

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VOLTAMETRİK FENİLALANİN SENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

FUNDA ALIŞIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

MALATYA

OCAK 2020

Tezin Başlığı: Voltametrik Fenilalanin Sensörünün Geliştirilmesi

Tezi Hazırlayan: FUNDA ALIŞIK

Sınav Tarihi: 22.01.2020

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap TİTRETİR DURAN.....

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Burhan ATEŐ

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Ülkü YILMAZ

Malatya Turgut Özal Üniversitesi

Prof.Dr. Kazım TÜRK

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Voltametrik Fenilalanin Sensörünün Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Funda ALIŞIK

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

VOLTAMETRİK FENİLALANİN SENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Funda ALIŞIK

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
78+xii sayfa

2020

Danışman: Doç. Dr. Serap TİTRETİR DURAN

Eş Danışman: Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE

Fenilalanin, vücut için gerekli olan proteinlerin yapısında bulunur ve esansiyel bir aminoasittir [1]. Fenilalanin esansiyel olmayan tirozin aminoasidinin ve türevlerinin metabolik öncülüdür [2]. Karaciğerde sentezlenen fenilalanin hidrosilaz enzimi (PAH) ile fenilalanin tirozine dönüşür. PAH eksikliği ile Fenilketonüri (PKU) hastalığı meydana gelmektedir. Eğer hastalık erken teşhis edilip tedavi edilmez ise fenilketonüri nörolojik fonksiyon bozukluğuna, otizme, egzamaya ve ağır davranış bozukluğuna yol açar. Erken teşhis ile hastalığın birçok etkisi önlenabilir [3]. Bu tez çalışmasında iki farklı yöntem ile L-Phe tayini için elektrokimyasal sensörler hazırlanmıştır. Birinci olarak elektrokimyasal yöntem ile moleküler baskılanmış fenilalanin elektrotları hazırlanmıştır. Bu yöntemde, elektrokimyasal sensör, kalıp molekül (L-Phe) ve fonksiyonel monomer (para-toluensülfonik asit) varlığında platin elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyonla hazırlanmıştır. İkinci yöntemde, kimyasal modifikasyon ile fenilalanin sensörleri hazırlanmıştır. Bu yöntemde GUM temelli poliüretan kaplamalar kullanılarak fenilalanin seçici elektrotlar hazırlanmıştır. Öncelikle GUM temelli poliüretanlar çözelti kimyasal polimerizasyon tekniği ile sentezlenmiştir ve polimerinin karakterizasyonu FTIR, SEM, DSC, TGA ve DTA ile gerçekleştirilmiştir. Ardından GUM polimerlerin çözeltilerinin platin elektrot üzerine damlatılması ile polimer film kaplı elektrotlar hazırlanmıştır.

Modifiye edilmiş elektrotların fenilalanine duyarlı sensör özelliğini belirlemek üzere; tarama hızı, elektrolit türü, pH ve film kalınlığı gibi parametreler, dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV) gibi yöntemler kullanılarak incelenmiş ve analit derişimi ile doğrusal olarak yanıt alınıp alınmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak 0,9997 ve 0,9972 duyarlılıkla fenilalanin tayini için voltametik fenilalanin sensörleri elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenilalanin, sensör, moleküler baskılama, poliüretan, voltametri.

ABSTRACT
MASTER THESIS

DEVELOPMENT OF VOLTAMMETRIC PHENYLALANINE SENSOR

FundaALİŞİK

İnönü Universty

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

78+xii pages

2020

Supervisor: Assoc. Dr. Serap TİTRETİR DURAN

Cosupervisor: Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE

Phenylalanine is found in the structure of proteins necessary for the body and is an essential amino acid [1]. Phenylalanine is the metabolic precursor of the non-essential tyrosine amino acid and its derivatives [2]. The phenylalanine hydroxylase enzyme (PAH) synthesized in the liver turns phenylalanine into tyrosine. Phenylketonuria (PKU) occurs with PAH deficiency. If the disease is not diagnosed and treated early, phenylketonuria leads to neurological dysfunction, autism, eczema and severe behavior disorder. Early detection can prevent many effects of the disease [3]. In this thesis study electrochemical sensors for the determination of L-Phe were prepared by two different methods. As the first, molecularly imprinted phenylalanine electrodes were prepared by electrochemical method. In this method, the electrochemical sensor was prepared by electropolymerization on the platinum electrode surface in the presence of the template molecule (L-Phe) and functional monomer (para-toluenesulfonic acid). In the second method, phenylalanine sensors were prepared by chemical modification. In this method, phenylalanine selective electrodes were prepared using GUM based polyurethane coatings. Firstly, gum-based polyurethanes were synthesized by solution polymerization technique and characterization of the polymer was carried out by FTIR, SEM, DSC, TGA and DTA. Polymer film coated electrodes were prepared by dropping the solutions of GUM polymers onto the platinum electrode.

To determine the phenylalanine sensitive sensor property of the modified electrodes; parameters such as scanning speed, electrolyte type, pH and film thickness were investigated using alternating voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) and whether or not linear response was obtained by analyte concentration. As a result, voltammetric phenylalanine sensors were obtained for the determination of the phenylalanine with sensitivity of 0.997 and 0.9972.

Key Words: Phenylalanine sensor, molecular imprinting, polyurethane, voltammetry.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim süresince desteğini ve yardımını esirgemeyen, beni yönlendiren, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Serap TİTRETİR DURAN'a;

Bilgisinden ve engin tecrübelerinden yararlandığım kıymetli eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye, fikirleriyle destek olan Arş. Grv. Dr. Öznur GÜNGÖR'e, çalışmamın her aşamasında yardımını, desteğini ve emeğini esirgemeyen, beni yönlendiren değerli arkadaşım Muammer BURÇ'a, katkı ve desteklerinden dolayı arkadaşlarım İmren ÖZCAN, Nurcan AYHAN ve İmren TAŐKIN'a;

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde FYL-2019-1581 No'lu proje ile tüm maddi imkânları sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve Kimya Bölüm Başkanlığına;

Ayrıca öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi destek olan sevgili AİLEM'e ve yüksek lisans öğrenimim süresince destek veren mesai arkadaşlarıma;

Teşekkür ederim.

Funda ALIŞIK

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Aminoasitler ve Fizyolojik Önemi.....	3
2.2 Aminoasit Metabolizması	4
2.3. Fenilalanin (Phe)	5
2.4. Fenilalanin Metabolizması	6
2.5. Fenilalanin Metabolizması Bozuklukları	7
2.6.Fenilalaninin Tayinine Yönelik Çalışmalar	10
2.7.Fenilalaninin Elektrokimyasal Analizi.....	11
2.8. Moleküler Baskılama Teknolojisi	12
2.9. Moleküler Baskılamanın Temel Bileşenleri.....	15
2.9.1. Kalıp molekül	15
2.9.2. Fonksiyonel monomer	15
2.9.3. Çapraz bağlayıcı	17
2.9.4. Moleküler baskılama işleminde çözücünün önemi	18
2.10. Kovalent Baskılama	18
2.10.1. Kovalent baskılamanın avantajları	18
2.10.2. Kovalent baskılamanın dezavantajları.....	19
2.11. Non-Kovalent Baskılama	19

2.11.1. Non-Kovalent baskılamanın avantajları	20
2.11.2. Non-Kovalent baskılamanın dezavantajları	20
2.12. Elektrokimyasal Sensörler	20
2.12.1. Voltametrik sensörler	20
2.12.2. Dönüşümlü voltametri	23
2.12.3. Diferansiyel puls voltametrisi.....	25
2.12.4. Kare dalga voltametrisi.....	27
2.13. Amaç	28
3. MATERYAL VE METOD.....	30
3.1. Kimyasal Maddeler	30
3.2. Ölçümde Kullanılan Aygıt ve Gereçler.....	30
3.3. Fenilalanin Sensörlerinin Hazırlanması	32
3.3.1. Moleküler baskılama yöntemi ile fenilalanin sensörünün hazırlanması ...	33
3.3.2. Kimyasal modifikasyon ile L-Fenilalanin sensörlerinin hazırlanması	34
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	35
4.1. Moleküler Baskılama Yöntemi ile Hazırlanmış L-Fenilalanin Sensörü Ölçüm Sonuçları	35
4.1.1. L-Fenilalaninin elektrokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	35
4.1.1.1. L-Fenilalanin pik potansiyelinin tespit edilmesi	35
4.1.1.2. L-Fenilalanin tayininde kullanılacak elektrot türünün tespit edilmesi ...	38
4.1.2. L-Fenilalanin tayini için optimizasyonlar	41
4.1.2.1. Kalıp molekül (L-Phe) ve fonksiyonel monomerin (PTSA) karışım oranı etkisi	41
4.1.2.2 Film kalınlığı etkisi.....	42
4.1.2.3. Dönüşümlü voltametri tarama hızının etkisi	43
4.1.3. Modifiye elektrot üzerinde L-Fenilalanin elektrokimyasal davranışının incelenmesi	44
4.1.3.1. Destek elektrolit türünün etkisi	44

4.1.3.2 Destek elektrolit pH etkisi	45
4.1.3.3. DPV yöntemi tarama hızı etkisi	46
4.1.3.4. Pulse amplitude etkisi.....	48
4.1.3.5. Pulse width etkisi.....	48
4.1.3.6. Pulse period etkisi.....	49
4.1.3.7. Girişim etkisi ve kalibrasyon grafiği	50
4.1.3.8 Modifiye elektrodun kararlılığının belirlenmesi	51
4.2. Kimyasal Modifikasyon ile Hazırlanmış Fenilalanin Sensörü Ölçüm Sonuçları	54
4.2.1. GUM temelli poliüretan yapıların karakterizasyonu.....	54
4.2.2. GUM temelli poliüretan modifikasyonu ile fenilalanin sensörünün hazırlanması	60
4.2.3. L-Fenilalanin tayininde kullanılacak polimer türünün belirlenmesi	60
4.2.4. Film kalınlığının etkisi	62
4.2.5. Elektrolit türünün etkisi	63
4.2.6. Elektrolit pH etkisi	63
4.2.7. DPV yöntemi tarama hızının etkisi	65
4.2.8. Girişim etkisi ve kalibrasyon grafiği	66
4.2.9. Modifiye elektrodun kararlılığının belirlenmesi	67
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	69
6. KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ast T	: Asetat Tamponu
BR T	: Britton-Robinson Tamponu
CV	: Dönüşümlü Voltametri
DPV	: Diferansiyel Puls Voltametri
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
DTA	: Diferansiyel Termal Analiz
Ep	: Pik potansiyeli, (V)
Ep/2	: Yarı pik potansiyeli, (V)
Ep_a	: Anodik pik potansiyeli, (V)
Ep_c	: Katodik pik akımı, (V)
F	: Faraday sabiti, (C/eq)
FTIR	: Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
GUM	: GUM Arabik
Id	: Difüzyon akımı, (A)
Ip	: Akım yoğunluğu, (A/cm ²)
i_p	: Pik akımı, (A)
LOD	: Tayin Sınırı
LOQ	: Kantitasyon Tayin Sınırı
L-Phe	: L-Fenilalanin
MIP	: Moleküler Baskılanmış Polimer
n	: Aktarılan elektron sayısı, (eq/mol)
NMP	: <i>N</i> -metilpirolidon
PAH	: Fenilalanin hidroksilaz
PBS	: Fosfat Tamponu
PDH	: Fenilalanin dehidrojenaz
Phe	: Fenilalanin
PKU	: Fenilketonüri
PTSA	: para-toluensülfonik asit

SB T	: Sodyum Borat Tamponu
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
Sit T	: Sitrat Tamponu
SWV	: Kare dalga voltametrisi
T	: Sıcaklık, (K)
TGA	: Termogravimetrik Analiz
THF	: Tetrahidrofuran
Tyr	: Tirozin
v	: Tarama hızı (V/S), (mV/S)
ΔES	: Basamaklı adım yüksekliği, (SWV), (V)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 : Aminoasit yapısı.	3
Şekil 2.2 : Aminoasitlerin yapısı ve sınıflandırılması.	4
Şekil 2.3 : Aminoasit metabolizmasının şematik olarak özetlenmesi.	5
Şekil 2.4 : L-Phe'nin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri.	6
Şekil 2.5 : Fenilalaninin tirozine çevriminde tetrahidrobiopterin dönüşümü.	7
Şekil 2.6 : Sağlıklı bireyde fenilalaninin metabolik yolları.	9
Şekil 2.7 : Fenilketonürlü bireylerde Phe metabolizmasının şematik gösterimi.	10
Şekil 2.8 : Moleküler baskılama işleminin şematik gösterimi.	14
Şekil 2.9 : Kovalent baskılamanın şematik gösterimi.	18
Şekil 2.10 : Non-Kovalent baskılamanın şematik gösterimi.	19
Şekil 2.11 : Bazı genel voltametrik teknikler için potansiyel uyarı sinyalleri.	22
Şekil 2.12 : Dönüşümlü voltametri tekniklerinde (a) potansiyel taramasının zamanla değişimi ve (b) potansiyel değişimi-akım ilişkisi	24
Şekil 2.13 : Diferansiyel puls voltametri için sinyal grafikleri.	26
Şekil 2.14 : Diferansiyel puls voltamogramı.	26
Şekil 2.15 : Kare dalga voltametri için potansiyel -zaman dalga şekli ve akım ölçümü	27
Şekil 2.16 : Tersinir bir reaksiyon için uyarma sinyaline akım cevabı.	28
Şekil 3.1 : BAS 100B elektrokimyasal analizör ve cell stand.	31
Şekil 3.2 : Mikro hücre ve montajı.	31
Şekil 2.3 : Moleküler baskılama yöntemi ile fenilalanin sensörünün hazırlanması.	33
Şekil 4.1 : a) Çıplak elektrot yüzeyinde b) (L-Phe: PTSA) 1:3 mol oranında kaplı elektrot yüzeyinde zemin ve L-Phe dönüşümlü voltamogramları.	36
Şekil 4.2 : Çıplak platin elektrot ile L-Phe'nin DPV yanıtları.	37
Şekil 4.3 : Çıplak altın elektrot ile L-Phe'nin DPV yanıtları.	37
Şekil 4.4 : Desorpsiyona uğramış platin elektrodun DPV yanıtı.	38
Şekil 4.5 : Desorpsiyona uğramamış altın elektrodun DPV yanıtı.	39
Şekil 4.6 : (a) Çıplak, (b) elektropolimerizasyon ile kaplanmış ve (c) HCl içinde desorbe edilmiş platin elektrot yüzeylerine ait SEM görüntüleri.	40
Şekil 4.7 : a: 1:4, b: 1:2, c: 1:3 (L-Phe:PTSA) mol oranında kaplı elektrotların 700 µM L-Phe DPV yanıtları	41
Şekil 4.8 : Farklı kalınlıklarda kaplı elektrotların 700µM L-Phe'ye verdiği DPV yanıtları.	42
Şekil 4.9 : Film kalınlığı ile L-Phe yükseltgenme akımı ilişkisi.	42

Şekil 4.10 : Farklı tarama hızlarında CV yöntemi ile modifiye edilen elektrotların 700 μ M L-Phe DPV yanıtları.	43
Şekil 4.11 : CV tarama hızı ile L-Phe yükseltgenme akımı ilişkisi.	44
Şekil 4.12 : 700 μ M L-Phe'nin yanıtları üzerine destek elektrolit türünün etkisi.....	45
Şekil 4.13 : Destek elektrolit türünün L-Phe'nin yükseltgenme akımına etkisi.....	45
Şekil 4.14 : Destek elektrolit pH ile L-Phe yükseltgenme akımı ilişkisi	46
Şekil 4.15 : Destek elektrolit pH'sı ile L-Phe potansiyeli ilişkisi	46
Şekil 4.16 : Farklı tarama hızlarında 700 μ M L-Phe DPV yanıtları	47
Şekil 4.17 : DPV tarama hızı ile L-Phe yükseltgenme akımı ilişkisi.	47
Şekil 4.18 : L-Phe yükseltgenme akımı ile pulse amplitude ilişkisi.	48
Şekil 4.19 : 700 μ M L-Phe DPV yükseltgenme pik akımı üzerine puls width etkisi.	49
Şekil 4.20 : L-Phe'nin yükseltgenme pik akımı üzerine pulse period etkisi.....	49
Şekil 4.21 : İnterferanslar varlığında L-Phe'nin artan konsantrasyonlarına modifiye elektrodun DPV yanıtları	50
Şekil 4.22 : MIP elektrot üzerinde L-Phe kalibrasyon eğrisi.	51
Şekil 4.23 : İnterferanslar varlığında aynı modifiye elektrot üzerinde 1 mM L-Phe DPV'leri	52
Şekil 4.24 : İnterferanslar varlığında 1 mM L-Phe seçici modifiye elektrodun tekrarlanabilirliği..	52
Şekil 4.25 : İnterferanslar varlığında farklı modifiye elektrot üzerinde 1 mM L-Phe DPV'leri.	53
Şekil 4.26: İnterferanslar varlığında 1 mM L-Phe seçici modifiye elektrodun yeniden üretilebilirliği.	53
Şekil 4.27 : GUM temelli poliüretan yapılarına ait FTIR spektrumları.	54
Şekil 4.28 : GUM-PU-%1 yapısına ait SEM görüntüleri.	55
Şekil 4.29 : GUM-PU-%5 yapısına ait SEM görüntüleri.	56
Şekil 4.30: GUMPU-%10 yapısına ait SEM görüntüleri.	57
Şekil 4.31 : GUM temelli poliüretan yapılarına ait TGA termogramı.	58
Şekil 4.32 : GUM temelli poliüretan yapılarına ait DTA termogramları.	58
Şekil 4.33 : GUM temelli poliüretan yapılarına ait DSC termogramları.	59
Şekil 4.34 : Farklı oranlarda GUM içeren poliüretan kaplı elektrotlar ile 700 μ M L-Phe'nin DPV yanıtları.....	61
Şekil 4.35 : Farklı oranlarda GUM içeren poliüretann L-Phe'nin yükseltgenme akımına etkisi.	61
Şekil 4.36 : Farklı kalınlıklarda GUM-PU-%10 kaplı elektrotlar üzerinde 700 μ M L-Phe DPV yanıtları.	62

Şekil 4.37 : Film kalınlığının L-Phe'nin yükseltgenme akımına etkisi.....	62
Şekil 4.38 : 4 µL GUM-PU-%10 kaplı elektrotlar ile 1 mM L-Phe'nin DPV sonuçları.	63
Şekil 4.39 : 4 µL GUM-%10 kaplı elektrotlar ile 1 mM L-Phe'nin PBS tamponu içerisinde farklı pH'lardaki DPV yanıtları.	64
Şekil 4.40 : Elektrolit pH'sı ile L-Phe'nin yükseltgenme akımı ilişkisi.	64
Şekil 4.41 : Elektrolit pH'sının L-Phe'nin potansiyeline etkisi	65
Şekil 4.42 : Farklı tarama hızlarında PBS tamponu içinde 4 µL GUM-PU-%10 kaplı elektrotlar üzerinde 1 mM L-Phe DPV yanıtları.	65
Şekil 4.43 : İnterferanslar varlığında modifiye elektrot üzerinde artan L-Phe konsantrasyonlarının DPV yanıtları.	66
Şekil 4.44 : L-Phe kalibrasyon eğrisi.	67
Şekil 4.45 : İnterferanslar varlığında modifiye elektrot üzerine 1 mM L-Phe DPV'leri	67
Şekil 4.46 : İnterferanslar varlığında 1 mM L-Phe seçici modifiye elektrodun kararlılığı..	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 : Elektrokimyasal MIP sensörleri ile analitlerin tayininden örnekler.	13
Çizelge 2.2 : Moleküler baskılamada en sık kullanılan fonksiyonel monomerler.	16
Çizelge 2.3 : Moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerler.....	16
Çizelge 2.4 : Moleküler baskılamada sık kullanılan çapraz bağlayıcılar.	17
Çizelge 5.1 : Fenilalanin tayininde kullanılan tekniklerin karşılaştırılması.	71



1. GİRİŞ

Fenilalanin, (Phe) vücut için gerekli olan proteinlerin yapısında bulunan, sadece dışarıdan besinlerle alınan esansiyel bir aminoasittir [4]. Fenilalanin esansiyel olmayan tirozin (Tyr) aminoasidinin ve türevlerinin metabolik öncülüdür [2]. Karaciğerde sentezlenen fenilalanin hidrosilaz (PAH) enzimi ile Phe tirozine dönüşür [5]. Tirozin, dolayısıyla fenilalanin tiroid hormonlarının yapımında, protein üretiminde ve nörotransmitterlerin (dopamin, nefrin, norepinefrin) yapımında kullanılır. Phe moleküler yapısındaki aromatik gruptan dolayı hidrofobik özelliğe sahiptir ve apolar aminoasitler kategorisindedir. Ayrıca L-Phe ilaç ve gıda sanayisinde katkı maddesi olarak kullanılır [2].

PAH eksikliği ile Fenilketonüri (PKU) hastalığı meydana gelmektedir [5]. PKU aminoasit metabolizması bozukluğundan meydana gelen bir hastalıktır. PKU hastalığında karaciğerde PAH enzimi aktivitesinin eksikliği sebebiyle Phe'den Try sentezi gerçekleşemez. Bu durumda Phe ve metabolitleri kanda birikir [6].

Fenilalanin birçok yöntemle tayin edilebilmektedir. Bunlardan biri de moleküler baskılamadır. Moleküler baskılama tekniği belirli bir analite karşı seçiciliği olan ve spesifik tanıma alanları bulunan yapay reseptörlerin elektrokimyasal olarak hazırlanmasıyla analitin tayinini mümkün kılmaktadır. Bu teknikte belirlenen analitin eşleniğini içeren çapraz bağlı polimerik yapılar hazırlanır [7]. Elektrokimyasal sensörler, basit, uygun maliyetli ve kısa zamanda sinyal verebilme özelliklerinden dolayı sık kullanılan sensörlerdir [8]. Elektrokimyasal sensörler ile elektrot yüzeyinde oluşan etkileşim sonucunda değişen akım ölçülür [9].

Bu çalışmada önemli bir hastalık olan fenilketonürinin hızlı, duyarlı, doğru ve seçici tayini için fenilalanin sensörleri geliştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerde temel ölçüm prensibi olarak voltametri tekniği kullanılmıştır. Yapısal olarak iki farklı tipte elektrot tasarımı ve elektrot modifikasyonu kullanılarak fenilalanin tayini yapılmıştır. Bu çalışmanın birinci kısmı moleküler baskılama yöntemiyle fonksiyonel monomer olarak para-toluensülfonik asit kullanarak L-fenilalaninin baskılanmış elektrokimyasal sensörlerin hazırlanmasını içerir. İkinci kısım ise doğal bir polisakkarit olan GUM temelli poliüretan yapıların kullanılması ile modifiye platin elektrotların hazırlanmasını kapsar.

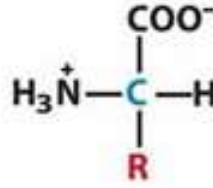
Bu tür elektrotların sensör özelliklerinin belirlenmesinden önce sentezlenen poliüretan yapılarının kimyasal ve termal özelliklerinin tespit edilebilmesi için FTIR, DTA, TGA ve DSC analiz teknikleri kullanılmıştır. Ayrıca polimer yapıların yüzey özellikleri morfolojilerinin aydınlatılabilmesi amacıyla SEM yöntemi kullanılmıştır. Modifiye edilmiş elektrotların kararlılık, duyarlık, seçicilik ve özgüllük özelliğini belirlemek üzere; tarama hızı, elektrolit türü ve pH'sı, film katmanının kalınlığı gibi parametreler, dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV) gibi yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada L-fenilalaninin basit, seçici, ucuz yüksek hassasiyetli tayininin sağlanması amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Aminoasitler ve Fizyolojik Önemi

Aminoasitler, yapısında amino (-NH₂) grubu taşıyan karboksilik asitlerdir. Karboksil karbonuna komşu olan karbondan (alfa karbonunda) amino grubu taşıyan asitler α -aminoasitlerdir. Proteinler, α -aminoasitlerden oluşan büyük molekül ağırlığına sahip polimerlerdir. Doğada yaklaşık 300 tane aminoasit vardır. Proteinlerin yapısında 20 çeşit aminoasit bulunur. Proteinlerin yapısında bulunan aminoasitlere standart aminoasitler denir [10]. Proteinlerin yapı taşı olan aminoasitler aynı zamanda canlılar için azot kaynağıdır. Bir aminoasidin yapısında karbon atomuna bağlı bir karboksil grubu, bir amino grubu ve bir de R grubu bulunur (Şekil 2.1). Aminoasitler R grubuna bağlı olarak birbirinden farklılaşırlar [11].

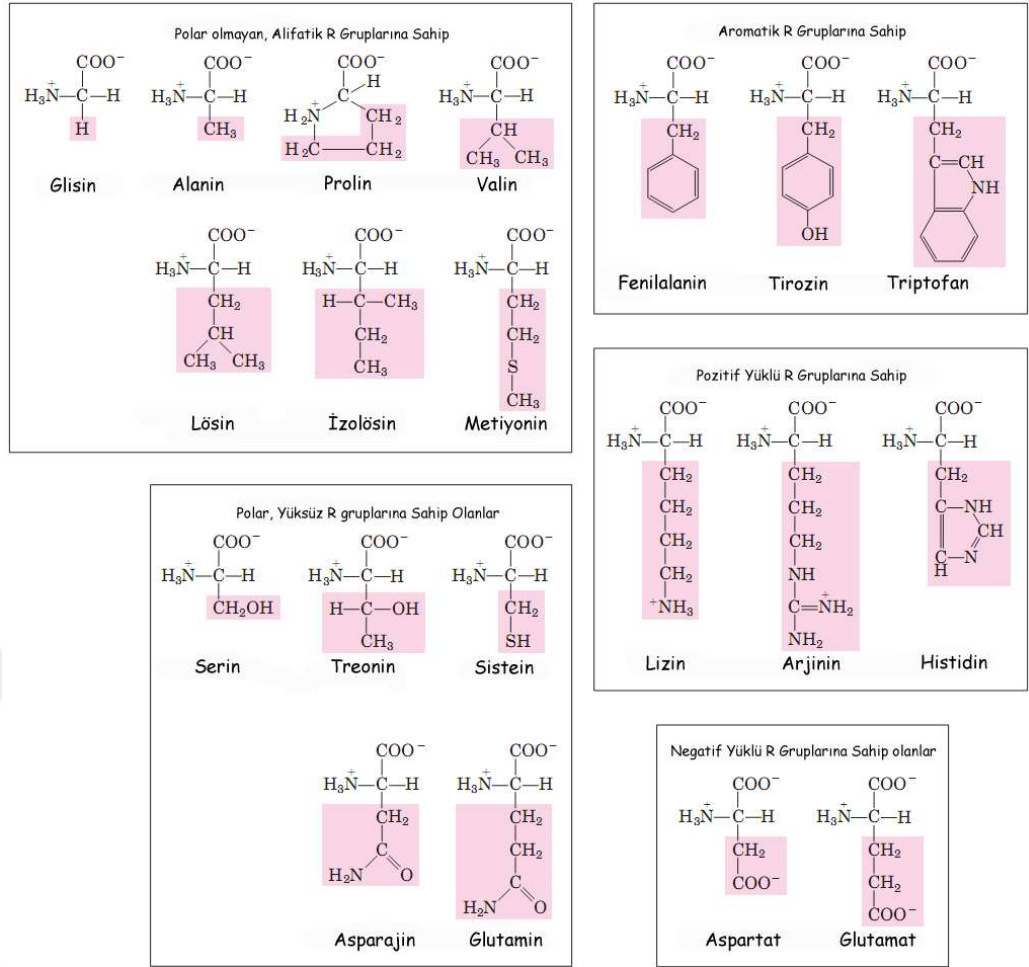


Şekil 2.1: Aminoasit yapısı.

Şekil 2.2’de vücudumuzda bulunan standart aminoasitlerin genel yapısı verilmiştir. Sadece glisin aminoasidinde R grubu yerine H atomu bulunur. Diğer aminoasitler farklı R grupları taşımaktadır. Standart aminoasitler besin değerlerine göre esansiyel aminoasitler ve esansiyel olmayan aminoasitler olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Esansiyel aminoasitler: Maksimum büyümeyi sağlamak için organizmada yeterince sentezlenmeyen ve diyetle organizmaya alınması gereken aminoasitlerdir. Bunlar; Valin (Val), Metiyonin (Met), İzolösin (Ile), Triptofan (Trp), Lösin (Leu), Treonin (Thr), Fenilalanin (Phe), Lizin (Lys), Histidin (His) ve Arginin (Arg) aminoasitleridir.

Esansiyel olmayan aminoasitler: Organizmada sentezlenen aminoasitlerdir [13]. Bunlar; Alanin (Ala), Asparagin, Aspartat (Asp), Glutamat (Glu), Glutamin (Gln), Glisin (Gly), Prolin (Pro), Serin (Ser), Sistein (Cys) ve Tirozin (Tyr) aminoasitleridir.

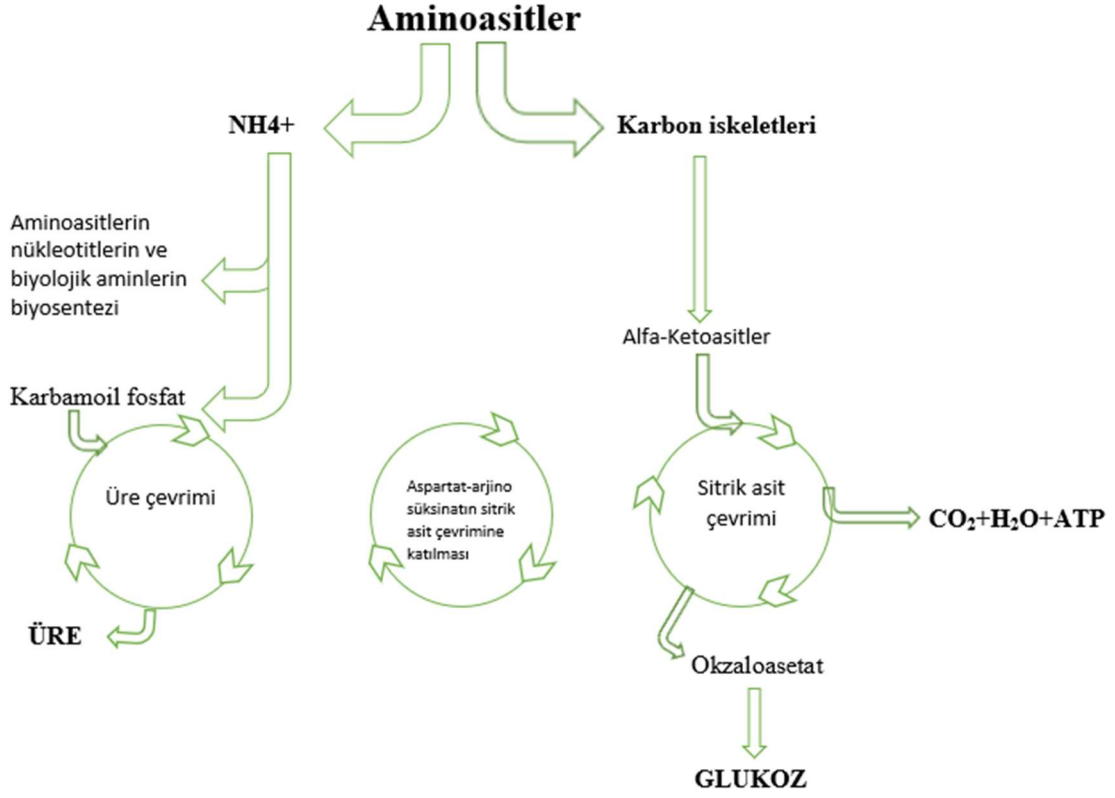


Şekil 2.2: Aminoasitlerin yapısı ve sınıflandırılması [12].

2.2 Aminoasit Metabolizması

Aminoasitler canlı metabolizması açısından oldukça önemli bileşiklerdir (Şekil 2.3). Özellikle insan metabolizmasında protein ve enzim yapılarının oluşturulmasında temel bileşen olarak görev yaparlar. Sindirim kanalında besinsel proteinlerin, enzimlerin etkisiyle parçalanması sonucu aminoasitler oluşur ve bunlar emilerek vücuda alınır. Önemli miktarda aminoasit doku metabolizması sırasında sentezlenir. Kaslar vücudun protein deposudur açlık durumunda kasların yıkılmasıyla aminoasitler oluşur.

Hücrelerin içindeki proteinler devamlı olarak yıkılmakta ve tekrardan sentezlenmektedir. Protein yıkımı sırasında serbest hale geçen aminoasitlerin çoğunluğu protein sentezi için tekrar kullanılır. Aminoasitlerin oksidasyonu ile enerji elde edilir [14].



Şekil 2.3: Aminoasit metabolizmasının şematik olarak özetlenmesi.

Bu aminoasitler arasında fenilalanin, vücut için gerekli olan proteinlerin yapısında bulunan önemli bir aminoasittir ve sadece dışarıdan besinlerle alınan bir aminoasittir [1]. İnsan vücudundaki yüksek fenilalanin seviyeleri sinir hasarına neden olabilmektedir [2].

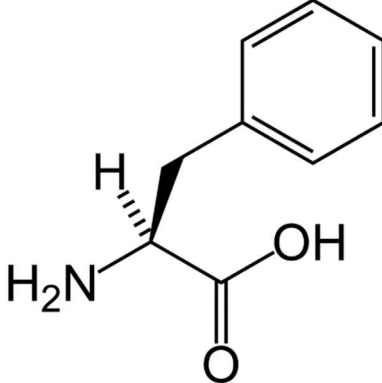
2.3. Fenilalanin (Phe)

Fenilalanin, besin yoluyla organizmaya alınan esansiyel bir aminoasittir. Fenilalanin doğada üç farklı formda bulunur. L-Phe, proteinlerde bulunur. D-Phe, laboratuarda üretilir ve iki çeşidin kombinasyonu şeklinde D, L-Phe çeşidi mevcuttur. Phe'nin yapısal özellikleri Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Yapısındaki fenil halkasından dolayı aromatik amino asittir. Ayrıca hidrofobik ve nonpolar özelliklere sahiptir.

