

**L-FENİLALANİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ
BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF MOLECULARLY IMPRINTED
BIOSENSOR FOR L-PHENYLALANINE DETECTION**

NİHAL ERMİŞ

Doç.Dr.LOKMAN UZUN

Danışman

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2013

NİHAL ERMİŞ in hazırladığı '**L-Fenilalanin Tayini İçin Moleküler Baskılanmış Biyosensör Hazırlanması**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**' nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

BaŐkan

(Prof. Dr. Adil DENİZLİ)

ye

(Prof.Dr. Serap ŐENEL)

ye

(Doç.Dr. Handan YAVUZ)

ye

(Doç.Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ)

Danışman

(Doç.Dr. Lokman UZUN)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıŐtir.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Varlığıyla yolumu aydınlatan Annem'e

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

22/07/2013

Nihal ERMİŞ

ÖZET

L-FENİLALANİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

NİHAL ERMİŞ

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Lokman UZUN

Temmuz 2013, 85 sayfa

Fenilalanin (Phe) esansiyel bir aminoasit olup esansiyel olmayan aminoasit tirozin ve türevlerinin metabolik öncüsüdür. Fenilalanin, fenilalanin hidrosilaz enzimi (PAH) varlığında tirozine dönüştürülür. Tirozin, dolayısıyla Phe, protein yapımında, nörotransmitter maddelerin (dopamin, nefrin, norepinefrin) ve tiroid hormonlarının yapımında kullanılır. Bu çalışmada; L-fenilalanin tayinine yönelik moleküler baskılanmış elektrokimyasal biyosensör hazırlanmıştır. Elektrokimyasal biyosensör, kalıp molekül (L-fenilalanin) ve fonksiyonel monomer tiyofen-3-karbonil triptofan varlığında altın elektrot yüzeyinde elektriksel polimerizasyonla hazırlanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, L-fenilalaninle etkileşmesi için uygun yapıda fonksiyonel monomer olarak seçilen tiyofen-3-karbonil-L-triptofan, 3-karboksitiyofen ve L-triptofanın reaksiyona sokulmasıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen tiyofen-3-karbonil-L-triptofan monomeri, NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir. L-fenilalanin baskılanmış sensörün etkinliğinin incelenmesi için farklı derişimlerde L-fenilalanin içeren çözeltiler, elektrokimyasal hücre ile etkileştirilerek L-fenilalaninin sulu ortamdan analizi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan elektrokimyasal sensör, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre, FTIR-ATR ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Ayrıca L-fenilalaninin dönüşümlü voltametri (CV) ve kare dalga voltametri (SWV) teknikleri kullanılarak elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. CV sonuçlarına göre L-fenilalaninin yükseltgenme akımının difüzyon kontrollü olduğu bulunmuştur. Kontrol deneyleri için kalıp molekül L-fenilalanin olmadan, baskılanmamış sensör de hazırlanmıştır. L-Fenilalanin baskılanmış sensörün seçiciliğini göstermek için L-fenilalanin, D-fenilalanin ve triptofan aminoasitlerinin yarışmacı tayini araştırılmıştır. Sonuçlar, baskılanmış sensörün L-fenilalanin için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: L-Fenilalanin, moleküler baskılama, dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal sensör.

ABSTRACT

PREPARATION OF MOLECULARLY IMPRINTED BIOSENSOR FOR L-PHENYLALANINE DETECTION

NIHAL ERMIŞ

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Lokman UZUN

Temmuz 2013, 85 pages

Phenylalanine (Phe) is an essential amino acid and it is the metabolic precursor of non-essential amino acid tyrosine and its derivatives. In the presence of phenylalanine hydroxylase (PAH), phenylalanine is converted into tyrosine. Tyrosine, therefore Phe, is used in synthesizing proteins, neurotransmitter substances (dopamine, naphrine, norepinephrine), and thyroid hormones. In this study, molecularly imprinted electrochemical biosensor was prepared to detect L-phenylalanine. Electrochemical biosensor was prepared in the presence of template (L-Phe) and functional monomer thiophene-3-carbonyl-L-tryptophan on gold electrode surface with electropolymerization. In the first step of the study, thiophene-3-carbonyl-L-tryptophan was synthesized by the reaction of 3-carboxythiophene and L-tryptophan. Synthesized thiophene-3-carbonyl tryptophan monomer was characterized by NMR and FTIR studies. To analyse the activity of L-phenylalanine imprinted sensor, aqueous L-phenylalanine solutions in different concentrations were interacted with electrochemical cell. Prepared electrochemical sensors were characterized with atomic force microscopy (AFM), ellipsometer, FTIR-ATR and contact angle measurements. Electrochemical behaviour of L-phenylalanine was analysed with cyclic voltametry (CV) and square wave voltametry (SWV). According to CV results oxidation current of L-phenylalanine was found to be diffusion controlled. For control experiments, non-imprinted sensor was also prepared in absence of template L-phenylalanine molecules during polymerization. In order to show the selectivity of the L-phenylalanine imprinted electrochemical sensor, competitive detection of L-phenylalanine, D-phenylalanine and L-tryptophan was evaluated. The results showed that the imprinted sensor has high selectivity and sensitivity for L-phenylalanine.

Keywords: L-phenylalanine, molecular imprinting, cyclic voltametry, electrochemical sensor.

TEŞEKKÜR

Biyokimya araştırma grubunun bir parçası olmama müsaade ederek, tez çalışmamın gerçekleşmesi için imkan verip, desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde bilgisi ve deneyimi ile beni yönlendiren tez danışmanım ve değerli hocam Doç. Dr. Lokman Uzun'a,

Deneyimlerini benimle bıkmadan paylaşarak laboratuvar çalışmalarımda yol gösteren, çalışmamın şekillenmesinde desteğini esirgemeyen, her zaman sabırla tüm sorularıma cevap veren sevgili arkadaşım Mehmet Yola'ya,

Çalışmalarımda bana destek olan Esmâ Sarı ve tüm Bioreg üyelerine,

Bu zorlu süreçte manevi desteklerini esirgemedi her zaman yanımda olan Demet Köroğlu, Sabina Hüseyinli ve Necat Tuncalı'ya,

Hayatım boyunca sevgileri ve bana olan inançlarıyla tüm zorlu süreçlerde yanımda olan canım annem Fatma Nur Ermiş'e ve ablam Hilal Ermiş'e,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER	vii
ŞEKİLLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Aminoasit.....	3
2.2. Aminoasit Metabolizması.....	5
2.3. Fenilalanin (Phe)	7
2.4. Fenilalanin Fonksiyonları	7
2.5. Fenilalanin Metabolizması	8
2.6. Fenilalanin Metabolizması Bozuklukları.....	10
2.7. Moleküler Baskılama Teknolojisi	14
2.7.1. Moleküler Baskılama Tekniği.....	16
2.7.1.1. Kalıp Molekül	17
2.7.1.2. Fonksiyonel Monomerler	17
2.7.1.3. Çapraz Bağlayıcılar	19
2.7.1.4. Çözücü	20
2.8. Biyosensörler.....	20
2.9. Elektrokimyasal Sensörler	26
2.9.1. Voltametri	27
2.9.1.1. Dönüşümlü Voltametri	29
2.9.1.2. Adsorpsiyonun CV ile incelenmesi.....	35
2.9.1.3. Kare Dalga Voltametrisi	37
2.9.1.4. Sıyırma Voltametrisi.....	40

2.9.1.5. Kronoamperometri (CA)	42
3. DENEYSEL YÖNTEMLER	44
3.1. Kimyasal Maddeler	44
3.2. L-Fenilalanin Baskılanmış Elektrokimyasal Sensörün Sentezi	44
3.2.1. Tiyofen-3-Karbonil Triptofan Monomerinin Sentezi	44
3.2.2. Tiyofen-3-Karbonil-L-Triptofan Monomerinin Karakterizasyonu	44
3.2.2.1. FTIR Analizi	44
3.2.2.2. NMR Analizi	45
3.3. Elektrokimyasal Sensörün Hazırlanması	45
3.3.1. Kalıp Molekülün Desorpsiyonu	45
3.4. L-Fenilalaninin Elektrokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	46
3.4.1. Dönüşümlü Voltametri Deneyleri	46
3.4.2. Kronoamperometri Deneyleri	46
3.5. Elektrokimyasal Sensörün Karakterizasyonu	46
3.5.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi	46
3.5.2. Atomik Kuvvet Mikroskopisi	46
3.5.3. Elipsometre	47
3.5.4. Temas Açısı Ölçümleri	47
3.6. Elektrokimyasal Sensörle Kinetik Analizler	47
3.7. Yarışmalı Kinetik Analizler	49
3.8. Elektrokimyasal Sensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi	49
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	50
4.1. TP3C-Trp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	50
4.2. Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu	53
4.2.1. FTIR Analizi	53
4.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi	53
4.2.3. Elipsometre Analizi	55
4.2.4. Temas Açısı Analizi	55
4.3. L-Fenilalaninin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	58
4.3.1. Akım Karakterinin İncelenmesi	58
4.3.2. Elektrot Tepkimesinin İncelenmesi	59
4.3.3. Proton ve Aktarılan Elektron Sayısının Bulunması	59
4.3.4. Difüzyon Katsayısının Bulunması	62
4.4. Elektrokimyasal Sensörle Kinetik Analizler	63

4.5. Denge İzoterm Modelleri.....	68
4.6. Yarışmalı Kinetik Analizler	71
4.7. Biyosensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi	72
5.YORUM	75
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	85

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. L-Phe'nin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri	7
Çizelge 2.2. Plazma fenilalanin seviyeleri ve hastalık ilişkileri	11
Çizelge 4.1. Atomik kuvvet mikroskop sonuçları	55
Çizelge 4.2. L-Fenilalaninin (50.00 ng/mL; pH 7.0, fosfat) CA yöntemiyle hesaplanan difüzyon katsayıları.	63
Çizelge 4.3. L-Fenilalanin baskılanmış sensörle elde edilen derişime karşı akım grafiğinin özellikleri (n = 6).....	67
Çizelge 4.4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri	71

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Aminoasit yapısı.....	3
Şekil 2.2. Amino asitlerin yapısı ve gruplandırılması	4
Şekil 2.3. Amino asitlerin farklı pH'larda molekül yapıları ve yük değişimi.....	5
Şekil 2.4. Amino asit metabolizmasının şematik olarak özetlenmesi	6
Şekil 2.5. Fenilalaninin tirozine çevriminde tetrahidrobiyopterin dönüşümü.....	8
Şekil 2.6. Sağlıklı bireyde fenilalaninin metabolik yolları.....	9
Şekil 2.7. Fenilketonurili bireylerde fenilalanin metabolizmasının şematik gösterimi.	10
Şekil 2.8. Moleküler baskılanmış polimerlerin sentez basamakları.....	16
Şekil 2.9. Moleküler baskılamada sık kullanılan fonksiyonel monomerler.	18
Şekil 2.10. Moleküler baskılamada sık kullanılan çapraz bağlayıcılar.	20
Şekil 2.11. Bir biyosensörün bileşenleri ve çalışma mekanizması.	21
Şekil 2.12. 1980- 2013 yılları arasında biyosensörlerle ilgili yayın sayıları.....	22
Şekil 2.13. Bir QCM sensör yüzeyinin görüntüsü.....	23
Şekil 2.14. Bir SPR sensörün çalışma prensibi.....	24
Şekil 2.15. Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.	25
Şekil 2.16. Doğru akım polarogramları (a) Elektroaktif maddenin polarogramı, (b) Destek elektrolit polarogramı.	28
Şekil 2.17. Doğrusal taramalı ve dönüşümlü voltametri tekniklerinde potansiyel taramasının zamanla değişimi.	30
Şekil 2.18. Tersinir bir sisteme ait CV voltamogramı.	32
Şekil 2.19. Tersinmez bir elektrot reaksiyonunda CV ile farklı tarama hızlarında anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması. v; a) 0,13 V/s b)1,3 V/s c) 4 V/s d) 13 V/s.....	34
Şekil 2.20. Dönüşümlü voltametrde pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi.	35
Şekil 2.21. (A) Reaktantın kuvvetli adsorpsiyonunda ve (B) ürünün kuvvetli adsorpsiyonunda gözlenen dönüşümlü voltamogramları.....	36
Şekil 2.22. Kare dalga voltametrisi için potansiyel-zaman dalga şekli ve akım ölçümü; ΔE_s : adım yüksekliği, E_{sw} : puls genliği, τ : periyot.....	38

Şekil 2.23. Tersinir bir reaksiyon için uyarma sinyaline akım cevabı, A, (I_1) ileri akım; B, (I_2) ters akım; C, ($I_1 - I_2$) akım farkı.....	39
Şekil 2.24. Kronoamperometride (a) potansiyel–zaman ve (b) akım-zaman ilişkisi	43
Şekil 3.1. Hücre sistemi (solda) ve hücre sisteminin bağlı olduğu, verilerin okunduğu potansiyostat cihazı (sağda).....	48
Şekil 4.1. TP3C-Trp monomerinin sentez reaksiyonu.	50
Şekil 4.2. TP3C-Trp monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.	51
Şekil 4.3. TP3C-Trp monomerinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu.	52
Şekil 4.4. TP3C-Trp monomerinin FTIR spektrumu.....	52
Şekil 4.5. L-Fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyine ait FTIR-ATR spektrumu. .	53
Şekil 4.6. L-Fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyine ait AFM görüntüleri. (A) Altın yüzey; (B) Altın yüzey 3-boyutlu; (C) L-Fenilalanin baskılanmış polimer; (D) L-Fenilalanin baskılanmış polimer 3-boyutlu.	54
Şekil 4.7. L-Fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyine ait elipsometre görüntüleri.	56
Şekil 4.8. Temas açısı ölçümleri. (A) Modifiye edilmemiş altın yüzey ve (B) L-fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyi.	57
Şekil 4.9. 1.0×10^{-6} M L-fenilalaninin (pH 7.0, fosfat) farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları.(A) 25 mV/s; (B) 50 mV/s; (C) 75 mV/s; (D) 100 mV/s; (E) 200 mV/s; (F) 300 mV/s; (G) 400 mV/s; (H) 500 mV/s; (I) 1000 mV/s.	58
Şekil 4.10. 1.0×10^{-6} M L-fenilalaninin (pH 7.0, fosfat) $\log I_{pa} - \log V$ grafiği	59
Şekil 4.11. L-Fenilalaninin (50 ng/mL; pH 7.0, fosfat) SWV voltamogramlarına ait pH- E_p grafiği.	60
Şekil 4.12. L-Fenilalaninin olası yükseltgenme mekanizması.....	60
Şekil 4.13. Destek elektrolit pH'sının L-fenilalanin yükseltgenme akımına etkisi. .	62
Şekil 4.14. L-Fenilalaninin (50.00 ng/mL; pH 7.0, fosfat) kronoamperometri (CA) voltamogramı ($i - t^{-1/2}$).	63
Şekil 4.15. L-Fenilalanin baskılanmış elektrokimyasal sensörle L-fenilalanin çözeltileri arasındaki etkileşimlere ait kare dalga voltamogramları. (A) 0.01 nM; (B) 0.05 nM; (C) 0.1 nM; (D) 0.2 nM; (E) 0.5 nM.	64
Şekil 4.16. L-Fenilalanin çözeltileri (pH 7.0, fosfat) ile elektrokimyasal sensör arasındaki etkileşimlere ait voltamogramlar.....	66
Şekil 4.17. L-Fenilalanin baskılanmış elektrokimyasal sensöre ait derişim ile ΔI arasındaki ilişki.	67

Şekil 4.18. Adsorpsiyon modelleri. (A) Langmuir; (B) Freundlich; (C) Langmuir-Freundlich modelleri.	69
Şekil 4.19. Seçicilik deneyleri. L-Fenilalanin baskılanmış sensör ile analit (L-fenilalanin, D-fenilalanin ve L-triptofan) arasındaki etkileşimlere ait voltamogramlar. Analit derişimi: 50 ng/mL, pH: 7.0, fosfat.	72
Şekil 4.20. Seçicilik deneyleri. Baskılanmamış sensör ile analit (L-fenilalanin, D-fenilalanin ve L-triptofan) arasındaki etkileşimlere ait voltamogramlar. Analit derişimi: 50 ng/mL, pH: 7.0, fosfat.	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	Elektrodun yüzey alanı, cm^2
D	Difüzyon katsayısı, cm^2/s
i_p	Pik akımı, (A)
n	Aktarılan elektron sayısı, (eq/mol)
F	Faraday sabiti, (C/eq)
I_d	Difüzyon akımı, (A)
E_p	Pik potansiyeli, (V)
$E_{p/2}$	Yarı pik potansiyeli, (V)
R	İdeal gaz sabiti, (J/K mol)
T	Sıcaklık, (K)
Γ	Elektrot yüzeyine adsorbe olan madde miktarı, (mol/cm^2)
π	Pi sayısı, (3,14)
v	Tarama hızı (V/S), (mV/S)
E_{p_a}	Anodik pik potansiyeli, (V)
E_{p_k}	Katodik pik akımı, (V)
I_p	Akım yoğunluğu, (A/cm^2)
ΔE_S	Basamaklı adım yüksekliği, (SWV), (V)

Kısaltmalar

Phe	Fenilalanin
CV	Dönüşümlü Voltametri
SWV	Kare Dalga Voltametri
CA	Kronoamperometri
CV	Dönüşümlü Voltametri
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
LSV	Doğrusal Taramalı Voltametri
M	Molar
mM	Milimolar

1. GİRİŞ

Fenilalanin (Phe) esansiyel bir aminoasit olup esansiyel olmayan aminoasit tirozin ve türevlerinin metabolik öncülüdür. Fenilalanin, fenilalanin hidroksilaz enzimi varlığında tirozine dönüştürülür. Tirozin, dolayısıyla Phe protein yapımında, nörotransmitter maddelerin (dopamin, nefrin, norepinefrin) ve tiroid hormonlarının yapımında kullanılır. Moleküler yapısında bulunan aromatik grup nedeniyle hidrofobik özellik gösterir ve polar olmayan amino asitler sınıfındadır. L-Fenilalanin ayrıca ilaç sanayinde ve gıda sanayinde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır [1]. Gıda sanayinde dipeptit tatlandırıcı olan α -aspartam yapımında kullanılan L-fenilalanin; basitrasin, gramisidin, tirosidin gibi bazı antibiyotiklerin yapımında kullanılmaktadır [2].

Hiperfenilalaninemiler (HPA), fenilalanin hidroksilaz (EC 1.14.16.1) enzimini oluşturan gende meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan metabolik bozukluklardır [3]. Fenilketonuriyi (PKU) de kapsayan HPA aminoasit metabolizması bozukluğuna bağlı en yaygın hastalıktır. PKU'da karaciğerde fenilalanin hidroksilaz enziminin aktivitesinin eksikliğine bağlı olarak Phe'den tirozin sentezi gerçekleşemez. Bu da kanda fenilalanin ve metabolitlerinin birikimine yol açar [4]. Hastalık eğer erken tespit edilip tedavi edilmezse PKU nörolojik fonksiyon bozukluklarına, ağır davranış bozukluklarına, otizm ve egzamaya yol açar. Erken tedavi ile hastalığın birçok etkisi bertaraf edilebilir [5]. Tüm bu nedenlerden dolayı L-fenilalaninin moleküler tanınması ve tayini son derece önemlidir.

Moleküler baskılama teknolojisi belirli bir analite seçiciliği ve özgüllüğü olan yapay reseptörlerin tasarlanmasını kapsar. Bu kapsamda istenilen analitin eşleniğini içeren çapraz bağlı polimerik yapılar oluşturma işlemine moleküler baskılama denir [6]. Elektrokimyasal dönüştürücülerden oluşmuş biyomimetik sensörler ve moleküler baskılanmış polimerler gitgide dikkat çeken ve daha sık kullanılan sensörler haline gelmiştir. Elektrokimyasal sensörler, basitliği, uygun maliyeti ve kısa sürede sinyal verebilme özellikleri nedeniyle sensörler içerisinde sık kullanılan bir sensördür [7]. Elektrokimyasal sensörler besin analizi, klinik analiz ve çevresel

görüntüleme gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Elektrokimyasal sensörün teorisi çip yüzeyinde etkileşim sonucu değişen akımın ölçülmesine dayanmaktadır [8].

Bu çalışma L-fenilalanin miktarının belirlenmesi için moleküler baskılama yöntemiyle elektrokimyasal sensörlerin hazırlanması ve elektrokimyasal sensör yüzeyinde L-fenilalanin baskılanmış polimer hazırlanarak L-fenilalaninin basit, yüksek hassasiyetli ve seçici tayininin sağlanmasını içerir. Bu çalışma kapsamında L-fenilalanin tayinine yönelik moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensör hazırlanmış ve L-fenilalanin baskılanmış sensörün etkinliğinin incelenmesi için farklı derişimlerde L-fenilalanin içeren çözeltiler elektrokimyasal hücre ile etkileştirilerek L-fenilalaninin sulu ortamdan analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda çalışma; 3 ana başlık altında gerçekleştirilmiştir.

i. Uygun yapıda fonksiyonel monomer olarak tiyofen-3-karbonil-L-triptofan, 3-karboksitiyofen ve L-triptofanın reaksiyonu ile sentezlenerek NMR ve FTIR ölçümleriyle karakterize edilmiştir.

ii. Sensör yüzeyleri hazırlanmış, karakterize edilmiş ve kinetik-afinite sabitleri belirlenmiştir.

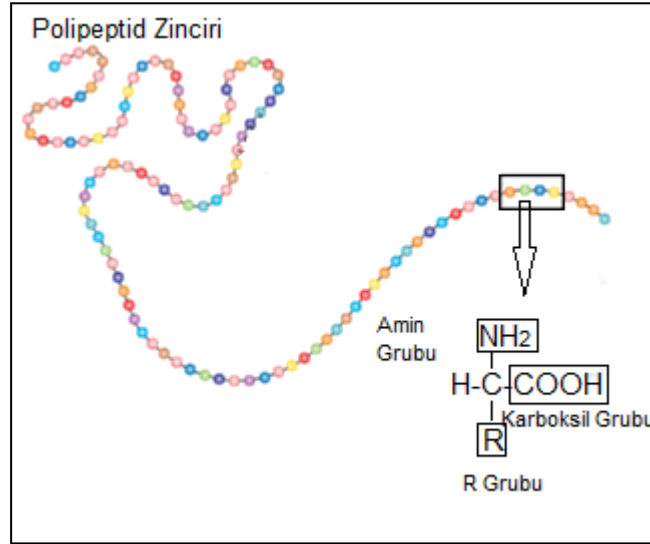
iii. Sensörün kararlılığı, seçiciliği ve özgüllüğü belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aminoasit

Atmosferde %78 oranında bulunan azot tüm proteinlerin, nükleik asitlerin temelini oluşturması sebebiyle canlılar için önemli bir maddedir. Canlılar için önemli olmasına rağmen azot çok az organizma tarafından atmosferde bulunduğu N_2 , NO ve N_2O gibi atmosferik gaz ürünleri halinde kullanılabilir. Atmosferdeki azotun diğer canlılar tarafından kullanılabilir hale gelmesinde önemli rolü olan mikroorganizmalar (*Pseudomonos*, *Bacillus*, *Streptomyces*...) azotu fikse ederek diğer canlılar tarafından kullanılabilir NH_4^+ , NO_3^- veya NO_2^- formlarına dönüştürürler [9].

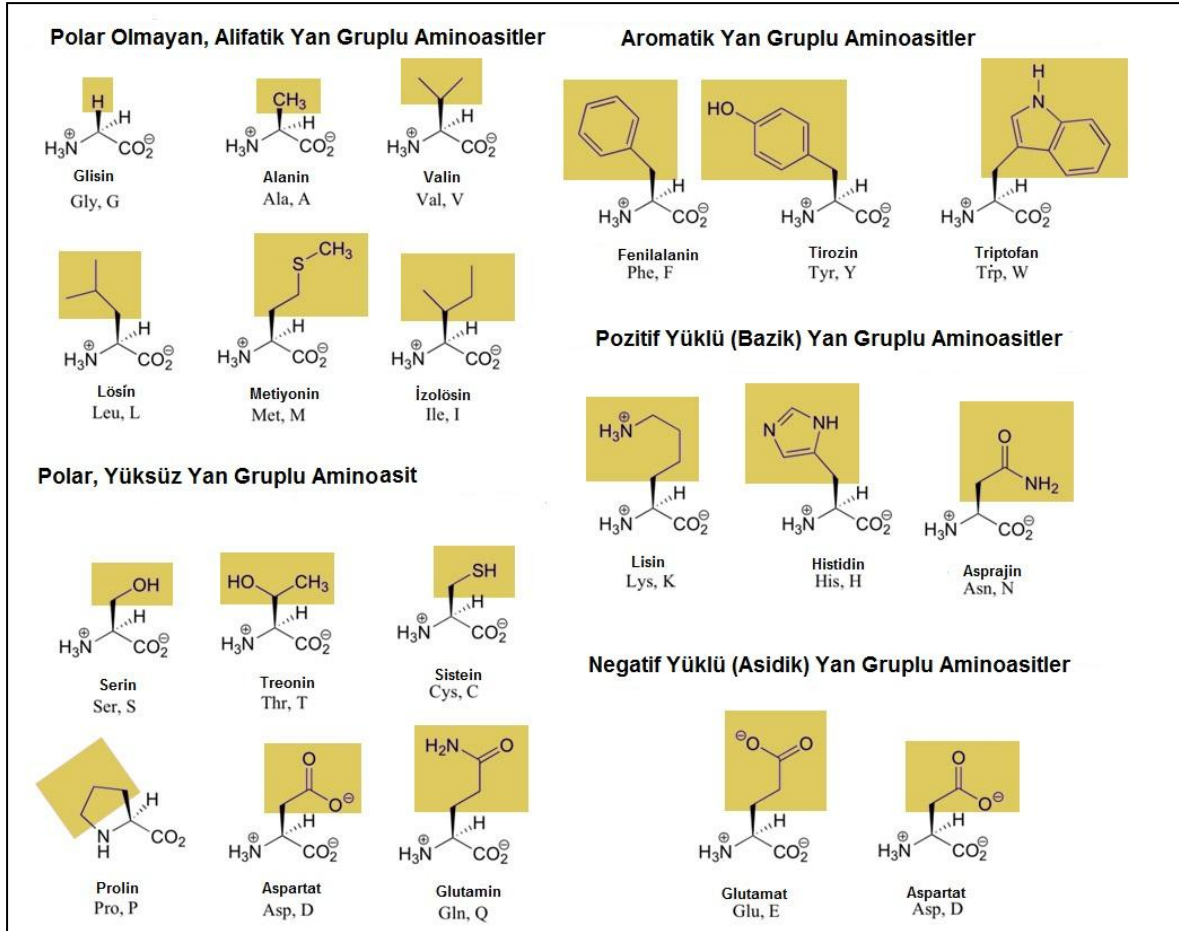
Canlılar için azot kaynağı olan amino asitler proteinlerin yapı taşlarıdır. Bir amino asitin yapısında karbon atomuna bağlı bir amino grubu, bir karboksil grubu ve bir de R grubu bulunur. Bu R grubunda hidrofilik veya hidrofobik yapılar bulunmaktadır. R grubu asidik, nötral veya bazik; alifatik veya aromatik olup, amino asitin özelliğini belirler [10].



Şekil 2.1. Aminoasit yapısı.

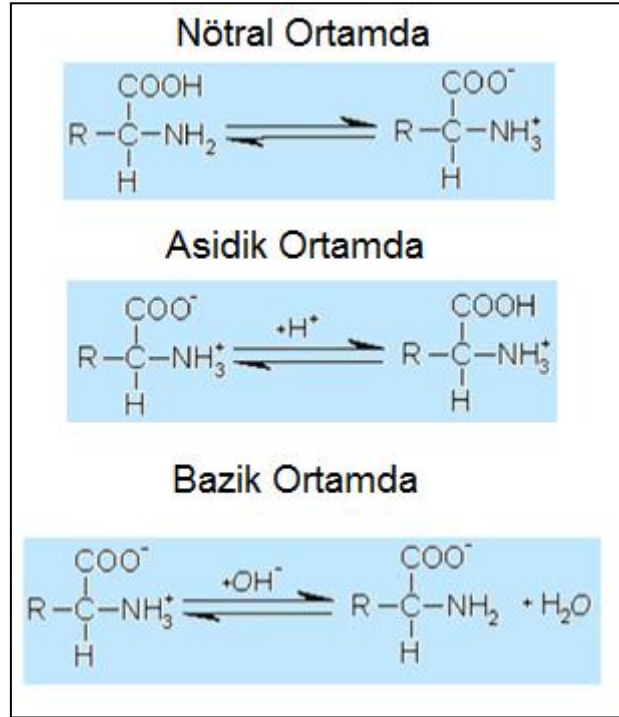
R grupları etkisiyle farklılaşan amino asitler dört ana gruba ayrılırlar.

- Polar olmayan (nonpolar) veya hidrofobik R grubuna sahip aminoasitler,
- Nötral (yüksüz) polar R grubuna sahip aminoasitler,
- Pozitif yüklü (bazik) R grubuna sahip aminoasitler,
- Negatif yüklü (asidik) R grubuna sahip aminoasitler.



Şekil 2.2. Amino asitlerin yapısı ve gruplandırılması [59].

Amino asitlerin asimetric α -C atomu doğada L- ve D- şeklinde iki stereozomer halinde bulunmalarını sağlar. DNA tarafından kodlanarak protein yapısına giren 20 amino asitin hepsi L- amino asittir [10]. Amino asitler yapılarında iyonlaşabilen gruplar bulduklarından pH'ı nötral olan bir sulu çözültide dipolar iyon yapısı gösterirler. Ayrıca buldukları çözültinin pH'sına göre iyonlaşarak yüklerini değiştirirler. Her aminoasitin yüksüz olduğu bir pH söz konusudur. Bu pH'ya o aminoasitin izoelektrik noktası denir. Bu noktada aminoasitler iç tuz oluştururken asidik ortamda katyonik, bazik ortamda ise anyonik halde bulunurlar.



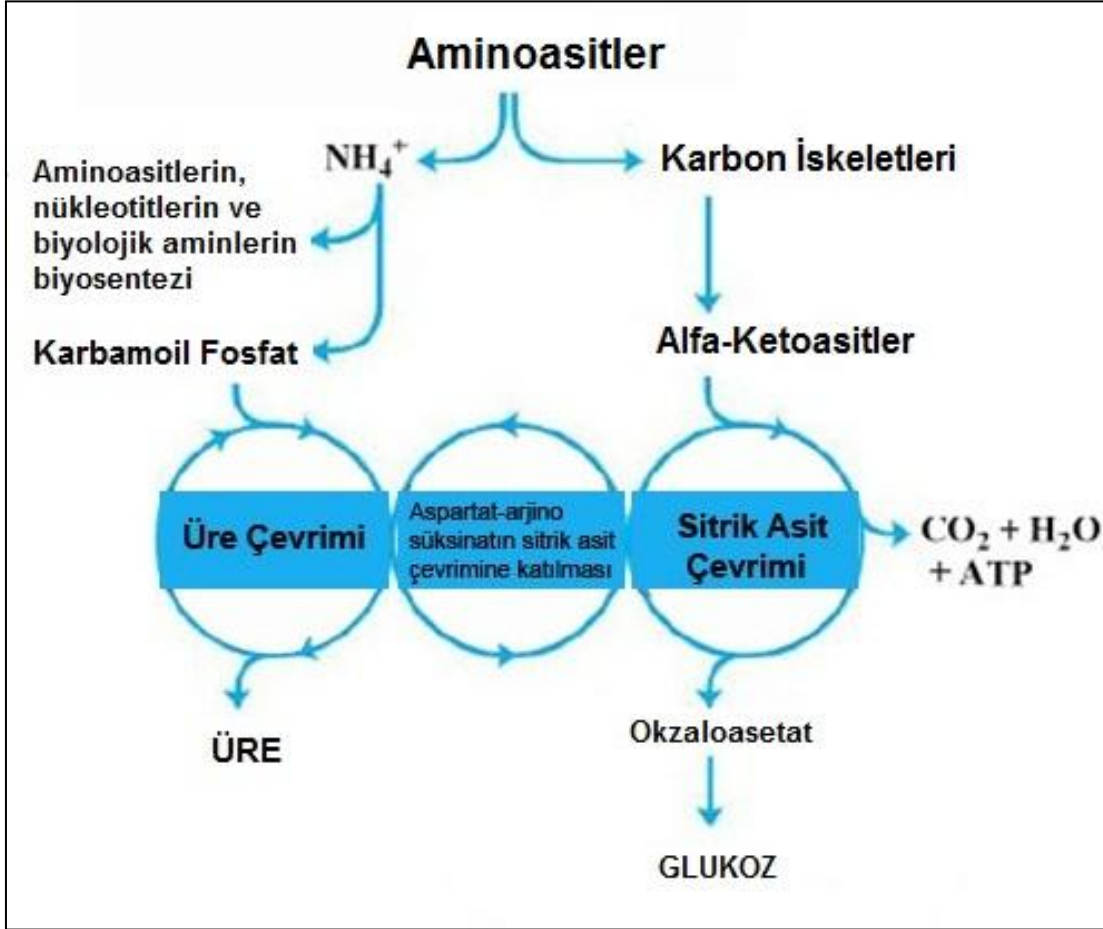
Şekil 2.3. Amino asitlerin farklı pH'larda molekül yapıları ve yük değişimi.

