

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI İLETKEN POLİMERİK NANOKOMPOZİT MODİFİYE
ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI VE DNA BAZ TAYİNİNDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ**

SEZEN KURŞUN AYAZLI

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

AĞUSTOS 2016

Tezin Başlığı: **Bazı İletken Polimerik Nanokompozit Modifiye Elektrotların Hazırlanması ve DNA Baz Tayininde Kullanılabilirliğinin İncelenmesi**

Tezi Hazırlayan: **Sezen KURŞUN AYAZLI**

Sınav Tarihi : **19.08.2016**

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. Ergun EKİNCİ**

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Kadir DEMİRELLİ

Fırat Üniversitesi

Prof. Dr. Burhan ATEŞ

İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Süleyman KÖYTEPE

İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Esin KAYA

Muş Alparslan Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim ADIGÜZEL

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum “**Bazı İletken Polimerik Nanokompozit Modifiye Elektrotların Hazırlanması ve DNA Baz Tayininde Kullanılabilirliğinin İncelenmesi**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dűşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bűtűn kaynakların hem metin içinde hem de kaynaklarda yűntemine uygun biçimde gűsterilenlerden olduğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Sezen KURşUN AYAZLI



Oğlum Alp Aslan'a

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI İLETKEN POLİMERİK NANOKOMPOZİT MODİFİYE ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI VE DNA BAZ TAYİNİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

Sezen KURŞUN AYAZLI

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

xiii + 95 sayfa

2016

Danışman: Prof. Dr. Ergun EKİNCİ

Kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotlar, çeşitli organik ve inorganik modifiye edicilerin elektrot yüzeyine yerleştirilmesi ile elde edilirler. Modifiye edilmiş elektrotlar voltametrik, amperometrik ve potansiyometrik sensörler olarak analitik tayinlerde hassasiyetin, seçiciliğin veya kararlılığın artırılması amacı ile tasarlanırlar. Bu çalışmada, anilin, *N*-metil pirol ve anilin-2-sülfonik asit monomerleri ile altın nanoparçacıkları kullanılarak çevrimli voltametri ile, camı karbon elektrot yüzeyinde elektropolimerik nanokompozit elektrotlar hazırlanmıştır. Hazırlanan altın nanoparçacık modifiye polianilin, poli(*N*-metil pirol) ve poli(anilin-2-sülfonik asit) kompozit elektrotların guanin, adenin, dopamin ve ürik asite karşı elektrokatalitik etkisi DPV tekniği ile incelenmiştir.

Daha sonra, elektropolimerik nanokompozit elektrotların sensör karakteristiklerini etkileyen parametreler (polimerik film kalınlığı, monomer, destek elektrolit, altın nanoparçacık derişimi, altın nanoparçacıklarının film kalınlığı ve pH) sistematik olarak optimize edilmiştir. Optimize sensörlerin kararlılık testleri nano-Au/PA/GCE ve nano-Au/PNMPy/GCE 90 gün, nano-Au/PASA/GCE ise 60 gün süre kararlı olduğunu göstermiştir. Balık sperm DNA'daki baz oranları standart katma yöntemi ile belirlenmiştir. G/A oranı nano-Au/PA/GCE için % 1,74, nano-Au/PASA/GCE için % 1,36 hata ile hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Anilin, *N*-metil pirol, Anilin-2-sülfonik asit, Guanin, Adenin

ABSTRACT

PhD. Thesis

PREPARATION OF CONDUCTING NANO COMPOSITE ELECTRODES AND EXAMINATION OF AVAILABILITY IN DNA BASE ANALYSIS

Sezen KURŞUN AYAZLI

İnönü University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

xiii + 95 pages

2016

Supervisor: Prof. Dr. Ergun EKİNCİ

Chemically modified electrodes have been obtained by immobilization of various organic and inorganic modifiers on the electrode surface. Modified electrodes are designed to aim for the improvement of stability, sensitivity and selectivity in analytical applications as voltammetric, amperometric and potentiometric sensors. In this work, electropolymeric nanocomposite electrodes have been prepared on glassy carbon electrode surface by using aniline, *N*-methylpyrrole, aniline-2-sulfonic acid monomers and gold nanoparticles with cyclic voltammetry. The electrocatalytic effect to guanine, adenine, dopamine and uric acid of prepared gold nanoparticle modified polyaniline, poly(*N*-methylpyrrole) and poly(aniline-2-sulfonic acid) composite electrodes has been investigated by DPV technique.

Then, the parameters affecting sensor characteristics (polymeric film thickness, monomer, supporting electrolyte, gold nanoparticle concentration, film thickness of gold nanoparticles and pH) of electropolymeric nanocomposite electrodes were systematically optimized. The stability tests of the optimized sensors indicated that nano-Au/PA/GCE ve nano-Au/PNMPy/GCE are stable at 90 days, nano-Au/PASA/GCE is stable at 60 days. The base ratios in fish sperm DNA were determined by standart addition method. The ratio of G/A was calculated with 1,74% error for nano-Au/PA/GCE and 1,36% error for nano-Au/PASA/GCE.

KEYWORDS: Aniline, *N*-Methylpyrrole, Aniline-2-sulfonic Acid, Guanine, Adenine

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca her konuda yardımlarını gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ergun EKİNCİ'ye;

Çalışmalarım sırasında fikirleri ile katkıda bulunan değerli tez izleme jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Burhan ATEŞ ve Sayın Doç. Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye;

Çalışmalarım süresince ilgi ve yardımlarını gördüğüm hocalarım Arş. Grv. Dr. Öznur GÜNGÖR ve Arş. Grv. Dr. Nilüfer KIVILCIM'a;

Doktora sürecine beraber başlayıp kader ortaklığı yaptığımız arkadaşım Arş. Grv. Ünzile KELEŞTEMUR'a;

Bu çalışmanın yapılmasında 2013/161 nolu proje ile maddi destek sağlayan İÜBAP'a

Bu süreçte gösterdikleri hoşgörü ve desteklerinden ötürü değerli eşim ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SEMBOL VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Elektrokimya.....	3
2.1.1. Voltametri ve voltametrik teknikler.....	3
2.1.1.1. Doğrusal taramalı voltametri.....	4
2.1.1.2. Diferansiyel puls voltametrisi (DPV).....	5
2.1.1.3. Kare dalga voltametrisi (SWV).....	6
2.1.1.4. Döngülü (çevrimli voltametri (CV).....	7
2.1.2. Voltametrik cihazlar.....	8
2.1.2.1. Voltametrizde kullanılan referans elektrotlar.....	8
2.1.2.2. Voltametrizde kullanılan çalışma elektrotları.....	9
2.2. Kütle Aktarımı.....	10
2.2.1. Difüzyon.....	10
2.2.2. Göç.....	11
2.2.3. Konveksiyon.....	11
2.3. Kimyasal Olarak Modifiye Edilmiş Elektrotlar.....	11
2.3.1. Kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotların hazırlanması.....	12
2.3.1.1. Fiziksel tutunma esaslı modifiye elektrotlar.....	12
2.3.1.2. Kimyasal tutunma esaslı modifiye elektrotlar.....	13
2.3.1.3. Kovalent bağlı modifiye elektrotlar.....	13
2.3.1.4. Homojen çoklu tabaka modifiye elektrotlar.....	13
2.3.1.5. Heterojen çoklu tabaka modifiye elektrotlar.....	13
2.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon.....	13
2.5. Kimyasal Sensörler.....	15

2.5.1.	Kimyasal sensörlerin sınıflandırılması.....	16
2.5.2.	Elektrokimyasal sensörler.....	16
2.6.	Nükleik Asitler ve DNA.....	17
2.6.1.	DNA moleküllerinin sulu çözeltilerdeki özellikleri.....	18
2.6.2.	Nükleik asitlerin elektrokimyası.....	19
2.7.	Eş Zamanlı Guanin ve Adenin Tayini Literatür Çalışmaları.....	20
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1.	Deneysel Araç ve Gereçler.....	23
3.1.1.	Elektrotlar.....	24
3.1.1.1.	Elektrotların temizliği.....	24
3.1.2.	Modifiye elektrotların hazırlanması.....	25
3.1.3.	Modifiye elektrotların analiz amaçlı kullanımı.....	26
3.1.4.	0,1 M Fosfat tamponunun hazırlanması.....	26
3.1.5.	DNA örneklerinin hazırlanması ve baz oranlarının hesaplanması.....	26
3.2.	Kimyasal Maddeler.....	27
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28
4.1.	Polianilin Altın Nanoparçacık Modifiye Elektrot.....	28
4.1.1.	Altın nanoparçacık modifiye polianilin elektrodun hazırlanması.....	29
4.1.2.	Film kalınlığının etkisi.....	31
4.1.3.	Monomer derişiminin etkisi.....	34
4.1.4.	Polimerizasyon ortamındaki destek elektrolit derişimi etkisi.....	37
4.1.5.	Altın nanoparçacık kalınlığının etkisi.....	40
4.1.6.	HAuCl ₄ derişimin etkisi.....	43
4.1.7.	Guanin Yanıtı Üzerine pH Etkisi.....	45
4.1.8.	Guanin, adenin, ürik asit ve dopaminin eşzamanlı tayini.....	47
4.1.9.	Kararlılık.....	49
4.1.10.	DNA örnekleri.....	50
4.2.	Altın Nanoparçacık Modifiye Poli(<i>N</i> -Metil pirol) Camsı Karbon Elektrot.....	51
4.2.1.	Altın nanoparçacık modifiye poli(<i>N</i> -metil pirol) elektrodun hazırlanması.....	52
4.2.1	Kompozit film kalınlığının guanin yanıtına etkisi.....	54
4.2.2.	Monomer derişimi etkisi.....	56
4.2.3.	HAuCl ₄ derişimin etkisi.....	58
4.2.4.	Polimerizasyon ortamındaki destek elektrolit derişimi etkisi.....	60

4.2.5.	Guanin yanıtları üzerine pH etkisi.....	62
4.2.6.	Guanin, adenin, ürik asit ve dopaminin eşzamanlı tayini.....	64
4.2.7.	Kararlılık.....	67
4.2.8.	NanoAu/poli (N-Metil pirol)/GCE için DNA örnekleri.....	67
4.3.	Altın Nanoparçacık Modifiye Poli(anilin-2-sülfonik asit) Elektrot....	68
4.3.1.	Altın nanoparçacık modifiye poli(anilin-2-sülfonik asit) elektrodun hazırlanması.....	69
4.3.2.	Film kalınlığının etkisi.....	70
4.3.3.	Monomer derişiminin etkisi.....	72
4.3.4.	Polimerizasyon ortamındaki destek elektrolit derişiminin etkisi.....	74
4.3.5.	Altın nanoparçacık kalınlığının etkisi.....	76
4.3.6.	HAuCl ₄ derişimin etkisi.....	78
4.3.7.	pH etkisi.....	80
4.3.8.	Guanin, adenin, ürik asit ve dopaminin eşzamanlı tayini.....	81
4.3.9.	Kararlılık.....	83
4.3.10.	Optimum elektrodun DNA uygulaması.....	84
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	86
6.	KAYNAKLAR.....	90
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	94

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1.	Kullanılan kimyasal maddelerin alındığı firma isimleri.....	33
Tablo 4.1.	Guanin, adenin, dopamin ve ürik asit pik potansiyel ve pik akımlarının pH'la değişimi.....	47



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri.....	5
Şekil 2.2.	Kare Dalga Voltametrisi için potansiyel- zaman dalga şekli ve akım ölçümü.....	6
Şekil 2.3.	a) Çevrimli voltamogram, b) Çevrimli voltametrizde uyarma sinyali.....	7
Şekil 2.4.	Elektrokimyasal sensörün şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.5.	Guanin ve adenin yükseltgenme mekanizmaları	19
Şekil 3.1.	BAS 100W elektrokimyasal analizör.....	23
Şekil 3.2.	Mikro hücre ve montajı; A: yardımcı elektrot, W: çalışma elektrodu, R: referans elektrot	24
Şekil 4.1.	Polianilin/NanoAu/GC elektrodun şematik gösterimi	28
Şekil 4.2.	Anilinin elektrokimyasal polimerizasyon mekanizması için şematik gösterim	29
Şekil 4.3.	0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin çevrimli voltamogramı.....	30
Şekil 4.4.	PA/GCE yüzeyinde 0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde 2 mM H _{AuCl} ₄ çözeltisinin çevrimli voltamogramı.....	31
Şekil 4.5.	Nano-Au/PA/GC elektrodun PBS pH 7’de 100 µM adenin, guanin, ürik asit ve dopamine ayrı ayrı DPV yanıtları.....	31
Şekil 4.6.	0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin GCE yüzeyinde 4 çevrimlik voltamogramı.....	32
Şekil 4.7.	PA/GCE yüzeyinde 0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde 2 mM H _{AuCl} ₄ çözeltisinin 2 çevrimlik voltamogramı.....	32
Şekil 4.8.	20 mM anilin çözeltisinden (destek elektroliti 0,1 M KCl) a) 2, b) 4, c) 6, d) 8, e) 10 çevrim olarak hazırlanıp üzerine 2 mM H _{AuCl} ₄ çözeltisinden 2 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	33
Şekil 4.9.	Film kalınlığının guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.10.	0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin GCE yüzeyinde 4 çevrimlik voltamogramı.....	35
Şekil 4.11.	PA/GCE yüzeyinde 0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde 2 mM H _{AuCl} ₄ çözeltisinin 2 çevrimlik voltamogramı.....	35
Şekil 4.12.	0,1 M KCl içerisinde a) 10 mM, b) 15 mM, c) 20 mM, d) 25 mM, e) 30 mM anilin çözeltisinden hazırlanan nano-Au/PA/GC elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	36
Şekil 4.13.	Monomer derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.14.	0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin GCE yüzeyinde 4 çevrimlik voltamogramı.....	38
Şekil 4.15.	Polianilin/GCE yüzeyinde 0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde 2 mM H _{AuCl} ₄ çözeltisinin 2 çevrimlik voltamogramı.....	38

Şekil 4.16.	a) 0,025 M, b) 0,05 M, c) 0,1 M, d) 0,2 M, e) 0,4 M KCl içerisinde 25 mM anilin çözeltisinden hazırlanan nano-Au/PA/GC elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	39
Şekil 4.17.	Elektrolit derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.18.	0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin GCE yüzeyinde 4 çevrimlik voltamogramı.....	41
Şekil 4.19.	PA/GCE yüzeyinde 0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde 2 mM H ₂ AuCl ₄ çözeltisinin 6 çevrimlik voltamogramı.....	41
Şekil 4.20.	PA üzerine 2 mM H ₂ AuCl ₄ çözeltisinden a) 2, b) 4, c) 6, d) 8, e) 10 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	42
Şekil 4.21.	Çevrim sayısının guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.22.	PA film üzerine a) 1, b) 1,5, c) 2, d) 2,5, e) 3 mM H ₂ AuCl ₄ çözeltisinden 6 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	44
Şekil 4.23.	H ₂ AuCl ₄ derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.24.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun a) pH 4, b) pH 5, c) pH 6, d) pH 7, e) pH 8, f) pH 9'da 100 µM'lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışıma ait yanıtları.....	46
Şekil 4.25.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5'de 100 µM'lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan guanin derişim yanıtları.....	48
Şekil 4.26.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5'de 100 µM'lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan adenin derişim yanıtları.....	48
Şekil 4.27.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5'de 100 µM'lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan dopamin derişimi yanıtları.....	49
Şekil 4.28.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5'de 100 µM'lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan ürik asit derişim yanıtları.....	49
Şekil 4.29.	Optimize elektrodun kararlılığı.....	50
Şekil 4.30.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5'de a) zemin, b) 50µL ssDNA, c) 5 µM Guanin ve Adenin, d) 10 µM Guanin ve Adenin, e) 15 µM Guanin ve Adenin, f) 20 µM Guanin ve Adenin DPV yanıtları.....	51
Şekil. 4.31.	Altın nanoparçacık modifiye PNMPy elektrodun şematik gösterimi...	52
Şekil 4.32.	a) 0,2 M KCl içerisinde 30 mM <i>N</i> -metil pirol çözeltisinin GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı b) 0,2 M KCl içerisinde 30 mM <i>N</i> -Metil pirol ve 2 mM H ₂ AuCl ₄ içeren çözeltinin GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı.....	52
Şekil 4.33.	0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde 2 mM H ₂ AuCl ₄ çözeltisinin PNMPy/GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı.....	53

Şekil 4.34.	PBS pH 7’de 100µM Guanin yanıtı a) PNMPy filmin üzerine 0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde 2 mM HAuCl ₄ çözeltisinden 6 çevrimlik nano-Au kaplanarak hazırlanan GCE, b) 0,2 M KCl içerisinde 30 mM <i>N</i> -metil pirol ve 2 mM HAuCl ₄ çözeltisinden eşzamanlı olarak hazırlanan 6 çevrimlik GCE, c) 0,2 M KCl içerisinde 30 mM <i>N</i> -metil pirol çözeltisinden 6 çevrimlik hazırlanan GCE.....	54
Şekil 4.35.	0,2 M KCl içerisinde 30 mM <i>N</i> -Metil pirol ve 2 mM HAuCl ₄ çözeltisinden a) 2, b) 4, c) 6, d) 8, e) 10 çevrim olarak hazırlanan elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	55
Şekil 4.36.	Çevrim sayısının guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.37.	0,2 M KCl içerisinde a) 10, b) 20, c) 30, d) 40, e) 50 mM <i>N</i> -Metil pirol ve 2 mM HAuCl ₄ çözeltisinden 8 çevrimlik hazırlanan filmlerin 100 µM guanin yanıtları.....	57
Şekil 4.38.	Monomer derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.39.	0,2 M KCl içerisinde 30 mM, <i>N</i> -Metil pirol ve a) 1, b) 1,5, c) 2, d) 2,5 ve e) 3 mM HAuCl ₄ çözeltisinden 8 çevrimlik hazırlanan filmlerin 100 µM guanin yanıtları.....	59
Şekil 4.40.	HAuCl ₄ derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.41.	a) 0,1, b) 0,15, c) 0,2, d) 0,25 ve e) 0,3 M KCl içerisinde 30 mM, <i>N</i> -Metil pirol 1,5 mM HAuCl ₄ çözeltisinden 8 çevrimlik hazırlanan filmlerin 100 µM guanin yanıtları.....	61
Şekil 4.42.	Destek elektroliti derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	62
Şekil 4.43.	Optimize şartlarda hazırlanan nanokompozit elektrodun a) pH 4, b) pH 5, c) pH 6, d) pH 7, e) pH 8, f) pH 9’da 100 µM’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışıma ait DPV yanıtları.....	63
Şekil 4.44.	Optimize şartlarda hazırlanan nanokompozit elektrodun a) pH 4, b) pH 5, c) pH 6, d) pH 7, e) pH 8, f) pH 9’da 100 µM’lık guanin yanıtları...	64
Şekil 4.45.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 µM’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda a) 100, b) 200, c) 300, d) 400, e) 500µM guanin yanıtları.....	65
Şekil 4.46.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 µM’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan adenin derişim yanıtları.....	65
Şekil 4.47.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 µM’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan dopamin derişim yanıtları.....	66
Şekil 4.48.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 µM’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda a) 100, b) 200, c) 300, d) 400 ve e) 500 µM ürik asit yanıtları.....	66
Şekil 4.49.	Optimize elektrodun kararlılığı.....	67

Şekil 4.50.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de a) zemin, b) 50µL ssDNA, c) 5 µM Guanin ve Adenin, d) 10 µM Guanin ve Adenin, e) 15 µM Guanin ve Adenin, f) 20 µM Guanin ve Adenin, g) 25 µM Guanin ve Adenin DPV yanıtları.....	68
Şekil 4.51.	Altın nanoparçacık modifiye poli(anilin-2-sülfonik asit) elektrodun şematik gösterimi.....	69
Şekil 4.52.	30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinin (destek elektroliti 0,2 M KCl) GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı	69
Şekil 4.53.	0,5 M H ₂ SO ₄ içerisinde 2 mM HAuCl ₄ çözeltisinin PASA/GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı.....	70
Şekil 4.54.	a) 0,2 M KCl içerisinde 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 4 çevrim hazırlanan GCE’un, b) 0,2 M KCl içerisinde 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 4 çevrim hazırlanıp üzerine 2 mM HAuCl ₄ çözeltisinden 4 çevrim nano-Au kaplanan GCE’un 100 µM guanin yanıtları.....	70
Şekil 4.55.	0,2 M KCl içerisinde 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden a) 2, b) 4, c) 6, d) 8 ve e) 10 çevrim olarak hazırlanıp üzerine nano-Au kaplanan elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	71
Şekil 4.56.	Çevrim sayısının guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	72
Şekil 4.57.	0,2 M KCl içerisinde a) 6, b) 8, c) 10, d) 12, e) 14, f) 20 ve g) 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 8 çevrim olarak hazırlanıp üzerine nano-Au kaplanan elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	73
Şekil 4.58.	Monomer derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi.....	74
Şekil 4.59.	a) 0,1 M, b) 0,15 M, c) 0,2 M d) 0,25 M, e) 0,3 M KCl içerisinde 10 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 8 çevrim olarak hazırlanıp üzerine nano-Au kaplanan elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	75
Şekil 4.60.	Destek elektrolit derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi	76
Şekil 4.61.	PASA film üzerine 2 mM HAuCl ₄ çözeltisinden a) 2, b) 4, c) 6, d) 8, e) 10 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun 100 µM guanin yanıtları....	77
Şekil 4.62.	Guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtı üzerine çevrim sayısının etkisi.....	78
Şekil 4.63.	PASA film üzerine a) 1 mM, b) 1,5 mM, c) 2 mM, d) 2,5 mM, e) 3 mM HAuCl ₄ çözeltisinden 6 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun 100 µM guanin yanıtları.....	79
Şekil 4.64.	Guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine HAuCl ₄ derişiminin etkisi.....	80
Şekil 4.65.	Optimize elektrodun a) pH 3, b) pH 4, c) pH 5, d) pH 6, e) pH 7, f) pH 8, g) pH 9’da 100 µM’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışıma ait DPV yanıtları.....	81
Şekil 4.66.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4’de 100 µM’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan guanin derişim yanıtları.....	82

Şekil 4.67.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4’de 100 μ M’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan adenin derişim yanıtları.....	82
Şekil 4.68.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4’de 100 μ M’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan dopamin derişim yanıtları.....	83
Şekil 4.69.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4’de 100 μ M’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan ürik asit derişim yanıtları.....	83
Şekil 4.70.	Optimize elektrodun kararlılığı.....	84
Şekil 4.71.	Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4’te a) zemin, b) 50 μ L ssDNA, c) 5 μ M, d) 10 μ M, e) 15 μ M, f) 20 μ M g) 25 μ M Guanin ve Adenin DPV yanıtları.....	85



SEMBOL VE KISALTMALAR

CME	Kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot
CV	Çevrimli voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
E	Elektrot potansiyeli
E_p	Pik Potansiyeli
E_{1/2}	Yarı dalga potansiyeli
F	Faraday sabiti
i	Akım
M	Molar derişim
μA	Mikro Amper
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
τ	Periyot
f	Frekans
PA	Polianilin
PASA	Poli(anilin-2-sülfonik asit)
PNMPy	Poli(N-metil pirol)

1. GİRİŞ

DNA kalıtsal bilgiyi saklayan ve protein biyosentezinde önemli rol oynayan, nükleotit birimlerinden oluşan bir makromoleküldür. Yaşam için önemli rol oynayan guanin (G) ve adenin (A), DNA'da bulunan iki önemli pürin bazıdır. Guanin ve adeninin, koroner ve serebral döngü, kan akışının kontrolü, kalp aritmilerini önleme, nörotransmitter salınımını önleme ve adenilsiklaz aktivitesini düzenleme gibi yaygın etkileri vardır [1-2]. Bu bazların konsantrasyonu kanser ve AIDS gibi farklı hastalıkların tanısal belirleyicisi olarak kullanılır [3].

Dopamin (DA) en önemli katekolaminlerden birisidir. Böbrek, merkezi sinir sistemi ve hormonal sistemin işlevselliğinin sağlanmasında önemli bir rol oynar. Dopamin seviyesindeki aşırı anormallikler Parkinson, şizofreni ve Huntington hastalığı gibi birçok hastalığın belirleyicisidir [4]. Modifiye edilmemiş elektrotlarda çakışan yükseltgenme potansiyeline sahip ürik asit gibi interferansların varlığı, gerçek örneklerdeki dopaminin elektrokimyasal olarak belirlenmesinde temel sorundur. Ürik asit (UA) insanlarda pürin yıkım mekanizmasının son yükseltgenme ürünüdür. Serum ve ürin gibi vücut sıvılarındaki ürik asit seviyesi hiperrusima, gout ve Lesh-Nyansendromu gibi birçok hastalığın belirleyicisidir [5,6]. Serum ve aurin gibi fizyolojik sıvılarda DA, UA, A ve G birlikte bulunurlar. Bu nedenle; DA, UA, G ve A'nin eş zamanlı tayini için duyarlı ve seçici bir metot geliştirilmesi biyomedikal kimyada oldukça önemlidir. Bundan önceki çalışmalar bu dört türden ikisinin eş zamanlı tayini üzerine odaklanmıştır [1,7,8,9,37].

Nükleik asitlerdeki pürin bazlarının tayini için sıvı kromatografisi ya da elektroforez ile birleştirilmiş belirleme yöntemleri kullanılır. Bu yöntemlerde; ölçümlerin zaman alıcı olması, karmaşık cihazlar ve örneklerin ön hazırlık gerektirmesi gibi dezavantajlar yüzünden sıkıntılar yaşanmaktadır [8]. Hızlı, ucuz ve güvenli analize olanak sağladıkları için elektrokimyasal yöntemler kullanışlıdır [9]. Ancak çıplak elektrotlarda çakışan yükseltgenme potansiyelleri ve elektrot yüzeyinin kirlenmesine bağlı olarak ortaya çıkan zayıf tekrarlanabilirlik bu dört türün eşzamanlı tayinini zorlaştırmaktadır. Bu sorunu giderebilmek için; polimer, tek katmanlı tabaka, nanomateriyal, nanoparçacık ve metal oksit modifiye elektrotlar kullanılmıştır [7]. Metal nanomateriyallerin elektrot yüzeyinden kolayca düşmeleri, bunların sensör ve biyosensör uygulamalarında doğrudan kullanımlarını

kısıtlamaktadır. Metal nanomateriyallerin iletken polimer membranlara katkılanması elektronik, sensör ve kataliz uygulamalarında oldukça etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır [10].

Yapılan bu çalışmada; altın nanoparçacıkların anilin, *N*-metil pirol ve anilin-2-sülfonik asit monomerleriyle camı karbon elektrot yüzeyinde eş zamanlı polimerizasyon veya polimerik film üzerine CV yöntemiyle kaplanması suretiyle nanokompozit elektrotlar hazırlanmıştır. Hazırlanan kompozit elektrotların dopamin, ürik asit, guanin ve adenine karşı elektrokatalitik etkileri DPV tekniği ile incelenmiş, hazırlanan nanokompozit elektrodun optimizasyonu (film kalınlığı, monomer derişimi, destek elektrolit derişimi, altın nanoparçacık kalınlığı, altın nanoparçacık derişimin etkisi, pH) ise en yüksek guanin yanıtına göre yapılmıştır. Optimize elektrotların 90 gün süreyle kararlılıkları incelenmiştir. Optimum şartlarda hazırlanan nanokompozit elektrotların fish sperm DNA'dan elde edilen ss-DNA'ya karşı yanıtları DPV tekniği ile belirlenmiş ve DNA dizinindeki guanin / adenin oranı bulunmuştur.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Elektrokimya

Maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesi ve bunun sonucunda ortaya çıkan kimyasal dönüşümlerle fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine dönüşümünü inceleyen bilim dalına elektrokimya denir. Elektrokimyasal tepkimelerde elektron transferi veya geçişi söz konusudur yani yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir. Elektrokimyasal olaylar, elektrokimyasal hücre adı verilen bir düzenek yardımıyla yürütülür. Elektrokimyasal hücre, incelenen maddeyi içeren bir çözelti ya da erimiş tuz, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrotlar ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir dış devreden oluşur [11].

