişimi. KDV koşulları: frekans: 50 Hz; puls genliği 40 mV, gerilim adımı 10 mV

*Figure 5.* SWVs of  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  cortisol at various pH (2-9) of BRBS on GCE with accumulation time 60 s, at open circuit condition. The effect of pH on the peak current ( $I_p$ ) and peak potential ( $E_p$ ) of cortisol appears in graphs A and B, respectively. SWV conditions: frequency, 50 Hz; scan increment, 10 mV; pulse amplitude, 40 mV

### Biriktirme Değişkenlerinin Etkisi (Effect of Deposition Variables)

DV yöntemiyle elektrot üzerindeki akımın adsorptif karakterli olduğunun belirlenmesi sonrasında voltametrik analizlerin belirli bir gerilimi belirli bir süre boyunca uygulayarak elektrokimyasal yanıtın artırılabilirliği söylenebilir. Ancak en iyi yanıtın hangi biriktirme süresinde ve hangi potansiyelde olduğunun belirlenmesi için optimize edilmesi gerekir. Bu değişkenler optimize edilirken bir tanesi sabit tutulurken diğer değerler değiştirilir ve en iyi yanıtın alındığı değer saptanır. Kortizolün pik akımı üzerine biriktirme süresi optimizasyonu, BR pH 2,0 desteğinde,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) kortizol derişiminde, hücre dakikada 500 devirle dönerken ve sisteme açık devre gerilimi uygulanırken, 0-300 s arasında KDV yöntemiyle incelendi. Pik süresi arttıkça pik akımı da yükseldi. En yüksek pik akımına 60 s de ulaşıldı. Bu süreden sonra elektrot üzerinde biriken kortizol miktarı ve pik şiddeti de azalmaya başladı. Hem analiz süresinin kısa olması hem de en iyi doygunluk değerine 60 s de erişmesi nedeniyle optimum biriktirme süresi 60 s olarak belirlendi.

Biriktirme gerilimi etkisi KDV yöntemiyle ya açık devrede veya -0,2 V ile -1,0 V aralığında, 60 s biriktirme süresinin bu süre ve gerilimler boyunca karıştırıldığı hücrede incelendi. En yüksek ve düzgün pik şekli açık devre geriliminde elde edildiğinden çalışmanın devamı açık devre gerilimi ve 60 s biriktirme süresi uygulanarak gerçekleştirildi.

### Aletsel Değişkenlerin Etkisi (Effect of Instrumental Parameters)

Voltametrik yöntemlerde aletin verdiği yanıtlar, gerek kullanılan yazılımla gerekse aletin sinyal değişkenleri ile önemli oranda değişebilir. Bu nedenle aletin yazılım parametreleri optimize edilerek indirgenme pik akımı ve pikin şeklinde iyileştirmeler sağlanabilir. Bu etkiyi incelemek adına  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) kortizol derişimi içeren BR pH 2,0 ortamında çözeltinin karıştırılarak ve optimum biriktirme değişkenleri uygulanarak frekans ( $f = 25-100 \text{ Hz}$  aralığında), puls genliği ( $E_{sw} = 30-100 \text{ mV}$  aralığında) ve gerilim adımı ( $\Delta E_s = 8-14 \text{ mV}$  aralığında) gibi önemli KDV değişkenlerinin yanıtı olan etkileri incelendi. Bu işlemler, incelenen değişken değiştirilirken diğer değişkenler sabit tutularak ve en iyi yanıtın elde edildiği değer seçilmesi yoluyla gerçekleştirildi. Aynı işlemler sırasıyla diğer değişkenler için de uygulandı ve en iyi yanıtın elde edildiği değerler belirlendi. En iyi pik yüksekliği ve morfolojisi, frekansın 75 Hz, puls genliğinin 60 mV ve gerilim adımının 10 mV olduğu değerler ile elde edildi. Bu yüzden çalışmanın devamı optimize edilen bu aletsel değerler kullanılarak yapıldı. Derişim etkisine kadar optimize edilen değerler Çizelge 1'de özetlenmiştir.