Hücreler tarafından sentezlenen amino asitler, hücrede protein ve enzim sentezlerinde monomer olarak kullanılırlar. İnsan vücudu birçok amino asiti kendi sentezleyebilirken bazı amino asitleri sentezleyemez. Bu aminoasitlerin gıda yoluyla alınması gerekir. Böyle amino asitlere esansiyel amino asitler denir. L-fenilalaninin de bu esansiyel (endojen) aminoasitlerden biridir.

2.2. Aminoasit Metabolizması

Omurgalılarda diyet yoluyla vücuda alınan proteinlerin sindirimi sonucu ya da açlık durumu olduğunda vücudun protein deposu olan kasların yıkılmasıyla elde edilen aminoasitler vücuttaki amino gruplarının kaynağını teşkil eder. Bu yollarla elde edilen aminoasitlerin oksidasyonu, enerji elde edilmesini sağlar. Oksidasyonda aminoasitlerin karbon iskeletlerinin ve amino gruplarının katabolizma yolları farklıdır. Karaciğere gelen aminoasitlerin amino grupları aminotransferazlar veya transaminazlar tarafından uzaklaştırılır. Bu deaminasyon reaksiyonları sonucu amonyak oluşur. Oluşan amonyak ya başka reaksiyonlarda kullanılır ya da üreye çevrilerek zararsız hale getirilir. Bu şekilde gerçekleşen transaminasyon tepkimeleri esnasında aminoasidin α -amino grupları

uzaklaştırılırken α -keto asit analogu kalır. Bu α -keto asit analogu aminoasidin karbon iskeletini teşkil eder. Karbon iskelet CO_2 ve H_2O 'ya oksitlenir. Ayrıca glukoza çevrilebilecek üç veya dört karbonlu bileşiklere dönüştürülürler. Karbon iskeletleri ise glukoza çevrilebilen ya da sitrik asit çevriminde kullanılabilir ara bileşiklere dönüştürülür [11].



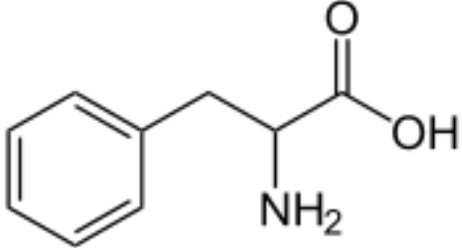
Şekil 2.4. Amino asit metabolizmasının şematik olarak özetlenmesi [12].

2.3. Fenilalanin (Phe)

Fenilalanin esansiyel bir aminoasittir. Doğada üç formda bulunur: L-fenilalanin, proteinlerde doğal halde bulunur, D-fenilalanin, laboratuarda üretilen formudur. Ayrıca iki formun kombinasyonu olarak bulunan D, L-fenilalanin formu mevcuttur. Yapısındaki fenil halkası sebebiyle aromatik amino asittir. Ayrıca yapısındaki bu halka fenilalanine hidrofobik ve nonpolar özellik kazandırır.

Aromatik amino asitlerden biri olan L-fenilalanin, tatlandırıcı olan α -aspartam yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca fenilalanin basitrasin, gramisidin, tirozidin gibi bazı antibiyotiklerin yapısında bulunur [13].

Çizelge 2.1. L-Phe'nin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri [14].

Molekül Formülü: $C_9H_{11}NO_2$	
Molekül Ağırlığı: $165.19 \text{ g mol}^{-1}$	
pK_a : 1.83 (karboksil), 9.13 (amino)	
İzolektrik Nokta(pI): 5.48	
Sudaki Çözünürlüğü: (mg/mL)	
0°C 19.8	
25°C 29.6	
50°C 44.3	
75°C 66.2	
100°C 99.0	
Erime Noktası: 283°C	

2.4. Fenilalanin Fonksiyonları

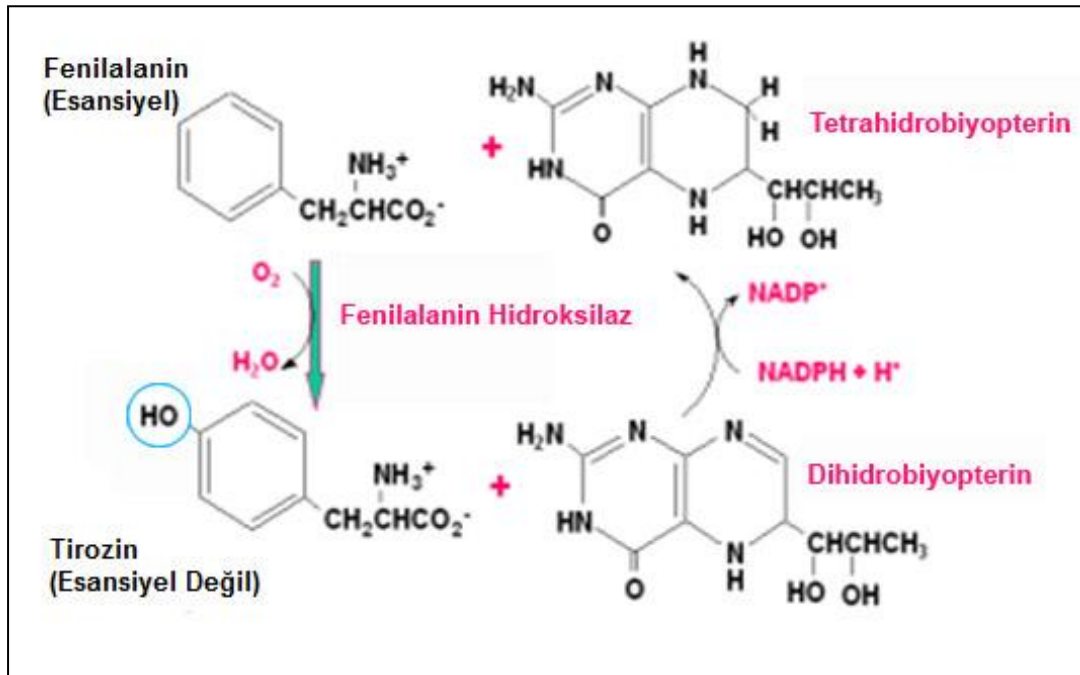
Fenilalanin birçok önemli proteinin sentezinde rol oynar. Fenilalanin aynı zamanda esansiyel olmayan aminoasit tirozin ve türevlerinin metabolik öncülüdür. Tirozin protein yapımında, nörotransmitter maddelerin (dopamin, nefrin, norepinefrin) ve tiroid hormonlarının yapımında kullanılır. Tirozin ruh halini etkileyen norepinefrinin sentezlenmesinde kullanıldığından tirozinin dolayısıyla da fenilalaninin değişik formları depresyon tedavisinde kullanılır [3].

Fenilalanin depresyon tedavisinin yanı sıra enflamasyon, kronik ağrı ve Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılır [3]. Tatlandırıcı olan aspartamın da yapısında yer alır [2].

Fenilalaninin beslenme eksikliği nadirdir, sadece son derece düşük protein alımı ile oluşmaktadır. Ancak eksikliği durumunda amino asidüri, anoreksiya, halsizlik, ödem, cilt lezyonları, hafıza problemleri, iştahsızlık, uyuşukluğun yanı sıra, karaciğer hasarı ve yavaş büyüme gibi belirtiler görülebilir. Yüksek dozlarda L-fenilalanin ise nörotoksik etki gösterir, anksiyete, çarpıntı, hipertansiyona neden olur [15].

2.5. Fenilalanin Metabolizması

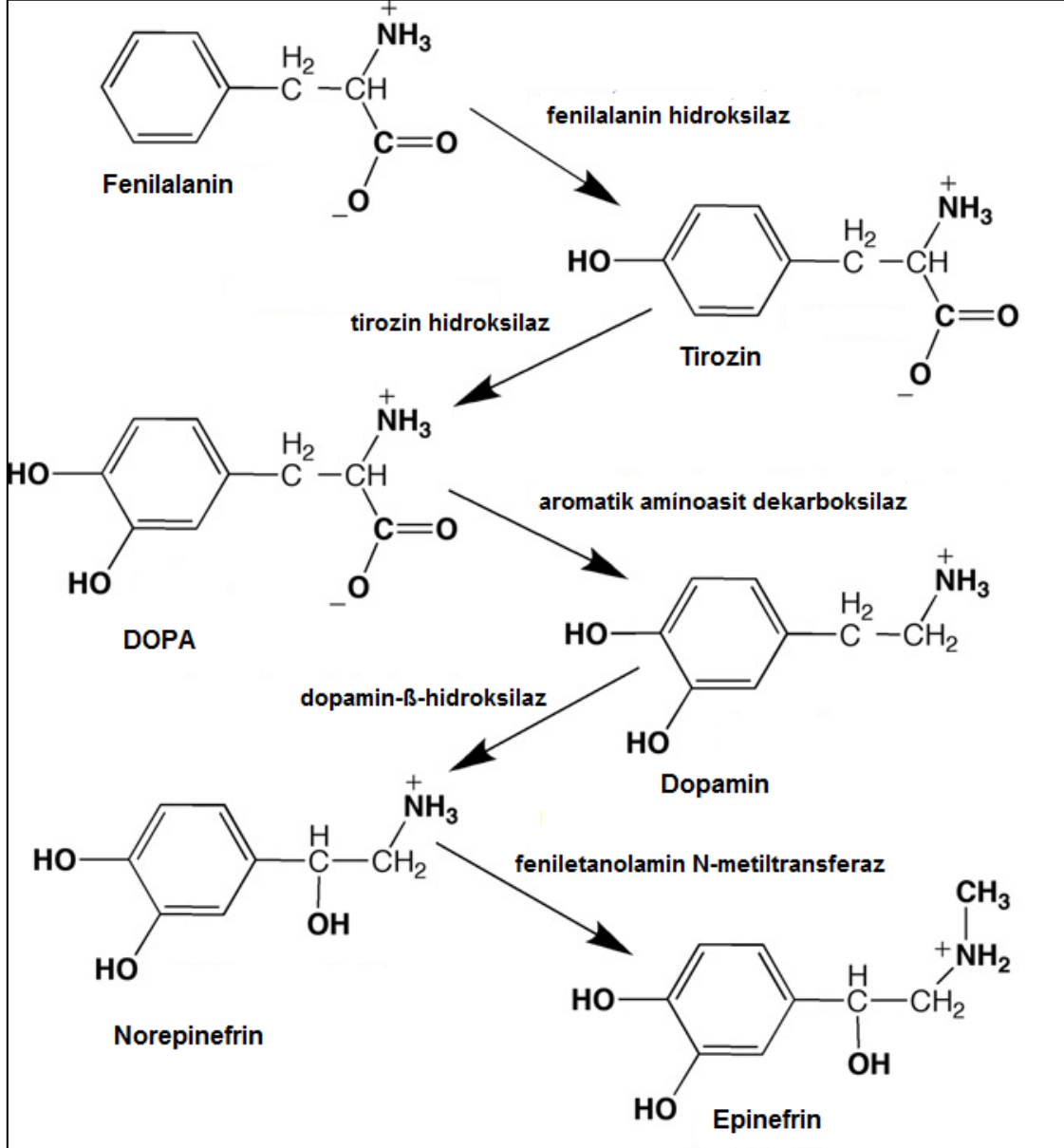
Fenilalanin, fenilalanin hidroksilaz enzimi varlığında tirozine dönüştürülür. Fenilalanin hidroksilaz tetrahidrobiyopterin koenzimi eşliğinde çalışan bir enzimdir. Enzim elektron ihtiyacını bu koenzim molekülü olan *tetrahidrobiyopterin*den karşılar [11].



Şekil 2.5. Fenilalaninin tirozine çevriminde tetrahidrobiyopterin dönüşümü [11].

Tirozinin, 3,4 dihidroksifenilalanine (DOPA) hidroksile olmasıyla başlayan bir dizi tepkime ile nörotransmitter olan dopamin ve adrenal medulla hormonları olan

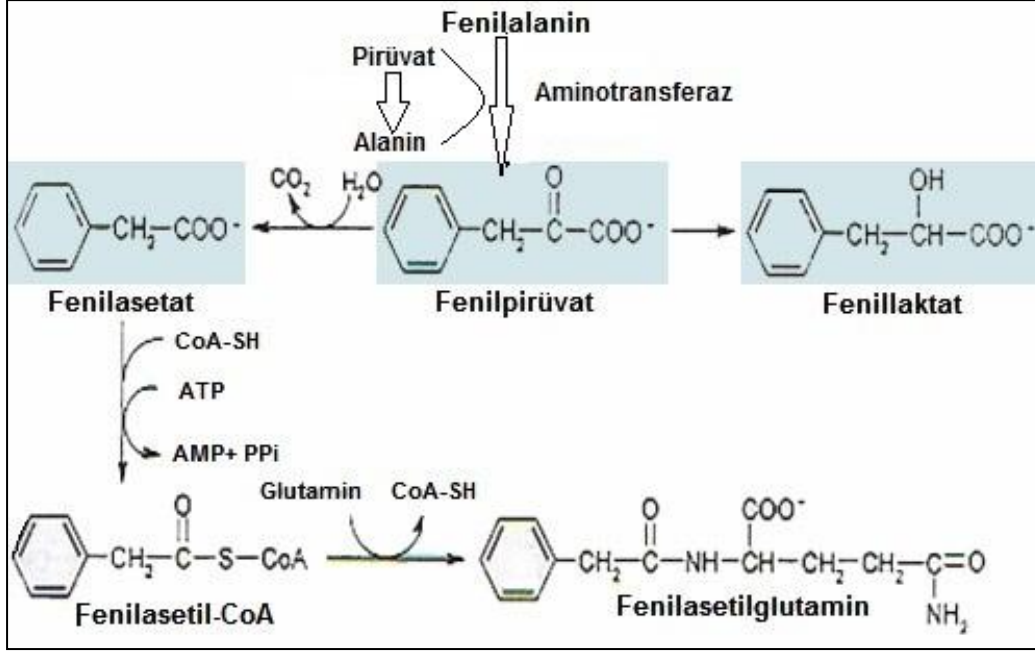
epinefrin ve norepinefrin oluşur. Ayrıca deri, saçta renk veren melanin ve tiroid hormonu olan tiroksin de tirozinden elde edilir [16].



Şekil 2.6. Sağlıklı bireyde fenilalaninin metabolik yolları [60].

Her ikisi de dokuz karbonlu olan fenilalanin ve oksidasyon ürünü tirozin, homojenistik asit üzerinden dört karbonlu fumarata ve yine dört karbonlu Asetil-CoA'ya çevrilir. İki ürün de sitrik asit çevrimine girer. Kalan tek karbon ise CO₂ olarak kaybedilir.

Fenilalaninin katabolizmasında daha az kullanılan diğer yolunda ise Şekil 2.7.'de görüldüğü gibi fenilketonurili bireylerde fenilalanin transaminasyon geçirek fenilpirüvata daha sonra da fenillaktat ya da fenilasetata dönüşür. Fenilasetat idrara karakteristik koku verir. Bu da yeni doğanlarda destekleyici diğer verilerle fenilketonuri tanısı konulmasında kullanılabilir [11].



Şekil 2.7. Fenilketonurili bireylerde fenilalanin metabolizmasının şematik gösterimi [11].

2.6. Fenilalanin Metabolizması Bozuklukları

Genetik anomaliler yüzünden aminoasit metabolizmasında yer alan bazı enzimlerin işlevleri bozulur. Bu yüzden eksik ya da görevini gerçekleştiremeyen enzimin ürünü oluşmaz. Bu da vücutta istenmeyen metabolitlerin birikmesine bağlı olarak bir takım hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur.

Hiperfenilalaninemiler (HPA), fenilalanin hidroksilaz (EC 1.14.16.1) enzimini oluşturan gende meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan metabolik bozukluklardır [3]. Fenilketonuriyi (PKU) de kapsayan HPA aminoasit metabolizması bozukluğuna bağlı en yaygın hastalıktır. PKU'da karaciğerde fenilalanin hidroksilaz enziminin aktivitesinin eksikliğine bağlı olarak Phe'den tirozin sentezi gerçekleşemez [4]. Bu da kanda fenilalanin ve metabolitlerinin birikimine yol açar.

Sağlıklı bireylerde kandaki fenilalanin seviyesi 2 mg/dL'yi geçmez. Hasta bireyler ise yenidoğan tarama testinde kandaki fenilalanin seviyelerine göre şöyle sıralanır: kan fenilalanin seviyesi 2 ila 10 mg/dL arasında hiperfenilalaninemi (HPA), 10 ila 20 mg/dL arasında orta dereceli fenilketonuri (PKU), 20 mg/dL'den fazla ise klasik fenilketonuridir (PKU) [12].

Çizelge 2.2. Plazma fenilalanin seviyeleri ve hastalık ilişkileri [12].

Hastalık	Plazma Fenilalanin Seviyesi (mg/dL)
Klasik PKU	> 20 mg/dL
Orta dereceli PKU	10- 20 mg/dL
Hiperfenilalaninemi (HPA)	2- 10 mg/dL
Normal	< 2 mg/dL

PKU, Norveçli biyokimyacı ve doktor olan Asbjorn Folling tarafından 1934 yılında keşfedilmiştir [17]. Hasta iki kardeşin idrarına FeCl₃ ilavesiyle idrarlarında geçici yeşil renk oluştuğunu gözlemiştir. Bunun daha sonra kanda L-Phe seviyesi 10 mg/dL'nin üzerinde olduğunda Phe'nin transaminasyonunda oluşan yan ürün olan fenilpirüvik asitten kaynaklandığını tespit etmiştir [17].

PAH eksikliğinden kaynaklanan PKU'de fenilalaninden tirozin sentezlenemediği için tirozin esansiyel hale gelir. Tirozin dopamin, noradrenalin, serotonin gibi nörotransmitterlerin beyinde sentezi için öncülüdür. Bu yüzden HPA'de birikmiş fenilalanin varlığına ve tirozin eksikliğine bağlı olarak beyinde bu nörotransmitterlerin sentezi gerçekleşemez [18].

PKU'li hastalarda beyinde miyelinizasyon ve demiyelinizasyonda bozukluklar görülür. Hastalarda miyelin dönüşümü (turnover) artarken miyelin üretimi azalır. Miyelin dönüşümü ile beyinde serbest fenilalanin miktarı artar. Beyinde protein sentezi azalır. Hastaların beyin ağırlığında, beyin hücre sayısında azalma görülür. Bu bozukluklar PKU ile beyinde ortaya çıkan bozuklukların temel sebebi olabilir [18]. Beyindeki bu biyolojik değişimler hasta bireylerde bir takım psikiyatrik bozukluklara da yol açmaktadır. Hastalık eğer erken tespit edilip tedavi edilmezse PKU nörolojik fonksiyon bozukluklarına, ağır davranış bozukluklarına, otizm ve egzamaya yol açar. Erken tedavi ile hastalığın birçok etkisi bertaraf edilebilir.

Erken tedavi gerçekleşmesine rağmen hastalıkla ilgili birçok semptom gözlenmiştir. Erken tedavi edilmiş bazı çocuklarda depresyon, izolasyon, fiziksel şikayetler ve hiperaktivite görülürken yetişkinlerde anksiyete, fobi, obsesyon, depresyon, paranoya ve yeme bozuklukları görülür. Paranoya ve şizofreninin biriken aşırı fenilalanine bağlı olduğu düşünülmektedir [5].

PKU hastalığında nörokimyasal bulgular göstermiştir ki artan L-Phe derişimi beyinde serbest L-Phe miktarını arttırırken; diğer büyük nötral aminoasit miktarını azaltır [18]. McKean'in hiperfenilalaninemik farelerle yaptığı bir çalışmada beyinde phe konsantrasyonu artarken valin, lösin, izolösin, treonin, histidin, triptofan, metiyonin ve tirozin gibi diğer büyük nötral aminoasitlerin eksik olduğu tespit edilmiştir [19].

Nötral aminoasitlerin derişimlerinin azalmasıyla beyinde protein sentezi azalır ve miyelin yıkımı artar. Bu da beyin ağırlığını etkiler ve beyin hücre sayısında azalmaya neden olur ancak böbrekleri etkilemez. Organa özgü bu etkinin kan beyin bariyerinin aşılmasında phe ile yarışan nötral aminoasitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir [18].

Dünyada PKU görülme sıklığı ülkeden ülkeye değişiklik gösterir. Avrupa'ya bakıldığında bu oran; İrlanda da 1:4,500 iken Finlandiya'da 1:100,000 ila 1:200,000 arasında değişmektedir. Klasik PKU daha çok kuzey ve batı Avrupa'da görülür. Polonya'da bu oran % 70'i bulmaktadır. Kuzey Amerika'da ise 1:15,000 şeklindedir. Akraba evliliklerinden dolayı Orta Doğu ülkelerinde de yüksek oranda PKU'ya rastlanır. İsrail'de oran 1:11,000'dir. Japonya'da görülme sıklığı 1:108,000; Çin'de ise yaklaşık 1:15,000 olduğu tespit edilmiştir [17]. Bu ülkeler arasında Türkiye'ye bakıldığında 1:2,600 ile yüksek görülme sıklığı göze çarpmaktadır [20].

PKU'nun tedavisi aşırı phe birikimini önleyecek şekilde L-Phe derişiminin sistematik azaltılmasını kapsar. Ancak aynı zamanda protein sentezini destekleyecek şekilde yeterli miktarda tirozin takviyesini kapsar. Düşük Phe diyeti kanda Phe seviyesini normal tutabilmek için bazı hastalarda ömür boyu devam ettirilmelidir. Böylece hastalıktan kaynaklanabilecek bilişsel bozukluklar önlenir. Ancak böylesi bir diyetin ömür boyu uygulanması zordur. Bu durum bebekler ve

çocuklar için sorun oluşturmasa da ergen ve yetişkinler için sosyal izolasyona neden olabilir. Ayrıca diyet ürünlerinin pahalılığı, genetik ve sosyoekonomik farklar düşünüldüğünde tedavi olarak diyetin seçimi zorlaşır. Bu nedenle alternatif tedavi yolları geliştirilmektedir [21].

PAH enzimi karaciğerde görev yapar ve eksikliği HPA'ya yol açtığından karaciğer transplantasyonu denenmiş bir tedavi yöntemidir. Varyo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada on yaşında siroz ve PKU'lu bir çocuğa yaptıkları karaciğer transplantasyonu ile fenilalanin seviyesi yaklaşık 10 mg/dL'den 1 mg/dL'ye kadar indirilmiştir [22]. Ancak hasta sıklığı ve transplantasyon imkanının az olduğu göz önüne alındığında bu yöntem çok etkili olmayacaktır.

Kan beyin bariyerinde taşınım esnasında Phe ile yarışacak büyük nötral aminoasitlerin gıda takviyesine eklenmesi de PKU'lu bireylerde Phe seviyesini düşürmektedir. Ancak bu yöntem tartışmalıdır ve sadece diyetini takip etmekte zorlanan hastalar için önerilir [23].

PKU'lu bireye PAH kofaktörü olan tetrahidrobiopterin (BH₄) uygulanması da diğer bir alternatif tedavi yöntemidir. BH₄ takviyesi HPA'lı hastalarda işe yararken, daha ağır klasik PKU veya PKU olmayan hiperfenilalaninemik hastaların BH₄ takviyesine cevap vermediği görülmüştür. Böyle hastalar için geliştirilmekte olan enzim tedavisi kullanılabilir. Bu yöntemde PAH yerine Phe'i amonyak ve sinamik asite çeviren fenilalanin amonyum liyaz enzimi (EC 4.3.1.5) kullanılır [39]. Sinamik asit zararsız bir üründür ve sonraki basamakta benzoik asite parçalanır, daha sonra hızlıca hippürik asite çevrilir. Amonyak ise hiperamonemiya olacak kadar kanda birikmez [24].

Tüm yaşamı etkileyen PKU'da doğru tedavi yönteminin belirlenip, biriken phe metabolitlerinin bireyin zihinsel ve motor faaliyetlerini etkilemesinin engellenmesi için erken teşhis önem taşımaktadır. Bu nedenle tüm dünyada yeni doğan bebeklerde hastalığın taranması gitgide önem kazanmıştır. Bu nedenler göz önünde bulundurulduğunda L-fenilalaninin moleküler tanınması ve tayini son derece önem arz etmektedir.

2.7. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama teknolojisi belirli bir analite seçiciliği ve özgüllüğü olan yapay reseptörlerin tasarlanmasını kapsar [7]. Bu kapsamda istenilen analitin eşleniğini içeren çapraz bağlı polimerik yapılar oluşturma işlemine moleküler baskılama denir. Canlı organizmaların birbirleriyle etkileşirken sahip oldukları yapısal ayırım yapma yeteneğine ve bu yeteneği polimerik yapılara aktarma yöntemi olarak da düşünülebilen moleküler baskılama mekanizmasının anlaşılması enzim-substrat, antijen-antibadi, hormon-reseptör arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasını sağlar. Bilim insanları bunun altında yatan mekanizmayı anlamaya ve dolayısıyla antijen-antibadi, enzim-substrat, hormon-reseptör, DNA ve RNA arasındaki etkileşimleri ortaya koymaya çalışmaktadır. Dolayısıyla moleküler baskılanmış polimerler (MIPIler), baskılama teknolojisi kullanılarak elde edilen antibadiler, biyolojik reseptörler gibi doğal tanıma elemanlarını taklit yeteneğine sahip yapılardır. Bu sayede biyolojik sıvılardan ve çevre örneklerinden karmaşık numuneler ayrıştırılıp analiz edilebilir [7]. Yani moleküler baskılanmış polimerler hedef molekül tanıma ve bağlanma özelliğine sahip yapay reseptörlerdir.

Moleküler baskılama yöntemi moleküler kalıp (tanınması istenen yapı) ile fonksiyonel monomerler arasında bir kompleks oluşumu ve daha sonra polimerizasyon işlemiyle yapının sabitlenmesine dayalıdır. Kalıbın uzaklaştırılması şekil ve fonksiyonel olarak kalıba uygun "baskılar"ın ortaya çıkmasını sağlar.

Kalıp molekül varlığında şekillenen özgül tanıma bölgeleriyle oluşturulan moleküler baskılanmış polimerler (MIPIler) hedef molekülü birçok bileşen içeren bir karışımdan ayırma özelliğine sahiptir [25,26]. Doğal sistemlerin tanıma özelliği ile karşılaştırılabilir derece tanıma özelliğine sahip bu yapay reseptörlerin dizaynı ile moleküler baskılama son yıllarda önemli bir araştırma konusu olmuştur. Moleküler baskılama teknolojisi birçok biyolojik ve kimyasal molekülün tanınmasını mümkün kılmıştır. Bunların başında **amino asitler** [27, 28] ve **proteinler** [29], **nükleotit türevleri, kirleticiler, ilaçlar ve gıda** gelmektedir.

MIP'lerin çalışma konusu olarak seçilmesini sağlayan birçok avantajı mevcuttur. En önemli avantajı doğal kaynakla karşılaştırılabilecek kadar hedef moleküle gösterdikleri yüksek afiniteleri ve seçicilikleridir. Bu sayede kısa sürede hedef molekülü alıkoyar, kolayca rejenere edilebilir. Çevresel faktörlere; yüksek sıcaklık,

basınç, yüksek pH, organik çözücülere dayanıklıdır. Ayrıca düşük maliyetle kolayca hazırlanabilen yapılardır. Fiziksel ve kimyasal dayanıklılığı vardır ve birçok farklı şekillerde hazırlanabilir [26,30]. Protein ve nükleik asit gibi biyolojik sistemlerle karşılaştırıldığında daha yüksek fiziksel kararlılığa sahiptir. Artan sıcaklığa, basınca, asit, baz, metal iyon etkilerine ve organik çözücülere daha dayanıklıdır. Ayrıca yine biyolojik sistemlerle karşılaştırıldığında sentezlenmeleri daha ucuzdur. Bir diğer önemli özellikleri ise moleküler tanıma özelliklerini kaybetmeden uzun süre hatta oda sıcaklığında yıllarca saklanabilirler [7].

Tüm bu avantajlarına rağmen moleküler baskılanmış polimerlerin sentezlenmesinde zorlayıcı noktalar mevcuttur. Birçok madde için MIP'ler yapılsa da proteinler gibi büyük yapılar için MIP yapımı zordur. Çünkü protein ve nükleik asit yapıların ligand seçiciliği özellikleri yanında denatürasyon ve proteinlerin konformasyonel değişim eğilimleri, kararlılık problemleri, abiyotik çevrelerde kullanımlarını kısıtlamaktadır. Proteinlerin yüzeylerinde sahip oldukları birçok bağlanma bölgesi nedeniyle spesifik olmayan etkileşim sayısı artar [31]. Ayrıca büyük moleküller çapraz bağlı yapılar içerisinde daha düşük mobilitelere sahiptirler ve tekrar bağlanmaları da zordur [25]. Bu problemler baskılama sürecinde proteinlerin baskılanması zorlaştırmıştır. Ancak doğal eşlenikleriyle aynı seçiciliğe ve etkinliğe sahip yapay tanıma sistemlerinin geliştirilmesini tetiklemiştir. Büyük moleküllerin baskılanması zor olsa da proteinlerin baskılanmasıyla ilgili başarılı çalışmalar mevcuttur. Uzun ve ark. SPR yüzeye Hepatit B antibadi (HBsAb) baskılanmış nanofilm hazırlayarak insan serumundan HBsAb teşhisini gerçekleştirmiştir [32].

MIPler kararlılıkları, kolay hazırlanışları ve düşük maliyetleri ile antibadilerin, enzimlerin yerini alarak kimyasal sensörlerde kullanım potansiyeline sahiptirler. Ayrıca küçük analitlere, bakterilere, virüslere, peptit ve proteinlere gösterdikleri yüksek seçicilik sayesinde biyoayırma işlemlerinde de sıkça kullanılmaktadırlar [26]. Ayrıca katalizde, ayırma teknikleri ve saflaştırmada, ilaç taşınımında ve biyolojik antibadi ve reseptör sistemlerinde kullanılırlar [25,7]. MIP sensörler yüksek seçicilik ve afiniteleriyle anahtar-kilit modeli gibi çalıştılarından kiral kimyasal sensörler olarak da kullanılabilirler. Ayrıca kolayca rejenere olabilmeleri ve analit tayini sağladıklarından elektrokimyasal sensör olarak da kullanılmaktadır [33]. Baskılanmış polimerlerin birçok yapısal avantajı ile farmasötikten çevre

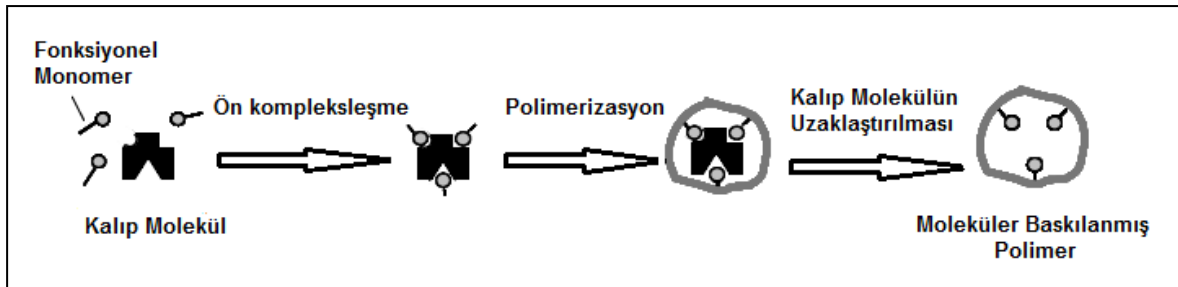
bilimlerine kadar çok geniş bir yelpazede tanıma ve ayırma amaçlı kullanılması moleküler baskılama teknolojisini gitgide daha cazip hale getirmektedir.

2.7.1. Moleküler Baskılama Tekniği

Moleküler baskılama klasik olarak kalıp molekül (analit) ve ona şekil ve büyüklük olarak benzer bir fonksiyonel monomerle kompleks oluşturarak polimerizasyon yapma işlemidir [30]. Polimerizasyon işlemi, kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ajan ve başlatıcının uygun çözücünde çözünmesiyle başlar.