2.1.1. Voltametri ve Voltametrik Teknikler

Elektrokimyasal hücrede, elektrot çözelti sistemine bir elektriksel uyarı yapılarak sistemin verdiği yanıt ölçülür. Genel olarak elektrokimyasal tekniklerde potansiyel, akım ve zaman parametreleri bulunur. Bu parametreler ilgili elektrokimyasal tekniğin adını belirler. Örneğin, kronoamperometride akım-zaman, voltametride akım-potansiyel parametreleri bulunmaktadır.

Çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik yöntemlere voltametri denir. Uygulanan gerilime karşı ölçülen akım değerlerinin grafiğine ise voltamogram denir.

Voltametrik ölçümler, çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında gerçekleştirilir. Polarizasyonu artırmak için ise yüzey alanı birkaç milimetre kare olan mikroeletrotlar kullanılır. Voltametride bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları, kullanılan çalışma elektroduna, kullanılan çözücü ve elektrolit türlerine bağlıdır. Örneğin, hücrede kullanılan karşılaştırma elektrodu doymuş kalomel ve çalışma elektrodu Pt ise, sulu ortamda +0,65V'dan daha pozitif potansiyel değerine gidilemez, zira daha pozitif gerilim değerinde su yükseltgenerek O₂ açığa çıkar ve devreden büyük bir akım geçer. Açığa çıkan bu akım, daha pozitif potansiyel değerlerinde yükseltgenebilecek bir maddenin neden olabileceği akımı örter. Maddenin

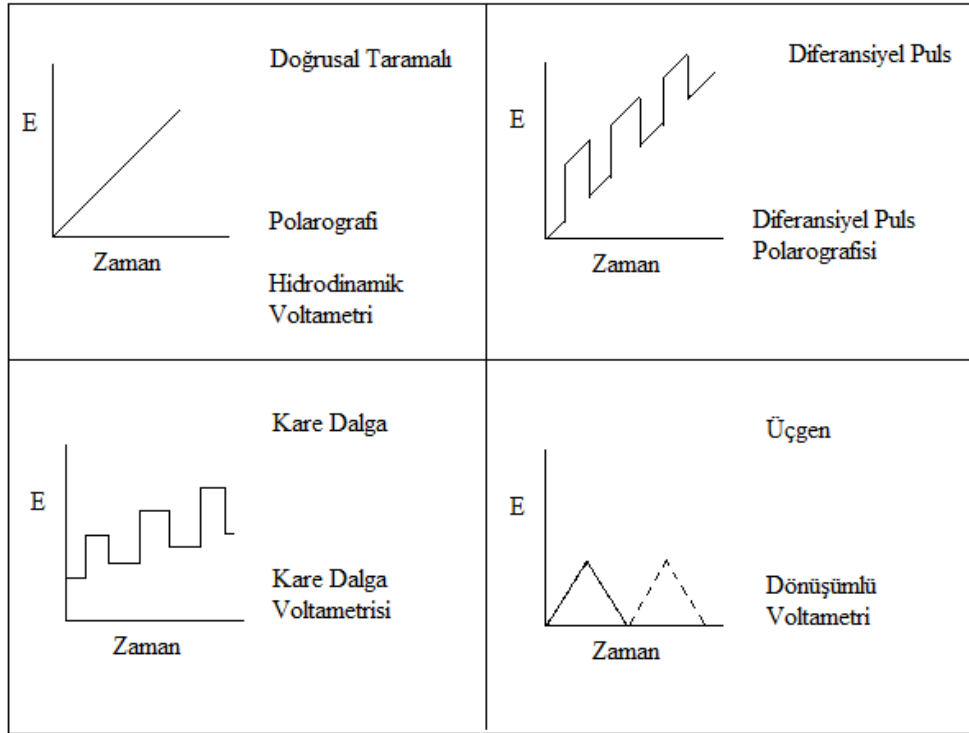
yükseltgenme akımı ile suyun yükseltgenmesinden kaynaklanan akımı ayırmak mümkün olamayacağından, bu elektroaktif maddenin elektrokimyasal davranışına ilişkin bir bilgi elde edilemez. Negatif gerilim sınırını ise çözücünün ya da destek elektrolit katyonunun indirgenme potansiyeli belirler. Pt elektrotta -0,45 V, Hg elektrotta ise asidik ortamda -1,80 V, bazik ortamda 2,40 V'da su indirgenerek H₂ gazı oluşumu sonucunda büyük bir akım oluşur. Bazı organik çözücüler suya göre daha güç indirgenir ya da daha güç yükseltgenirler. Bazı çözücülerde ise hem indirgenme sınırı, hem de yükseltgenme sınırı suya göre daha yüksek gerilimlere çıkar. Böylece susuz çözücülerin kullanılması ile uygun bir elektrot malzemesi ve destek elektroliti seçilerek çalışılabilen voltametrik gerilim sınırları, hem anodik hem de katodik yönde daha büyük gerilim değerlerine kaydırılabilir [12].

Voltametri; yükseltgenme indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan çalışmalarda da oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır [13]. Voltametrde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir.

Voltametrde uyarma sinyaliyle beraber, metodun temelini teşkil eden analite özgü akım cevapları oluşur. En çok kullanılan dört uyarma sinyali ise; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır.

2.1.1.1. Doğrusal Taramalı Voltametri

Bu voltametri türünde elektrotlar arasına zamanla doğrusal artan ya da azalan doğrusal potansiyel uygulanır. Genellikle 10-1000 mVs⁻¹ potansiyel aralığında doğrusal potansiyel taraması yapılır. Doğrusal taramalı voltametrde elde edilen akım potansiyel eğrileri elektrodun türüne göre değişir ve oluşan akım kütle taşınım türüne bağlıdır. Hücrede oluşan akım zamanın ve dolayısıyla da uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülür. Polarografi ve hidrodinamik voltametri olarak iki uygulaması vardır.



Şekil 2.1. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri

2.1.1.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)

Voltametrinin duyarlılığı artık akımın giderilmesine bağlıdır. Gerilimlerin puls şeklinde uygulanması artık akımın giderilmesine ve duyarlılığın artırılmasına neden olur. Uygulanan potansiyel pulslara karşılık oluşan akım, bu pulsların ömrü süresinde zamanın fonksiyonu olarak ölçülür. Normal ve diferansiyel puls olmak üzere iki tiptir.

Çalışma elektroduna puls şeklinde gerilim uygulandığında artık akımın kapasitif bileşeni neredeyse sıfır gibidir. Böylece pulsun sonundaki artık akım, faradaik akımdan kaynaklanmaktadır.

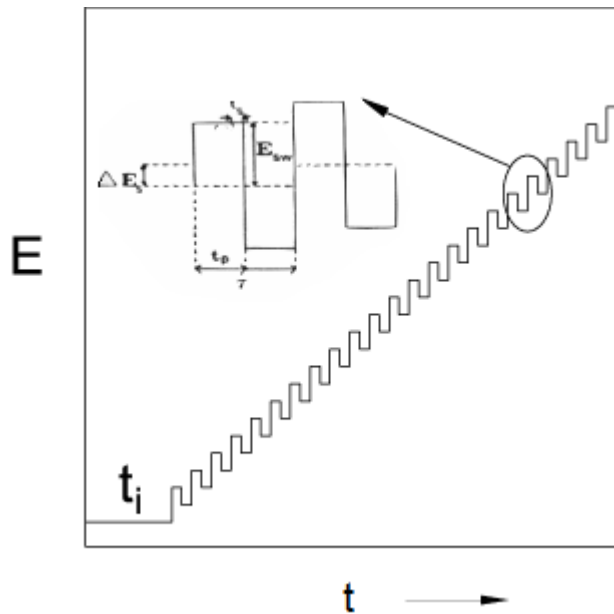
Normal puls voltametrisinde puls sonundaki artık akım az da olsa kapasitif akım içerir. Kapasitif akımın artık akım içindeki payını azaltmak, duyarlılığı artırmak amacıyla pulsun başlangıcında ve sonunda ölçülen akımların farkları alınmış ve diferansiyel puls voltametrisi adında yeni bir teknik elde edilmiştir. Bu teknik normal puls voltametrisinden daha duyarlı olup, bu duyarlık $10^{-7} - 10^{-8}$ M düzeyindedir.

Pulslar, giderek artan bir doğru akım potansiyeline sabit genlikli pulslar bindirilerek uygulanabileceği gibi, sabit doğru bir potansiyele giderek artan genlikli

pulsar bindirilerek de uygulanabilir. Puls uygulanmasından önce ve sonra akım ölçülerek, iki akım arasındaki fark alınmak suretiyle bulunan akım değeri potansiyele karşı grafiğe geçirilir.

2.1.1.3. Kare Dalga Voltametri (SWV)

Kare dalga voltametrisi ilk defa Barker tarafından geliştirilen son derece hızlı ve duyarlı bir metottur. Kare dalga voltametrisinin sabit elektrotlarda potansiyel-zaman dalga şekli, Şekil 2.2’de görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi potansiyel-zaman dalga şekli simetrik kare dalgalarından oluşur. Bir kare dalganın tamamlanma süresi olan periyod, τ ile gösterilir. Birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkına basamaklı adım yüksekliği adı verilir ve ΔE_s ile gösterilir. Kare dalga genliği (E_{sw}), herbir dalganın alt ve üst noktaları arasındaki farkın yarısına eşittir. Puls genişliği (t_p), $\tau/2$ ’ye eşittir. Genellikle periyod yerine $1/\tau$ ’a eşit olan frekans (f) kullanılır. Frekansın artması ve buna bağlı olarak periyodun azalması ile kare dalga pik akımı ve hassasiyet artar. Kare dalga voltametrisinde deneysel parametreler belirli aralıklarda seçilir. Deneylerde frekans genellikle $10 \leq f \leq 1000$ Hz veya periyod $1 \leq \tau \leq 100$ ms aralığında olmalıdır. Basamaklı adım yüksekliği ise aktarılan elektron sayısına (n) bağlı olarak $\Delta E_s = 10/n$ mV eşitliğinden bulunur. E_{sw} ise genelde $50/n$ mV’dur.

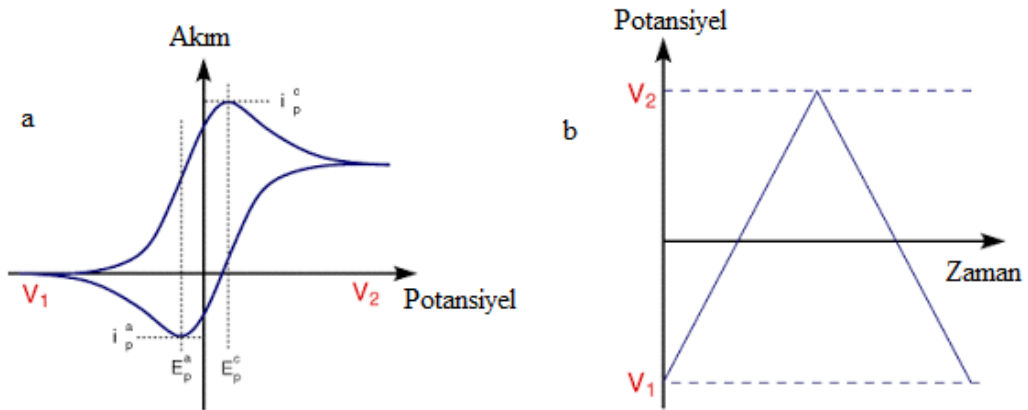


Şekil 2.2. Kare Dalga Voltametrisi için potansiyel- zaman dalga şekli ve akım ölçümü

Kare dalga voltametrisinde akım ölçümleri ileri ve geri pulsların sonuna doğru t_s kadar bir zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 olmak üzere her bir kare dalganın net akımı $\Delta i = i_1 - i_2$ 'ye eşittir ve ileri fark akımı olarak adlandırılır. Δi farkı potansiyele karşı grafiğe geçirilerek voltamogram oluşturulur. Kare dalga voltametrisinde ölçüm son derece hızlı yapıldığından birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini artırmak mümkündür. Bu metodun tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} M arasında olduğundan dolayı bu teknik en hassas ve hızlı elektroanalitik teknikler arasındadır [14].

2.1.1.4. Döngülü (Çevrimli) Voltametri (CV)

Elektrokimyasal reaksiyonlar hakkında kalitatif ve kantitatif bilgi alınabilecek voltametrik yöntemdir. Çalışma elektroduna üçgen dalga formunda potansiyel taraması uygulanır (Şekil 2.3.b). Doğrusal olarak artan potansiyel en yüksek değerine ulaşır sonra aynı hızda başlangıç noktasına geri döner.



Şekil 2.3. a) Çevrimli voltamogram, b) Çevrimli voltametriye uyarma sinyali [15]

Döngülü voltametri elektrokimyasal işlemler hakkında kantitatif bilgiler sağlayan temel yöntemlerdendir. Potansiyel tarama hızı değiştirilerek pik yüksekliklerinin tarama hızı ile değişmesi incelenir. Bu durum göz önüne alınarak, Fick'in ikinci kanundan hareketle Randles-Sevcik (2.1) eşitliği türetmiştir.

$$I_p = 0,4463nF(nFRT)^{1/2}C_0D^{1/2}\nu^{1/2} \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte I_p : Akım yoğunluğu, n : Elektron sayısı, F : Faraday sabiti, R : Gaz sabiti, D : Difüzyon katsayısı, v : Tarama Hızı, C : elektroaktif maddenin derişimidir. Eşitlikten görüldüğü gibi pik akımı elektroaktif maddenin derişimi ve tarama hızının kareköküyle doğru orantılıdır. Böylelikle döngülü voltamogram verileri ile bir reaksiyonun tersinirliği belirlenebilir. Eğer $I_p - v^{1/2}$ grafiğı doğrusal ise ve orjinden geçerse sistem tersinirdir. Buna ek olarak, anodik pik potansiyeli ile katodik pik potansiyeli arasında 59 mV fark olmalı, pik pontansiyeli tarama hızından bağımsız olmalı, anodik pik akımının katodik pik akımına oranı 1'e eşit olmalıdır [16]. CV'de elde edilen pik akımının büyüklüğü elektroaktif maddenin konsantrasyonu, aktarılan elektron sayısı, elektrot yüzey alanı ve difüzyon katsayısı ile değışir.

2.1.2. Voltametrik Cihazlar

Voltametrik yöntemlerde ölçümler; elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolitine daldırılmış üç elektrot ile yapılmaktadır. Hücrede bulunan üç elektrottan birisi mikroelettottur. Bu elektroda indikatör elektrot veya çalışma elektrodu denir. Analizler sırasında bu elektrodun potansiyeli, zamana bağılı olarak doğrusal bir şekilde değıştirilir.

Hücrede ikinci elektrot doymuş kalomel elektrot veya gümüş elektrodu gibi bir referans elektrottur. Referans elektrotların potansiyeli ölçümler süresince değışmez. Hücredeki üçüncü elektrot karşı elektrottur. Bu genellikle platinden yapılmış geniş yüzeyli elektrot olup kaynaktan çözeltiye, oradan da mikroelettroda geçirgenliği sağlar.

2.1.2.1. Voltametri de Kullanılan Referans Elektrotlar

Referans elektrotların potansiyeli çalışmalar sırasında dış ortamdan etkilenmez. İdeal bir referans elektrot; tersinirdir, Nerst eşitliğine uyar, zamanla değışmeyen bir potansiyeli vardır, ufak bir akıma maruz kaldıktan sonra orijinal potansiyeline döner ve sıcaklık değışimi ile ufak bir histeris gösterir.

Elektrokimyada ilk olarak standart hidrojen elektrodu referans elektrot olarak kullanılmıştır. Ancak elektrot düzeneğinin kurulmasının ve çalıştırılmasının çok güç olması nedeniyle günlük işlerde kullanılmaz. Bunun dışında yaygın olarak kalomel ve gümüş-gümüş klorür referans elektrot kullanılmaktadır.

Gümüş-gümüş klorür referans elektrotlar, bir gümüş elektrodun gümüş klorürle doyurulmuş potasyum klorür çözeltisine daldırılmasıyla elde edilir. Bir gümüş elektrot kısaca,



şeklinde gösterilir. Doygun KCl çözeltisi kullanıldığında standart hidrojen elektroduna göre potansiyeli + 0,222 V'dur [11].

2.1.2.2. Voltametrde Kullanılan Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrodu inert bir metal (platin ya da altın), karbon, pirolitik grafit ya da camsı karbon, yarı iletken (kalay oksit ya da indiyum oksit gibi) veya civa filmi ile kaplanmış bir metalden yapılmış olabilir. Her bir elektrodun çalışma potansiyel aralığı farklıdır. Bu potansiyel aralığı elektrot türüne, çözücüye, kullanılan elektrolit türüne ve pH'ya bağlı olarak değişir.

Çok sert, akımı iyi ileten ve pek çok korozif ortama dirençli bir malzeme olan camsı karbon; fenol/formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000°C - 3000°C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir. Çok iyi elektriksel ve mekanik özelliklere sahip olması ve geniş bir potansiyel aralığı olması, kimyasal tepkimelere girmemesi ve genellikle tekrarlanabilir yüzeyler sağlaması nedeniyle sıkça kullanılmaktadır. Ultrasonik olarak ayrıştırmak ya da elektrot yüzeyinin modifiye edilmesi gibi ilave işlemler uygulanarak analitlerin tanıma sınırı düşürülmektedir [17]. Yaygın olarak kullanılan camsı karbon elektrot modifiye edicileri: Organik maddeler, makrosiklik bileşikler, polimerler, bioaktif bileşikler ve nanotüplerdir [18]. Metal-organik madde, polimer metal, polimer-organik madde, polimer-organik madde-metal gibi farklı madde bileşimleri de camsı karbon elektrot yüzey modifikasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Modifiye elektrotların büyük bir bölümünü polimer kaplı camsı karbon elektrotlar oluşturmaktadır. Elektrot yüzeyinde polimer film elde etmek için birkaç damla polimer çözeltisi elektrot yüzeyine damlatılabilir ya da çözelti içerisindeki monomerin yükseltgenmesine dayanan elektrokimyasal polimerizasyon uygulanabilir.

2.2. Kütle Aktarımı

Bir elektrot sadece yüzeyindeki çok ince bir çözelti tabakasında etkili olabildiğinden, faradayik akım, ana çözeltiden elektrot yüzeyinde reaksiyona giren türlerin devamlı kütle aktarımını gerektirir. Eğer arayüzeyde elektron transferi ve elektrot boyunca elektron iletim mekanizmalarının ikisi de hızlıysa, elektroaktif türlerin hareketi yük akış hızını sınırlar.

Elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine aktarımına kütle aktarımı başka bir deyişle konsantrasyon polarizasyonu denir ve elektrot-çözelti ara fazında bir molekülün elektrokimyasal indirgenmesi veya yükseltgenmesiyle gerçekleşir. Kütle transferi, difüzyon, migrasyon (göç) ve konveksiyon olmak üzere üç ayrı mekanizma ile incelenir [19].

2.2.1. Difüzyon

Çözeltide bulunan bir türün katotta indirgenmesi veya anotta yükseltgenmesi sonucu çözeltinin iki bölgesi yani katot/anot bölgesi ve çözeltinin büyük kısmı (bulk) arasında, indirgenen tür bakımından bir derişim farkı meydana gelir. Bu fark nedeniyle çözeltinin derişimi büyük olan ana kısımdan, katot/anot bölgesine doğru bir iyon veya molekül hareketi olur. Böyle harekete difüzyon denir. Difüzyon için bir türün derişiminin çözeltinin iki ayrı yerinde farklı olması gerekir.

Difüzyon hızı (dc/dt) olmak üzere;

$$dc/dt = k (c - c_0) \quad (2.3)$$

bağıntısıyla verilir. Burada c , çözeltinin büyük kısmında bulunan ve tepkimeye giren türün derişimini, c_0 , aynı türün elektrot yüzeyinde kurulan dengedeki derişimini gösterir. Bağıntıda geçen, k ise bir orantı katsayısıdır. Daha önce gösterildiği gibi c_0 , elektrot potansiyeliyle tespit edilen bir değer olup Nernst denkleminde hesaplanır. Elektroda daha yüksek potansiyeller uygulandığı zaman c_0 derişimi düşmeye, difüzlenmeye artmaya başlar. Sonunda c_0 derişimi c derişiminin yanında ihmal edilebilir bir hale gelir, $c_0 \rightarrow 0$ olur. Bunun sonucu difüzlenme hızı,

$$dc/dt = kc \quad (2.4)$$

şeklini alır. Bu durumda derişim polarizasyonu tamamlanmış olur ve elektrot polarizlenmiş ideal bir elektrot haline gelir.

2.2.2. Göç

Bir çözeltide bulunan iyonların, elektrostatik alanın çekim etkisinde hareket etmesi olayına göç etme denir. Yük aktarılmasında veya kütle aktarılmasında en etkin olay budur. Burada söz konusu olan elektrostatik alan, bir elektrodun meydana getirdiği alandır. Bu alan ortamda bulunan bütün iyonlar üzerinde etkilidir. Ancak, iki yüklü bir iyon üzerine olan etkisi, tek yüklü bir iyon üzerine olan etkisinden daha büyüktür. Bir elektrodun kimyasal tepkimeye iştirak eden bir iyon üzerindeki etkisi ortamın toplam iyon derişimi arttıkça azalır. Elektrot tepkimelerinde rolü olan bir iyon derişimi, ortamda bulunan iyonların toplam derişimi yanında çok küçük kalırsa (1/100 gibi), elektrodun bir iyon üzerindeki çekim etkisi sıfıra yaklaşır.

2.2.3. Konveksiyon

Tepkimeye giren iyon, çözeltinin büyük kısmından çok ince olan elektrot tabakasına konveksiyonla taşınır. Konveksiyonla taşınma ikiye ayrılır: Mekanik taşınma ve doğal taşınma. Mekanik taşınma çözeltinin elle veya bir motorla karıştırılmasıyla olur. Böylece elektrot üzerindeki derişim polarizasyonu büyük ölçüde önlenir. Doğal konveksiyon, sıcaklık veya yoğunluk farkından ileri gelir [11].

2.3. Kimyasal Olarak Modifiye Edilmiş Elektrotlar

Kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotlar, çeşitli organik ve inorganik modifiye edicilerin, elektrot yüzeyine uygun bir metod ile yerleştirilmesi ile hazırlanır. Hazırlanan bu modifiye edilmiş elektrodun; mekanik olarak dayanıklı, kimyasal olarak kararlı, tekrarlanabilir, hızlı yanıt süresine sahip olması, yeniden kullanılabilir olması, elektrot yapımının basit ve güvenli olması gibi özelliklere sahip olması istenir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş bir elektrodun elektrokatalitik etki göstermesi elektrot modifikasyonu için önemli bir uygulama alanıdır. Elektrokatalitik modifiye elektrotlar, bir redoks modifiye edicinin yüzeye sabitlenmesi ve analit ile elektrot arasındaki elektron transferini sağlaması esasına dayanır [20].

2.3.1. Kimyasal Olarak Modifiye Edilmiş Elektrotların (CME) Hazırlanması

Modifiye edicinin; çıplak elektrot yüzeyine doğrudan adsorplanması, elektrot yüzeyine kovalent bağlanması, bir polimerin elektrot yüzeyine ince film şeklinde kaplanması, bir modifiye edicinin karbon pasta gibi iletken bir matris içine katkılanması gibi yöntemlerle kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotlar (CME) hazırlanabilir. Murray'a göre modifiye elektrotların hazırlanması dört ana başlık altında incelenebilir [21].

1. Tutunma esaslı elektrotlar
2. Kovalent modifiye elektrotlar
3. Redoks polimer kaplama elektrotlar (Tek tabaka)
4. Heterojen çoklu tabaka elektrotlar

Tutunma esaslı kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotlarda, fiziksel ve kimyasal etkileşim özelliklerinden tek tabakalı yapılar oluşturmak için yararlanılır. Kolay yüzey modifikasyonu ve fonksiyonel grup bağlanması bu yöntemin önemli avantajlarıdır. Elektrot yüzeyinin kovalent modifikasyonu da CME hazırlanmasında önemli bir ilgi alanıdır. Örneğin camı karbon elektrotta oluşan $>C=O$ ve $>C-O$ fonksiyonel grupları ve oksit elektrotlarda oluşan $-OH$ grubundan birçok uygulamada yararlanılır [22]. Bununla beraber, tek tabaka kaplama elektrot yüzeyindeki aktif bileşenlerin miktarını kısıtlamaktadır. Alternatif olarak polimer esaslı çok tabaka CME'ler bu problemi çözmek için uygun bir yöntem sunarlar. Bu tür CME'ler homojen ya da heterojen şartlar altında hazırlanabilirler. Homojen çok tabaka hazırlanması, iyonomerler, redoks polimerler, inorganik polimerler mediyatörlerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesi gibi yöntemleri içerir. Heterojen sistemlerin hazırlanmasında ise, CME'ler kil, zeolit, sol-jel, karbon pastası, epoksi reçineleri ve diğer polimerik sistemlerle desteklenirler [23].

2.3.1.1. Fiziksel Tutunma Esaslı Modifiye Elektrotlar

Tutunma esaslı kimyasal modifiye elektrotların hazırlanması, saf organik ya da organometalik komplekslerin susuz çözeltilerinin, gözenekli karbon yapıların üzerine damlatıldıktan sonra çözücünün buharlaştırılması esasına dayanır.

2.3.1.2. Kimyasal Tutunma Esaslı Modifiye Elektrotlar

Fiziksel tutunma esaslı sistemler analitik uygulamalar için kullanışlı olsalar da kararlılık bu elektrotlar için önemli bir problemdir. Bu kararlılık problemi kimyasal tutunma yöntemi ile çözülebilir. Bu yöntemde genellikle altın elektrot, tiyol ve etanol çözeltisine daldırılarak, fonksiyonel grupların (-SH ve -OH) tek tabakalı olarak elektrot yüzeyine tutunmasıyla modifiye edilir.

2.3.1.3. Kovalent Bağlı Modifiye Elektrotlar

Modifiye edilecek elektrot yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, sentetik yöntemlerle ya da yükseltgenme / indirgenme potansiyelinin kontrol edilmesiyle değiştirilerek kovalent bağlı modifiye elektrotlar hazırlanabilir. Karbon yüzeyi değiştirilebilir yüzey yapısı nedeniyle birçok çalışmada bu amaçla kullanılmaktadır.

2.3.1.4. Homojen Çoklu Tabaka Modifiye Elektrotlar

Elektrokimyasal polimerizasyon, elektrot modifikasyonunda kullanılan yaygın yöntemlerdendir. Önceki çalışmalarımızda, bazı fenol türevli monomerlerin elektropolimerizasyonu ile elde edilen modifiye elektrotların, ürik aside karşı seçici geçirgen olduğu gösterilmiştir [6, 24]. Bazı durumlarda ise hazırlanan polimerik yüzey, incelenen analite karşı katalitik etki gösterebilir. Ancak bazı polimerlerin yüksek moleküllü ağ yapıları ve düzensiz zincir yapıları nedeniyle mobilitelerinin düşük olması bir dezavantajdır. Bu sorunun çözümünde; nano katkılı polimerik elektrotlardan yararlanılmaktadır.