**Çizelge 1.** Ad-KDSV yöntemiyle kortizol için optimize edilen değişkenler.

*Table 1. Optimized parameters for cortisol with Ad-SWSV method*

Değişkenler	Bulgular
Destek Elektroliti	BR
pH	2,0
Biriktirme Süresi	60 s
Biriktirme Gerilimi	Açık devre
Aletsel Değişkenler	
a) Frekans	75 Hz
b) Puls Genliği, $E_{sw}$	60 mV
c) Gerilim Adımı, $\Delta E_s$	10 mV

### Kortizol Derişiminin Etkisi (Influence of Cortisol Concentration)

Geliştirilen yöntemin optimize edilen değerlerinde kortizol için dinamik çalışma aralığı, GS ve TAS farklı derişimlerin pik akımıyla ilişkisi temelinde incelendi. Kortizol,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  ile  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişim aralığında ve  $-1,12 \text{ V}$  gerilim değerinde;

$$I_p (\mu\text{A}) = -0,5689C(\mu\text{g mL}^{-1}) - 11,378 \quad (r = 0,998) \quad (6)$$

eşitliğiyle ifade edilen doğrusal bir artış gösterdi (Eşitlik 6).

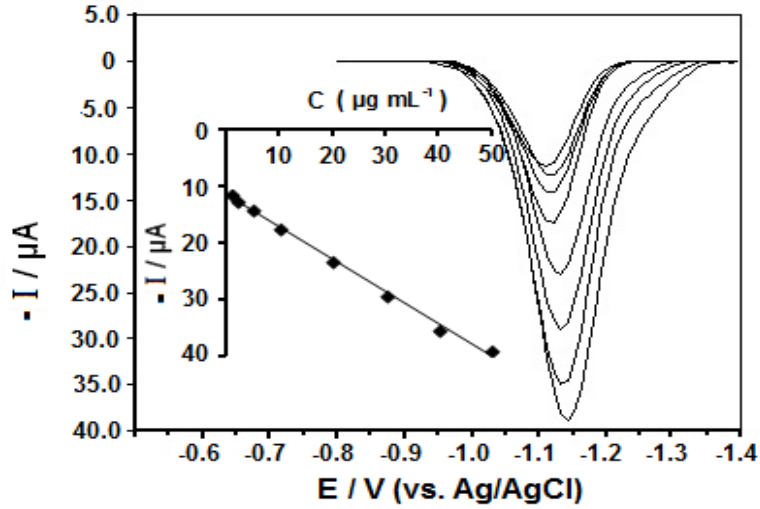
Yöntemin analitik duyarlılığı GS, 3 s/m oranından, TAS ise 10 s/m oranından hesaplanmıştır (Harisha ve diğ., 2019). Orandaki "s", destek elektroliti çözeltisinin zemin çizgisinde okunabilen en küçük altı sinyal gürültüsünün standart sapması, "m" ise kalibrasyon eğrisinin eğimidir. GS ve TAS değerleri sırasıyla  $0,069 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $1,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) ve  $0,229 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $6,32 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) bulunmuştur. Geliştirilen bu yöntemin kortizolün literatürdeki elektrokimyasal analiz yöntemlerini tamamlayan ve hatta yalın elektrot kullanımı ile hız açısından alternatif bir yaklaşım geliştirdiği söylenilebilir (Çizelge 2). Yalın elektrotlarla çalışırken ortamdaki maddelerin elektrot yüzeyini kirletip duyarlılığı ve doğruluğu azaltıcı bir etkisi olduğu ancak elektrot yüzeyinde yapılacak modifikasyonun da uzun ve zahmetli bir takım süreçleri gerektirdiği bilinmektedir (Kozub ve diğ., 2010).  $\beta$ -siklodekstrin modifiye elektrotun kullanıldığı ilk yöntem, bu çalışmada gerçekleştirilen duyarlılıktan daha düşük bir duyarlılığa sahipken diğer iki yöntemin ise daha iyi bir duyarlılığa sahip olduğu görülmektedir. Ancak bu yöntemlerin ise elektrot hazırlama süreçleri açısından CKE'ye göre daha zahmetli olduğu söylenebilir. Yalın CKE ile hızlı, ekonomik ve tatmin edici bir duyarlılığa ulaşan bir yöntem geliştirilmiştir. Önerilen yöntemin kesinliği  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) derişimdeki kortizolün gün içi ( $n=10$ , Şekil 7) ve günler arası ( $n=5$ ) tekraredilebilirliği yapılarak test edildi. Gün içi bağıl standart sapma 2,45 günler arası 4,23 değeri elde edildi.