Genel olarak bu işlem üç adımda gerçekleşir.

1. Fonksiyonel monomerle kalıp molekül arasında *ön kompleksleşme*,
2. Aşırı çapraz bağlayıcı varlığında üç boyutlu polimer ağ oluşumu,
3. Polimerizasyon sonrasında kalıp molekül özgül boşluklar oluşturacak şekilde polimerden uzaklaştırılır. Oluşan bu boşluklar kalıp molekülü şekil, büyüklük ve kimyasal uygunluk açısından tamamlayıcıdır [7].



Şekil 2.8. Moleküler baskılanmış polimerlerin sentez basamakları [34].

Ön-kompleksleşme

Fonksiyonel monomer kalıp molekülle etkileşecek şekilde seçilir. Çünkü kararlı bir kalıp monomer kompleksi, moleküler tanımanın başarıyla gerçekleşmesi için olmaz olmazdır. Bu adımda kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir iskelet yapı oluşur. Hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özelliklerinin benzer olması önemlidir.

Polimerizasyon

Monomerler kalıp molekülün etrafında üç boyutlu düzlemde yer alırlar. Çapraz bağlayıcı varlığında da fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilerek sabit

hale getirilirler. Elde edilen yapıyla kalıp molekülün üç boyutlu yapısına eşlenik özgül mikroboşluklar içeren polimer matriks oluşmuştur.

Kalıp (hedef) molekülün uzaklaştırılması

Kalıp molekülün uygun çözücü ile yıkanarak polimerden uzaklaştırılmasıyla bağlanma bölgeleri kalıp molekülü tamamlayan boşluklar oluşur. Oluşan bu boşluklar kalıp molekülün şeklini, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıyarak seçici ve etkin olarak kalıp molekülü bağlar.

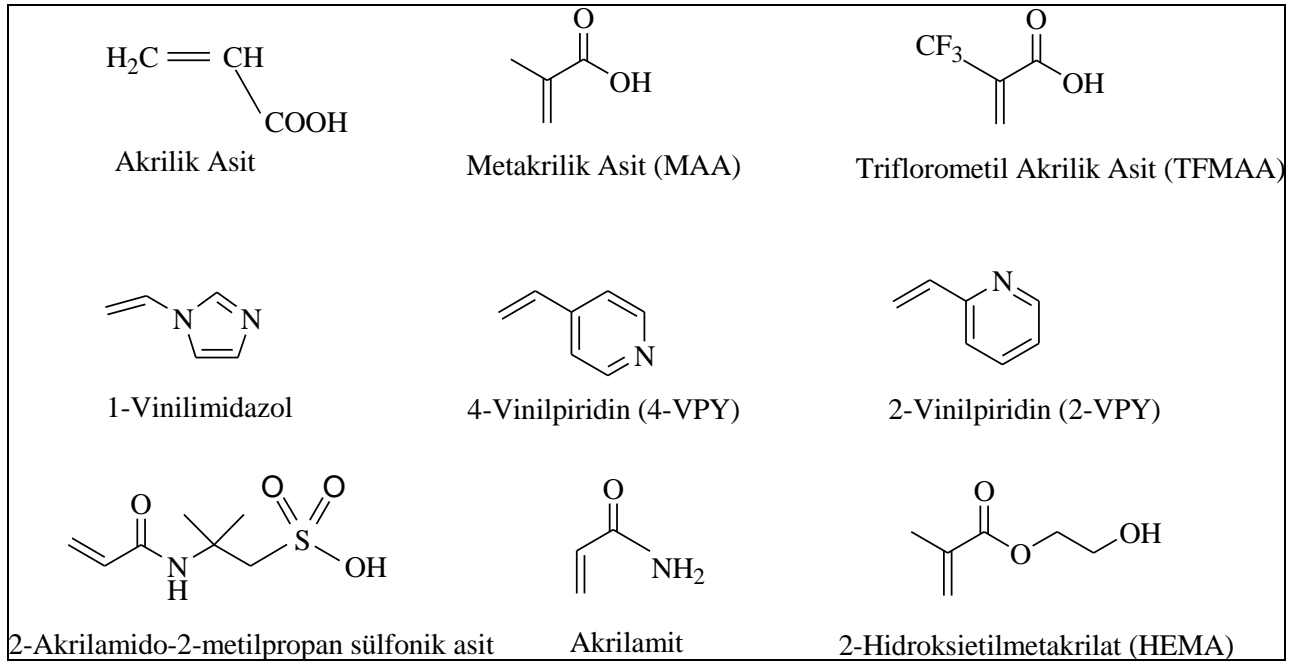
Genel olarak polimer yapı içerisinde kalıp molekül ve fonksiyonel gruplar arasında oluşan hidrojen, dipol-dipol ve iyonik etkileşimler moleküler tanımadan sorumludur [57]. Polimerizasyon işleminde kullanılan kalıp molekülün, fonksiyonel monomerin, çapraz bağlayıcının, polimerizasyon için çözücünün ve başlatıcının kimyasal uygunluğu, bu nedenle de dikkatli seçimi başarılı bir moleküler baskılama süreci için önemlidir.

2.7.1.1. Kalıp Molekül

Kalıp molekülün fonksiyonel monomerle kompleks yapabilmesi için buna uygun fonksiyonel grupları içermelidir. Moleküler tanımanın gerçekleşmesi için kalıp molekül ve fonksiyonel gruplar arasında hidrojen, dipol-dipol ve iyonik etkileşimler oluşmalıdır. Bu nedenle kalıp molekülün bu etkileşimleri yapabilecek karboksil, amino, hidroksil ve amid grupları bölgeleri kompleks oluşumu için gereklidir. Kalıp molekülün konformasyonunda veya stabilitesinde kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği koşullar altında değişiklik olmamalıdır. Baskılanacak molekül olarak ilaçlar, aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler kullanılmıştır [35].

2.7.1.2. Fonksiyonel Monomerler

Monomerin seçimi kalıp moleküle uygun boşluklar oluşturması açısından önemlidir. Bir fonksiyonel monomerin kalıp moleküle etkileşebilmesi için hem seçici etkileşime girebilecek fonksiyonel gruplara hem de polimerleşebilecek doymamış bağlara sahip olması gerekir.



Şekil 2.9. Moleküler baskılamada sık kullanılan fonksiyonel monomerler [7].

Tipik fonksiyonel monomerler üç kısımda incelenebilir.

1. Asidik karakterli monomerler

- akrilik asit (AA), metakrilik asit (MAA), p-vinilbenzoik asit, 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA), akriloamido-(2-metil)-propan, 2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit (AMPSA)

2. Bazik karakterli monomerler

- 4-vinil piridin (4-VP), 2-vinil piridin (2-VP), 4-(5)-vinylimidazol, 1-vinil imidazol, allilamin, N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM)

3. Nötral monomerler

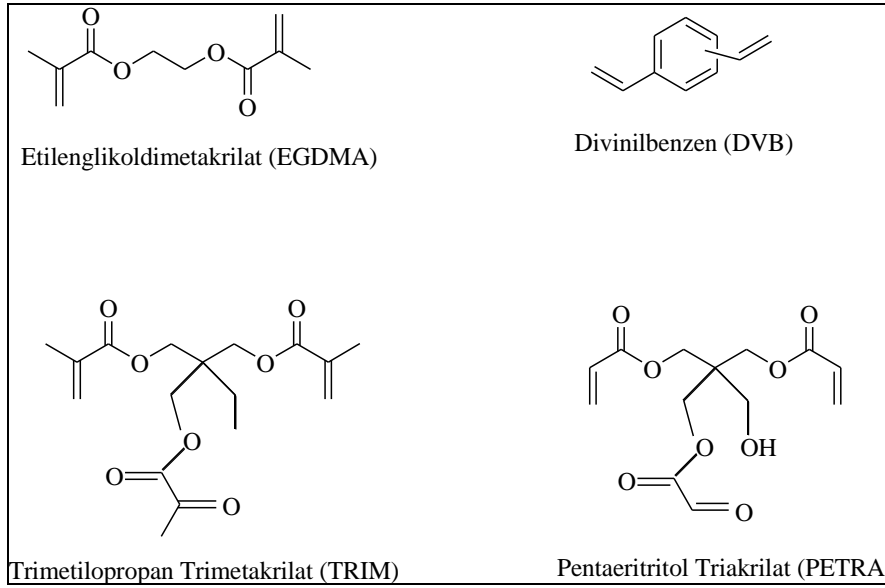
- akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren

2.7.1.3. Çapraz Bağlayıcılar

Baskılanmış polimerlerde polimer matriksin kararlı bir şekilde oluşabilmesi için çapraz bağlayıcı önemlidir. Çapraz bağlayıcı polimer matriksin morfolojisinin kontrol edilmesinde kullanılır. Ayrıca baskılanmış kalıp moleküle özgü bağlanma bölgelerini kararlı hale getirerek, polimer matriksin moleküler tanıma özelliğini korumasını sağlar. Bunun için birçok farklı çapraz bağlayıcı kullanılır. Çapraz bağlayıcı polimerin fiziksel yapısının oluşumunda önemli etkiye sahip olduğundan kullanılan çapraz bağlayıcı-monomer oranı da başarılı bir sentez için önemlidir.

Çapraz bağlayıcı-monomer mol oranı düşük olduğunda kalıp moleküllerin bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşır. Bu yüzden hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır. Aralarındaki oran yüksek olduğunda da, çapraz bağlayıcı monomerle ya da kalıp moleküle non-kovalent etkileşimler gösterir. Her iki durumda da baskılamanın etkinliği azalır [36,37]. Yüksek apraz bağlayıcı oranı genellikle yeterli mekanik kararlılığa sahip makrogözenekli yapılar elde etmek için kullanılır.

Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM) sık kullanılan çapraz bağlayıcılardandır. Çapraz bağlayıcı polimerin fiziksel yapısının oluşumunda önemli etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki çapraz bağlayıcı polimerin büyüklüğünü önemli derece etkilemektedir [7].



Şekil 2.10. Moleküler baskılamada sık kullanılan çapraz bağlayıcılar [7].

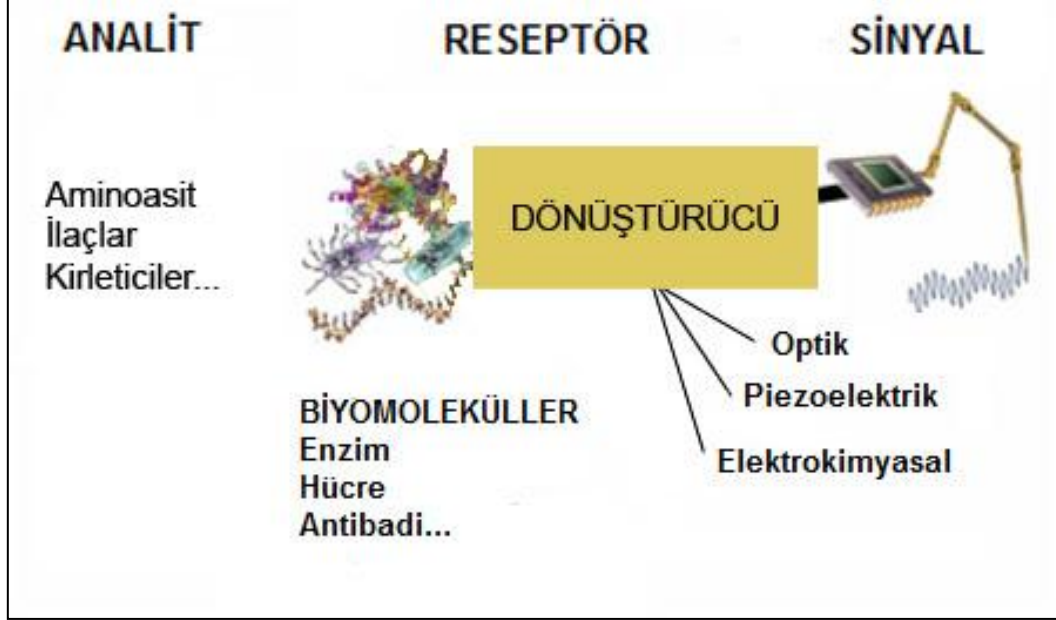
2.7.1.4. Çözücü

Çözücü de baskılama sürecinde önemli rolü olan diğer bir etkidir. Polimerizasyonda kullanılan kimyasalların tek bir fazda, homojen olmasını sağlar. Ayrıca makrogözenekli polimerlerde gözenek oluşumundan sorumludur. Bu nedenle çözücü gözenek oluşturucu (porojen) olarak da adlandırılır. Çözücü oluşan baskılanmış polimerde gözenek oluşumu ve daha iyi akıştan sorumludur. Bu yüzden çözücü hacminin artması oluşacak gözeneklerin hacminin artmasına neden olur [7].

2.8. Biyosensörler

Biyokimyasal algılama, anlık (on-line) uygulanan ve gerçek zamanlı (real-time) ölçüm sağladığından son 30 yıldır bilimsel ilgi odağı olmuştur [55]. Biyosensörler çok geniş alanda kullanıma sahip analitik cihazlardır. Klinik teşhis, tıbbi uygulamalar, gıda, çevresel analizlerden; kalite kontrol, tarım, gıda ve ilaç endüstrisine, çevresel analizlere, madencilik, savunma sanayine çok geniş ölçekte kullanım alanı mevcuttur. Ancak en geniş ölçeği diyabetli hastalarda glikoz sensörü kullanımının yaygınlığıyla tıbbi uygulamalar alır. Bu bağlamda biyosensörler kişiselleştirilmiş tıpta önemli yer tutmaktadır [38]. Biyosensörler

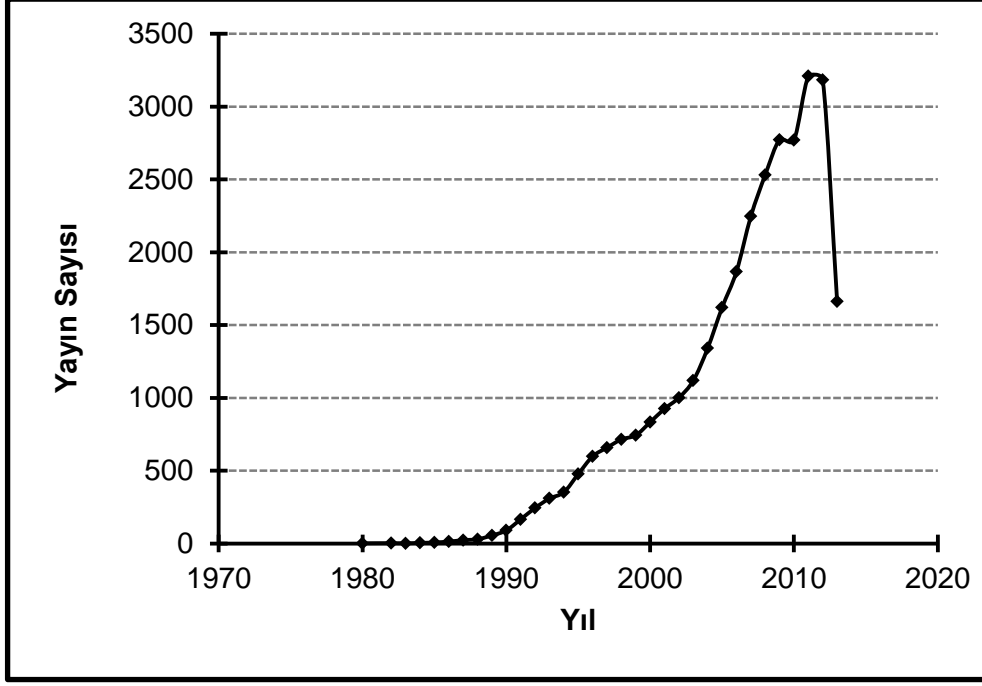
temelde iki kısımdan oluşurlar. İlk kısım analit ile seçimli etkileşime girecek biyolojik duyargaç, ikinci kısım ise bu etkileşimi anlamlı sinyale çevirecek dönüştürücüdür [35].



Şekil 2.11. Bir biyosensörün bileşenleri ve çalışma mekanizması [38].

Sensörlerde kullanılan dönüştürücüler farklı olabilir. Bunlar arasında piezoelektrik, termometrik, manyetik ve mikromekanik dönüştürücüler yer almaktadır. Buna bağlı olarak sensörler ısı, mekanik, kimyasal, akustik, radyoaktif sensörler olabilir.

Biyolojik algılayıcı elemanlar varlığında çalışan analitik cihazlar olan biyosensör alanında gelişmeler artan bir hızla devam etmektedir. Bu alandaki önemli dergilerden biri olan 'Biosensors and Bioelectronics' 1985 yılında yayınlandığında sadece otuz civarında makale yayınladı. Bu esnada dünya çapında bu alanda yayınlanan makale sayısı ise yaklaşık yüz dolaylarında idi. Şekil 2.12'den de görüldüğü gibi 2012 yılında ise bu alanda yayınlanan makale sayısı (Web of knowledge veri tabanına göre, "biosensor" kelimesi "Topics" lerde taranmıştır) ise yaklaşık 3200 idi. Bu da göstermektedir ki bu alanda yapılan çalışmalar dünya çapında yoğun bir hızla ilerlemektedir.

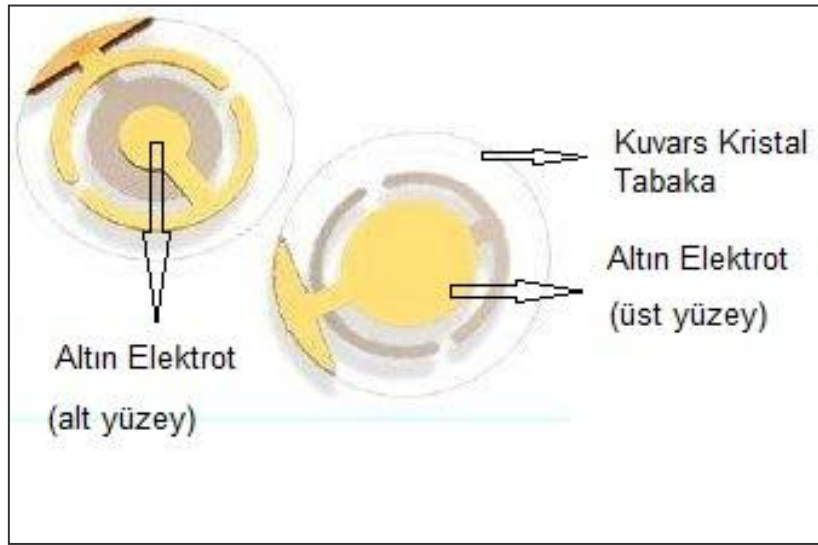


Şekil 2.12. 1980- 2013 yılları arasında biyosensörlerle ilgili yayın sayıları. Web of Knowledge taraması. Anahtar kelime: “biosensor” kelimesi “Topics” lerde taranmıştır. Tarih: 15.07.2013.

Çoğunlukla kullanım alanları klinik amaçlı olsa da sensörler çok farklı amaçlar için kullanılabilir. Bunlara örnek olarak kiral tanıma amaçlı biyosensörler [30], fermentasyon işlem kontrolünde kullanılan biyosensörler [39], gıda analizlerinde patojen, pestisit, mikroorganizma ve toksin tespitinde kullanılan biyosensörler [40] verilebilir. Tüm bu amaçlar için sensörlerde tanıma elemanı olarak enzimler, antibadiler, biyoreseptörler veya aptamerler gibi biyolojik tanıma elemanları kullanılabilir. Geniş kullanım alanına rağmen biyosensörlerin bir takım sınırlılıkları mevcuttur. Bunların uzun süreli dayanıklılığı (raf ömrü) ve tekrar kullanılabilirlikleri sınırlıdır. Belirlenmiş optimum çalışma pH ve sıcaklık değerleri korunmalıdır. Moleküler tanıma elemanı olarak kullanılan biyolojik bileşenlerin temini zor, bazen de fiyatları yüksektir [30].

Kütle duyarlı biyosensörler, yüzey plazmon rezonans, elektrokimyasal sensörler sıkça kullanılan biyosensörlerdendir. Kuvars kristal mikroterazi (QCM) biyosensörler, kütle duyarlı kimyasal sensörler sınıfından olup yüksek seçicilik, düşük maliyet, taşınabilirlik ve basitlik gibi özellikleri nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmektedir [41]. Kütle duyarlı sensörlerin çalışma prensibini asimetrik

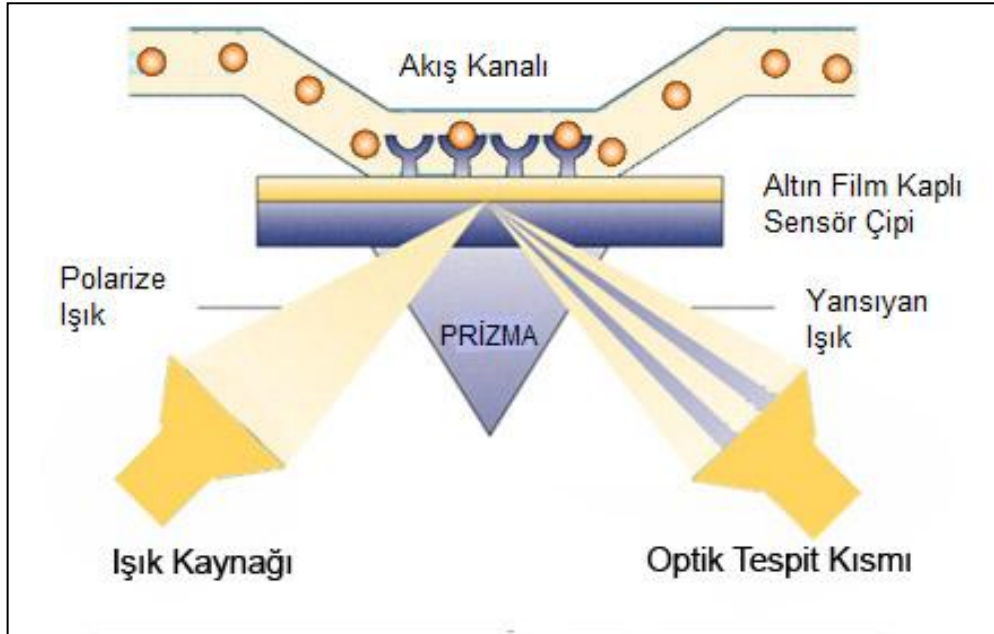
kristallerin sahip oldukları “piezoelektrik etki” özelliği oluşturmaktadır. Biyosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir biyosensör olan kuvars kristal mikroterazi (QCM), piezoelektrik özelliği kullanan kütle duyarlı sensördür. Piezoelektrik etki; bazı kristallerin yüzeylerine mekanik kuvvet (gerilim) uygulandığında kristal yüzeyleri arasında, uygulanan bu gerilimin şiddeti ile doğru orantılı olarak artan bir elektriksel potansiyel farkı ile ortaya çıkan etkidir. Bir QCM sensör bir çift elektrot arasında yer alan ince kuvars diskten oluşur. Kuvars kristal doğal bir titreşim frekansına sahiptir. QCM, yüzeyine biyomoleküller immobilize olmuş salınımlı kristal kullanarak biyokimyasal etkileşimlerin dinamik görüntülenmesini sağlar.



Şekil 2.13. Bir QCM sensör yüzeyinin görüntüsü.

Kuvars rezonatör yüzeyine kütle uygulandığında salınımın frekansı azalır. Ortamın sıvı ya da gaz faz olması da salınım frekansı etkiler. Başlangıçta, QCM ölçümleri katı faz ölçümler için kullanılmış olsa da uygun salınım (osilatör) devrelerinin geliştirilmesiyle sıvı fazda da ölçümler yapmak mümkün hale gelmiştir. Kütle uygulandığında frekanstaki değişimin ölçülmesiyle kütlede ki değişimin belirlenmesi mümkün hale getirilir. Kuvars kristal rezonatör kullanarak kütle tayinini ilk Sauerbrey gerçekleştirmiştir. Ayrıca Sauerbrey kuvars kristal rezonatörün frekansındaki değişimin (Δf), mutlak kütle değişiminin (Δm) doğrusal bir fonksiyonu olduğunu göstermiştir. QCM temelli biyosensörler çevresel kirleticiler, genetik hastalıkların markırları, oksidatif stresin tayini, protein miktarı belirlemede, genetiği değiştirilmiş organizmaların tayininde kullanılmaktadır [31, 35, 42].

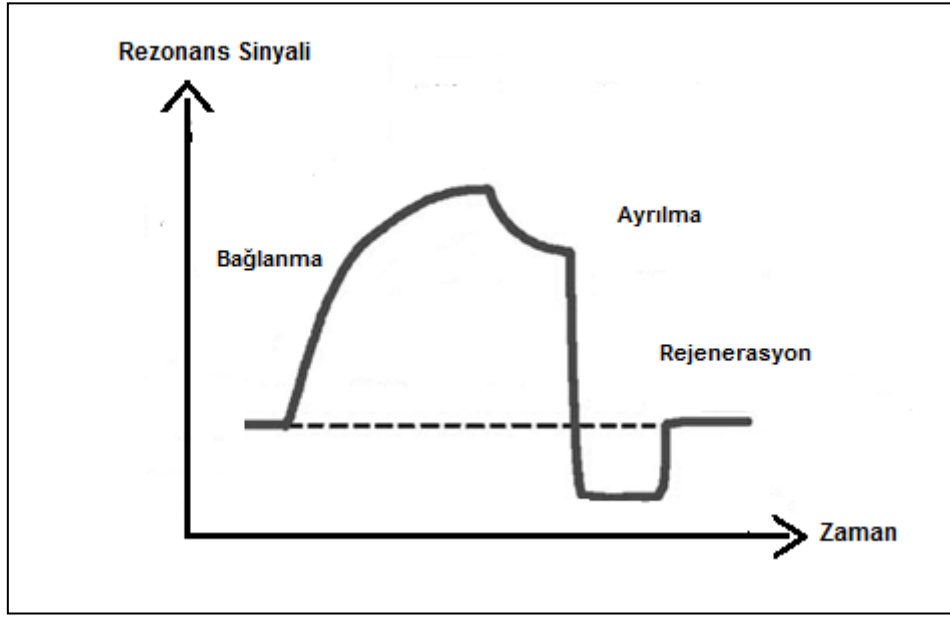
Bir diğer sıklıkla kullanılan biyosensör yüzey plazmon rezonans sensörlerdir. Yüzey plazmon rezonans teorisine göre enerji taşıyan ışık fotonu metal elektronları ile birleşir ve enerji transferi gerçekleşir. Burada kırılma indisleri farklı iki ortam vardır. Düzlem polarize ışık daha yüksek kırılma indisli cam prizma ortamına girdiğinde toplam iç yansımaya uğrar. Bu durumda kendiliğinden sönümlü dalga (evanescent wave) adı verilen ışık, metal filmin içine doğru nüfuz eder. Belirli bir kırılma açısında bu dalga nedeniyle metal yüzeydeki serbest elektronlar yüzey plazmonları oluşturur. Bu sebeple yansıyan ışığın yoğunluğu düşer. Bu olay yüzey plazmon rezonans olarak adlandırılır. Enerji transferi, ışık fotonları ve metal yüzeyindeki elektronlar arasında bir eşleşme ve/veya rezonans yakalandığında gerçekleşir. Bu transfer metal film yüzeyinden yansıyan ışığın miktarı ölçülerek belirlenebilir. Burada birleşmenin ya da enerji transferinin gerçekleştiği ışığın geliş açısı her metal ve metal yüzeyinin çevresine göre değişir. Yüzey plazmon rezonans sadece rezonans açısı denilen belirli bir açıda gözlenir. Metal yüzeye analit eklenmesiyle rezonans açısı değiştirilebilir. Bu değişim özelliğinden faydalanılarak yüzey hedef moleküle göre modifiye edilerek seçici hale getirilebilir. Bu da SPR biyosensörlerin temelini oluşturur [41].



Şekil 2.14. Bir SPR sensörün çalışma prensibi [60].

Rezonans açısındaki kaymanın ölçüldüğü metal yüzeyindeki kimyasal bileşen değişimi, absorplanan ışığın geliş açısında kaymaya neden olur. Sensöre analit

içeren örnek uygulandığında gerçekleşen biyomoleküler etkileşim miktarı ile rezonans açısındaki kaymanın boyutu orantılıdır. Bu etki zamana bağlı incelendiğinde önce yüzeye analit bağlanması ile rezonans açısı artar. Daha sonra desorpsiyon çözeltisinin sisteme verilmesiyle analit, yüzeyden ayrılmaya başlar ve belli süre sonra sinyal tekrar eski seviyesine döner.



Şekil 2.15. Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.

SPR biyosensörler herhangi bir işaretleme olmadan kullanılmaları, etkileşimleri eş zamanlı ve doğrudan görüntüleyebilmeleri, hızlı cevap süresine ve yüksek seçiciliğe sahip olması nedeniyle çeşitli biyomoleküler etkileşmelerde tercih edilen sensörlerdendir [43]. SPR sensörler biyomoleküler etkileşimlerin karakterizasyonunda, afinite ve bağlanma sabitlerinin belirlenmesinde, görüntülemeye, teşhiste, DNA analizinde kullanılmaktadır [32,44]. SPR biyosensörler biyoteknolojide, yaşam bilimlerinde ve farmasötik çalışmalarda biyomoleküler ve onların etkileşimlerinin araştırılması ve görüntülenmesi için biyotıpta kullanılmaktadır. Ayrıca çevresel kirleticilerin tespitinde, ilaç analizinde, gıda güvenliğinde, hastalıkların teşhisinde kullanılan bir tekniktir [45].

2.9. Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal dönüştürücülerden oluşmuş biyomimetik sensörler ve elektrokimyasal moleküler baskılanmış polimerler gitgide dikkat çeken ve daha sık kullanılan sensörler haline gelmiştir [34]. Elektrokimyasal sensörlerle çevresel, klinik, biyolojik birçok analitin yüksek seçicilikle analizi mümkündür. Hassas, ucuz, elektrotların sensör sistemine uygulaması kolay, birçok analitin analiz edilebilir olması gibi nedenlerden ötürü tercih edilen sensörlerdendir.

Elektrokimyasal sensörler tıbbi ve klinik, çevresel ve endüstriyel analizlerde önemli rol oynamaktadır. Yapılan elektrokimyasal ölçümler amperometrik, voltametrik, potansiyometrik ve kondüktometrik olabilir [8,46,47]. Bu çeşitli yollardan birçok farklı uygulamada yararlanıldığından moleküler baskılanmış polimerler kullanılarak sensör üretiminde elektrokimyasal dönüştürücüler önemli hale gelmiştir. Triazin herbisitler, endokrin bozucu kimyasallardan bisfenol A (BPA) gibi önemli toksik bileşiklerin MIPIler kullanılarak yapılan elektrokimyasal sensörlerle tespiti mümkün hale gelmiştir [34].

Elektrosentezin MIP teknolojisine uygulanması dikkat çeken bir yöntemdir. Bu yöntemden ilk defa 1995 yılında nitrat seçici potansiyometrik sensör yapımında faydalanılmıştır [34]. Pirolün, NaNO_3 varlığında polimerizasyonu ile nitrat iyonlarına özgül boşluklar içeren polimer film oluşturulmuştur. Bu moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensörün nitrata, perklorat ve iyodüre göre dört kat daha fazla seçici olduğu tespit edilmiştir [48]. Yapılan bir çalışmayla atrazin tayini için elektrokimyasal sensör yapılmıştır. Atrazin sensör çipi, altın yüzeyde metakrilik asit ve EDMA varlığında doğrudan polimerizasyonla sağlanmıştır. MIP yapımında LiCl elektrolit olarak kullanılarak atrazinin elektrokimyasal indirgenmesi sağlanmıştır. 1 ila 10 μM arası tayin aralığında atrazin tesbit edilmiştir [34]. Atrazinle ilgili yapılan başka bir çalışmada ise atrazin baskılanmış ince polimer filmleri hazırlanmış ve 50 nM' a kadar düşük miktarda atrazin tespit edilebildiği bildirilmiştir [49].

Elektrokimyasal sensörlerde kullanılan iletken polimerlerin elektrokimyasal tekniklerle elde edilmesi kolay olmasına rağmen polimerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri polimerizasyonda kullanılan çözücü, destek elektrolit, elektrot malzemesi

ve elektropolimerizasyon potansiyeline bağlı olarak değişir. Ayrıca iletken polimerler iyonik adsorpsiyona o kadar hassasdırlar ki spesifik olmayan adsorpsiyonlar ihmal edilemez.