L-Phe, tatlandırıcı çeşidi olan α -aspartam üretiminde kullanılır. Ayrıca Phe; tirozidin, basitrasin ve gramisidin gibi antibiyotiklerin yapısında bulunur [15].

Tirozin, organizmada sentezlenen esansiyel olmayan aminoasittir. Tirozin; protein, nörotransmitter maddeler olan; dopamin, nefrin, norepinefrin ve tiroid hormonlarının sentezinde kullanılır. Phe, tirozinin metabolik öncülüdür. Norepinefrin ruh halini etkilediği için tirozin dolayısıyla fenilalaninin değişik formları depresyon

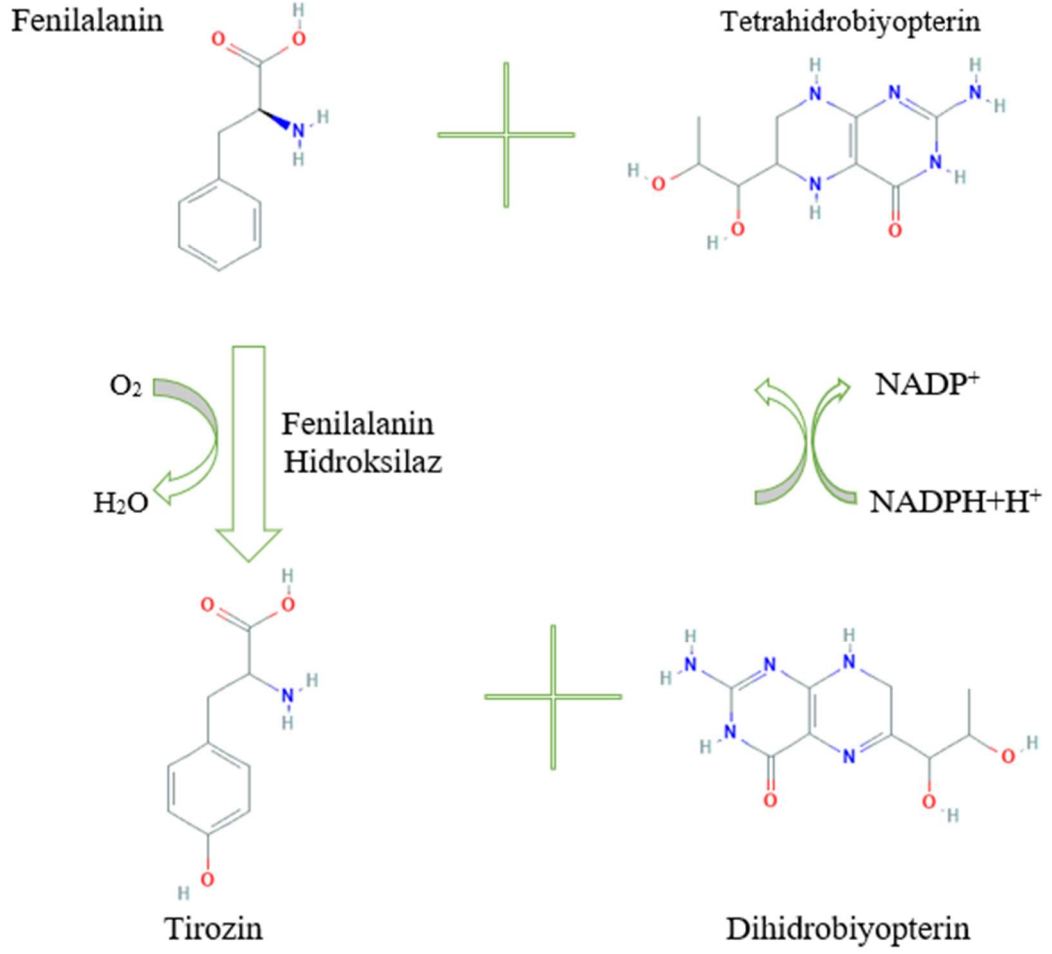
tedavisinde kullanılır. Ayrıca fenilalanin kronik ağrı, parkinson hastalığı ve enflamasyon tedavisinde de kullanılır [5].

Molekül Formülü: C ₉ H ₁₁ NO ₂	
Molekül Ağırlığı: 165.19 g mol ⁻¹	
İzolektrik Nokta(pI): 5.48	
pKa : 1.83 (karboksil), 9.13 (amino)	
Erime Noktası: 283°C	
Sudaki Çözünürlüğü: (mg/mL)	
0°C 19.8 25°C 29.6 50°C 44.3 75°C 66.2 100°C 99.0	

Şekil 2.4: L-Phe'nin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri.

2.4. Fenilalanin Metabolizması

Fenilalanin, vücutta fenilalanin hidroksilaz enzimi ile tirozine dönüştürülür. Tetrahidrobiopterin, fenilalanin hidroksilaz enziminin koenzimidir. Şekil 2.5'deki çevrimde görüldüğü gibi enzim elektron ihtiyacını bu koenzimden karşılar [14]. Şekil:2.6'da sağlıklı bireyde fenilalaninin metabolik yolları gösterilmiştir. Bu yollar dahilinde fenilalanin, Trozin, DOPA, dopamin, norepinefrin ve epinefrine dönüşebilir. Nörotransmitter olarak bu hormonlar vücudumuz için çok önemlidir. Bu nedenle fenilalanin özellikle hormon metabolizması için de önem arzeder.



Şekil 2.5: Fenilalaninin tirozine çevriminde tetrahidrobiyopterin dönüşümü.

2.5. Fenilalanin Metabolizması Bozuklukları

Fenilketonüri, fenilalanin hidroksilaz enziminin geninde oluşan mutasyonlar sonucu enzimin işlevsiz hale gelmesi sonucu oluşan genetik bozukluktur [16]. Karaciğerde PAH enziminin aktivite eksikliği fenilalanin tirozine dönüştürülmesine engel olmaktadır. Bu da kandaki Phe ve metabolitlerinin seviyesinin yükselmesine neden olur [17].

Fenilketonüri tanısı için en güvenilir gösterge kandaki veya idrardaki fenilalanin derişimidir. Sağlıklı bireylerde kandaki fenilalanin miktarı 2 mg/dL'nin altındadır. Yenidoğan tarama testinde kandaki fenilalanin miktarı 2 ila 10 mg/dL arasında olanlar hiperfenilalaninemi, 10 ila 20 mg/dL arasında olanlar orta dereceli fenilketonuri, 20 mg/dL'den fazla olanlar ise klasik fenilketonuridir [18].

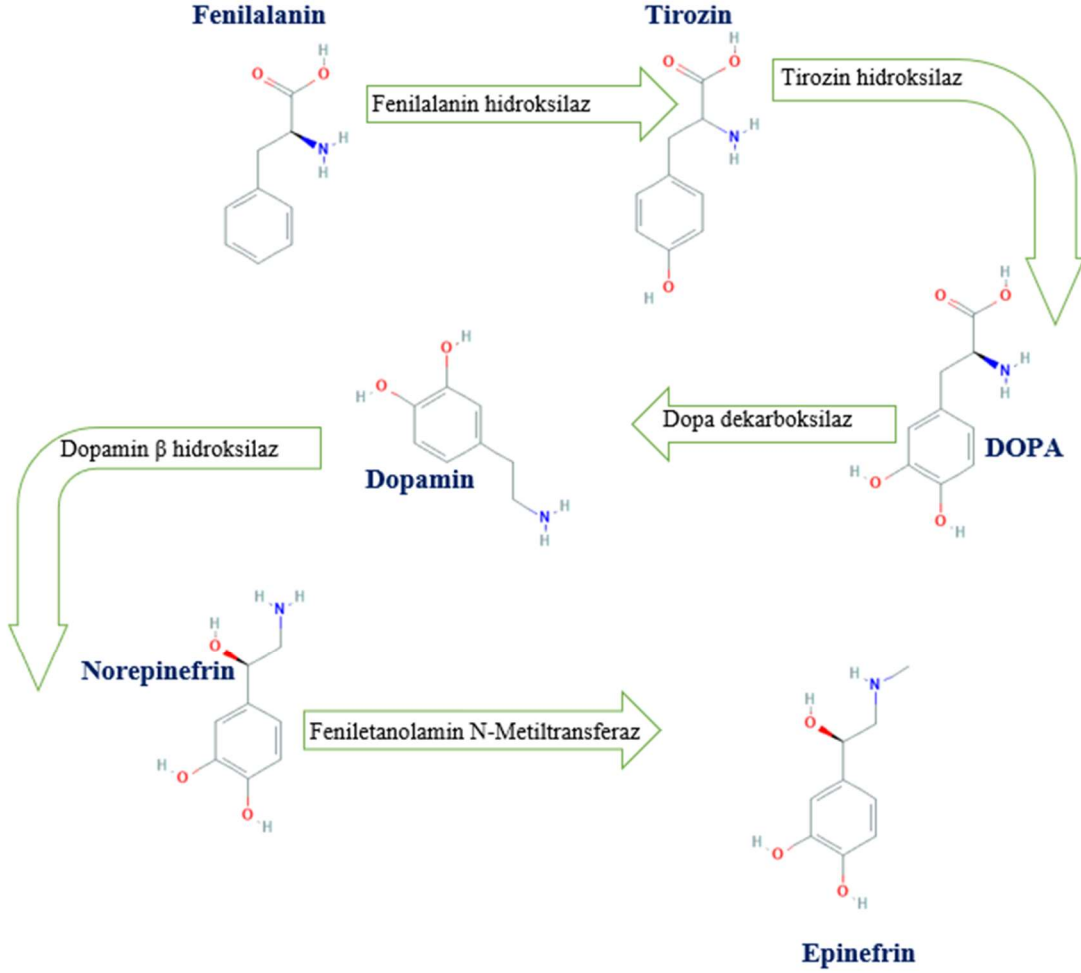
Kılcal elektroforez, florometri, kromatografi, iyon değişimli kolon kromatografisi, kütle spektrometresi ve spektrofotometri [16], gaz kromatografisi ve elektroforez, izotop seyreltme sıvı kromatografisi / tandem kütle spektrometresi PKU'nun saptanması için en yaygın kullanılan yöntemlerdir [19]. PKU hastası olan çocuklardaki zihinsel ve gelişimsel bozuklukların ilerlemesini önlemek için bebeklerde PKU'nun hızlı tanılanması gerekir [16].

2013 Yılında Xi-ming Mo ve arkadaşları çocuklarda ve yenidoğanlarda PKU'nun taranması ve teşhisi için basit, hızlı ve kullanışlı bir yöntem geliştirmek için; yaşları 2 ay ile 7 yıl arasında değişen 102 çocuk ve doğumdan 48 / 72 saat sonra 32 yenidoğan bebeğin topuğundan açlık kan örneği alınır. Alınan örneklerde; plazma, serum ve tam kandaki fenilalanin (Phe) ve tirozin (Tyr) konsantrasyonlarını belirlemek için yüksek performanslı sıvı kromatografi ile Ultraviole (HPLC-UV) kullanılır. Yapılan ölçümler sonucu kandaki Phe derişiminin Try derişiminden fazla olduğu tespit edilir [17].

Fenilketonürinin, görölme sebebi karaciğer enzimi olan fenilalanin hidrosilaz eksikliğidir. Bu enzim fenilalaninin tirozine dönüşmesini katalize eder [20]. Bu dönüşüm gerçekleşmezse aşırı fenilalanin serumda birikir ve metabolitleri ile birlikte idrarla atılır [21]. Erken teşhis edildiğinde PKU, düşük fenilalanin diyeti uygulanarak tedavi edilir. Bu şekilde hastanın normal gelişimi devam eder fakat fenilalanin düzeyinin sıklıkla ve tüm yaşamları süresince izlenmesi gerekir. Ulusal Sağlık Enstitüleri, ayda bir veya iki kez test edilmesini önermektedir. Gebelik sırasında haftada iki kere test edilmelidir. Bu tespitlerin yapılmasında birkaç yarı nicel yöntemin yanı sıra, sayısal yöntemler de vardır. Kan ve idrarda fenilalanin tayini yapılabilir. Spektrofotometri, fluorometri ile aminoasit analizi, fenilalanin seviyesinin belirlenmesi için referans yöntemler olarak geliştirilmiştir. İnsan serumunda bu yöntemler genellikle vakit gerektirir, numunelerin hazırlanması oldukça karmaşıktır ve yetenekli teknisyenler tarafından yapılması gerekir. İdrardaki fenilalanin konsantrasyonu daha yüksek olduğu için fenilalaninin belirlenmesinde idrarla yapılan analizler tercih edilir.

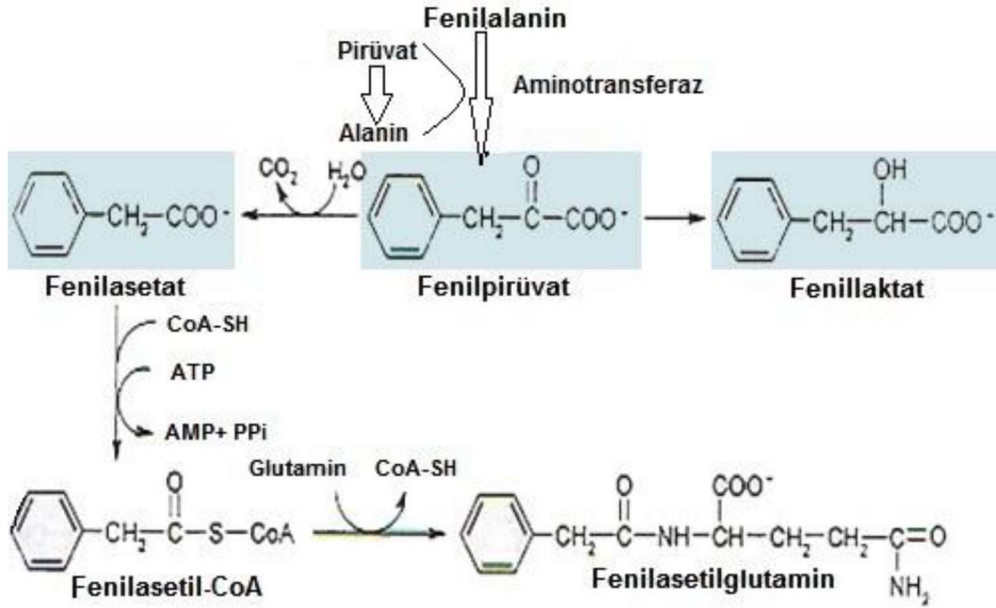
Bu nedenle basit, ucuz ve hızlı bir yöntemle insan idrarındaki fenilalaninin kantitatif tayin edilmesi gereklidir. Birçok önemli analit tipinin saptanmasında biyosensörler; hızlı, seçici ve ileri analitik araçlar olarak kullanılır. Fenilalanin tayini için enzimatik testler ve biyosensörler kullanılır.

Örneğin fenilalanin dehidrojenaz (PDH) enzimi ile kolorimetrik veya potansiyometrik yöntemler, amperometrik biyosensörler kullanılarak fenilalanin tayin edilebilir [19].



Şekil 2.6: Sağlıklı bireyde fenilalaninin metabolik yolları.

Sağlıklı bireylerde Şekil 2.6’da görüldüğü gibi fenilalanin tirozine dönüşmesiyle başlayan bir dizi tepkimenin sonucunda dopamin (nörotransmitter), epinefrin ve norepinefrin (adrenal medulla hormonları) oluşur. Ayrıca tirozinden; deriye, saça renk veren melanin ve tiroksin (tiroid hormonu) elde edilir [11].



Şekil 2.7: Fenilketonürlü bireylerde Phe metabolizmasının şematik gösterimi [15].

Fenilketonürlü hastalarda transaminasyon geçiren fenilalanin önce fenilpirüvata ardından ya fenillaktat ya da fenilasetata dönüşür (Şekil 2.7). İdrardaki karakteristik fenilasetat kokusu yeni doğanlarda PKU tanısı konulmasında belirteç olarak kullanılabilir [14].

2.6.Fenilalaninin Tayinine Yönelik Çalışmalar

Fenilketonüri, fenilalanin ile karakterize edilen doğuştan metabolik bir hastalıktır. Bu hiperfenilalaninemi temel olarak fenilalaninin tirozine dönüşümünden sorumlu olan enzim olan fenilalanin hidroksilazın anormal derecede düşük aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Bu genetik hastalığın önemli bir sonucu olarak, fenilalanin ve biyokimyasal yollardan metabolitleri beyinde birikir ve kendisini anormal nörolojik gelişim ve zekâ geriliği olarak gösteren doku hasarına yol açar [22]. Bu anormallik için bir tedavi yoktur ve etkilenen bireyler için en etkili tedavi, erken teşhis ve ardından gıdada fenilalanin alımını kesin olarak sınırlandırmaktır [23]. Sonuç olarak, birçok ülkede yenidoğan için hiperfenilalaninemi tarama programları uzun yıllardır sağlık kurumları tarafından yürütülmektedir. Kapiler elektroforez, kromatografi, kütle spektrometresi, iyon değişim kromatografisi, spektrofotometri ve florometri fenilalaninin saptanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerdir [16].

Teşhis süresi, PKU'dan etkilenen çocuklara yardım etmede önemlidir, bu nedenle etkilenen bebeklerde PKU'nun hızlı bir şekilde teşhisi, hastalıkla ilişkili zihinsel ve gelişimsel bozuklukların ilerlemesini önlememize yardımcı olabilir. Genel olarak, PKU izlemesi için minimum fenilalanin konsantrasyonu, kanda ve tükürükte sırasıyla 0.5 mM ve 10.0 mM olarak kabul edilir [24].

2.7.Fenilalaninin Elektrokimyasal Analizi

Serum veya diğer matrislerde fenilalanin tayini için büyük bir hassasiyet sunan, Gutrie testi, flourometrik ve HPLC-Tandem Kütle Spektrometresi [25-28] gibi fenilalanin tayini için az sayıda yöntem vardır. Bu hastalığın tedavisi yoktur ve erken teşhis; belirtilerin daha sonraki yaşamda etkili şekilde baskılanması için büyük önem taşır. Birçok ülkede modern kütle spektrometrik veya kromatografik yöntemlere erişim bütün sağlık merkezlerinde bulunmaz ve bu nedenle, fenilketonüri tayini, numunenin merkezi laboratuvarlara gönderilmesini gerektirir. Bu işlem pahalıdır ve numunenin laboratuvara ulaşması ve sonuçların geri dönüşü için günler geçmesi zaman alır [22]. Bu nedenle, tüm sağlık merkezlerinde/doğum birimlerinde gerçekleştirilebilecek kadar basit olan ve ayrıca duyarlılık, seçicilik ve tekrarlanabilirlik açısından uygun analitik özelliklere sahip olan bir yönteme ihtiyaç duyulur. Bu nedenle elektrokimyasal sensörler önemli bir alternatiftir. Elektrokimyasal sensörler, hızlı, pratik, örnek hazırlama basamakları uzun olmayan tekniklerdir. Ayrıca etkin ve uzman personel ihtiyacı oldukça azdır. Ölçüm için gerekli donanımlar oldukça ekonomiktir. Diğer ölçüm tekniklerindeki cihazlar (özellikle, HPLC, GC, Kapiler elektroforez, iyon kromatografisi vb.) potansiyometrelere göre oldukça pahalı sistemlerdir.

Moleküler olarak basılmış polimerler, moleküler tanıma yeteneğine sahip çok yönlü malzemelerdir [22]. Yapısal olarak, moleküler baskılanmış polimerler bir şablon molekülünün varlığında sentezlenen yüksek çapraz bağlanmış polimerlerden oluşur [29]. Bu çapraz bağlı polimerler bir elektropolimerizasyon ile hazırlanabileceği gibi şablonun bulunduğu ortamda klasik polimerizasyon teknikleri ile de hazırlanabilir. Şablonun polimerizasyondan sonra çıkarılması, şablon için afinite ve seçiciliği koruyan bir boşluk bırakır. Moleküler baskılı polimerler, sensör geliştirmeye çalışan bilim adamlarının yoğun ilgisini çekmiştir. Ancak literatürde moleküler baskı teknolojisine dayanan potansiyometrik sensörlerin tasarımı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [30-35].

2.8. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama kavramı, 1894’de Fischer’in enzim-substrat etkileşimini belirtmek için oluşturduğu “Anahtar-Kilit” modelinden esinlenerek ortaya çıkmaya başlamıştır. Daha sonra 1931 yılında Polyakov, seçici moleküler tanıma konusunda çalışmalar yapmış ve sodyum silikat çözeltisini asitlendirerek jelimsi silika polimer sentezlemiştir. Kurutma işleminin ardından sert bir matriks elde etmiştir [36].

1972 yılında Takagashi, Klotz, Wulff, ve Sarhan birbirlerinden bağımsız olarak, moleküler baskılamanın ilk örnekleri olan, sentetik organik polimerleri sentezlemiştir [37-38]. Kovalent baskılama yöntemini ilk defa Wulff öne sürmüştür [39]. Mosbach kovalent baskılamaya göre daha basit olan ve ikincil etkileşimlere dayanan kovalent olmayan baskılama yöntemi geliştirmiştir [40].

Moleküler baskılama, polimer üzerinde kalıp moleküle (analit) bağlı olarak spesifik tanıma alanlarının oluşumu prosesidir. Moleküler baskılama kullanılarak sentetik reseptörler üretilir. Sentetik reseptörler; dayanıklılık, yüksek afinite, özgüllük ve düşük maliyetli üretim gibi özelliklerinden dolayı doğal reseptörlere alternatif olarak kullanılırlar. MIP tabanlı sensörlerin duyarlılığı, grafen oksit, karbon nanotüpler veya nanopartiküller gibi nanomateryallerle birleştirilerek artırılabilir [41].

MIP’lerin baskılı boşluğuna, özel bir tanıma alanlarının yerleştirilmesi ile kalıp molekülün, şekil ve boyuta bağlı seçiciliğinden ziyade interferanslara karşı da daha seçici hale getirilmesi sağlanır. Kovalent bağların, hidrojen bağlarının ve kulombik ve supramoleküler etkileşimlerin yanı sıra metal şelat ve π - π istifinin oluşması için farklı fonksiyonel monomerler kullanılmaktadır. MIP’ler istenen şekil ve boyutta boncuklar halinde, kemosensör üretimi için ince filmler şeklinde üretilebilir. Elektropolimerizasyon veya elektrokimyasal olarak indüklenmiş polimerizasyon, iletken ve iletken olmayan MIP filmlerinin sentezi için en uygun yöntemdir [42].

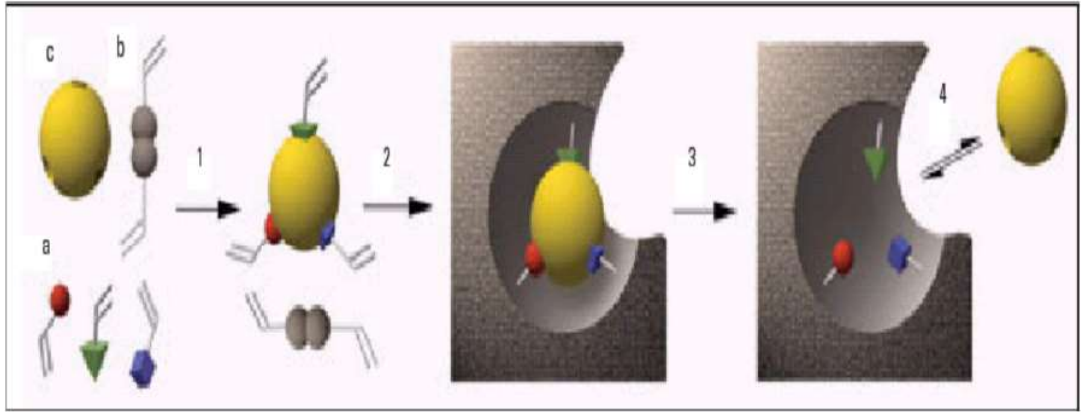
Moleküler baskılama tekniği, fonksiyonel monomerlerin fonksiyonu aracılığıyla kalıp moleküllerin spesifik olarak tanınması amacıyla baskı bölgelerini sentezlemek için kullanılır. Yüksek afinite ve seçiciliğe sahip moleküler baskılanmış polimerler; ayırma, katı faz ekstraksiyonu, biyomimetik sensörler ve enzim taklitleri katalizi gibi çeşitli araştırma alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Çizelge 2.1). Moleküler baskılı polimerlerin boyutunun küçük olması, dispersiyon işleminin zor olması, dezavantajlarıdır. Manyetik materyaller basit, duyarlı, düşük maliyetli ve hızlı ayrılma

avantajlarından dolayı zenginleştirme, biyolojik ayırma, biyomedikal görüntüleme ve diagnostik uygulamalarda kullanılır [43].

Çizelge 2.1: Elektrokimyasal MIP sensörleri ile analitlerin tayininden örnekler [41].

ANALİT	ALGILAMA YÖNTEMİ	LOD (M)
İLAÇ ETKEN MADDESİ		
Asetaminofen	Voltametri	2.30×10^{-9}
Parasetamol(asetaminofen)	Amperometri	4.30×10^{-8}
Gansiklovir	Amperometri	1.50×10^{-9}
Klorambucil	Voltametri	1.18×10^{-9}
Dekstrometorfan	Potansiyometri	1.00×10^{-6}
Salbutamol	Voltametri	7.00×10^{-9}
İfosfamid	Voltametri	4.20×10^{-10}
Digoksin	Empedans	6.95×10^{-11}
ANTİBİYOTİKLER		
Norfloksasin	Amperometri	4.60×10^{-8}
Kanamisin	Amperometri	$1,20 \times 10^{-8}$
Ceftazidime	Elektrokimyasal	5.50×10^{-10}
Metronidazol	Elektrokimyasal	9.10×10^{-8}
BİYOBELİRTEÇLER		
Tetrahidrokanabinol ve tripsin	Kapasitif	1.00×10^{-14}
Dopamin	Voltametri	3.30×10^{-8}
L-dopa	Elektrokimyasal	1.20×10^{-8}
Norepinefrin	Elektrokimyasal	1.00×10^{-7}
Melatonin	Amperometri	6.00×10^{-9}
L-Fenilalanin	Voltametri	1.00×10^{-9}
Tirozin ve ürik asit	DPV	3.20×10^{-9}
BSA	ÇBS	1.20×10^{-8}
Karnozin	İmpedimetrik kapasite	2.00×10^{-5}
17β-östradiol	SWA	2.00×10^{-8}
Oksitosin	Empedans	6.00×10^{-5}
Oksitlenmiş glutatyon	Amperometri	1.80×10^{-9}

Moleküler baskılama, kalıp moleküle şekil ve büyüklük bakımından benzeyen fonksiyonel monomerle birlikte kompleks oluşturup polimerizasyon yapma tekniğidir. Kalıp molekül, çapraz bağlayıcı, fonksiyonel monomer ve başlatıcının uygun çözücünde çözünmesiyle polimerizasyon işlemi başlar. Genel hatları ile moleküler baskılama yöntemi Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8: Moleküler baskılama işleminin şematik gösterimi [44].

- (a) fonksiyonel monomerler
- (b) çapraz bağlayıcı
- (c) kalıp molekül

1. basamakta fonksiyonel monomerler kalıp molekül ile kompleks oluştururlar. Moleküler baskılamanın başarıyla gerçekleşmesi için karalı bir kalıp molekül-monomer kompleksi oluşmalıdır.

2. basamakta fonksiyonel monomerler çapraz bağlayıcı ile kopolimerize olurlar.

3. basamakta polimerizasyon ilerlerken kalıp molekül etrafında çözünmeyen, çapraz bağlı polimer ağ oluşur. Böylelikle kalıp molekülün üç boyutlu yapısına benzer mikroboşlukları olan polimer oluşur.

4. basamakta polimerizasyon işleminden sonra kalıp molekül, desorpsiyon işlemi ile polimerik yapıdan uzaklaştırılır. Böylece kalıp molekül için yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip baskılanmış bağlanma bölgelerine sahip bir polimer elde edilir [15].

2.9. Moleküler Baskılamanın Temel Bileşenleri

Moleküler baskılı polimerin tasarlanması ve hazırlanması aşamasında polimerizasyon bileşenleri olarak kalıp molekül, fonksiyonel monomer(ler), çapraz bağlayıcı ve uygun çözücü kullanılır. Polimerizasyon bileşenlerinin seçimi moleküler baskılamanın başarılı olması için önemlidir. Bileşenler ve genel özellikleri aşağıda özetlenmiştir [44].

2.9.1. Kalıp molekül

Moleküler baskılamanın başarılı olmasında kalıp molekül kilit rol oynar. Kalıp molekülün fonksiyonel monomerle kompleks oluşturabilmesi için uygun fonksiyonel grupları içermesi gerekir. Kalıp molekülün içerdiği karboksil, hidroksil, amino ve amid grupları aracılığıyla kalıp molekül ve fonksiyonel gruplar arasında dipol-dipol, hidrojen ve iyonik etkileşimler oluşur [15]. Kalıp molekül polimerizasyon aşamasında kimyasal olarak inert olmalıdır. Kalıp molekülün polimerize olacak grup içermesi, polimerizasyonu inhibe edecek veya geciktirecek fonksiyonel gruplar içermemesi, kararlı olması ve farklı reaksiyonlara girmemesi gerekir. Kalıp molekülün seçiminde molekül büyüklüğü de önemlidir. Polimerin çapraz bağları arasından çok büyük moleküllerin uzaklaştırılması zor olduğundan, moleküler baskılama yönteminde kalıp olarak genellikle küçük moleküller tercih edilir [45]. Baskılanacak molekül olarak aminoasitler, proteinler, ilaçlar, karbonhidratlar, nükleotid bazlar, koenzimler, hormonlar ve pestisitler kullanılmıştır [46].

2.9.2. Fonksiyonel monomer

Seçilen fonksiyonel monomerin kalıp molekülle etkileşmesi, kalıp moleküle uygun boşluklar oluşturması gerekir. Monomer üzerinde bulunan fonksiyonel gruplar kalıp molekül ile etkileşmeyi, doymamış bağlar ise polimerleşmeyi sağlar [8]. Moleküler baskılamada en sık kullanılan fonksiyonel monomerler Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2: Moleküler baskılamada en sık kullanılan fonksiyonel monomerler.

Fonksiyonel Monomer	Açık Yapı Formülü	Fonksiyonel Monomer	Açık Yapı Formülü
Metakrilik Asit		Akrilik Asit	
Triflorometil Akrilik Asit		1-Vinylimidazol	
4-Vinilpiridin		2-Vinilpiridin	
2-Akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit		Akrilamit	
2-Hidroksietilmetakrilat			

Moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerler Çizelge 2.3'te görüldüğü üzere asidik özelliklerine göre üç kısma ayrılabilir.

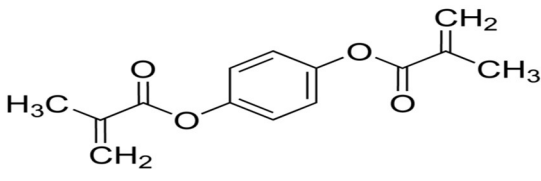
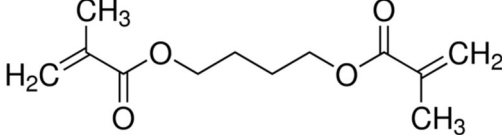
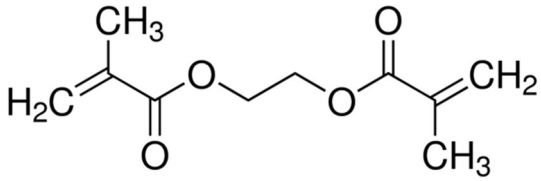
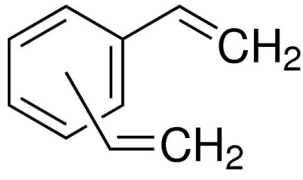
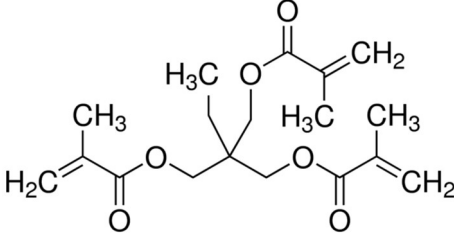
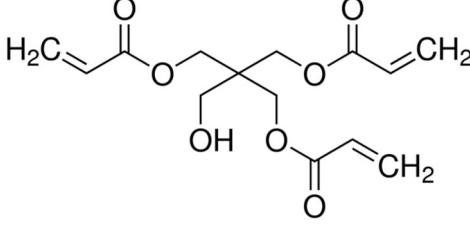
Çizelge 2.3: Moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerler.

Asidik Karakterli Monomerler	Bazik Karakterli Monomerler	Nötral Karakterli Monomerler
Metakrilik asit	4-vinil piridin	Akrilamit
Akrilik asit	2-vinil piridin	2-hidroksietil metakrilat
Akrilamido-(2-metil)-propan	4-(5)-vinylimidazol	Metakrilamit
2-(triflorometil)- akrilik asit	1-vinil imidazol	Akrilonitril
p-vinilbenzoik asit	Allilamin	Stiren
2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit	N,N'-dietilaminoetil metakrilamit	Metilmetakrilat
		Etilstiren

2.9.3. Çapraz bağlayıcı

Baskılanmış polimerleri sentezlemek için kullanılan çapraz bağlayıcılar; polimerin matris yapısını kontrol ederek polimerin jel formunun, makro gözenekli veya mikrojel pudra şeklinde olmasını sağlar.

Çizelge 2.4: Moleküler baskılamada sık kullanılan çapraz bağlayıcılar.