**Çizelge 2.** Kortizol tayininde önerilen yöntemle literatürdeki yöntemlerin karşılaştırılması

*Table 2. Comparison between the previous literature methods for the determination of cortisol with the proposed method*

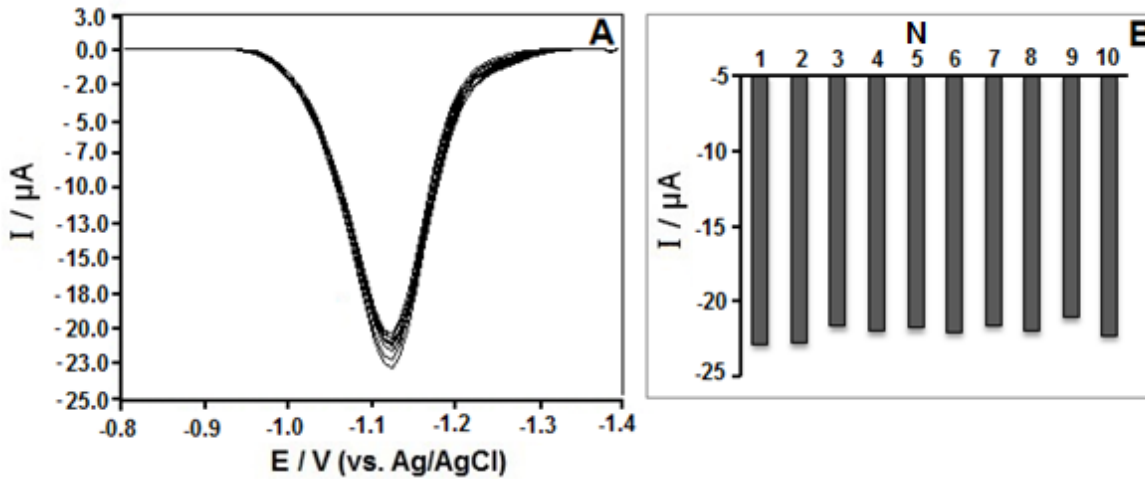
Elektrot	Yöntem	Doğrusal Aralık	GS	Kaynak
$\beta$ -Siklodekstrin modifiye elektrot	DPV	$4,0 \times 10^{-6} \text{ M} - 2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$	$3,7 \times 10^{-7}$	(Balaji ve diğ., 2008)
EPPGE	KDV	$1,0 \times 10^{-7} \text{ M} - 2,0 \times 10^{-6} \text{ M}$	$8,8 \times 10^{-8} \text{ M}$	(Goyal ve diğ., 2010)
Civa Film	Ad-DPV	$2,0 \times 10^{-8} \text{ M} - 1,2 \times 10^{-6} \text{ M}$	$4,8 \times 10^{-9} \text{ M}$	(Smajdor ve diğ., 2015)
CKE	Ad-KDSV	$2,8 \times 10^{-6} \text{ M} - 1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$	$1,9 \times 10^{-7} \text{ M}$	Bu çalışma





**Şekil 6.** BR pH 2,0'da CKE'de kortizolün değişen derişimlerine ( $1 \mu g mL^{-1}$  -  $50 \mu g mL^{-1}$ ) karşılık elde edilen Ad-KDSV'leri. Ad-KDSV koşulları: frekans, 75 Hz; puls genliği, 60 mV; gerilim adımı, 10 mV; biriktirme süresi, 60 s; biriktirme gerilimi, açık devre.