2.9.1. Voltametri

Elektroanalitik yöntemlerde, elektrot-çözelti sistemine bir elektriksel etki yapılır. Yapılan bu elektriksel etkiye sistemin verdiği cevap ölçülür. Elektroanalitik yöntemler elektrot tepkimelerinin mekanizmalarının belirlenmesi, elektrokimyasal ve kimyasal tepkimelerin kinetiklerinin ve adsorpsiyon olaylarının incelenmesi, denge sabitlerinin ve difüzyon katsayısının bulunması, nicel ve nitel analizler gibi kimyanın pek çok alanında kullanılmaktadır.

Elektroanalitik yöntemler genel olarak ikiye ayrılır. İlki net akımın sıfır olduğu denge durumundaki durağan yöntemler; ikincisi ise denge durumundan uzakta net akımın gözleendiği dinamik yöntemlerdir. Elektroanalitik tekniklerin büyük bir kısmını net akımın sıfır olmadığı dinamik yöntemler oluşturur. Bunlar da potansiyel kontrollü, akım kontrollü ya da yük kontrollü yöntemlerdir [8].

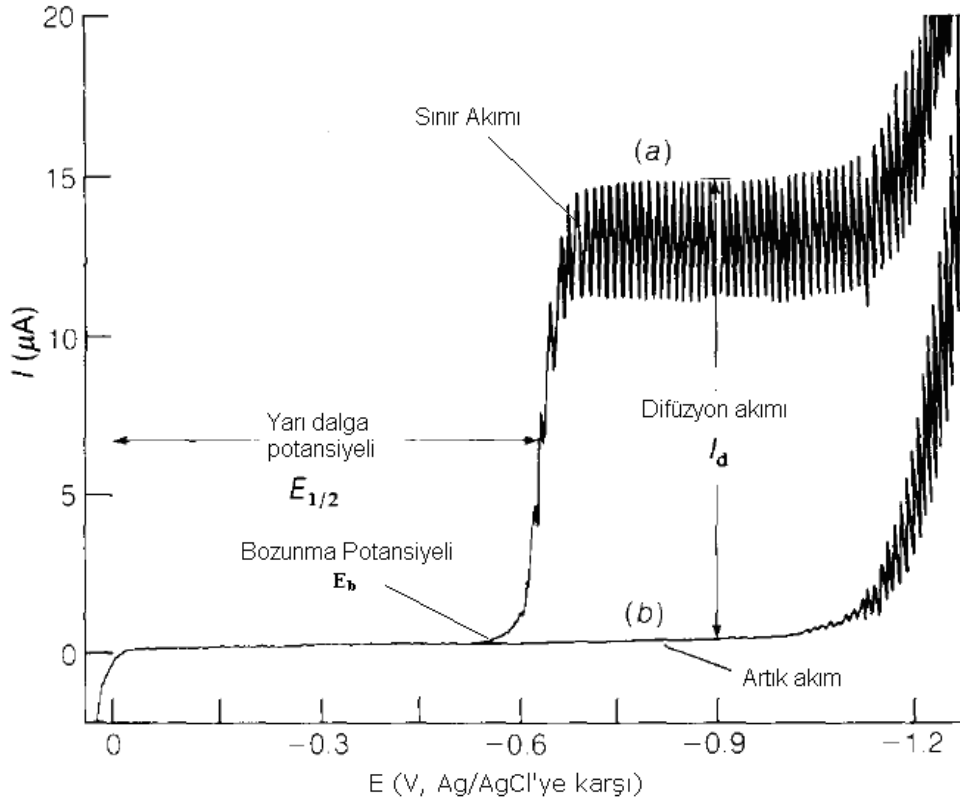
Voltametri potansiyel kontrollü bir teknik olup çalışma (indikatör) elektrodunun polarize olduğu şartlarda potansiyel ve akım parametreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen tekniktir. Burada oluşan akım potansiyelin bir fonksiyonudur ve analitle ilgili bilgi verir.

Voltametricde üçlü elektrot sisteminden faydalanılır.

1. *Referans elektrodu*; potansiyeli deney süresince sabittir. Genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrotlar kullanılır.
2. *Çalışma (indikatör) elektrodu*; polarize edilebilen, zamanla potansiyeli değiştirilen elektrotlardır. Civa, platin, altın, paladyum, karbon elektrot(grafit, karbon pasta elektrot, camsı karbon, karbon cloth elektrot) gibi elektrotlaryaygın olarak kullanılmaktadır.
3. *Karşıt (yardımcı) elektrot*; elektriğin güç kaynağından çözeltinin içinden geçerek çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan elektrotlardır. Karşıt elektrot olarak ise genellikle Pt tel kullanılır [8].

Bu sistemde, potansiyel, çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına uygulanır ve çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki akım ölçülür. Akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşur. Katodik ve anodik olmak üzere iki tür akım oluşur. Katodik akım indirgenmeden dolayı oluşan akıma, anodik akım ise yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma denir [50].

Bir voltametrik yöntemde çalışma elektrodu damlayan civa elektrodu (DCE) ise yöntem polarografi adını alır. Damlayan civa elektrodu 0,05 - 0,08 mm iç çaplı bir kılcal cam borudan damlayan civadan oluşur. Şekil 2.16' da Normal polarografide gözlenen akım –potansiyel eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 2.16. Doğru akım polarogramları (a) Elektroaktif maddenin polarogramı, (b) Destek elektrolit polarogramı [50].

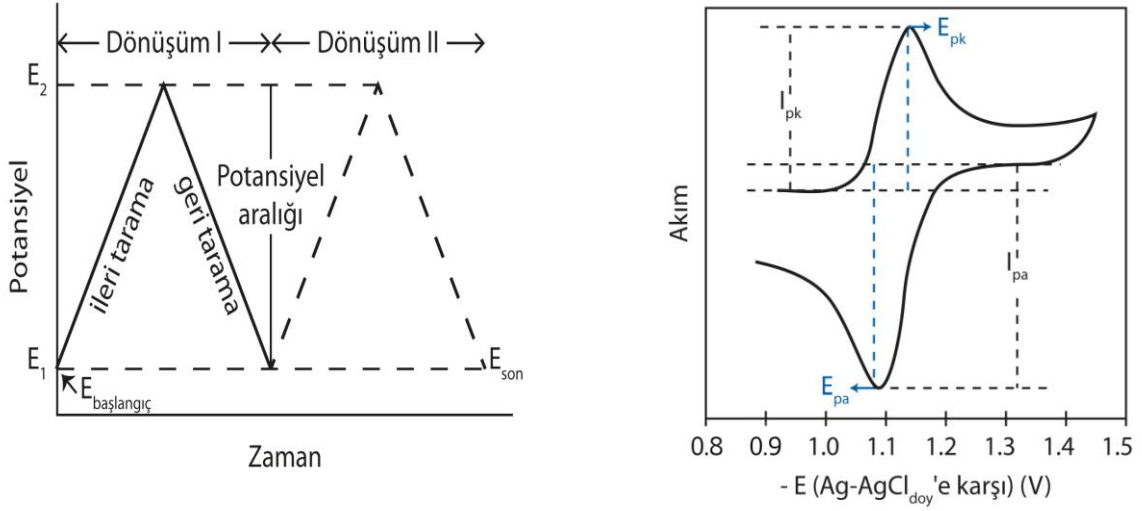
Yukarıdaki polarogramda görülen **sınır akımı** belli bir potansiyel değerinden sonra akımın sabit kaldığı bir değere ulaştığı akımdır. Elektrot üzerinde henüz reaksiyon

olmadığı zaman küçük de olsa gözlenen akıma **artık akım** denir. Sınır akımı ile artık akım arasındaki yükseklik ise dalga yüksekliğidir. Elektroaktif maddenin derişimi arttıkça dalga yüksekliği de doğrusal olarak arttığından polarografi kantitatif tayinlerde kullanılabilir [50].

2.9.1.1. Dönüşümlü Voltametri

Bu teknik elektrokimyasal teknikler içinde en yaygın kullanılan tekniktir. Dönüşümlü voltametri (CV) yönteminde çalışma elektroduna uygulanan potansiyel kontrol edilir ve hücreden küçük bir akım geçer. Bu nedenle CV, potansiyel kontrollü sabit elektrot voltametri yöntemidir. Dönüşümlü voltametrde E_p akımın maksimum olduğu noktadaki pik potansiyelidir.

Bu teknikte *tarama hızı* (v) olarak adlandırılan potansiyelin zamanla doğrusal olarak değişimi uygulanır. Belli bir potansiyelden sonra ilk tarama yönünde tarama yapılır. Elektrot mekanizmalarının incelenmesinde, adsorpsiyon olayının araştırılmasında, maddelerin miktar tayinlerinin yapılmasında ve kinetik çalışmalarda kare dalga voltametrisi ve polarografisi, sıyırma voltametrisi, kronoamperometri teknikleri gibi CV tekniği de sıklıkla kullanılır [8, 50]. Uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği Şekil 2.17'de görülmektedir. Potansiyel taraması bir E_1 başlangıç potansiyeli ve E_2 potansiyeli arasında yapılırsa yöntem *doğrusal taramalı voltametri* adını alır (LSV). LSV analitik çalışmalar için uygun bir metottür. E_2 potansiyeline ulaştıktan sonra aynı tarama hızıyla ilk tarama yönüne göre ters yönde tarama yapılırsa yöntemin adı dönüşümlü voltametri olur.



Şekil 2.17. Doğrusal taramalı (solda) ve dönüşümlü voltametri tekniklerinde (sağda) potansiyel taramasının zamanla değişimi [8].

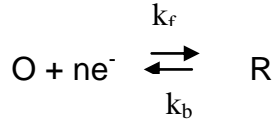
Grafiklere bakıldığında akımın artmaya başladığı kısımda standart indirgenme potansiyeli değerine yaklaşılmaktadır ve madde indirgenmeye başlar. Potansiyel azaldıkça elektrot yüzeyindeki maddenin indirgenme hızı artar. Madde daha hızlı indirgenmeye başladıkça akım da artar. İndirgenme hızı yeterince yüksek olduğunda elektrot yüzeyine difüzyonla gelen madde miktarı akımı kontrol eder. Elektrot yüzeyine madde geldikçe difüzyon tabakası kalınlaşır. Bu da difüzyon hızını azaltır ve buna bağlı olarak da akım azalmaya başlar.

CV'de elde edilen pik akımının büyüklüğünü etkileyen faktörler şunlardır;

- elektroaktif maddenin derişimi,
- aktarılan elektron sayısı,
- elektrot yüzey alanı
- difüzyon katsayısı

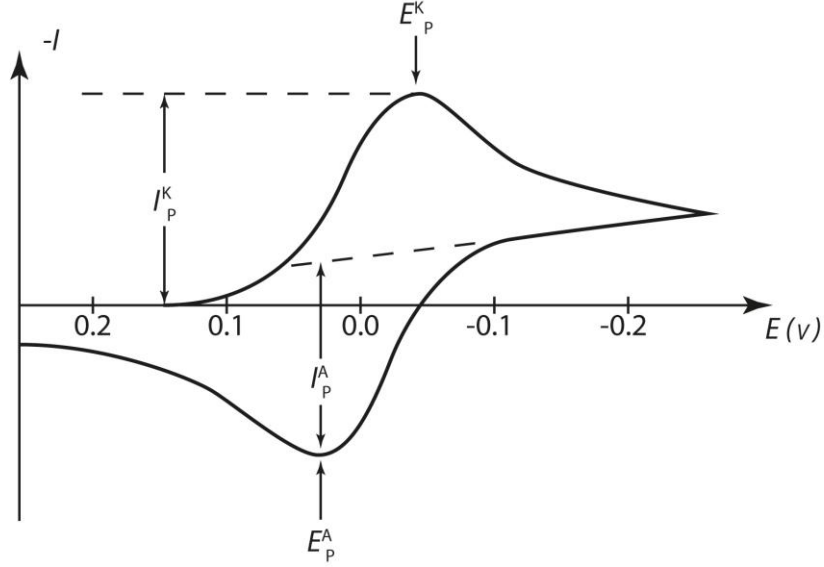
Tersinir Reaksiyonların Dönüşümlü Voltamogramı

Elektrot reaksiyonu,



şeklinde olduğu durumlarda başlangıçta çözeltilde yalnızca O maddesi bulunduğu varsayılır. Eğer gerçekleşen tek kimyasal reaksiyon, elektron aktarımı ise ve elektrot yüzeyinde adsorpsiyon olayı meydana gelmiyor ise $i - E$ grafiği pik şeklinde gözlenir. Pik yüksekliği tarama hızı arttıkça artar.

Potansiyel taraması geriye doğru yapıldığında tarama hızlı ise elektrot yüzeyinde yeteri kadar R bulunduğu için, E° değerinden itibaren daha pozitif potansiyellerde R yükseltgenmeye başlayacaktır. R yükseltgenmeye başlayıp ters taramada anodik pik oluşacaktır. Bu sırada E° değerine kadar O indirgenmeye yani R oluşmaya devam edecektir. Ters taramada potansiyel pozitifleştikçe Nernst eşitliğine göre R yüzey derişimi azalacak ve yeteri kadar pozitif değerlerde sıfıra gidecektir. Ters taramada potansiyel pozitifleştikçe Nernst eşitliğine göre R yüzey derişimi azalır ve yeteri kadar pozitif değerlerde sıfıra gider. Deney sırasında yüzeyde oluşan R, çözeltiliye doğru difüzlenir. Bu yüzden ters tarama akımı katodik akımdan biraz daha düşük olur. Bundan dolayı ters pik akımı (anodik akım) katodik akımdan biraz daha düşük olur.



Şekil 2.18. Tersinir bir sisteme ait CV voltamogramı [50].

Şekil 2.18' de verilen tersinir bir $O + ne^- \leftrightarrow R$ tepkimesinin dönüşümlü voltamogramı aşağıdaki gibidir. Tersinir sistemlerde bütün potansiyellerde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyük olduğu için elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerlidir.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[R]}{[O]} \quad (2.1)$$

Tersinir bir elektrot reaksiyonunun pik akımı ise 25°C sıcaklıkta Randles – Sevcik eşitliği ile gösterilir.

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.2)$$

i_p : Pik akımı, Amper

D_0 : O türünün difüzyon katsayısı, cm^2 / s

v : Tarama hızı, V / s

C_0 : O türünün ana çözelti derişimi, mol / cm^3

n : Aktarılan elektron sayısı

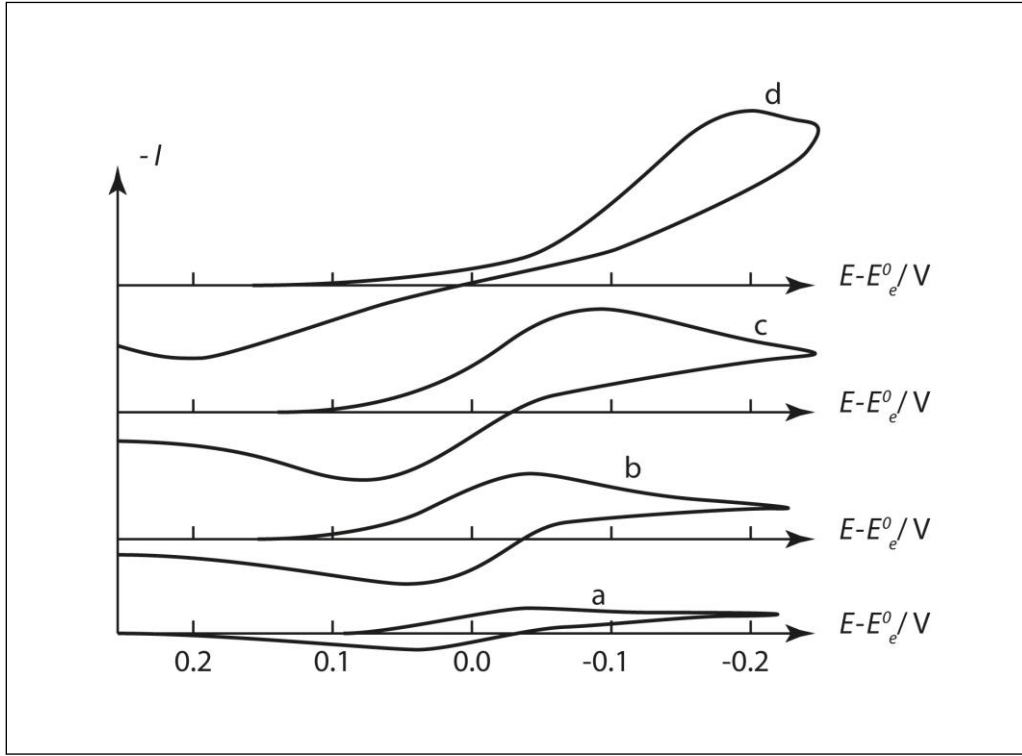
CV verileri ile bir reaksiyonun tersinirlik testi yapılabilir. Eğer $I_p - v^{1/2}$ grafiği doğrusal ise ve orjinden geçerse sistem tersinirdir. Buna ilaveten bir sistemin tersinir olup olmadığı şu özelliklerin bulunmasıyla tespit edilir.

1. $I_p - v^{1/2}$ grafiği doğrusal olmalıdır.
2. $E_p^k - E_p^a = 59/n$ mV veya $E_p - E_{p/2} = 57/n$ mV olmalıdır.
3. ΔE_p , tarama hızı ile değişmemelidir.
4. $i_p^a / i_p^k = 1$ olmalıdır.
5. E_p 'ten daha negatif potansiyellerde I^2 , t ile orantılı olmalıdır [53].

Tersinmez Reaksiyonların Dönüşümlü Voltamogramı

Tersinmez sistemlerde elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerli değildir. Bu durumda CV voltamogramı tersinir durumdan farklıdır. Tamamen tersinmez bir sistemde genellikle ters tarama piki (anodik pik) gözlenmez. Ancak dikkat edilmesi gereken bir husus vardır ki o da; anodik pikin gözlenmeyişi mutlaka elektron aktarım basamağının tersinmez olduğunu göstermez. Şöyle ki elektron basamağını takip eden çok hızlı bir kimyasal tepkimede oluşan ürün hızlı bir şekilde başka maddeye dönüşür. Bu da ters taramada yükseltgenme gözlenmemesine neden olabilir.

Tersinmez durumlarda tarama hızı çok düşük olduğunda elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından daha yüksek olur. Bu da sistemin tersinir gibi gözlenmesine neden olur. Tarama hızı arttıkça kütle aktarım hızı elektron aktarım hızı ile aynı seviyeye gelir. Bu durumda tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik potansiyelleri birbirinden uzaklaşır (Şekil 2.19). Tersinir durumda E_p^k , tarama hızının bir fonksiyonu değildir. Ancak tersinmez durumda E_p^k , v ile değişir. Tersinmez elektron aktarım reaksiyonlarında standart hız sabiti, tersinir reaksiyonlardakine göre daha küçüktür.



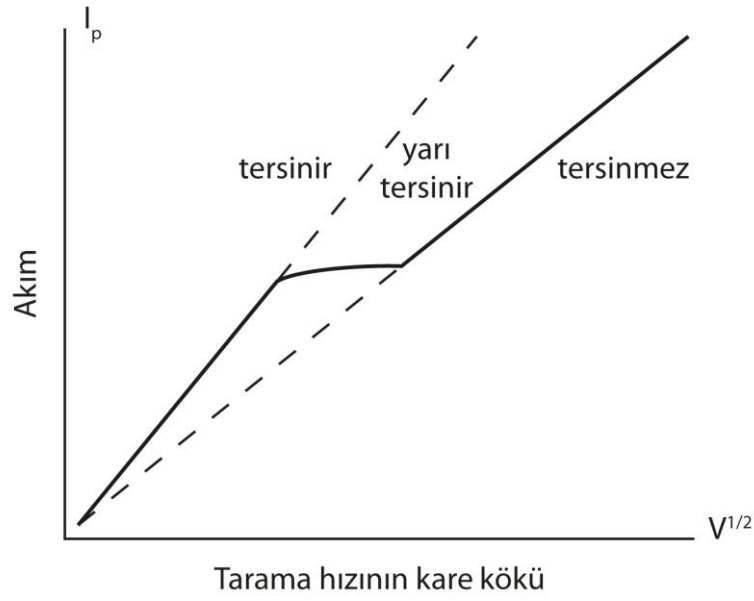
Şekil 2.19. Tersinmez bir elektrot reaksiyonunda CV ile farklı tarama hızlarında anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması. v; a) 0,13 V/s b)1,3 V/s c) 4 V/s d) 13 V/s [8].

Dönüşümlü voltametri ile bir reaksiyonun tersinmez olduğunu tespit etmek için şu özelliklerden faydalanılır [50].

1. Anodik pik gözlenmez.
2. \dot{I}_p^k , tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olarak değişir.
3. E_p^k kayması tarama hızındaki 10 kat artmada $30/\alpha_c n_\alpha$ kadardır.
4. $|E_p - E_{p/2}| = 48/(\alpha_c n_\alpha)$ mV

Yarı Tersinir Reaksiyonların Dönüşümlü Voltamogramı

Yarı tersinir reaksiyonlarda akım hem difüzyon hızı hem de elektron aktarım hızı ile birlikte kontrol edilir. Tersinir, yarı tersinir ve tersinmez durumlar için akım, tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirilirse Şekil 2.20' deki gibi bir grafik elde edilir.



Şekil 2.20. Dönüşümlü voltametri de pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi [50].

Tarama hızındaki artış ile sistemin tersinir durumdan tersinmez duruma geçişi görülmektedir. Dönüşümlü voltametri de bir sistemin yarı tersinir olup olmadığı şu özelliklerin bulunmasıyla tespit edilir [50].

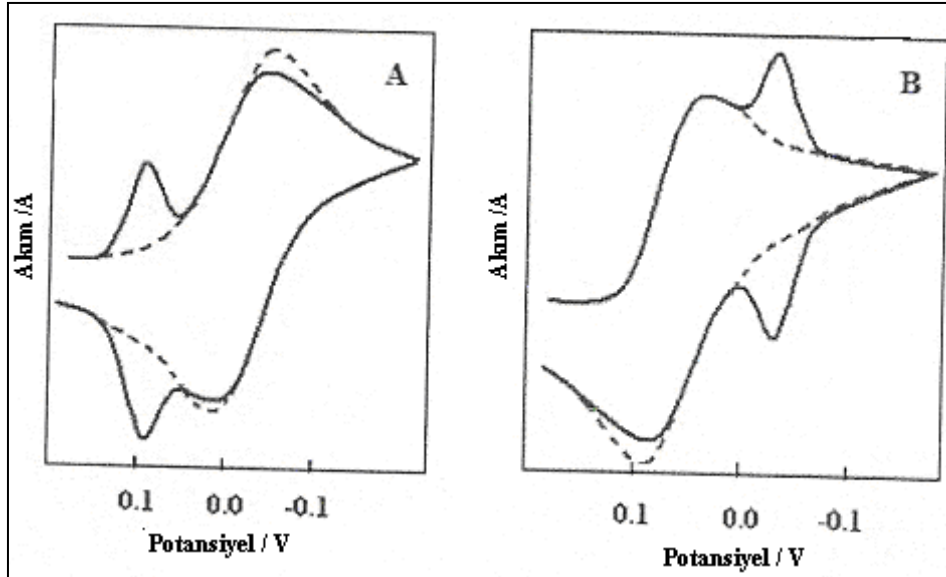
1. I_p , $v^{1/2}$ ile artar ancak doğrusal değildir.
2. E_p^k , tarama hızı ile değişir bu değişim genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.
3. $I_p^a / I_p^k = 1$ olmalıdır. ($\alpha = 0.5$ ise)
4. $E_p^k - E_p^a$ farkı düşük tarama hızlarında $59/n$ 'e yaklaşmalıdır.

2.9.1.2. Adsorpsiyonun CV ile incelenmesi

Çözelti içerisindeki iyon veya moleküllerin elektrot yüzeyine adsorpsiyonları farklı şekillerde olabilir [8]. İyon veya molekül, elektrot yüzeyine adsorbe olunca aralarında bağ oluşur. Bu bağ, anyon ve katyonlarda elektrostatik karakterli olabildiği gibiyüklü elektrot yüzeyi ile dipol özellikteki moleküller arasında yük – dipol etkileşmesi şeklinde de olabilir [50]. Elektrot yüzeyine elektroaktif maddelerin, ara ürünlerin veya son ürünlerin adsorplanması elektrot reaksiyonunu etkiler.

Elektrot reaksiyonunda doğrudan yer almayan iyon veya moleküllerin adsorplanması sonucu elektron aktarım hızı etkilenir. Bu da elektrot reaksiyonunun mekanizmasını değiştirerek farklı ürün oluşumuna yol açabilir. Tüm bu nedenlerden dolayı, beklenmeyen elektrokimyasal davranışlar adsorpsiyon olayına bağlanır.

Adsorpsiyonda iki farklı grafik gözlenir. Elektroaktif maddenin ürünü kuvvetli bir şekilde adsorbe olduğunda, elektroaktif maddenin pikinden önce küçük bir adsorpsiyon piki gözlenirken (Şekil 2.21. a), elektroaktif maddenin kendisi yüzeyde kuvvetli bir şekilde adsorbe oluyorsa normal pikten sonra ayrı bir adsorpsiyon piki gözlenir (Şekil 2.21. b).



Şekil 2.21. (A) Ürünün kuvvetli adsorpsiyonunda ve (B) Reaktantın kuvvetli adsorpsiyonunda gözlenen dönüşümlü voltamogramları [50,57].

Ürün kuvvetli bir şekilde adsorbe oluyorsa aşağıdaki şekilden de görüldüğü gibivoltamogramda bir ön pik gözlenir. Bu ön pikin yüksekliği tarama hızıyla doğru orantılı olduğu için ve difüzyon pikinin akımı ise tarama hızının karekökü ile arttığı için $\frac{(i_p)_{ads}}{(i_p)_{dif}}$ oranı tarama hızı arttıkça artar. Reaktant kuvvetli adsorbe olduğu zaman, difüzyon pikinden sonra gözlenen arka pik, adsorbe olmuş türün çözeltideki türe göre daha kararlı olmasından dolayı oluşur. Gözlenen bu arka pik

tarama hızındaki artış ile artar [51]. Dönüşümlü voltametri tekniği ile kuvvetli ve zayıf adsorpsiyonun varlığı aşağıdaki testlerle belirlenir [50].

1. CV voltamogramlarında ön pik veya arka pik gözlenmelidir.
2. $\log(\dot{I}_p) - \log(v)$ grafiğinin eğimi 0,5'ten büyük olmalıdır
3. Akım fonksiyonu ($\dot{I}_p / C_v^{1/2}$) tarama hızı ile artmalıdır.
4. Derişim artışı ile \dot{I}_p / C oranı azalmalıdır.
5. $\dot{I}_p / C_v - v$ değişimi sabit olmalıdır.

Kuvvetli adsorpsiyon gerçekleşiyorsa anodik taramadaki pik, potansiyel eksenine göre katodik pik ile simetriktir.

İdeal bir tersinir reaksiyon için, Langmuir izotermi şartlarında anodik pik potansiyelinin katodik pik potansiyeline eşit olması gerekir. Bu durumda anodik ve katodik piklerin yarı yüksekliğindeki genişliği Eşitlik 2.3 gibi olur.

$$\Delta E_{p/2} = 3,53 \frac{RT}{nF} = \frac{90,6}{n} mV (25^{\circ}C) \quad (2.3)$$

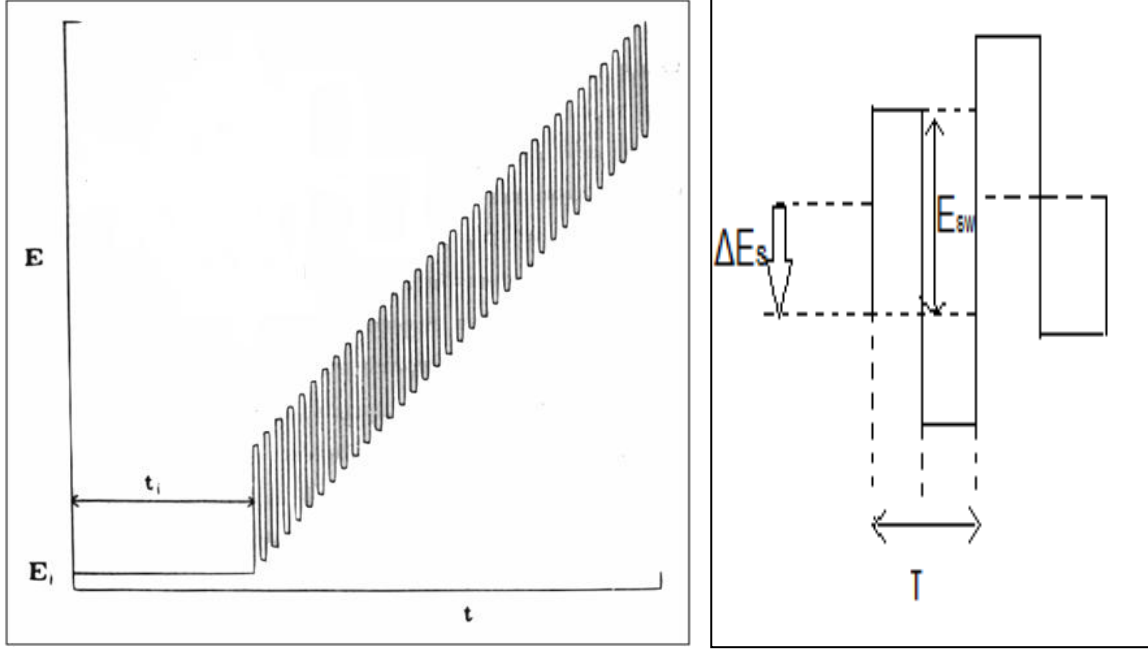
Pik akımını veren bağıntı ise Eşitlik 2.4'deki gibi olur.

$$\dot{I}_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_o^* \quad (2.4)$$

Bu eşitlikten yararlanılarak elektrot yüzeyine adsorbe olan madde miktarı (Γ) da hesaplanır [8].

2.9.1.3. Kare Dalga Voltametrisi

Kare dalga voltametrisi (SWV) hem teorik hem de cihaz geliştirilmesi bakımından Barker tarafından geliştirilmiştir. Hızlı ve duyarlı bir yöntem olan kare dalga voltametrisinin sabit elektrotlarda potansiyel-zaman dalga şekli Şekil 2.22'de görülmektedir [50, 56].



Şekil 2.22. Kare dalga voltametrisi için potansiyel-zaman dalga şekli ve akım ölçümü; ΔE_s : adım yüksekliği, E_{sw} : puls genişliği, τ : periyot [8].

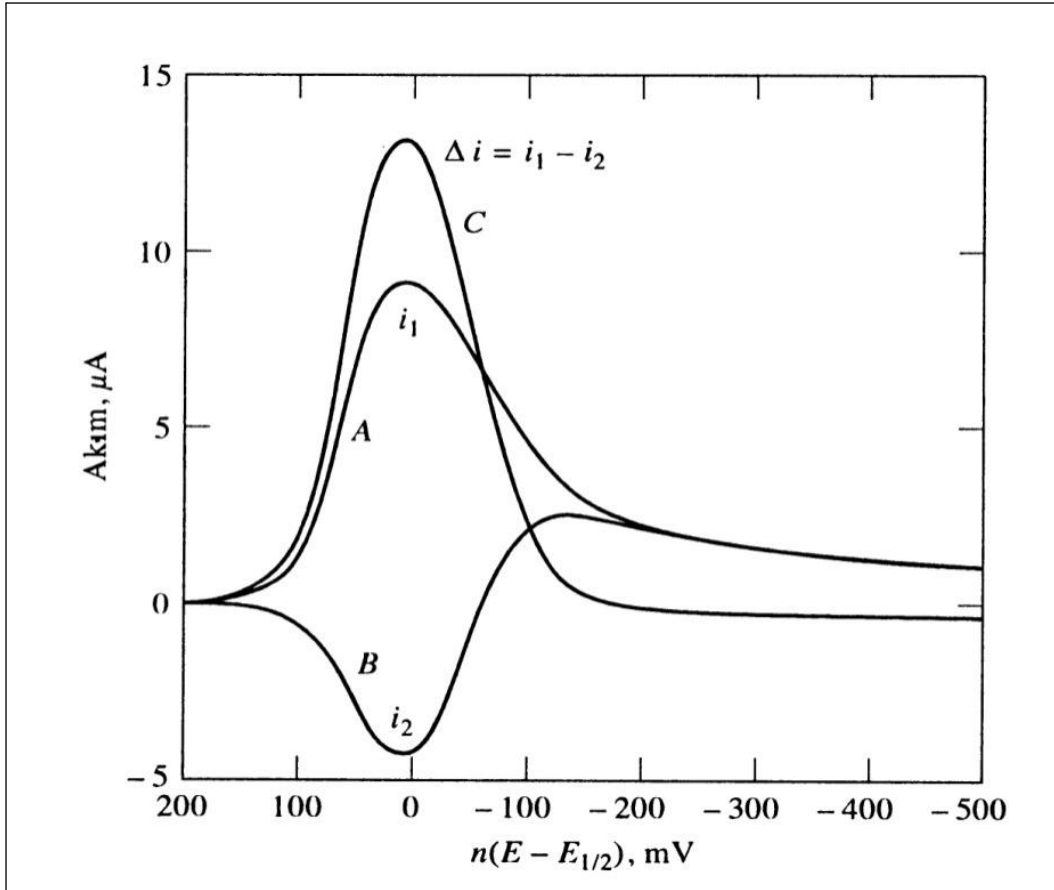
Şekilden de görüldüğü üzere dalga şekli, simetrik kare dalgalardan oluşan merdiven görünüşündedir. Potansiyel-zaman dalga şeklini oluşturan bu simetrik kare dalgalardan, bir kare dalganın tamamlanma süresi olan periyod, τ ile gösterilir ve yaklaşık 5 ms civarındadır [8]. Birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkı *basamaklı adım yüksekliği* (*sinyalin potansiyel basamağı*) dir ve ΔE_s ile gösterilir. Bu da genelde ΔE_s 10 mV'dur. Herbir dalganın alt ve üst noktaları arasındaki farkın yarısına *kare dalga genişliği* (E_{sw}) denir. Puls genişliği (t_p) ise $\tau/2$ 'ye eşittir. Genellikle periyod yerine $1/\tau$ a eşit olan frekans (f) kullanılır. Frekansın artması ve buna bağlı olarak periyodun azalması ile kare dalga pik akımı ve hassasiyet artar. Kare dalga voltametrisinde deneysel parametrelerin genellikle seçildiği aralıklar;

frekans $10 \leq f \leq 1000$ Hz

periyod $1 \leq \tau \leq 100$ ms

Basamaklı adım yüksekliği ise aktarılan elektron sayısına (n) bağlı olarak $\Delta E_s = 10/n$ mV eşitliğinden bulunarak kullanılır. E_{sw} ise genelde $\frac{50}{n}$ mV'dur.