2.3.1.5. Heterojen Çoklu Tabaka Modifiye Elektrotlar

Karbon pasta elektrotlar heterojen çoklu tabaka modifiye elektrot olarak yaygın kullanım alanına sahiptir. Katı haldeki destek malzemesinin bir bağlayıcı ile birleştirilmesiyle hazırlanırlar [25].

2.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon

Elektropolimerizasyon tek basamakta elektrot yüzeyinin kaplanması için alternatif bir metoddur. Bu vinil, amin gibi polimerleşebilen elektroaktif gruplar

içeren bir türün elektropolimerizasyonu ile yapılır. Aromatik, heterosiklik, benzoid türevleri içeren monomerler elektropolimerizasyon için yaygın olarak kullanılırlar.

Elektropolimerizasyon; çözücü, monomer konsantrasyonu, elektrolit türü, sıcaklık, pH, elektrot malzemesi ve uygulanan elektriksel şartlar gibi birçok deneysel değişken içerir. Polimer, potansiyostatik, galvonostatik veya döngülü potansiyel taraması yöntemleri kullanılarak, farklı elektrot yüzeylerinde biriktirebilir. Uygulanan elektriksel şartlar ve deneysel değişkenler polimerizasyonun hızını, oluşan filmin morfolojisi ve özelliklerini etkilemektedir. Elektropolimerizasyonda genellikle monomerin milimolar düzeyindeki konsantrasyonu yeterlidir.

Elektrobiriktirme gerilimi her bir elektropolimerik monomer için spesifikdir. Polimerler direkt olarak yükseltgenmiş halde, elektrotun yüzeyinde birikir. Elektrokimyasal polimerizasyonun diğer tekniklerden üstünlükleri;

- Tepkimenin oda sıcaklığında gerçekleşmesi,
- Potansiyel ve akım değiştirilerek film kalınlığının kontrol edilebilmesi,
- Polimer filmlerin homojen olması ve elektrot yüzeyinde birikmesi,
- Polimer katılanmasının film oluşumu ile eş zamanlı gerçekleşmesi

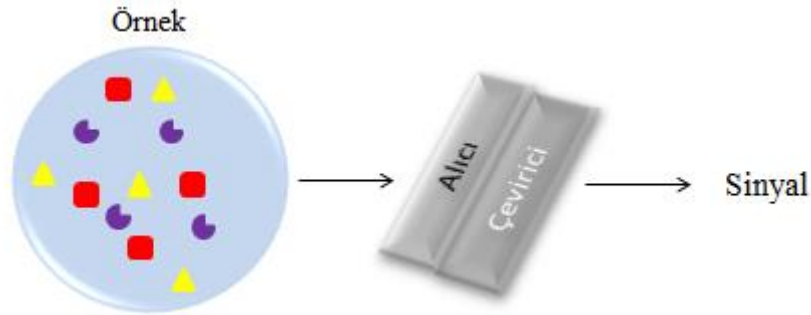
olarak sıralanabilir. Piyrol, tiyofen ve anilin gibi monomerlerin elektropolimerizasyonu ile iletken modifiye elektrotlar hazırlanabilmektedir. Elektrot üzerinde başarılı biçimde elektroaktif-iletken filmler veren aromatik bileşikler için iki özellikten bahsedilir. Emsallerine göre daha düşük potansiyelde yükseltgenirler ve elektrofilik yerdeğiştirme reaksiyonlarına yatkındırlar. Elektrokimyasal yoldan başlatılan polimerleşme reaksiyonu ile iletken polimerlerin haricinde birçok polimer de sentezlenebilir.

Elektrokimyasal yöntemle başlatılmış katılma polimerleşmesinde aktif türlerden biri katyon, anyon ya da serbest radikal vermek üzere elektrot yüzeyinde reaksiyona girer. Örneğin anodik aktif aromatik monomerlerden piyrol ve tiyofenin polimerleştirilmesinde monomer katyonu radikale yükseltgenmektedir. Meydana gelen rezonans yapı, radikalın kararlılığını artırır. Monomer radikalleri, dimeri oluşturur. Oluşan dimerin yükseltgenme potansiyeli monomerinkine göre daha düşük olduğundan dimer büyür, sürekli katılmalarla pasifleşme olmadan polimerleşme meydana gelir ve bu polimerler elektrot üzerine birikir.

Polimer film elektrotlarının ayırt edici özelliği, polimer filmlerinin elektrokimyasal aktif merkezler içeriyor olmalarıdır. Elektrokimyasal aktif merkezler, elektrot ile substrat arasındaki elektron transfer reaksiyonlarını yürütürler. Elektrot yüzeyi belirli bir kalınlıktaki polimer filmi ile kaplanmış bu elektrotlar, elektrokimyasal bir sisteme sahiptir. Bu tür elektrotlarda birinci sıra iletken olarak genelde bir metal, ikinci sıra iletken bir çözelti ve bu ikisinin arasında elektrokimyasal olarak aktif bir polimer tabakası bulunmaktadır. Bu polimer tabakası genelde elektronik ve iyonik iletkenlik özelliklerinin her ikisine de sahiptir. Çözeltideki türlere elektronların transferi iki ara yüz (metal-polimer ve polimer-çözelti ara yüzleri) dahilinde ve filmin içinde olduğu düşünülen bir reaksiyon vasıtası ile yürür. Polimer film elektrotlarındaki film kalınlığı μm hatta nm seviyesindedir [26].

2.5. Kimyasal Sensörler

Kimyasal sensörler, analiz edilen numunenin derişiminden yararlanarak elde edilen kimyasal bilgiyi analitik olarak yararlı bir sinyale dönüştüren sistemlerdir.



Şekil 2.4. Elektrokimyasal sensörün şematik gösterimi

Bir kimyasal sensör iki kısım içerir. Bunlar, fiziksel dönüştürücü (çevirici) ve kimyasal ara yüzey (alıcı) tabakasıdır. Kimyasal ara yüzeyde; analit bir kimyasal aktif yüzey ile kimyasal olarak etkileşir. Böylece fiziksel / kimyasal özelliklerde bir değişme meydana gelir. Bu değişiklikler, fiziksel dönüştürücü ile ölçülebilir bir duruma getirilir. Değişiklikler, elektriksel sinyal ile ilişkili olarak meydana gelir ve monitörden okunur.

Kimyasal sensörlerin bazı özellikleri;

1. Kimyasal sensörlerde duyarlı bir tabaka analit ile kimyasal etkileşim içindedir.
2. Sensörün yüzeyinde bulunan bu duyarlı tabakada, analitle etkileştikten sonra kimyasal bir değişiklik olmamalıdır.
3. Minyatürize edilebilir olmalıdırlar. Hazırlanan sensörlerin özellikle klinik kimya için uygun boyutlarda üretilebilmesi oldukça önemlidir.
4. Tek bir fiziksel ya da kimyasal özelliğin ölçülmesi gerekli değildir.
5. Aynı kimyasal ölçümler için kullanılan cihazlardan daha az masraflıdır.

2.5.1. Kimyasal Sensörlerin Sınıflandırılması

Dönüşüm mekanizmalarına göre kimyasal sensörler; manyetik, ısıma, elektrokimyasal, mekanik ve termal olarak sınıflandırılmıştır. Bütün sensör kategorilerinde, arayüzlerdeki reaksiyonların katalitik ya da absortif olduğu görülür. Arayüzlerde meydana gelen kimyasal reaksiyonların türlerine göre sensörleri düzenlemek daha kullanışlıdır. Bu kimyasal reaksiyonların her biri hemen hemen her dönüştürücü platform üzerinde kullanılır [27].

2.5.2. Elektrokimyasal Sensörler

Analitik kimyada oldukça yaygın kullanım alanı olan elektrokimyasal sensörler için IUPAC tarafından literatürde belirtilen tanımlama ise şu şekildedir:

“Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve derişime bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler denir ” [28].

Elektrokimyasal sensörler, kimyasal sensörlerin en eski ve en geniş grubudur. Bu sensörlerin birçoğu gelişme safhasında olup, bazıları ticari olarak kullanılmaktadır.

İdeal bir sensörün sahip olması gereken özelliklerden bazıları aşağıda açıklanmıştır.

Seçicilik: Sensör incelenen analite karşı spesifik bir sinyal vermeli, ortamda bulunan diğer türlerin yanıtları girişim yapmamalıdır. Sensör yeterli ölçüde seçici değilse bu eksikliği ortadan kaldırmak için ilave işlemlerin yapılması gereklidir.

Tekrarlanabilirlik: Aynı koşullarda, ardarda yapılan ölçümlerde analit için birbirine çok yakın değerlerin okunması istenir. Elektrot yüzeyinde meydana gelen değişimler / bozulmalar pratikte bu ölçümleri mümkün kılmamaktadır.

Kararlılık: Bir sensörün kararlılığı kalitesini gösteren en önemli faktörlerden biridir. Hazırlanan sensör ile sabit bir ölçüm yapılması sırasında, hep aynı sinyal değeri alınması sensörün kararlılığını gösterir. Sensörün dönüştürücü kısmını oluşturan materyalin fiziksel dayanıklılığı, ısı, nem, pH gibi parametreler kararlılığı etkilemektedir.

Kullanım Ömrü: Dönüştürücünün aktivitesindeki azalma ya da materyalin zamanla aşınması ya da yüzeyden düşmesi gibi sorunlar kullanım ömrünü kısaltmaktadır. Bu durum aynı zamanda sensörün kalibrasyonunu, kararlılığını ve tekrarlanabilirliğini de etkilemektedir.

Geniş Ölçüm Aralığı: Sensörden alınan akım- derişim grafiklerinin doğrusal olduğu derişim aralığı ölçüm aralığı olarak adlandırılmaktadır.

Yanıt Süresi: Sensör örnek ile etkileştiği andan itibaren, çeviriciden sinyalin alınmasına kadar geçen süre yanıt süresi olarak tanımlanabilir. Akım zaman grafiğinde elde edilen eğride basamakların şekli basık ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

Basitlik ve Ucuzluk: İdeal bir sensörün kullanımı rahat, tasarımı basit ve maliyetinin düşük olması gerekir.

2.6. Nükleik Asitler ve DNA

Deoksiribonükleik asit (DNA) kalıtım molekülüdür. Çok sayıda deoksiribonükleotid birimlerinden oluşmuş, çok uzun ipliğimsi bir makromoleküldür. DNA'daki pürin ve pirimidin bazıları genetik bilgiyi taşıırken, şeker ve fosfat gruplarının yalnız yapısal özellikleri vardır. DNA dört çeşit baz ihtiva eder: adenin (A) ve guanin (G) pürinleri ile timin (T) ve sitozin (C) pirimidinleri.

DNA ve RNA moleküllerini içine alan nükleik asitler, bir başka deyimle, polinükleotidler 1872 yılında keşfedilmiştir. 1953 yılında ise James Watson ve Francis Crick, DNA'nın üç boyutlu yapısını ortaya çıkarmışlardır. Bu modelin önemli yönleri şöyle sıralanabilir:

1. İki antiparalel polinükleotid zinciri ortak bir eksen çevresinde sağ el yönünde sarılır.

2. Pürin ve pirimidin bazları sarmalın iç tarafında yer alırken, fosfat ve deoksiriboz birimleri dış taraftadır.

3. Sarmalın çapı 20 Å'dur. Komşu bazların sarmal eksenini boyunca aralarındaki mesafe 3,4 Å olup, 36°'lik bir dönme yapmışlardır.

4. İki zincir, baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Adenin daima timin ile guanin de sitozin ile eşleşir.

5. Bir polinükleotid zinciri boyunca bazların sıralanışı hiçbir şekilde sınırlandırılmamıştır ve bu sıralama genetik bilgiyi taşır.

DNA çift sarmalının en önemli özelliği baz çiftlerinin sipsifikliğidir. Watson ve crick, zincirler arası mesafe ve hidrojen bağı faktörlerinden dolayı adeninin timinle (A-T), guaninin sitozinle (G-C) eşleştiğini ortaya çıkarmıştır.

2.6.1. DNA Moleküllerinin Sulu Çözeltilerdeki Özellikleri

DNA molekülleri sulu çözeltilerde kendilerine has bazı özellikler gösterirler. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibidir;

1. Asit-baz özellikleri: Komşu mononükleotidler arasında köprü görevi gören sekonder fosfat grupları oldukça düşük pKa değerlerine sahiptir. Bu yüzden DNA, pH 4'ün üzerinde tamamen iyonlaşmış, çok protonlu bir asittir. Bu fosfat grupları sarmalın çevresinde tamamen suya yönelmiş haldedir. Baz çiftleri pH 4,0-11,0 arasında maksimum kararlılığa sahiptir. Bu sınırların dışında DNA sarmalı bozulur ve açılır.

2. Viskozite: Çift sarmalın sağlamlığı ve küçük çapına oranla çok fazla uzunluğu, çok seyreltik DNA çözeltilerinin bile viskozitesinin yüksek olmasına yol açar.

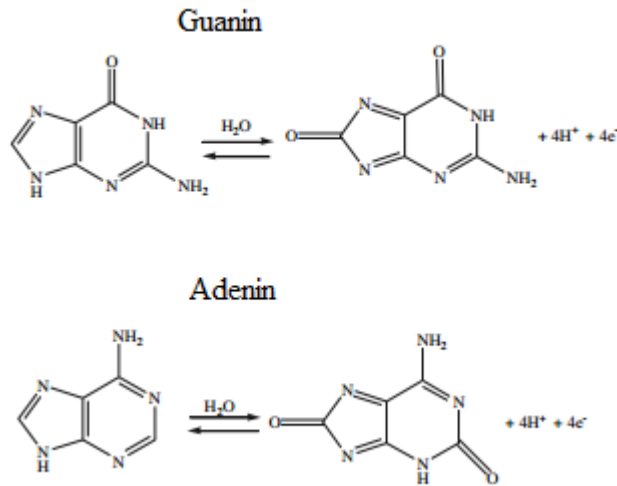
3. Sedimentasyon özellikleri: DNA numunelerinin sedimentasyon katsayıları ve molekül ağırlıkları, proteinlerde olduğu gibi ultrasantrifüj kullanılarak elde edilir. Bununla birlikte, DNA moleküllerinin olağanüstü uzunlukları ve çözeltilerin viskoz olmaları yüzünden sedimentasyon ölçümleri bir seri düşük DNA

konsantrasyonlarında yapılır ve sonra sıfır konsantrasyona ekstrapolasyon yapılarak molekül ağırlıkları tesbit edilir.

4. DNA'nın denatürasyonu: DNA'nın çift sarmal yapısı; yüksek ve düşük pH'larda, ısıtılınca, alkoller ve benzeri çözünenlere maruz bırakılınca açılarak bozulur. DNA denatürasyonu esnasında omurgadaki kovalent bağlardan hiçbiri parçalanmaz [29].

2.6.2. Nükleik Asitlerin Elektrokimyası

Nükleik asitlerin analitiksel olarak kullanılabilir yükseltgenme – indirgenme sinyalleri ürettikleri ilk olarak 1950'lerin sonları ve 60'lı yılların başlarında bildirilmiştir. Bu sinyallerin DNA ve RNA'daki baz kalıntılarından olduğunun anlaşılmasıyla bu alandaki sensör çalışmaları başlamıştır. DNA'daki guanin kalıntıları, guanin indirgenme ürünlerinin yükseltgenmesine bağlı anodik sinyaller üretirken, adenin ve sitozin kalıntıları indirgenme sinyalleri üretirler. Elektrokimyasal analiz, DNA denatürasyonu ve DNA yapısındaki ufak değişiklikleri duyarlılıkla yansıtmaktadır.



Şekil 2.5. Guanin ve adenin yükseltgenme mekanizmaları [30]

Nükleik asitler elektrot yüzeyine genellikle kuvvetle adsorbe olurlar. RNA ve / veya DNA'nın tersinmez adsorpsiyonu civa, karbon ve diğer elektrotlarda gözlenmektedir. DNA modifiye civa ya da karbon elektrotlar, çıplak elektrodun DNA çözeltisine kısa bir süre daldırılmasıyla kolaylıkla hazırlanabilmektedir.

Nükleik asitlerin civa ve karbon elektrotlara adsorpsiyonu, altın ve ITO elektrotlarla kıyaslandığında daha zayıftır.

Nükleik asit bazları arasında guanin kolaylıkla yükseltgenebilmektedir. İlk defa 1981 yılında altın elektrotlarda pürin bazlarının yükseltgenbildiği Hinnen ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır [31]. Özellikle yaşlanma ve birçok hastalıkta büyük biyolojik öneme sahip olduğu için guaninin redoks reaksiyonları, yoğun olarak çalışılmıştır.

2.7. Eş Zamanlı Guanin ve Adenin Tayini Literatür Çalışmaları

Gao ve arkadaşları GCE yüzeyine gözenekli yapısı olan polipirol/grafen filmini çevrimli voltametri yöntemiyle kaplamışlardır. Polimer içerisindeki grafen elektroaktif yüzey alanını artırarak duyarlılığı geliştirmiştir. Hazırlanan sensör ile adenin ve guanin için en düşük tayin sınırı sırayla 0,02 μM ve 0,01 μM olarak belirlenmiştir. Analitiksel sensör uygulaması için calf thymus DNA kullanılmış ve G/A oranı % 2,59'luk hata ile hesaplanabilmiştir [41].

Fan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kimyasal olarak sentezledikleri TiO_2 -grafen nanokompozit dispersiyondan GCE yüzeyine damlatarak modifiye elektrot hazırlamışlardır. Hazırlanan sensör ile adenin ve guanin için en düşük tayin sınırı sırayla 0,1 μM ve 0, 15 μM olarak belirlenmiştir. İki hafta boyunca kararlılığı incelenen sensörün, ikinci haftanın sonunda başlangıç değerinin %92'sini devam ettirdiği görülmüştür. Analitiksel sensör uygulaması için termal denatüre DNA kullanılmış ve G/A oranı % 3,89'luk hata ile hesaplanabilmiştir [42].

Ensafi ve çalışma grubu Pt-Pd/poröz silikon nanokompozit malzemeyi karbon nanotüp pasta elektroda katkılایarak modifiye elektrodu hazırlamışlardır. Hazırlanan sensör ile DPV tekniği kullanılarak 0,10-10 μML^{-1} derişim aralığında adenin ve guanin için eşzamanlı tayin yapılabilmiştir. Modifiye elektrodun analitiksel uygulaması için termal denatüre DNA kullanılmış ve G/A oranı %5,19'luk hata ile hesaplanabilmiştir [43].

Chatterjee ve çalışma arkadaşı camı karbon elektrot yüzeyinde nanoyapılı ince platin filmini elektrokimyasal biriktirmesine dayalı modifiye elektrot hazırlamışlardır. Hazırlanan sensör 0,1 – 500 μM derişim aralığında guanine

doğrusal yanıtlar vermiştir. 45 gün süre ile kararlılığı incelenen sensörün yanıtlarındaki azalma %10 olarak belirtilmiştir [44].

Wang ve çalışma arkadaşları guanin ve adeninin eş zamanlı tayini için b-cyclodextrin katkılı karbon nanotüp modifiye elektrotlar hazırlamışlardır. Guanin ve adenin için tayin sınırı sırayla 0,2 ve 0,25 μML^{-1} olarak hesaplanmıştır [45].

Shahrokhian ve çalışma grubu adenin ve guaninin eş zamanlı tayini için Fe_3O_4 nanoparçacıkları içeren multi-walled karbon nanotüp esaslı yeni bir biyosensör hazırlamışlardır. Elektrokimyasal biyosensör adenin ve guanin için sırayla en düşük tayin sınırı 1 nM ve 5 nM olarak 0.01–10 μM ve 0.05–8 μM doğrusal derişim aralığında yanıt vermiştir. Hazırlanan yeni biyosensörün analitiksel uygulaması için balık sperm DNA kullanılmış ve G/A oranı 0,81 olarak hesaplanmıştır [46].

Pruneanu ve çalışma grubu sentezledikleri grafen ve platin nanoparçacıkları altın elektrot yüzeyine damlatarak modifikasyon yapmışlardır. Hazırlanan sensörün guanin ve adenin için elektrokatalitik etki gösterdiğini çevrimli voltametri ve doğrusal taramalı voltametri yöntemleri ile göstermişlerdir [47].

Zhang ve çalışma arkadaşları guanin ve adeninin eş zamanlı tayini için, nano-bakır oksit modifiye camı karbon elektrot tasarımını elektrokimyasal biriktirme ile yapmışlardır. Hazırlanan sensör ile guanin ve adenin için tayin sınırı sırayla 6×10^{-3} μM ve 9×10^{-3} μM olarak belirlenmiştir. Analitiksel sensör uygulaması için calf thymus DNA kullanılmış ve G/A oranı 0,81 olarak hesaplanmıştır [48].

Liu ve çalışma grubu adenin ve guaninin eş zamanlı tayini için sensör tasarımını iki basamaklı olarak yapmışlardır. İlk basamakta altın nanoparçacık (NPAu) / multi-walled karbon nanotüp (MWNTs) kompozitini camı karbon elektrot yüzeyinde biriktirmişlerdir. İkinci basamakta ise NPAu/MWNTs/GCE yüzeyinde tioninin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Guanin ve adenin için tayin sınırı sırayla 1×10^{-8} M ve 8×10^{-9} M olarak bulunmuştur. . Analitiksel sensör uygulaması için calf thymus DNA kullanılmış ve G/A oranı 0,79 olarak hesaplanmıştır [49].

Niu ve çalışma arkadaşları dopamin, ürik asit, adenin ve guaninin eş zamanlı tayini için; öncelikle camı karbon elektrot yüzeyinde safranin T'nin

elektropolimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu elektrot farklı parçacık boyutuna sahip altın nanoparçacık çözeltisine daldırılarak 10 saat daha sonra ds-DNA çözeltisine daldırılarak 2 saat daha bekletilmiştir. Son olarak tekrar altın çözeltisine daldırılarak 2 saat bekletilmiştir. DA, UA, G ve A için tayin sınırları sırayla 0,2, 8,0, 0,5 ve 4,0 nM olarak belirlenmiştir. Modifiye elektrodun analitiksel uygulaması için termal denatüre DNA kullanılmış ve G/A oranı standart değer olan 0,77'ye çok yakın olarak 0,78 hesaplanmıştır [40].

Li ve grup arkadaşları dopamin, ürik asit, adenin ve guaninin eş zamanlı tayini için melamin monomeri ve Ag iyonlarını çevrimli voltametri ile camı carbon elektrot yüzeyinde kopolimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kare dalga voltametrisi ile ilgili dört türün net olarak piklerinin birbirinden ayrıldığı gösterilmiştir. DA, UA, G ve A için tayin sınırları sırayla 10, 100, 8 ve 8 nM olarak belirlenmiştir. Sensörün kararlılık testleri incelendiğinde 2 hafta sonunda DA, UA, G ve A için pik akımları sırayla % 90,2, % 89,8, % 94,6 ve % 93,5 azaldığı görülmüştür [30].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Araç ve Gereçler

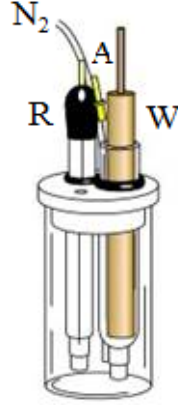
Elektrokimyasal analizör olarak BAS (Bioanalytical Systems, Inc) 100W kullanılmıştır. Analizör masaüstü bir bilgisayara bağlanarak cihazın program arayüzünün kontrolü ve verilerin depolanması gerçekleştirilmiştir. Ölçüm çözeltisinden gaz geçirilmesi ve çözeltinin karıştırılması da yine ilgili cihaz yardımıyla yapılmıştır. Analizör genel hatlarıyla Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. BAS 100W elektrokimyasal analizör

Faraday kafesi görevini gören C2 hücre kafesi (cellstand) sayesinde ölçüm ortamı, dış elektrik ve manyetik etkilerden yalıtılmıştır. Kullanılan referans elektrot, periyodik olarak kontrol edilmiştir. Çözelti pH'ları, Jenway 3010 pH metre ile ayarlanmıştır. Kimyasalların tartımı için Mettler Toledo Ab204-S terazi kullanılmıştır.

Çalışmalarda aşağıda gösterilen, yaklaşık 10 mL hacimli pyrex cam hücreler kullanılmış; ölçüm çözeltisinin hacmi ise 5 mL olarak tutulmuştur.



Şekil 3.2. Mikro hücre ve montajı; A: yardımcı elektrot, W: çalışma elektrodu, R: referans elektrot [32]

3.1.1. Elektrotlar

Çalışma elektrodu olarak modifiye edilmiş GCE (CHI) elektrot, referans elektrot olarak 3 M KCl içinde Ag/AgCl (CHI) ve yardımcı elektrot olarak da platin tel kullanılmıştır.

3.1.1.1. Elektrotların Temizliği

Çalışma elektrodu olarak kullanılan GCE elektrotların temizliğinde, tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için her ölçümden önce elektrot yüzeyi aşağıda gösterildiği şekilde temizlenmiştir:

1. Zımpara temizleme pedi bir miktar distile su ile ıslatıldıktan sonra $1\mu\text{m}$ gözenek boytundaki alümina ped üzerine aktarılmış ve camsı karbon elektrot dairesel hareketlerle bir süre çevrilmiştir. Aynı işlem naylon ve kadife ped üzerinde sırasıyla $0,3\mu\text{m}$ ve $0,15\mu\text{m}$ alümina kullanılarak tekrarlanmıştır.

2. Elektrot yüzeyi her temizleme pedi öncesinde distile su ile temizlenir. Son olarak yüzeyde kalmış olabilecek alümina parçacıklarını uzaklaştırmak için ultrasonik banyoda 5 dakika boyunca distile su içerisinde bekletilir.

3. Belirtilen süre sonunda elektrot yüzeyi distile su ve etil alkolle temizlenerek kurumaya bırakılır.

4. Bu temizleme işlemi polimerik yapıyı yüzeyden yeterince temizlemeye yetmediği için elektrot önce HNO_3 (1:1) içerisinde ultrasonik banyoda 30 dakika boyunca bekletilmiş ve bu süre sonunda sırasıyla saf su ve etil alkol ile yıkanarak kurutulmuştur.

5. Kurumuş olan elektrodun 0,1 M H₂SO₄ çözeltisi içerisinde -500 ile +1500 mV arasında 20 taramalık CV'si alınarak elektrokimyasal olarak temizlenmiştir [33].

Referans elektrotlar distile su ile yıkanmış ve kullanılmadığı zaman 3 M KCl çözeltisi içinde saklanmıştır. Yardımcı elektrot olarak kullanılan platin elektrotların temizliği ise ateşle ısıtılarak yapılmıştır.

3.1.2. Modifiye Elektrotların Hazırlanması

Nano-Au/PA/GC Elektrotlar: Temiz GCE yüzeyine destek elektroliti olarak KCl içeren anilin çözeltisinden çevrimli voltametri yöntemi ile elektropolimerik film kaplanmıştır. Çevrimli voltametri 0 V ile (+1.7 V) potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Polimerik film üzerine H₂SO₄ içeren H₂AuCl₄ çözeltisinden yine çevrimli voltametri yöntemi ile altın nanoparçacık kaplaması yapılmıştır. Burada kullanılan çevrimli voltametri parametreleri ise 0 V ile (+1.2 V) potansiyel aralığı, 100 mV/s tarama hızı olarak kullanılmıştır. Her iki deneysel aşama için çevrim sayısı ile film kalınlıkları değiştirilmiştir.

Nano-Au/PNMPy/GC Elektrotlar: Temiz GCE yüzeyine destek elektroliti olarak KCl içeren *N*-metilpirol ve H₂AuCl₄ çözeltisinden eş zamanlı elektropolimerizasyon çevrimli voltametri yöntemi ile yapılmıştır. Çevrimli voltametri (-1.5 V) ile (+2.5 V) potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Çevrim sayısı değiştirilerek nanokompozit karakterdeki sensörün film kalınlıkları değiştirilmiştir.