*Figure 6.* Ad-SWSVs obtained for cortisol at varying concentrations ( $1 \mu g mL^{-1}$  -  $50 \mu g mL^{-1}$ ) at the GCE electrode in 0.1 M BR pH 2.0. Ad-SWSV conditions: frequency, 75 Hz; scan increment 10 mV, pulse amplitude, 60 mV; accumulation time, 60 s; accumulation potential, open circuit.



**Şekil 7.** (A).  $5 \mu g mL^{-1}$  kortizolün gün içi tekraredilebilirliği (N=10) için Ad-KDSV'leri (B) Her tekrar için ölçülen akım değerlerinin değişimi. Ad-KDSV koşulları şekil 6 ile aynıdır.

*Figure 7.* Ad-SWSV voltammograms for intraday repeatability of  $5 \mu g mL^{-1}$  cortisol (N=10). (B) Change of measured peak current values for each experiment (N). Ad-SWSV parameters as indicated in Fig. 6.

#### Gerçek Numune Analizleri (Real Sample Analysis)

Elde edilen bulgular ışığında geliştirilen Ad-KDSV yöntemi film kaplı tablet dozaj formlarına herhangi bir numune ekstraksiyonu veya filtrasyon uygulanmadan yeterli seyreltme işlemi uygulandıktan sonra ilgili kalibrasyon eğrisinde yerine konularak miktar analizleri gerçekleştirildi. Ağz yoluyla alınan her bir tablet için etiket bilgilerinde aktif bileşen olarak 10,0 mg kortizol ve inaktif bileşen olarak laktoz, mikrokristal selüloz monohidrat, sodyum nişasta glikolat, povidon, polisorbitat 80, magnezyum stearat ve eritrosin E127 içerdiği bildirilmiştir. Geliştirilen yöntem ile ticari tablet

analizlerinde kortizolün analizi başarıyla uygulandı. Yöntemle hesaplanan değerlerin etikette iddia edilen değerlerle örtüştüğü gözlemlendi.

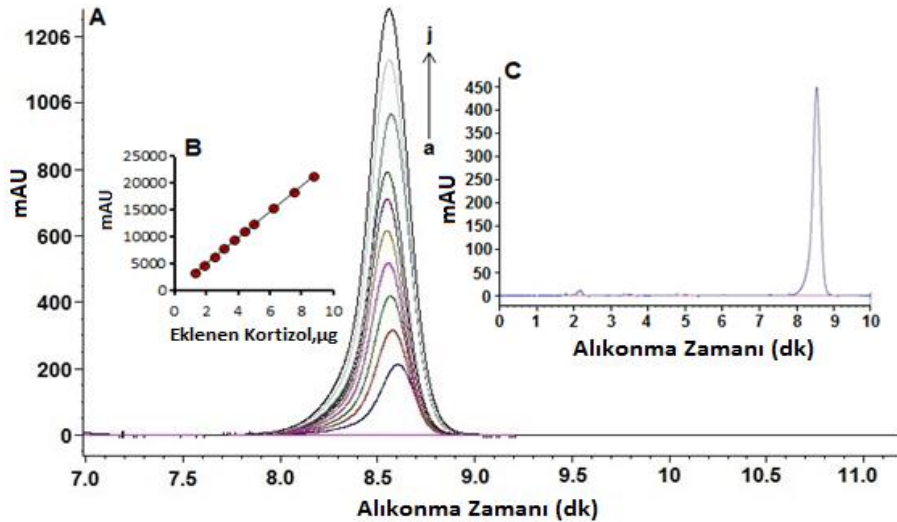
Verilen bir matris içerisinde ilgili analitin geri kazanımı, yöntemin doğruluğunun ölçülmesinde kullanılabilir. Bunu test etmek ve ilahtaki katkı maddelerinin herhangi bir girişim oluşturmadığını test etmek için geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemiyle gerçekleştirildi. Geri kazanım değerleri %97,27 ile %100,44 arasında bulundu.