Kare dalga voltametrisinde akım ölçümleri ileri ve geri pulsların sonuna doğru t_s kadar bir zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 olmak üzere her bir kare dalganın net akımı $\Delta i = i_1 - i_2$ 'ye eşittir. Bu net akım (Δi) *ileri fark akımı* olarak adlandırılır. Δi farkı potansiyele karşı grafiğe geçirildiğinde voltamogram tek pik şeklinde elde edilir [50].



Şekil 2.23. Tersinir bir reaksiyon için uyarma sinyaline akım cevabı, A, (i_1) ileri akım; B, (i_2) ters akım; C, ($i_1 - i_2$) akım farkı [8]

Oluşan pik potansiyeli de polarografik yarı dalga potansiyeline karşılık gelir. Kare dalga voltametrisinde ölçüm son derece hızlı yapılır. Tarama hızı, frekans ve periyod ile adım yüksekliğine bağlı olarak aşağıdaki gibi belirlenir. Belirlenen bu tarama hızına etkin tarama hızı (ETH) denir.

$$ETH = f \times \Delta E_s = 1/\tau \times \Delta E_s \quad (2.5)$$

ΔE_r kadar bir potansiyel aralığında tarama yapmak için sadece τ ($\Delta E_r / \Delta E_s$) kadar bir zaman gereklidir. Uygun frekansların seçimi ile deney süreleri çok azaltılabilir. Örneğin $n=1$ iken $\Delta E_s = 10$ mV ve $f = 200$ Hz ($\tau = 1/200$) ise, $ETH = 2$ V/s'dir. 500 mV'luk (ΔE_s) bir potansiyel aralığını tarayabilmek için gerekli olan süre sadece 0.25 s'dir. Bu da birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğinin artırılmasını mümkün kılar. Bu yöntemin tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} M arasındadır. Bu nedenle bu teknik en hassas ve hızlı elektroanalitik teknikler arasındadır. Bundan dolayı SWV hızlı taramalı teknik olarak tanımlanır [8].

2.9.1.4. Sıyırma Voltametrisi

Sıyırma voltametrisi elektrokimyasal ya da fiziksel herhangi bir yolla elektrotta biriktirilen maddelerin analizi için kullanılır. Bu yöntemde iki basamak vardır. Birinci basamakta çözelti karıştırılarak analitin çalışma elektrotu üzerine elektrokimyasal yolla veya sabit potansiyelde herhangi bir kimyasal değişikliğe uğratılmadan doğrudan doğruya elektrot yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla adsorbe edilerek birikmesi sağlanır. İkinci basamak sıyırma basamağıdır. Bu basamakta elektrot üzerinde biriktirilmiş olan madde sinüs dalga, puls, diferansiyel puls veya kare dalga gibi potansiyel-zaman dalga şekilleri kullanılarak voltametrik yöntemlerden biri ile sıyırılır. Elektrolizdeki önderiştirme basamağı, sıyırma yöntemleri ile eser element tayini yapmaya olanak sağlar. Bu yöntemlerle 10^{-6} - 10^{-9} M arasında analiz yapılabilir. Sıyırma voltametrisi ile bir maddenin analiz edilebilmesi için; maddenin kararlı olması ve çözelti tarafından tutulması gereklidir. Biriktirme basamağında ürünün çözeltiliye geri difüzyonla geri difüzyonunun için cıva elektrotta çözünmemesi gerekir. Ayrıca çözünmeyen bir ürün oluşuyorsa çok fazla seyrelmelerde bile çözünmemelidir. Ancak yüksek dirençli bir tabaka oluşturmamalıdır. Son olarak biriken maddenin sıyırma piki oluşturabilmesi için biriken madde tekrar oksitlenme kabiliyetinde olmalıdır [8].

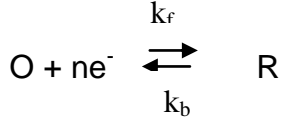
Elektrot üzerine biriken maddelerin miktarı, maddelerin ve çözeltinin özelliği, elektrot malzemesi ve boyutu, potansiyel, zaman, pH, iyonik güç, maddenin elektrodta taşınması, sıcaklık, biriktirme süresi ve çözeltinin karıştırılma hızı gibi faktörlerden etkilenir. Karıştırma, çok yavaş olursa daha az madde birikir ve ürünün geri kazanılma verimi artar. Bu durumda daha çok zaman harcanır ve

duyarlılık azalır. Bazen çözelti hiç karıştırılmadan, yalnız difüzyonla madde göçü sağlanarak da biriktirme yapılabilir. Biriktirme süresi de analizin duyarlılığını etkiler. Elektrot yüzeyine madde birikimi ile duyarlılık doğru orantılıdır. Maksimum duyarlılık maddenin tamamının elektrot yüzeyine toplanmasıyla elde edilir. Çözeltide ve elektrot yüzeyinde tepkimeler tersinirdir. Bu nedenle elektrot yüzeyinde biriktirilen madde sıyırma işleminden sonra tekrar çözeltilmeye geçer. Bu noktada uzun süre madde birikimi de maddenin geri kazanımını engelleyebilir. Ayrıca uzun bekleme sonucunda elektrot yüzeyine istenmeyen tepkimeler oluşabilir. Ürün kararsız olabilir ve elektroaktif bir hale dönüşebilir. Biriktirme esnasında elektrota uygulanan potansiyel, pik yüksekliğini etkilediğinden normal sıyırma voltametri ile analizi yapılacak maddenin yarı dalga potansiyelinden birkaç yüz milivolt daha yüksek potansiyelin uygulanması gerekir. Çünkü normal sıyırma voltametrisinde maddeler elektrot yüzeyine bir kimyasal tepkime ile biriktirilirken; adsorptif katodik sıyırma voltametri (adsorptive cathodic stripping voltammetry, AdSV)'nde uygulanacak potansiyelin herhangi bir kimyasal tepkimeye yol açmayacak değerde tutulması gerekir. Bu nedenle AdSV'de bu potansiyel artık akım bölgesinden seçilmelidir.

Sıyırma voltametrisinde karışımdaki maddelerin aynı anda analizi mümkündür. Biriktirme potansiyeli özellikle karışım analizlerinde önemlidir. Birkaç tane metal iyonu içeren bir çözeltiden biriktirme yapılırken sıyırma esnasında analitin pikine girişim yapabilecek bileşenler bilinmeli ve biriktirme potansiyeli buna göre seçilmelidir. Çok sayıda maddenin bulunduğu bir çözeltide girişim yapma ihtimali biriktirme potansiyelinin negatifliği arttıkça artar. Sıyırma voltametrisinde asılı duran cıva damlası veya bir katı elektrot kullanılır.

2.9.1.5. Kronoamperometri (CA)

Kronoamperometride çözeltiliye daldırılmış olan çalışma elektrodu potansiyeli birden değiştirilerek durgun ortamda akım–zaman ilişkisi gözlenir. Elektrot yüzeyinde;



reaksiyonu gerçekleşir. Başlangıçta çözeltide O maddesinin olduğu durumda çalışma elektroduna herhangi bir redoks reaksiyonunun olmadığı E1 potansiyeli uygulanır. E1 için elektroaktif maddenin indirgenmediği ve artık akımın olduğu herhangi bir potansiyel seçilir. CV voltamogramının pik potansiyelinin ötesinde bir potansiyelde, indirgenme difüzyon kontrollü olacak şekilde E2 potansiyeli seçilerek aniden elektrodun potansiyeli E2'ye değiştirilir ve potansiyel E2 de sabit tutulur.

E2 potansiyelinde oluşan akımın zamanla değişimi Cottrell eşitliğinde verildiği gibidir.

$$I = \frac{nFAD^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (2.6)$$

I = Akım, A

n = Aktarılan elektron sayısı

F = Faraday sabiti, C/eq

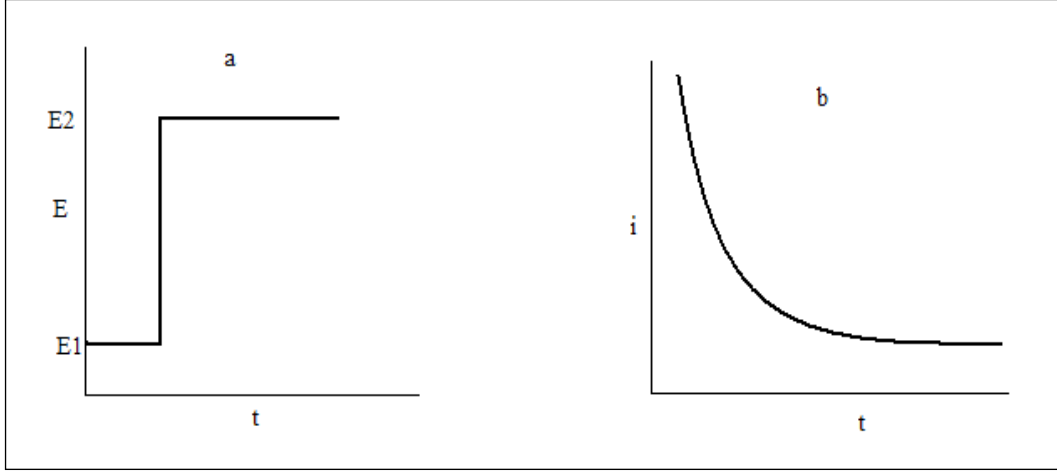
A = Elektrot alanı, cm²

D^{1/2} = Difüzyon katsayısı, cm²/s

C₀ = Maddenin derişimi, mol/cm³

t = zaman, s

Bu potansiyelde oluşan akımın zamanla değişimine bakılır (Şekil 2.24). Oluşan akım grafikten de görüldüğü gibi zamanın karekökü ile azalır.



Şekil 2.24. Kronoamperometride (a) potansiyel-zaman ve (b) akım-zaman ilişkisi [8].

Akım değerleri $t^{-1/2}$ ye karşı grafiğe geçirildiğinde orijinden geçen bir doğru elde edilir. Kronoamperometri tekniği bir maddenin difüzyon katsayısının bulunmasında, elektron aktarım reaksiyonunun hız sabitinin hesaplanmasında, elektron aktarım basamağına eşlik eden bir kimyasal reaksiyonun hız sabitinin bulunmasında kullanılır. Ayrıca bu teknikle elektrot reaksiyonunun mekanizması ve elektrotta bir adsorpsiyon olayı meydana gelip gelmediği belirlenebilir. Zaman aralığının geniş tutulması deneyin güvenilirliğini arttırır [8,50].

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Maddeler

Kalıp molekül olarak kullanılan L-fenilalanin Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. firmasından temin edilmiştir. Deneyde kullanılan 3-karboksitiyofen Sigma firmasından (St. Louis, ABD) temin edilmiştir. Diğer kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiş olup analitik safıktadır. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROPure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

3.2. L-Fenilalanin Baskılanmış Elektrokimyasal Sensörün Sentezi

3.2.1. Tiyofen-3-Karbonil Triptofan Monomerinin Sentezi

3-Karboksitiyofen (5 mmol), tiyonil klorür (5 mmol), 1H-benzotriazol (20 mmol) içeren THF (15 mL) çözeltisine 25°C ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı, 20 dakika 35-40°C'de karıştırılmıştır. Tepkime karışımı, buz banyosunda soğutulmuş ve 5 mL THF'da çözünmüş N-ucu kapalı L-triptofan (5 mmol) damla damla ilave edilmiştir. 25°C'de 2 saat karıştırıldıktan sonra tepkime sırasında oluşan beyaz çökelek alınmış ve filtrat düşük basınç altında deriştirilmiştir. Kalıntı 100 mL etil asetat (EtOAc) ile seyreltilmiş ve çözelti doygun Na₂CO₃ çözeltisi ile (3 × 50 mL) yıkanmış ve susuz MgSO₄ ile kurutulmuştur. Düşük basınçta çözücünün uzaklaştırılmasıyla son ürün, tiyofen-3-karbonil triptofan (TP3C-Trp) elde edilmiştir.

3.2.2. Tiyofen-3-Karbonil-L-Triptofan Monomerinin Karakterizasyonu

3.2.2.1. FTIR Analizi

TP3C-Trp monomerinin FTIR spektrumu için FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır. Bunun için TP3C-Trp monomeri (2 mg), KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılarak, tablet haline getirilmiştir. FTIR spektrumu 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında alınmıştır.

3.2.2.2. NMR Analizi

TP3C-Trp monomerinin proton (^1H) ve karbon (^{13}C) NMR spektrumları, CDCl_3 içerisinde JEOL GX-400 300 MHz (Japonya) NMR cihazı kullanılarak alınmıştır. Kimyasal kaymalar (δ) ppm cinsinden CDCl_3 referans alınarak rapor edilmiştir.

3.3. Elektrokimyasal Sensörün Hazırlanması

Voltametik çalışmalar Ivium marka Compactstat model (Ivium Technologies B.V., The Netherlands) elektroanalizör ile yapılmıştır. Deneylerde referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel, çalışma elektrodu olarak altın elektrot kullanılmıştır. Molce oranı 1:1 olacak şekilde 5'er mL L-Phe ve TP3C-Trp çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra kalıp molekülle fonksiyonel monomerin etkileşmesi için çözeltiler, 3 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu çözeltiden 5 mL alınıp molce 1:4 olacak şekilde 5 mL tiyofen çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiler de karıştırılarak polimerizasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu polimerizasyon çözeltisinden 50 μL alınarak Au yüzeye damlatılmıştır. Hazırlanan Au plaka bir gün boyunca kurutulmuştur. Çalışma elektrodu bu şekilde hazırlandıktan sonra diğer elektrotlarla cihaza bağlanmıştır. Elektrotlar, destek elektrolit olarak 0.1 M pH 7.0 fosfat tamponundan 3 mL içeren hücreye daldırılmıştır. Bu sisteme dönüşümlü voltametri uygulanarak -900 mV ila + 900 mV arasında potansiyel uygulanarak elektropolimerizasyon yapılmıştır. 10 defa tarama yapılarak yüzeyde polimerizasyon sağlanmıştır.

3.3.1. Kalıp Molekülün Desorpsiyonu

TP3C-Trp monomeri ve L-fenilalanin arasında ikincil kuvvetlerden kaynaklanan ortak etkileşimler söz konusudur. Ancak temel etkileşimler, TP3C-Trp monomeri ve L-fenilalanin arasındaki hidrojen bağları ve aromatik halkadan kaynaklanması muhtemel hidrofobik etkileşimlerdir. Kalıp molekül olan fenilalaninin polimerik yapıdan sökülebilmesi için yukarıdaki etkileşimleri kırabilecek bir desorpsiyon ajanının kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla desorpsiyon ajanı olarak 1M etilen glikol çözeltisi kullanılmıştır. Kalıp molekülün desorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Altın yüzeye tutturulan L-fenilalanin baskılanmış polimer üzerine desorpsiyon çözeltisi (20 mL) eklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörde oda

sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanmıştır (200 rpm). Desorbe edilen sensör, deiyonize su ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 25°C) kurutulmuştur.

3.4. L-Fenilalaninin Elektrokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.1. Dönüşümlü Voltametri Deneyleri

Bu yöntemde çalışma elektrodu olarak altın elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücreye pH 3.0 -9.0 aralığında 3.0 mL pH 7.0, 0.05 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (1:1) tamponu konup, çözültiden 10 dk azot gazı geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda azot gazı çözültinin üzerine gönderilmeye başlanmıştır. 25 mV/s tarama hızlarında 10^{-6} M derişimde L-fenilalanin çözültisinin dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir.

3.4.2. Kronoamperometri Deneyleri

Bu yöntemde çalışma elektrodu olarak altın elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücreye 3.0 mL pH 7.0, 0.05 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (1:1) tamponu konup, çözültiden 10 dk azot gazı geçirilmiştir. $[(-900) - (+900)]$ mV'luk potansiyel aralığında 50.00 ng/mL derişiminde L-fenilalanin çözültisinin kronoamperometrik voltamogramları tek yönlü olarak kaydedilmiştir.

3.5. Elektrokimyasal Sensörün Karakterizasyonu

3.5.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

Elektrokimyasal sensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Ölçüm yapılan örnek haznesinden 10 dk azot gazı geçirilerek havadan kaynaklanan nem ve karbondioksit uzaklaştırılmıştır. Elektrokimyasal sensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülerek spektrumlar alınmıştır.

3.5.2. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

Elektrokimyasal sensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği

ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Elektrokimyasal sensör çift yüzlü karbon bant ile örnek tutucuya yerleştirilmiştir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 kHz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1 V_{RMS} ve boş titreşim genliği ise 2 V_{RMS} 'dir. Örnekler 2 $\mu\text{m/s}$ tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 2 x 2 μm 'lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır.

3.5.3. Elipsometre

Hazırlanan sensörlerin yüzeylerindeki kalınlık ölçümleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal sensör lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiştir. Yüzey kalınlığı hesaplama program için 50 nm altın + 50 nm polimer katmanı veri olarak öngörülmüştür. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir.

3.5.4. Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı ölçümleri için KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Elektrokimyasal sensörlerin yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla (Sessile Drop) yöntemiyle temas açısı belirlenmiştir. Çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatmak suretiyle 10 ayrı fotoğraf çekilmiş ve her biri için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Belirlenen temas açı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki noktanın ortalaması olan ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş ve edilmiş sensör yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan 10 ölçümün ortalama değerleri hesaplanmıştır.

3.6. Elektrokimyasal Sensörle Kinetik Analizler

L-Fenilalanin baskılanmış elektrokimyasal sensörün hazırlanmasından sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerdeki L-fenilalanin çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler pH: 7.0 fosfat tamponuyla 0.01-0.5 nM derişimleri arasında hazırlanarak elektrokimyasal sensör sistemine verilmiştir.

Elektrokimyasal sensör sistemi; çalışma, karşıt, referans elektrotlardan oluşan hücre sistemi ve hücre sisteminin bağlı olduğu, verilerin okunduğu potansiyostat cihazından oluşmaktadır (Şekil 3.1.). Çalışma elektrotlarının temizliği 0.05-0.1 μM boyutunda alümina çözeltileri ile yapılmıştır. Yüzeyine L-fenilalanin baskılanmış ve baskılanmamış elektrokimyasal sensörler, kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Hücre sistemi (solda) ve hücre sisteminin bağlı olduğu, verilerin okunduğu potansiyostat cihazı (sağda).

Destek elektrolit olarak seçilen pH 7.0 0.05 M $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ (1:1) tamponundan 3.0 mL alınarak elektrokimyasal hücreye konulmuş ve 10 dakika azot gazı geçirilmiştir. Deney esnasında azot gazı çözelti üzerine gönderilmiştir. Farklı tarama hızlarında CV ile L-fenilalaninin davranışı incelenmiş, optimum potansiyel bulunmuştur. Daha sonra belirlenen potansiyelde SWV kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Kronoamperometri yöntemi ile de difüzyon katsayısı hesaplanmıştır. Bunun için SWV yönteminde 400 mV; CV ve CA yöntemlerinde ise -900 mV ve +900 mV'luk biriktirme potansiyelleri uygulanmıştır. Hücreye mikropipet yardımıyla μL düzeyinde standart L-fenilalanin çözeltisinden eklenmiş ve bir dakika N_2 gazı geçirildikten sonra artan derişimlerde L-fenilalanin

eklenerek deney tekrarlanmış ve voltamogramlar kaydedilmiştir. Elde edilen kinetik veriler, Iviumstat yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.7. Yarışmalı Kinetik Analizler

Çalışma elektrodunun yüzeyindeki L-fenilalanin baskılanmış polimerin seçiciliğini göstermek için L-fenilalanin, D-fenilalanin ve triptofan kullanılmasıyla hazırlanan çözeltiler elektrokimyasal hücre sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler, fosfat tamponu (pH:7.0) içerisinde 1 nM derişiminde hazırlanmıştır. Yarışmacı molekül deneyleri için farklı potansiyeller aralığında CV yöntemi ile belirli potansiyel aralığında akım karakteri ölçülmüştür. Çözeltiler elektrokimyasal hücre sistemine eklenerek sensörle etkileştirilmiş ve kinetik veriler alınarak Iviumstat yazılımı ile analiz edilmiştir.

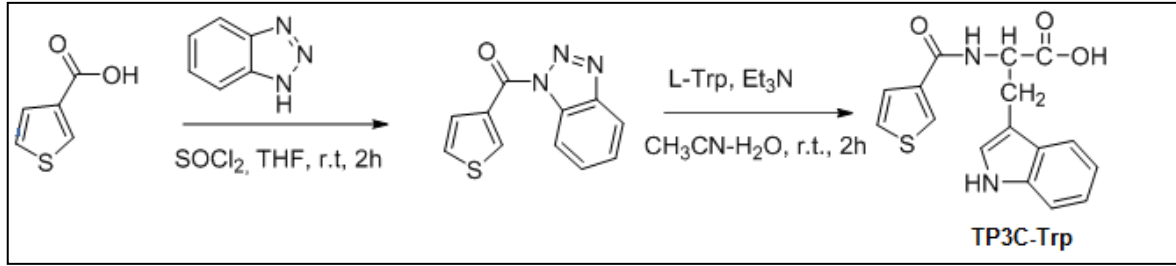
3.8. Elektrokimyasal Sensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlemesi

L-Fenilalanin baskılanmış sensörün seçiciliğini göstermek için L-fenilalanin baskılanmamış sensör de hazırlanmıştır. L-Fenilalanin, D-fenilalanin ve triptofan kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler elektrokimyasal sensör sistemine gönderilmiştir. Bu çözeltiler fosfat tamponu (pH: 7.0) içerisinde 1 nM derişiminde hazırlanmıştır. Seçicilik deneyleri için de yukarıda anlatıldığı gibi CV yöntemi kullanılmıştır. Çözeltiler elektrokimyasal sensörle etkileştirilmiş ve kinetik veriler alınarak Iviumstat yazılımı ile analiz edilmiştir.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. TP3C-Trp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

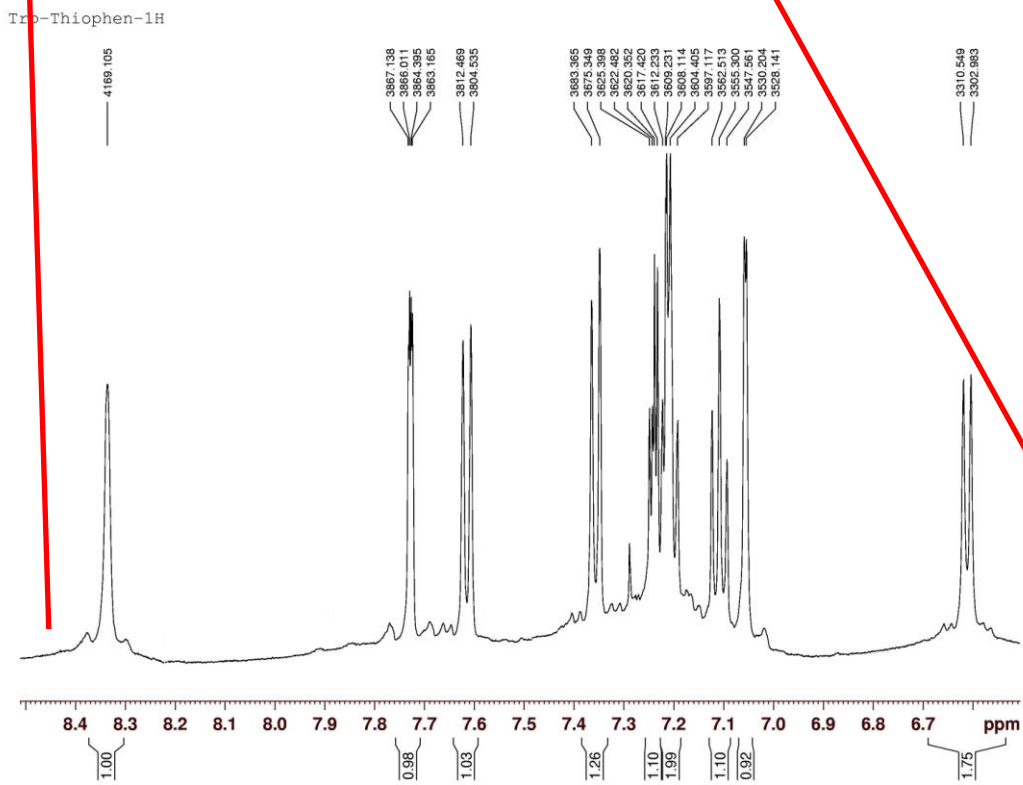
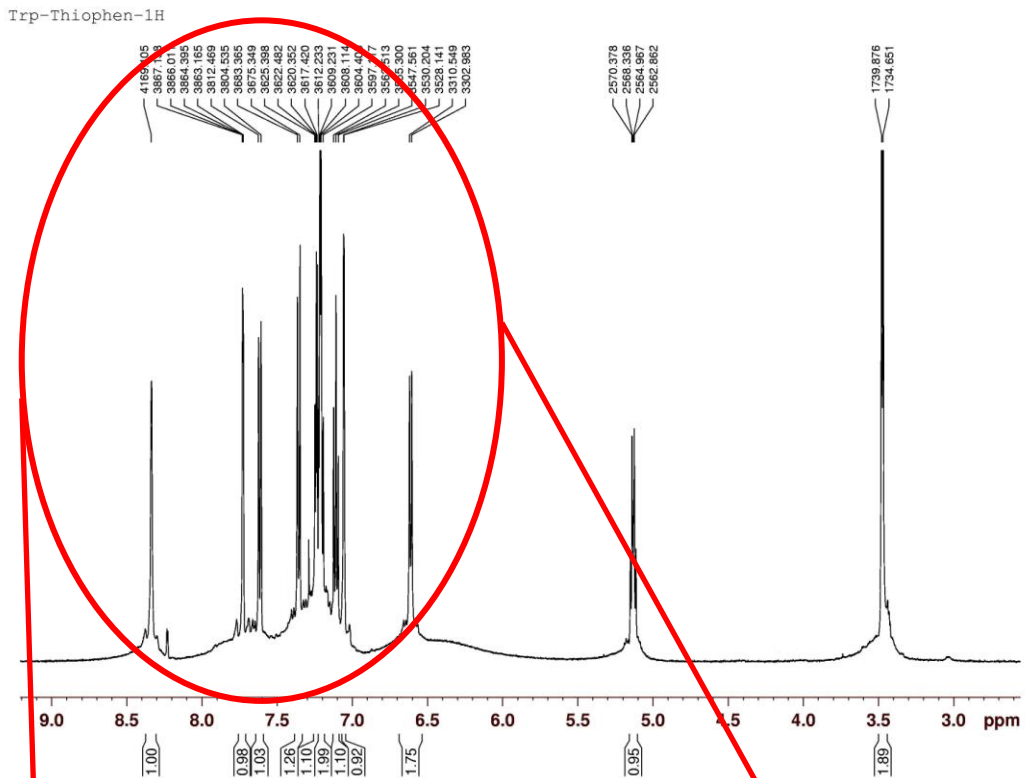
Fonksiyonel monomer, 3-karboksitiyofen ile uygun şartlar altında L-triptofanın reaksiyonu sonucu elde edilmiştir [58] (Şekil 4.1.). Elde edilen fonksiyonel monomer NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir.



Şekil 4.1. TP3C-Trp monomerinin sentez reaksiyonu.

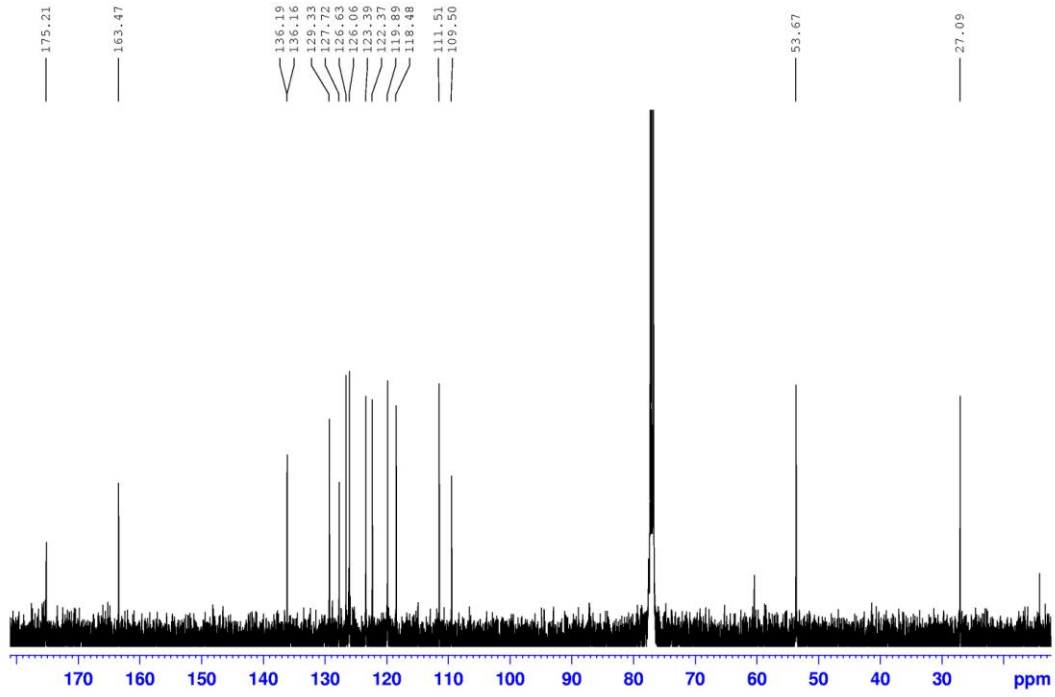
Elde edilen TP3C-Trp monomerinin proton NMR analizi sonucunda; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 C): δ = 8.34 (s, 1H), 7.30 (dd, ⁴J_{HH}= 1.17, 2.79 Hz, 1H), 7.61 (d, ³J_{HH}= 7.93 Hz, 1H), 7.35 (d, ³J_{HH}= 8.02 Hz, 1H), 7.25-7.23 (m, 1H), 7.22-7.19 (m, 2H), 7.11 (t, ³J_{HH}= 7.47 Hz, 1H), 7.06 (d, ³J_{HH}= 2.06 Hz, 1H), 6.60 (d, ³J_{HH}= 7.57 Hz, 1H), 5.10 (dd, ³J_{HH}= 2.04, 5.41 Hz, 1H), 3.49 (d, ³J_{HH}= 5.22 Hz, 2H) ppm pikleri görülmüştür. Karbon NMR analizinde ise; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 C): δ = 27.1, 53.7, 109.5, 111.5, 118.5, 119.89, 122.4, 123.4, 126.1, 126.6, 127.7, 129.3, 136.1, 136.2, 163.5, 175.2 ppm pikleri görülmüştür. NMR spektrumları fonksiyonel monomerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.