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Açık Molekül Yapısı
İzo propilen bis (1,4-fenilen) dimetakrilat	
Tetra metilen dimetakrilat	
Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA)	
Divinilbenzen (DVB)	
Trimetilopropan Trimetakrilat (TRIM)	
Pentaeritritol Triakrilat (PETRA)	

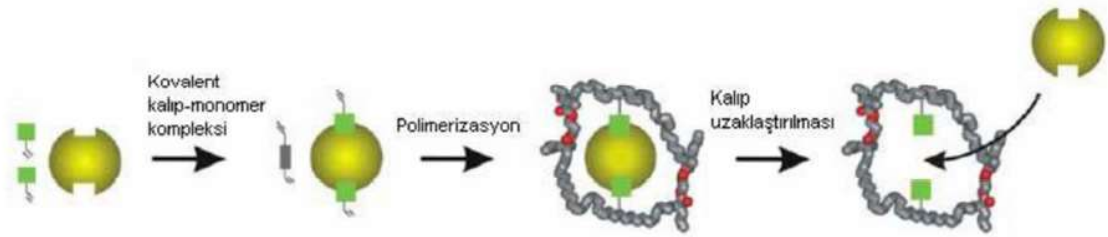
2.9.4. Moleküler baskılama işleminde çözücünün önemi

Çözücü, polimerizasyon işleminde kullanılan tüm kimyasalların tek bir fazda bir araya gelerek homojen olmasını sağlar. Makrogözenekli polimerlerin sentezinde gözenek oluşumundan sorumludur. Çözücü genellikle gözenek oluşturucu anlamına gelen porojen olarak da adlandırılır. Çözücü hacminin yüksek olması oluşacak gözeneklerin hacminin artmasına sebep olur [8].

2.10. Kovalent Baskılama

Wulff ve arkadaşları; p-vinilbenzenboronik asit ile 4-nitrofenil- α D-mannopiranositini 2:1 oranında birleştirerek elde ettikleri kompleks etilen dimetakrilat eşliğinde polimerleştirerek ilk defa kovalent baskılama yapmışlardır [38].

Kovalent baskılamada, polimerizasyondan önce kalıp molekül ile fonksiyonel monomer birbirlerine kovalent bağlar ile bağlanır. Polimerizasyondan sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak için kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Kalıp molekül, baskılanmış polimerlerle birleştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur [49-50]. Genel hatları ile kovalent baskılama yöntemi Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9: Kovalent baskılamanın şematik gösterimi [44].

2.10.1. Kovalent baskılamanın avantajları

Kovalent baskılama

- Fonksiyonel monomer-kalıp molekül kompleksi oldukça kararlıdır
- Fonksiyonel monomer-kalıp molekül kompleksi stokiometrik oranlarda gerçekleştiği için homojen bir dağılıma sahiptir
- Oluşan konjugatlar kararlı olduğu için yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar çözücü gibi polimerizasyon koşullarında istenildiği gibi uygulanabilir [51].

2.10.2. Kovalent baskılamanın dezavantajları

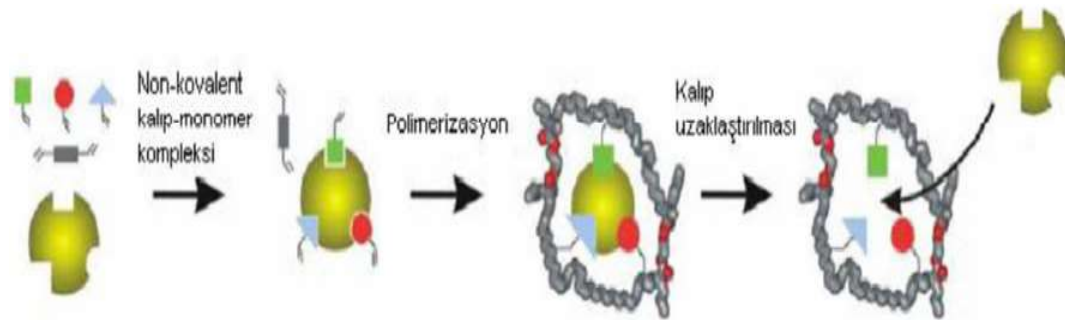
Kovalent baskılama

- Fonksiyonel monomer-kalıp molekül kompleksinin sentezinde sorunlar çıkabilir ve sentez pek ekonomik değildir
- Kalıp molekülün polimere tersinir olarak kovalent bağlanma sayısı sınırlıdır
- Kovalent bağ oluşumu yavaş gerçekleştiği için bağlanma kinetiği yavaştır
- Kovalent bağın oluşumu ve kırılması yavaş gerçekleştiğinden kalıp molekülün bağlanma ve ayrılmasını yavaşlatır bu nedenle kromatografik ayırmalarda kullanımı sınırlıdır [44,52-55].

2.11. Non-Kovalent Baskılama

Mosbach ve arkadaşları, moleküler baskılama işleminin gerçekleşmesi için kovalent bağ oluşmasının zorunlu olmadığını belirterek, kovalent olmayan etkileşimler ile moleküler baskılama yapmıştır. MIP'ler üzerindeki enantiyomerik çözünmeyi incelemek için MIP'leri kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında non-kovalent ve non-iyonik etkileşimleri kullanarak hazırlamıştır [40,56]. Genel hatları ile non-kovalent baskılama yöntemi Şekil 2.10'da gösterilmiştir.

Non-kovalent baskılama; fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve koordinasyon bağ oluşumu gibi etkileşimler ile bağlanması ile gerçekleşir. Polimerizasyon işleminden sonra uygun çözücü ile non-kovalent etkileşimler kırılır ve kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Kalıp molekül ile baskılanmış polimerler birleştirildiğinde aynı non-kovalent etkileşimlerle bağlanır [57,58].



Şekil 2.10: Non-Kovalent baskılamanın şematik gösterimi [30].

2.11.1. Non-Kovalent baskılamanın avantajları

Non-Kovalent baskılama

- Kalıp molekülün polimerden uzaklaşma koşulları daha kolaydır
- Non-Kovalent etkileşimler kovalent bağlara kıyasla daha zayıf olduğu için kalıp molekülün bağlanması ve ayrılması hızlıdır
- Polimerizasyon öncesinde non-kovalent etkileşimler kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin düzenlenmesine fırsat tanıdığı için basit ve sorunsuzdur
- Non-kovalent baskılama kinetiği kovalent baskılamayla kıyaslandığında enzim-substrat bağlanmasına benzer
- Kalıp molekülün yapısı ve reaktivitesi hakkında spesifik bilgiye ihtiyaç duymaksızın baskılanmış polimer hazırlanabilir [44,53,59,60].

2.11.2. Non-Kovalent baskılamanın dezavantajları

Non-Kovalent baskılama

- Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül kompleksi stokiyometrik oranlarda gerçekleşmediği için değişkendir ve heterojen bir dağılıma sahiptir. Bu dağılım spesifik olmayan bağlanmalara ve kalıp molekülün zayıf moleküller tanımasına neden olabilmektedir.
- Kovalent olmayan etkileşimleri en üst düzeyde oluşturabilmek için polimerizasyon koşullarının çok dikkatli seçilmesi gerekmektedir.
- Polimerizasyon aşamasında bağ oluşum dengesini arttırmak amacıyla çok fazla fonksiyonel monomer kullanıldığı için spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşmasına neden olur ve seçici bağlanmayı azaltır [44,53,59-60].

2.12. Elektrokimyasal Sensörler

2.12.1. Voltametrik sensörler

Elektroanalitik kimya, elektrokimyasal hücredeki analit çözeltisinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan kalitatif ve kantitatif yöntemleri inceler. Elektroanalitik metodlar ile elektrot ara yüzeylerde meydana gelen kütle aktarım hızı, yük

aktarımın stokiyometrisi ve hızı, adsorpsiyon derecesi kimyasal tepkimelerin hızı ve denge sabitleri gibi bilgilere ulaşılabilir [62-67].

Elektroanalitik yöntemler ikiye ayrılır.

a) *Durağan yöntemler*: Net akımın sıfır olduğu denge durumundaki yöntemlerdir.

b) *Dinamik yöntemler*: Denge durumundan uzakta net akımın gözlemlendiği, sıfır olmadığı yöntemlerdir. Elektroanalitik tekniklerin büyük bir kısmı dinamik yöntemlerden oluşur. Dinamik yöntemler; potansiyel kontrollü, yük kontrollü veya akım kontrollü yöntemlerdir [9]. Voltametri, elektrokimyasal bir hücreye uygulanan potansiyelle bağlı olarak oluşan kimyasal değişimden dolayı hücreden geçen akımın ölçüldüğü tekniklerin genel adıdır. Voltametri, potansiyel kontrollü bir tekniktir. Elde edilen akım-potansiyel eğrisine de voltamogram denir. Elektrokimyasal hücrede indirgenmenin olduğu elektrot katod, yükseltgenmenin olduğu elektrot ise anottur. Bu durum hem galvanik hem de elektrolitik hücreler için geçerlidir.

Elektrokimyasal pillerde iki elektrot kullanılırken elektroanalitik işlemlerde genellikle üç elektrot kullanılır.

1) *Referans (karşılaştırma) elektrotları*: Polarizlenemeyen elektrot olarak da adlandırılır. Referans elektrotların potansiyelleri bilinir ve daima sabittir. Potansiyelin sabit olmasındaki kasıt potansiyeldeki değişimin akım, zaman ve diğer değişkenlerdeki değişimlerden minimum ölçüde etkilenmesidir. Bu sayede potansiyeli bilinmeyen elektrodun potansiyeli hesaplanır. Ag/AgCl ve kalomel elektrotlar referans elektrodu olarak en fazla kullanılan elektrotlardır.

2) *Çalışma (ölçme) elektrotları*: Bu elektrot incelenen elektrokimyasal olayın gerçekleştiği elektrottur ve elektrokimyasal ölçüm bölgesini oluşturur. Polarize edilebilen ve zamanla potansiyeli değiştirilen elektrotlardır. Bu elektrotlar amaca bağlı olarak soy (inert) veya soy olmayan metallerden seçilebilir. Çalışma elektrodu olarak en yaygın şekilde kullanılan materyaller; cıva, platin, altın, paladyum, karbon (grafit, karbon pasta elektrot, camsı karbon, karbon kumaş elektrot) elektrottur.

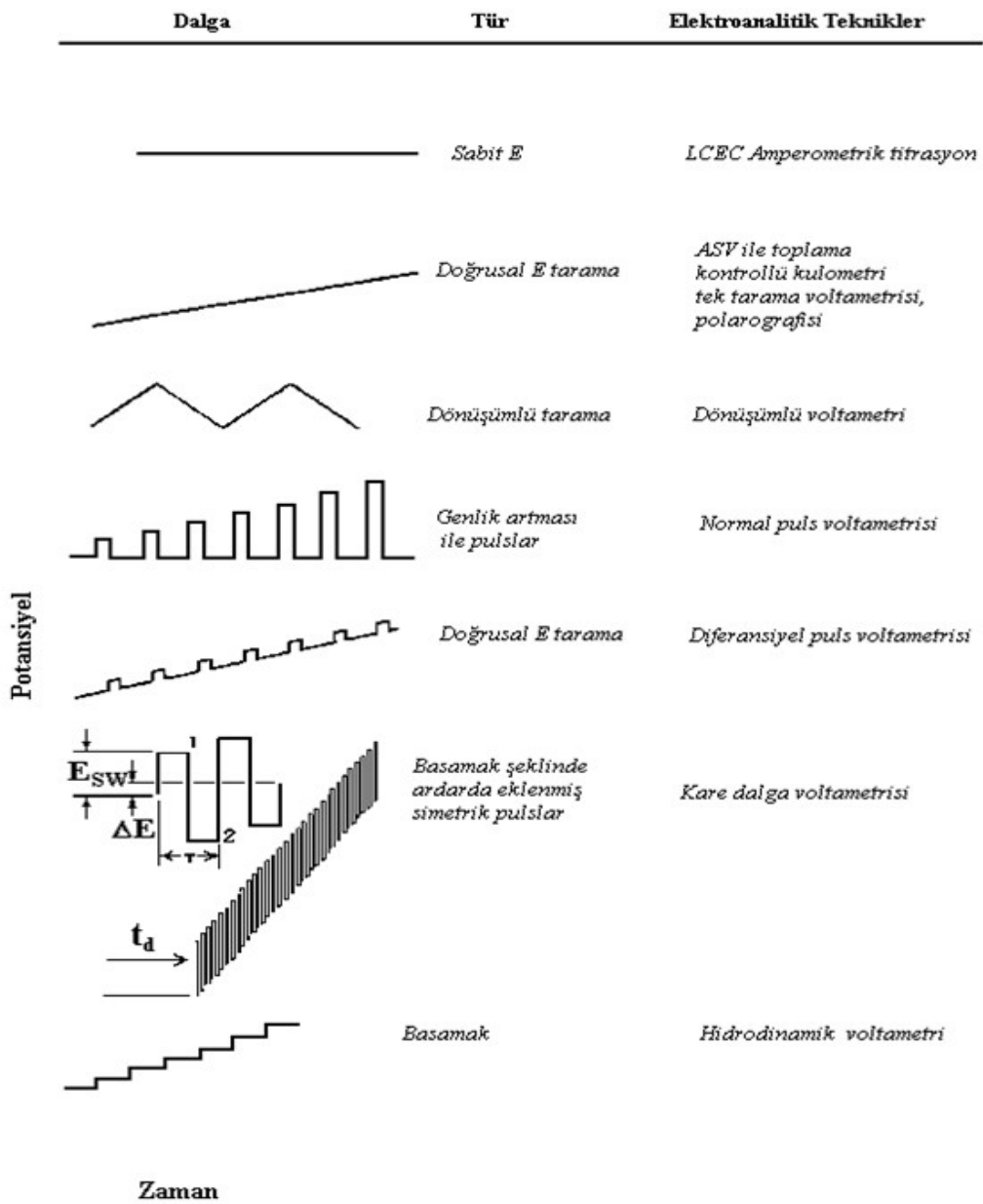
3) *Karşı (yardımcı) elektrotlar*: Bu elektrot, elektronlar için kaynak veya havuz oluşturur. Böylece pilden akımın geçmesini sağlar. Çoğunlukla potansiyeli ölçülmez ve bilinmez. Genellikle soy metallerden seçilir. Karşı elektrot olarak en yaygın şekilde kullanılan materyaller: platin, altın, cıva, bakır ve grafitir.

Voltametri de herhangi bir kimyasal davranışı incelemek için elektroda

uygulanabilecek potansiyel aralığının sınırları; çalışma elektroduna, çözücü ve elektrolit türüne (bazen pH'ya) ve referans elektroda bağlıdır.

Voltametik ölçümler için; yüzeyde adsorpsiyon yapmayan pyrex veya camdan imal edilmiş, 5-50 mL çözelti ile çalışılabilecek şekilde yapılmış elektrokimyasal hücreler kullanılır. Sıcaklığın kontrol edildiği ölçümlerde hücrenin dış yüzeyinde suyun dolaşmasına izin veren özel hücreler kullanılmaktadır [62-68].

Voltametricte en çok kullanılan uyarma sinyallerinin dalga şekli aşağıdaki Şekil 2.11'de verilmiştir.



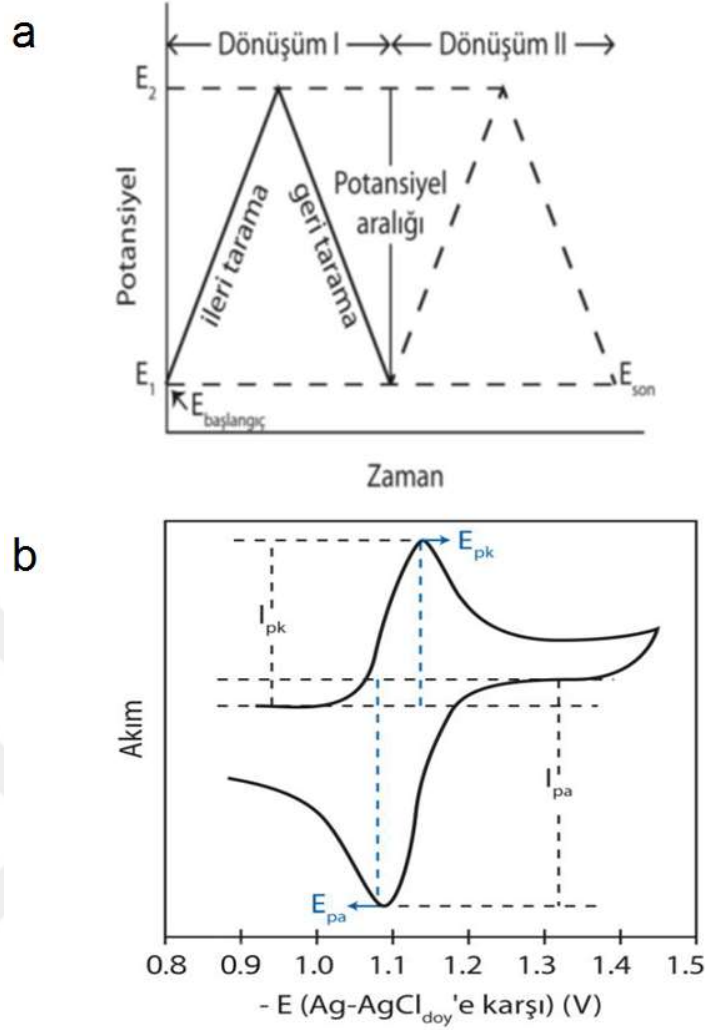
Şekil 2.11: Bazı genel voltametik teknikler için potansiyel uyarı sinyalleri [68].

2.12.2. Dönüşümlü voltametri

Dönüşümlü voltametri (CV), çalışma elektroduna uygulanan potansiyelin kontrol edildiği ve hücreden küçük bir akımın geçtiği yöntemdir. Elektrot tepkimelerinin incelenmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. CV, karıştırılmayan bir ortamda elektrot potansiyelini doğrusal olarak değiştirerek akım-potansiyel ilişkisini inceleyen potansiyel kontrollü sabit elektrot voltametri yöntemidir. CV’de akımın maksimum olduğu noktadaki pik potansiyeli E_p değeridir.

Dönüşümlü voltamogramların incelenmesiyle, bir sistemin hangi potansiyelerde ve kaç basamakta indirgenip yükseltgendiği, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığı, elektrot tepkimesinin bir çözelti tepkimesi ile eş zamanlı yürüyüp yürümediği, indirgenme ve yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığı, elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadığı tayin edilir [62-68].

Elektrot mekanizmalarının araştırılmasında, maddelerin miktar tayinlerinin yapılmasında ve kinetik çalışmalarda, adsorpsiyon olayının incelenmesinde kare dalga voltametri ve polarografisi, kronoamperometri, sıyırma voltametri gibi tekniklerin yanında CV tekniği de sıklıkla kullanılır [9,61]. Uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği Şekil 2.12’de görülmektedir. Potansiyel taramasının E_1 başlangıç potansiyeli ve E_2 potansiyeli arasında yapıldığı yöntem doğrusal taramalı voltametridir (LSV). E_2 potansiyeline ulaştıktan sonra ilk tarama yönüne göre ters yönde aynı tarama hızıyla tarama yapılırsa yöntemin adı dönüşümlü voltametri olur [15].



Şekil 2.12: Dönüşümlü voltametri tekniklerinde (a) potansiyel taramasının zamanla değişimi ve (b) potansiyel değişimi-akım ilişkisi [15].

Grafikler incelendiğinde akımın artmaya başladığı kısımda standart indirgenme potansiyeli değerine yaklaşılmakta (negatif yönde ilerledikçe) ve madde indirgenmeye başlamaktadır. Potansiyelin azalmasıyla elektrot yüzeyindeki maddenin indirgenme hızı artar. Maddenin indirgenme hızı artmaya başladıkça akım da artar. İndirgenme hızı yeteri kadar yüksek olduğunda difüzyonla elektrot yüzeyine gelen madde miktarı, akımı kontrol eder. Madde elektrot yüzeyinde biriktikçe difüzyon tabakası kalınlaşır. Difüzyon tabakası kalınlaşması difüzyon hızını azaltır ve akım azalmaya başlar [15] ve böylece indirgenme piki adı verilen dönüşümlü voltamogramın indirgenme sinyali, katodik pik akımı, (I_{pk}) elde edilir. İndirgenme tamamlandıktan sonra potansiyel taraması ters yöne (pozitif yöne), yükseltgenme yönüne, döner bu kez indirgenmiş olan tür, eğer tersinir bir reaksiyon gösteriyorsa, yükseltgenmeye başlar.

Bu kez de yükseltgenme akımı maksimum değere ulaşır ve yükseltgenme piki adı verilen dönüşümlü voltamogramın yükseltgenme sinyali, anodik pik akımı, (\dot{I}_{pa}) elde edilir. İndirgenme ve yükseltgenme akımlarının maksimum olduğu potansiyellere ise sırasıyla katodik pik potansiyeli (E_{pk}) ve anodik pik potansiyeli (E_{pa}) adı verilir.

CV'de elde edilen pik akımının (\dot{I}_p) büyüklüğü; elektroaktif maddenin derişimine, aktarılan elektron sayısına, elektrot yüzey alanına ve difüzyon katsayısına bağlıdır. CV'de tarama bir kez yapılabildiği gibi, dönüşüm birçok kez de tekrarlanabilir.

Bir tepkimenin tersinir olup olmadığı dönüşümlü voltametri ile belirlenebilir. İleri yönde potansiyel taraması yapıldığı gibi ters yönde de potansiyel taraması yapılabilir. Her iki yöndeki tarama sırasında da pikin gözlenmesi; elektrot üzerinde meydana gelen reaksiyonun tersinir olduğunun göstergesidir. Tersinir bir elektrot tepkimesinde anodik pik potansiyeli ile katodik pik potansiyeli, arasında $(0.059/n)$ V'luk bir potansiyel farkı olmalıdır. Anodik pik akımının, katodik pik akımına eşit olması ileri yöndeki tarama esnasında oluşan ürünün kimyasal olarak kararlı olduğunun göstergesidir. Katodik pik akımı değerinin anodik pik akımına göre daha küçük olması ürünün kararlı olmadığına göstergesidir. Dönüşümlü voltametri kantitatif analiz için kullanılmazken kalitatif analizler için sık kullanılan bir tekniktir. Organik ve metal-organik sistemlerin indirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinin elektron transfer kinetiğinin ve mekanizmalarının aydınlatılması için bu yöntem kullanılmaktadır [62-68].

Şekil 2.12b'deki voltamogram incelendiğinde; İleri yöndeki tarama esnasında elektroindirgenmenin olduğu, geri yöndeki tarama esnasında indirgenme sonucu oluşan ürünün elektrot üzerinde yeniden yükseltgendiği anlaşılır.

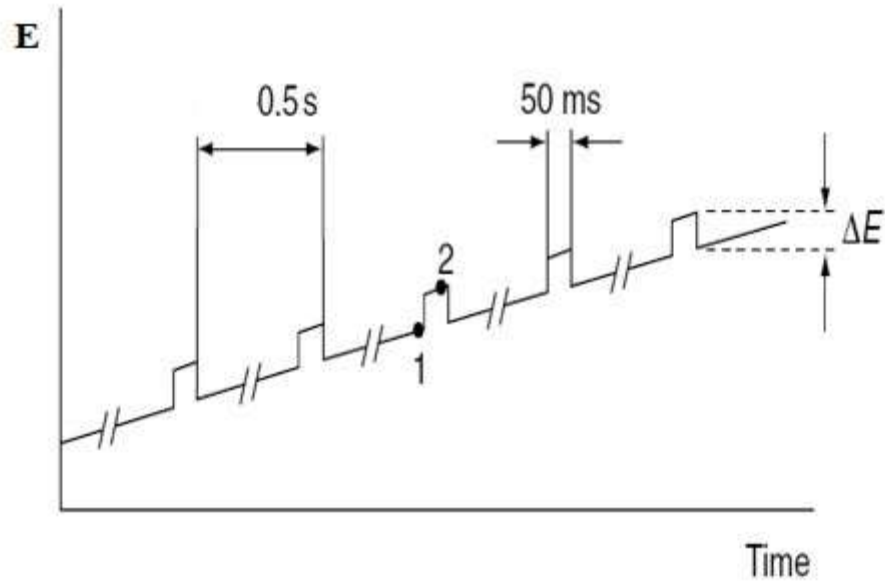
2.12.3. Diferansiyel puls voltametri

Diferansiyel puls voltametri (DPV) pek çok elektroaktif türün, organik ve inorganik türlerin eser miktarlarının tayininde kullanılmaktadır. DPV yönteminde elektrodun potansiyeli değişen bir şekilde taramırken aynı zamanda genlikleri sabit potansiyel pulsları uygulanır. Şekil 2.13'de görüldüğü gibi; akım, pulstan hemen önce (i_1) ve pulsun sonuna doğru (i_2) olmak üzere iki kez ölçülür ve aradaki fark kaydedilir. Voltamogramda akım ekseninde her bir puls için ölçülen akımların farkı ($\Delta i = i_2 - i_1$) yer alır. Uygulanan potansiyele karşı akım farkının grafiğe geçirilmesiyle pik şeklinde voltamogramlar elde edilir. Pik yüksekliği analitin derişimi ile doğru orantılıdır.

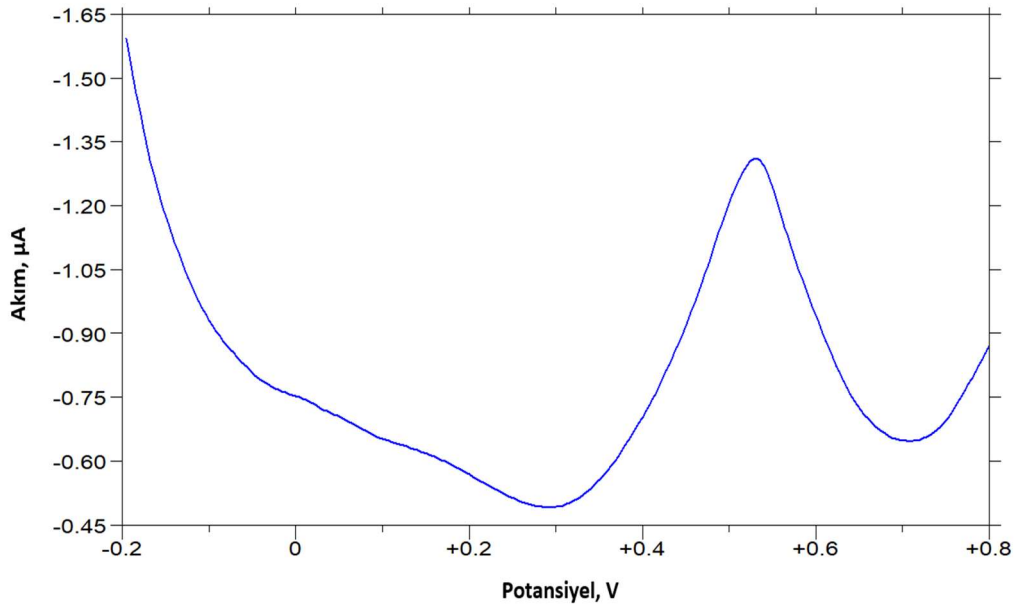
Tersinir sistemlerle kıyaslandığında tersinir olmayan veya yarı-tersinir

sistemlerde pik yükseklikleri daha küçük, pikler daha yayvandır. Bu durum duyarlık ve pik rezolüsyonun daha düşük olduğunun göstergesidir. Puls genliğinin ve potansiyelin ve tarama hızının optimizasyonu ile duyarlılık ve pik rezolüsyonu artırılabilir.

DPV'de kapasitif akım katkısının çok düşük olması, sinyal/gürültü oranını iyileştirir, tayin sınırını düşürerek 10^{-7} - 10^{-8} M derişimlerin tayinine imkan verir [62-68].



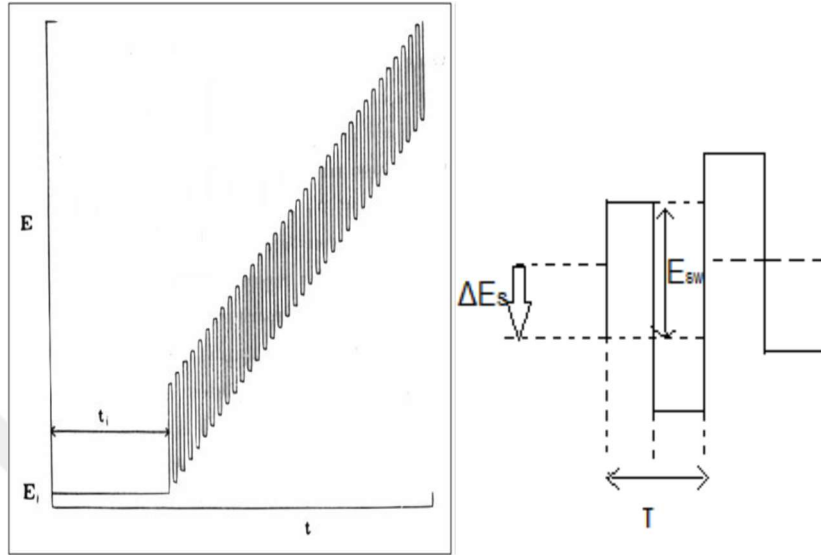
Şekil 2.13: Diferansiyel puls voltametri için sinyal grafikleri [62].



Şekil 2.14: Diferansiyel puls voltamogramı.

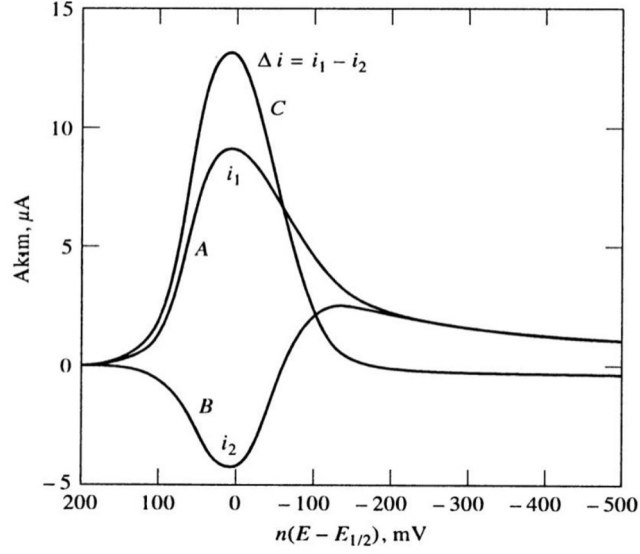
2.12.4. Kare dalga voltametrisi

Kare dalga voltametrisi (SWV) teorik ve cihaz bakımından Barker tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem oldukça hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Potansiyel-zaman dalga şekli Şekil 2.15. de görülmektedir [69-70].



Şekil 2.15: Kare dalga voltametrisi için potansiyel-zaman dalga şekli ve akım ölçümü; ΔE_s : adım yüksekliği, E_{sw} : puls genişliği, T : periyot [9].

Kare dalga voltametrisinde her bir kare dalga dönüşümü için bir ileri yöndeki pulsun sonunda ve bir de ters yöndeki pulsun sonunda olmak üzere akım iki kez ölçülür. Ölçümler ileri ve geri pulsların sonuna doğru t_s zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 ve her bir kare dalganın net akımı $\Delta i = i_1 - i_2$ eşitliği ile hesaplanır. Net akım, Δi ileri fark akımı olarak da isimlendirilir. Net akım farkının (Δi) potansiyele karşı grafiğe geçirilmesi ile tek pik şeklinde voltamogram elde edilir (Şekil 2.16) [69].



Şekil 2.16: 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 [9].

2.13. Amaç

Bu tez çalışmasının amacı PKU hastalığının tayinine yönelik alternatif olarak kullanılacak etkili, doğru ve duyarlı sensörlerin tasarlanmasıdır. Bu amaç dahilinde hedef sensör yapılarında kullanılacak elektrotların modifiye edilerek PKU hastalığının bir belirteci olan fenilalanin aminoasidini algılayacak şekilde dizayn edilmesi sağlanmıştır. Bu modifikasyonlar sırasında iki temel strateji geliştirilmiştir. Birinci stratejide elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak moleküler baskılama tekniği ile elektrot tasarımları gerçekleştirilmiştir. İkinci teknikte ise Phe yapısı ve molekül büyüklüğüne uygun kimyasal polimerizasyon yöntemi ile poliüretan sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen poliüretan yapılarında özellikle Phe afinitesini artıracak ve moleküler yapı polar grupları bulunduracak şekilde dizayn edilmiştir. Tüm bu konsept dahilinde tez çalışmamız iki temel adımdan oluşmaktadır. Moleküler baskılama adımında polimerik yapıyı oluşturabilmek için Phe yapısı ile kuvvetli ikincil etkileşimler kuran paratoluen sülfonik asit (PTSA) monomer olarak tercih edilmiştir. Özellikle sülfonik asit grupları Phe yapısı üzerindeki amino grupları ile hidrojen bağı yaparken PTSA yapısındaki fenil grupları Phe yapısındaki fenil grupları ile aren-aren etkileşimleri kurarak düzenli bir yapı oluşturmaktadır. Bu sayede hazırlanmış olan moleküler kompleksin elektropolimerizasyon vasıtası ile polimer yüzeyine kaplanması gerçekleştirilmiştir.

İçte bulunan Phe yapılarının uzaklaştırılması ile de Phe moleküler boşluklarına sahip moleküler baskılanmış bir elektrot tasarımı elde edilmiştir. İkinci adımda ise yapısında GUM Arabik üniteleri bulunan polar özelliği yüksek poliüretan yapıları üretan katılması yöntemi ile sentezlenmiştir. Daha sonra kimyasal modifikasyon yöntemi ile elektrot yüzeyine damlatılarak elektrot modifikasyonları sağlanmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen poliüretanların kimyasal yapıları FTIR, elementel analiz ve termal analiz yöntemleri ile belirlenmiştir. Yüzey özellikleri ise SEM analiz tekniği ile incelenmiştir. Elde edilen modifiye elektrotlar kullanılarak Phe ölçümleri gerçekleştirilmiş ve elektrokimyasal ölçümler farklı optimizasyon parametreleri içerecek şekilde detaylandırılmıştır.