#### Elektrokimyasal yöntemin YPSK yöntemiyle karşılaştırılması (Comparison of Electrochemical Method with HPLC Methods)

Yapılan analizlerin güvenilirliğini kanıtlamak için voltametrik analizlerden elde edilen veriler YPSK yönteminden elde edilen verilerle mukayese edildi. Bunun için ilaç numunesindeki derişimi kapsayacak şekilde kortizol standartlarından on farklı derişimde çözeltiler hazırlandı ve gözlenen pik alanlarına karşı derişimler grafiğe geçirildi (Şekil 8). Derişimlerle pik alanları arasında

$$y = 2410,8x + 270,21 \quad (R^2 = 0,9998) \quad (7)$$

doğrusal eşitliğine uyan bir ilişki bulundu (Eşitlik 7). Eşitlikteki "y" pik alanı, "x" ise derişimi göstermektedir. Şekil.8C tabletteki kortizolün karakteristik alıkonma zamanındaki (8,537 dk) kromotogramını göstermektedir.



Şekil 8. Standart çözeltiler kromotogramları (A) ve pik alanı ile farklı derişimlerdeki kortizol arasındaki doğrusal ilişki (B) "a" dan "j"ye sırayla 1,25 µg, 1,87 µg, 2,5 µg, 3,125 µg, 3,75 µg, 4,375 µg, 5,0 µg, 6,25 µg, 7,5 µg ve 8,75 µg. Tabletteki kortizolün karakteristik kromotogramı (C) kromotografik koşullar:

Mobil faz; metanol-su (60:40, v/v), akış hızı; 1 mL dk<sup>-1</sup>

Figure 8. The standard solution chromatograms (A) and calibration plot of cortisol at different concentrations (B). The letters a- j correspond to 1.25 µg, 1.87 µg, 2.5 µg, 3.125 µg, 3.75 µg, 4.375 µg, 5.0 µg, 6.5 µg, 7.5 µg and 8.75 µg. (C) Typical chromatogram of cortisol in pharmaceutical drug form. Chromatographic conditions: Mobile Phase; methanol- water (60:40, v/v), flow rate; 1 mL min<sup>-1</sup>

Tabletteki kortizol içeriği 250 nm deki YPSK kromotogramından belirlendi ve tabletin bir gramında bulunan mikrogram kortizol (µg kortizol/g tablet) olarak ifade edildi. Çizelge 3'te gösterildiği gibi önerilen KDV yöntemi ile elde edilen sonuçların ortalaması ile YPSK'den elde edilen değerlerin ortalamaları arasında %5 güven seviyesinde anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

**Çizelge 3.** Ad-KDSV ve YPSK yöntemleriyle elde edilen tablet içeriğindeki kortizol miktarlarının karşılaştırılması

*Table 3. Comparison of cortisol content of tablet obtained by Ad-SWSV and HPLC methods*

<b>İddia Edilen (her tabletteki, mg)</b>	<b>Ad-KDSV ± SS (n=3)</b>	<b>YPSK ± SS (n=3)</b>
10	9,96 ± 0,21	10,20 ± 0,13

Geliştirilen yöntemin kortizolün idrardan tayin edilmesine dönük bir analizde kullanılabilirliği de test edildi. Bunun için standart kortizol çözeltilerinden artan derişimlerde idrara eklemeler yapıldı. Matris etkisini elimine etmek amacıyla işlemlerde standart ekleme yöntemi kullanıldı. Geri kazanım değerleri (%95,99'den %110,31'e değişen) geliştirilen yöntemin yeterli doğruluğa sahip olduğunu ve analiz edilen numunelerde dikkate almayı gerektirecek önemli bir girişim etkisinin olmadığını göstermektedir (Çizelge 4). Bu nedenle geliştirilen yöntemin idrardan kortizol derişiminin nicel olarak belirlenmesinde de kullanılabileceği anlaşılmıştır.