Monomerin FTIR-ATR spektrumunda; 3554 cm⁻¹'de karboksilik asit -OH bandı, 2358 ve 2256 cm⁻¹'de alifatik C-H gerilme bandları, 1745 cm⁻¹'de karbonil C=O bandı (farklı C=O varlığı nedeniyle omuz oluşumlarıyla beraber), 1556 ve 1530 cm⁻¹'de NH₂ ve NH₃⁺ gerilme bandları, 1426 cm⁻¹'de aromatik C=C gerilme bandı, 1374 cm⁻¹'de indol halkasının C-N gerilme bandı, 1270, 1227 ve 1203 cm⁻¹'de çoklu C-H eğilme bandları, 763 cm⁻¹'de tiyofen halkasının C-S-C düzlem dışı eğilme bandı belirlenmiştir. FTIR-ATR spektrumu da NMR verilerini doğrulamakta ve fonksiyonel monomer yapısının elde edildiğini göstermektedir.

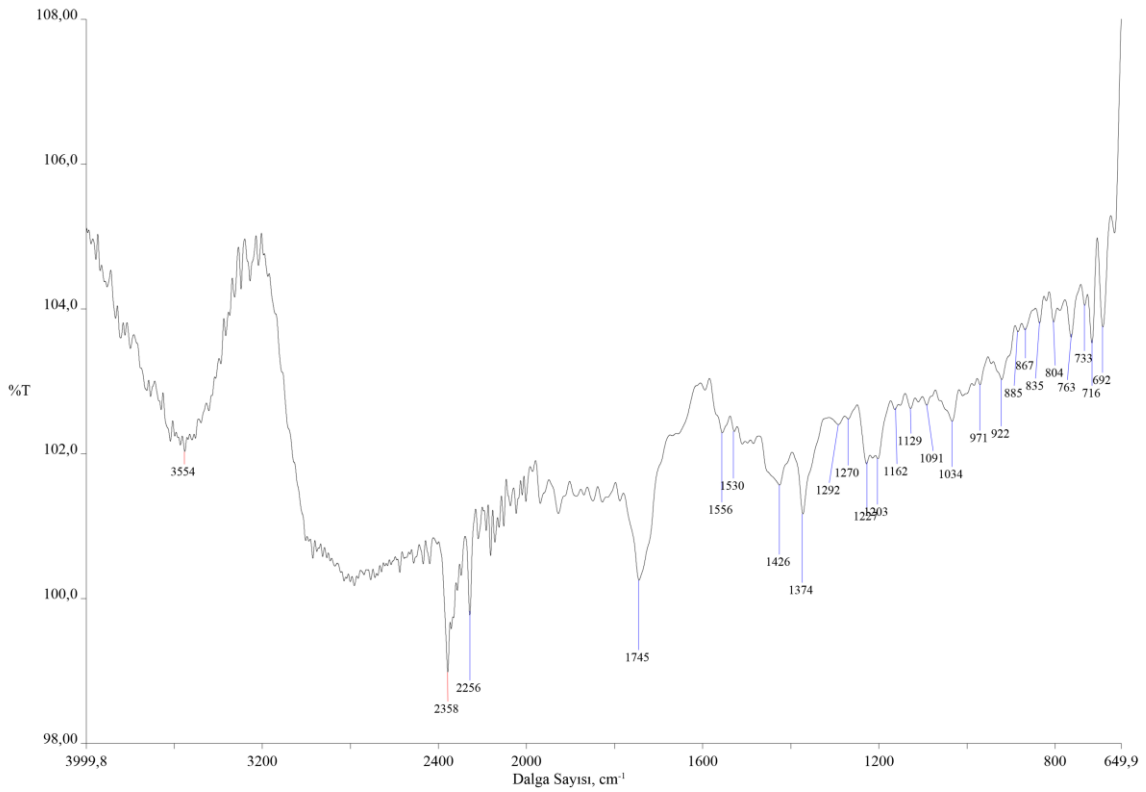


Şekil 4.2. TP3C-Trp monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

Trp-Thiophen-13C



Şekil 4.3. TP3C-Trp monomerinin ^{13}C -NMR spektrumu.

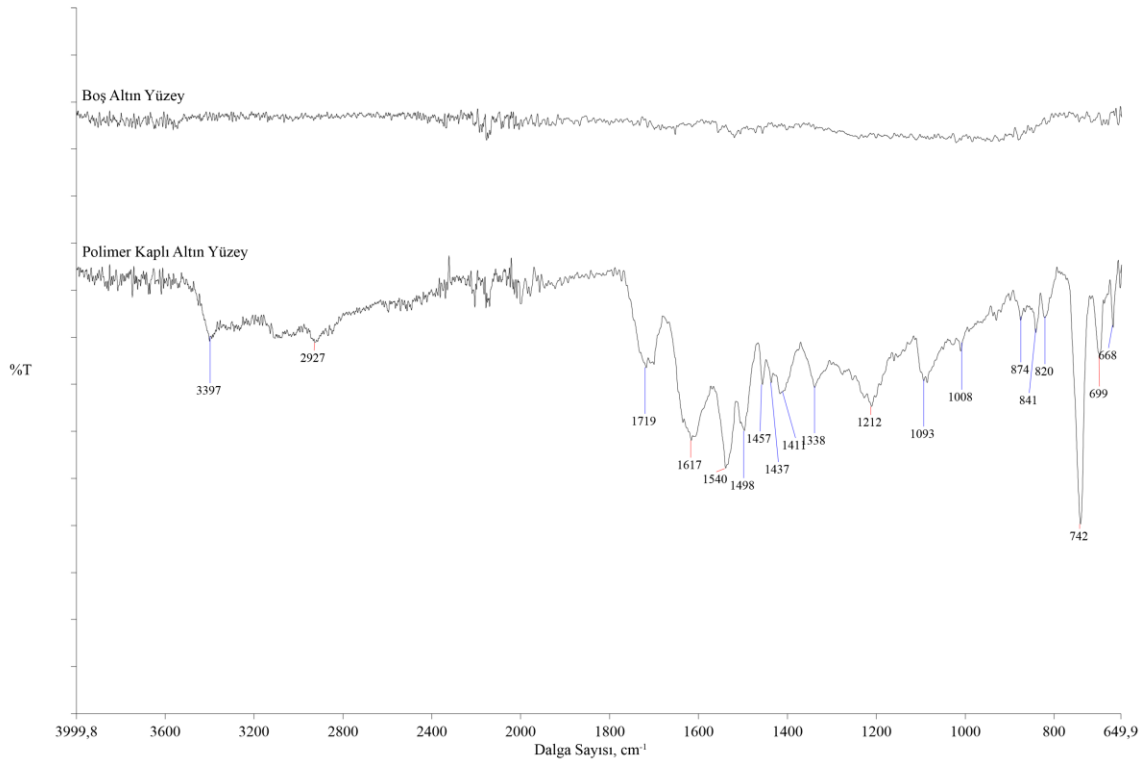


Şekil 4.4. TP3C-Trp monomerinin FTIR spektrumu.

4.2. Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu

4.2.1. FTIR Analizi

Elektrokimyasal sensörün yüzey karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır (Şekil 4.5). Şekilden de görüldüğü gibi spektrumda fonksiyonel monomerin sahip olduğu karboksilik asit –OH bandı, 3397 cm^{-1} 'de; alifatik C-H gerilme bandı 2927 cm^{-1} 'de; karbonil C=O bandı (farklı C=O varlığı nedeniyle omuz oluşumlarıyla beraber) 1719 cm^{-1} 'de; NH_2 ve NH_3^+ gerilme bandları 1540 cm^{-1} 'de; aromatik C=C gerilme bandı 1437 cm^{-1} 'de; indol halkasının C-N gerilme bandı 1338 cm^{-1} 'de; tiyofen halkasının C-S-C düzlem dışı eğilme bandı 742 cm^{-1} 'de belirlenmiştir. Boş altın plakasının FTIR-ATR spektrumunda ise herhangi bir fonksiyonel grup gözlenmemiş olup sonuçlar, polimerizasyonun başarıyla gerçekleştiğini ve triptofan ve tiyofen gruplarının yüzeye dönük olarak bulunduğunu göstermektedir.

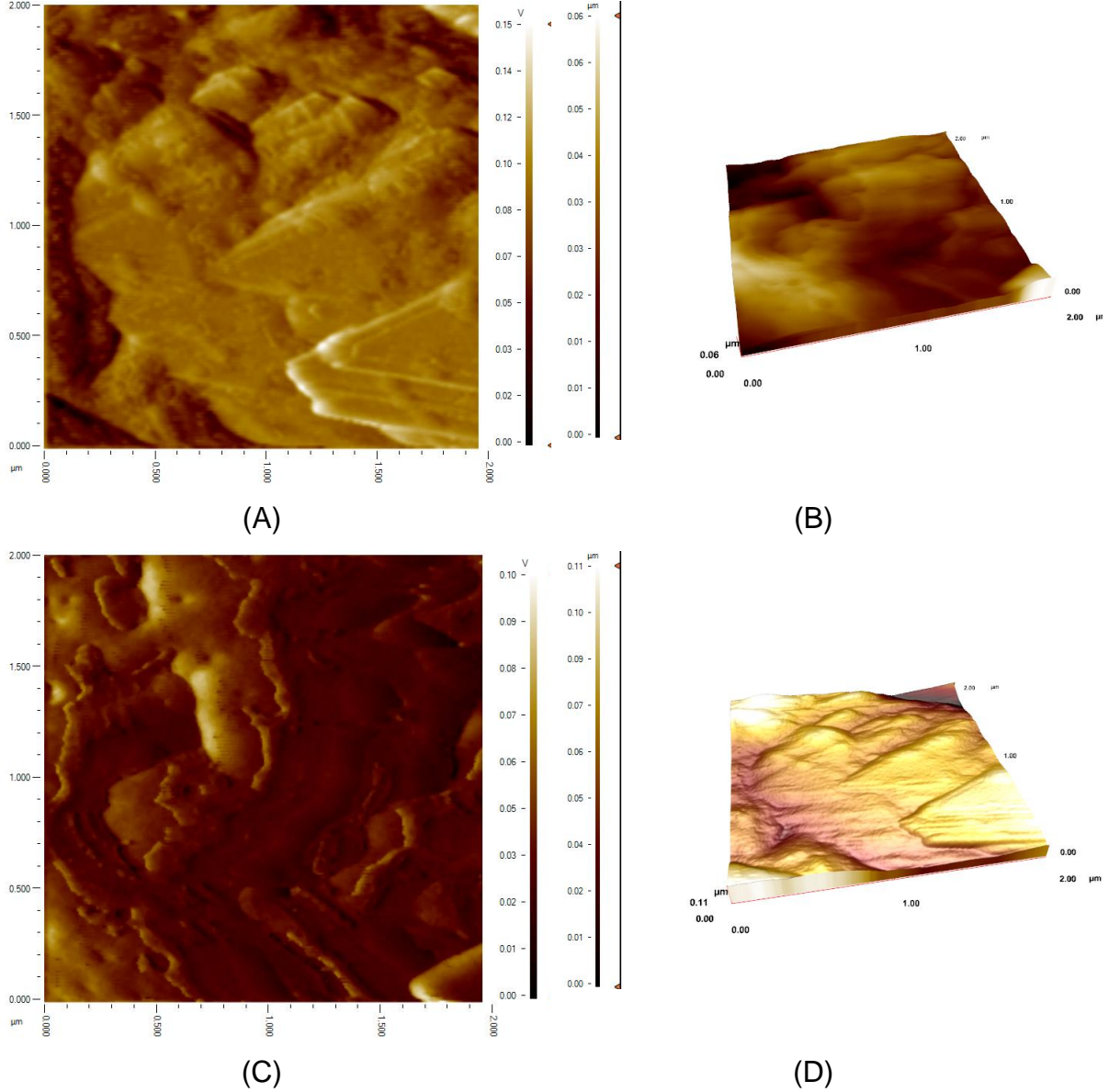


Şekil 4.5. L-Fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyine ait FTIR-ATR spektrumu.

4.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi

Modifiye edilmemiş, baskılanmış elektrokimyasal sensörlerin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Bazik pirana çözelti (10 mL; $\text{NH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2$; 1:3 v/v) ile temizlenmiş altın elektrot sensörün yüzey

pürüzlülüğü ortalama karekökü, yüzey eğriliği ve yüzey basıklığı değerleri, sırasıyla, 0.0372 μm , 0.0383 μm , 1.085 ve 1.228 olarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.1.). L-Fenilalanin baskılanmış elektrokimyasal sensörün yüzey için bu değerleri ise; sırasıyla 0.0619 μm , 0.0642 μm , 1.095 ve 1.255 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Bu sonuçlar; yüzeyde yaklaşık 30 nm'lik bir artış olduğunu ve polimerizasyonun yüzeyde homojen bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.6. L-Fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyine ait AFM görüntüleri. (A) Altın yüzey; (B) Altın yüzey 3-boyutlu; (C) L-Fenilalanin baskılanmış sensör; (D) L-Fenilalanin baskılanmış sensör 3-boyutlu.

Çizelge 4.1. Atomik kuvvet mikroskop sonuçları

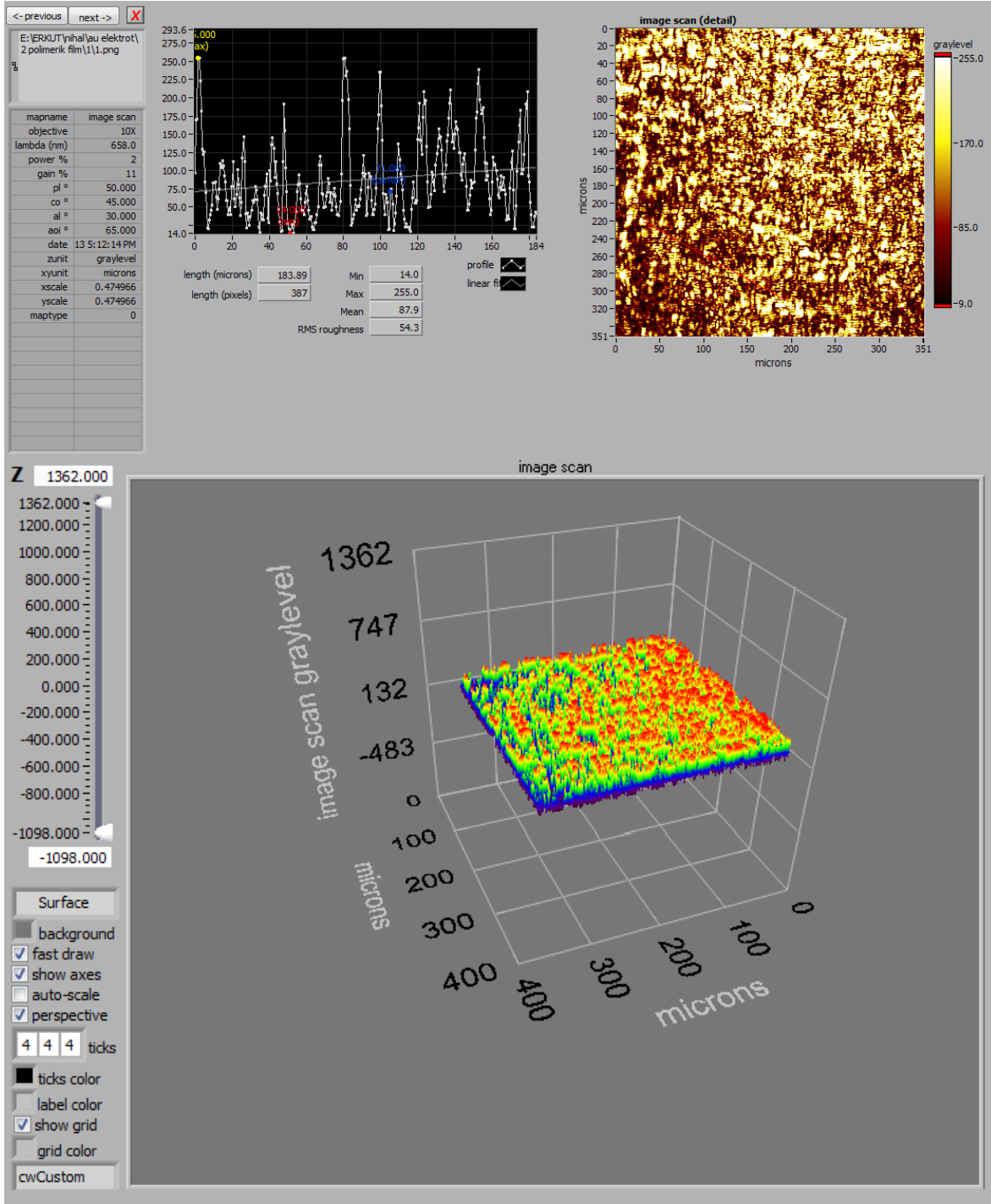
Özellik	Yüzey	Modifiye edilmemiş altın yüzey	L-Fenilalanin baskılanmış sensör
Ortalama Pürüzlülük (μm)		0.0372	0.0619
Ortalama Kakrekök (μm)		0.0383	0.0642
Yüzey Eğriliği		1.085	1.095
Yüzey Basıklığı		1.228	1.255

4.2.3. Elipsometre Analizi

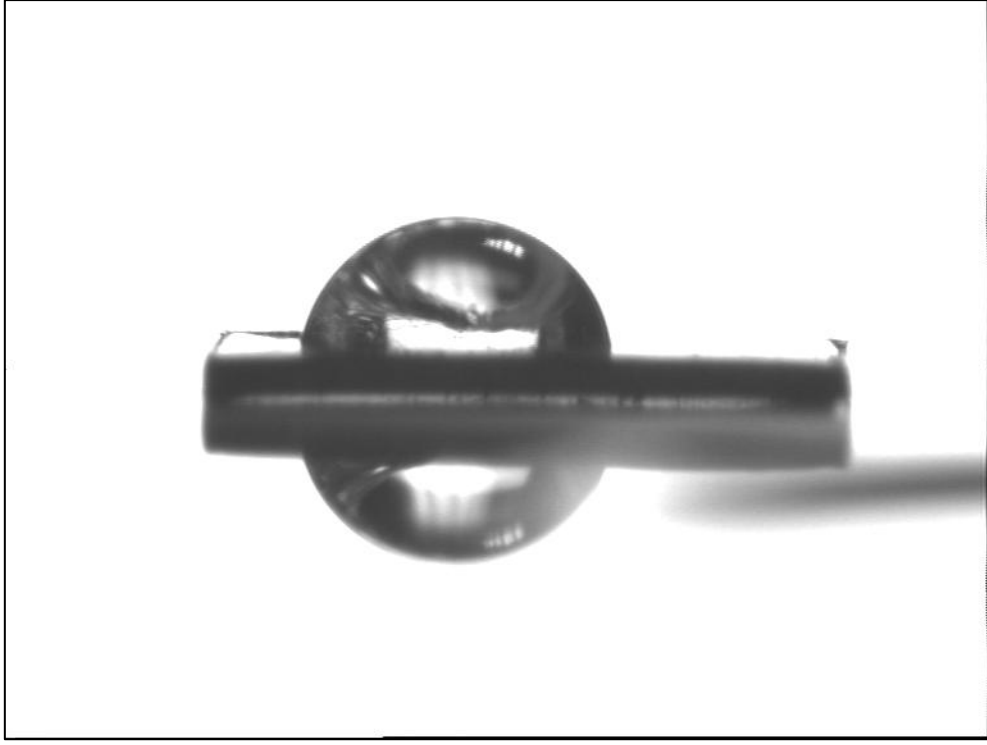
L-Fenilalanin baskılanmış altın sensör yüzeyinin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 85°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. L-Fenilalanin baskılanmış altın sensör yüzeyinin ortalama kalınlık değerleri yaklaşık 30 nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7). Bu sonuçlar, oldukça ince bir film tabakası oluşumunu teyit etmekte ve AFM sonuçlarını da doğrulamaktadır.

4.2.4. Temas Açısı Analizi

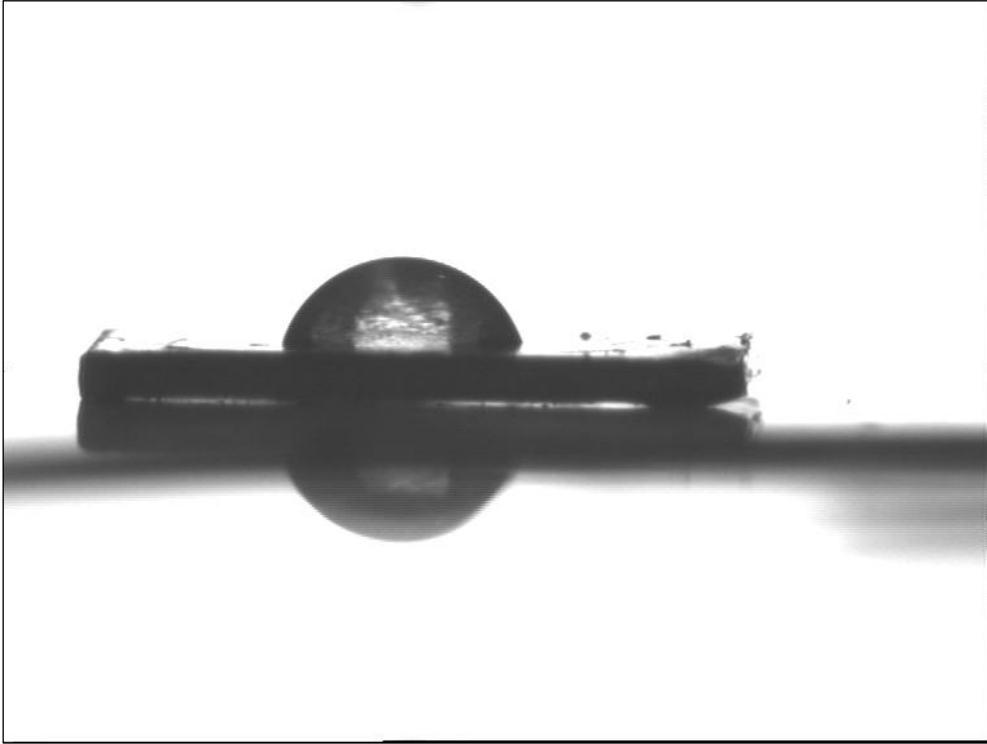
Modifiye edilmemiş ve L-fenilalanin baskılanmış sensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Modifiye edilmemiş ve L-fenilalanin baskılanmış elektrokimyasal sensörlerin yüzey temas açısı değerleri 78.7° ve 72.2° olarak belirlenmiştir. Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş altın elektrot yüzeyinin temas açısı değerindeki bu azalma, yüzey pürüzlüğünün artması ve polimerik filmin sulu ortam ile iyi etkileştiğini göstermektedir. Şekil 4.8'de temas açısı ölçümleri alınan modifiye edilmemiş ve L-fenilalanin baskılanmış sensörlere ait temas açısı görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.7. L-Fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyine ait elipsometre görüntüleri.



(A)



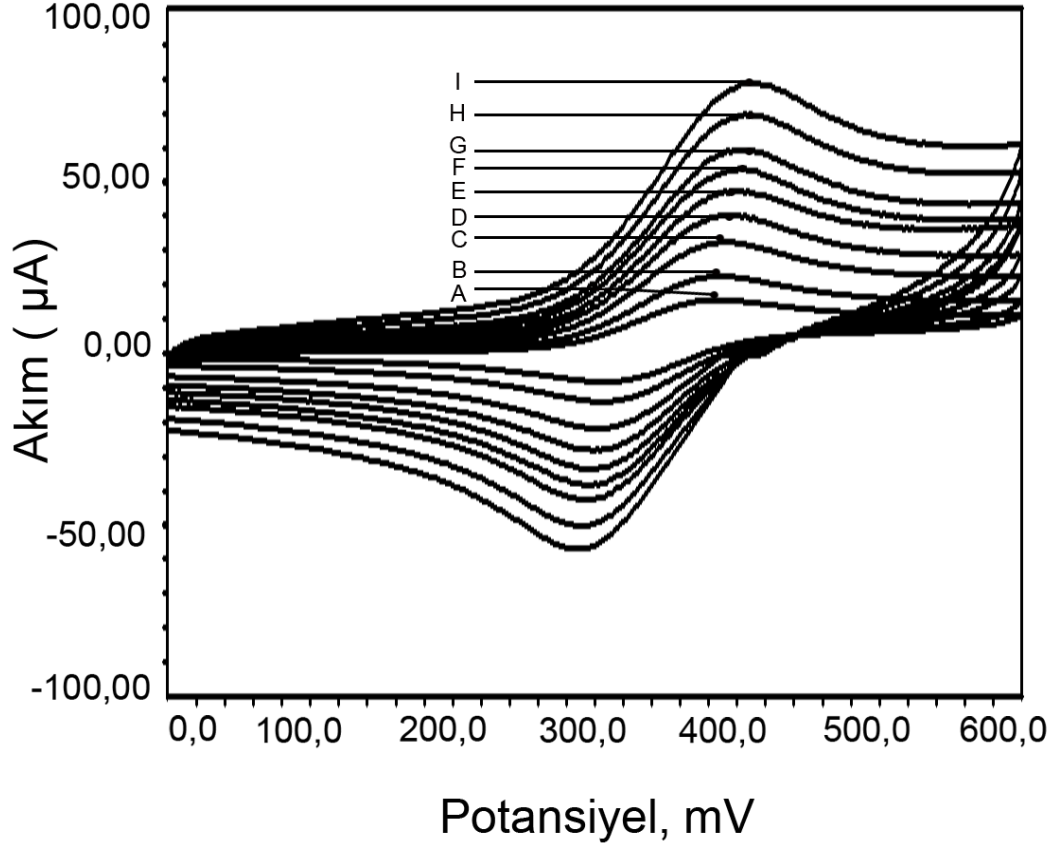
(B)

Şekil 4.8. Temas açısı ölçümleri. (A) Modifiye edilmemiş altın yüzey ve (B) L-fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyi.

4.3. L-Fenilalaninin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

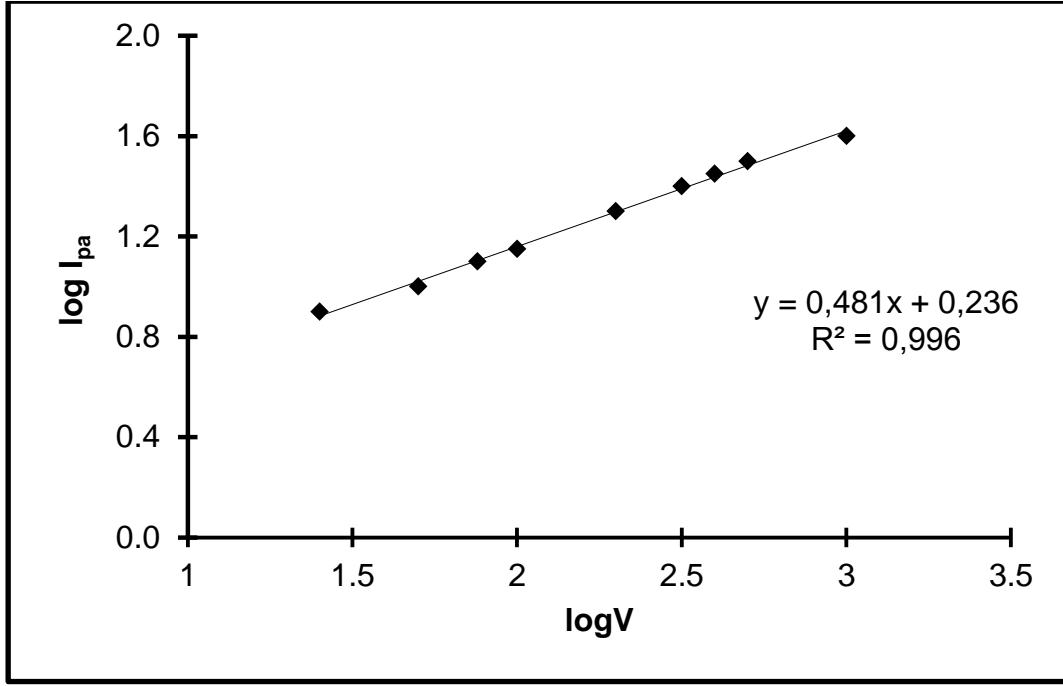
4.3.1. Akım Karakterinin İncelenmesi

Akım karakterinin belirlenmesi amacıyla CV deneylerinde sabit derişimde farklı tarama hızlarında voltammogramlar alınmıştır. Bunun için L-fenilalaninin derişimi sabit tutulmuş (1.0×10^{-6} M), tarama hızı değiştirilerek pik potansiyelleri ve pik akımları ölçülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 1.0×10^{-6} M L-fenilalaninin (pH 7.0, fosfat) farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları. (A) 25 mV/s; (B) 50 mV/s; (C) 75 mV/s; (D) 100 mV/s; (E) 200 mV/s; (F) 300 mV/s; (G) 400 mV/s; (H) 500 mV/s; (I) 1000 mV/s.

Tarama hızının logaritmasına ($\log v$) karşı pik akımının logaritması ($\log I_p$) ile elde edilen grafiğin (Şekil 4.10) eğiminden akımın difüzyon kontrollü olup olmadığına karar verilebilir. Bu şekilde elde edilen grafiğin eğiminin 0.5'e yakın bir değer olması (0.481), L-fenilalaninin yükseltgenmesi sonucu oluşan akımın difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10. 1.0×10^{-6} M L-fenilalaninin (pH 7.0, fosfat) $\log I_{pa} - \log V$ grafiği

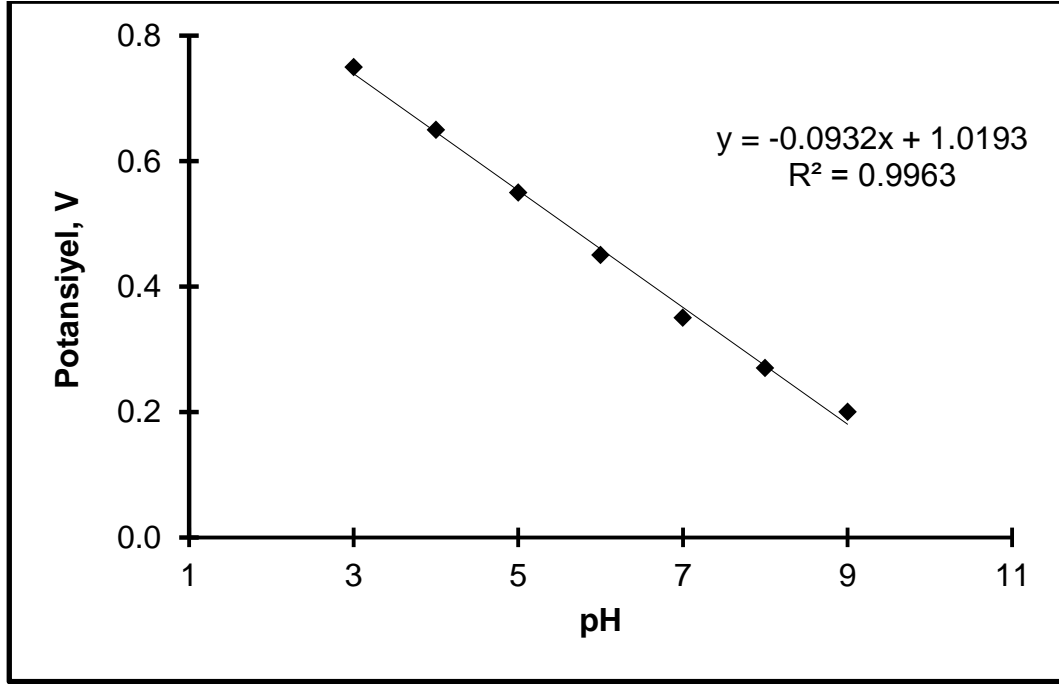
4.3.2. Elektrot Tepkimesinin İncelenmesi

Tersinmez sistemlerde Nernst eşitliği elektrot yüzeyinde geçerli değilken tersinir sistemlerde geçerlidir. Çünkü tersinir sistemlerde tüm potansiyellerde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyüktür. L-Fenilalaninin yükseltgenme tepkimesi için tersinirlik testleri CV yöntemi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Ters taramada anodik pikin gözlenmesi, elektrot tepkimesinin tersinir gerçekleştiğini gösterir. Ayrıca anodik pik potansiyelinin tarama hızı arttıkça pozitif değerlere kayması da bunu doğrulamaktadır. Şekil 4.9'a bakıldığında CV yöntemi ile yapılan taramada anodik pikin oluşması L-fenilalaninin yükseltgenme tepkimesinin tersinir olduğunu göstermektedir [8]. Bu tersinir işlem süresi, hem tekrarlanan sonuçların elde edilebilmesinin hem de sensörün tekrar kullanımının mümkün olduğunu göstermektedir. Bu durum, hem maliyet hem de güvenilirlik bakımından üretilen sensörün uygun olduğunu kanıtlamaktadır.