Çalışmanın temel amaçları doğrultusunda erişilmek istenilen hedefler aşağıda sıralanmıştır:

1. Kararlı ve kuvvetli yüzey adhezyonu gösterebilen PTSA filmlerin moleküler baskılama tekniğine uygun olarak elektropolimerizasyon yöntemi ile Pt elektrotlar üzerine kaplanması,
2. Hazırlanan PTSA temelli elektrotların yapısına bağlı Phe gruplarının polimer yapısını dağıtmadan çıkarılarak moleküler boşlukların oluşturulması,
3. Moleküler baskılama ile hazırlanan bu elektrotların sensör parametrelerinin çalışması,
4. GUM Arabik temelli poliüretanların sentezi,
5. Sentezlenen poliüretan yapılarının yapısal ve yüzey özelliklerinin incelenmesi,
6. Sentezlenen poliüretanların kullanılması ile poliüretan temelli elektrotların hazırlanması ve sensör parametrelerinin çalışması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında, L-Fenilalanin ($C_9H_{11}NO_2$), Paratoluen sülfonik asit ($C_7H_8O_3S$), Hidroklorik asit (HCl), Sodyum sitrat ($Na_3C_6H_5O_7$), Sitrik asit ($C_6H_8O_7$), Asetik asit (CH_3COOH), Sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$), Borik asit (H_3BO_3), Fosforik asit (H_3PO_4), Potasyum klorür (KCl), Sodyum hidroksit (NaOH), Sodyum klorür (NaCl), Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) Sigma-Aldrich'den satın alınarak kullanılmıştır. Tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta temin edilmiş olup deneylerden önce herhangi bir ön saflaştırma işlemi gerçekleştirilmemiştir.

3.2. Ölçümde Kullanılan Aygıt ve Gereçler

Tez kapsamında L-Phe tayini için hazırlanan modifiye elektrotların yapısal karakterizasyonunda FTIR elementel analiz kullanılırken yüzey morfolojilerinin tespitinde SEM analizi kullanılmıştır. Ayrıca kimyasal modifikasyon ile hazırlanan elektrotların termal özelliklerinin belirlenmesinde TGA, DTA ve DSC analiz teknikleri kullanılmıştır. FTIR analizlerinde Perkin Elmer Spektrum Two FTIR cihazı kullanılmıştır. Analizler ATR ölçüm modunda $400-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiştir. Elementel analizler LECO CNHO-90 elementel analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri LEVO-EVO40 SEM cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup numuneler herhangi bir yüzey kaplaması (Au/Pd veya C) yapılmaksızın analizlenmiştir. Termal analizlerde ise Shimatsu TGA-50, Shimatsu DTA-50 ve Shimatsu DSC-60 cihazları kullanılmıştır. TGA ve DTA analizleri $30-650\text{ }^\circ\text{C}$ arasında gerçekleştirilmiş olup $10\text{ }^\circ\text{C/dak}$ ısıtma hızında statik hava atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 10 mg numune ve 10 mg standart alümina kullanılmıştır. DSC analizlerinde $10\text{ }^\circ\text{C/dak}$ ısıtma hızı ve 5 mg numune kullanılarak 25 mL/dak dinamik azot atmosferi kullanılmıştır. Tüm analizler alümina örnek küveti kullanılarak $-30/500\text{ }^\circ\text{C}$ aralığında gerçekleştirilmiştir.

Voltametrik deneyler, BAS 100B (Bionalytical Systems, Inc.) elektrokimyasal analizör kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.1). Aygıtın kontrolü Windows altında çalışan BAS 100W yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1: BAS 100B elektrokimyasal analizör ve cell stand.

Elektrokimyasal ölçümler yaklaşık 10-20 mL hacimli pyrex cam hücreler içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Mikro hücre ve montajı R: referans elektrot, Ç: çalışma elektrodu, Y: yardımcı elektrot.

Elektrokimyasal hücreler, BAS firmasının C2 (cell stand) kafesi içerisine yerleştirilmiştir. Faraday kafesi gibi kullanılan bu cell stand sayesinde deney düzeneği dış ortamdaki elektriksel ve manyetik etkilerden korunmuştur.

Elektrotların temizlenmesinde ve çözeltilerin homojen hale getirilmesinde Branson marka 3510 model ultrasonik banyodan yararlanılmıştır. Çözeltilerin pH ayarlamaları Orion 4 Star marka pH metre ile yapılmıştır. Kimyasalların tartımında Kern marka ABJ 220-4NM model terazi kullanılmıştır. Kullanılan tüm cam malzemeler Nüve marka EN400 model etüvde kurutulmuştur. Çözeltilerin hazırlanmasında ve elektrotların temizlenmesinde Millipore Milli-Q Water Purification System ile arıtılan rezistivitesi $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ @ $25 \text{ }^\circ\text{C}$ olan ultra saf su, cam malzemelerin temizlenmesinde ise deiyonize saf su kullanılmıştır.

Deneylerde; yardımcı elektrot olarak platin tel elektrot (BAS marka MW-1032), referans elektrot olarak 3 M KCl içindeki Ag/AgCl (BAS marka RE-5B) elektrodu ve çalışma elektrodu olarak ise 1.6 mm çaplarında platin (Pt) elektrot (CHI102) ve altın (Au) elektrot (BAS marka MF-2014) kullanılmıştır.

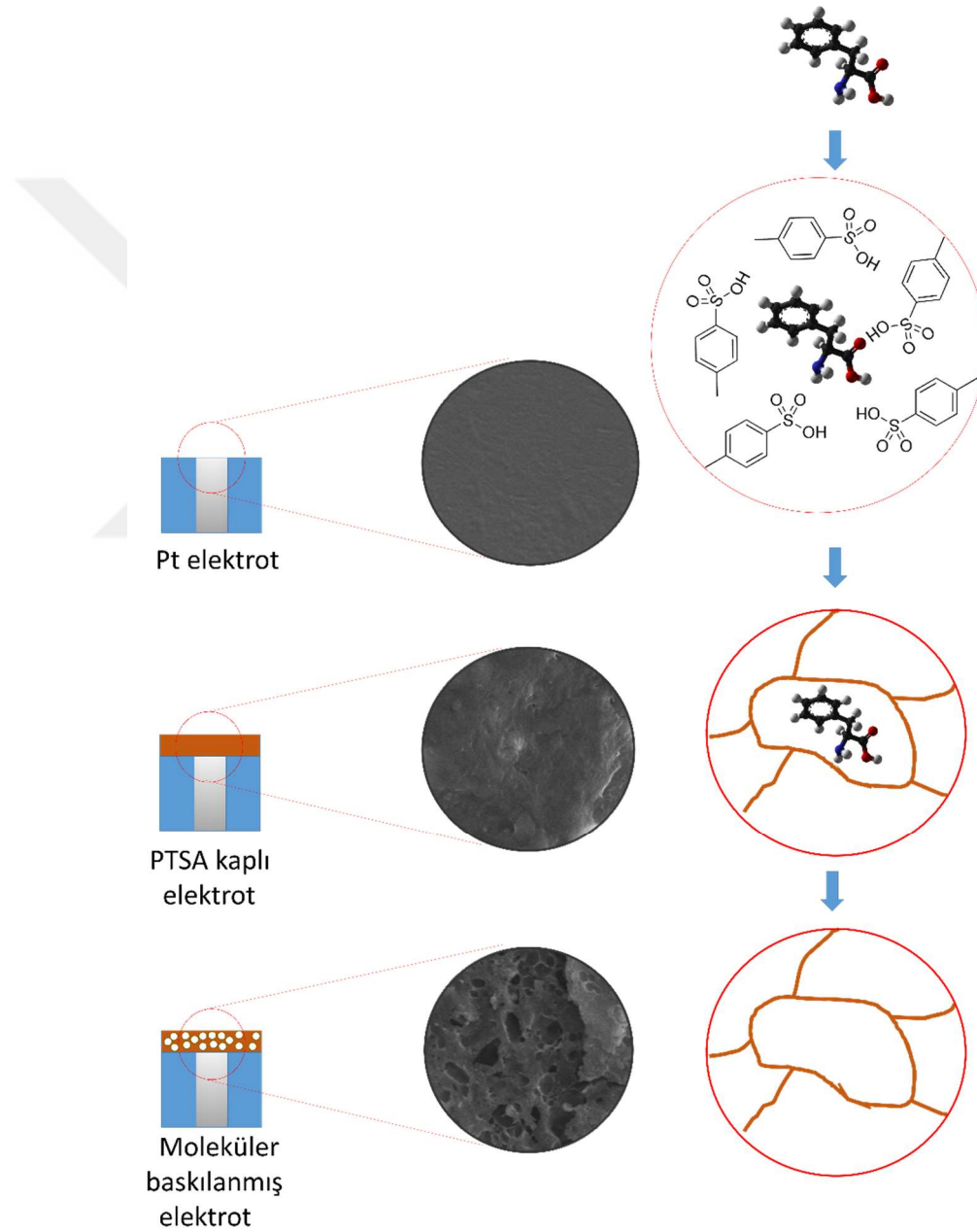
Referans elektrot kullanıldıktan sonra ultra saf su ile yıkanıp doygun AgNO_3 içeren 3 M KCl çözeltisi içerisinde saklanmıştır. Platin tel elektrot, olası organik kirliliklerin uzaklaştırılması amacıyla, belirli aralıklarla çıplak ateşte ısıtılıp ultra saf su ile yıkanmıştır. Çalışma elektrodu ise kadife bir disk üzerine birkaç damla $0.05\text{-}0.1 \text{ }\mu\text{M}$ boyutunda alümina çözeltisi damlatılıp, elektrot “8” çizdirilip ardından ultra saf su ile yıkanıp, alümina kalıntılarının tamamen temizlenmesi için 1:1 oranındaki etil alkol:su çözeltisi içerisinde ultrasonik banyoda 1 dakika bekletilerek temizlenmiştir.

3.3. Fenilalanin Sensörlerinin Hazırlanması

Tez kapsamında iki farklı modifikasyon prosedürü kullanarak fenilalanin sensörleri hazırlanmıştır. Birincisinde moleküler baskılama yöntemi ile modifiye edilmiş, ikincisinde ise poliüretan ile kimyasal polimerizasyon yöntemiyle Pt elektrotlar hazırlanmıştır. Moleküler baskılama yönteminde poli(p-toluensülfonik asit) film kullanılırken, ikinci yöntemde GUM temelli poliüretan yapılar kullanılmıştır.

3.3.1. Moleküler baskılama yöntemi ile fenilalanin sensörünün hazırlanması

Mol oranı 1:3 (L-Phe:PTSA) olacak şekilde monomer çözeltisi (PBS tamponu pH:7.40 içerisinde) hazırlanmıştır. Daha sonra kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin etkileşmesini sağlamak için çözelti, 5 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elektrotlar, 5 mL monomer çözeltisi içeren hücreye daldırılmış, dönüşümlü voltametri yöntemi ile (-1000 mV) - (+1000) mV potansiyel aralığında 5 segmentlik film kalınlığında elektropolimerizasyon yöntemi ile kaplanmıştır.



Şekil 3.3: Moleküler baskılama yöntemi ile fenilalanin sensörünün hazırlanması.

Kalıp molekül olan L-fenilalaninin polimerik yapıdan çıkarılabilmesi L-Phe ve PTSA arasındaki etkileşimleri kırabilecek bir desorpsiyon ajanının kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla desorpsiyon ajanı olarak 0.1 M HCl çözeltisi kullanılmıştır. L-fenilalanin baskılanmış altın ve platin elektrotlar 200 mL 0.1 M HCl çözeltisi içinde 24 saat bekletilmiştir. Desorpsiyon işleminin verimli bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği DPV yöntemi ile kontrol edilmiştir.

3.3.2. Kimyasal modifikasyon ile L-Fenilalanin sensörlerinin hazırlanması

Çalışma kapsamında kimyasal modifikasyonlarda kullanılan GUM temelli poliüretan yapıları çözelti polimerizasyon tekniği kullanılarak DMF/THF karışımında sentezlenmiştir. Sentezler sırasında öncelikle oda sıcaklığında 10 mL DMF/THF (3/7) içerisinde 0.01 molar GUM Arabik dağıtılmıştır. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra sisteme beş dakika argon gazı gönderilmiştir. Dinamik argon akışı altında 0.01 molar heksametilendiizosiyanat (HMDI) monomer olarak eklenmiştir. 30 °C sıcaklıkta bir saat ikili monomer karışımı karıştırılmıştır. Daha sonra sıcaklık 90 °C'ye çıkarılarak 5 saat refluks edilmiştir. Elde edilen polimerik yapı su ilavesi ile çöktürülmüştür. Reaksiyonun sonlanma aşaması FTIR spektrumu kullanılarak belirlenmiştir. İlgili spektrumda 2220 cm⁻¹'de serbest izosiyanat piki görülmeyene kadar reaksiyon devam ettirilmiştir. Bu pik serbest izosiyanat gruplarından kaynaklanır ve pikin kaybolması reaksiyonun sonlandığını gösterir. Elde edilen poliüretan yapıları yine FTIR, SEM ve termal analiz teknikleri ile karakterize edilmiştir. Poliüretan yapısında yapısal çeşitliliği ise poliöl grupları arasındaki GUM oranının değiştirilmesi ile sağlanmıştır. %1, %5 ve %10 olmak üzere üç farklı GUM oranı kullanılmıştır. Gerçekleştirilen elektrot modifikasyonları sonrasında GUM-PU-%10 yapısı içeren elektrotun ideal olduğu tespit edilmiş olup ileri elektrokimyasal sensör deneyleri için bu oranda hazırlanan polimer ile modifiye edilen elektrot kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

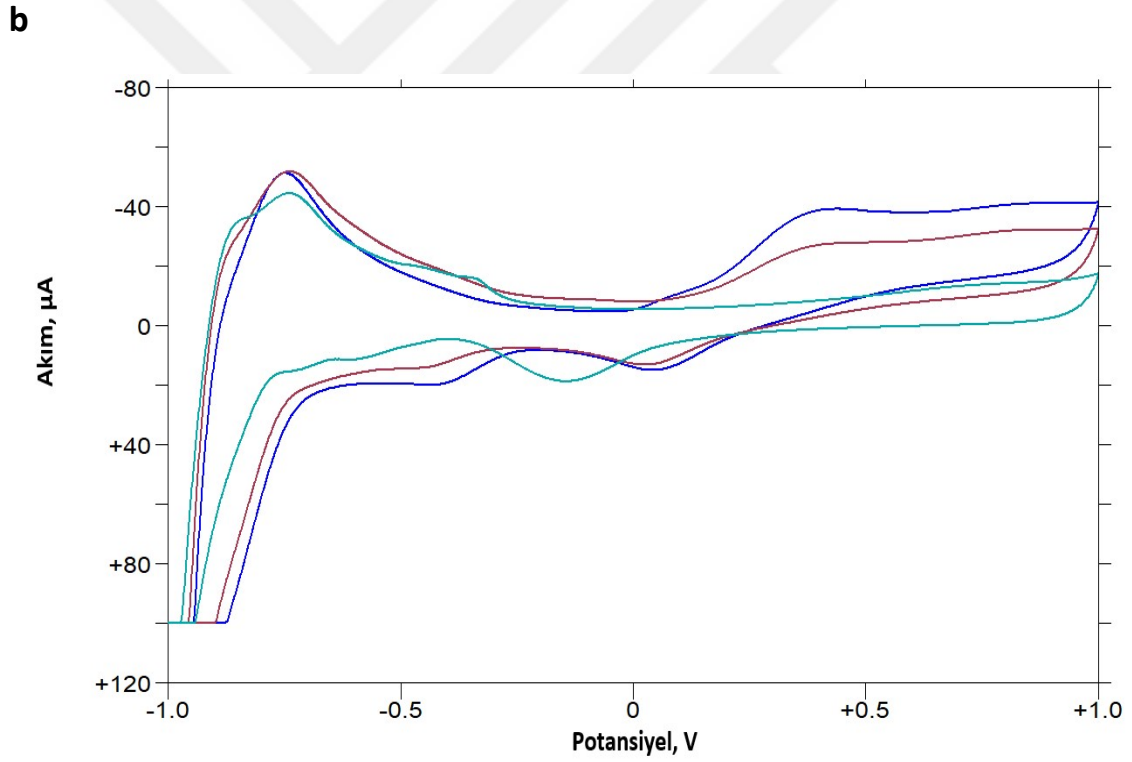
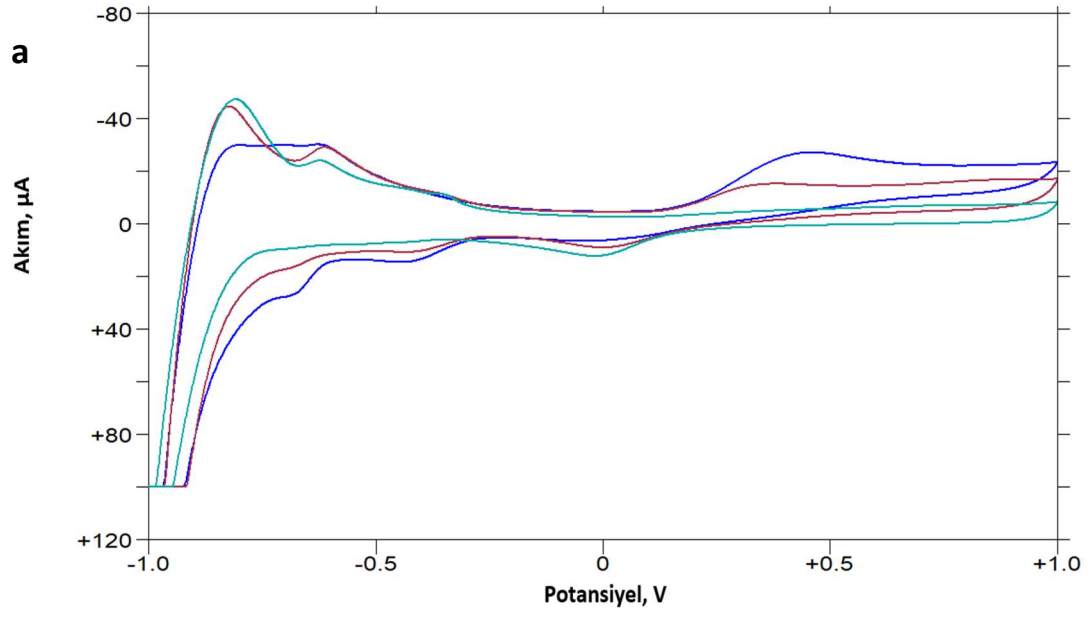
4.1. Moleküler Baskılama Yöntemi ile Hazırlanmış L-Fenilalanin Sensörü Ölçüm Sonuçları

Tez kapsamında sadece fenilalanin yapılarına affinite gösteren bir sensörün hazırlanabilmesi için öncelikle moleküler baskılama yöntemi tercih edilmiştir. Bu sayede elektrot yüzeyinde bulunan polimerik film yapısında sadece fenilalanin yapısının geçebileceği moleküler boşluklar oluşturulmuştur. Bu çalışma sırasında öncelikle fenilalanin yapısının elektrokimyasal özellikleri tespit edilmiştir. Daha sonra ise elektrot türü belirlenmiştir. Seçilen elektrot üzerine moleküler baskılama işlemi gerçekleştirildikten sonra film kalınlığı, girişim etkisi, kararlılık, duyarlık, tekrarlanabilirlik gibi sensör özellikleri belirlenmiştir.

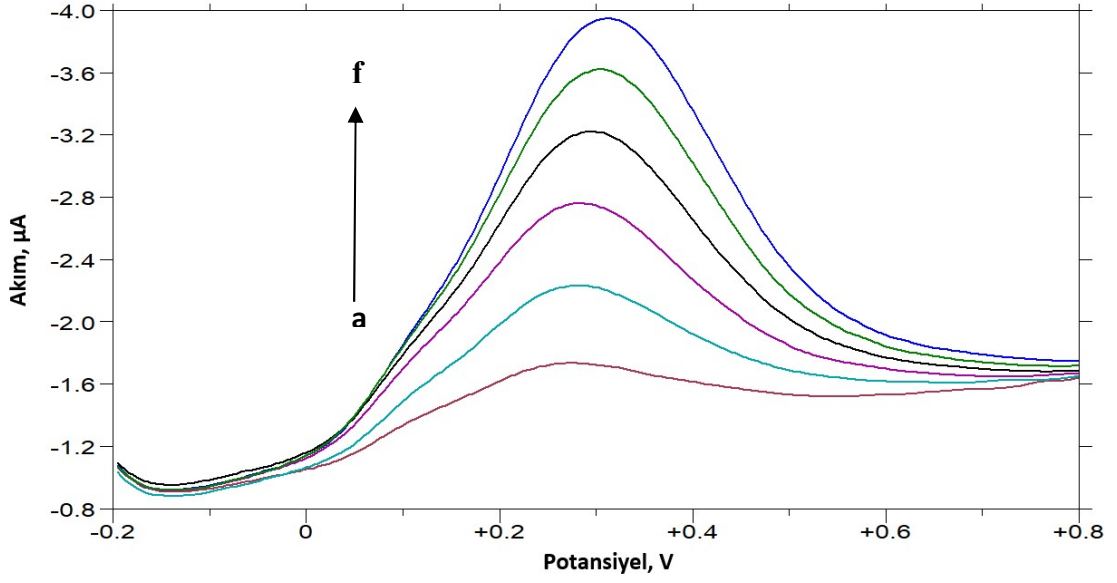
4.1.1. L-Fenilalaninin elektrokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

4.1.1.1. L-Fenilalanin pik potansiyelinin tespit edilmesi

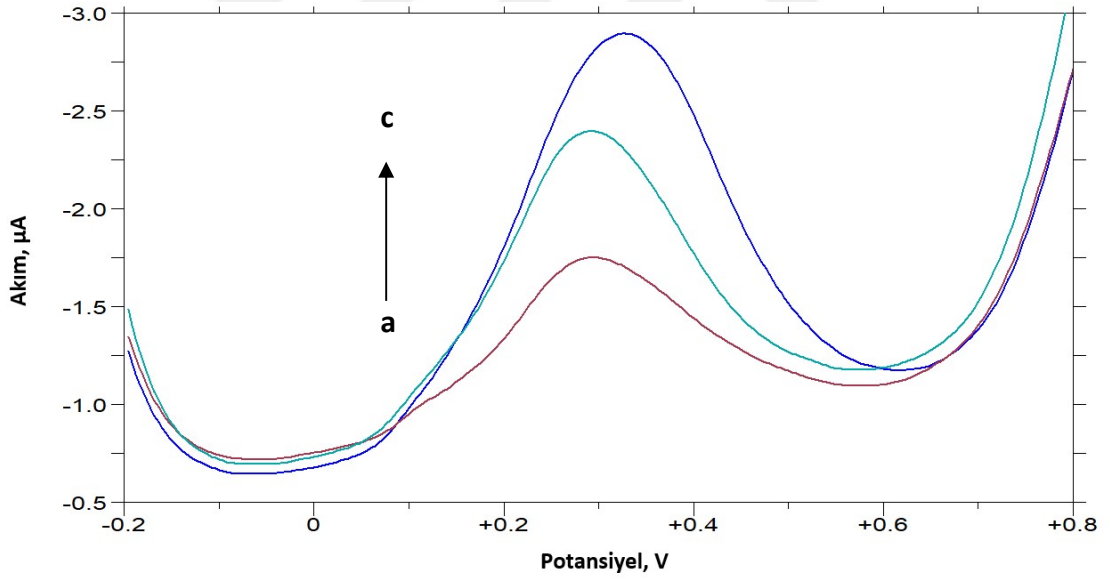
Bu yöntemde; çalışma elektrodu olarak altın ve platin, referans elektrot olarak Ag/AgCl (3M KCl), karşıt elektrot olarak ise platin tel kullanılmıştır. Öncelikle çıplak elektrot üzerindeki fenilalanine ait pik potansiyellerinin belirlenmesi işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.1’de verilmiştir. Elektrokimyasal hücreye 5 mL (pH: 7.40) PBS (0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Na₂HPO₄, 0.0018 M KH₂PO₄) tamponu eklenmiş, CV ve DPV yöntemleri ile ayrı ayrı platin (Şekil 4.2) ve altın elektrot (Şekil 4.3) kullanılarak zemin (analit içermeyen elektrolit) çözeltisi içinde voltamogramlar alınmıştır. 5 mL PBS tamponu içerisinde 200-700 µM L-Fenilalanin çözeltisi hazırlanmış, CV ve DPV yöntemleri ile L-Fenilalaninin +300 mV’da net ve belirgin bir piki tespit edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda altın elektrot ile elde edilen pik akımının platin elektrot ile elde edilen pik akımından daha büyük olduğu gözlenmiştir. Elektrokimyasal pik akımının büyük olması daha küçük derişimleri tayin edebilme imkanı vermektedir.



Şekil 4.1: a) Çıplak elektrot yüzeyinde b) (L-Phe: PTSA) 1:3 mol oranında kaplı elektrot yüzeyinde zemin ve L-Phe dönüşümlü voltamogramları.
(Yeşil: Zemin, Kırmızı:1 mM Phe, Mavi:2 mM Phe)



Şekil 4.2: Çıplak platin elektrot üzerinde PBS (pH 7.40) içerisinde L-Phe'nin DPV yanıtları. **a:** 200 mM, **b:** 300 mM, **c:** 400 mM, **d:** 500 mM, **e:** 600 mM, **f:** 700 mM.



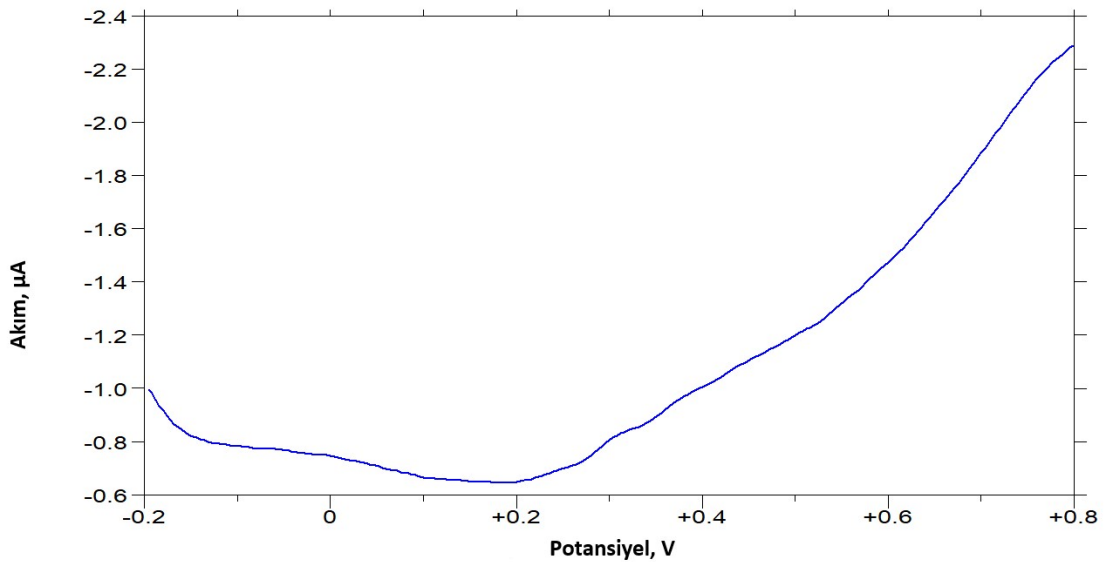
Şekil 4.3: Çıplak altın elektrot üzerinde PBS (pH 7.40) içerisinde L-Phe'nin DPV yanıtları. **a:** 100 mM, **b:** 200 mM, **c:** 300 mM.

Sonuç olarak 300 mM Phe için i_p değeri; altın elektrot için -1.953×10^{-6} V ve platin elektrot için -0.9562×10^{-6} V değerleri elde edilmiştir.

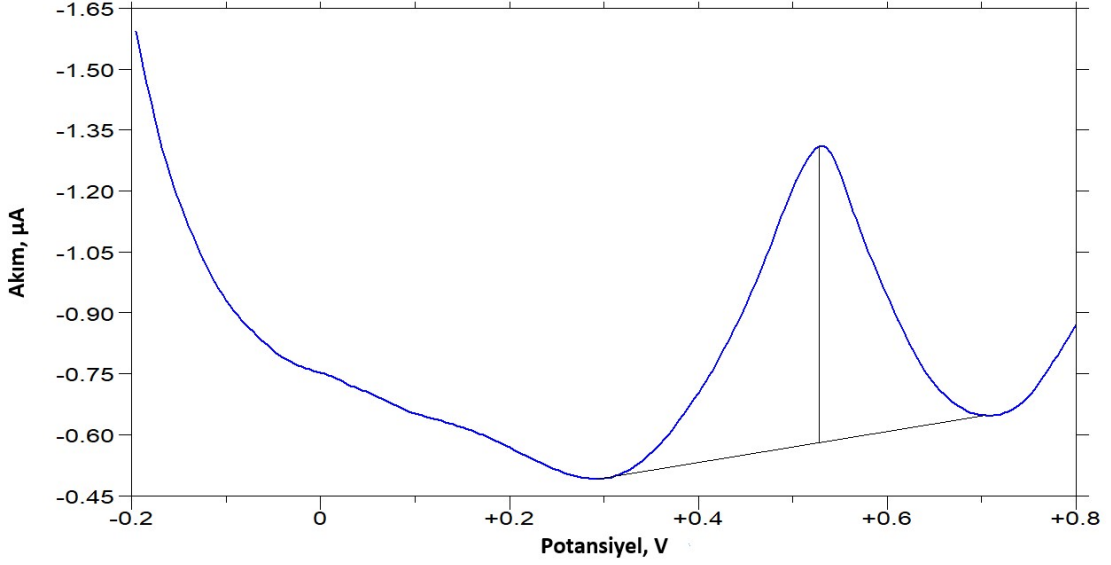
4.1.1.2. L-Fenilalanin tayininde kullanılacak elektrot türünün tespit edilmesi

L-fenilalanin baskılanmış elektrotların hazırlanması için bir önceki basamakta belirlenmiş olan potansiyel aralığında çalışılarak öncelikle fenilalanin bulunduran filmler hazırlanmıştır. Daha sonra L-fenilalanin baskılanmış altın ve platin elektrotlar 200 mL 0.1 M HCl çözeltisi içinde 24 saat bekletilerek desorpsiyon işlemi yapılmıştır.

Desorpsiyon işleminin verimli bir şekilde gerçekleştiğini kontrol etmek için; 0.1 M HCl çözeltisi içinde bekletilen elektrotların 5 mL PBS tamponu içerisinde DPV yöntemi ile (-0.2)-(+0.8) V potansiyel aralığında voltamogramları alınmıştır (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Altın elektrot ile alınan voltamogramlar (Şekil 4.5) incelendiğinde; 528 mV'da L-Phe piki gözlenmiştir. Böylece L-Phe'nin altın elektrottan sıyrılmadığı yani desorpsiyon işleminin altın elektrot için verimli bir şekilde gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Platin elektrot ile alınan voltamogramlar (Şekil 4.4) incelendiğinde; L-Phe piki gözlenmediğinden, L-Phe'nin platin elektrottan sıyrıldığı yani desorpsiyon işleminin verimli bir şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışma elektrodu olarak platin elektrot seçilmiştir.

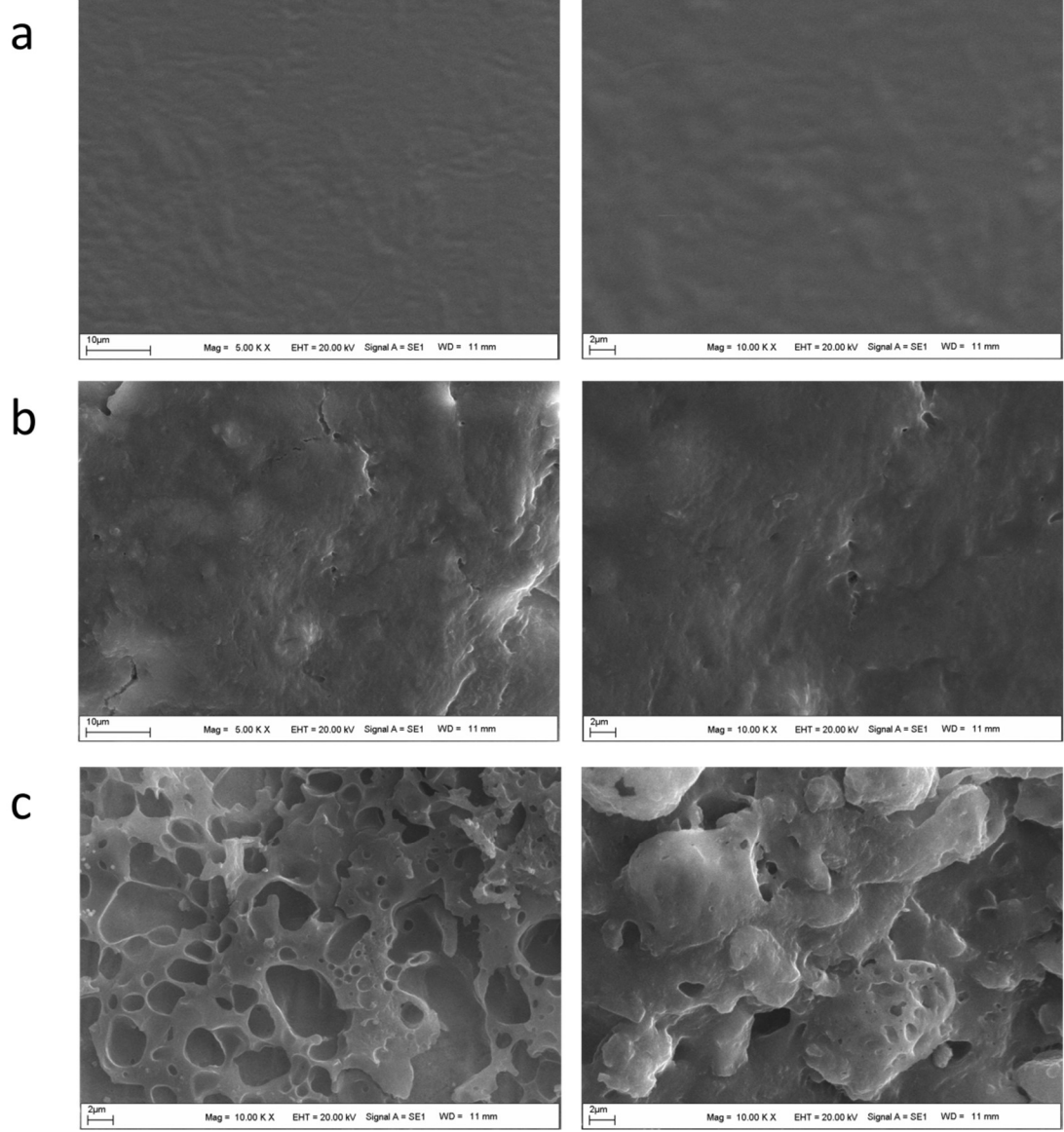


Şekil 4.4: Desorpsiyona uğramış platin elektrodun pH 7.40 PBS içerisindeki DPV yanıtı.