**Çizelge 4.** İdrar numunelerindeki kortizolün ölçüm sonuçları

*Table 4. Measurement results of cortisol in urine samples*

<b>Eklenen ( µg mL<sup>-1</sup> )</b>	<b>Bulunan ( µg mL<sup>-1</sup> )</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>
1,00	0,97	96,75
1,50	1,44	95,99
2,50	2,42	96,84
5,00	5,52	110,31
10,00	9,79	97,87

## SONUÇ

Bu makalede kortizolün doğrudan analizinde yalın ve mekanik olarak işlem görmüş CKE'nin duyarlı bir elektrokimyasal sensör gibi kullanımı gerçekleştirilmiştir. Kortizolün elektrokimyasal davranışı ve miktar analizi sırasıyla DV ve Ad-KDSV yöntemleriyle yürütülmüştür. Önerilen analitiksel yöntem varolan kromatografik yöntemlere göre daha basit, daha hızlı ve daha ekonomiktir. Yöntemle 0,069 µg mL<sup>-1</sup> (1,9×10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>) düzeyine erişen bir GS'ye ulaşılmıştır. Geliştirilen elektrokimyasal yöntemin uygulanabilirliği ticari tablet analizlerinde ve idrar numunelerinde başarıyla gösterilmiştir. Elektrokimyasal yöntemle elde edilen veriler diyot dizinli dedektöre sahip YPSK ile elde edilen verilere karşılaştırılmış ve iki yöntemin de aralarında iyi bir uyum olduğu gösterilmiştir. Yalın CKE'de kortizolün hızlı ve duyarlı analiz edilebilmesi klinik ve tanusal amaçla diğer yöntemlere alternatif olabileceğini kanıtlamıştır.

## KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Abdel Gaber, A.A., Ahmed, S.A., Abdel Rahim, A.M.,2017, "Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of Ribavirin in pharmaceutical dosage form, urine and serum", *Arabian Journal of Chemistry*, King Saud University, Cilt 10, ss.S2175–S2181.
- Aburuz, S., Millership, J., Heaney, L., Mcelnay, J.,2003, "Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges", Cilt 798, ss.193–201.
- Al Sharef, O., Feely, J., Kavanagh, P., Scott, K., Sharma, S.,2007, "An HPLC method for the determination of the free cortisol / cortisone ratio in human urine", *Biomedical Chromatography*, Cilt 21, ss.1201–1206.
- Appel, D., Schmid, R.D., Dragan, C.A., Bureik, M., Urlacher, V.B.,2005, "A fluorimetric assay for cortisol", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Cilt 383, Sayı 2, ss.182–186.
- Balaji, K., Reddy, G.V.R., Reddy, T.M. and Reddy, S.J.,2008, "Determination of prednisolone , dexamethasone and hydrocortisone in pharmaceutical formulations and biological fluid samples