Nano-Au/PASA/GC Elektrotlar: Temiz GCE yüzeyine destek elektroliti olarak KCl içeren anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden çevrimli voltametri yöntemi ile elektropolimerik film kaplanmıştır. Çevrimli voltametri (-1.0 V) ile (+ 1.0 V) potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Polimerik film üzerine H₂SO₄ içeren H₂AuCl₄ çözeltisinden yine çevrimli voltametri yöntemi ile altın nanoparçacık kaplaması yapılmıştır. Burada kullanılan çevrimli voltametri parametreleri ise 0 V ile (+1.2 V) potansiyel aralığı, 100 mV/s tarama hızı olarak kullanılmıştır. Her iki deneysel aşama için çevrim sayısı ile film kalınlıkları değiştirilmiştir.

3.1.3. Modifiye Elektrotların Analiz Amaçlı Kullanımı

Hazırlanan modifiye elektrotlar ile analitlerin tayini 0,1 M fosfat tamponunda (PBS) DPV tekniği ile gerçekleştirilmiştir. PBS farklı pH'larda hazırlanarak ilgili sensör için optimizasyon yapıldıktan sonra deneyler optimum pH'da gerçekleştirilmiştir. DPV için kullanılan ölçüm parametreleri ise (-0.2 V) ile (+1.7 V) potansiyel aralığında, 20 mV/s tarama hızında, puls genliği 50 mV, örnek genişliği 20 ms, puls genişliği 50 ms, puls periyodu 200 ms'dir. Hazırlanan modifiye elektrotlar kullanılmadıkları zamanlarda PBS içerisinde bekletilerek muhafaza edilmiştir.

3.1.4. 0,1 M Fosfat Tamponunun Hazırlanması

Ölçümler sırasında kullanılan 0,1 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 27,22 g (0,2 mol) KH_2PO_4 , 14,20 g (0,1 mol) Na_2HPO_4 , 2,24 g KCl (0,03 mol) ve 73,05 g NaCl (1,25 mol) içermektedir. Çözeltinin pH'sı gerekliyse, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle ayarlandı.

3.1.5. DNA örneklerinin Hazırlanması ve Baz Oranlarının Hesaplanması

10 mg balık spermine ait DNA 1 mL saf suda çözüldükten sonra kaynamakta olan su banyosuna yerleştirilmiştir ve 60 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda buz banyosuna alınarak denatürasyon tamamlanmıştır. Ölçümlerde kullanılmak üzere denatürasyonu tamamlanan çözeltiden 50 μL alınarak PBS ile son hacim 5 mL olacak şekilde seyreltilmiştir.

Baz oranlarının hesaplanmasında standart katma yöntemi kullanılmıştır. Derişimi bilinmeyen ve son hacim 5 mL olacak şekilde hazırlanan tek sarmal DNA (ssDNA) üzerine her seferinde 5 μM guanin ve 5 μM adenin olacak şekilde enjeksiyonlar yapılmış ve DPV'leri alınmıştır. Her DPV sonucundan elde edilen adenin ve guanine ait pik akımları derişime karşı grafiğe geçirilmiş ve sıfır derişim noktasına ekstrapole edilerek adenin ve guanin derişimleri okunmuştur.

3.2. Kimyasal Maddeler

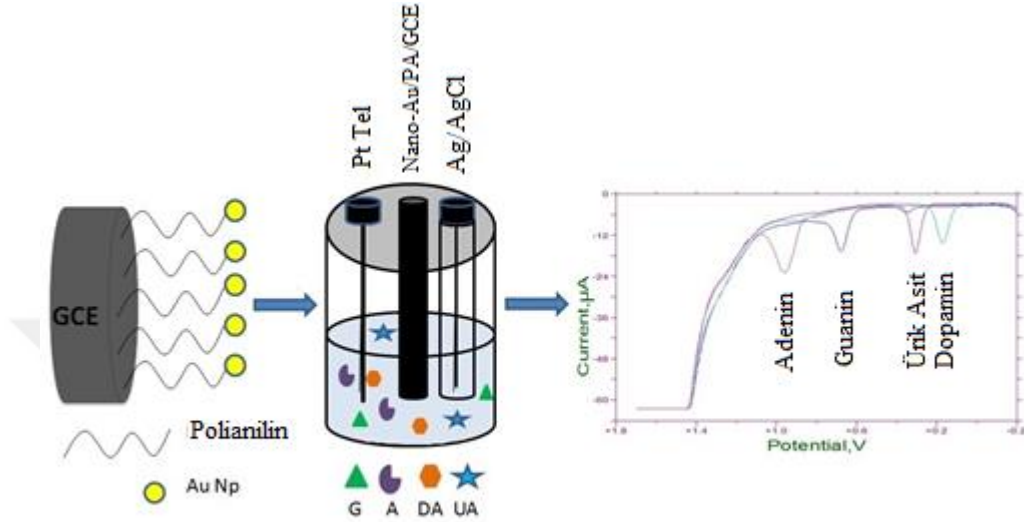
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve alındıkları firmalar

Madde Adı	Maddenin Satın Alındığı Firma
Anilin	Merck
N-metil Pirel	Merck
Anilin-2-sülfonik Asit	Merck
Guanin	Acros Org.
Adenin	AppliChem.
Dopamin	Alfa Aesar
Ürik Asit	Merck
HAuCl ₄	Alfa Aesar
Fish Sperm DNA	Sigma
KCl	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Sigma
KH ₂ PO ₄	Sigma

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

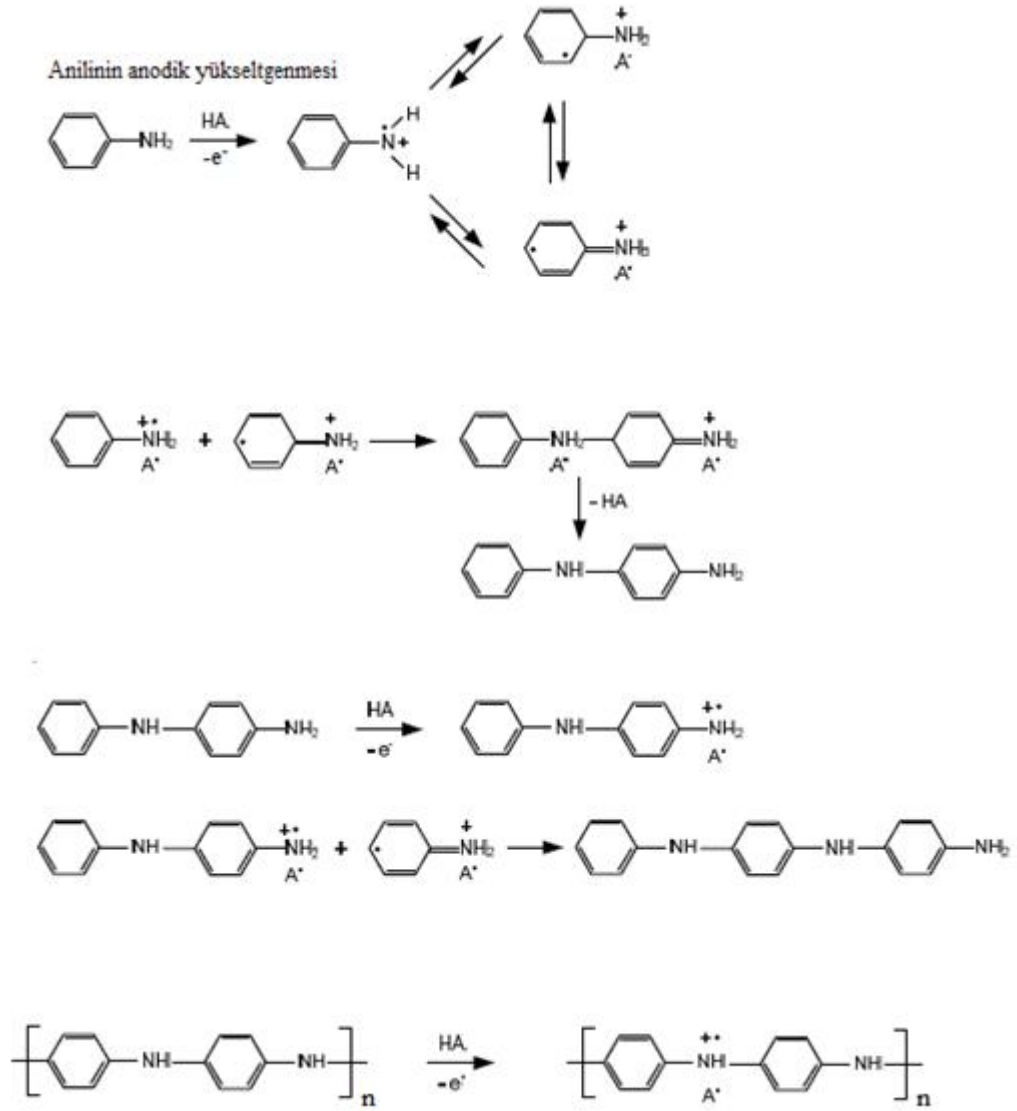
4.1. Polianilin Altın Nanoparçacık Modifiye Elektrot

Şekil 4.1.'de camsı karbon elektrot yüzeyinde oluşturulan kompozit film şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Polianilin/NanoAu/GC elektrodun şematik gösterimi [34]

Asidik sulu ortamda hazırlanan anilin çözeltisinden çevrimli voltametri yöntemi ile camsı karbon elektrot yüzeyinde elektropolimerik film oluşturulmuştur. Şekil 4.2'de anilin elektropolimerizasyonu için olası bir mekanizma gösterilmiştir. Film kalınlığı çevrim değiştirilerek kontrol edilmiştir. Daha sonra hazırlanan elektropolimerik film üzerine HAuCl_4 çözeltisinden yine çevrim sayısı kontrol edilerek altın nanoparçacık biriktirmek suretiyle, nanokompozit elektrot hazırlanmıştır.

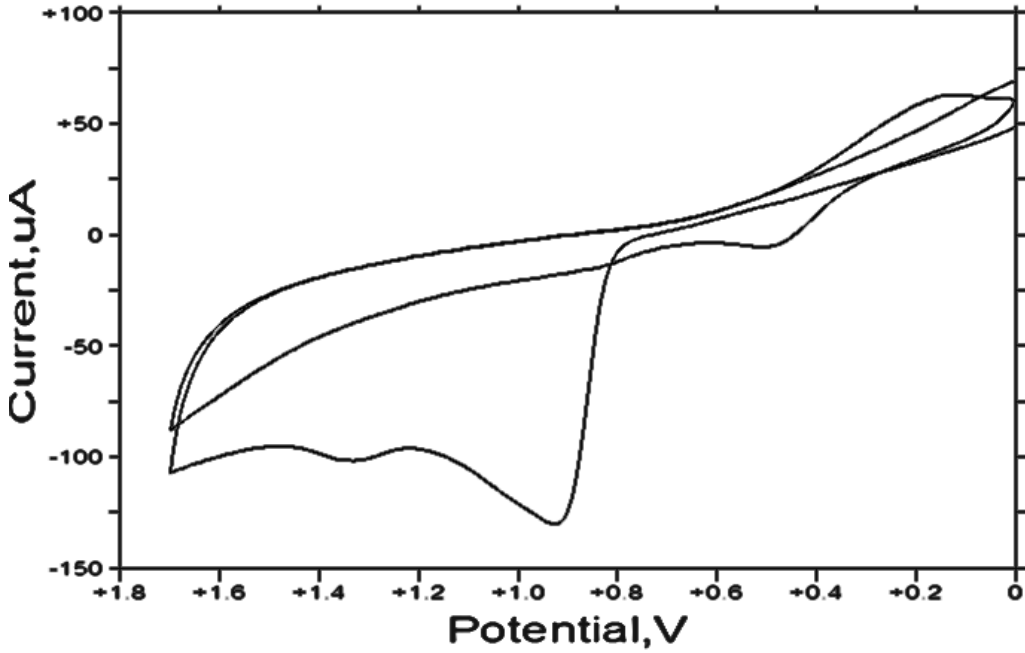


Şekil 4.2. Anilinin elektrokimyasal polimerizasyonu için şematik gösterim [35]

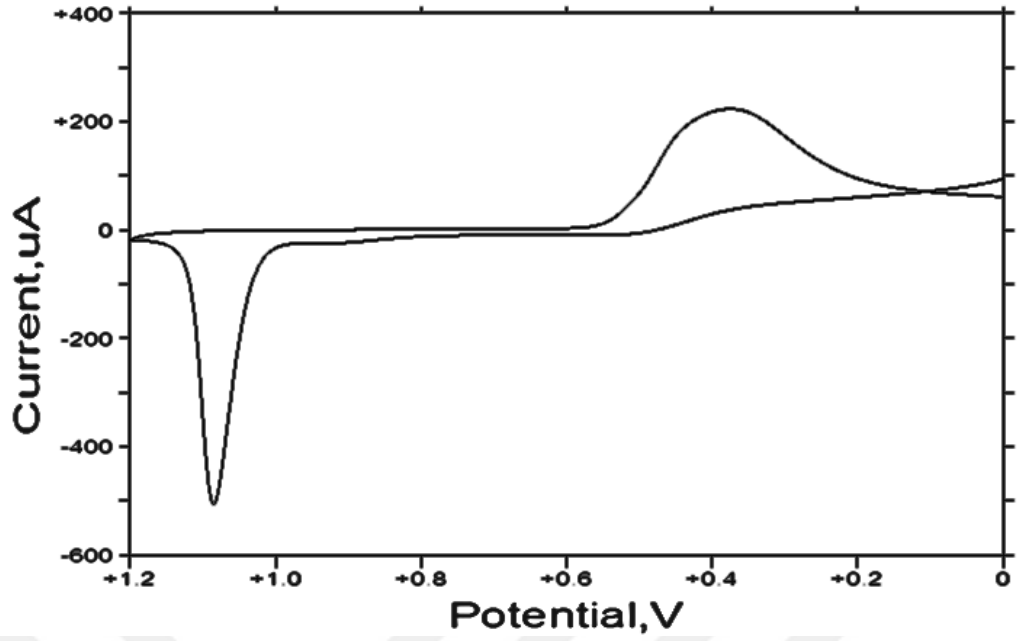
4.1.1. Altın Nanoparçacık Modifiye Polianilin Elektrodun Hazırlanması

Temiz GCE yüzeyinde hazırlanması planlanan polimerik filmin guanine, adenin, dopamin ve ürik aside karşı elektokatalitik etkisini araştırmak için; 0,5 M H_2SO_4 içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinden çevrimli voltametri ile 4 çevrimlik film oluşturulmuştur. Elektropolimerizasyon öncesinde monomer çözeltisinden 10 dakika boyunca N_2 gazı geçirilmiş ve elektropolimerizasyon esnasında çözelti yüzeyinde bir katman oluşturacak şekilde hücreye N_2 gazı gönderilmiştir. Her polimerizasyon öncesinde ve esnasında aynı işlem tekrarlanmıştır. Şekil 4.3 incelendiğinde aniline ait +0,9 V' luk yükseltgenme potansiyeli ikinci çevrimde +0,5 V'a kaymıştır. İkinci çevrimde pik potansiyelinin

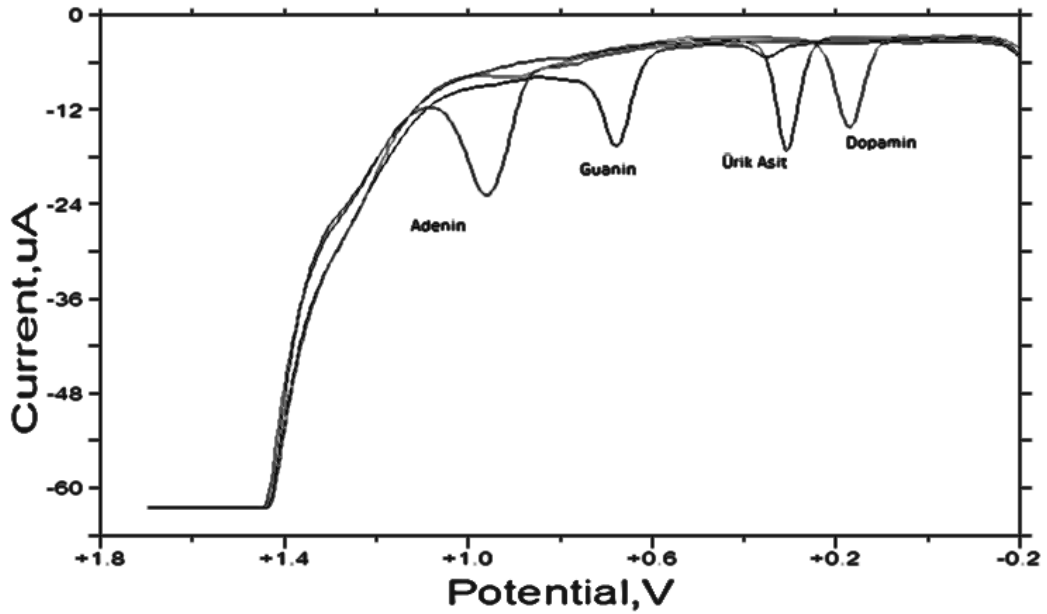
kaymasıyla birlikte oluşan yeni pik akımı, yüzeyde iletken polimerik filmin oluştuğunun göstergesidir. Hazırlanan polimerik elektrot ile 100'er μM 'lık guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları incelendiğinde; bu dört türün pik potansiyellerinin birbiriyle çakışmayacak şekilde ayrıldığı görülmüştür. Bu filmin üzerine 0,5 M H_2SO_4 içerisinde 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden 2 çevrimlik altın nanoparçacık kaplanarak bahsedilen analitlerin yanıtları tekrar incelendiğinde; mevcut elektrodun hem elektrokatalitik etki gösterdiği hem de altın nanoparçacık sayesinde pik akımlarının arttığı gözlenmiştir. Pik akımlarının artması daha küçük derişimlerde çalışmaya olanak sağlamakta yani hazırlanan sensörün duyarlılığını artırmaktadır. Bu aşamadan sonra guanin yanıtına etki edebilecek parametreler sistematik olarak çalışılarak optimizasyon yapılmıştır.



Şekil 4.3. 0,5 M H_2SO_4 içerisindeki (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin çevrimli voltamogramı



Şekil 4.4. PA/GCE yüzeyinde 0,5 M H₂SO₄ içerisinde 2 mM HAuCl₄ çözeltisinin çevrimli voltamogramı

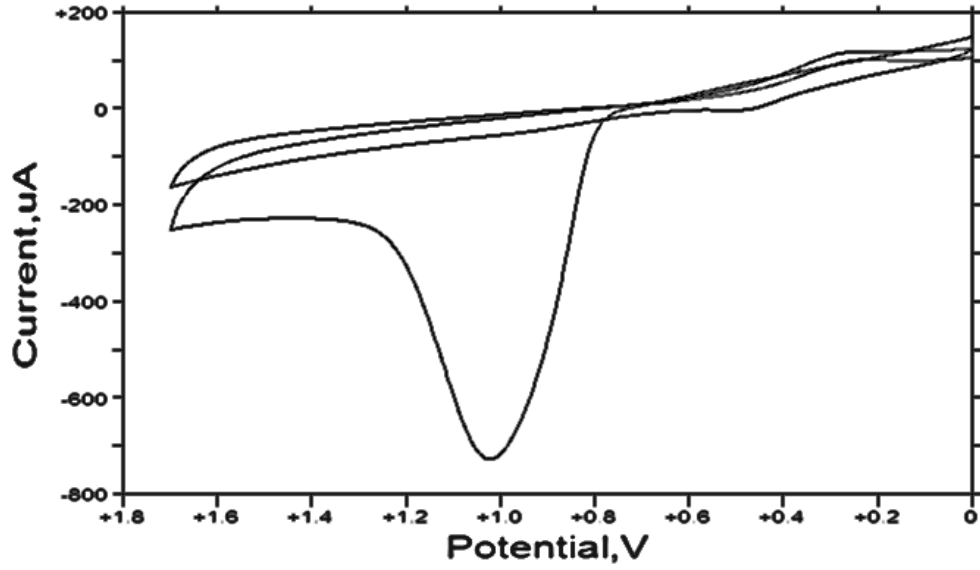


Şekil 4.5. Nano-Au/PA/GC elektrodun PBS pH 7’de 100 µM adenin, guanin, ürik asit ve dopamine ayrı ayrı DPV yanıtları

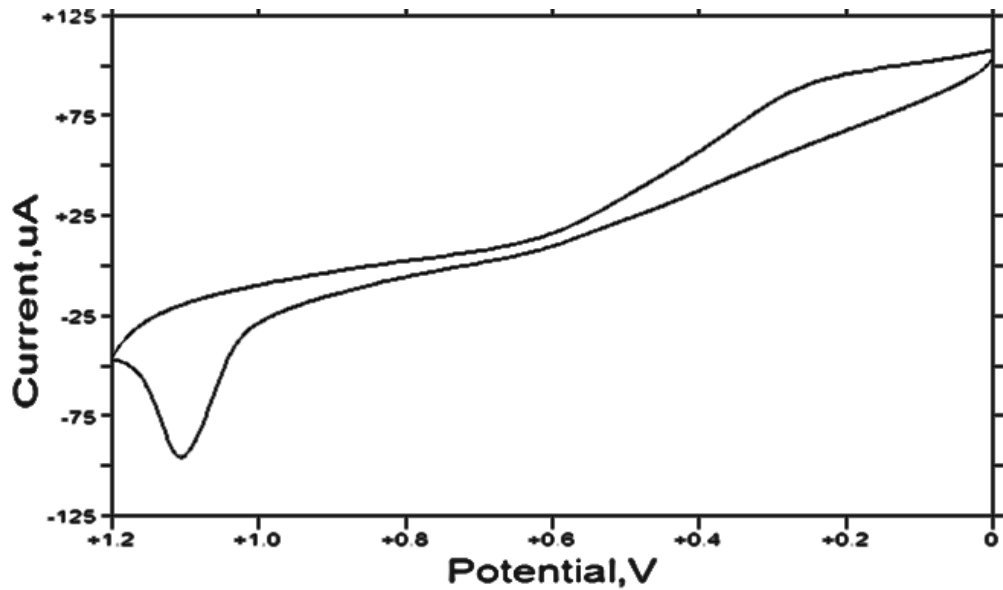
4.1.2. Film Kalınlığının Etkisi

Elektrokatalitik etkiyi incelemek amacıyla hazırlanan polimerik filmin çevrim sayısı referans alınarak, farklı çevrim sayısı ile oluşturulan farklı kalınlıklardaki filmlerin guanin yanıtları kıyaslanmıştır. Bu aşamada HAuCl₄ derişimi ve çevrim sayısı sabit tutularak elektroda altın nanoparçacık kaplanması yapılmıştır. Çevrimli voltametri tekniği ile 0,5 M H₂SO₄ içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM

anilin çözeltisinden 2, 4, 6, 8 ve 10 çevrimlik filmler oluşturularak, her birinin üzerine 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden 2 çevrimlik altın nanoparçacık kaplanmıştır. Elektropolimerizasyon için alınan voltamogramlar 0 - +1700 mV potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. altın nanoparçacık kaplanması sırasında alınan votamogramlar ise 0 - +1200 mV arasında 100 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

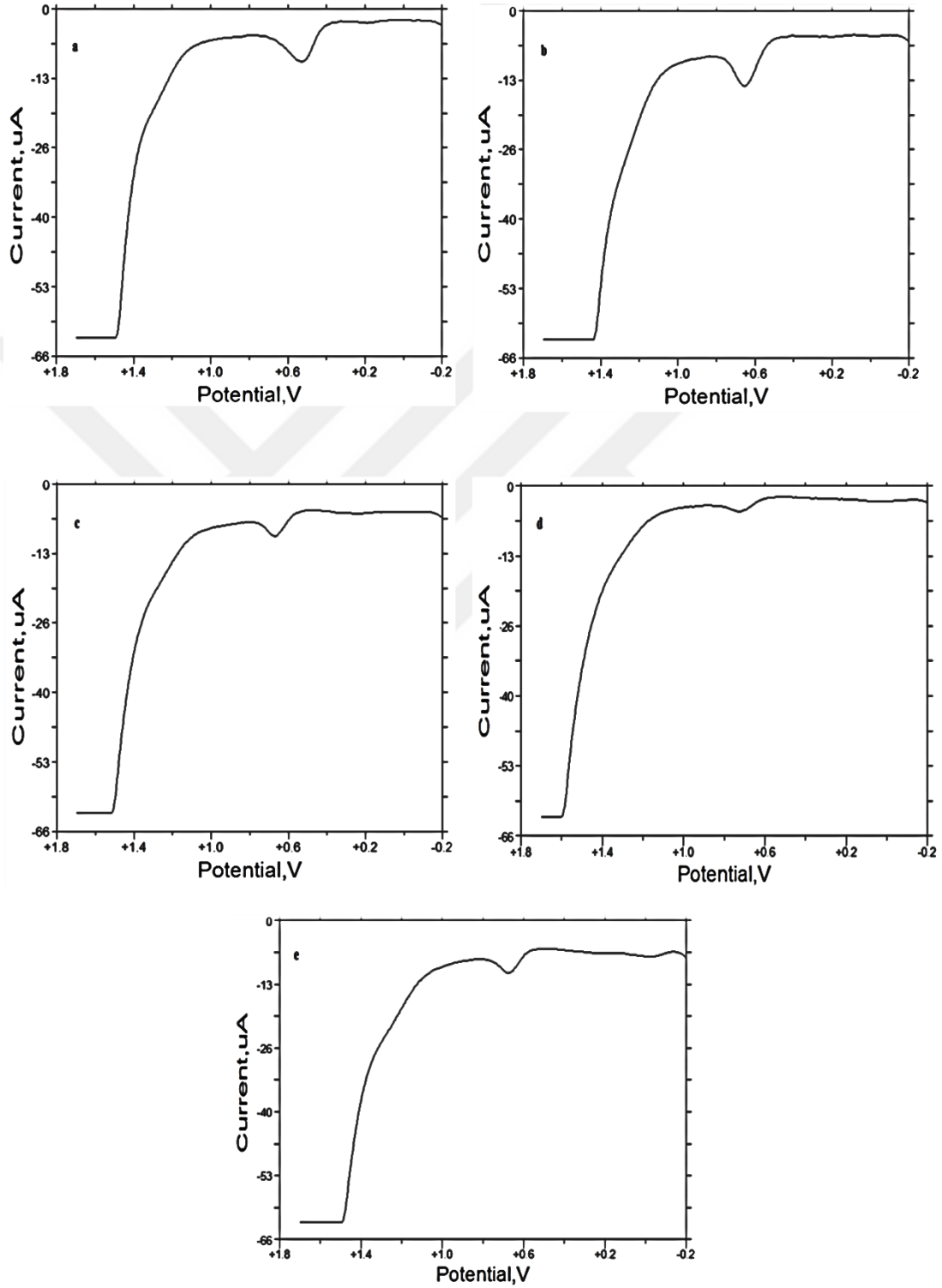


Şekil 4.6.0,5 M H_2SO_4 içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin GCE yüzeyinde 4 çevrimlik voltamogramı

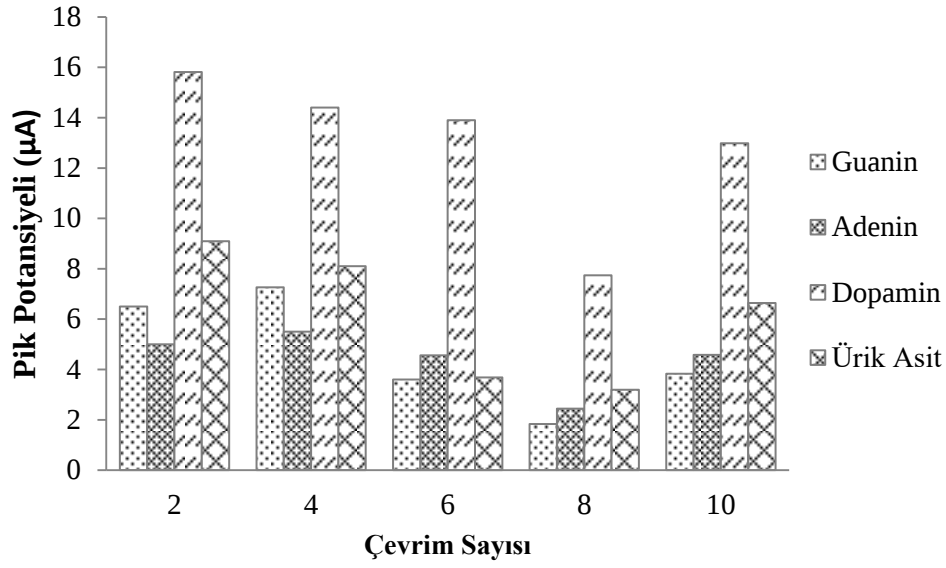


Şekil 4.7. PA/GCE yüzeyinde 0,5 M H_2SO_4 içerisinde 2 mM HAuCl_4 çözeltisinin 2 çevrimlik voltamogramı

Hazırlanan elektrotlar ile guanin, adenin, ürik asit ve dopamin yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Optimizasyon için guanin yanıtları esas alındığından, 4 çevrim olarak hazırlanan filmde guanin yanıtının daha büyük olduğu görülmüştür. Adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları da şekil 4.9’de gösterilmiştir.