Şekil 4.5: Desorpsiyona uğramamış altın elektrodun pH 7.40 PBS içerisindeki DPV yanıtı.

Bu işlemler sırasında moleküler baskılama işleminin etkinliğini belirlemek için SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Çıplak platin elektrot, elektropolimerizasyon ile kaplanmış elektrot ve HCl içinde desorbe edilmiş elektrot yüzeylerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir. İki farklı büyütme olarak verilmiş şekillerde platin yüzey oldukça düz ve pürüzsüzdür (Şekil 4.6a). Kaplama işleminden sonra yüzeydeki polimerik film net olarak belirgindir (Şekil 4.6b). Yüzey yapısı düzgün film yapısını ispatlamaktadır. Fenilalanin moleküllerinin desorpsiyonundan sonra yüzey yapısında boşluklar ve gözenekler belirgin olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 4.6c).



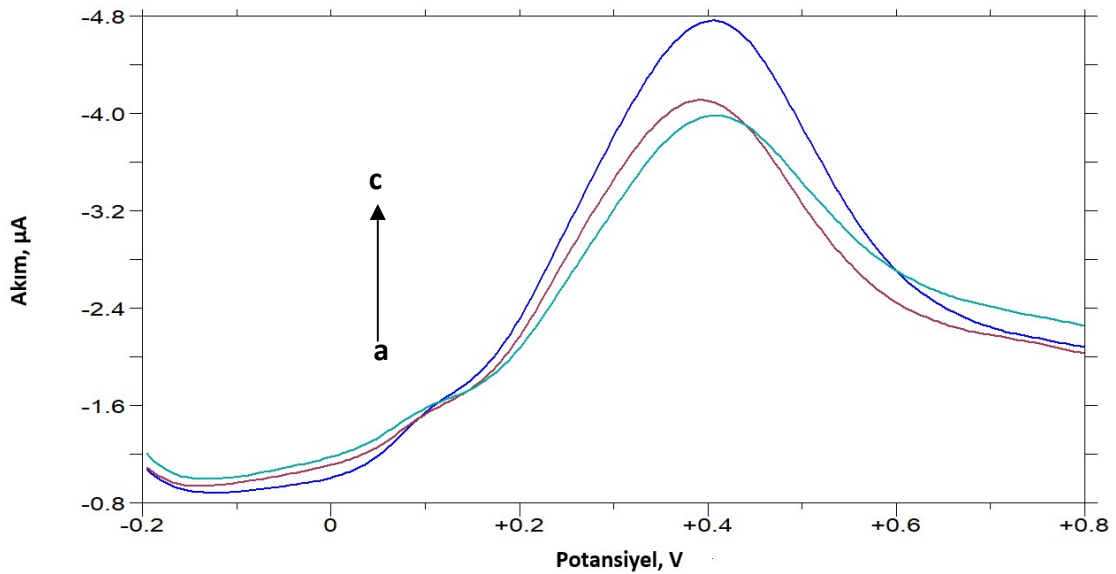
Şekil 4.6: **a:** Çıplak, **b:** elektropolimerizasyon ile kaplanmış ve **c:** HCl içinde desorbe edilmiş platin elektrot yüzeylerine ait SEM görüntüleri.

4.1.2. L-Fenilalanin tayini için optimizasyonlar

L-Fenilalanin baskılanmış elektrokimyasal sensörün hazırlanmasından sonraki optimizasyon çalışmaları pH'sı 7.40 olan PBS tamponu içinde L-fenilalanin derişimi 200-700 μM arasında gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.1. Kalıp molekül (L-Phe) ve fonksiyonel monomerin (PTSA) karışım oranı etkisi

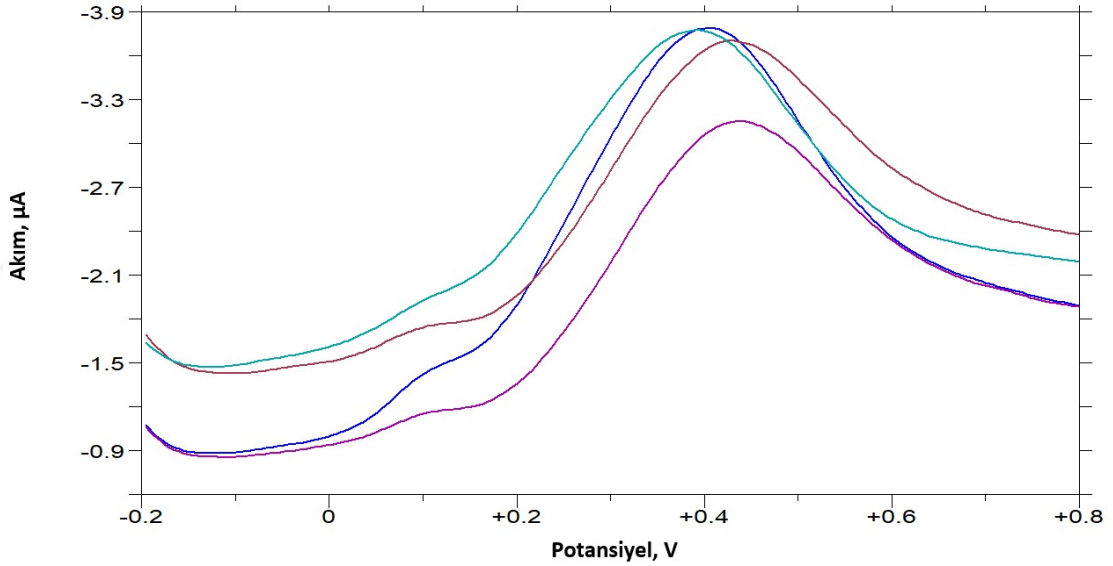
Mol oranı (L-Phe: PTSA) 1:2, 1:3 ve 1:4 olan çözeltiler, 5 mL (pH:7.40) PBS tampon çözeltisi içinde hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak elde edilen DPV voltamogramları Şekil 4.7'de verilmiştir. Elektropolimerizasyon işlemi; 5 segmentlik film kalınlığı CV yöntemi ile (-1000)-(+1000) mV potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında yapılmıştır. Desorpsiyon işleminin ardından DPV yöntemi ile (-0.2)-(+0.8) V aralığında 5 mL PBS tamponu ile zemin voltamogramları alınmış 200-700 μM aralığında artan derişimlerde standart L-fenilalanin çözeltisinden eklenerek deney tekrarlanmış ve voltamogramlar kaydedilmiştir. Voltamogramlar incelendiğinde 1:3 (L-Phe:PTSA) mol oranındaki monomer çözeltisi ile elektropolimerizasyon yapılmasına karar verilmiştir.



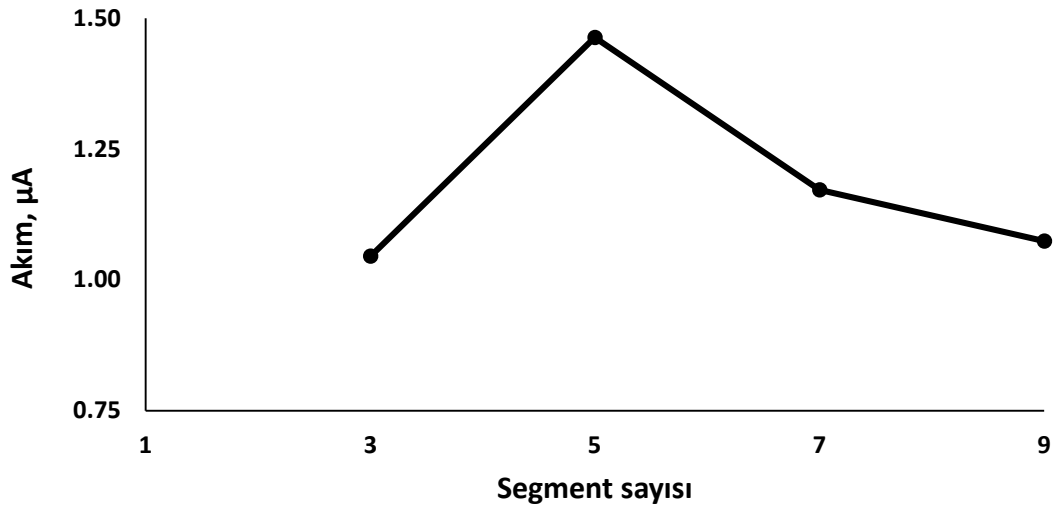
Şekil 4.7: a: 1:4, b: 1:2, c: 1:3 (L-Phe:PTSA) mol oranında kaplı elektrotların 700 μM L-Phe DPV yanıtları

4.1.2.2 Film kalınlığı etkisi

Belirlenen orandaki monomer çözeltisi ile hazırlanan polimerin, film kalınlığının etkisi CV yönteminde segment sayısı (3, 5, 7 ve 9) değiştirilerek incelenmiştir. Bu incelemelerde elde edilen voltamogramlar Şekil 4.8’de gösterilmiştir. 200-700 μM aralığında L-Phe’nin artan derişimleri ile alınan voltamogramlar incelendiğinde 5 segmentlik film kalınlığı ile elektropolimerizasyon yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.8: Farklı (L-Phe:PTSA) kalınlıklarında (Kırmızı: 3, Mavi: 5, Yeşil: 7, Mor: 9 segment) kaplı elektrotların 700 μM L-Phe DPV yanıtları.

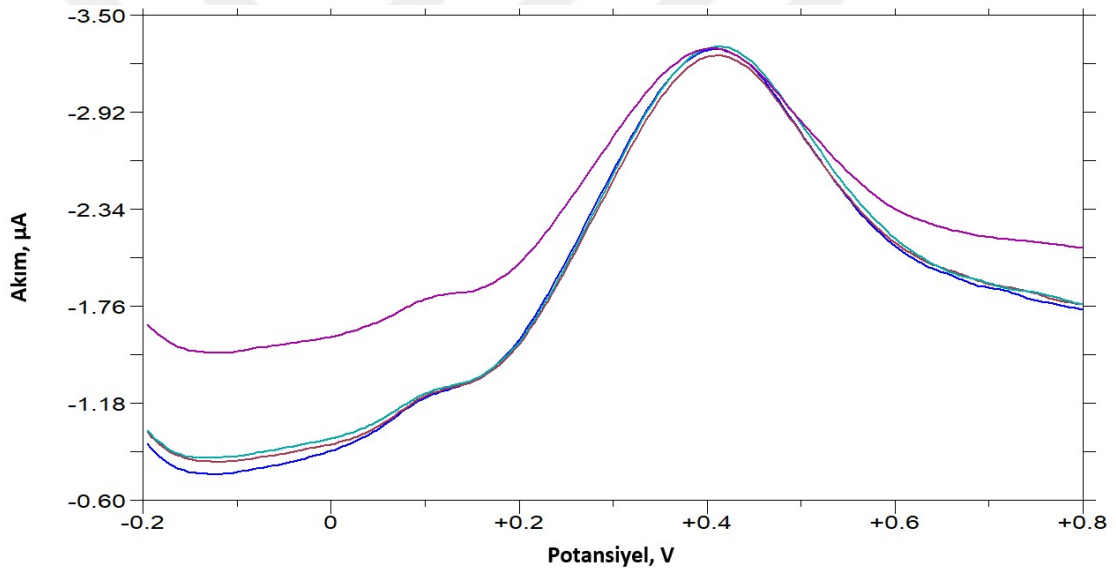


Şekil 4.9: Film kalınlığı ile L-Phe yükseltgenme akımı ilişkisi.

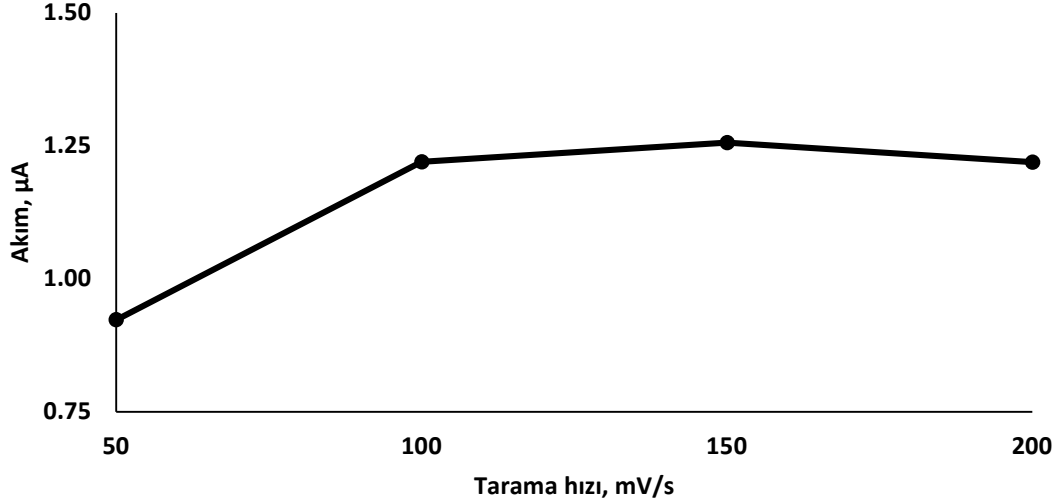
Film kalınlığının 700 μM L-Phe'nin yükseltgenme akımına etkisi Şekil 4.9'da görülmektedir. Bu grafik üzerinde 5 segmentlik film kalınlığının optimum olduğu net olarak görülmektedir. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda 5 segmentlik film kalınlığı ile kaplanan elektrotların kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.2.3. Dönüşümlü voltametri tarama hızının etkisi

Belirlenen oranda (1:3; L-Phe:PTSA) hazırlanan monomer çözeltisi ile CV yöntemi kullanılarak (-1.000)-(+1.000) V potansiyel aralığında 50, 100, 150, 200 mV/s tarama hızlarında elektropolimerizasyon yapılmıştır. Farklı tarama hızlarında, 5 segmentlik film kalınlığında kaplanan, desorbe edilmiş elektrotlar kullanılarak (-0.2)-(+0.8) V aralığında DPV yöntemi ile alınan 700 μM L-Phe voltamogramları Şekil 4.10'da görülmektedir.



Şekil 4.10: Farklı tarama hızlarında CV yöntemi ile modifiye edilen elektrotların 700 μM L-Phe DPV yanıtları.



Şekil 4.11: CV tarama hızı ile L-Phe yükseltgenme akımı ilişkisi.

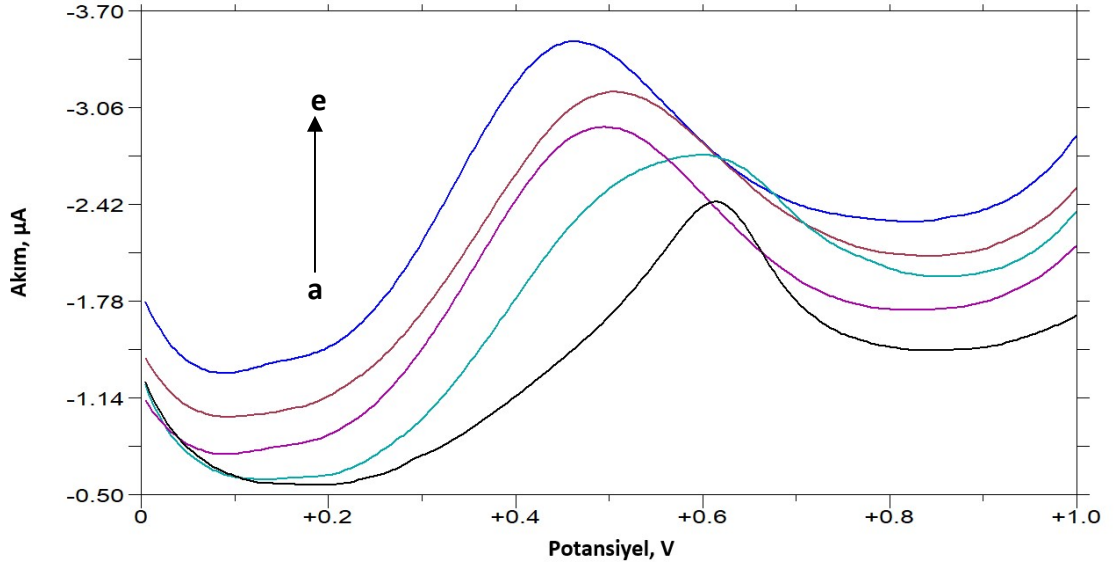
Şekil 4.11'deki grafikten optimum tarama hızının 150 mV/s olduğu görülmektedir.

4.1.3. Modifiye elektrot üzerinde L-Fenilalanin elektrokimyasal davranışının incelenmesi

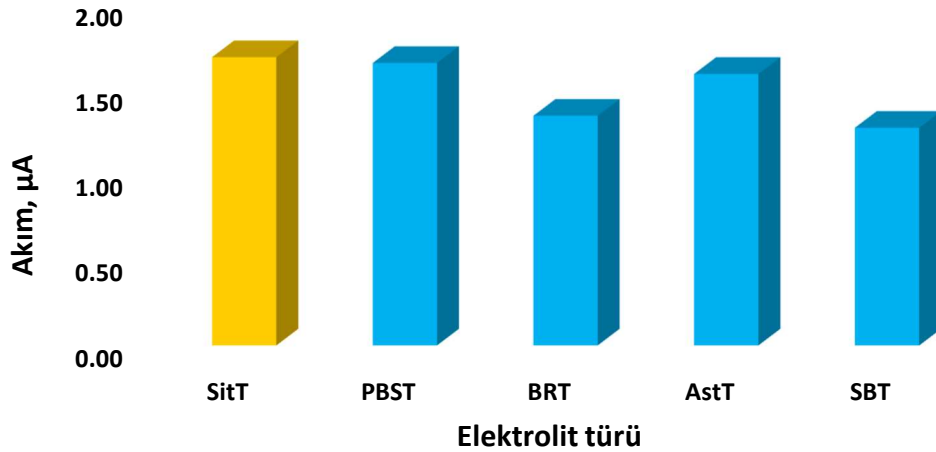
Modifiye elektrot; 5 mL (pH:7.4) PBS tamponu içerisinde mol oranı (L-Phe: PTSA) 1:3 olan monomer çözeltisi hazırlanarak CV yöntemi ile (-1000)-(+1000) mV potansiyel aralığında, 150 mV/s tarama hızında, 5 segmentlik film kalınlığı ile elektropolimerizasyon yapılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan modifiye elektrotlar için destek elektrolit türü ve pH'sı, tarama hızı, pulse amplitude, pulse width, pulse period ve girişim etkisi gibi parametreler optimize edilmiştir. İlgili optimizasyonlar yapıldıktan sonra artan fenilalanin konsantrasyonu için kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Daha sonra modifiye elektrodun kararlılığı, tekrar kullanılabilirliği ve yeniden üretilebilirliği belirlenmiştir. Bu optimizasyon çalışmalarına ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1.3.1. Destek elektrolit türünün etkisi

pH:7.00 ayarlı sitrat (SitT), asetat (AstT), PBS tamponu (PBST), Britton-Robinson (BRT) ve sodyum borat (SBT) tampon çözeltileri ile 700 µM L-Phe çözeltisi hazırlanmıştır. Modifiye elektrot kullanılarak elde edilen diferansiyel puls voltamogramları incelendiğinde en yüksek pik akımının sitrat tamponunda görülmesi nedeniyle sitrat tamponu ile çalışılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).



Şekil 4.12: 700 µM L-Phe yanıtları üzerine destek elektrolit türünün etkisi. (a: Sodyum borat, b: B-R, c: PBS, d: Asetat, e: Sitrat tamponu).

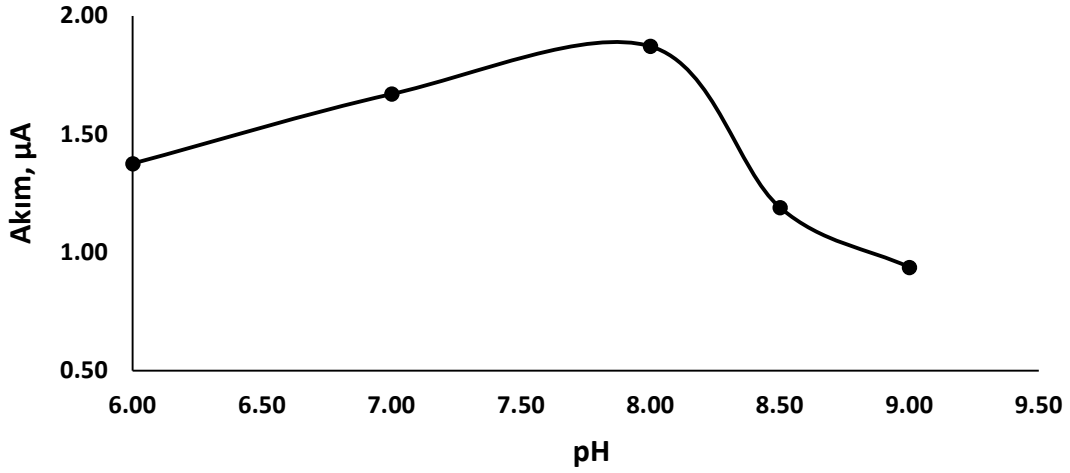


Şekil 4.13: Destek elektrolit türünün L-Phe'nin yükseltgenme akımına etkisi.

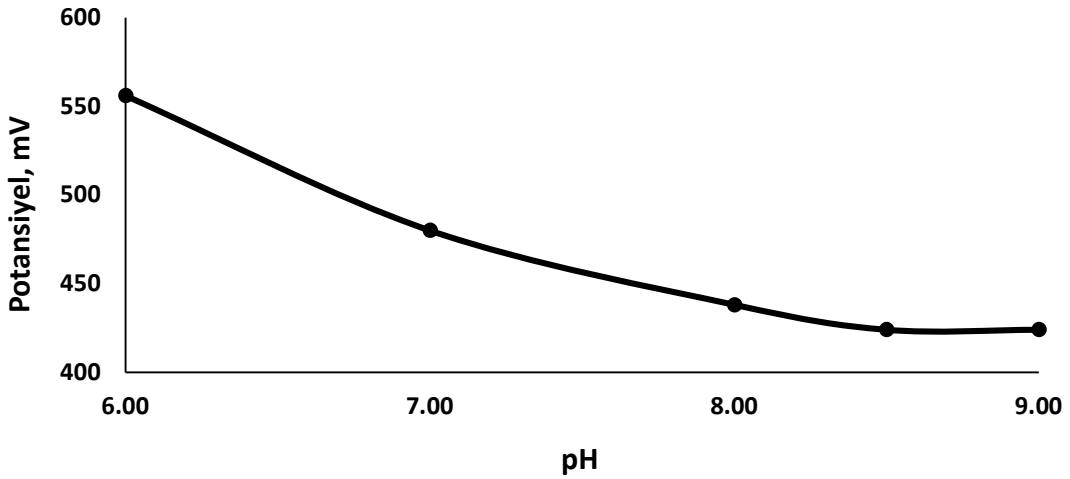
4.1.3.2 Destek elektrolit pH etkisi

Destek elektrolit olarak seçilen sitrat tamponun pH'sı 2.00, 4.00, 6.00, 7.00, 8.00 ve 9.00'a ayarlanarak DPV yöntemi ile zemin ve 700 µM L-Phe ölçümü yapılmıştır. Elde edilen voltamogramlar incelendiğinde pik akımının bazik yönde artış gösterdiği gözlenmiştir. Şekil 4.14'de görüldüğü üzere; pik akımı pH: 8.00' de en büyük değeri göstermiş, pH: 9.00'da azaldığı için, 8.00-9.00 aralığında daha yüksek pik verme olasılığını göz önünde bulundurarak pH: 8.50 de ölçüm yapılmış fakat pik akımı azaldığı

için pH: 8.00 sitrat tamponu ile çalışmaya karar verilmiştir. Şekil 4.15’de destek elektrolit pH’sının L-Phe potansiyeline etkisi gösterilmiştir.



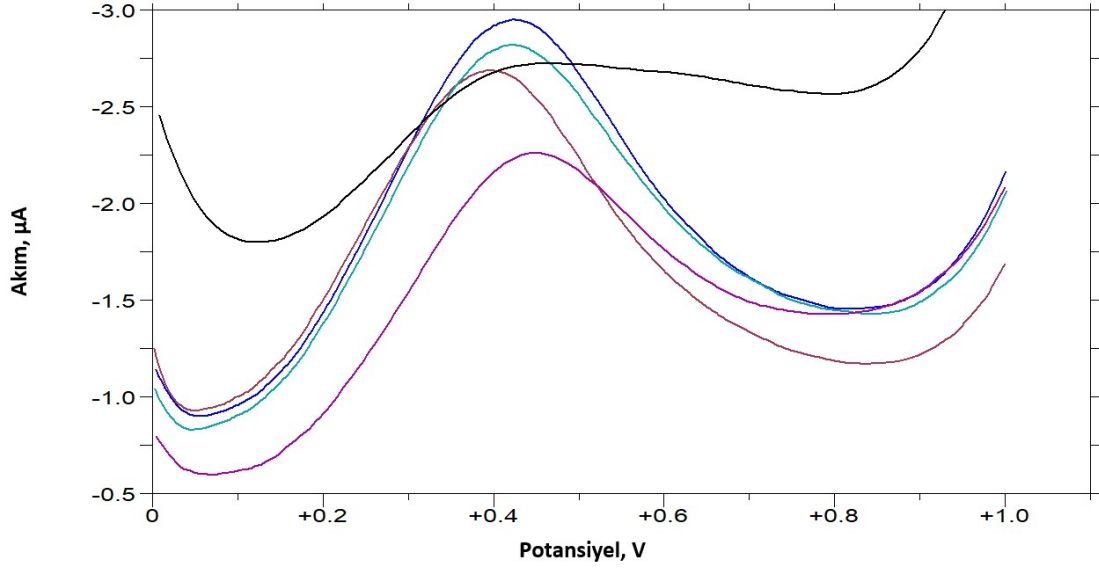
Şekil 4.14: Destek elektrolit pH’sı ile L-Phe yükseltgenme akımı ilişkisi.



Şekil 4.15: Destek elektrolit pH’sı ile L-Phe potansiyeli ilişkisi.

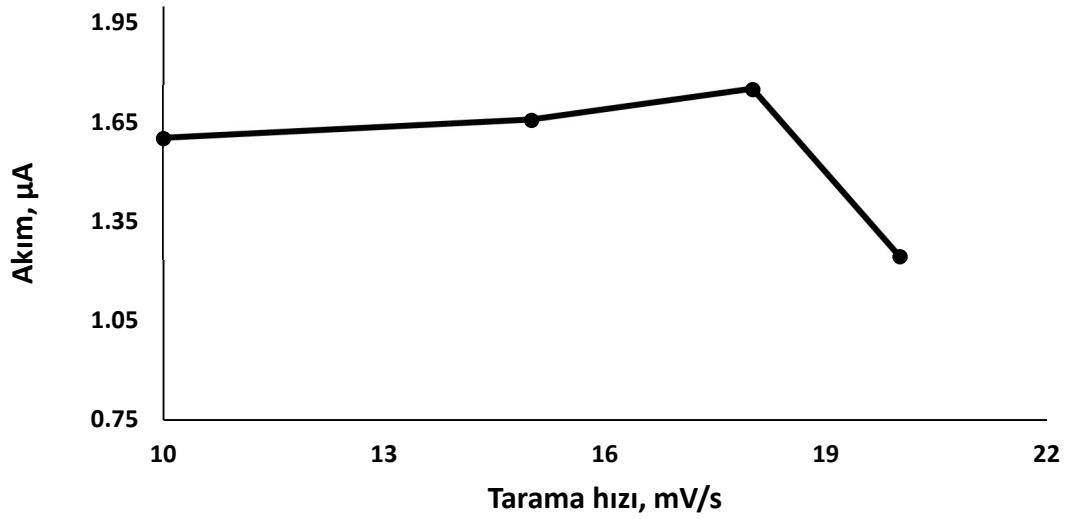
4.1.3.3. DPV yöntemi tarama hızı etkisi

Hazırlanan modifiye elektrotun 700 µM L-Phe’nin elektrokimyasal davranışına DPV yönteminin tarama hızı etkisini belirlemek amacıyla 10, 15, 18, 20 ve 40 mV/s tarama hızlarında voltamogramlar alınmıştır (Şekil 4.16). Bu voltamogramlarda elde edilen pik akımı değerleri tarama hızına karşı grafiğe dönüştürüldüğünde (Şekil 4.17) en uygun tarama hızının 18 mV/s olduğu görülmüştür.



Şekil 4.16: Farklı tarama hızlarında 700 µM L-Phe DPV'leri (Kırmızı: 10 mV/s, Yeşil: 15 mV/s, Mavi: 18 mV/s, Mor: 20 mV/s, Siyah: 40 mV/s).

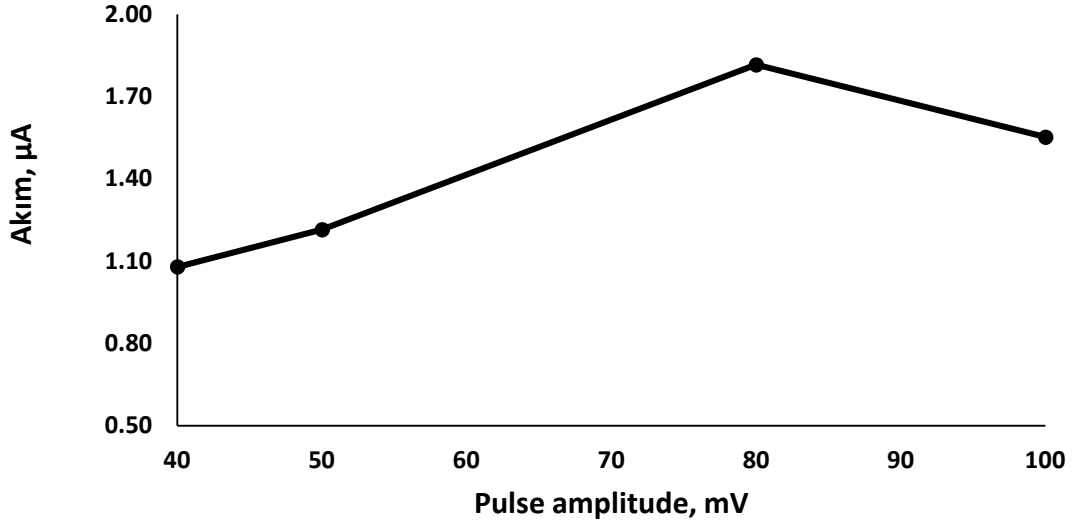
Tarama hızının etkisini tespit etmek için; önce 20 mV/s sonra 40 mV/s hızlarında çalışıldı. 40 mV/s de pik akımı azaldığından, pik akımının daha düşük hızlarda artış göstereceği düşünülüp, 10 mV/s hızında çalışıldı. Elde edilen pik akımı 40 mV/s'ye göre büyük, 20 mV/s'ye göre küçük olduğu görüldüncü; 20 mV/s ile 10 mV/s arasında ara değer çalışılmaya karar verildi. 15 mV/s ile 18 mV/s hızlarında çalışıldı. En yüksek pik akımı 18 mV/s hızında görüldüğü için bu hızda çalışılmasına karar verildi.



Şekil 4.17: DPV tarama hızı ile L-Phe yükseltgenme akımı ilişkisi.

4.1.3.4. Pulse amplitude etkisi

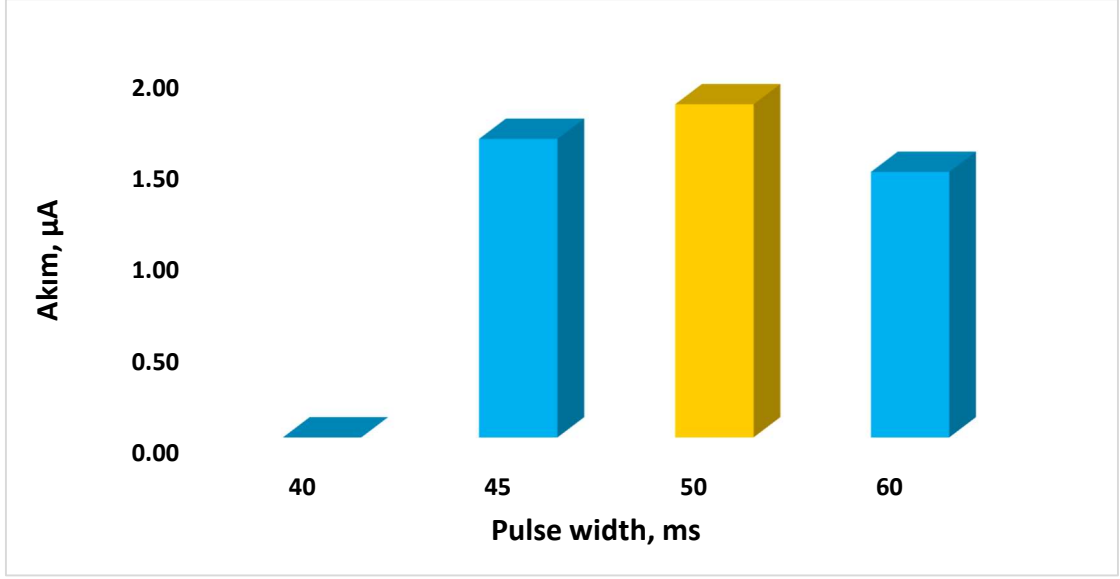
Hazırlanan modifiye elektrotun 700 μM L-Phe'nin elektrokimyasal davranışına DPV yönteminde puls amplitude etkisini belirlemek amacıyla sırasıyla 40, 50, 80 ve 100 mV değerlerinde DPV deneyleri yapılmıştır (Şekil 4.18). Pulse amplitude 50 mV'den 40 mV'e düşürüldüğünde pik akımı azaldığından, 80 mV ve 100 mV değerlerinde çalışıldı. 100 mV'da pik akımı tekrar azaldığı için 80 mV'da çalışılmaya karar verilmiştir.