- by voltammetric techniques using  $\beta$ -cyclodextrin modified carbon paste electrode", *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Cilt 2, Sayı 8, ss.157–166.
- Beale, J.M., Block, J.H.,2011, *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic, Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, edited by Troy, D.B., Twelfth Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Bigert, C., Bluhm, G., Theorell, T.,2005, "Saliva cortisol - A new approach in noise research to study stress effects", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Cilt 208, Sayı 3, ss.227–230.
- Canalis, E., Caldarella, A.M., Reardon, G.E.,1979, "Serum Cortisol and 11-Deoxycortisol by Liquid Chromatography : Clinical Studies and Comparison with Radioimmunoassay", *Clinical Chemistry*, Cilt 25, Sayı 10, ss.1700–1703.
- Edwards, O.M., Galley, J.M., Courtenay-Evans, R.J., Hunter, J., Tait, A.D.,1974, "Changes in Cortisol Metabolism Following Rifampicin Therapy", *The Lancet*, Cilt 304, Sayı 7880, ss.549–551.
- Frerichs, V.A., Tornatore, K.M.,2004, "Determination of the glucocorticoids prednisone, prednisolone, dexamethasone, and cortisol in human serum using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Cilt 802, Sayı 2, ss.329–338.
- Gatti, R., Cappellin, E., Zecchin, B., Antonelli, G., Spinella, P., Mantero, F., De Palo, E.F.,2005, "Urinary high performance reverse phase chromatography cortisol and cortisone analyses before and at the end of a race in elite cyclists", *Journal of Chromatography B*, Cilt 824, Sayı 1–2, ss.51–56.
- Goyal, R.N., Chatterjee, S., Rana, A.R.S.,2010, "A comparison of edge- and basal-plane pyrolytic graphite electrodes towards the sensitive determination of hydrocortisone", *Talanta*, Elsevier B.V., Cilt 83, Sayı 1, ss.149–155.
- Goyal, R.N., Gupta, V.K., Chatterjee, S.,2009, "A sensitive voltammetric sensor for determination of synthetic corticosteroid triamcinolone, abused for doping", *Biosensors and Bioelectronics*, Cilt 24, Sayı 12, ss.3562–3568.
- Hammer, F., Stewart, P.M.,2006, "Cortisol metabolism in hypertension", *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, Cilt 20, Sayı 3, ss.337–353.
- Harisha, K. v., Swamy, B. e. K., Ganesh, P. s., Jayadevappa, H.,2019, "Electrochemical oxidation of haematoxylin at poly(alanine) modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Elsevier, Cilt 832, Sayı June 2018, ss.486–492.
- Hu, Z., Gong, Q., Hu, X., Wang, L., Cao, Y., Cao, W., Yu, Q., et al.,2005, "Simultaneous determination of 6B-hydroxycortisol and cortisol in human urine and plasma by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for phenotyping the CYP3A activity", *Journal of Chromatography B*, Cilt 826, Sayı 1–2, ss.238–243.
- Kämäräinen, S., Mäki, M., Tolonen, T., Palleschi, G., Virtanen, V., Micheli, L., Sesay, A.M.,2018, "Disposable electrochemical immunosensor for cortisol determination in human saliva", *Talanta*, Elsevier B.V., Cilt 188, ss.50–57.
- Kaushik, A., Vasudev, A., Arya, S.K., Pasha, S.K., Bhansali, S.,2014, "Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application", *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, Cilt 53, ss.499–512.
- Konieczna, L., Plenis, A., Oldzka, I., Kowalski, P., Bączek, T.,2010, "Simultaneous determination of cortisol, cortisone, and corticosterone in human plasma of parachutists in view of pharmacokinetic studies", *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, Cilt 33, Sayı 18, ss.1613–1629.
- Kozub, B.R., Rees, N. V., Compton, R.G.,2010, "Electrochemical determination of nitrite at a bare glassy carbon electrode; why chemically modify electrodes?", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, Cilt 143, Sayı 2, ss.539–546.
- Kushnir, M.M., Neilson, R., Roberts, W.L., Rockwood, A.L.,2004, "Cortisol and cortisone analysis in serum and plasma by atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry", *Clinical Biochemistry*, Cilt 37, Sayı 5, ss.357–362.
- Laviron, E., Roullier, L., Degrand, C.,1980, "A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes. Part II. Theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Cilt 112, Sayı 1, ss.11–23.