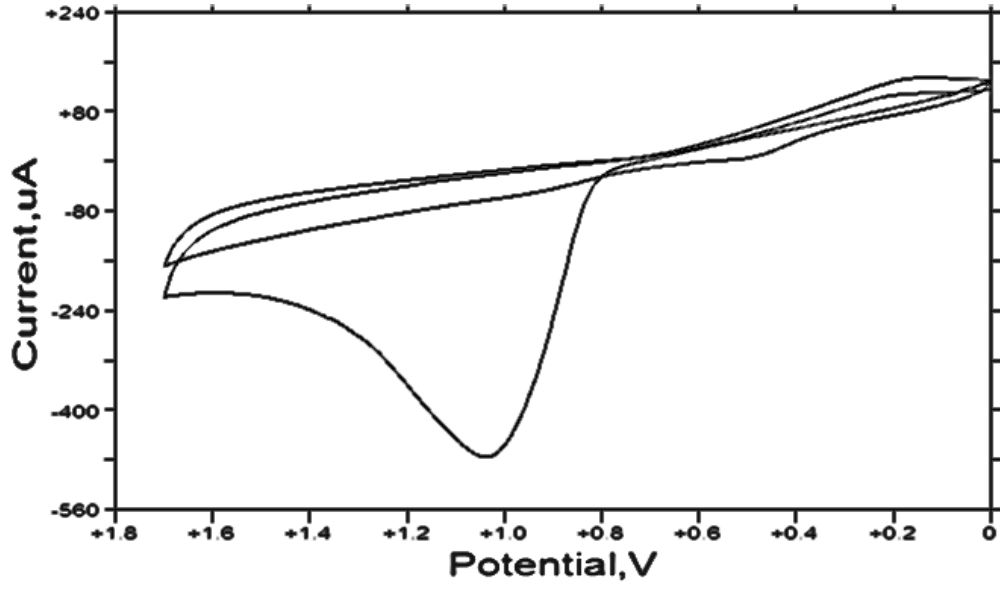
Şekil 4.8. 20 mM anilin çözeltisinden (destek elektroliti 0,1 M KCl) **a)** 2, **b)** 4, **c)** 6, **d)** 8, **e)** 10 çevrim olarak hazırlanıp üzerine 2 mM H_{Au}Cl₄ çözeltisinden 2 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun 100 μM guanin yanıtları



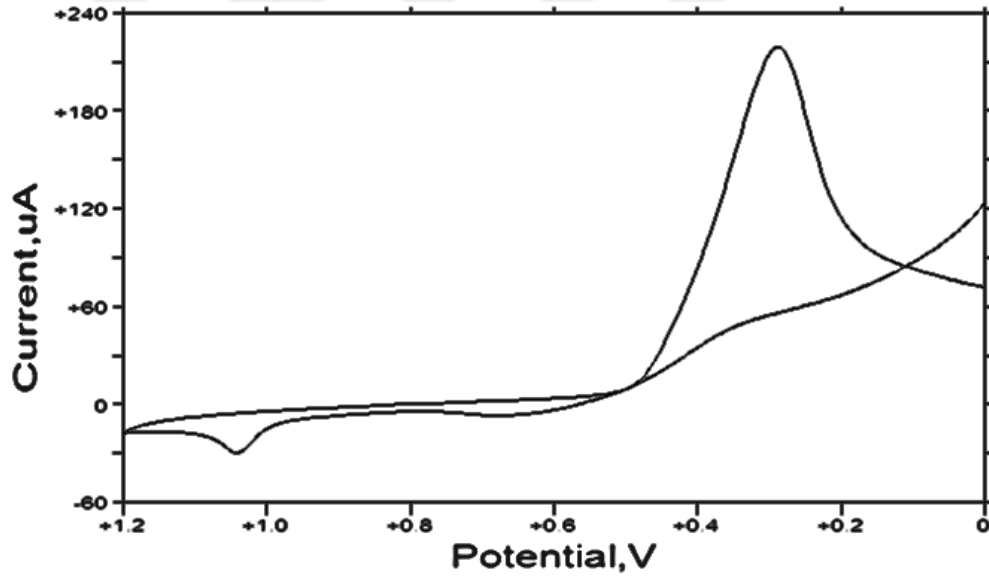
Şekil 4.9. Film kalınlığının guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

4.1.3. Monomer Derişiminin Etkisi

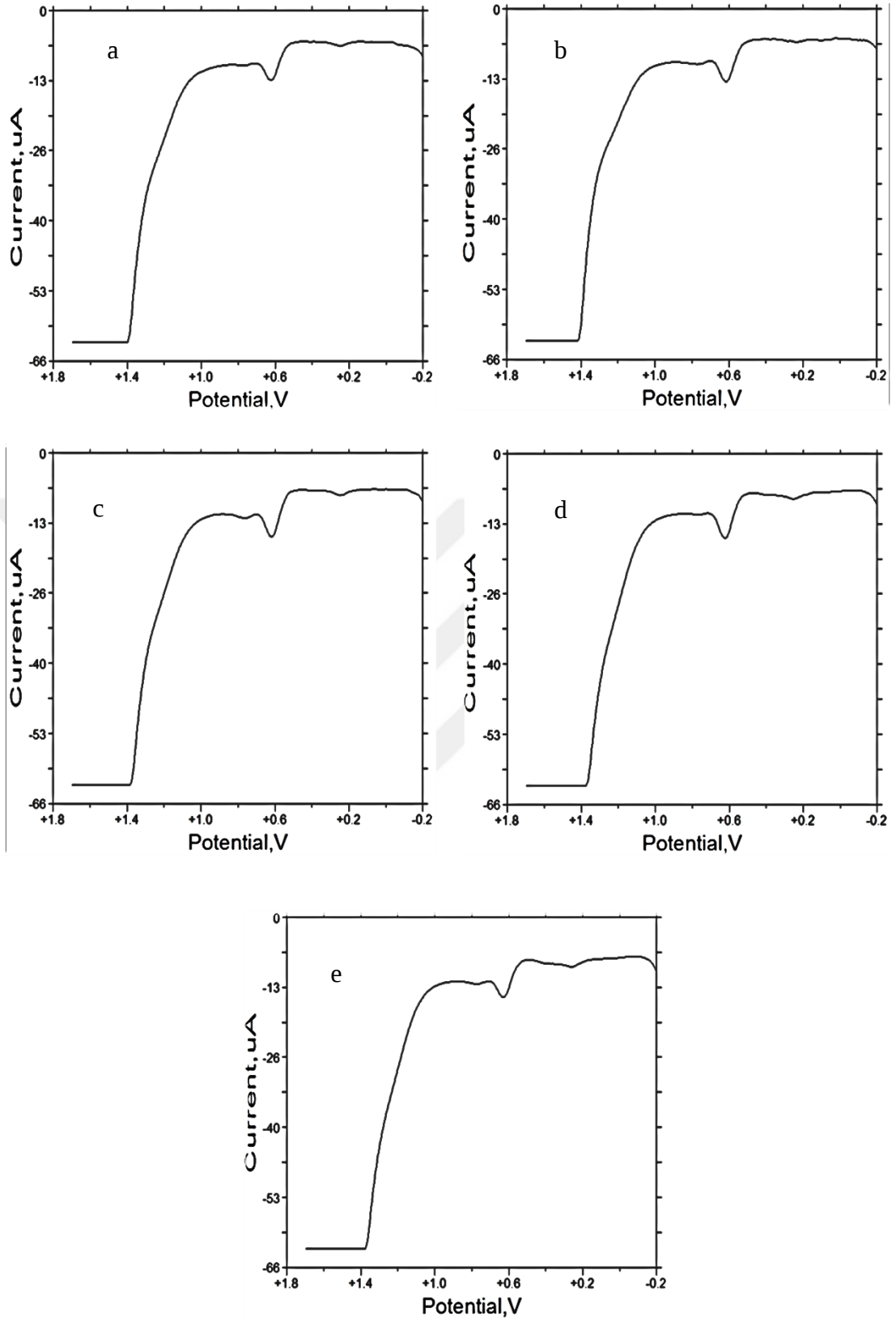
Film kalınlığı optimize edildikten sonra, monomer derişimini optimize edebilmek için HAuCl_4 çözeltisinin derişimi ve çevrim sayısı sabit tutulmuştur. Farklı monomer derişimleriyle hazırlanan 4 çevrimlik filmlerin üzerine yapılan altın nanoparçacık kaplamasından sonra guanin yanıtları esas alınarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 0,5 M H_2SO_4 içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 10, 15, 20, 25 ve 30 mM olarak hazırlanan monomer çözeltilerinden 4 çevrimlik polianilin filmi oluşturulmuş üzerine 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden 2 çevrimlik nano-Au kaplanarak 100 μM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları incelenmiştir. Şekil 4.12’de görülen guanine ait voltamogramlar kıyaslandığında 25 mM monomer çözeltisinden hazırlanan elektrodun guanin yanıtının daha büyük olduğu görülmüştür. Adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ise şekil 4.13’de gösterilmiştir.



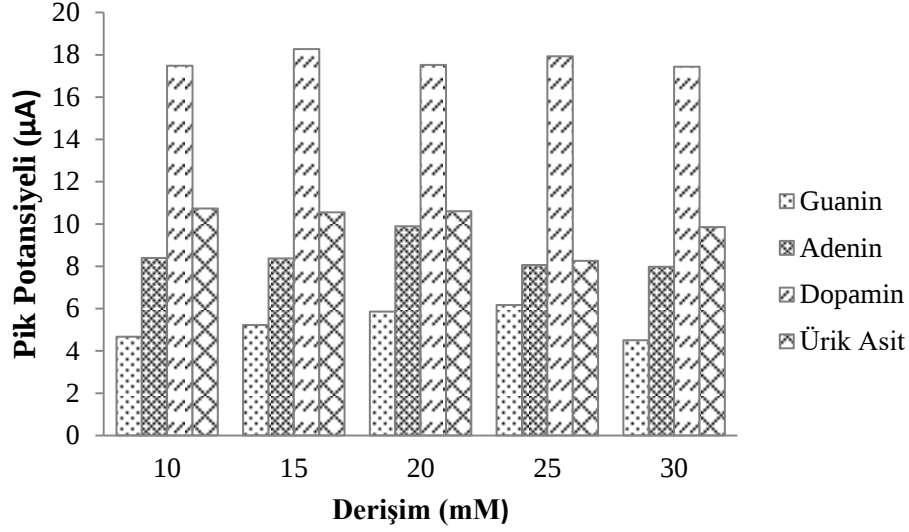
Şekil 4.10. 0,5 M H_2SO_4 içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin GCE yüzeyinde 4 çevrimlik voltamogramı



Şekil 4.11. PA/GCE yüzeyinde 0,5 M H_2SO_4 içerisinde 2 mM HAuCl_4 çözeltisinin 2 çevrimlik voltamogramı



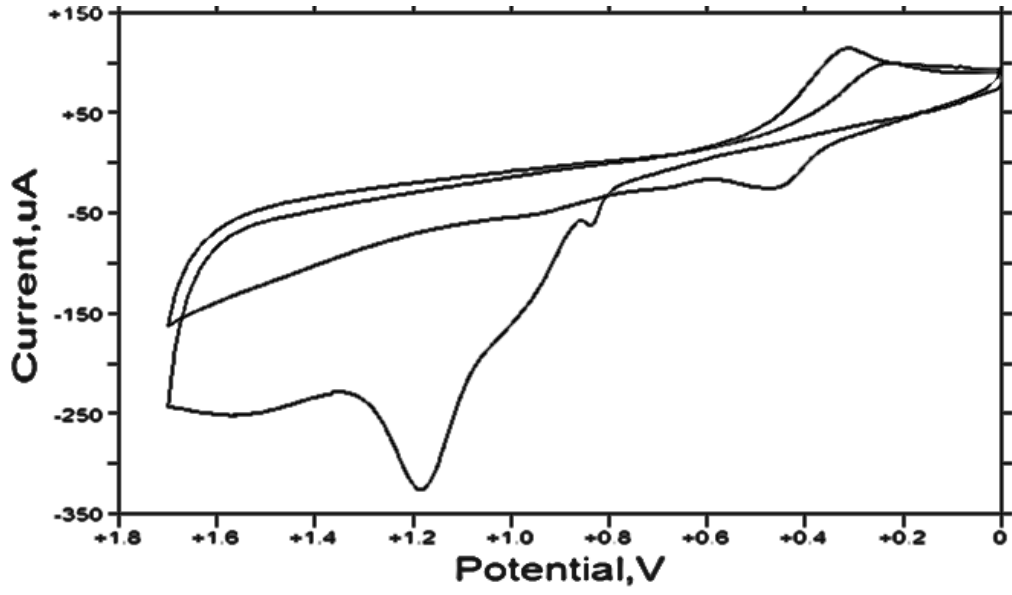
Şekil 4.12.0,1 M KCl içerisinde a) 10 mM, b) 15 mM, c) 20 mM, d) 25 mM, e) 30 mM anilin çözeltisinden hazırlanan nano-Au/PA/GC elektrodun 100 μM guanine yanıtları



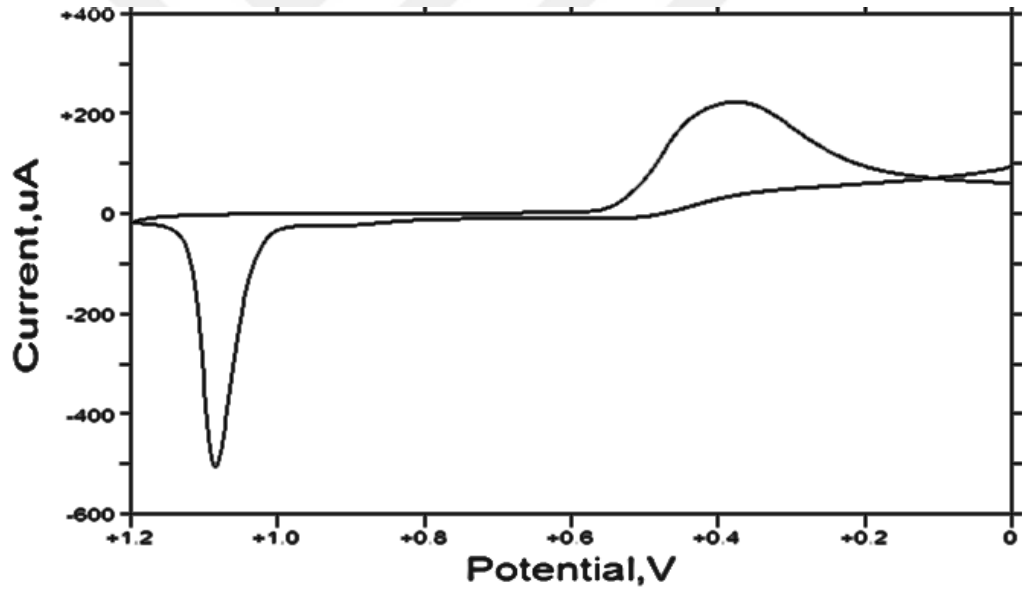
Şekil 4.13. Monomer derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

4.1.4. Polimerizasyon Ortamındaki Destek Elektrolit Derişimi Etkisi

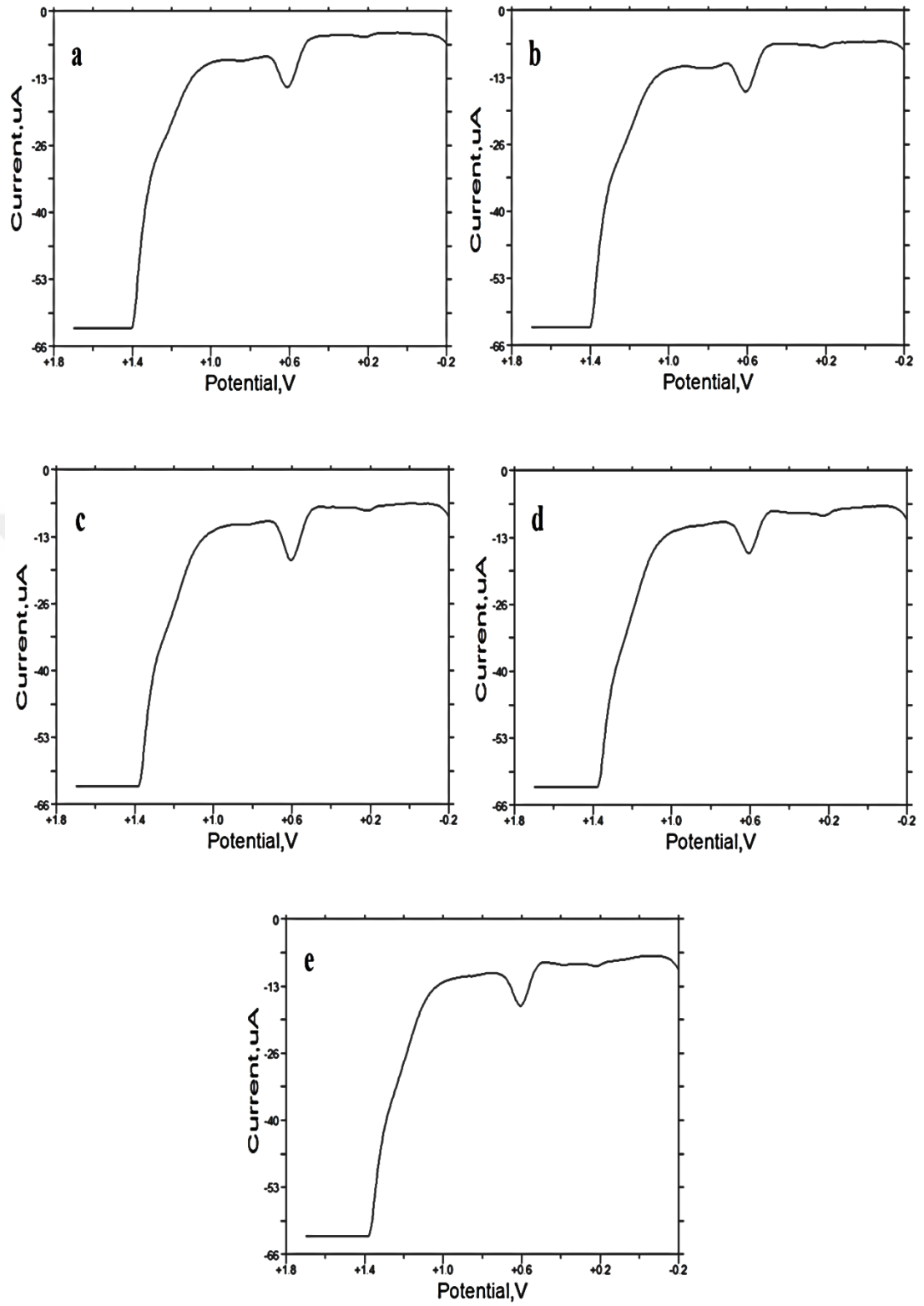
Film kalınlığı ve monomer derişimi optimize edildikten sonra HAuCl_4 çözeltisinin derişimi ve çevrim sayısı sabit tutularak polimerizasyon ortamındaki destek elektrolit derişimini optimize edebilmek için, 0,5 M H_2SO_4 içerisinde farklı derişimlerde KCl çözeltileri hazırlanmıştır. 0,025, 0,05, 0,1, 0,2 ve 0,4 M KCl olacak şekilde hazırlanan 25 mM anilin çözeltisinden 4 çevrimlik filmin üzerine 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden 2 çevrimlik film kaplanmıştır. Hazırlanan nanokompozit elektrot ile 100 μM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar kıyaslandığında 0,1 M KCl ortamında elektropolimerize olan filmle hazırlanan nanokompozit elektrodun guanin yanıtlarının daha büyük olduğu görülmüştür.



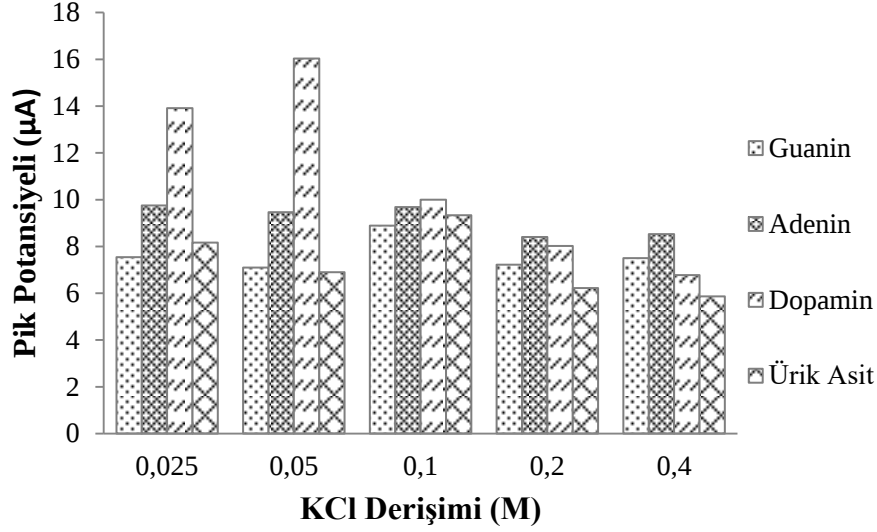
Şekil 4.14. 0,5 M H_2SO_4 içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin GCE yüzeyinde 4 çevrimlik voltamogramı



Şekil 4.15. Polianilin/GCE yüzeyinde 0,5 M H_2SO_4 içerisinde 2 mM $HAuCl_4$ çözeltisinin 2 çevrimlik voltamogramı



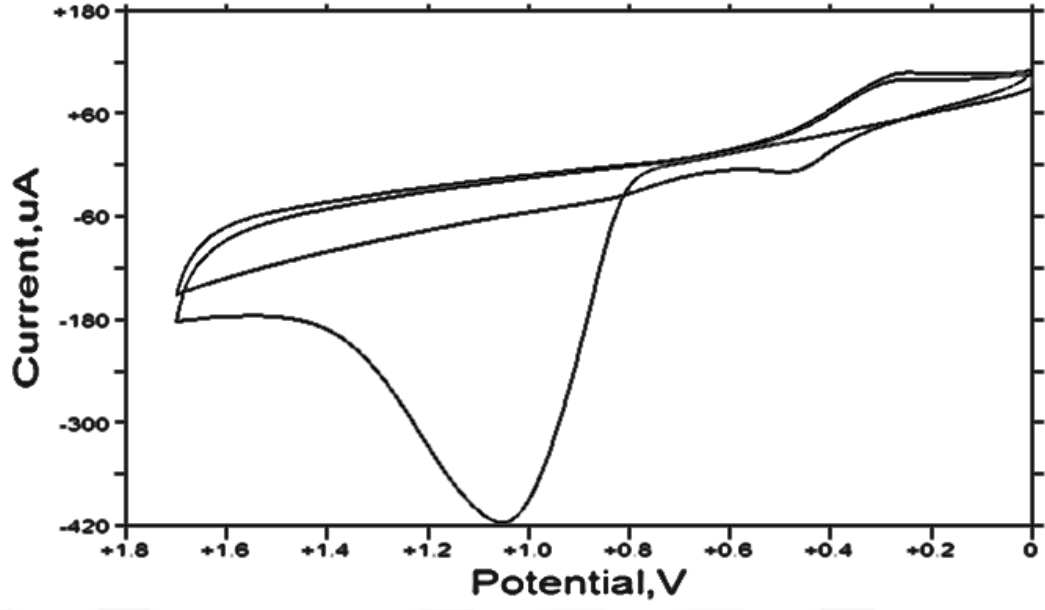
Şekil 4.16. a) 0,025 M, b) 0,05 M, c) 0,1 M, d) 0,2 M, e) 0,4 M KCl içerisinde 25 mM anilin çözeltisinden hazırlanan nano-Au/PA/GC elektrodun 100 μM guanine yanıtları



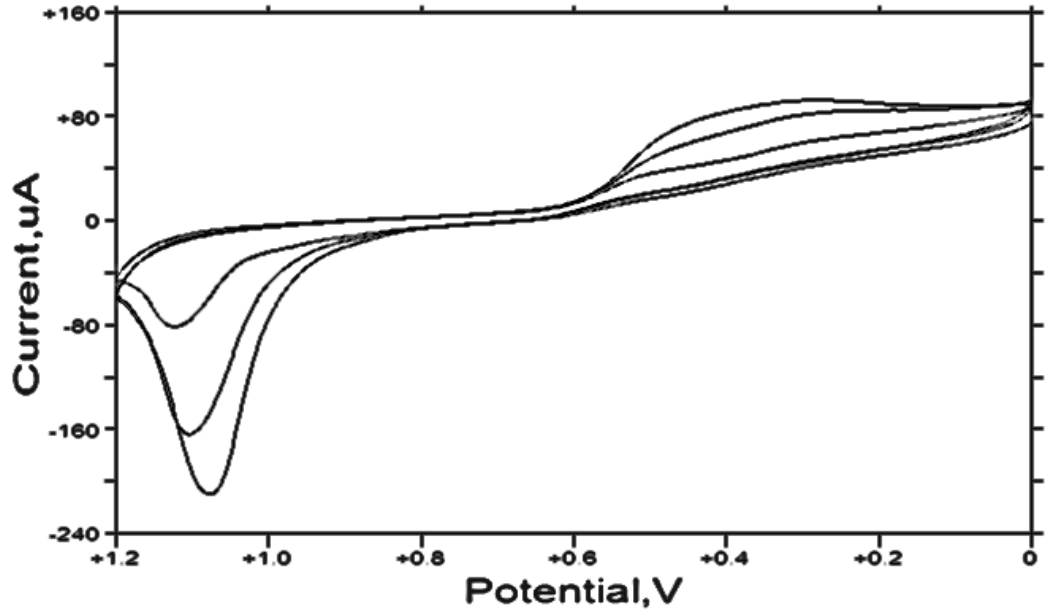
Şekil 4.17. Elektrolit derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