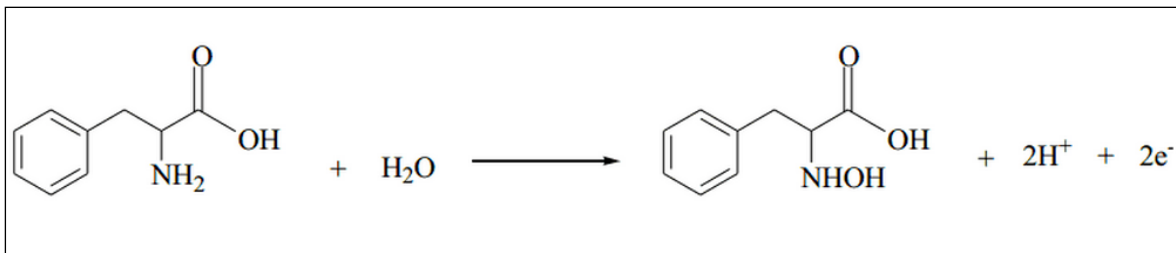
4.3.3. Proton ve Aktarılan Elektron Sayısının Bulunması

Bilinmektedir ki pik potansiyeli, elektrokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH'sına doğrudan bağlıdır. Buna bağlı olarak; L-fenilalaninin pH 3.0- 9.0 aralığında kaydedilen kare dalga voltamogramlarında (SWV) gözlenen piklerinin

potansiyelleri pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.11'den de görüldüğü gibi L-fenilalaninin yükseltgenme piki artan pH ile negatif potansiyellere kaydığından söz konusu pike ait yükseltgenme tepkimesinde protonun yer aldığı düşünebilir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. L-Fenilalaninin (50 ng/mL; pH 7.0, fosfat) SWV voltamogramlarına ait pH-E_p grafiği.



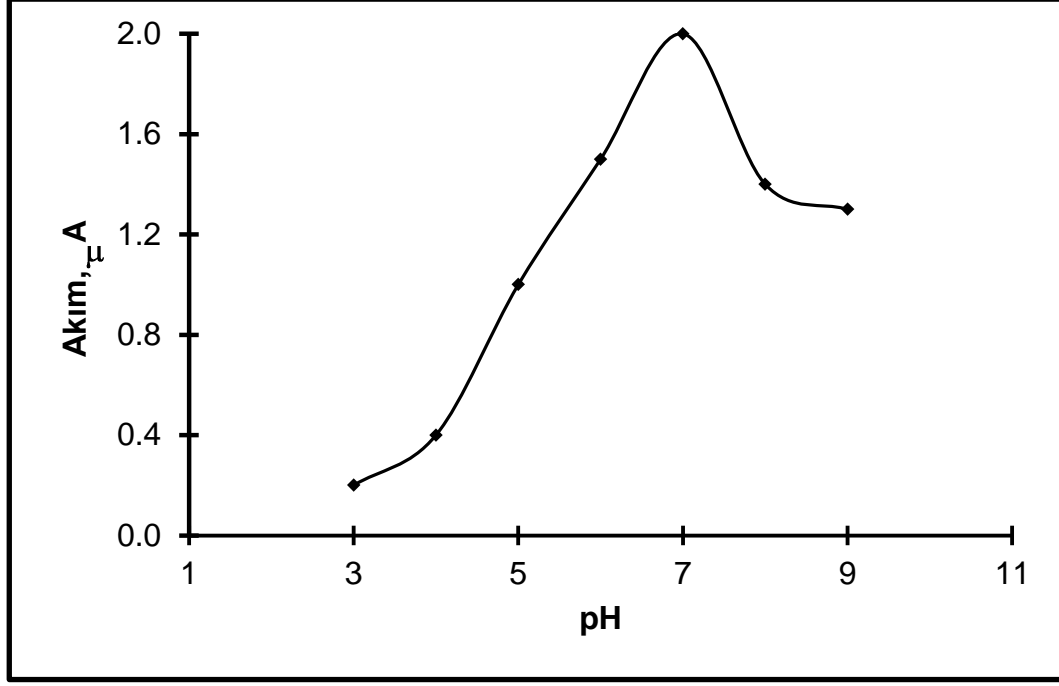
Şekil 4.12. L-Fenilalaninin olası yükseltgenme mekanizması.

Aşağıda tersinir sistemlere ait pik potansiyelinin pH ile değişimiyle ilgili geçerli eşitlik (3.1) verilmiştir.

$$E_p = E^{\circ} - \frac{2,303pRT}{nF} pH \quad (4.1)$$

- E_p : Pik potansiyeli, V
 E° : Standart hücre potansiyeli, V
 R : İdeal gaz sabiti, $J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
 T : Sıcaklık, K
 n : Transfer edilen elektron sayısı
 F : Faraday sabiti

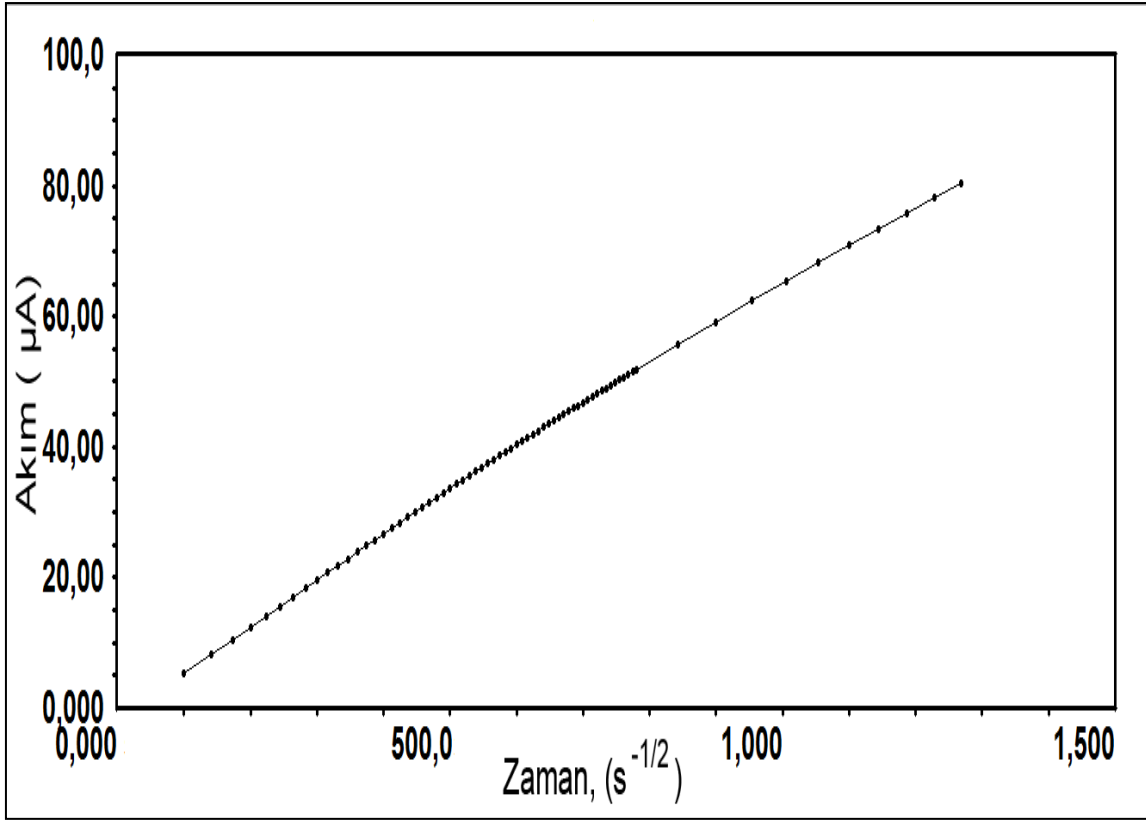
Şekil 4.11'deki pik potansiyeli-pH ilişkisini gösteren grafiğin doğru denkleminin eğimi $2.303pRT/nF$ değerine eşitlendiğinde p/n değeri 1 olarak bulunur. L-Fenilalaninin yükseltgenme tepkimesi ve bulunan p/n oranı göz önüne alındığında yükseltgenme mekanizmasında 2 proton yer aldığı ve 2 elektron aktarıldığı söylenebilir [8, 53] (Şekil 4.12). Ayrıca elde edilen grafik, pH 3.0-9.0 arasında 56 mV pH^{-1} eğimle doğrusaldır. Bu değer; iki protonlu ve iki elektronlu bir elektrot tepkimesi için beklenen 59 mV pH^{-1} değerine yakındır. Bu da iki protonlu ve iki elektronlu bir elektrot tepkimesinin olduğunu ve p/n oranından yapılan çıkarımın da doğru olduğunu göstermektedir [54]. L-Fenilalanin çözeltisinde (1.0 mM; fosfat) en yüksek akım pikinin elde edildiği değer pH 7.0 olduğundan, diğer tüm elektrokimyasal taramalarda pH 7.0 olarak kullanılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Destek elektrolit pH'sının L-fenilalanin yükseltgenme akımına etkisi.

4.3.4. Difüzyon Katsayısının Bulunması

Yapılan ön çalışma grubunda; difüzyon kontrollü akım karakteri elde edildiğinden kronoamperometrik (CA) yöntemden faydalanarak ve Cottrell eşitliğini kullanarak difüzyon katsayıları hesaplanmıştır. CA yöntemi ile elde edilen akıma karşı zamanın karekökünün değişimi grafiğinin doğrusal bölgesinin (Şekil 4.14) eğiminden Cottrell eşitliği kullanılarak elde edilen difüzyon katsayıları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Şekilden ve çizelgeden de görüldüğü gibi, difüzyon katsayısı, puls genişliğine bağlı olarak 3.39×10^{-4} - 3.52×10^{-4} cm²/s aralığında değişmektedir. Puls genişliğinin 10'dan 250'ye yükseltilmesine rağmen difüzyon katsayısı 1/100,000 gibi oldukça düşük bir oranda değişmiştir. Bu durum; difüzyon kontrollü bir işlem olmasına rağmen (Bölüm 4.3.3); difüzyonun oldukça hızlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Sonuç olarak; oldukça hızlı bir difüzyon kinetiğine sahip olan bir işlemle L-fenilalanin tayin edilmektedir.



Şekil 4.14. L-Fenilalaninin (50.00 ng/mL; pH 7.0, fosfat) kronoamperometri (CA) voltamogramı ($i - t^{-1/2}$).

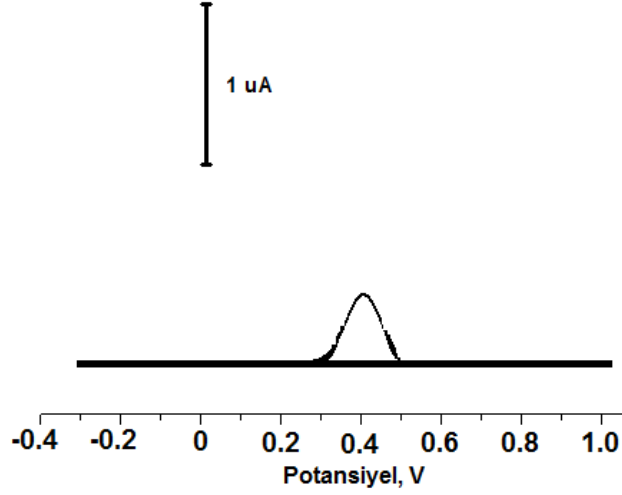
Çizelge 4.2. L-Fenilalaninin (50.00 ng/mL; pH 7.0, fosfat) CA yöntemiyle hesaplanan difüzyon katsayıları.

Puls genişliği	R ²	D (cm ² / s)
10	0.9985	3.39 x 10 ⁻⁴
100	0.9984	3.46 x 10 ⁻⁴
250	0.9986	3.52 x 10 ⁻⁴

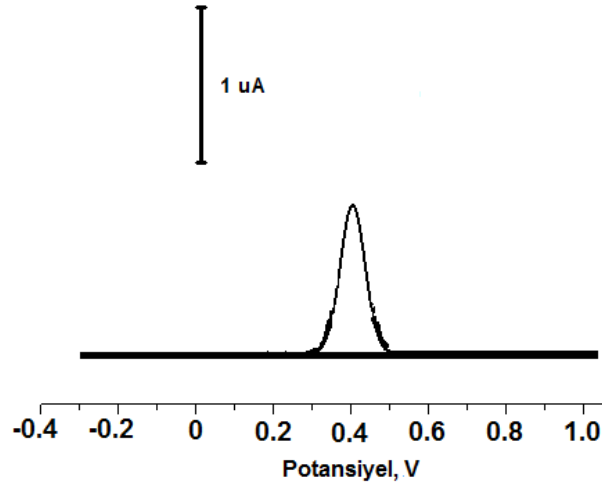
4.4. Elektrokimyasal Sensörle Kinetik Analizler

Bu çalışma kapsamında seçici L-fenilalanin tayini için moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensörler hazırlanmıştır. Elektrokimyasal sensör sinyalleri ile L-fenilalanin derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde 0.01-0.50 nM L-fenilalanin çözeltileri (pH 7.0, fosfat) hazırlanmıştır. Çözeltiler elektrokimyasal hücreye eklenerek sensörlerle etkileşim sağlanmıştır. Iviumstat yazılımı ile elde edilen veriler eş zamanlı olarak izlenmiş ve kinetik veriler

alınmıştır. Şekil 4.15 'de farklı derişimlerde L-fenilalanin çözeltilerinden elde edilen voltamogramlar verilmiştir.

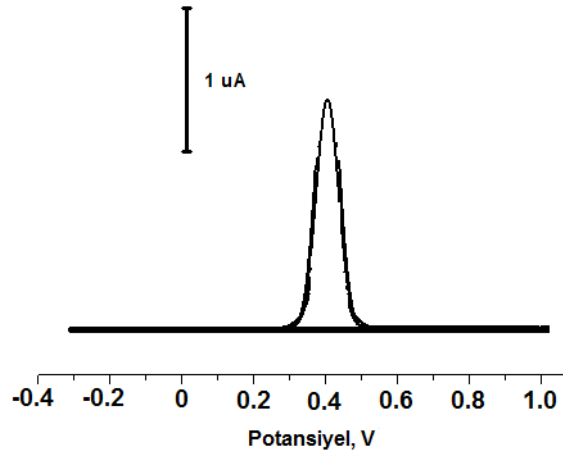


(A) 0.01 nM

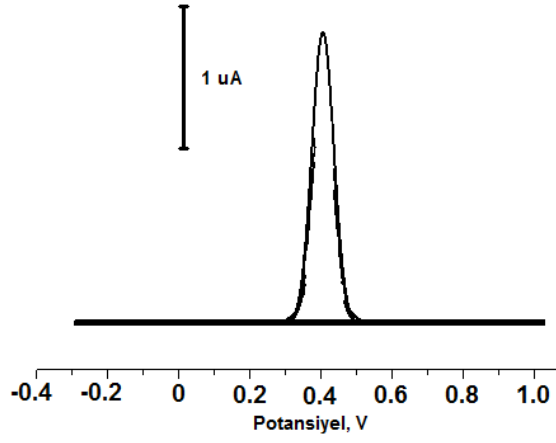


(B) 0.05 nM

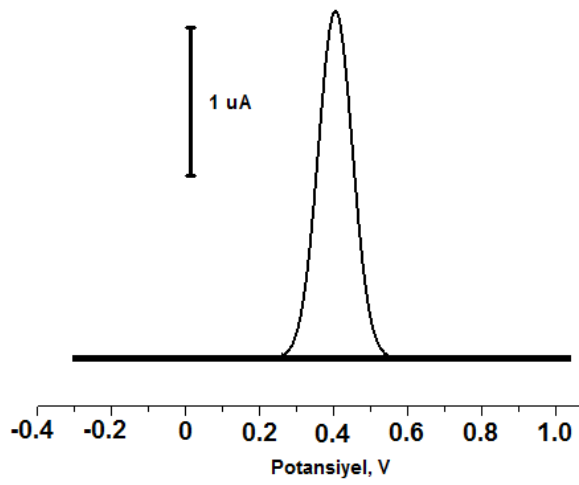
Şekil 4.15. L-Fenilalanin baskılanmış elektrokimyasal sensörle L-fenilalanin çözeltileri arasındaki etkileşimlere ait kare dalga voltamogramları. (A) 0.01 nM; (B) 0.05 nM; (C) 0.1 nM; (D) 0.2 nM; (E) 0.5 nM.



(A) 0.10 nM



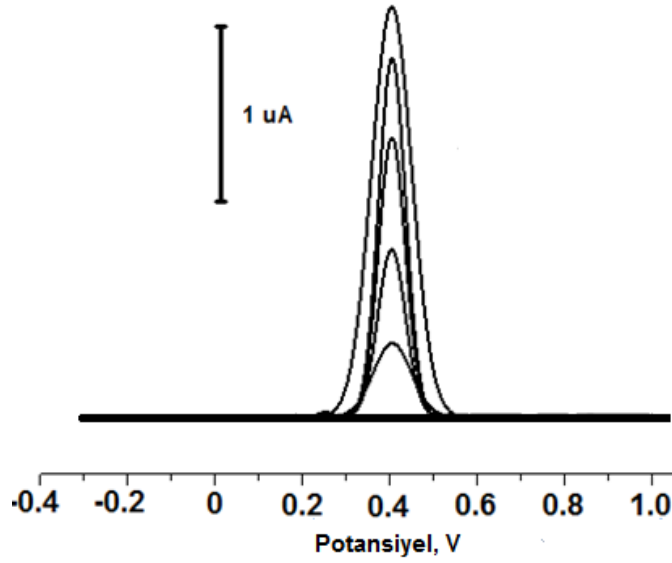
(B) 0.20 nM



(E) 0.50 nM

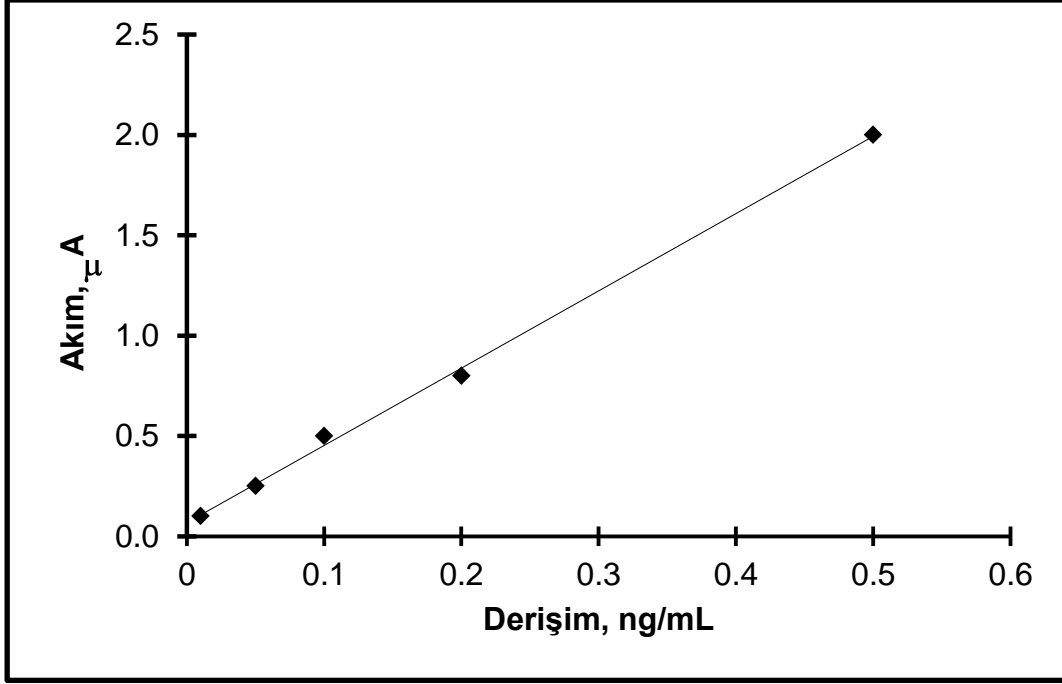
Şekil 4.15. Devamı.

Şekil 4.15’de farklı derişimlerde L-fenilalanin çözeltilerinin sensöre uygulanmasıyla elde edilen potansiyele karşı ΔI değişim değerini gösteren grafikler verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.16’de farklı derişimlerde L-fenilalanin çözeltilerine ait potansiyele karşı ΔI değişim değerini gösteren tüm grafikler birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi artan L-fenilalanin derişimi ile birlikte voltamogramdaki sinyal şiddeti doğrusal olarak artmaktadır. Derişim-sinyal şiddeti arasındaki bu doğrusallık Şekil 4.17’de açıkca görülmektedir.



Şekil 4.16. L-Fenilalanin çözeltileri (pH 7.0, fosfat) ile elektrokimyasal sensör arasındaki etkileşimlere ait voltamogramlar.

Yapılan standart bir ölçümde; elektrokimyasal hücreye farklı derişimlerde hazırlanmış L-fenilalanin çözeltileri (pH 7.0, fosfat) eklenmiştir. Şekilden de görüldüğü (daha önce de belirtildiği) gibi artan derişimle birlikte voltamogramdaki ΔI değişimleri doğru orantılıdır. Geniş bir derişim aralığında (0.01-0.5 nM) veriler alınmasına rağmen; elde edilen veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y = 3.851x + 0.067$) ve doğrusallığı (R^2) 0.9993 olarak hesaplanmıştır. Bu elde edilen verilerle, hazırlanan elektrokimyasal sensör 0.01-0.5 nM derişim aralığında % 99.9 doğrusallıkta ölçüm yapabildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3). L-Fenilalanin baskılanmış sensörün, tayin limiti (LOD, limit of detection) ve tayin sınırı (LQD, limit of quantification) değerleri ise sırasıyla $3.3 \times 10^{-12}M$ ve $1.0 \times 10^{-11}M$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.17. L-Fenilalanin baskılanmış elektrokimyasal sensöre ait derişim ile ΔI arasındaki ilişki.

Çizelge 4.3. L-Fenilalanin baskılanmış sensörle elde edilen derişime karşı akım grafiğinin özellikleri (n = 6).

	Fenilalanin
Doğru Denklemi	$y = 3.851x + 0.067$
Eğimin Standart Hatası	0.16
Kesişimin Standart Hatası	0.34
Korelasyon Katsayısı (r)	0.9993
Doğrusallık Aralığı (M)	$1.0 \times 10^{-11} - 5.0 \times 10^{-10}$
LOD (M)	3.3×10^{-12}
LOQ (M)	1.0×10^{-11}

$y = ax + b$; y: Pik Akımı (μA), x: Fenilalanin Derişimi (nM), a: eğim, b: kesim noktası, LOQ: Tayin sınırı (limit of quantification), LOD: Tayin sınırı (limit of detection).

4.5. Denge İzoterm Modelleri

L- fenilalanin baskılanmış sensör ile L- fenilalanin arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla üç farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

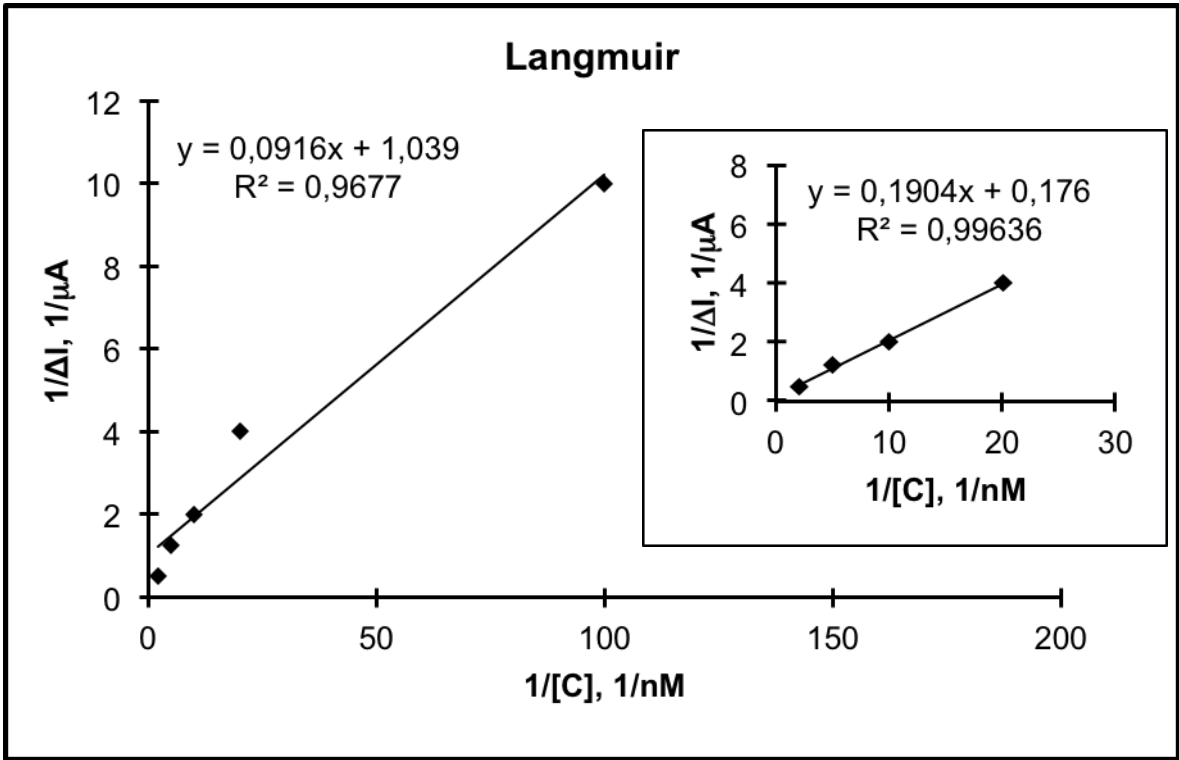
$$\text{Langmuir} \quad \Delta I = \{\Delta I_{\text{maks}}[C]/(K_D + [C])\} \quad (4.2)$$

$$\text{Freundlich} \quad \Delta I = \Delta I_{\text{maks}}[C]^{1/n} \quad (4.3)$$

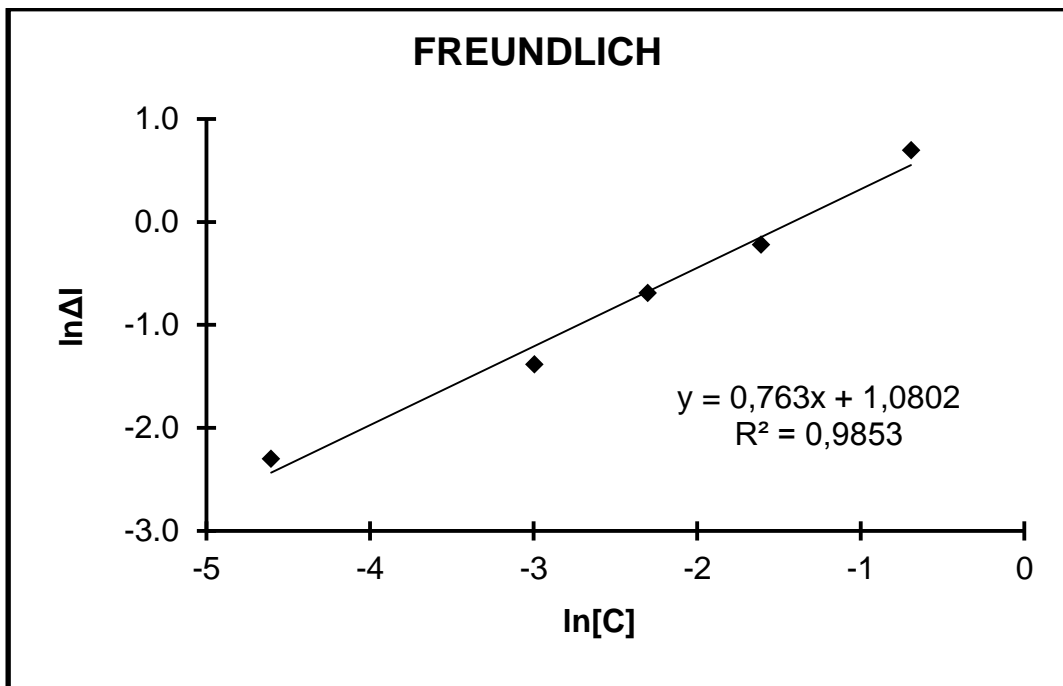
$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta I = \{\Delta I_{\text{maks}}[C]^{1/n}/K_D + [C]^{1/n}\} \quad (4.4)$$

Burada; ΔI_{maks} (μA), maksimum sinyal kayması; ΔI_{denge} (μA), denge halindeki sinyal kayması; $[C]$, analit derişimi (nM); K_A (nM), bağlanma denge sabiti; K_D (1/nM), ayrılma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

Langmuir adsorpsiyon modeli homojen, Freundlich adsorpsiyon modeli ise heterojen bağlanma varsayımına dayanır. Langmuir modeli, moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermine yaygın olarak kullanılmıştır. Moleküler baskılanmış polimerlerin heterojen bağlanma bölgeleri de içerdiği son zamanlarda rapor edilmiştir [35,41]. Freundlich adsorpsiyon modeli, özellikle düşük derişimlerde MIP sistemlerine uygunluk göstermektedir. Fakat bu model, yüksek derişim değerlerinde bazı sapmalar göstermektedir [35,41]. Bu sapmaları engellemek için Langmuir-Freundlich ikili modeli kullanılabilir. Bu model, heterojenite olduğu durumda çok düşük derişimlerden doygunluğa kadar MIP sistemleriyle uygunluk göstermektedir [35,41]. Şekil 4.18'de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmiştir.

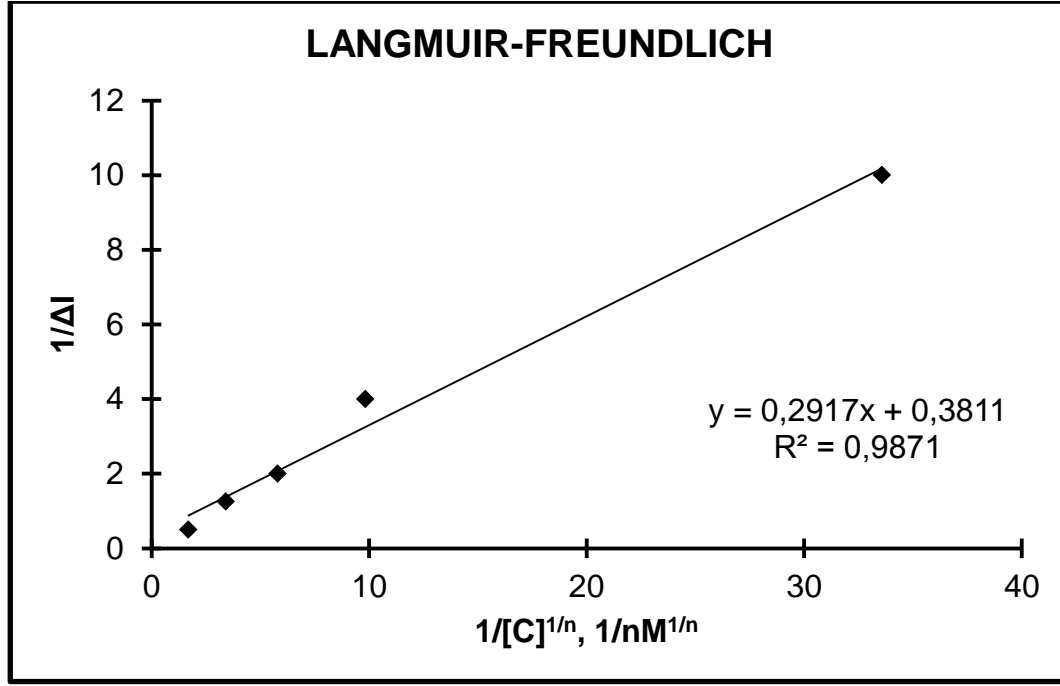


(A)



(B)

Şekil 4.18. Adsorpsiyon modelleri. (A) Langmuir; (B) Freundlich; (C) Langmuir-Freundlich modelleri.



(C)

Şekil 4.18. Devamı.