- Lee, C., Goeger, D.E.,1998, "Interference of 6Beta-hydroxycortisol in the quantitation of urinary free cortisol by immunoassay and its elimination by solid phase extraction", *Clinical Biochemistry*, Cilt 31, Sayı 4, ss.229–233.
- Materon, E.M., Wong, A., Fatibello-Filho, O., Faria, R.C.,2018, "Development of a simple electrochemical sensor for the simultaneous detection of anticancer drugs", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Elsevier, Cilt 827, Sayı August, ss.64–72.
- Moreno-Guzmán, M., Agüí, L., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M.,2013, "Gold nanoparticles/carbon nanotubes/ionic liquid microsized paste electrode for the determination of cortisol and androsterone hormones", *Journal of Solid State Electrochemistry*, Cilt 17, Sayı 6, ss.1591–1599.
- Newell-Price, J., Bertagna, X., Grossman, A.B., Nieman, L.K.,2006, "Cushing's syndrome", *Lancet*, Cilt 367, Sayı 9522, ss.1605–1617.
- Perogamvros, I., Owen, L.J., Newell-Price, J., Ray, D.W., Trainer, P.J., Keevil, B.G.,2009, "Simultaneous measurement of cortisol and cortisone in human saliva using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application in basal and stimulated conditions", *Journal of Chromatography B*, Cilt 877, Sayı 29, ss.3771–3775.
- Reimondo, G., Pia, A., Bovio, S., Allasino, B., Daffara, F., Paccotti, P., Borretta, G., et al.,2008, "Laboratory differentiation of Cushing's syndrome", *Clinica Chimica Acta*, Cilt 388, Sayı 1–2, ss.5–14.
- Rouits, E., Boisdron-Celle, M., Morel, A., Gamelin, E.,2003, "Simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of urinary free cortisol and 6beta-hydroxycortisol in routine practice. For CYP 3A4 activity evaluation in basal conditions and after grapefruit juice intake", *Journal of Chromatography B*, Cilt 793, Sayı 2, ss.357–366.
- Sánchez-Guijo, A., Hartmann, M.F., Shi, L., Remer, T., Wudy, S.A.,2014, "Determination of free cortisol and free cortisone in human urine by on-line turbulent flow chromatography coupled to fused-core chromatography-tandem mass spectrometry (TFC-HPLC-MS/MS)", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Cilt 406, Sayı 3, ss.793–801.
- Shibli-Rahhal, A., Van Beek, M., Schlechte, J.A.,2006, "Cushing's syndrome", *Clinics in Dermatology*, Cilt 24, Sayı 4, ss.260–265.
- Smajdor, J., Piech, R., Rumin, M., Paczosa-Bator, B.,2015, "New high sensitive hydrocortisone determination by means of adsorptive stripping voltammetry on renewable mercury film silver based electrode", *Electrochimica Acta*, Elsevier Ltd, Cilt 182, ss.67–72.
- Sochr, J., Cinkova, K., Svorc, L.,2014, "Electrochemical Behaviour Study and Sensitive Determination of Dopamine on Cathodically Pretreated", *Austin J Anal Pharm Chem.*, Cilt 1, Sayı 1, ss.1–7.
- Sun, K., Ramgir, N., Bhansali, S.,2008, "An immunoelectrochemical sensor for salivary cortisol measurement", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, Cilt 133, Sayı 2, ss.533–537.
- Tang, C., Kassahun, K., McIntosh, I.S., Brunner, J., Rodrigues, A.D.,2000, "Simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 b -hydroxycortisol by liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry and its application for estimating hepatic CYP3A induction", *Journal of Chromatography B*, Cilt 742, ss.303–313.
- Taylor, P., Özkan, S.A., Uslu, B., Aboul-enein, H.Y. (n.d.). "Critical Reviews in Analytical Chemistry Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids Using Modern Electroanalytical Techniques Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids Using Modern Electroanalytical", Sayı December 2012, ss.37–41.
- Turpeinen, U., Hämäläinen, E.,2013, "Determination of cortisol in serum, saliva and urine", *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, Elsevier Ltd, Cilt 27, Sayı 6, ss.795–801.
- Vabbina, P.K., Kaushik, A., Pokhrel, N., Bhansali, S., Pala, N.,2015, "Electrochemical cortisol immunosensors based on sonochemically synthesized zinc oxide 1D nanorods and 2D nanoflakes", *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, Cilt 63, ss.124–130.
- Van der Linden, W.E., Dieker, J.W.,1980, "Glassy carbon as electrode material in electro- analytical chemistry", *Analytica Chimica Acta*, Cilt 119, Sayı 1, ss.1–24.

- Vieira, J.G.H., Nakamura, O.H., Carvalho, V.M.,2014, "Determination of cortisol and cortisone in human saliva by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method", *Arq Bras Endocrinol Metab*, Cilt 58, Sayı 8, ss.844–850.
- Whitworth, J.A., Brown, M.A., Kelly, J.J., Williamson, P.M.,1995, "Mechanisms of cortisol-induced hypertension in humans", *Steroids*, Cilt 60, Sayı 1, ss.76–80.
- Yardıı, Y., Keskin, E., Zühre, Ş.,2013, "Talanta Voltammetric determination of mixtures of caffeine and chlorogenic acid in beverage samples using a boron-doped diamond electrode", Cilt 116, ss.1010–1017.