4.1.5. Altın Nanoparçacık Kalınlığının Etkisi

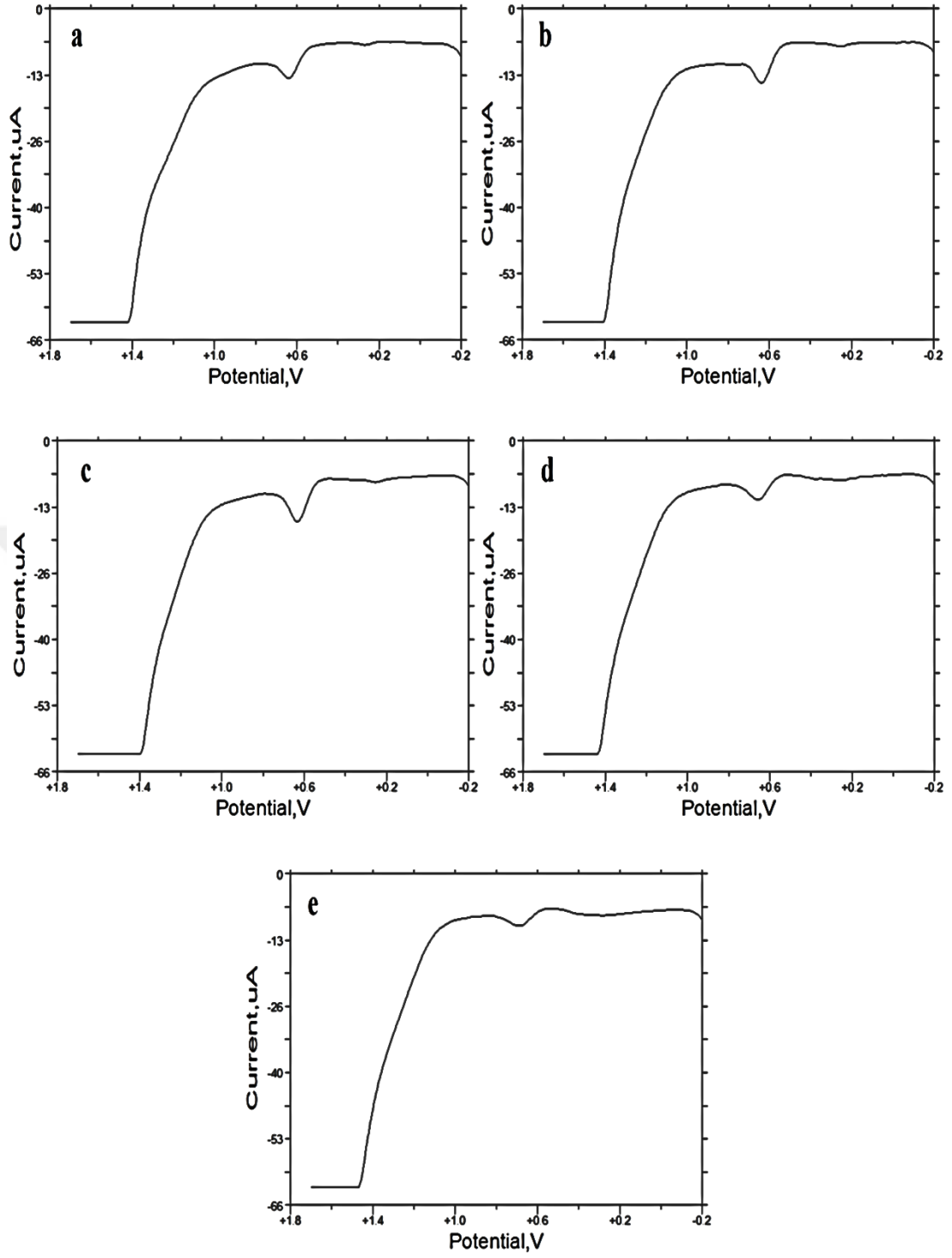
Film kalınlığı, monomer derişimi ve destek elektrolit derişimi optimize edildikten sonra polimerik film üzerine kaplanan altın nanoparçacık tabakasının kalınlığının guanin yanıtları üzerine etkisi araştırılmıştır. 0,5 M H_2SO_4 (destek elektroliti 0,1 M KCl) içerisinde 25 mM anilin çözeltisinden 4 çevrim olarak hazırlanan filmin üzerine 2 mM $HAuCl_4$ çözeltisinden 2, 4, 6, 8 ve 10 çevrim nano-Au kaplanarak 100 μM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları incelenmiştir. Guanin yanıtlarına ait voltamogramlar incelendiğinde 6 çevrim olarak hazırlanan filmin guanin yanıtının daha büyük olduğu görülmüştür.



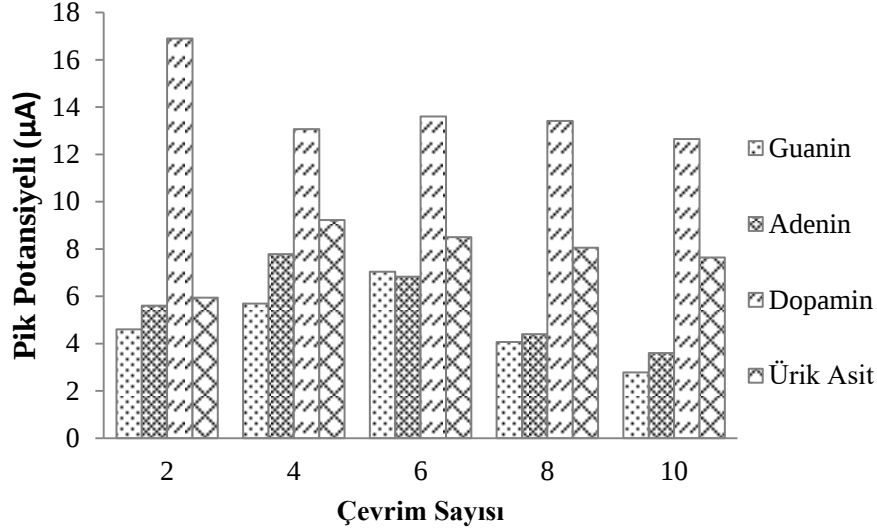
Şekil 4.18. 0,5 M H_2SO_4 içerisinde (destek elektroliti 0,1 M KCl) 20 mM anilin çözeltisinin GCE yüzeyinde 4 çevrimlik voltamogramı



Şekil 4.19. PA/GCE yüzeyinde 0,5 M H_2SO_4 içerisinde 2 mM HAuCl_4 çözeltisinin 6 çevrimlik voltamogramı



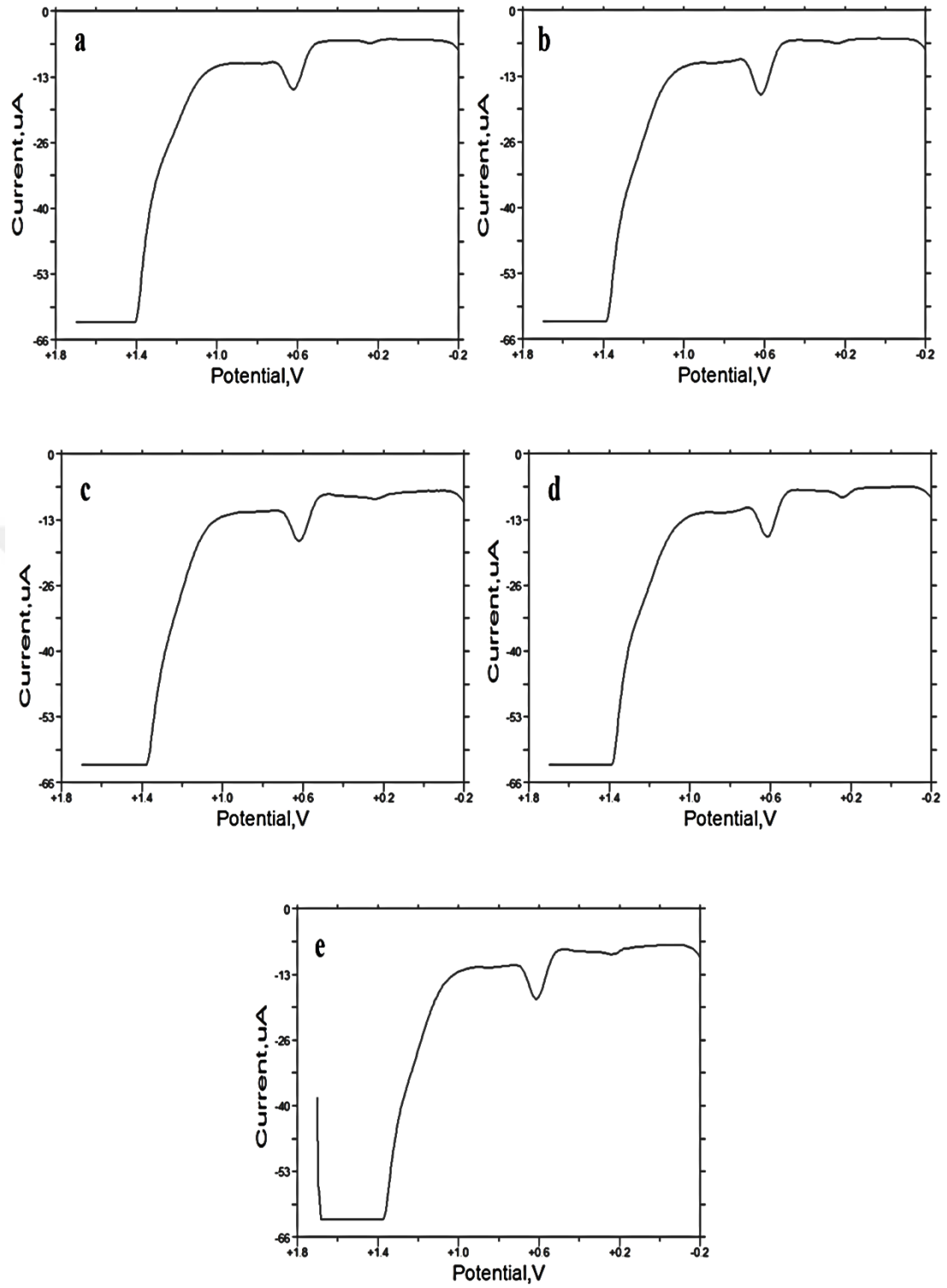
Şekil 4.20. PA üzerine 2 mM H_{Au}Cl₄ çözeltisinden a) 2, b) 4, c) 6, d) 8, e) 10 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun 100 μ M guanin yanıtları



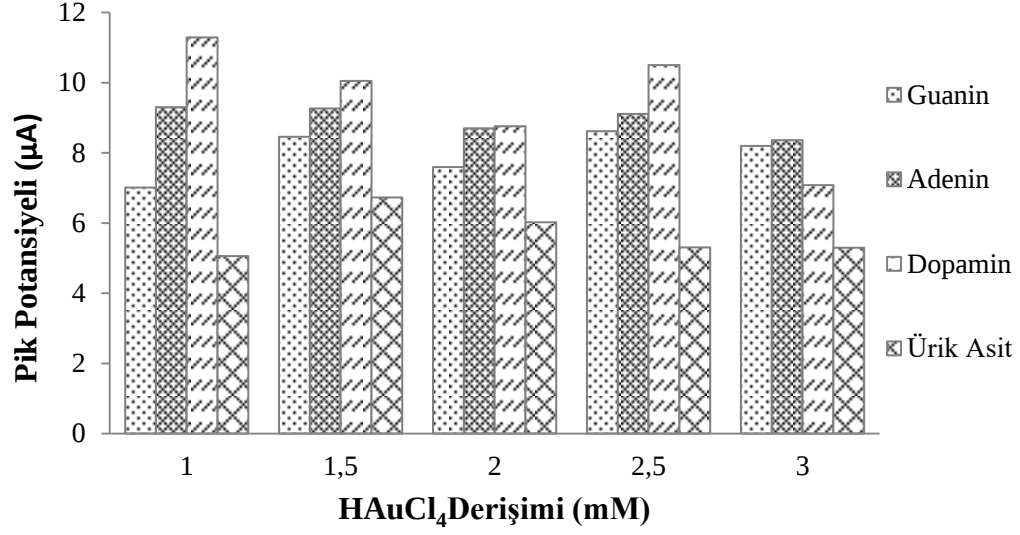
Şekil 4.21. Çevrim sayısının guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

4.1.6. H_{Au}Cl₄ Derişimin Etkisi

Film kalınlığı, monomer derişimi, destek elektrolit derişimi ve altın nanoparçacık kalınlığı optimize edildikten sonra, 0,1 M KCl içerisinde 25 mM anilin çözeltisinden 4 çevrim olarak hazırlanan filmin üzerine 6 çevrim 1, 1,5, 2, 2,5 ve 3 mM H_{Au}Cl₄ çözeltisinden nano-Au kaplanarak 100 µM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlardan 2,5 mM H_{Au}Cl₄ çözeltisi kullanarak hazırlanan filmin guanin yanıtının daha büyük olduğu görülmüştür.



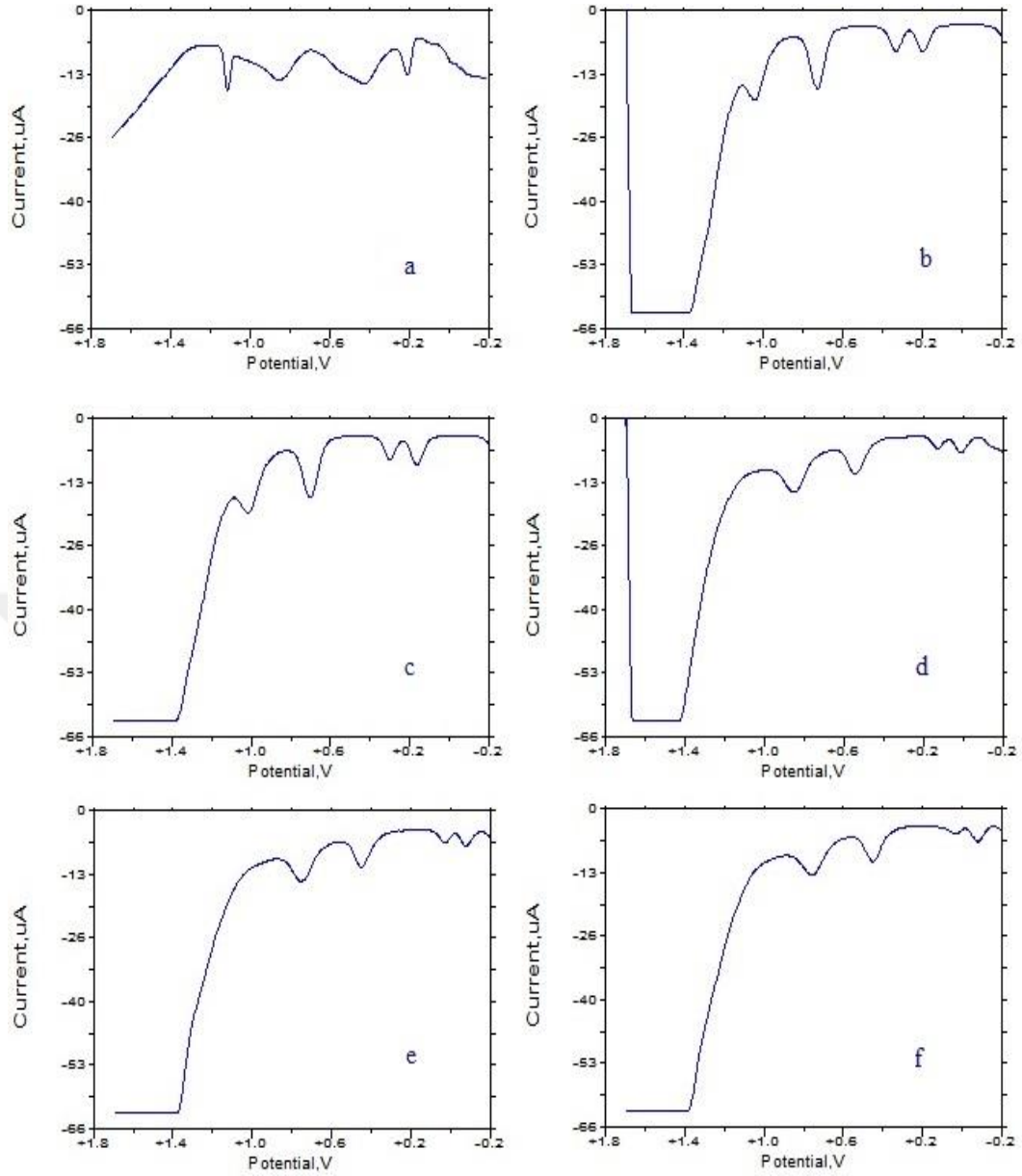
Şekil 4.22. PA film üzerine **a)** 1, **b)** 1,5, **c)** 2, **d)** 2,5, **e)** 3 mM H_{Au}Cl₄ çözeltisinden 6 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun 100 μM guanin yanıtları



Şekil 4.23. HAuCl₄ derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

4.1.7. Guanin Yanıtı Üzerine pH Etkisi

Optimum şartlarda (0,1 M KCl içerisinde 25 mM anilin çözeltisinden 4 çevrim olarak hazırlanan filmin üzerine 2,5 mM HAuCl₄ çözeltisinden 6 çevrim nano-Au) hazırlanan nanokompozit elektrot ile farklı pH'larda 100 µM'lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışım ortamında guanin yanıtları kıyaslanmıştır.



Şekil 4.24. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun **a)** pH 4, **b)** pH 5, **c)** pH 6, **d)** pH 7, **e)** pH 8, **f)** pH 9’da 100 μ M’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışıma ait yanıtları

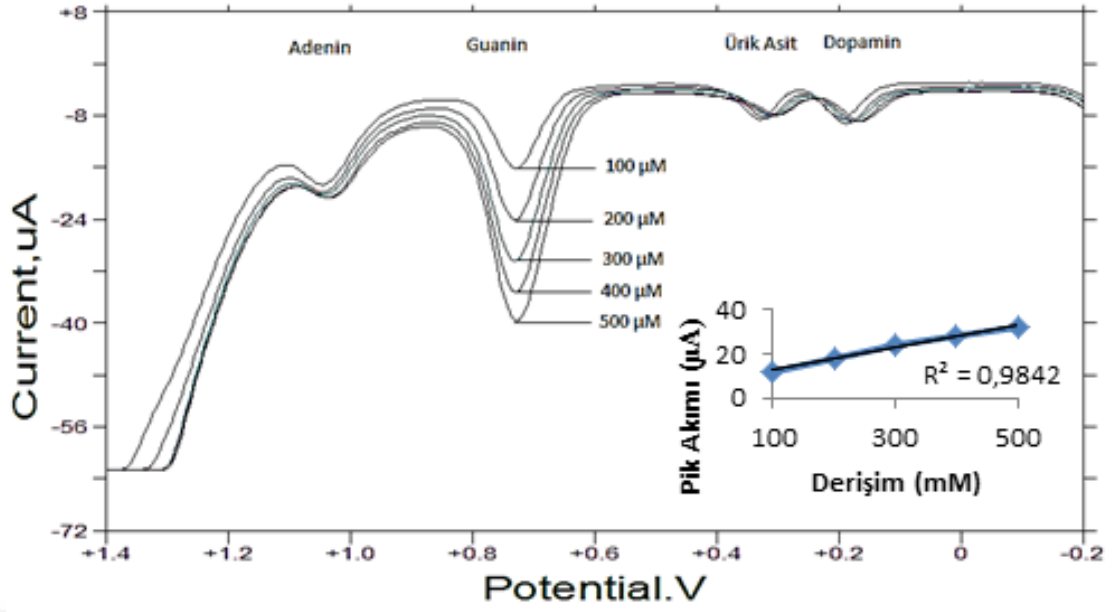
Voltamogramlardan elde edilen sonuçlar, aşağıda tablo halinde sunulmuştur. pH arttıkça pik potansiyelleri negatif potansiyellere doğru kaymaktadır. Pik akımlarında ise guanin için en yüksek yanıtın pH 5’ te olduğu şekil 4.24’de görülmektedir.

Tablo 4. 1. Guanin, adenin, dopamin ve ürik asit pik potansiyel ve pik akımlarının pH'la değişimi

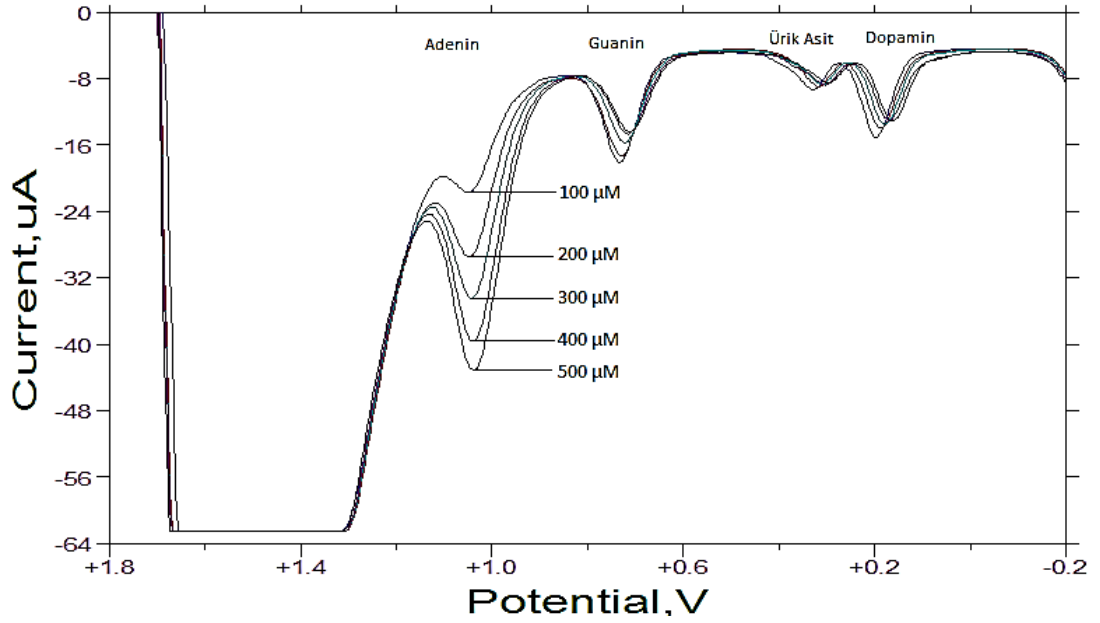
<i>Analitler</i> \ <i>pH</i>	4	5	6	7	8	9
Guanin	857 mV 5,32µA	728mV 11,56µA	704 mV 10,82 µA	468mV 5,88 µA	448mV 5,86 µA	448mV 6,04 µA
Adenin	1143 mV 7,92 µA	1040mV 5,54 µA	1012mV 5,84 µA	780mV 5,4 µA	756mV 5,62 µA	748mV 6,02 µA
Dopamin	229 mV 6,47 µA	196mV 4,66 µA	164mV 5,10 µA	-60mV 2,88 µA	-80 mV 2,9 µA	-76mV 2,717 µA
Ürik Asit	460 mV 8,21 µA	332mV 4,66 µA	300mV 4,26 µA	56mV 2,07 µA	40mV 1,08 µA	28mV 2,16 µA

4.1.8. Guanin, Adenin, Ürik Asit ve Dopaminin Eşzamanlı Tayini

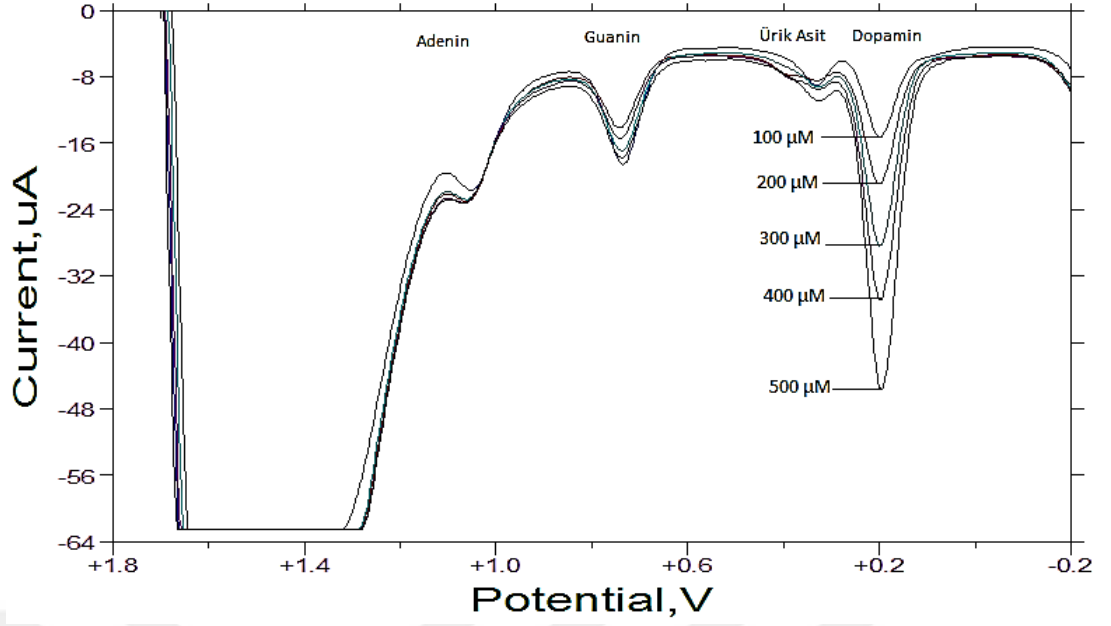
Optimum şartlarda hazırlanan nanoAu/PA/GC elektrodun ilgili analitlerin eşzamanlı tayininde kullanılabilirliğini araştırmak için; her bir analit 100 µM olacak şekilde bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışımın üzerine stok guanin çözeltisinden ortama guanin enjeksiyonu yapılarak, karışım ortamında farklı derişimlerde guanin çözeltileri elde edilmiştir. Bu çözeltilerin yanıtları DPV tekniği ile incelendiğinde, guanin derişimindeki artışa karşılık guanine ait pik akımlarının da arttığı, diğer bileşenlerin pik akımlarının ise değişmediği gözlenmiştir. Yani ortamda guaninle birlikte bulunan adenin, dopamin ve ürik asidin guanin yanıtları üzerine bir girişimi bulunmamaktadır. Voltamogramlardan elde edilen farklı derişimlerdeki pik akımları yardımıyla çizilen kalibrasyon grafiğinde ise, guanin 100-500 µM derişim aralığında pik akımlarının oldukça doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Aynı işlem adenin, ürik asit ve dopamin için tekrarlandığında, ortamda bir türün derişiminin artırılmasının, diğer türlerin yanıtlarını değiştirmedeği görülmüştür.