Şekil 4.18’de görüldüğü gibi; deneysel verilere 0.10-0.50 nM L-fenilalanin derişim aralığında en uygun model Langmuir-Freundlich modelidir ($R^2= 0.9871$). Bu model, daha önce de belirtildiği gibi; geniş derişim aralıklarında uygulanabilen bir hibrit izoterm modelidir. Derişim aralığını 0.05-0.50 aralığına daralttıımızda ise; Langmuir izoterm modelinin R^2 değeri 0.9964 değerine yükselmektedir. Bu durum, sistemin Langmuir izotermine daha yatkın olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre; hazırlanan L-fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin homojen dağılmış eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. İzotermlden hesaplanan katsayılar Çizelge 4.4’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
$I_{maks}, \mu A$	0.9624	$I_{maks}, \mu A$	2.9453	$I_{maks}, \mu A$	2.6240
K_D, nM	0.0882	1/n	0.7630	K_D, nM	0.7654
R^2	0.9677	R^2	0.9853	1/n	0.7630
				R^2	0.9871

4.6. Yarışmalı Kinetik Analizler

Moleküler baskılanmış polimerler için, dağılma ve seçicilik katsayıları, denge durumundaki çözeltide ve yüzeyde bulunan analit miktarlarının oranlarından hesaplanmaktadır.

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (4.5)$$

Eşitlikte K_d , dağılma katsayısını (1/nM); C_i ve C_f , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (nM); V , kullanılan çözelti hacmini (L) ve m , polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir. Ancak; sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi ve derişimin akımdaki artış (ΔI) ile doğrusal ilişkide olmasıdır. Bu durumda; seçicilik katsayısı,

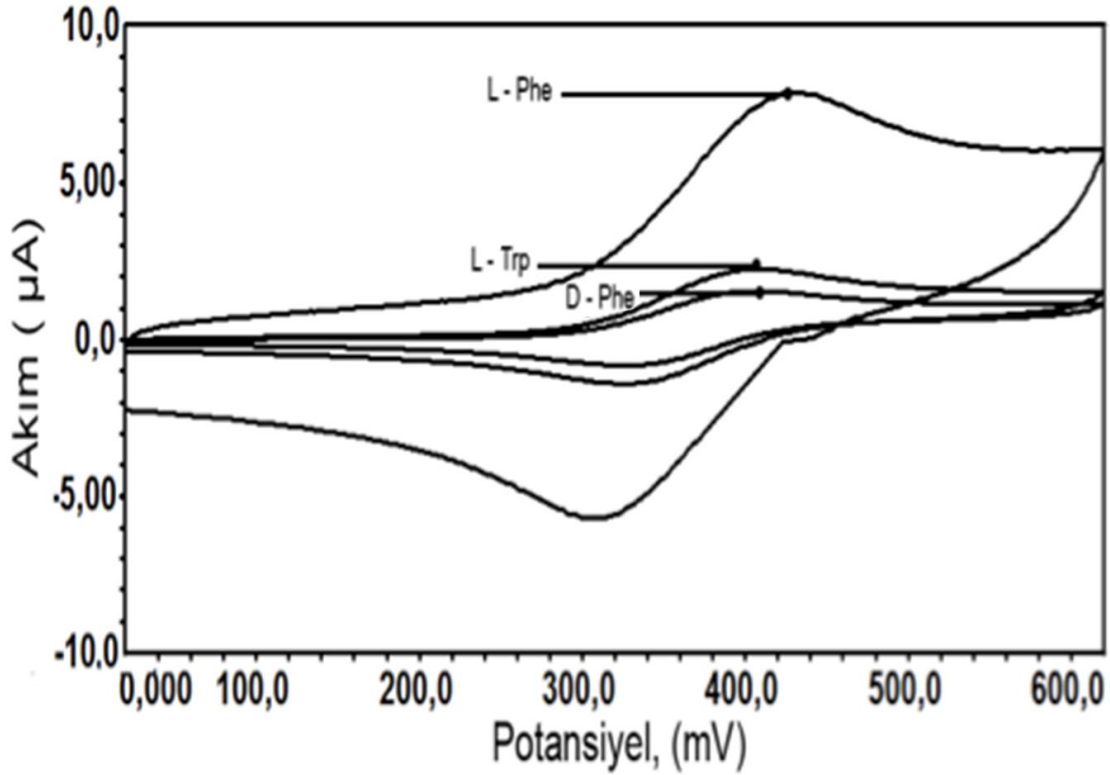
$$k = \Delta I_{kalıp} / \Delta I_{girişimci} \quad (4.6)$$

şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için kullanılan göreceli seçicilik katsayısı (k') ise;

$$k' = k_{baskılanmış} / k_{kontrol} \quad (4.7)$$

şeklinde ifade edilebilir. Hazırlanan L-fenilalanin baskılanmış sensörün L-fenilalanine karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı tayin deneyleri, D-fenilalanin, L-triptofan ve L-fenilalanin moleküllerinin çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sensörün eşit koşullar altında (derişim, pH, sıcaklık, hacim vb.) ilgili biyomoleküllere verdiği cevap, Şekil 4.19'da Akım/Potansiyel ilişkilerine ait döngüsel voltamogramlarda görülmektedir. D-Fenilalanin ve L-triptofan molekül yapıları ve ağırlıkları L-fenilalanin'e oldukça yakındır. Şekilden de görüldüğü gibi; sensör L-fenilalanine; D-fenilalanin ve L-Triptofona verdiği tepkiden daha yüksek şiddette seçici tepki vermiştir. L-Fenilalanin için elde edilen sinyal değeri $7.98 \mu\text{A}$ iken D-fenilalanin için elde edilen sinyal değeri yaklaşık $0.97 \mu\text{A}$ ve L-triptofan için elde edilen sinyal değeri yaklaşık $1.93 \mu\text{A}$ 'dir. Bu değerlerden seçicilik katsayısı (k) değerleri, L-fenilalanin/L-triptofan çifti için 4.13 ve L-fenilalanin/D-fenilalanin çifti için 8.22 olarak bulunmuştur.



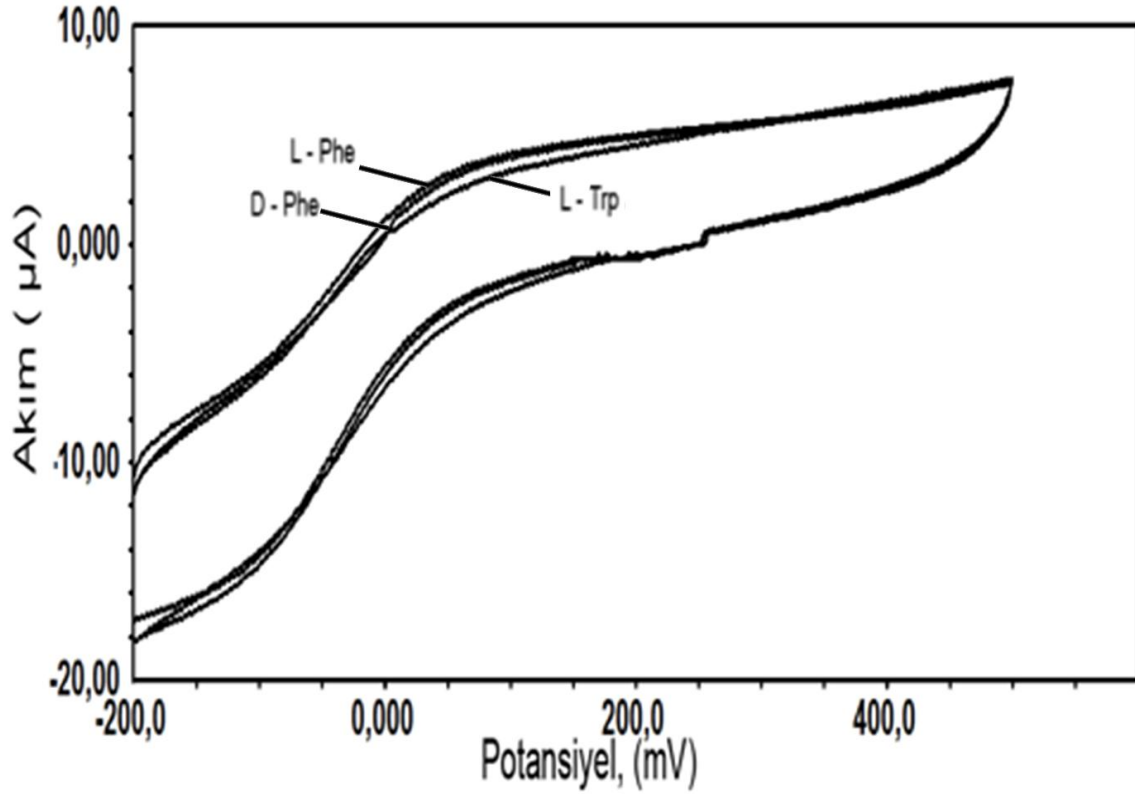
Şekil 4.19. Seçicilik deneyleri. L-Fenilalanin baskılanmış sensör ile analit (L-fenilalanin, D-fenilalanin ve L-triptofan) arasındaki etkileşimlere ait voltamogramlar.

Analit derişimi: 50 ng/mL , pH: 7.0, fosfat.

4.7. Biyosensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

L-Fenilalanin baskılanmış sensörün, seçiciliğinin moleküler baskılama ile ilişkilendirmek için baskılanmamış sensör de hazırlanmıştır. Baskılanmamış

sensor, Bölüm 4.6 gibi moleküler yapısı benzer olan potansiyel girişimci moleküllerle eşit koşullar altında etkileştirilmiştir. Analit çözeltileri (L-fenilalanin, D-fenilalanin ve L-Triptofan; 50 ng/mL), elektrokimyasal hücre sistemine gönderilmiştir ve Akım-potansiyel eğrileri elde edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Seçicilik deneyleri. Baskılanmamış sensör ile analit (L-fenilalanin, D-fenilalanin ve L-triptofan) arasındaki etkileşimlere ait voltamogramlar. Analit derişimi: 50 ng/mL, pH: 7.0, fosfat.

Baskılanmamış sensörün aynı derişimdeki L-fenilalanin, D-fenilalanin ve L-triptofana içeren çözeltilere karşı verdiği sinyal oldukça benzer görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi en uygun karşılaştırma yükseltgenme pikinin görüldüğü 100 mV'luk potansiyel değerinde mümkün görülmektedir. Bu değerdeki akım değerleri karşılaştırıldığında; L-fenilalanin için 6.3 µA, D-fenilalanin için 6.1 µA ve L-triptofan için 5.2 µA'dır. Bu değerlere göre hesaplanan seçicilik katsayısı (k) değerleri, L-fenilalanin/L-triptofan çifti için 1.21 ve L-fenilalanin/D-fenilalanin çifti için 1.03 olarak bulunmuştur. Moleküler baskılama ile kazanılan seçicilik değerini gösteren göreceli seçicilik katsayıları ise; L-fenilalanin/L-triptofan çifti için 3.41 ve

L-fenilalanin/D-fenilalanin çifti için 7.98 olarak bulunmuştur. Sonuçlardan görüldüğü gibi, moleküler baskılama işlemi, hazırlanan sensöre oldukça yüksek seçicilik özelliği kazandırmıştır. L-Fenilalanin baskılanmış sensör, kalıp molekül olarak kullanılan L-fenilalanin molekülünü, enantiyomeri olan D-fenilalanine göre 7.98 kat; indol halkası içeren L-triptofana göre 3.41 kat daha seçici olarak tanımaktadır. Ayrıca, baskılama işlemi için seçilen ve sentezlenen TP3C-Trp fonksiyonel monomer, polimerik malzemelere sentezde kullanılan L-izomerlerine bağlı olarak stereoseçici tanıma özelliği kazandırmaktadır.

5.YORUM

- TP3C-Trp monomeri 3-karboksitiyofen ile uygun şartlar altında L-triptofanın reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Elde edilen monomer NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir.
- TP3C-Trp monomerinin ¹H-NMR spektrumunda TP3C-Trp monomerine ait piklere bakıldığında 3.49 ppm (-CH₂-CH); 5.10 ppm (-CO-NH-); aromatik protonlar ise 6-8 ppm aralığında gözlenmiştir. Bu pikler şöyledir; 7.61 ppm (-C=CH-S); 7.35, 7.30 ppm (benzen halkasında (-CH=CH-)); 7.25-7.23 ppm (pirol halkasında (=CH-NH)); 7.22-7.19 ppm (-CH=CH-) 6.60 ppm (-CH=CH-); karboksil protonu ise 8.24 ppmde gözlenmiştir.
- Ayrıca monomerin FTIR-ATR spektrumunda; 3554 cm⁻¹'de karboksilik asit –OH bandı, 2358 ve 2256 cm⁻¹'de alifatik C-H gerilme bandları, 1745 cm⁻¹'de karbonil C=O bandı (farklı C=O varlığı nedeniyle omuz oluşumlarıyla beraber), 1556 ve 1530 cm⁻¹'de NH₂ ve NH₃⁺ gerilme bandları, 1426 cm⁻¹'de aromatik C=C gerilme bandı, 1374 cm⁻¹'de indol halkasının C-N gerilme bandı, 1270, 1227 ve 1203 cm⁻¹'de çoklu C-H eğilme bandları, 763 cm⁻¹'de tiyofen halkasının C-S-C düzlem dışı eğilme bandı belirlenmiştir. FTIR-ATR spektrumu da NMR verilerini doğrulamakta ve fonksiyonel monomer yapısının elde edildiğini göstermektedir
- Sensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. Boş altın plakanın FTIR-ATR spektrumunda herhangi bir fonksiyonel grup gözlenmemiştir. Baskılanmış polimer kaplı altın plakanın yüzey spektrumunda ise fonksiyonel monomerin sahip olduğu karboksilik asit –OH bandı, 3397 cm⁻¹'de; alifatik C-H gerilme bandı 2297 cm⁻¹'de; karbonil C=O bandı (farklı C=O varlığı nedeniyle omuz oluşumlarıyla beraber) 1719 cm⁻¹'de; NH₂ ve NH₃⁺ gerilme bandları 1540 cm⁻¹'de; aromatik C=C gerilme bandı 1437 cm⁻¹'de; indol halkasının C-N gerilme bandı 1338 cm⁻¹'de; tiyofen halkasının C-S-C düzlem dışı eğilme bandı 742 cm⁻¹'de belirlenmiştir. Sonuçlar, polimerizasyonun başarıyla gerçekleştiğini ve triptofan ve tiyofen gruplarının yüzeye dönük olarak bulunduğunu göstermektedir.

- Modifiye edilmemiş ve L-Phe baskılanmış sensörlerin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Bazik pirana çözeltisi ile temizlenmiş sensörün yüzey basıklığı 1.228, baskılanmış sensörün yüzey basıklığı 1.255 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar; yüzeyde yaklaşık 30 nm'lik bir artışın olduğunu ve polimerizasyonun yüzeyde homojen bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.
- L-Fenilalanin baskılanmış altın sensör yüzeyinin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. Buna göre L-Phe baskılanmış sensörün kalınlık değeri yaklaşık 30 nm olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, oldukça ince bir film tabakası oluşumunu teyit etmekte ve AFM sonuçlarını da doğrulamaktadır.
- Yapılan temas açısı ölçümlerinden elde edilen sonuçlara göre modifiye edilmemiş ve L-fenilalanin baskılanmış elektrokimyasal sensörlerin yüzey temas açıları 78.7° ve 72.2° olarak belirlenmiştir. Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş altın elektrot yüzeyinin temas açısı değeriindeki bu azalma, yüzey pürüzlüğünün artması ve polimerik filmin sulu ortam ile iyi etkileştiğini göstermektedir.
- Akım karakterinin belirlenmesi amacıyla CV deneylerinde sabit derişimde farklı tarama hızlarında voltamogramlar alınmıştır. Tarama hızının logaritmasına ($\log v$) karşı pik akımının logaritması ($\log I_p$) ile elde edilen grafiğin eğiminin 0.5'e yakın bir değeri olması (0.481), L-fenilalaninin yükseltgenmesi sonucu oluşan akımın difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.
- L-Fenilalaninin yükseltgenme tepkimesi için tersinirlik testleri CV yöntemi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Ters taramada anodik pikin gözlenmesi, elektrot tepkimesinin tersinir gerçekleştiğini gösterir. Ayrıca anodik pik potansiyelinin tarama hızı arttıkça pozitif değerlere kayması da bunu doğrulamaktadır. Bu tersinir işlem süresi, hem tekrarlanan sonuçların elde edilebilmesinin hem de sensörün tekrar kullanımının mümkün olduğunu göstermektedir. Bu durum, hem maliyet hem de güvenilirlik bakımından üretilen sensörün uygun olduğunu kanıtlamaktadır.

- Pik potansiyeli, elektrokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği ortamın pH'sına doğrudan bağlıdır. Buna bağlı olarak; L-fenilalaninin pH 3.0- 9.0 aralığında kaydedilen kare dalga voltamogramlarında (SWV) gözlenen piklerinin potansiyelleri pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir. L-fenilalaninin yükseltgenme piki artan pH ile negatif potansiyellere kaydığından söz konusu pike ait yükseltgenme tepkimesinde protonun yer aldığı düşünülebilir. Pik potansiyeli-pH ilişkisini gösteren grafiğin doğru denkleminin eğimi $2.303pRT/nF$ değerine eşitlendiğinde p/n değeri 1 olarak bulunur. L-Fenilalaninin yükseltgenme tepkimesi ve bulunan p/n oranı göz önüne alındığında yükseltgenme mekanizmasında 2 proton yer aldığı ve 2 elektron aktarıldığı söylenebilir. Ayrıca elde edilen grafik, pH 3.0-9.0 arasında 56 mV pH^{-1} eğimle doğrusaldır. Bu değer; iki protonlu ve iki elektronlu bir elektrot tepkimesi için beklenen 59 mV pH^{-1} değerine yakındır. Bu da iki protonlu ve iki elektronlu bir elektrot tepkimesinin olduğunu ve p/n oranından yapılan çıkarımın da doğru olduğunu göstermektedir.

- CA yöntemi ile elde edilen akıma karşı zamanın karekökünün değişimi grafiğinin doğrusal bölgesinin eğiminden Cottrell eşitliği kullanılarak elde edilen difüzyon katsayıları, puls genişliğine bağlı olarak $3.39 \times 10^{-4} - 3.52 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ aralığında değişmektedir. Puls genişliğinin 10' dan 250'ye yükseltilmesine rağmen difüzyon katsayısı 1/100,000 gibi oldukça düşük bir oranda değişmiştir. Bu durum; difüzyon kontrollü bir işlem olmasına rağmen; difüzyonun oldukça hızlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Sonuç olarak; oldukça hızlı bir difüzyon kinetiğine sahip olan bir işlemle L-fenilalanin tayin edilmektedir.

- Elektrokimyasal sensörle kinetik analizler için hazırlanan moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensörler ile farklı derişimlerde 0.01-0.50 nM L-fenilalanin çözeltileri (pH 7.0, fosfat) elektrokimyasal hücreye eklenerek sensörlerle etkileşim sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre artan L-fenilalanin derişimi ile birlikte voltamogramdaki ΔI değişimleri yani sinyal şiddeti doğrusal olarak artmaktadır. Geniş bir derişim aralığında (0.01-0.5 nM) veriler alınmasına rağmen; elde edilen veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y = 3.851x + 0.067$) ve doğrusallığı (R^2) 0.998 olarak hesaplanmıştır. Bu elde edilen verilerle, hazırlanan elektrokimyasal sensör 0.01-0.5 nM derişim aralığında % 99.8 doğrusallıkta ölçüm yapabilir. L-Fenilalanin baskılanmış sensörün, tayin limiti

(LOD, limit of detection) ve tayin sınırı (LQD, limit of quantification) değerleri ise sırasıyla 3.3×10^{-12} M ve 1.0×10^{-11} M olarak hesaplanmıştır.

- Deneysel verilere 0.10-0.50 nM L-fenilalanin derişim aralığında en uygun model Langmuir-Freundlich modelidir ($R^2= 0.9871$). Bu model, daha önce de belirtildiği gibi; geniş derişim aralıklarında uygulanabilen bir hibrit izoterm modelidir. Derişim aralığını 0.05-0.50 aralığına daralttığımızda ise; Langmuir izoterm modelinin R^2 değeri 0.9964 değerine yükselmektedir. Bu durum, sistemin Langmuir izotermine daha yakın olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre; hazırlanan L-fenilalanin baskılanmış sensör yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin homojen dağılmış eş enerjili ve minimum yanal etkileşimli olduğunu göstermektedir.

- Hazırlanan L-fenilalanin baskılanmış sensörün L-fenilalanine karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı tayin deneyleri, D-fenilalanin, L-triptofan ve L-fenilalanin moleküllerinin çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensörün eşit koşullar altında (derişim, pH, sıcaklık, hacim vb.) ilgili biyomoleküllere verdiği cevap Akım/Potansiyel ilişkilerine ait döngüsel voltamogramlarda belirlenmiştir. Buna göre L-Fenilalanin için elde edilen sinyal değeri $7.98 \mu\text{A}$ iken D-fenilalanin için elde edilen sinyal değeri yaklaşık $0.97 \mu\text{A}$ ve L-triptofan için elde edilen sinyal değeri yaklaşık $1.93 \mu\text{A}$ 'dir. Bu değerlerden seçicilik katsayısı (k) değerleri, L-fenilalanin/L-triptofan çifti için 4.13 ve L-fenilalanin/D-fenilalanin çifti için 8.22 olarak bulunmuştur.

- L-Fenilalanin baskılanmış sensörün seçiciliğinin belirlenmesi için baskılanmamış sensör hazırlanıp moleküler yapısı L-Phe'e benzer olan potansiyel girişimci moleküllerle eşit koşullar altında etkileştirilmiştir. Analit çözeltileri (L-fenilalanin, D-fenilalanin ve L-Triptofan; 50 ng/mL), elektrokimyasal hücre sistemine gönderilmiştir ve Akım-potansiyel eğrileri elde edilmiştir. Baskılanmamış sensörün aynı derişimdeki L-fenilalanin, D-fenilalanin ve L-triptofan içeren çözeltilere karşı verdiği sinyallerden de anlaşıldığı gibi en uygun karşılaştırma yükseltgenme pikinin görüldüğü 100 mV 'luk potansiyel değerinde mümkün görülmektedir. Bu değerdeki akım değerleri karşılaştırıldığında; L-fenilalanin için $6.3 \mu\text{A}$, D-fenilalanin için $6.1 \mu\text{A}$ ve L-triptofan için $5.2 \mu\text{A}$ 'dir. Bu değerlere göre hesaplanan seçicilik katsayısı

(k) değerleri, L-fenilalanin/L-triptofan çifti için 1.21 ve L-fenilalanin/D-fenilalanin çifti için 1.03 olarak bulunmuştur. L-Fenilalanin baskılanmış sensör, kalıp molekül olarak kullanılan L-fenilalanin molekülünü, enantiyomeri olan D-fenilalanine göre 7.98 kat; sadece benzen halkasına ek olarak pirol halkası içeren L-triptofana göre 3.41 kat daha seçici olarak tanımaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Demirci, Yasemin., *Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Rekombinant L-Fenilalanin Üretimi İçin Biyoproses Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2006**
- [2] Förster, H., Einfluß des Süßstoffs Aspartame auf den Appetit, *Aktuelle Ernährungsmedizin*, 18, 331-337, **1993**
- [3] Sarkissian, C. N., Gamez, A., Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now?, *Molecular Genetics and Metabolism*, 86, 22-23, **2005**
- [4] van Rijn M. ve ark., Protein Metabolism in Adult Patients with Phenylketonuria, *Nutrition*, 23, 445-453, **2007**
- [5] Bilder, D. A. ve ark., Psychiatric Symptoms in Adults with Phenylketonuria, *Molecular Genetics and Metabolism*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.12.006>, (Nisan, **2013**)
- [6] Cheong, W., J., Yang, S., H., Ali F., Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews, *Journal of Separation Science*, 36, 609–628, **2013**
- [7] Vasapollo, G. ve ark., Molecularly Imprinted Polymers : Present and Future Perspective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5908-5945, **2011**
- [8] Yola, M.,L., *Ezetimib'in Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Elektrokimyasal Yöntemlerle Farmasötik Preparatlardan Analizi*, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2009**
- [9] Kıvanç, M., Porsuk Çayı'nda Azot Miktarı ve Nitrifikasyon Bakterilerinin Dağılımı, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **2004**, <http://mikrobiyoloji.org/pdf/702040102.pdf>, (Ocak, **2013**)
- [10] Elliot, W.H., Elliot D.C., *Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, 34-37, **2001**
- [11] Kılıç, N., *Lehninger, Biyokimyanın İlkeleri*, (ed: Albert L. Lehninger), Palme Yayıncılık, Ankara, 628-648, **2011**
- [12] Sarıboğa, B., *Fenilketonüri (PKU) Teşhisinde Potansiyometrik Biosensörler Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, **2008**
- [13] Datta, S.,P., *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, Wiltshire, **2003**

- [14] Anonim, L-Phenylalanine, Product Information, http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p2126pis.Par.0001.File.tmp/p2126pis.pdf (Mayıs, **2013**)
- [15] MacDonald, A., Rocha, J., C., van Rijn M., Feillet, F., Nutrition in phenylketonuria, *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, 13, 10-18, **2011**
- [16] Elliot, W., H., Elliot D., C., *Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, 258-261, **2001**
- [17] Hanley, W., B., Phenylketonuria (PKU) – A Success Story, *Latest Findings in Intellectual and Developmental Disabilities Research*, <http://www.intechopen.com/books/latest-findings-in-intellectual-and-developmental-disabilitiesresearch/phenylketonuria-pku-a-success-story>, **2012**
- [18] Surtees, R., Blau, N., The Neurochemistry of PKU, *European Journal of Pediatrics*, 159, 110-112, **2000**
- [19] McKean, C., M., Boggs, D., E., Peterson, N., A., The influence of high phenylalanine and tyrosine on the concentrations of essential amino acids in brain, *Journal of Neurochemistry*, 15, 235-241, **1968**
- [20] Zschocke, J., Haverkamp, T., Møller, L., B., Clinical utility gene card for: Phenylketonuria, *European Journal of Human Genetics*, 20, 2, **2012**
- [21] Ding, Z., Harding, C. O., Thony, B., State of the art on PKU gene therapy, *Molecular Genetics and Metabolism*, 81, 3-4, **2004**
- [22] Varjo, P., Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis, *The New England Journal of Medicine*, 329, 363, **1993**
- [23] Koch, R. ve ark., Large neutral amino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach to treatment, *Molecular Genetics and Metabolism*, 79, 110-113, **2003**
- [24] Levy, H. L., Phenylketonuria: Old disease, new approach to treatment, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 1811- 1813, **1999**
- [25] Asliyuce, S. ve ark., Molecular imprinting based composite cryogel membranes for purification of anti-hepatitis B surface antibody by fast protein liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 889–890, 95–102, **2012**
- [26] Bilgen, O. ve ark., Microcontact Imprinted Surface Plasmon Resonance Sensor for Myoglobin Detection, *Materials Science and Engineering: C*, Available online 26 April, **2013**

- [27] Scorrano, S ve ark., Synthesis of molecularly imprinted polymers for amino acid derivatives by using different functional monomers., *International Journal of Molecular Science*, 12, 1735-1743, **2011**
- [28] Sönmezler, M., *QCM Temelli Histidin Sensörler*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**
- [29] Bossi, A. ve ark., Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of art, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1131-1137, **2007**
- [30] Kaniewska, M., Trojanowicz, M., Chiral Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers, *Electroanalysis*, 21, 229–238, **2009**
- [31] Şener, G. ve ark., Quartz crystal microbalance based nanosensor for lysozyme detection with lysozyme imprinted nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 815–821, **2010**
- [32] Uzun, L., Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2878–2884, **2009**
- [33] Chena, Y. ve ark., A potentiometric chiral sensor for L-Phenylalanine based on crosslinked polymethylacrylic acid–polycarbazole hybrid molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 754, 83– 90, **2012**
- [34] Fuchiwaki, Y., Kubo, I., Electrochemical sensor based on biomimetic recognition utilizing molecularly imprinted polymer receptor, *Biomimetics, Learning from Nature*, 19, 385, **2010**
- [35] Özgür, E., *Östradiol Tayini İçin Moleküler Baskılanmış Sensörlerin Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**
- [36] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z., Molecularly imprinted polymers: synthesis and Characterization, *Journal of Chromatography B*, 804, 173–182, **2004**
- [37] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. and Asanuma, H., Molecular Imprinting (From Fundamentals To Applications), *Wiley-VCH Verlag*, **2003**
- [38] Turner, A. P. F., Biosensors: sense and sensibility, *Chemical Society Reviews*, 42, 3175–3648, **2013**
- [39] Ferreira L.S. ve ark., Aspects concerning the use of biosensors for process control experiment and stimulation investigation, *Computers and Chemical Engineering*, 27, 1165-1173, **2003**
- [40] Mello, L. D., Kubota, L. T., Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food Chemistry*, 77, 237–256, **2002**

- [41] Şener, G., *Nanopartiküllerle Duyarlılığı Arttırılmış Yüzey Plazmon Rezonans Sensörlerin Hazırlanması*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2009**
- [42] Uludağ, Y., Piletsky, S.A., Turner, A.P.F., Cooper, M.A., Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes, *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 274, 5471–5480, **2007**
- [43] Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chemical Reviews*, 108, 462-493, **2008**
- [44] Diltemiz, S., E., Ersöz, A., Hür, D., Keçili, R., Say R., 4-Aminophenyl boronic acid modified gold platforms for influenza diagnosis, *Materials Science and Engineering C*, 33, 824–830, **2013**
- [45] Ertürk, G., Fab fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G Detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 28, 97–104, **2011**
- [46] Lawal, A., T., Adeloju, S., B., Polypyrrole based amperometric and potentiometric phosphate biosensors: A comparative study, *Biosensors and Bioelectronics*, 40, 377–384, **2013**
- [47] Hianik, T. ve ark., Amperometric detection of DNA hybridization on a gold surfacedepends on the orientation of oligonucleotide chains, *Bioelectrochemistry*, 53, 199–204, **2001**
- [48] Hutchins, R., S., Bachas, L., G., Nitrate-selective electrode developed by electrochemically mediated imprinting/doping of polypyrrole, *Analytical Chemistry*, 67, 1654-1660, **1995**
- [49] Kubo, I ve ark., Atrazine Sensing Chip Based on Molecularly Imprinted Polymer Layer, *Electrochemistry*, 76, 541-544, **2008**
- [50] Çekirdek, P., *Voltametrik Metotlarla Ditiyofosfonat Anyonlarının Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2005**
- [51] Wopschall, R. H., Shain, I., Effects of adsorption of electroactive species in stationary electrode polarography, *Analytical Chemistry*, 39, 1514–1527, **1967**
- [52] Katritzky, A., R.; Angrish, P.; Hür, D.; Suzuki, K., N-(Cbz- and Fmoc- α -aminoacyl)benzotriazoles: Stable Derivatives Enabling Peptide Coupling of Tyr, Trp, Cys, Met, and Gln with Free Amino Acids in Aqueous Media with Complete Retention of Chirality, *Synthesis*, 397-402, **2005**
- [53] Brooksby, P. A., Downard, A. J., Electrochemical and Atomic Force Microscopy Study of Carbon Surface Modification via Diazonium Reduction in, Aqueous and Acetonitrile Solutions, *Langmuir*, 20, 5038-5045, **2004**

- [54] Nassar, A. E. F, Zhang Z., Hu N. F., Rusling J.F., Journal of Physical Chemistry B, 101, 2224-2231, **1997**
- [55] Kotova, K. ve ark., MIP sensors on the way to biotech applications: Targeting selectivity, *Sensors and Actuators B*, **2013**,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.040>
- [56] Barker, G. C. and Jenkins, I. L. Square Wave Polarography, *Analyst*, 77; 685, **1952**
- [57] Öztekin, Y., *Camsı Karbon Elektrot Yüzeyine Çeşitli Fenantrolin Türevlerinin Modifikasyonu, Yüzey Karakterizasyonu, Elektrokimyasal ve Spektroskopik Özelliklerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**
- [58] Tae, W., K., Twenty Standard Amino Acids,
<http://kimwootae.com.ne.kr/apbiology/ch5-amino-acids.jpg>, (Şubat, **2013**)
- [59] Daubner, S. C., Lea, T., Wang, S., Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508, 1–12, **2011**
- [60] Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 515-528, **2002**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Ad Soyad : Nihal ERMİŞ
Doğum Tarihi/ Yeri : 31.07.1986/ Trabzon
Medeni Hali : Bekar
İkametgah Adresi : Dikmen Cad. 217/4
06450 Çankaya/ANKARA
Telefon : 0530 541 72 76
E- Posta : ermis.nihal@gmail.com

Eğitim

Lise (1997-2004) : Tevfik Serdar Anadolu Lisesi
Lisans (2004-2010) : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Eğitimi Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : UpperIntermediate
Almanca : Mittelstufe

İş Deneyimi

Comenius Dil Asistanlığı	Tulln/AVUSTURYA	2010-2011
Araştırma Görevlisi	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun/ TÜRKİYE	2013-

Deneyim Alanları

Biyosensörler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu İle Katıldığı

Toplantılar

-