Şekil 4.18: L-Phe yükseltgenme akımı ile pulse amplitude ilişkisi.

4.1.3.5. Pulse width etkisi

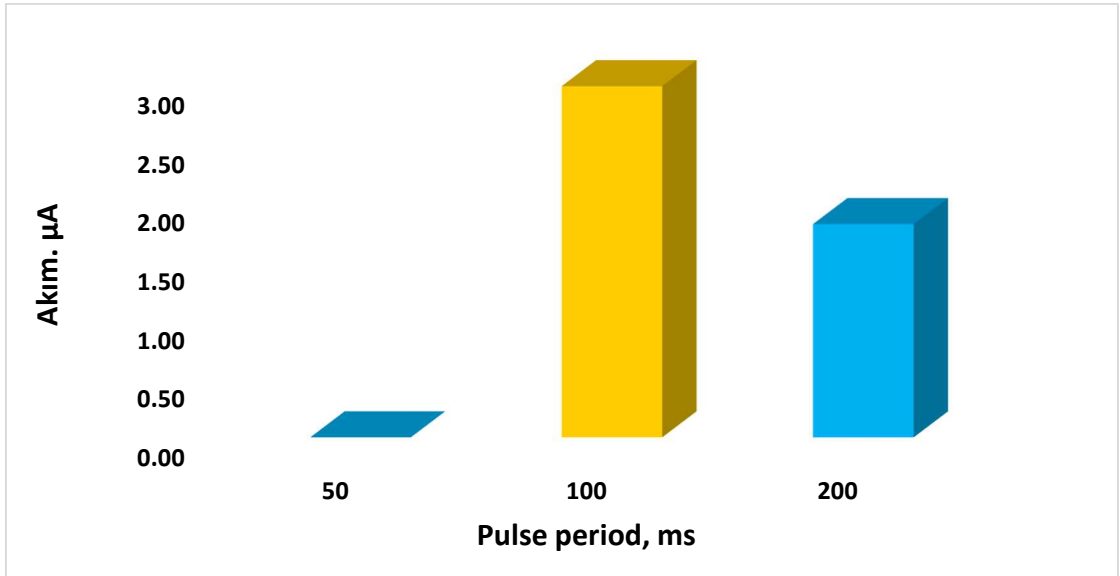
Hazırlanan modifiye elektrotun 700 μM L-Phe'nin elektrokimyasal davranışına DPV yönteminde puls width etkisini belirlemek amacıyla sırasıyla; 40, 45, 50 ve 60 ms değerlerinde DPV deneyleri yapılmıştır (Şekil 4.19). Pulse width 50 ms'den 40 ms düşürüldüğünde doygunluk verdiği için 45 ve 60 ms değerlerinde çalışılmış, pik akımı her iki değer için de azaldığından 50 ms ile çalışılmaya karar verilmiştir.



Şekil 4.19: 700 µM L-Phe DPV yükseltgenme pik akımı üzerine puls width etkisi.

4.1.3.6. Pulse period etkisi

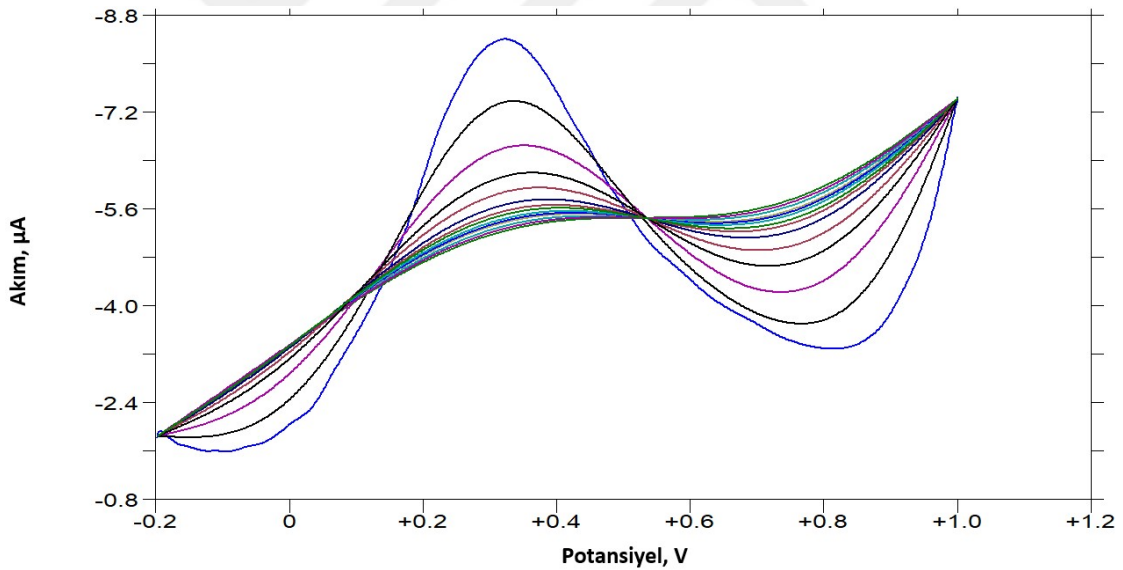
Hazırlanan modifiye elektrotun 700 µM L-Phe'nin elektrokimyasal davranışına DPV yönteminde puls period etkisini belirlemek amacıyla sırasıyla 50, 100 ve 200 ms değerlerinde DPV ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.20). 200 ms'den 100 ms'ye düşürüldüğünde pik akımında artış gözlemlendi, 50 ms'ye düşürüldüğünde doygunluk verdiği için 100 ms ile çalışılmaya karar verilmiştir.



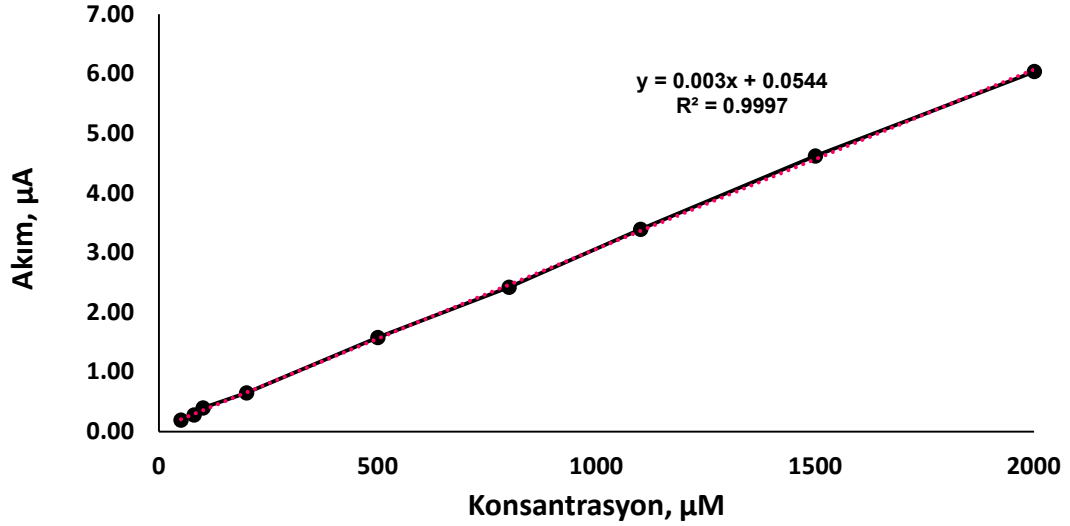
Şekil 4.20: L-Phe'nin yükseltgenme pik akımı üzerine pulse period etkisi.

4.1.3.7. Girişim etkisi ve kalibrasyon grafiği

Hazırlanan modifiye elektrot üzerinde girişim etkisini belirlemek amacıyla analit çözeltisi içerisinde 100 mM askorbik asit, ürik asit gibi elektroaktif olan; 100 mM laktoz, sükröz, glikoz, maltoz gibi elektroaktif olmayan türler eklenerek; 2, 5, 10, 20, 30, 50, 80, 100, 200, 500, 800, 1100, 1500 ve 2000 μM L-Phe tayini yapılmıştır. Bu ölçümler sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 4.21’de verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı üzere baskılanmış elektrot hem elektroaktif hem de elektroaktif olmayan türlerin varlığında sadece fenilalanine yanıt vermiştir. Yani, hazırlanmış olan elektrot fenilalanine duyarlı ve aynı zamanda fenilalanin seçicidir. Artan fenilalanin konsantrasyonu sonucu elde edilen pik akımları kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Moleküler baskılanmış modifiye elektrodun sadece L-Phe’ne yanıt verdiği tespit edilmiştir. Girişim yapabileceği düşünülerek eklenmiş olan elektroaktif ve elektroaktif olmayan türlerin varlığından hiçbir şekilde etkilenmemiştir. Bu özellikleri dikkate alınarak gerçek örneklerde başarılı bir şekilde kullanılabilceği anlaşılmıştır.



Şekil 4.21: İnterferanslar varlığında L-Phe artan konsantrasyonlarına (2, 5, 10, 20, 30, 50, 80, 100, 200, 500, 800, 1100, 1500, 2000 μM) modifiye elektrodun DPV yanıtları; (interferanslar; askorbik asit, ürik asit, laktoz, sükröz, glikoz, maltoz:100 mM).

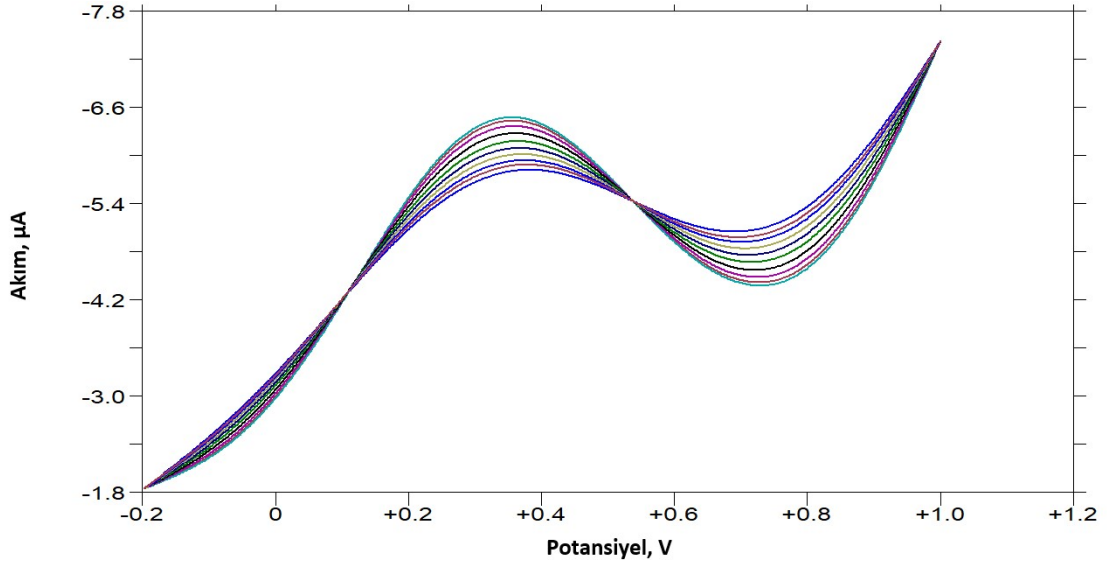


Şekil 4.22: MIP elektrot üzerinde L-Phe kalibrasyon eğrisi. (2, 5, 10, 20, 30, 50, 80, 100, 200, 500, 800, 1100, 1500, 2000 µM L-Phe).

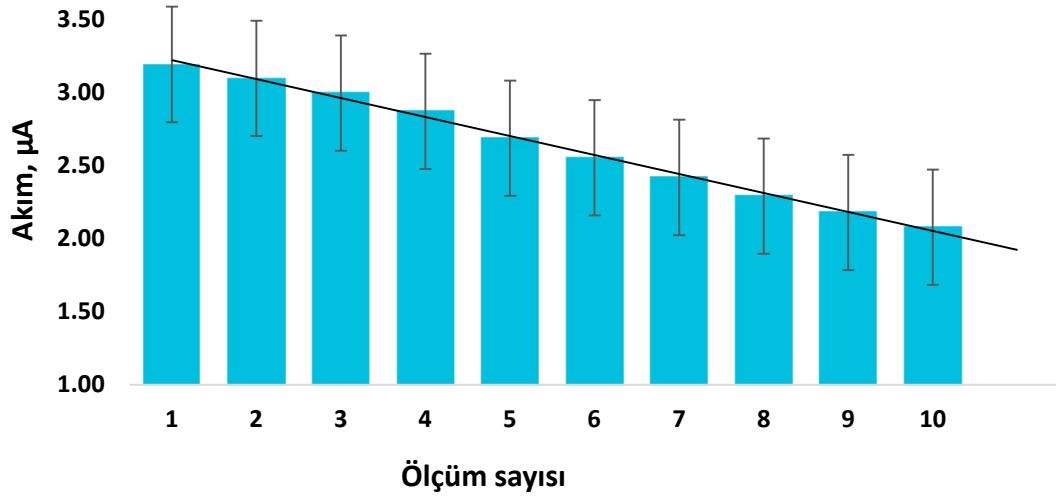
2-2000 µM L-Phe derişim aralığında elde edilen veriler ışığında oluşturulan doğrunun denklemi ($y=0.003x+0.0544$) ve doğrusallığı $R^2 = 0.9997$ olarak hesaplanmıştır. L-Phe seçici moleküler baskılanmış sensörün tayin sınırı (LOD, limit of detection) 0.59 µM ve kantitasyon tayin sınırı (LOQ, limit of quantitation) 1.77 µM olarak hesaplanmıştır.

4.1.3.8 Modifiye elektrodun kararlılığının belirlenmesi

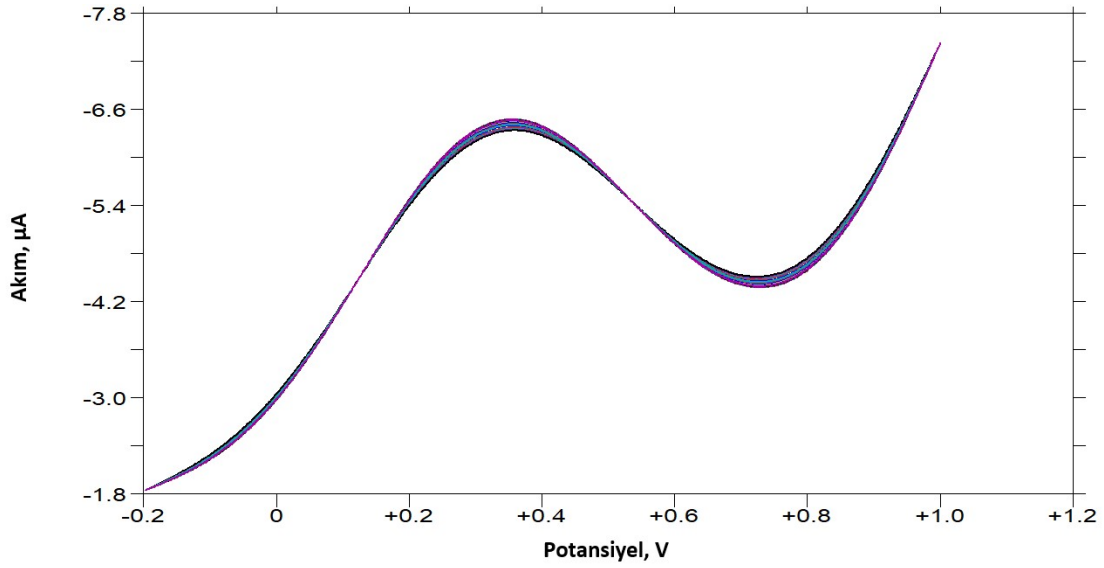
L-Phe seçici sensörün kararlılığını belirlemek için; modifiye edilmiş elektrot ile ardışık 10 defa DPV yöntemiyle 1 mM L-Phe voltamogramları alınmıştır. Bu voltamogramlara ait sonuçlar Şekil 4.23'de verilmiştir. Bu voltamogramlar için elde edilen pik akımları Şekil 4.24'te görülmektedir. Aynı modifiye elektrot ile ardışık 10 ölçüm (n=10) yapılmış ve ilk üç tekrarda %90.2 on tekrarda %60.6 kararlılık sergilediği ve %RSD değerinin ilk üç tekrar için %9.8 ve on tekrar için ise %39.4 olduğu gözlenmiştir.



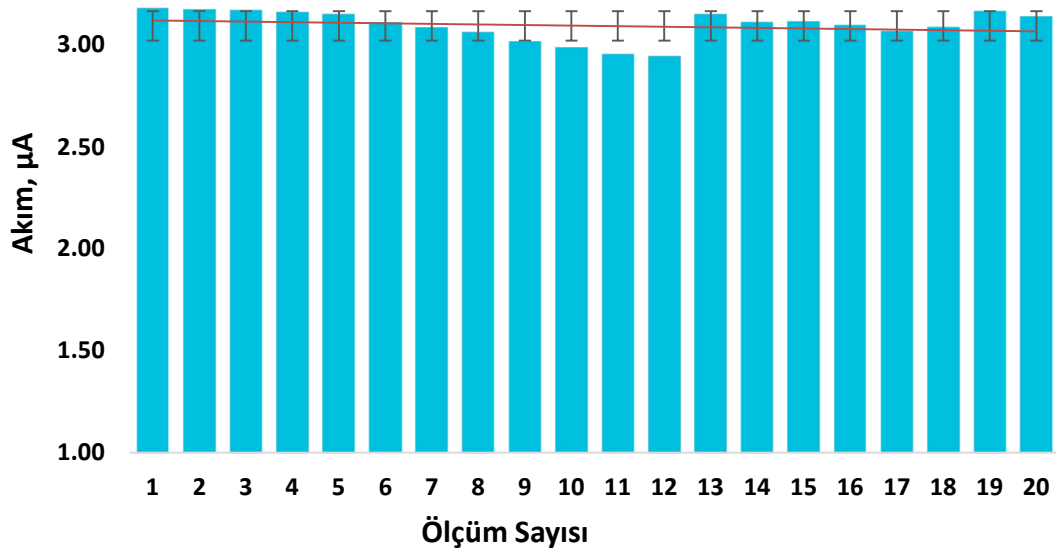
Şekil 4.23: İnterferanslar (askorbik asit, ürik asit, laktoz, sükröz, glikoz, maltoz:100 mM) varlığında aynı modifiye elektrod üzerinde 1 mM L-Phe DPV'leri (n=10).



Şekil 4.24: İnterferanslar (askorbik asit, ürik asit, laktoz, sükröz, glikoz, maltoz:100 mM) varlığında 1 mM L-Phe seçici modifiye elektrodun tekrarlanabilirliği (n=10).



Şekil 4.25: İnterferanslar (askorbik asit, ürik asit, laktoz, sükröz, glikoz, maltoz:100 mM) varlığında farklı modifiye elektrotlar üzerinde 1 mM L-Phe DPV'leri (n=20).



Şekil 4.26: İnterferanslar (askorbik asit, ürik asit, laktoz, sükröz, glikoz, maltoz:100 mM) varlığında 1 mM L-Phe seçici modifiye elektrodun yeniden üretilebilirliği (n=20).

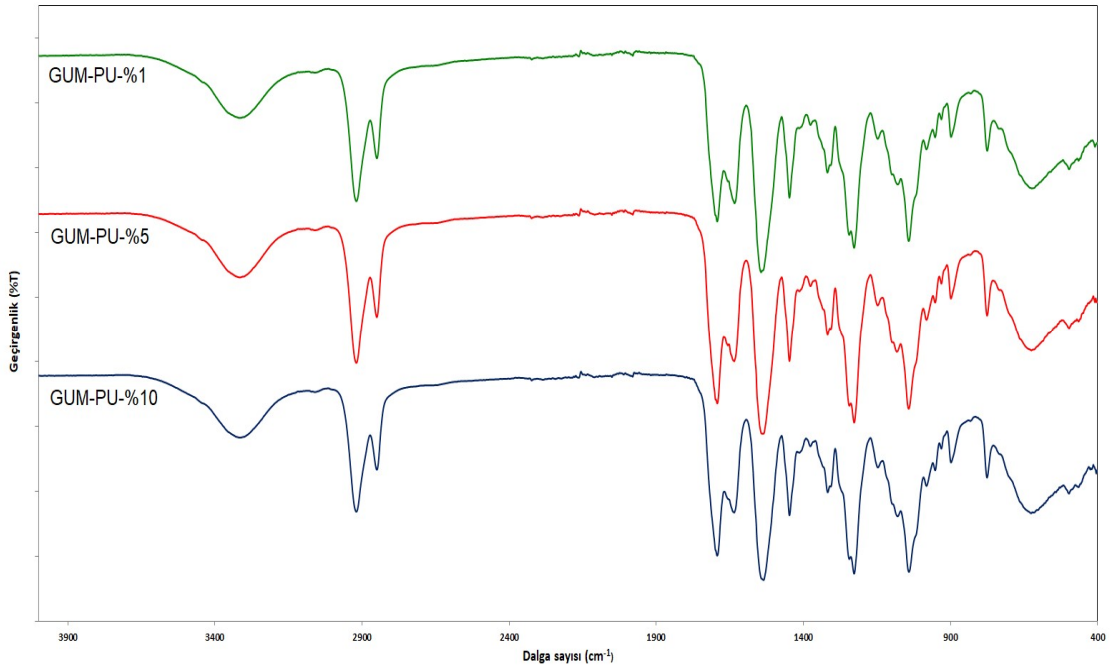
20 tane elektrot modifiye edilmiş ve her biri ile ayrı ayrı DPV'leri (Şekil 4.25) alınmıştır. Birinci elektrot ile yirminci elektrot arasında %92.8 kararlı sonuç elde edildiği, %RSD değerinin %7.20 olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.26).

4.2. Kimyasal Modifikasyon ile Hazırlanmış Fenilalanin Sensörü Ölçüm Sonuçları

Tezin ikinci kısmında fenilketonüri hastalığının belirlenmesi için kimyasal modifikasyon kullanılarak poliüretan kaplı elektrotlar hazırlanmıştır. Bu elektrotların hazırlanabilmesi için GUM temelli poliüretan yapıları sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Daha sonra farklı film kalınlıklarında elektrotlar üzerine kaplanarak sadece fenilalanin geçirgen polimerik film kaplı elektrotlar elde edilmiştir. Bu elektrotların temel karakterizasyon ve fenilalanin yanıtları aşağıda verilmiştir.

4.2.1. GUM temelli poliüretan yapıların karakterizasyonu

Elektrotların kimyasal modifikasyonlarında kullanılan GUM temelli poliüretanların yapısal analizleri elementel analiz ve FTIR spektrumları ile yapılmıştır. Elementel analiz sonuçlarına göre teorik ve deneysel veriler arasındaki sapma oranı %1'in altında görülmüştür. Bu nedenle poliüretan yapısının istenilen kimyasal kompozisyonda olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca gerçekleştirilen FTIR analizlerinde temel poliüretan gruplarına ait pikler tespit edilmiştir.

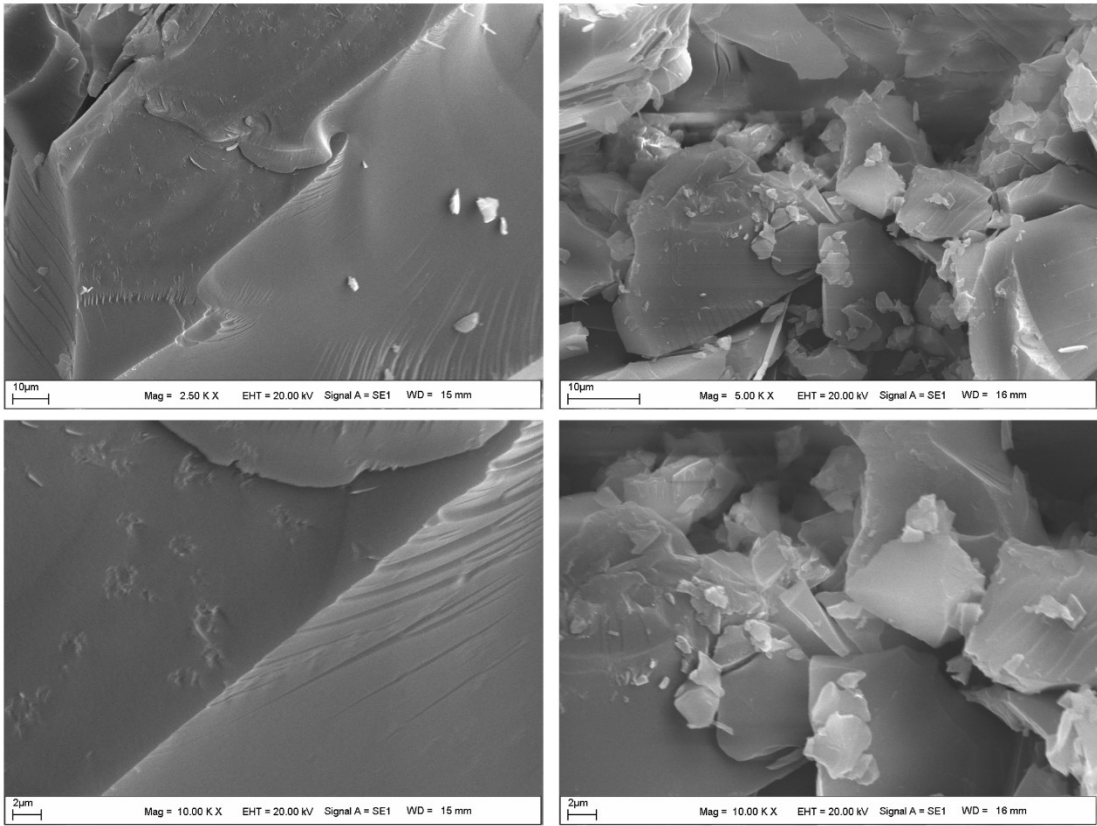


Şekil 4.27: GUM temelli poliüretan yapılarına ait FTIR spektrumları.

Şekil 4.27'de çalışma kapsamında hazırlanan ve farklı oranlarda GUM içeren poliüretanlara ait FTIR spektumları görülmektedir. Bu spektrumlarda hem GUM yapısından kaynaklı hem de diizosiyanat yapısından kaynaklı pikler görülmüştür.

Özellikle 1650 cm^{-1} 'de ve 1691 cm^{-1} 'de poliüretan yapısındaki karbonil gerilme titreşimleri; $300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ aralığında serbest OH ve NH gruplarına ait hidrojen bağı gerilme titreşimleri; 1360 cm^{-1} 'de C-N gerilme titreşimleri; 1042 cm^{-1} 'de ise C-O-C eterik gerilme titreşimleri görülmüştür. GUM yapısından kaynaklı alifatik C-H gerilme titreşimleri ise $2798\text{-}2975\text{ cm}^{-1}$ aralığında net bir şekilde görülmüştür.

Çalışma kapsamındaki GUM üniteleri üzerindeki C-O-C grupları $400\text{-}740\text{ cm}^{-1}$ aralığında tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular istenilen poliüretan yapısının elde edildiğini ispatlamıştır.

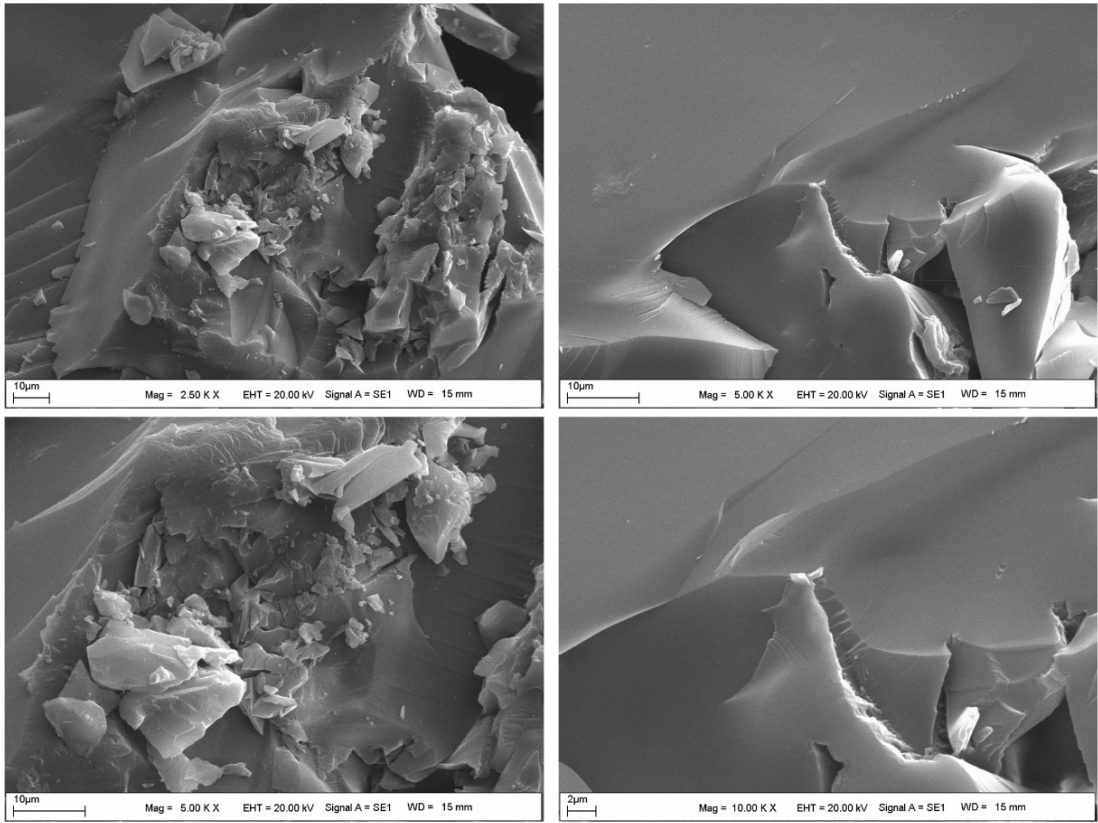


Şekil 4.28: GUM-PU-%1 yapısına ait SEM görüntüleri.

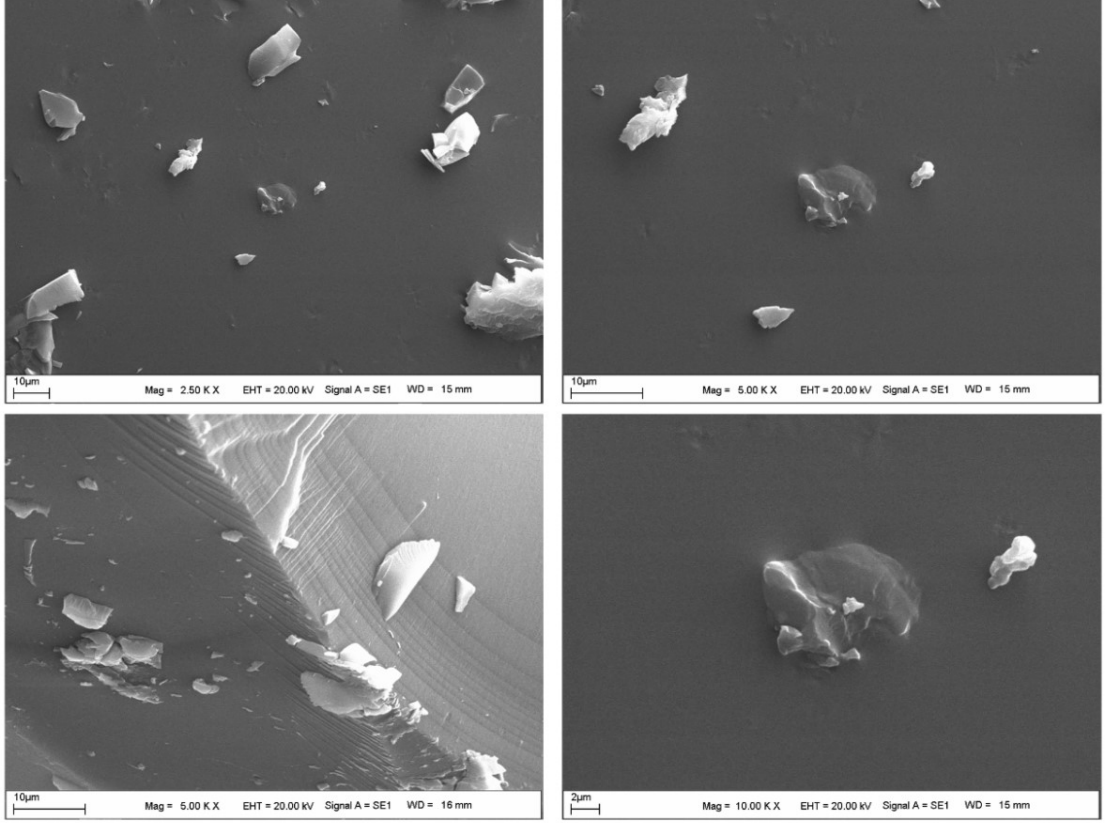
Elektrot modifikasyonunda kullanılacak polimerik yapılarda aranan önemli bir özellik ise yüzey morfolojisi ve yüzey karakterizasyonudur. Düzgün, pürüzsüz ve homojen yüzey yapısı sensör çalışmalarında genellikle amaçlanmaktadır. Bu plan dahilinde sentezi gerçekleştirilen poliüretan yapılarının $2500\times$, $5000\times$ ve $10000\times$ büyütmelede SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30

kapsamında ise %1, %5 ve %10 oranlarında GUM içeren yapılara ait kıyaslamalı SEM görüntüleri görülmektedir.