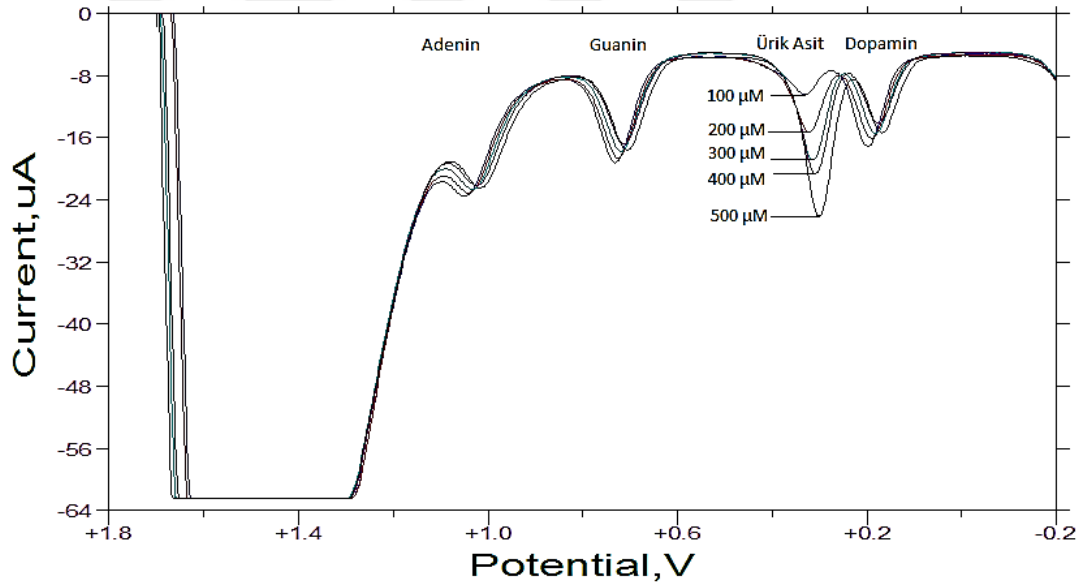
Şekil 4.25. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 μ M’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan guanin derişim yanıtları



Şekil 4.26. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 μ M’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan adenin derişim yanıtları



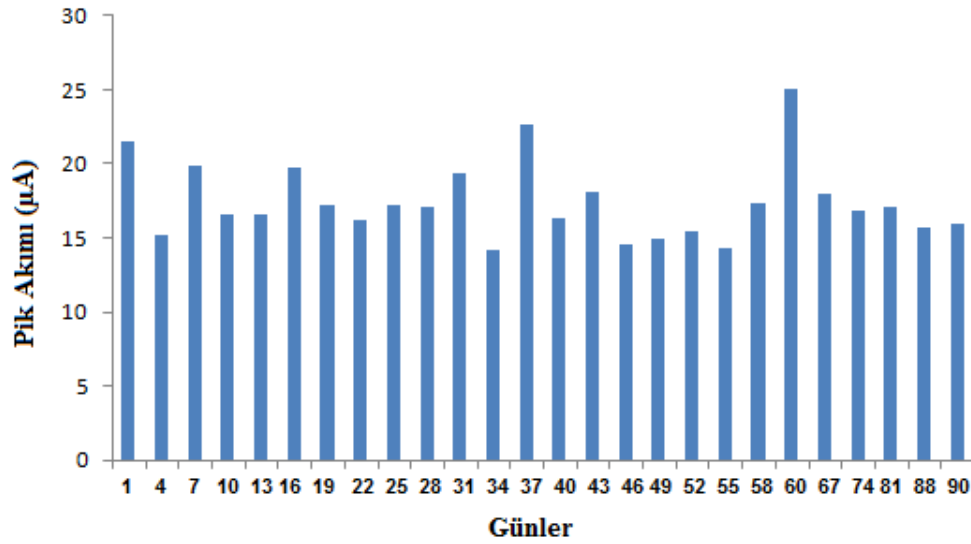
Şekil 4.27. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 μM ’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan dopamin derişimi yanıtları



Şekil 4.28. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 μM ’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan ürik asit derişim yanıtları

4.1.9. Kararlılık

Optimum şartlarda hazırlanan nano-Au/PA/GC elektrodun zamanla guanin yanıtını incelemek amacıyla; optimize elektrodun üç günde bir 100 μM guanin yanıtları incelenmiştir. Elektrot, kullanılmadığı zamanlarda PBS (pH 5) içerisinde bekletilmiştir. Aşağıdaki grafikte gün bazında, guanin yanıtları gösterilmiştir. Her sütun 3 guanin ölçümünün ortalamasıdır.

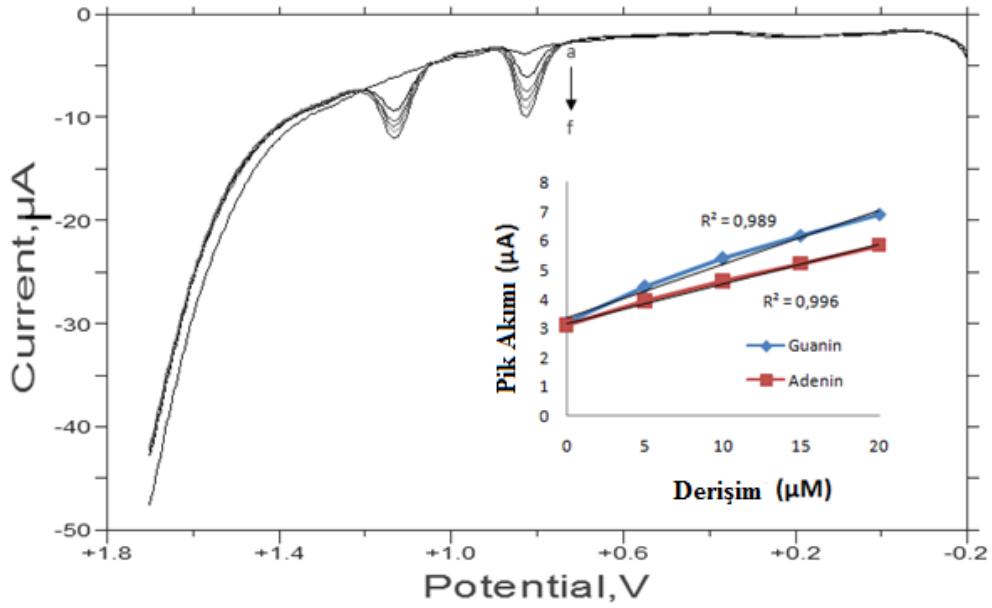


Şekil 4.29. Optimize elektrodun kararlılığı

4.1.10. DNA Örnekleri

Gerçek DNA örneklerindeki guanin ve adenin derişim oranlarını hesaplayabilmek için balık spermine ait DNA kullanılmıştır. Çift sarmal olan DNA termal denatürasyon ile tek sarmal haline getirilmiş ve optimize nanoAu/PA/GC elektrot kullanarak, standart ekleme yöntemiyle hazırlanan çözeltilerin DPV'leri alınmıştır.

10 mg balık spermine ait DNA 1 mL saf suda çözüldükten sonra kaynamakta olan su banyosuna yerleştirilmiştir ve bir saatin sonunda buz banyosuna alınarak denatürasyon tamamlanmıştır. Denatürasyonu tamamlanan çözeltiden 50 µL alınarak PBS (pH 5) ile son hacim 5 mL olacak şekilde seyreltilmiştir. Bu çözeltinin optimum koşullarda hazırlanan nanoAu/polianilin/GC elektrot ile DPV'si alınmıştır. Aynı çözelti üzerine her seferinde 5 µM guanin ve 5 µM adenin olacak şekilde enjeksiyonlar yapılmış ve standart katma yöntemiyle DNA'daki guanin ve adenin derişimleri bulunarak, guanin derişiminin adenin derişimine oranı hesaplanmıştır.

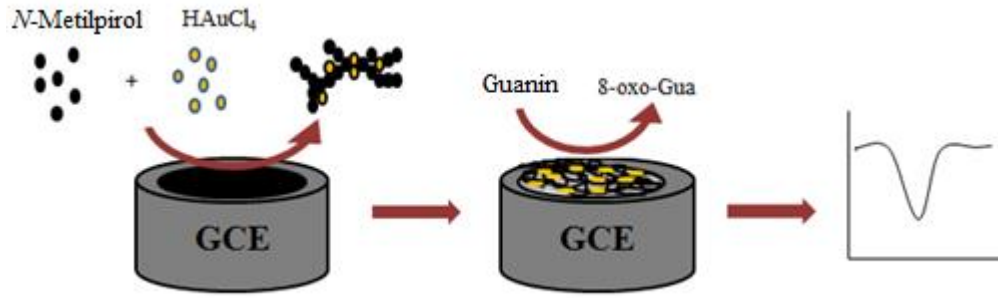


Şekil 4.30. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de a) zemin, b) 50μL ssDNA, c) 5 μM Guanin ve Adenin, d) 10 μM Guanin ve Adenin, e) 15 μM Guanin ve Adenin, f) 20 μM Guanin ve Adenin DPV yanıtları

Elde edilen kalibrasyon grafiğinden DNA’daki guanin derişimi 18,497 μM, adenin derişimi ise 23,61 μM olarak bulunmuştur. Guanin derişiminin adenin derişimine oranı ise 0,7834 olarak hesaplanmıştır. Literatürde bu değerin 0,77 [36, 37] olduğu düşünöldüğünde, bulunan sonucun oldukça anlamlı ve yakın olduğu görölmektedir.

4.2. Altın Nanoparçacık Modifiye Poli(*N*-Metil Piyol) Camsı Karbon Elektrot

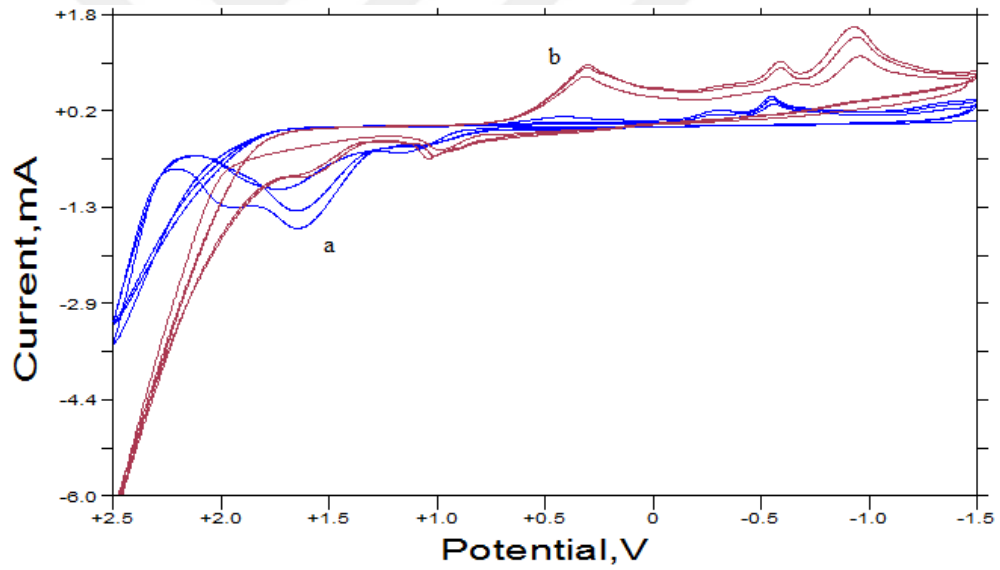
İletken elektropolimerik filmler oluşturduğu bilinen *N*-Metil piyol [38, 39] ile polimerik film üzerinde yükseltgenme yüzeylerini arttırarak daha duyarlı ölçömlere olarak sağlayan altın nanoparçacık parçalarından, nanokompozit elektrotlar hazırlanmıştır. *N*-metil piyol monomer çözeltisi ve H_{Au}Cl₄ çözeltisinden eş zamanlı olarak çevrimli voltametri yöntemi ile camsı karbon elektrot yüzeyinde kompozit elektropolimerik film oluşturulmuştur. Aşağıda şematik olarak hazırlanan bu elektrot gösterilmektedir.



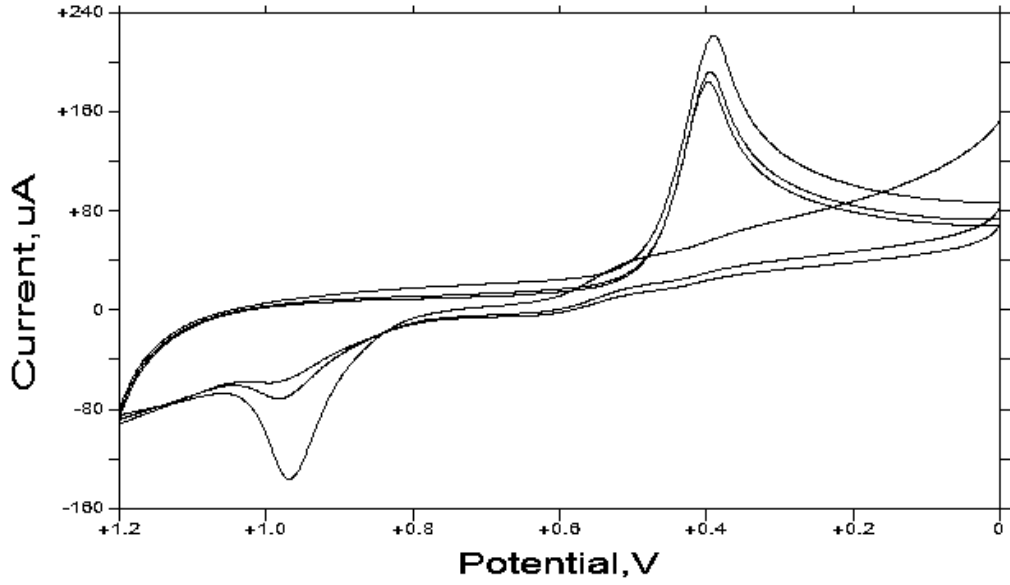
Şekil. 4.31. Altın nanoparçacık modifiye PNMPy elektrodun şematik gösterimi

4.2.1. Altın Nanoparçacık Modifiye Poli (N-metil pirol) Elektrodun Hazırlanması

0,2 M KCl içerisinde 30 mM *N*-metilpirolden 10 dk N_2 gazı geçirildikten sonra yine azot atmosferinde çevrimli voltametri ile GCE yüzeyinde 6 çevrimlik film oluşturulmuştur.



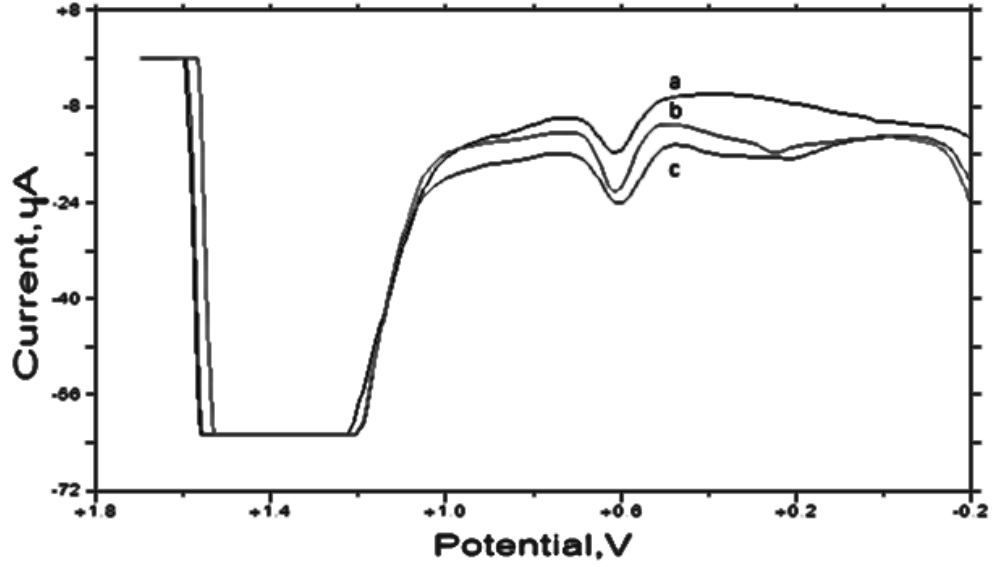
Şekil 4.32. a) 0,2 M KCl içerisinde 30 mM *N*-metil pirol çözeltisinin GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı **b)** 0,2 M KCl içerisinde 30 mM *N*-Metil pirol ve 2 mM HAuCl₄ içeren çözeltinin GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı



Şekil 4.33. 0,5 M H₂SO₄ içerisinde 2 mM HAuCl₄ çözeltisinin PNMPy/GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı

Karşılaştırma yapabilmek amacıyla, hazırlanan 6 çevrimlik filmin üzerine nanoAu kaplaması yapılmadan önce 100 µM'lık guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Daha sonra, GCE yüzeyinde 6 çevrim olarak hazırlanan PNMPy filminin üzerine 0,5 M H₂SO₄ içerisinde 2 mM HAuCl₄ çözeltisinden 6 çevrimlik nano-Au kaplaması yapılmıştır. Hazırlanan nanokompozit elektrot ile 100 µM'lık guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ayrı ayrı incelenmiş ve PNMPy kaplı GCE ile kıyaslanmıştır.

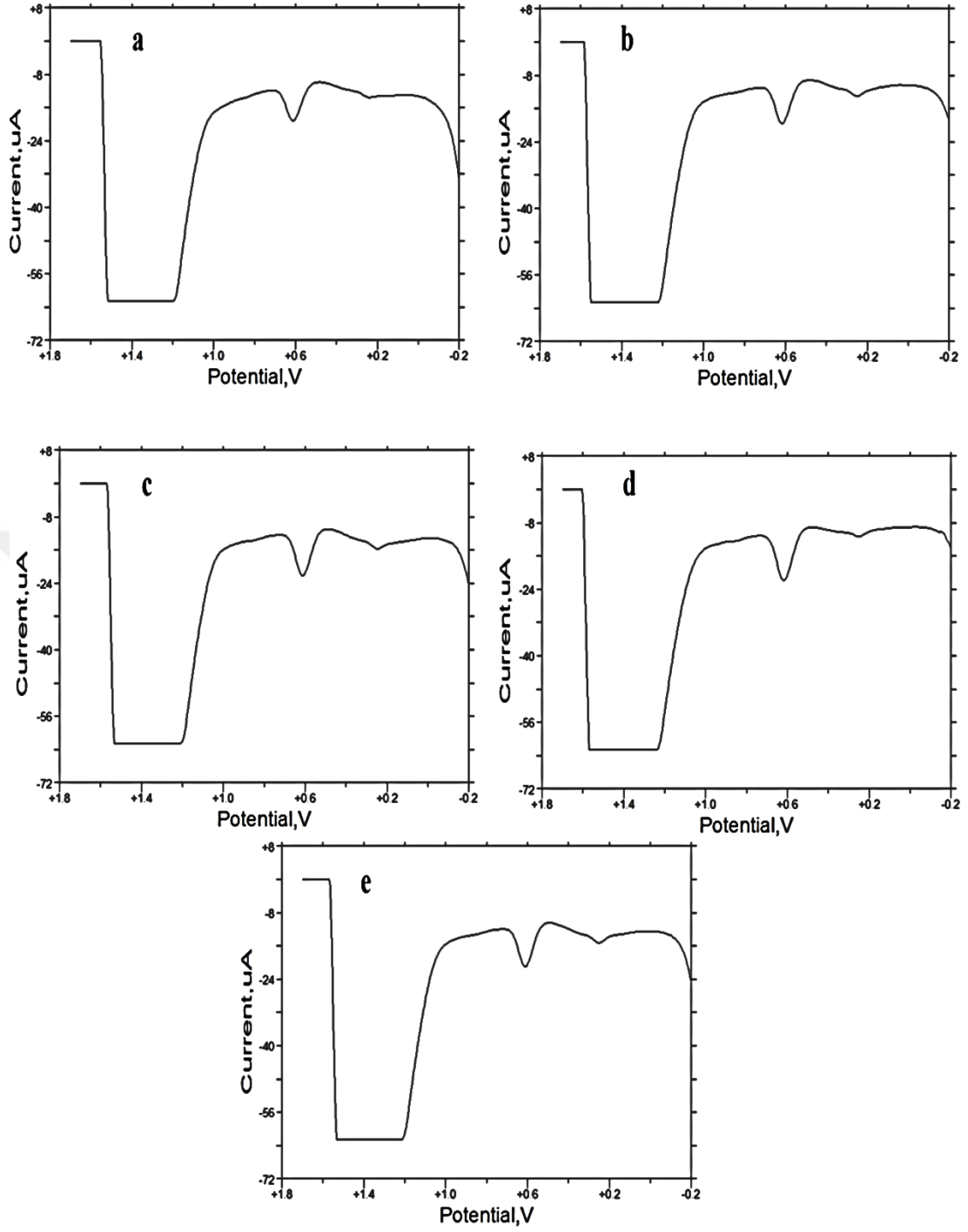
Voltamogramlar kıyaslandığında altın nanoparçacık kaplı PNMPy/GC elektrotta guanin yanıtı 7,025 µA iken, PNMPy /GC elektrotta guanin yanıtı 8,992 µA'dır. Bu nedenle elektropolimerik film üzerine altın nanoparçacık kaplamanın yüzeyin iletkenliğini düşürdüğü düşünülmüştür. Bunun yerine *N*-metil pirol ve HAuCl₄ aynı ortamda iken GCE yüzeyinde eş zamanlı elektropolimerizasyon ile yeni bir film oluşturulmuştur. Hazırlanan nanokompozit elektrot ile 100 µM guanin yanıtı incelendiğinde, 10,51 µA olduğu görülmüştür. Bu nedenle elektropolimerik filmin üzerine altın nanoparçacık kaplaması yapmak yerine, HAuCl₄ ve monomer çözeltisinin eş zamanlı elektropolimerizasyonu yapılmıştır.



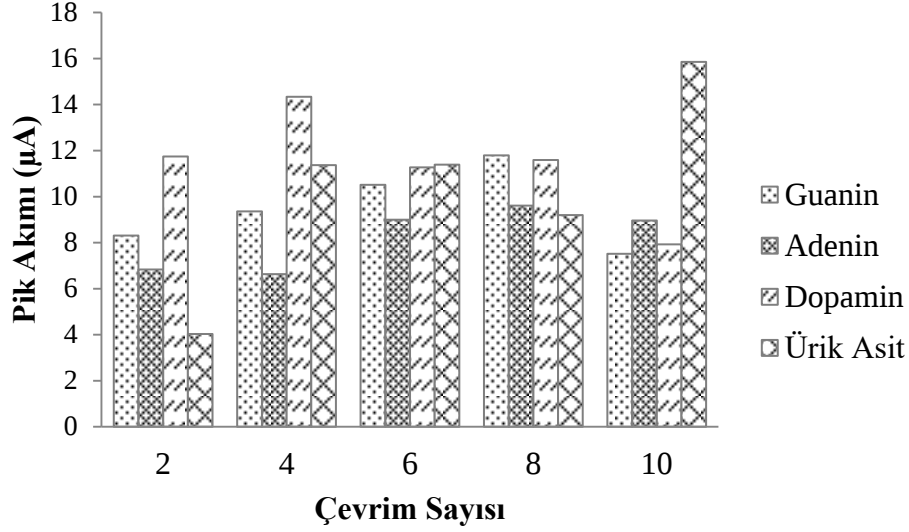
Şekil 4.34. PBS pH 7’de 100 μ M Guanin yanıtı **a)** PNMPy filmin üzerine 0,5 M H₂SO₄ içerisinde 2 mM HAuCl₄ çözeltisinden 6 çevrimlik nano-Au kaplanarak hazırlanan GCE, **b)** 0,2 M KCl içerisinde 30 mM *N*-metil pirol ve 2 mM HAuCl₄ çözeltisinden eşzamanlı olarak hazırlanan 6 çevrimlik GCE, **c)** 0,2 M KCl içerisinde 30 mM *N*-metil pirol çözeltisinden 6 çevrimlik hazırlanan GCE

4.2.1 Guanin Yanıtı Üzerine Kompozit Film Kalınlığının Etkisi

Guanin yanıtlarının üzerine nanokompozit filmin kalınlığının etkisini araştırmak amacıyla, 0,2 M KCl içerisinde 30 mM *N*-metil pirol ve 2 mM HAuCl₄ çözeltisinden 2, 4, 6, 8 ve 10 çevrimlik filmler oluşturularak, 100 μ M’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar kıyaslandığında, guanin yanıtının 8 çevrim olarak hazırlanan kompozit filmde daha büyük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.35. 0,2 M KCl içerisinde 30 mM *N*-Metil pirol ve 2 mM HAuCl₄ çözeltisinden **a)** 2, **b)** 4, **c)** 6, **d)** 8, **e)** 10 çevrim olarak hazırlanan elektrodun 100 μ M guanin yanıtları

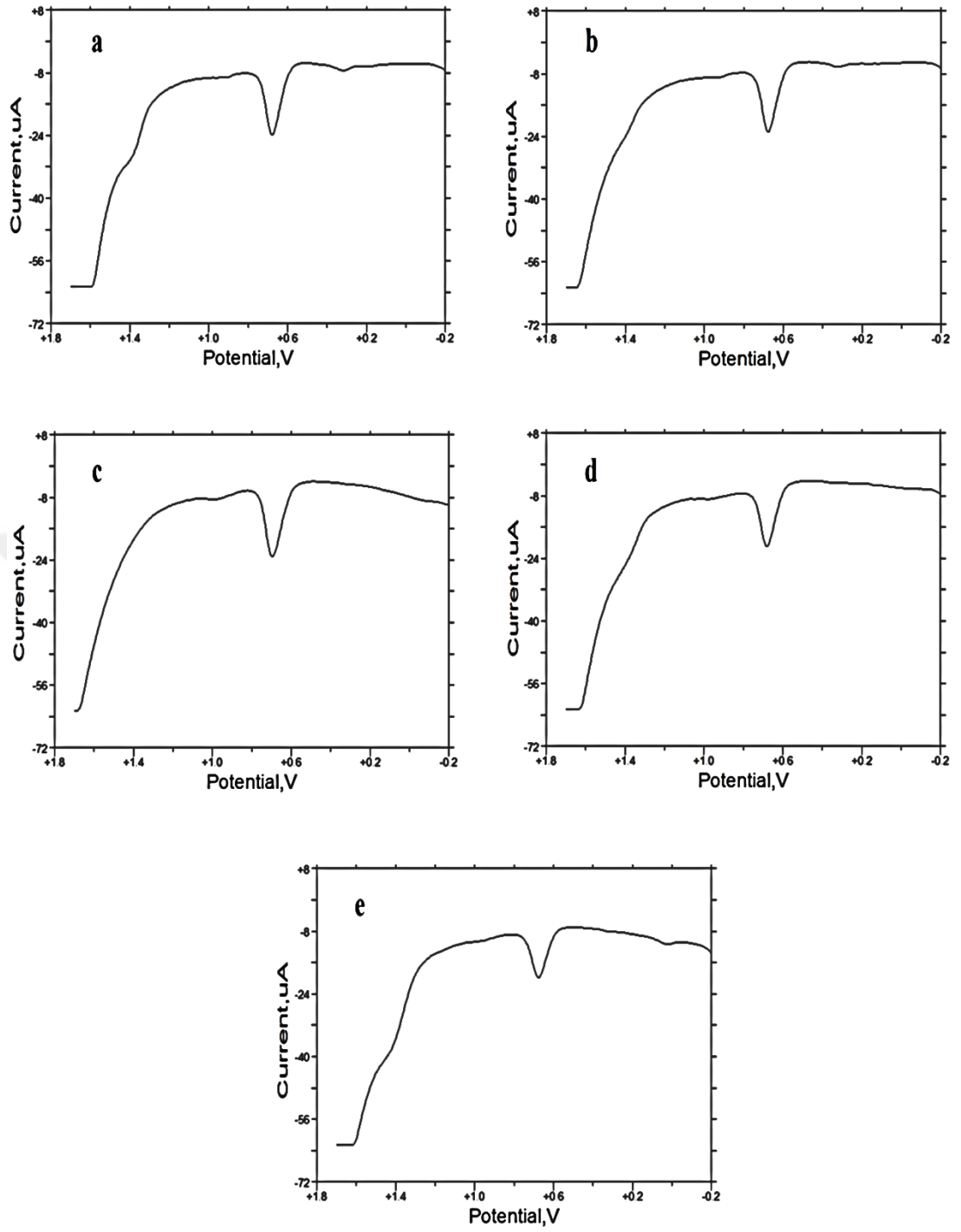


Şekil 4.36. Çevrim sayısının guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

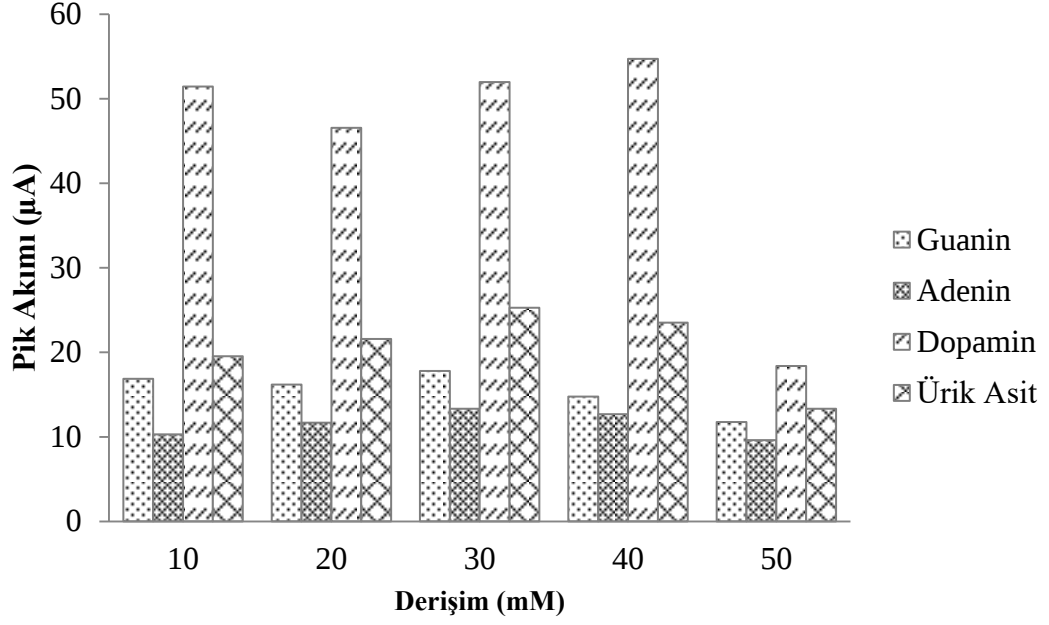
4.2.2. Monomer Derişimi Etkisi

Film kalınlığı optimize edildikten sonra, guanin yanıtı üzerine monomer derişiminin etkisini incelemek için HAuCl_4 derişimi sabit tutularak, farklı derişimlerde hazırlanan *N*-metil pirol çözeltisinden elektropolimerik filmler elde edilmiştir. Hazırlanan elektrot ile 100er μM 'lık guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Şekil 4.38'de kıyaslama yapmak için guanin yanıtları esas alınmıştır.