Farklı büyütmelerdeki SEM görüntülerinde öncelikle düzgün homojen ve katkısız bir morfoloji gözlenmiştir. Polimer yapısı yüzeye düzgün dağılım ve homojen adezyon gösteren bir yapıda olup klasik film morfolojisi sergilemektedir. Morfoloji üzerinde herhangi bir çatlak ve yabancı cisim görülmemektedir. Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'de verilen SEM görüntüleri beraber yorumlandığında GUM-PU-%10 yapısına ait SEM görüntüsünün daha pürüzsüz düzgün ve homojen olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu yapının elektrot hazırlanmasında kullanımı için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



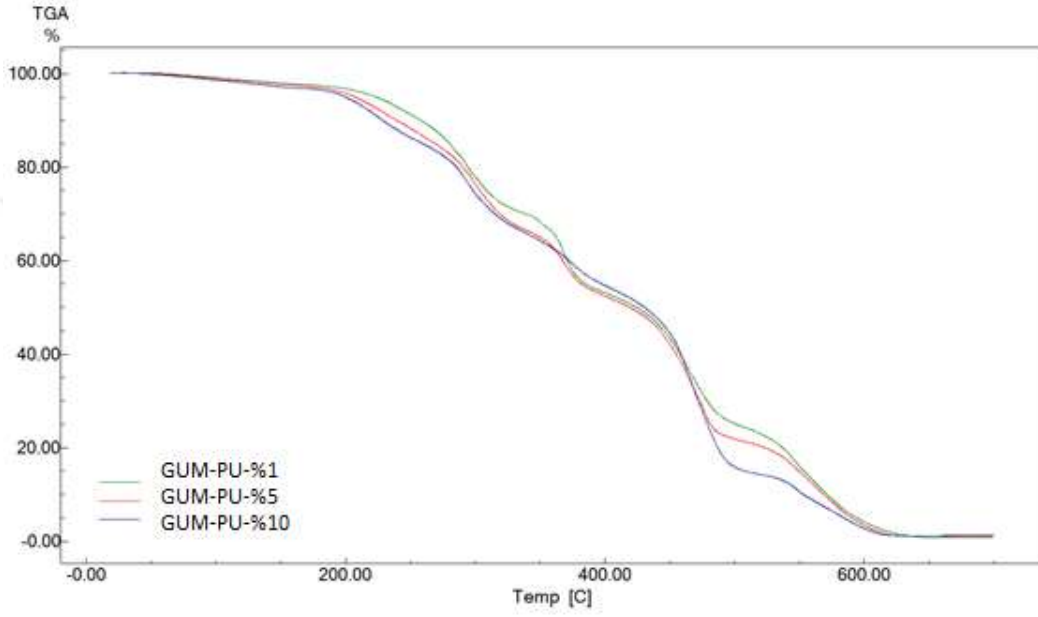
Şekil 4.29: GUM-PU-%5 yapısına ait SEM görüntüleri.



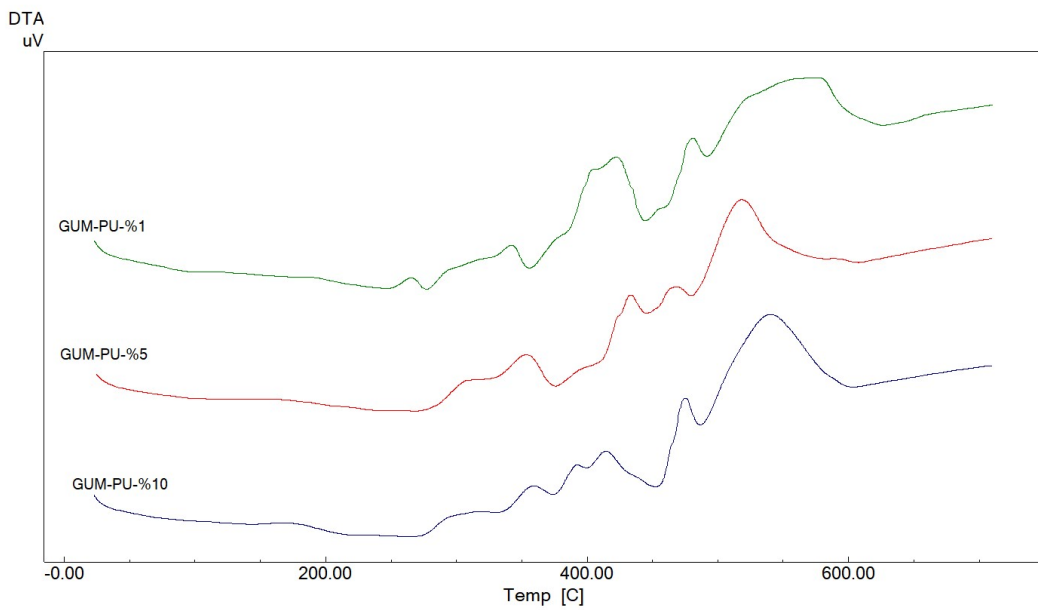
Şekil 4.30: GUM-PU-%10 yapısına ait SEM görüntüleri.

Sentezlenen bu poliüretanların termal özellikleri ise TGA, DTA ve DSC termogramları ile ölçülmüş olup Şekil 4.31, Şekil 4.32 ve Şekil 4.33’de verilmiştir. Şekil 4.29’daki TGA termogramı incelendiğinde yaklaşık 100 °C civarında yapısal nemden kaynaklı olarak yaklaşık %3 lük bir kütle kaybı görülmektedir. Bu kütle kaybının miktarı %1 GUM içeren yapıdan %10 GUM içeren yapıya doğru artmaktadır. Bunun nedeni yapıya giren GUM’a bağlı olarak polimerin yüzey hidrofilikliğinin artması ve yapının daha fazla nem bağlamasından kaynaklıdır. TGA termogramlarına göre poliüretan yapısının termal bozulması yaklaşık olarak 200 °C civarında başlamaktadır. Poliüretan yapıları 4 kademeli bir termal bozulma ile yapısal olarak degradasyona uğramaktadır. İlk kütle kaybı yaklaşık 200-300 °C arasında gözlenmiştir. Yaklaşık %25 civarında olan bu kütle kaybında poliüretan yapısındaki yumuşak segmentlerin degradasyonu söz konusudur. İkinci kütle kaybı ise 300 °C de başlayıp yaklaşık 380 °C de biten %15 civarında bir değişim görülmektedir. Bu her üç polimer için de ortak gözlenmiş olan bir kütle kaybıdır. Bu durum alifatik karakterli izosiyonat gruplarının degradasyonundan

kaynaklanır. Üçüncü degradasyon ise poliüretan yapısındaki sert segmentlerin bozulmasından kaynaklanır, 380 °C de başlar ve yaklaşık 500 °C ye kadar devam eder. Bu degradasyon GUM-PU-%1 yapısı için yaklaşık %35 civarında, GUM-PU-%5 yapısı için %40 civarında, GUM-PU-%10 yapısı için ise %45 civarında gözlenmiştir. Sonuç olarak gözlenen son termal degradasyonda ise polimerik yapının termooksidatif bozunması görülmüştür. Bu aşamada poliüretan yapısının karbonizasyonu gerçekleşir tüm bu bulgular literatür ile uyumlu olarak görülmüştür.

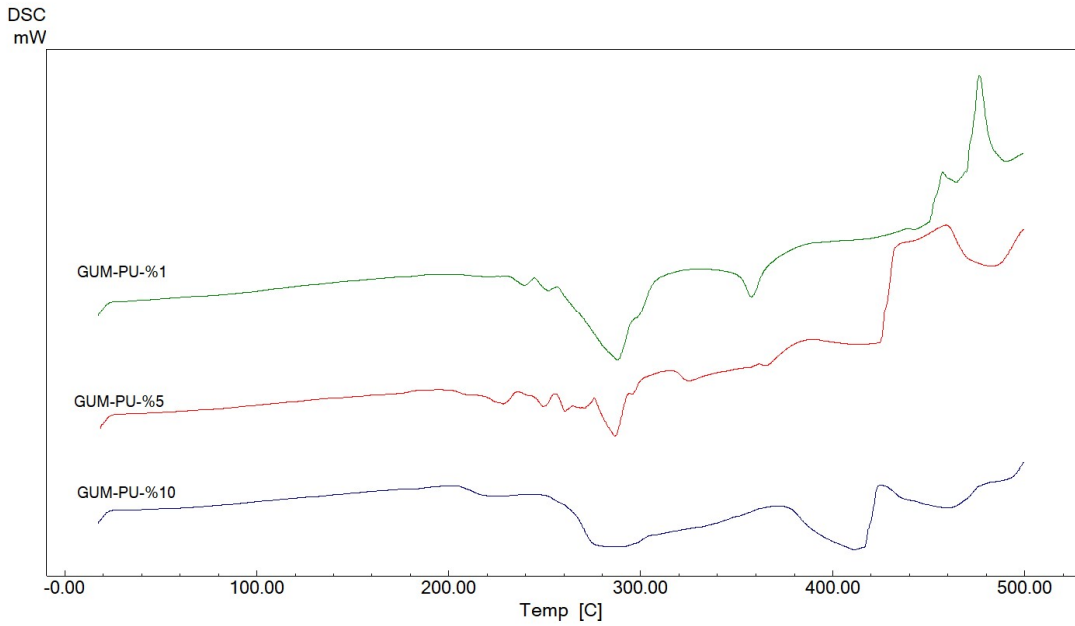


Şekil 4.31: GUM temelli poliüretan yapılarına ait TGA termogramı.



Şekil 4.32: GUM temelli poliüretan yapılarına ait DTA termogramları.

Şekil 4.32’de sentezlenen poliüretan yapılarına ait DTA termogramları verilmiştir. GUM-PU-%1 yapısı için elde edilen poliüretanın 247.9 °C’ ye kadar termal kararlı olduğu görülmektedir. GUM-PU-%5 yapısında ise bu stabilite değerinin yaklaşık 270 °C’ye kadar yükseldiğini görmekteyiz. GUM-PU-%10 yapısı içinde benzer stabilite artışı gözlenmektedir. Bu artışın nedeni poliüretan yapılarının GUM oranının artması ile çapraz bağlanma miktarının arttığını ve yapısal esneklik kazanan bu sistem ile termal stabilitenin de arttığını görmekteyiz. 700 °C’ ye kadar devam eden termogramlarda her bir polimer için TGA termogramı ile uyumlu olan dört temel ekzoterm görülmektedir. Birinci ekzoterm yaklaşık 270 ve 355 °C arasındadır. İkinci ekzoterm değeri 350-445 °C arasında görülüp, üçüncü ekzoterm yaklaşık olarak 495 °C’ye kadar devam etmektedir. Oldukça geniş olan son ekzoterm ise 490-630 °C arasında kalın bir bant görünümündedir. Polimerik yapının karbonizasyonunu göstermektedir. GUM-PU-%5 ve GUM-PU-%10 yapılarında son gözlenen karbonizasyon piki daralmakta ve daha düşük sıcaklıkta sonlanmaktadır. Bu değişim yapıya giren GUM moleküllerinden kaynaklanmaktadır. Bu sonuç da sentez sonrasında yapıya GUM moleküllerinin katıldığını ispatlamaktadır.



Şekil 4.33: GUM temelli poliüretan yapılarına ait DSC termogramları.

Şekil 4.33’de farklı GUM oranları kullanılarak hazırlanmış olan poliüretan yapılarına ait DSC termogramları verilmiştir. Bu termogramlarda azot atmosferi altında sentezlenen poliüretan yapılarının termal davranışları incelenmiştir.

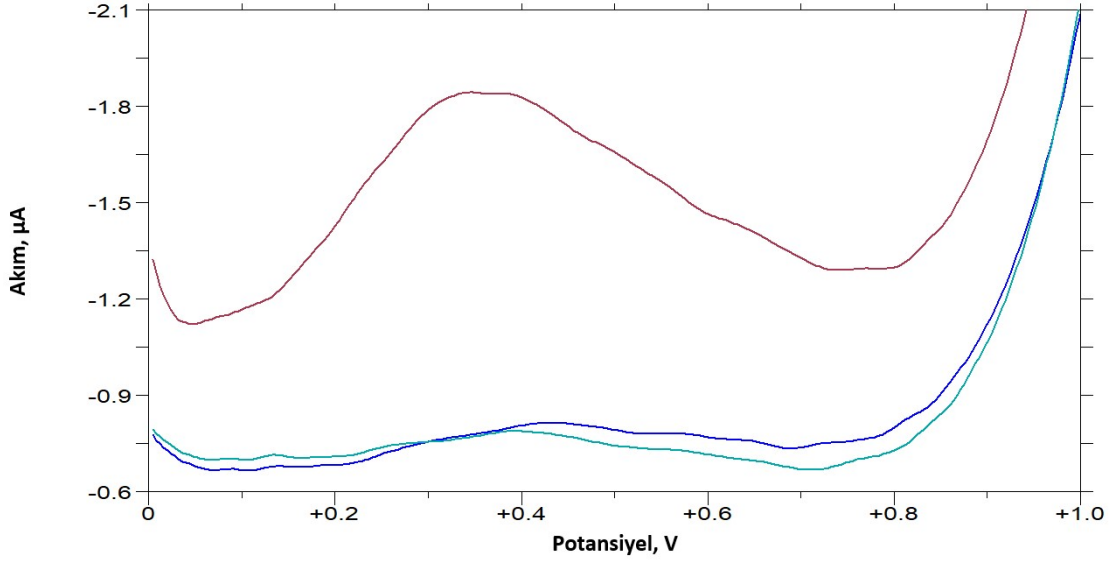
DTA termogramları ile benzer olarak GUM temelli poliüretan yapısının kademeli bozulması tespit edilmiştir. GUM-PU-%1 yapısı yaklaşık 250 °C'de bozunmaya başlayarak 500 °C ye kadar öncelikle GUM yapısındaki küçük hegzos ünitelerinin bozunması daha sonra yumuşak segment ve alifatik grupların bozunması gerçekleşmiştir. GUM-PU-%5'lik ve GUM-PU-%10'luk yapılarda ise bu bozunma piklerinin genişlediği doğal olarak yapıya giren GUM miktarının arttığı net olarak görülmüştür. Tüm bu karakterizasyon bulguları yaklaşık 200-250 °C arasında bozunan termal kararlı poliüretan yapılarının elde edildiğini göstermektedir. Bu bulgu bu poliüretanlar ile modifiye edilmiş yapıların yaklaşık 180 °C'ye kadar rahatlıkla strile edilebileceğini göstermektedir. Pek çok biyolojik sıvının okunmasında elektrot materyali olarak uygun ve kullanışlı malzemelerdir. Bu nedenle tez kapsamında planlanan poliüretan yapılarının amaca uygun olarak sentezlendiği görülmektedir.

4.2.2. GUM temelli poliüretan modifikasyonu ile fenilalanin sensörünün hazırlanması

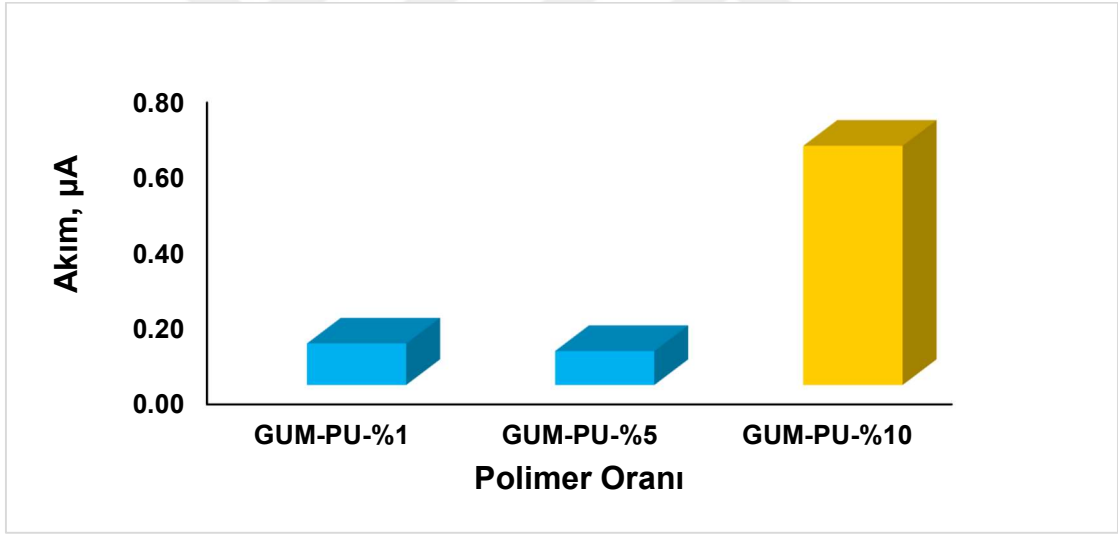
0.1 g GUM-PU-%10 polimeri 1 mL THF ve 0.1 mL NMP içerisinde çözülerek polimer çözeltisi hazırlanmıştır. Platin elektrot yüzeyine 4 µL polimer çözeltisi damlatılarak, bir gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur.

4.2.3. L-Fenilalanin tayininde kullanılacak polimer türünün belirlenmesi

Fenilalanin tayininde özellikle moleküler olarak Phe yapısına geçirgen diğer elektroaktif türlere geçirgen olmayan polimerik yapıların tasarlanması gerekmektedir. Bu nedenle çalışma kapsamında kuvvetli polar özellikte ve Phe yapısını elektrot yüzeyinde toplayacak bir polimer yapısı olarak GUM temelli poliüretanlar tercih edilmiştir. GUM yapısı polimer mikro zincir yapısı içerisinde hem gözenekli bir yapının oluşmasını sağlamakta hem de polariteyi artırmaktadır. GUM yapısının bu özelliklerini değiştirebilmek için üç farklı GUM oranı tercih edilmiştir. %1, %5 ve %10 GUM içeren poliüretanlar elde edilmiş ve Pt elektrot yüzeyine kaplanarak Phe yanıtları okumuştur. Farklı yapılardaki poliüretanların Phe yanıtlarına etkisi Şekil 4.34'de gösterilmiştir. Bu şekil üzerindeki voltamogramlara göre GUM-PU-%10 yapısında Phe pik akımı oldukça yüksektir (Şekil 4.35). Bu nedenle ileri sensör optimizasyonları için bu polimer türü tercih edilmiştir.



Şekil 4.34: Farklı oranlarda GUM içeren poliüretan kaplı elektrotlar üzerinde pH 8.00 sitrat tamponu içinde $700 \mu\text{M}$ L-Phe DPV yanıtları (Mavi: GUM-PU-%1, Yeşil: GUM-PU-%5, Kırmızı: GUM-PU-%10).

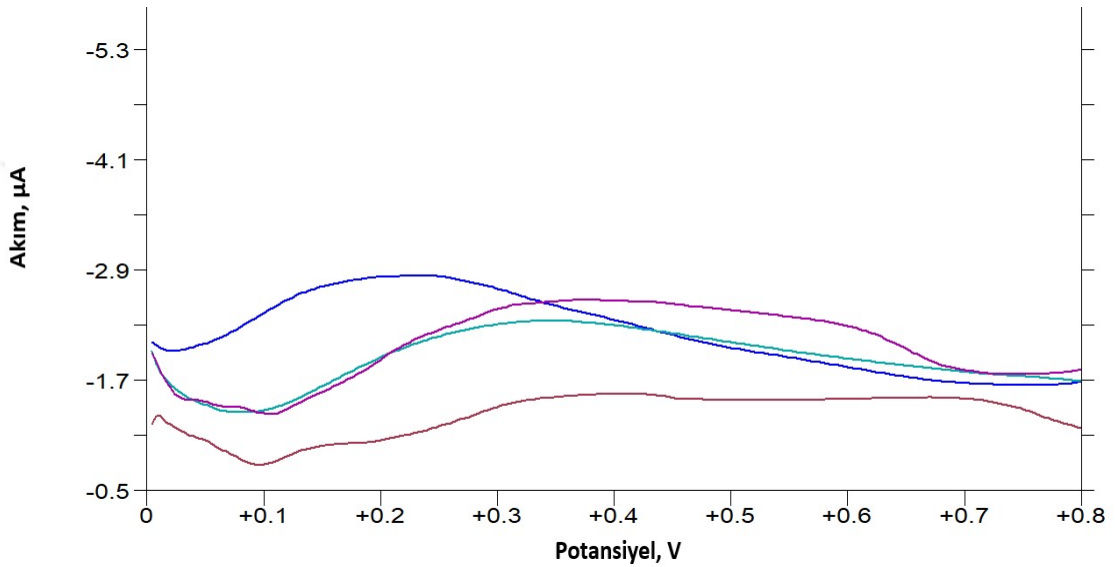


Şekil 4.35: Farklı oranlarda GUM içeren poliüretanın L-Phe yükseltgenme akımına etkisi.

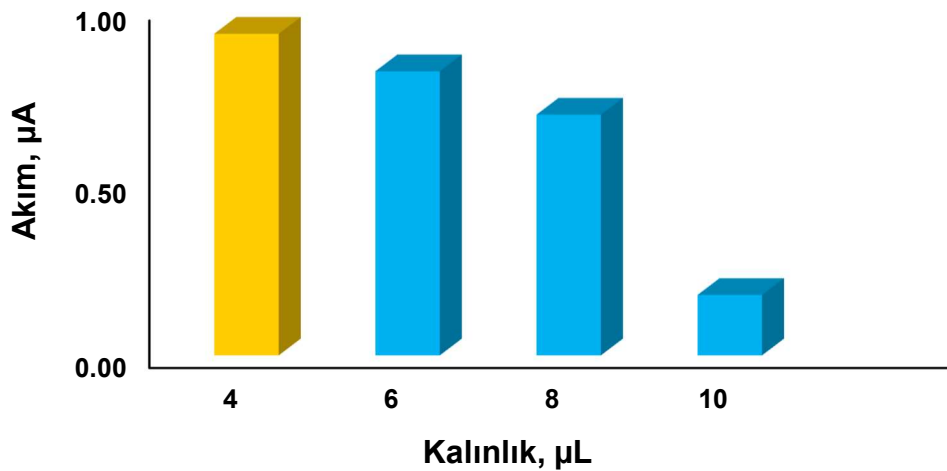
Şekil 4.34’de farklı oranlarda GUM içeren film yapılarına bağlı elde edilen L-Phe voltamogramları görülmektedir. Alınan voltamogramlar incelendiğinde; en yüksek pik akımı GUM-PU-%10 kaplı elektrot ile elde edilmektedir (Şekil 4.35). Bu nedenle L-Phe tayini için geliştirilen sensörün hazırlanmasında polimer olarak GUM-PU-%10 ile çalışılmasına karar verilmiştir.

4.2.4.Film kalınlığının etkisi

GUM-PU-%10 polimerinin film kalınlığının pik akımı üzerindeki etkisini belirlemek için dört farklı film kalınlığı ile elektrot modifiye edilmiştir. Elektrot üzerine farklı kalınlıklarda (4, 6, 8 ve 10 μL) polimer çözeltisi damlatılarak kurutulmuş olan elektrotlarla elde edilen L-Phe voltamogramları Şekil 4.36’da görülmektedir. Bu sonuçlar ile çizilen Şekil 4.37’deki grafiğe göre en yüksek pik akımı 4 μL film kalınlığında elde edildiği için bu kalınlıkta çalışılmaya karar verilmiştir.



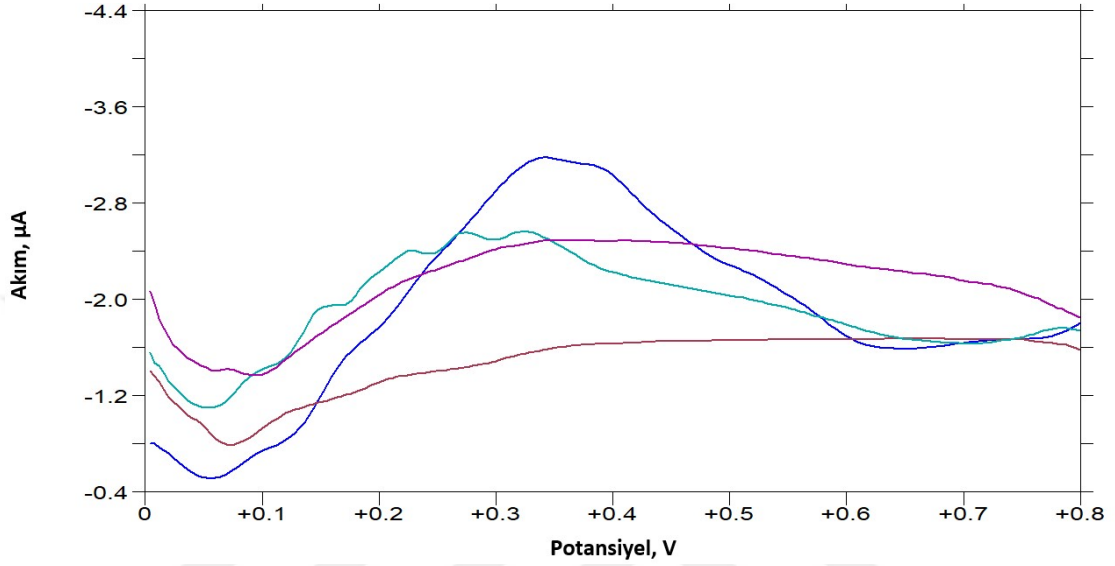
Şekil 4.36: Farklı GUM-PU-%10 kaplı elektrotlar üzerinde, pH 8.00 sitrat tamponu içinde, 700 μM L-Phe DPV yanıtları kalınlıklarda (Kırmızı: 10 μL , Yeşil: 6 μL , Mor: 8 μL , Mavi: 4 μL).



Şekil 4.37: Film kalınlığının L-Phe yükseltgenme akımına etkisi.

4.2.5. Elektrolit türünün etkisi

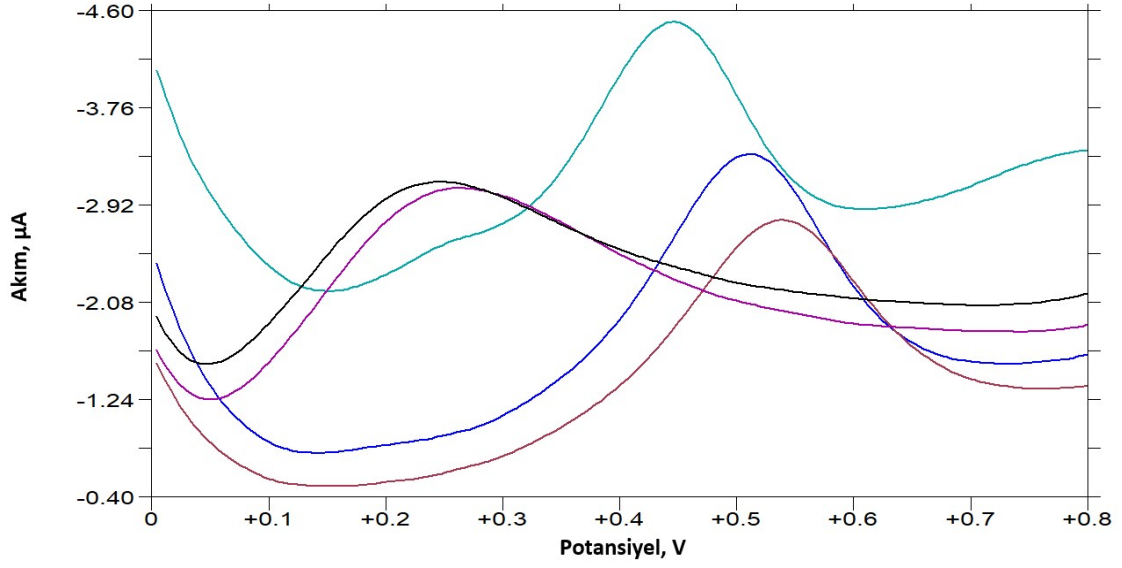
pH:7.00 ayarlı sitrat, fosfat, PBS ve B-R tampon çözeltileri ile 1 mM L-Phe çözeltisi hazırlanmıştır. Modifiye elektrot kullanılarak DPV yöntemi ile alınan voltamogramlar incelendiğinde en yüksek pik akımının PBS tamponunda görülmesi nedeniyle PBS tamponu ile çalışılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.38).



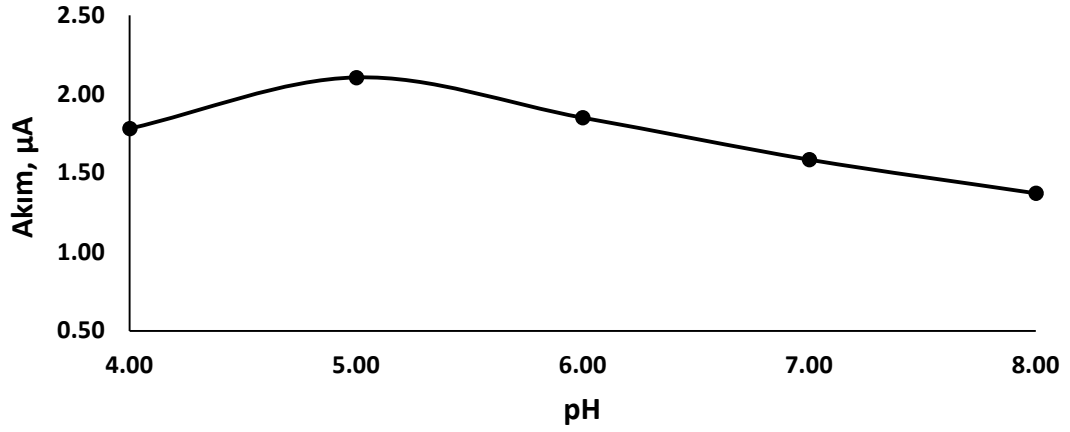
Şekil 4.38: 4 µL GUM-PU-%10 kaplı elektrotlar ile 1 mM L-Phe'nin pH 7.00 ayarlı farklı elektrolitler içerisindeki DPV sonuçları. (Kırmızı: B-R tamponu, Yeşil: Fosfat tamponu, Mor: Sitrat tamponu, Mavi: PBS tamponu).

4.2.6. Elektrolit pH etkisi

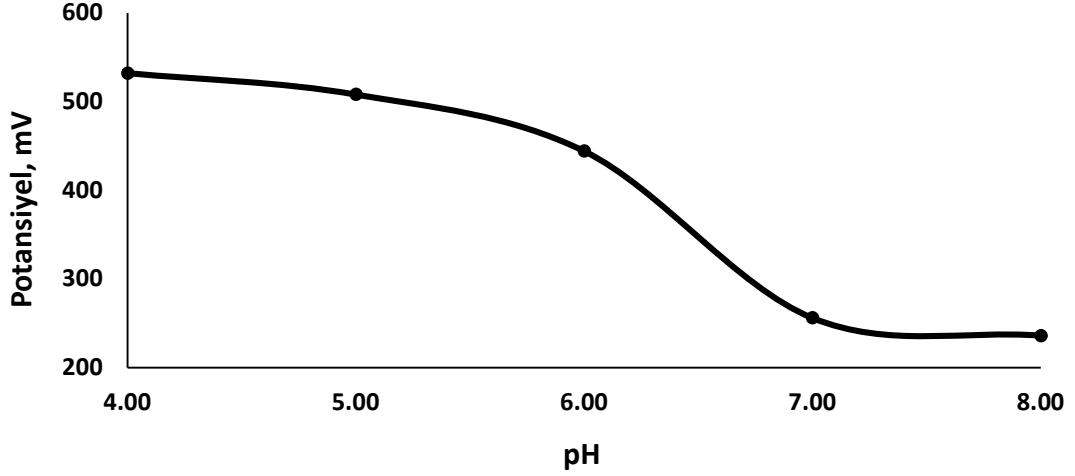
Destek elektrolit olarak seçilen PBS tamponunun pH'sı 4.00, 5.00, 6.00, 7.00 ve 8.00'e ayarlanarak DPV yöntemi ile zemin ve 1 mM L-Phe ölçümü yapılmıştır. Şekil 4.39'daki voltamogramlar incelendiğinde pik akımının bazik yönde artış gösterdiği gözlenmiştir. Pik akımı pH 5.00'de en büyük değeri gösterdiği için pH 5.00 PBS tamponu ile çalışılmasına karar verilmiştir. Şekil 4.40' da destek elektrolit pH'sının yükseltgenme akımına etkisi, Şekil 4.41'da destek elektrolit pH'sının L-Phe potansiyeline etkisi gösterilmiştir.



Şekil 4.39: 4 µL GUM-PU-%10 kaplı elektrotlar ile 1 mM L-Phe'nin PBS tamponu içinde farklı pH'larda DPV yanıtları. (Kırmızı: 4, Mavi: 5, Yeşil: 6, Mor: 7, Siyah: 8).



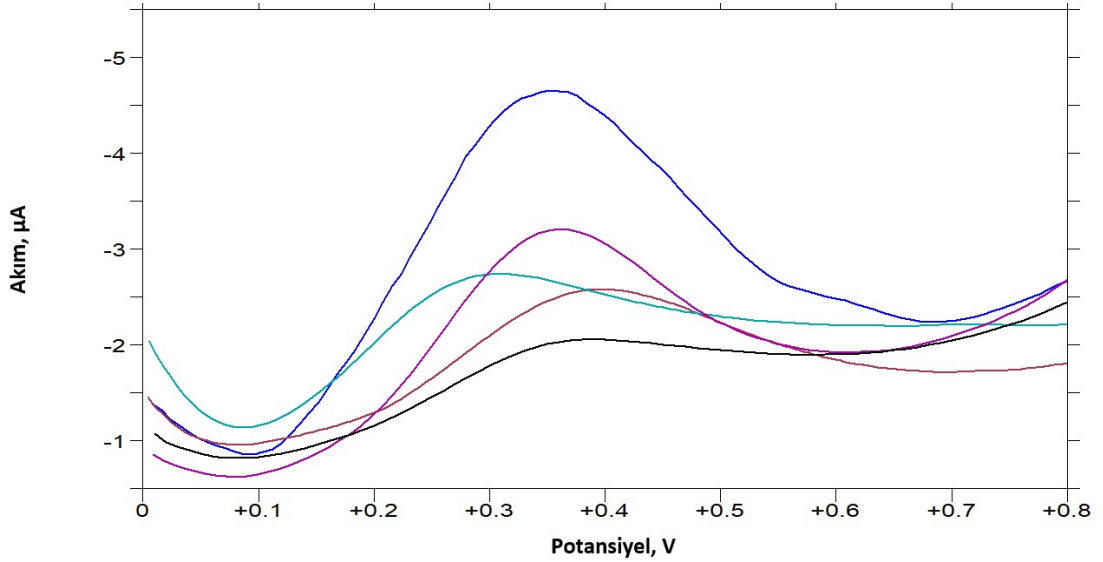
Şekil 4.40: Elektrolit pH'sı ile L-Phe yükseltgenme akımı ilişkisi.



Şekil 4.41: Elektrolit pH'sının L-Phe potansiyeline etkisi.

4.2.7. DPV yöntemi tarama hızının etkisi

Hazırlanan modifiye elektrotun 1 mM L-Phe'nin elektrokimyasal davranışına DPV yöntemi tarama hızının etkisini belirlemek amacıyla 20, 30, 40, 45 ve 50 mV/s tarama hızlarında alınan voltamogramlar Şekil 4.42'de belirtilmiştir.

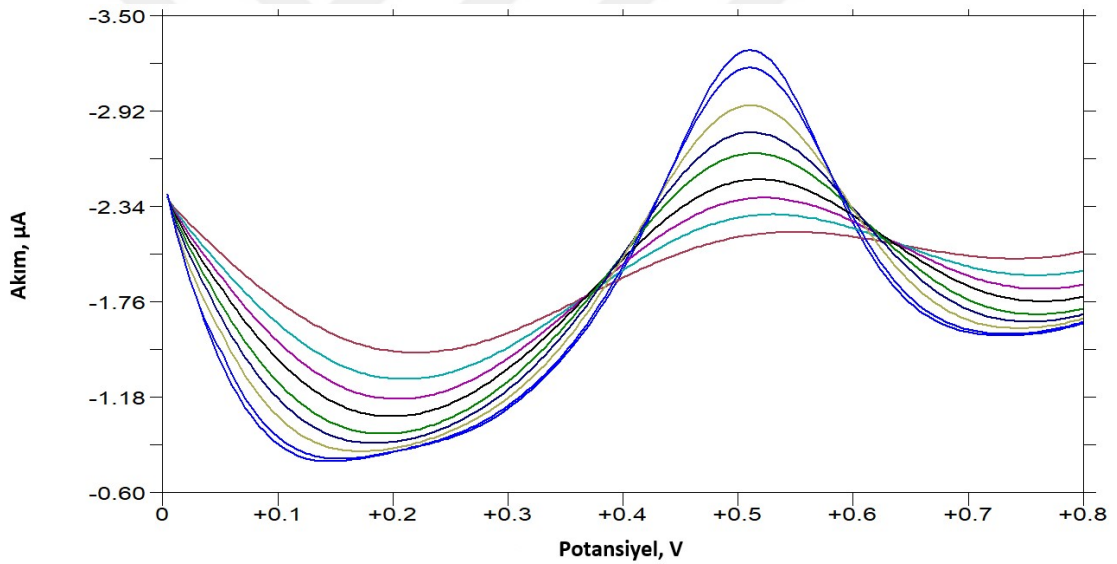


Şekil 4.42: Farklı tarama hızlarında PBS tamponu içinde 4 µL GUM-PU-%10 kaplı elektrotlar üzerinde 1 mM L-Phe DPV yanıtları (Kırmızı: 20, Yeşil: 30, Mavi: 40, Mor: 45, Siyah: 50 mV/s).

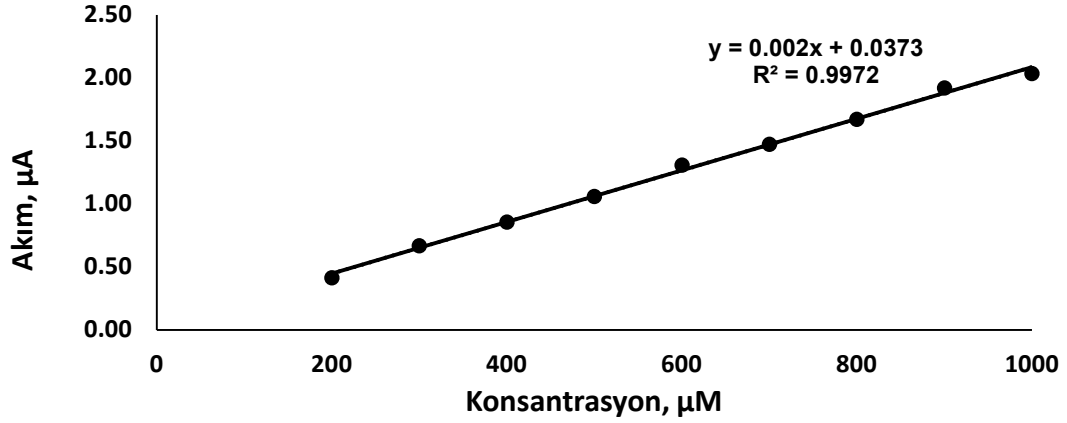
Tarama hızının etkisini tespit etmek için; sırasıyla 20, 30, 40 ve 50 mV/s hızlarında çalışıldı. Pik akımı 40 m V/s'de en büyük değeri göstermiş, 50 mV/s'de azaldığı için, 40-50 mV/s aralığında daha yüksek pik verme olasılığını göz önünde bulundurarak 45 mV/s'de de ölçüm yapılmış fakat pik akımı azaldığı için 40 mV/s tarama hızında çalışılmasına karar verilmiştir.

4.2.8. Girişim etkisi ve kalibrasyon grafiği

Hazırlanan modifiye elektrot üzerinde, girişim etkisini belirlemek amacıyla, analit çözeltisi içerisinde 100 mM askorbik asit, ürik asit gibi elektroaktif olan; 100 mM laktoz, sükroz, glikoz, maltoz gibi elektroaktif olmayan türler varlığında; 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 μ M L-Phe eklenerek DPV deneyleri yapılmıştır (Şekil 4.43). Modifiye elektrodun sadece L-Phe'ne yanıt verdiği, elektroaktif ve elektroaktif olmayan türlerden etkilenmediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.43: İnterferanslar (askorbik asit, ürik asit, laktoz, sükroz, glikoz, maltoz:100 mM) varlığında modifiye elektrot üzerinde artan L-Phe konsantrasyonlarının (200, 300, 400, 500, 600, 700 800, 900 ve 1000 μ M); DPV yanıtları.



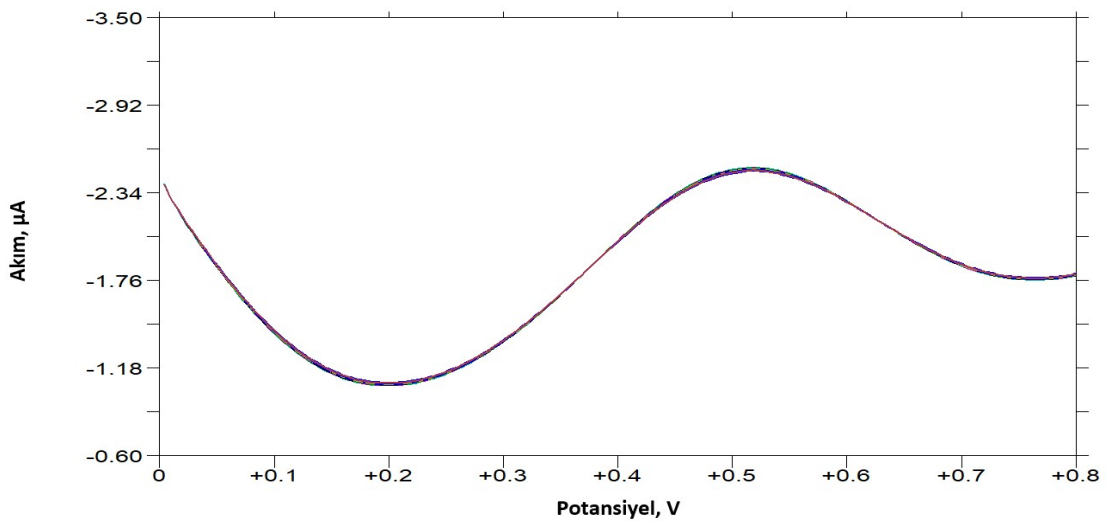
Şekil 4.44: L-Phe (200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 µM) kalibrasyon eğrisi.

200-1000 µM L-Phe derişim aralığında elde edilen veriler (Şekil 4.44) ışığında oluşturulan doğrunun denklemi ($y=0.002x+0.0373$) ve doğrusallığı $R^2=0.9972$ olarak hesaplanmıştır.

L-Phe seçici kimyasal modifikasyon ile hazırlanmış sensörün tayin sınırı (LOD, 48.01 µM ve kantitasyon tayin sınırı (LOQ) 144.02 µM olarak hesaplanmıştır.

4.2.9. Modifiye elektrodun kararlılığının belirlenmesi

L-Phe seçici sensörün kararlılığını belirlemek için; modifiye edilmiş tek bir elektrot üzerinde 10 defa 1 mM L-Phe'in diferansiyel puls voltamogramı alınmıştır (Şekil 4.45).



Şekil 4.45: İnterferanslar (askorbik asit, ürik asit, laktoz, sükröz, glikoz, maltoz:100 mM) varlığında modifiye elektrot üzerine 1 mM L-Phe DPV'leri (n=10).

Aynı modifiye elektrot ile ardışık 10 ölçüm yapılmış ve birinci elektrot ile onuncu elektrot arasında %98.8 kararlı sonuç elde edildiği ve %RSD değerinin %1.21 olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.46).



Şekil 4.46: İnterferanslar (askorbik asit, ürik asit, laktoz, sükroz, glikoz, maltoz:100 mM) varlığında 1 mM L-Phe seçici modifiye elektrodun kararlılığı (n=10).

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Önemli bir genetik hastalık olan PKU hastalığının teşhisi ve tedavisi sırasında bir görüntüleme ajanı olarak Phe oldukça önem arz etmektedir. Özellikle yeni doğanlarda bu hastalığın tespiti, yapılacak tedaviye erken başlanabilmesi için kritik rol oynamaktadır. Ancak Phe miktarının kanda oldukça düşük olması ölçüm yapılan test numunesinin çok küçük miktarda olması yeni doğmuş bir bebekten kan alınması gibi bir işlem gerektirmesi bu ölçümün doğruluğunu, duyarlılığını oldukça düşürmektedir. Yeni doğanlarda bu ölçüm için genellikle topuk kanı alınarak bir kağıda emdirilmekte ve bu numune Phe tayini için donanımlı merkezlere gönderilmektedir. Bu süreç tespit için uzmalara ve bazı karışıklıklara yol açabilmektedir. Ayrıca oldukça donanımlı laboratuvar gerektirmektedir. Özellikle analiz için Tandem kütle spektroskopisi kullanılmaktadır. İlgili analiz pahalı bir donanım gerektirdiği gibi çok adımlı bir örnek hazırlama prosedürü ve deneyimli personel ihtiyacı gerektirmektedir. Bu analizin daha düşük maliyetlerde daha duyarlı ve tekrarlanabilir yapılabilmesi için elektrokimyasal sensörler oldukça önemli bir alternatiftir. Özellikle spesifik modifiye edilmiş elektrotlar ile çok kısa sürelerde çok düşük derişimlerde ve tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlar elde edilebilir. Bu nedenle bu tez kapsamında iki farklı elektrot hazırlama yöntemi kullanılarak Phe sensörleri hazırlanmıştır. Birinci yöntemde bir elektropolimerizasyon tekniği kullanılarak PTSA temelli polimerik filmler hazırlanmış ve moleküler baskılı Phe sensörleri elde edilmiştir. Moleküler baskılama yöntemi sırasında öncelikle Phe gruplarının polimerik film yapısına hapsedilmesi ve asit kullanılarak elektrot yüzeyinden desorpsiyon adımları gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen tüm aşamalar SEM yüzey analizi tekniği ile görüntülenmiştir. Kaplanmamış Pt elektrot yüzeyi oldukça düzgün ve pürüzsüz iken PTSA temelli polimer kaplı elektrotlar yüzey pürüzlülüğü açısından belirgin bir değer almıştır. Phe desorpsiyonu sonrası ise yüzeyde gözeneklilik ve oldukça yüksek bir yüzey alanı elde edilmiştir. Artan yüzey alanı Phe yanıtlarının da artmasına yol açmıştır. Moleküler baskılama yöntemi ile elde edilen elektrotlar 2-2000 μM L-Phe derişim aralığında $R^2=0.9997$ değeri göstermiştir. L-Phe seçici moleküler baskılanmış sensörün tayin sınırı (LOD) 0.59 μM ve kantitasyon tayin sınırı (LOQ) 1.77 μM olarak hesaplanmıştır. Aynı modifiye elektrot ile ardışık 10 ölçüm sonrası, ilk üç tekrarda %90.2 on tekrarda %60.6 kararlılık sergileyip %RSD değerinin üç tekrar için %9.8 ve on tekrar için %39.4 olduğu görülmüştür. 20 tane elektrot modifiye edilmiş ve her biri ile ayrı ayrı

ölçüm yapılmıştır ve birinci elektrot ile yirminci elektrot arasında %92.8 kararlı sonuç elde edilmiştir ve %RSD değerinin %7.20 olduğu gözlenmiştir.

Phe tayini için elektrot hazırlamak amacı ile ikinci bir yöntem olarak kimyasal modifikasyon yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntem dahilinde Phe'nin elektrot yüzeyindeki kümülasyonunu artıracak GUM temelli poliüretan yapıları sentezlenmiştir. GUM yapısı %1, %5 ve %10 oranlarında kullanılarak polimer yapısı çeşitlendirilmiştir. Her üç polimer yapısı da Pt elektrot yüzeyinde kaplanarak Phe yanıtlarına etkileri incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlara göre; Phe için en yüksek pik akımı GUM-PU-%10 polimer kaplı elektrot ile elde edilmiştir. Bu elektrota ait yapılan optimizasyon sonuçlarında 200-1000 μM L-Phe derişim aralığında R^2 0.9972 değeri elde edilmiştir. L-Phe seçici kimyasal modifikasyon ile hazırlanmış sensörün tayin sınırı (LOD) 48.01 μM ve kantitasyon tayin sınırı (LOQ) 144.02 μM olarak hesaplanmıştır. Aynı modifiye elektrot ile ardışık 10 ölçüm yapılmış ve birinci elektrot ile onuncu elektrot arasında %98.8 kararlı sonuç elde edildiği ve %RSD değerinin %1.21 olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar ışığında literatür ile hazırlanan sensörlerin sonuçları kıyaslandığında R^2 değeri olarak 0.9997 sonucu elde edilmiş ve oldukça yüksek bir doğrusallık sağlanmıştır. Lineer ölçüm aralığı olarak da oldukça geniş bir aralık elde edilmiştir. PKU hastalığı sırasında kanda bulunan Phe düzeyi normal düzeyi olan 0.1014-1.014 mM üzerine çıkmaktadır. Hazırladığımız sensörler ölçüm aralığı olarak bu değerleri oldukça yüksek doğruluk ve duyarlılıkta ölçmektedir.

Literatürde Phe tayini için NIR, Kemilüminesans, spektroskopi, amperometri, voltametri ve HPLC teknikleri kullanılmaktadır [71-80]. Yaygın kullanılan bu tekniklere ait bazı önemli sonuçlar Çizelge 5.1 de gösterilmiştir. Bu çizelge dahilinde Cristina Quintelas ve arkadaşları NIR tekniği kullanarak 0.9203 R^2 değeri ile Phe tayini yapmışlardır [71]. Farklı bir teknik kullanarak Leman Tarhan ve arkadaşları akış enjeksiyon spektrofotometri tekniği kullanmış 4×10^{-6} M LOD değeri ve 0.991 R^2 değeri ile Phe tayini gerçekleştirmiştir [78]. Amperometri, voltametri, DPV ve CV teknikleri ile de Phe tayinleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir [72-77,79]. Tüm bu teknikler değerlendirildiğinde tez kapsamında hazırlanan her iki yöntem ile elde edilen Phe

sensörünün oldukça başarılı sonuçlar verdiği ve literatürle uyumlu olduğu hatta bazı tekniklere göre üstünlüklere sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 5.1. Fenilalanin tayininde kullanılan tekniklerin karşılaştırılması

Yöntem	Doğrusal Aralık, M	LOD, M	R ²	Referans
NIR	-	1.16×10 ⁻⁴	0.9203	[71]
DPV (MIP/β-CD-MWNTs/PAN/CE)	5.0×10 ⁻⁷ -1.0×10 ⁻⁴	1.0×10 ⁻⁹	0.971	[72]
Amperometri	0-6×10 ⁻³	-	0.993	[73]
MIP-CL	1.3×10 ⁻⁶ -5.44×10 ⁻⁴	6.23×10 ⁻⁷		[74]
Lineer Taramalı Voltametri	100-1000×10 ⁻⁹	14.5×10 ⁻⁹	0.9657	[75]
Amperometri	50×10 ⁻⁶ -9.1×10 ⁻³	25×10 ⁻⁶	0.997	[76]
Dönüşümlü Voltametri	20×10 ⁻⁶ -3.0×10 ⁻³	15×10 ⁻⁶	0.999	[77]
Flow-Injection Spektrofotometri	5×10 ⁻⁶ -600×10 ⁻⁶	4×10 ⁻⁶	0.991	[78]
Dönüşümlü Voltametri	0.5×10 ⁻³ -6×10 ⁻³	0.5×10 ⁻⁶	0.995	[79]
HPLC	100-16000×10 ⁻⁶	-	0.999	[80]
MIP- DPV	2-2000 ×10 ⁻⁶	0.59×10 ⁻⁶	0,9997	Bu çalışma
GUM-PU-%10 DPV	200-1000 ×10 ⁻⁶	48.0×10 ⁻⁶	0,9972	Bu çalışma

NIR: Yakın infrared spektroskopisi

β-CD–MWNTs/PAN/CE: β-siklodekstrin içeren, çok duvarlı karbon nanotüp ve baskılı sol-jel film

MIP-CL: moleküler baskılanmış polimer-kemiluminesans

Sonuç olarak iki farklı teknik kullanılarak doğruluğu, duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği yüksek Phe sensörleri başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. İleri çalışmalarda farklı elektropolimerik yapılar kullanılarak moleküler baskımala yöntemi dahilinde sensör tasarımları gerçekleştirilebilir. Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) gibi katkıları kullanılarak sensör duyarlılığı artırılmış, tayin süresi kısaltılmış ve LOD değeri daha düşük sensörler tasarlanabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] **Orhan G., Aykut O., Çulha C., Cesaretli Y. Irmak H.** (10-12 Ekim 2012). Tıbbi Amaçlı Beslenme Ürünlerinde Fenilalanin Düzeyinin LC-MS/MS Yöntemi ile Belirlenmesi, Türkiye 11. Gıda Kongresi; Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, Sayfa 556.
- [2] **Demirci, Y.** (2006). *Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Rekombinant L-Fenilalanin Üretimi İçin Biyoproses Geliştirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [3] **Bilder, D. A. ve ark.** (Nisan, 2013). Psychiatric Symptoms in Adults with Phenylketonuria, *Molecular Genetics and Metabolism*.
- [4] **Förster, H.** (1993). Einfluß des Süßstoffs Aspartame auf den Appetit, *Aktuelle Ernährungsmedizin*, 18, 331-337.
- [5] **Sarkissian, C. N., Gamez, A.** (2005). Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Molecular Genetics and Metabolism*, 86, 22-23.
- [6] **Van Rijn M. ve ark.** (2007). Protein Metabolism in Adult Patients with Phenylketonuria, *Nutrition*, 23, 445-453.
- [7] **Cheong, W. J., Yang, S. H., Ali F.** (2013). Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews, *Journal of Separation Science*, 36, 609–628.
- [8] **Vasapallo, G. ve ark.** (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Perspective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5908-5945.
- [9] **Yola, M., L.,** Ezetimib'in Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Elektrokimyasal Yöntemlerle Farmasötik Preparatlardan Analizi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009
- [10] **Ralph H. Petrucci, William S. Harwood, F. Geoffrey Herring.** (2005). *Genel Kimya İlkeler ve Modern Uygulamalar*, Sekizinci Baskıdan çeviri.
- [11] **Elliot, W.H., Elliot D.C.** (2011). *Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, 34-37.
- [12] <https://docplayer.biz.tr/7809016-Marmara-universitesi-fen-edebiyat-fakultesi-kimya-bolumu-biyokimya-anabilim-dali.html>
- [13] **Daubner, S. C., Lea, T., Wang, S.** (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508, 1–12.
- [14] **Kılıç, N., Lehninger.** (2011). *Biyokimyanın İlkeleri*, (ed: Albert L. Lehninger), Palme Yayıncılık, Ankara, 628-648.

- [15] **Ermiş, N.** (2013). *L-Fenilalanin Tayini İçin Moleküler Baskılanmış Biyosensör Hazırlanması* (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara .
- [16] **Naghib, S.M., Rabiee, M. ve Omidinia, E.** (2014). Electrochemical Biosensor for L-phenylalanine Based on a Gold Electrode Modified with Graphene Oxide Nanosheets and Chitosan, *Int. J. Electrochem. Sci*, 9, 2341- 2353.
- [17] **Mo, X., Li, Y., Tang, A., Ren. Y.** (2013). Simultaneous Determination of Phenylalanine and Tyrosine İnperipheral Capillary Blood by HPLC with Ultraviolet Detection, *Clinical Biochemistry*, 46,1074–1078.
- [18] **Sarıboğa, B.** (2008). *Fenilketonüri (PKU) Teşhisinde Potansiyometrik Biyosensörler Geliştirilmesi* (Doktora Tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [19] **Stred'anský, M., Labuda, J.** (2014). Biosensor With L-Phenylalanine Dehydrogenase and Diaphorase Immobilized on Nanocomposite Electrode For The Determination of L-Phenylalanine In Urine, *Естественные науки*, Том 156, кн. 3.
- [20] **Williams, R.A., Mamotte, C.D., Burnett, J.R.** (2008). Phenylketonuria: an inborn error of phenyl-alanine metabolism, *Clin. Biochem. Rev*, vol. 29, no. 1, pp. 31–41.
- [21] **Sendecka, E., Cabalska, B.** (2001). Standardy rozpoznawania i leczenia fenylketonuri, *Medycyna Wieku Rozwojowego*, vol. 5, no. 1, pp. 77–94.
- [22] **Bangaleh, Z., Sadeghi, H. B., Ebrahimi, S.A. ve Najafizadeh, P.** (2019). A New Potentiometric Sensor for Determination and Screening Phenylalanine in Blood Serum Based on Molecularly Imprinted Polymer, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18 (1): 61-71.
- [23] **Matalon, R., Michals, K.** (1991). *Clin. Biochem*, 24, 337.
- [24] **Hanley, W.B., Clarke, J.T.R., Schoonheydt, W.** (1987). *Clin. Biochem*, 20,149.
- [25] **Mitchell, J.J., Trakadis, Y.J., Scriver, C.R.** (2011). Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet. Med*, 13:697–707.
- [26] **Guthrie, R., Susi, A.** (1963). A simple Phenylalanine method for detecting Phenylketonuria in large population of newborn infants, *Pediatrics*, 32:338–43.
- [27] **Pandor, A., Eastham, J., Beverley, C., Chilcott, J., Paisley, S.** (2004) Clinical effectiveness and cost effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry, *Health Technol. Assess*, 8:1–121.
- [28] **Williams, RA., Mamotte, C.D.S., Burnett, J.R.** (2008). Phenylketonuria: an inborn error of Phenylalanine metabolism, *Clin. Biochem. Rev*, 29:31–41.
- [29] **Haupt, K., Mosbach, K.** (2000). Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors, *Chem. Rev*, 100: 2495-504.

- [30] **Alizadeh, T., Akhoundian, M.** (2010). A novel potentiometric sensor for promethazine based on a molecularly imprinted polymer (MIP): The role of MIP structure on the sensor performance, *Electrochim. Acta*, 55:3477–85.
- [31] **Liang, R., Zhang, R., Qin, W.** (2009). Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymers for determination of melamine in milk, *Sens. Actuators B Chem*, 141:544–50.
- [32] **Saber, T.M., Vardini, M.T., Abroomand, A.P., Husain, S.W.** (2010). Molecularly imprinted polymer based PVC-membrane-coated graphite electrode for the determination of Metoprolol, *J. Iran. Chem. Soc*, 7:759–69.
- [33] **Sadeghi, S., Fathi, F., Abbasifar, J.** (2007). Potentiometric sensing of Levamisole hydrochloride based on molecularly imprinted polymers, *Sens. Actuators B Chem*, 122:158–64.
- [35] **Bagheri, S. H., Ebrahimi, S.A., Tamaddon, A., Bozorgvar, F., Affifinia, H., Almasian, N., Mollaei, S.** (2011). Potentiometric sensing of Lamotrigine based on molecularly imprinted polymers, *Electroanalysis*, 23:2716–23.
- [35] **Chen, Y., Chen, L., Bi, R., Xu, L., Liu, Y.** (2012). A potentiometric chiral sensor for L-phenylalanine based on crosslinked polymethylacrylic acid-polycarbazole hybrid molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta*, 754:83–90.
- [36] **Polyakov, M.V.** (1931). Adsorption properties and structure of silica gel, *Zhur. Fiz. Khim*, 2: 799-805.
- [37] **Takagishi, T., Klotz, M.** (1972). Macromolecule-small molecule interactions: introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages, *Biopolymers*, 11; 483-491.
- [38] **Wulff, G., Sarhan, A.** (1972). Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates, *Angew Chem Int Ed Engl*, 11: 3-341
- [39] **Wulff, G., Grobe, E. R., Sarhan, A.** (1977). Enzyme-analogue built polymers, on the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers, *Macromol. Chem*, 178: 2817-2825.
- [40] **Arshady, R., Mosbach, K.** (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Macromol. Chem*, 182: 687-692.
- [41] **Ahmad, O.S., Bedwell, T.S., Esen, C., Cruz, A.G., Piletsky, A.S.** (2019). Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors, *Trends in Biotechnology*, Vol. 37, No. 3.
- [42] **Cieplak, M., Kutner, W.** (2016). Artificial Biosensors: How Can Molecular Imprinting Mimic Biorecognition?, *Trends in Biotechnology*, Vol. 34, No. 11.
- [43] **Yu, X., Liu, H., Diao, J., Sun, Y., Wang, Y.** (2018). Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for separating aromatic amines from azo dyes – Synthesis, characterization and application, *Separation and Purification Technology*, 204 ,213–219.

- [44] **Kuş H.**, (2013). *Moleküler Baskılanmış Polimerler ve Uygulamaları* (Bitirme Tezi). Erciyes Üniversitesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Kayseri.
- [45] **Ermış N., Uzun L., Denizli A.** (2017). Preparation of molecularly imprinted electrochemical sensor for Lphenylalanine detection and its application, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 807, 244–252.
- [46] **Özgür, E.**, (2011). *Östradiol Tayini İçin Moleküler Baskılanmış Sensörlerin Hazırlanması* (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [47] **Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z.** (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and Characterization, *Journal of Chromatography B*, 804, 173–182.
- [48] **Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H.** (2003). Molecular Imprinting , *From Fundamentals To Applications*, Wiley-VCH Verlag.
- [49] **Shea, K.J., Dougherty, T.K.** (1986). Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on theeffectiveness of molecular recognition, *J. Am. Chem. Soc*, 108: 1091.
- [50] **Molinelli, A.** (2004). Molecular imprinted polymers: Towards a rational understanding of biomimetic materials, Georgia institute of technology. In partial fulfillment of the requirement for the degree doctor of philosophy in chemistry.
- [51] **Ikegami, T., Mukawama, T., Nariai, H., Takeuchi T.** (2004). Bisphenol Arecognition polymers prepared by covalent molecular imprinting, *Analytica Chimica Acta*, 504: 131-135.
- [52] **Kriz, D., Ramstrom, O., Mosbach, K.** (1997). Molecular imprinting: newpossibilities for sensor technology, *Anal. Chem*, 69: 345-349.
- [53] **Sellergren, B., Lepistö, M. ve Mosbach, K.** (1988). Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions NMR and chromatographic studies on the nature of recognition, *J. Am. Chem. Soc*, 110: 5853–5860.
- [54] **Caro, E., Masqué, N., Marcé, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C.** (2002). Noncovalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples, *J. Chromatogr. A*, 963: 169–178.
- [55] **Steinke, J., Sherrington, D., Dunkin, I.** (1995). Imprinting of synthetic polymers using molecular templates, *Adv. Polym. Sci*, 123: 80-125.
- [56] **Vlatakis, G., Andersson, L.I., Muller, R., Mosbach, K.** (1993). Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, 361, 645-647.
- [57] **Nishide, H., Deguchi, J., Tsuchida, E.** (1977). Adsorption of metal ions oncrosslinked poly(4-vinylpyridine) resins preparedwith a metal ion as template, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed*, 15: 3023–3029.

- [58] **Ersöz, A., Denizli, A., Özcan, A., Say, R.** (2005). Molecularly Imprinted Ligand-Exchange Recognition Assay of Glucose by Quartz Crystal Microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (11): 2197-2202.
- [59] **Katz, A., Davis, M.E.** (1999). Investigations into the Mechanisms of Molecular Recognition with Imprinted Polymers, *Macromolecules*, 32: 4113-4121.
- [60] **Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Lui, S.X., Wang, N.** (2002). Separation of ephedrine stereoisomers by molecular imprinted polymers influence of synthetic condition and mobile phase compositions on the chromatographic performance, *Analyst*, 127: 1427-1432.
- [61] **Çekirdek, P.** (2005). *Voltametrik Metotlarla Ditiyofosfonat Anyonlarının Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi* (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [62] **Wang, J.** (2006). *Analytical Electrochemistry*, 3rd Ed. Wiley-VCH.
- [63] Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry. P.T. Kissinger and W.R. Heineman (Eds). **Dekker M.**, 1984
- [64] Handbook of Electrochemistry. Elsevier, **Zoski C.G.** (Ed)., 2007
- [65] Fundamentals of Electroanalytical Chemistry. **Monk, P.** John Wiley & Sons, 2002
- [66] Analytical Electrochemistry. Basic Concepts and Experiments. **Kelly R.S.**
- [67] Instruction Manuel for BASi Epsilon for Electrochemistry. Version 2.10.73, 2000-2009 Bioanalytical Systems Inc.
- [68] **Titretir, S.** (2001). *Polimerlerle Modifiye Edilmiş Civa Film Elektrotların Biyolojik ve Çevre Örneklerindeki İz Metallerin Sıyırma Analizi İçin Kullanımı* (Doktora Tezi), İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- [69] **Çekirdek, P.** (2005). *Voltametrik Metotlarla Ditiyofosfonat Anyonlarının Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi* (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [70] **Barker, G. C., Jenkins, I. L.** (1952). Square Wave Polarography, *Analyst*, 77;685.
- [71] **Quintelas, C., Braga, A., Mesquita, D.P., Amaral, A.L., Ferreira, E.C., Belo, I.** (2019). NIR spectroscopy applied to the determination of 2-phenylethanol and L-phenylalanine concentrations in culture medium of *Yarrowia lipolytica*, *J Chem Technol Biotechnol*, 94: 812–818.
- [72] **Hu, Y., Zhang, Z., Zhang, H., Luo, L., Yao, S.** (2011). Electrochemical determination of l-phenylalanine at polyaniline modified carbon electrode based on -cyclodextrin incorporated carbon nanotube composite material and imprinted sol-gel film, *Talanta*, 84, 305–313.

- [73] **Naghib, S.M., Rabiee, M., Omidinia, E., Khoshkenar, P., Zeini, D.** (2012). Biofunctionalization of Dextran-Based Polymeric Film Surface through Enzyme Immobilization for Phenylalanine Determination, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7, 120-135.
- [74] **Qiu, H., Xi, Y., Lu, F., Fan, L., Luo, C.** (2012). Determination of L-phenylalanine on-line based on molecularly imprinted polymeric microspheres and flow injection chemiluminescence, *Spectrochimica Acta Part A* 86, 456–460.
- [75] **Omidinia, E., Shadjou, N., Hasanzadeh, M.** (2013). (Fe₃O₄)-graphene oxide as a novel magnetic nanomaterial for non-enzymatic determination of phenylalanine, *Materials Science and Engineering C* 33, 4624–4632.
- [76] **Villalonga, R., Fujii, A., Shinohara, H., Tachibana, S., Asano, Y.** (2008) Covalent immobilization of phenylalanine dehydrogenase on cellulose membrane biosensor construction, *Sensors and Actuators B* 129, 195–199.
- [77] **Villalonga, R., Fujii, A., Shinohara, H., Tachibana, S., Asano, Y., Roberto Cao, R., Tachibana, S., Ortiz, P.** (2007). Supramolecular-mediated immobilization of L-phenylalanine dehydrogenase on cyclodextrin-coated Au electrodes for biosensor applications, *Biotechnol Lett*, 29:447–452.
- [78] **Tarhan, L., Kayali, H.** (2011). Immobilization of Phenylalanine Dehydrogenase and Its Application in Flow-Injection Analysis System for Determination of Plasma Phenylalanine, *Appl Biochem Biotechnol*, 163:258,267.
- [79] **Naghib, S.M., Rabiee, M., Omidinia, E., Khoshkenar, P.** (2012). Investigation of a Biosensor Based on Phenylalanine Dehydrogenase Immobilized on a Polymer-Blend Film for Phenylketonuria Diagnosis, *Electroanalysis*, 24, No. 2, 407-417.
- [80] **Mihali, C.V., Petrescu, M.C., Mândruțiu, I., Bechet, D., Nistor, T.V., Turcuș, V., Ardelean, A., Benga, G.** (2017). Comparison of Plasma Phenylalanine Determination by Densitometry of Thin-Layer Chromatograms and by High Performance Liquid Chromatography in Relation with the Screening of Phenylketonuria, *Acta Endocrinologica (Buc)*, vol. XIII, no. 2, p. 203-208.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Funda ALIŞIK
Doğum Tarihi ve Yeri : 02/10/1989 MALATYA
E-posta : kmygr_funda@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

Lisans : 2011, İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
: 2017, Anadolu Üniversitesi, İktisat Fakültesi, Kamu Yönetimi Bölümü

MESLEKİ DENEYİM:

2013 yılından itibaren Maliye Bakanlığında çalışmakta

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN ÇALIŞMALAR:

Poster: Preparation of Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor for Phenylalanine Detection. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research&Development (DRD 2019), Temmuz 2019, Malatya-TÜRKİYE