0,2 M KCl içerisinde 10, 20, 30, 40 ve 50 mM *N*-Metil pirol ve 2 mM HAuCl_4 içeren çözeltilerden 8 çevrimlik nanokompozit filmler oluşturularak 100 μM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar kıyaslandığında 30 mM monomer çözeltisinden hazırlanan elektrodun guanin yanıtının daha büyük olduğu görülmüştür.



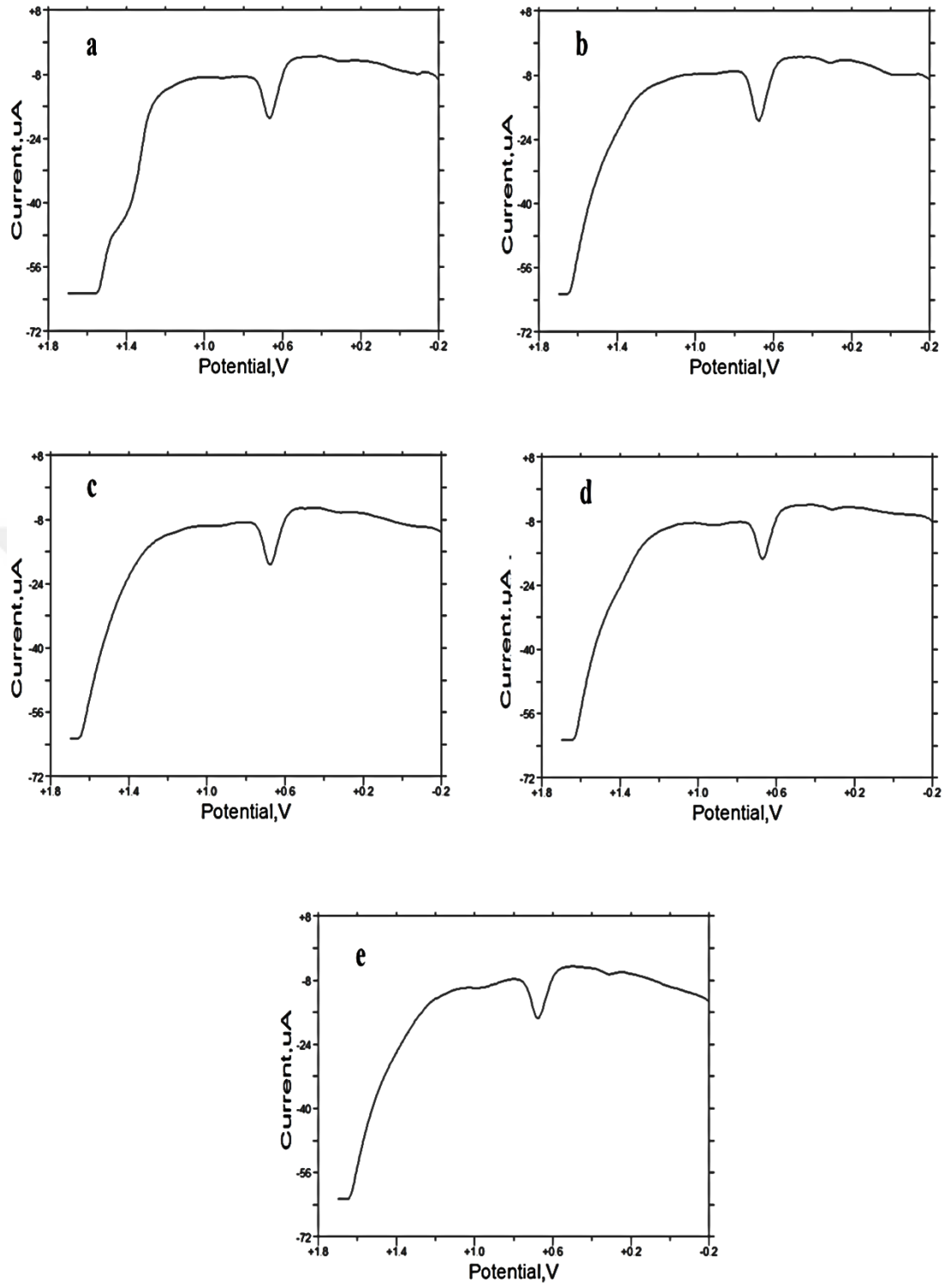
Şekil 4.37. 0,2 M KCl içerisinde **a)** 10, **b)** 20, **c)** 30, **d)** 40, **e)** 50 mM *N*-Metil pirol ve 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden 8 çevrimlik hazırlanan filmlerin 100 μM guanin yanıtları



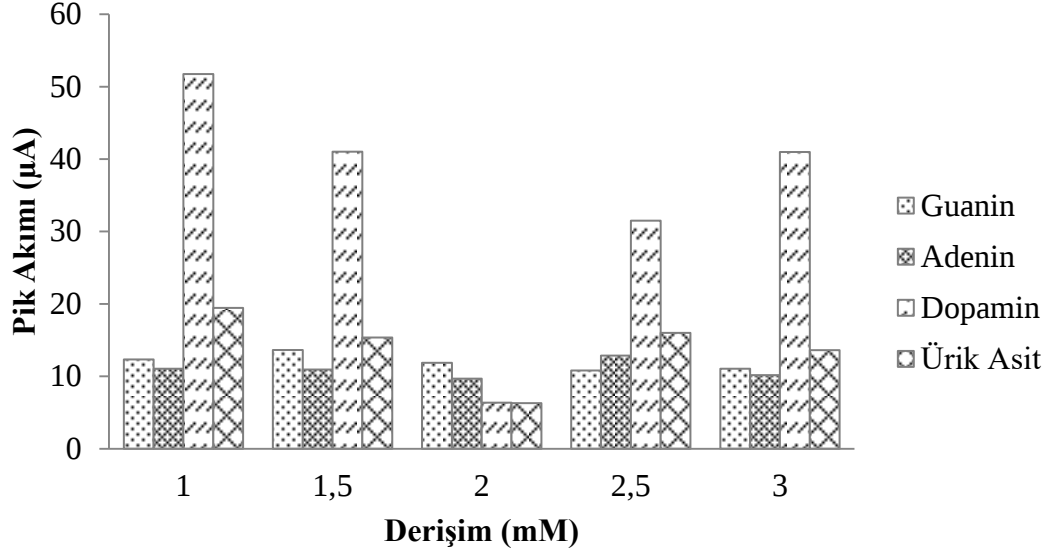
Şekil 4.38. Monomer derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

4.2.3. H_{Au}Cl₄ Derişimin Etkisi

Film kalınlığı ve monomer derişimi optimize edildikten sonra, H_{Au}Cl₄ derişiminin guanin yanıtları üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla; 0,2 M KCl içerisinde 30 mM *N*-Metil pirol ve 1, 1,5, 2, 2,5 ve 3 mM H_{Au}Cl₄ içeren çözeltilerden 8 çevrim olarak hazırlanan nanokompozit filmlerin 100 µM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar kıyaslandığında 30 mM *N*-Metil pirol ve 1,5 mM H_{Au}Cl₄ içeren çözelti kullanılarak hazırlanan kompozit elektrodun guanin yanıtının daha büyük olduğu görülmüştür.



Şekil 4.39. 0,2 M KCl içerisinde 30 mM, *N*-Metil pirol ve **a)** 1, **b)** 1,5, **c)** 2, **d)** 2,5 ve **e)** 3 mM HAuCl₄ çözeltisinden 8 çevrimlik hazırlanan filmlerin 100 μM guanin yanıtları

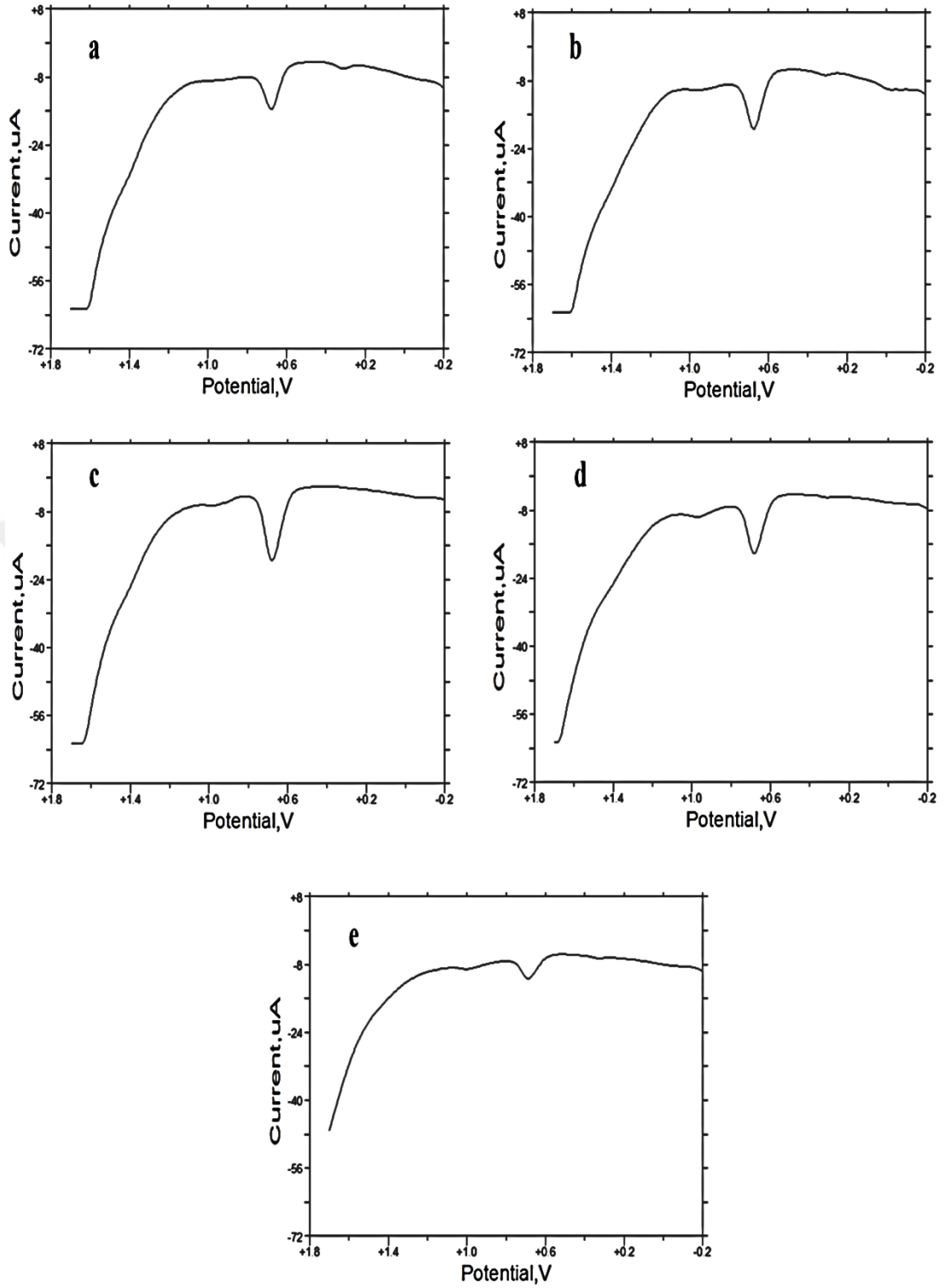


Şekil 4.40. HAuCl_4 derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

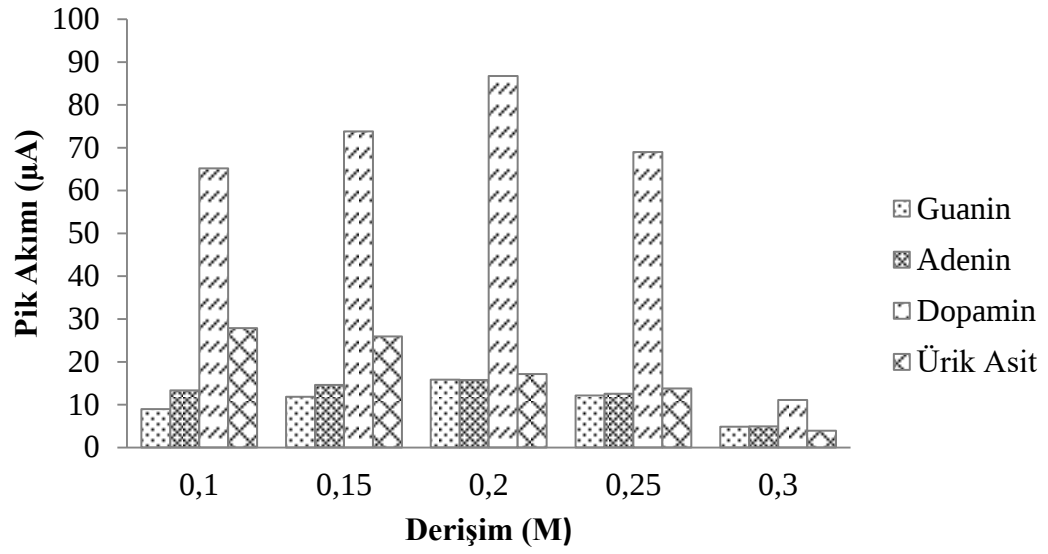
4.2.4. Polimerizasyon Ortamındaki Destek Elektrolit Derişiminin Etkisi

Film kalınlığı, monomer derişimi ve altın derişimi optimize edildikten sonra polimerizasyon ortamındaki destek elektroliti olan KCl 'nin derişiminin guanin yanıtları üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

0,1, 0,15 0,2, 0,25 ve 0,3 M KCl içerisinde hazırlanan 30 mM *N*-Metil pirol ve 1,5 mM HAuCl_4 içeren çözeltiden GCE yüzeyine 8 çevrimlik filmler kaplanarak 100 μM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlar kıyaslandığında 0,2 M KCl ortamında hazırlanan nanokompozit elektrodun guanin yanıtlarının daha büyük olduğu görülmüştür.



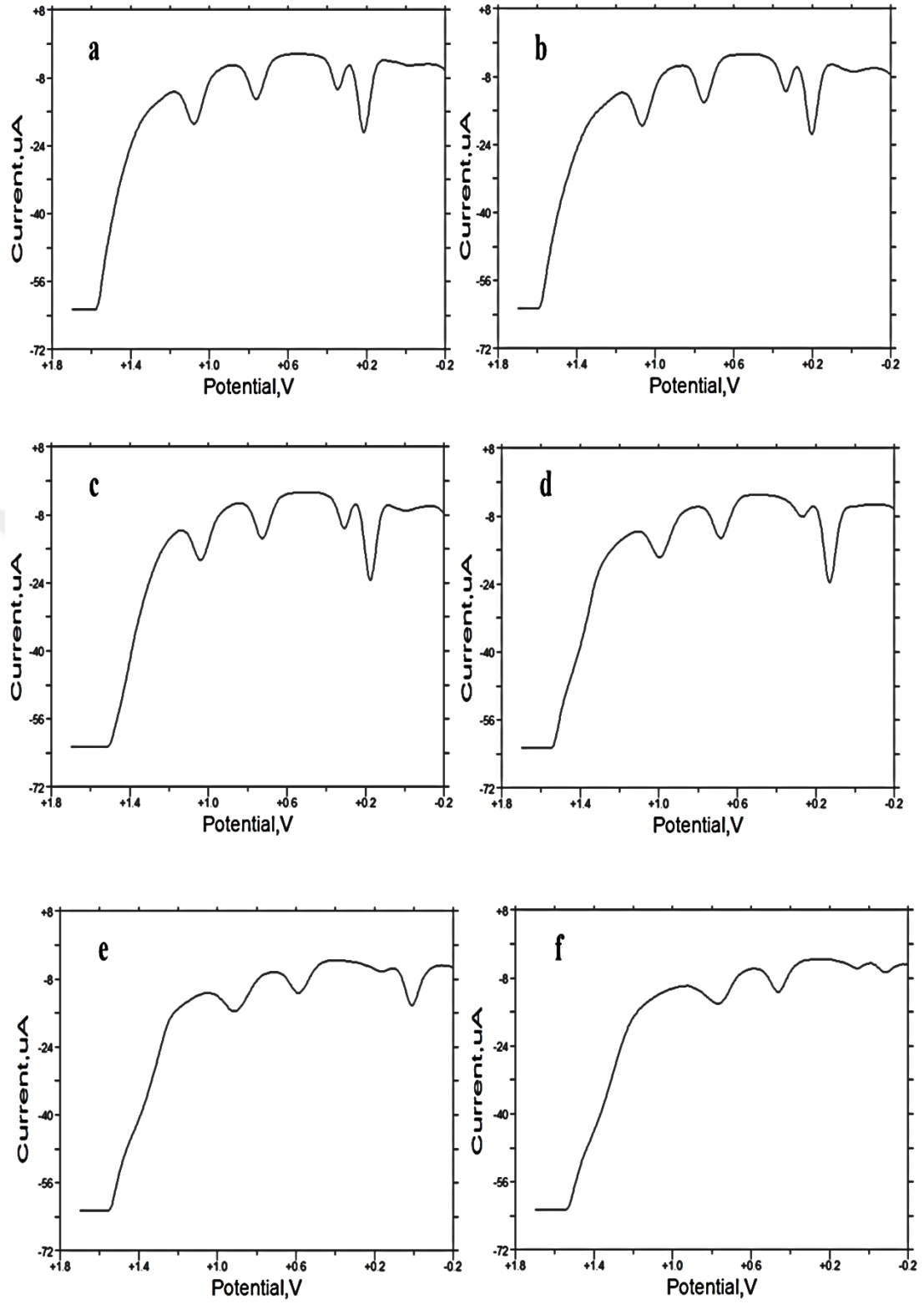
Şekil 4.41. a) 0,1, b) 0,15, c) 0,2, d) 0,25 ve e) 0,3 M KCl içerisinde 30 mM, *N*-Metil pirol 1,5 mM HAuCl_4 çözeltisinden 8 çevrimlik hazırlanan filmlerin 100 μM guanin yanıtları



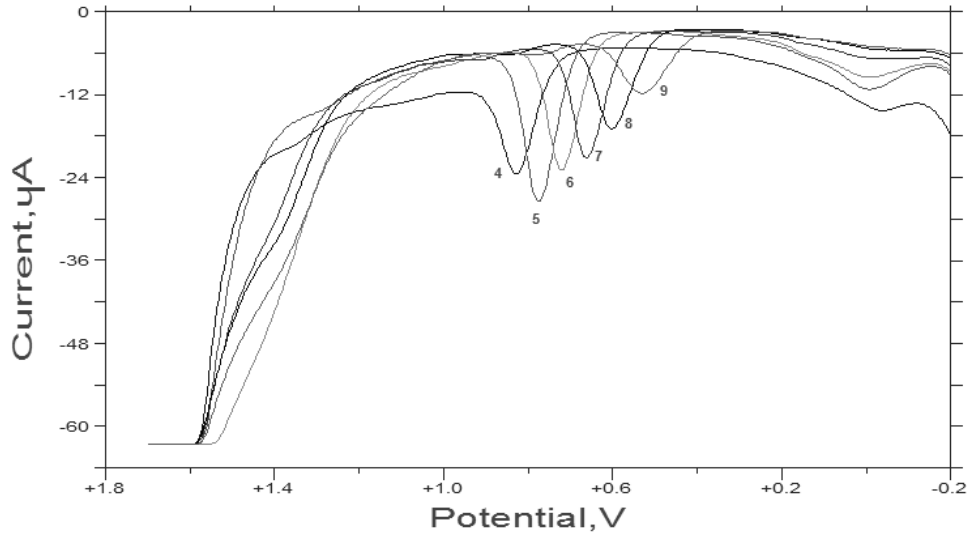
Şekil 4.42. Destek elektroliti derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

4.2.5. Guanin Yanıtları Üzerine pH Etkisi

Film kalınlığı, monomer derişimi, HAuCl_4 derişimi ve destek elektrolit derişimi optimize edildikten sonra 0,2 M KCl içerisinde 30 mM *N*-Metil pirol ve 1,5 mM HAuCl_4 çözeltisinden 8 çevrim olarak hazırlanan optimize elektrodun farklı pH'larda hazırlanan 100 μM 'lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışım ortamında guanin yanıtları kıyaslanmıştır.



Şekil 4.43. Optimize şartlarda hazırlanan nanokompozit elektrodun **a)** pH 4, **b)** pH 5, **c)** pH 6, **d)** pH 7, **e)** pH 8, **f)** pH 9’da 100 μM ’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışıma ait DPV yanıtları

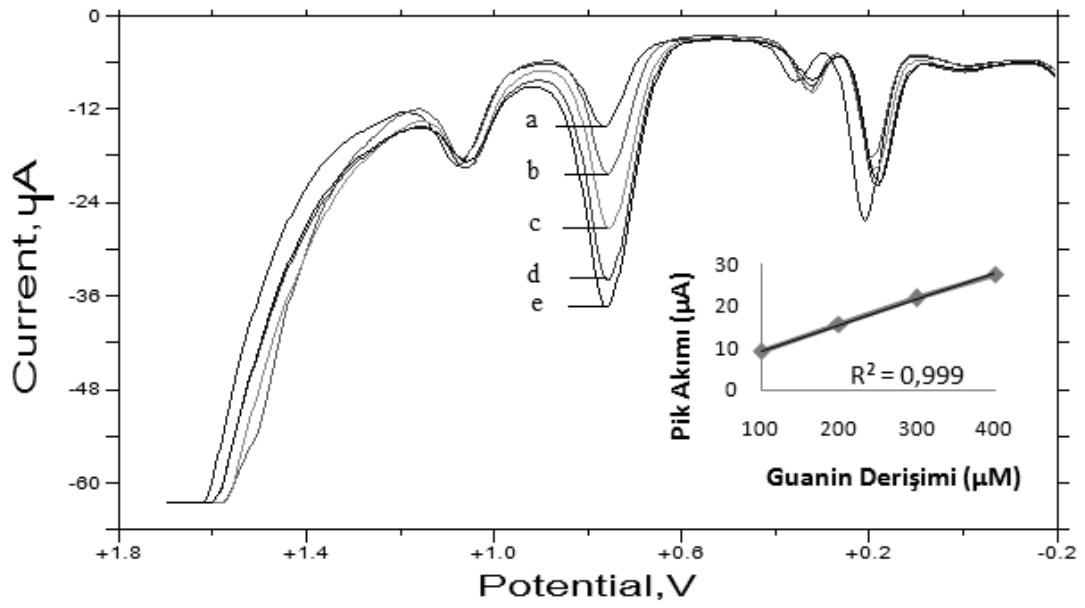


Şekil 4.44. Optimize şartlarda hazırlanan nanokompozit elektrodun **a)** pH 4, **b)** pH 5, **c)** pH 6, **d)** pH 7, **e)** pH 8, **f)** pH 9’da 100 µM’lık guanin yanıtları

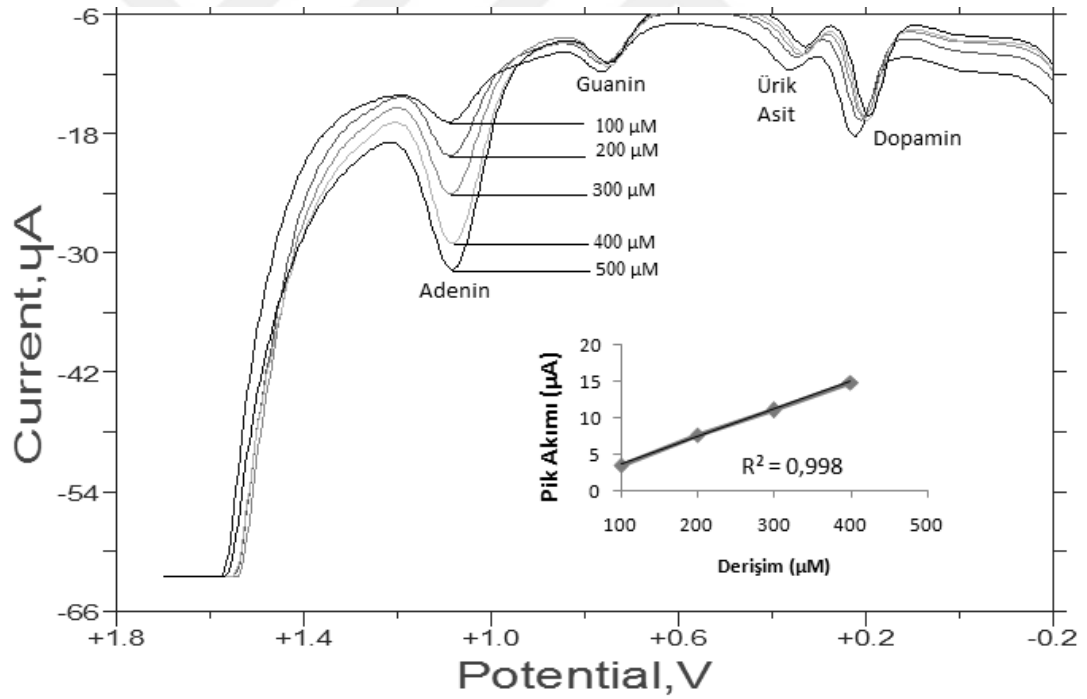
Guanin yanıtının pH 5’te maksimum olduğu ve pik potansiyelinin ise pH 4’ten pH 9’a doğru negatif potansiyellere doğru azaldığı görülmektedir.

4.2.6. Guanin, Adenin, Ürik Asit ve Dopaminin Eşzamanlı Tayini

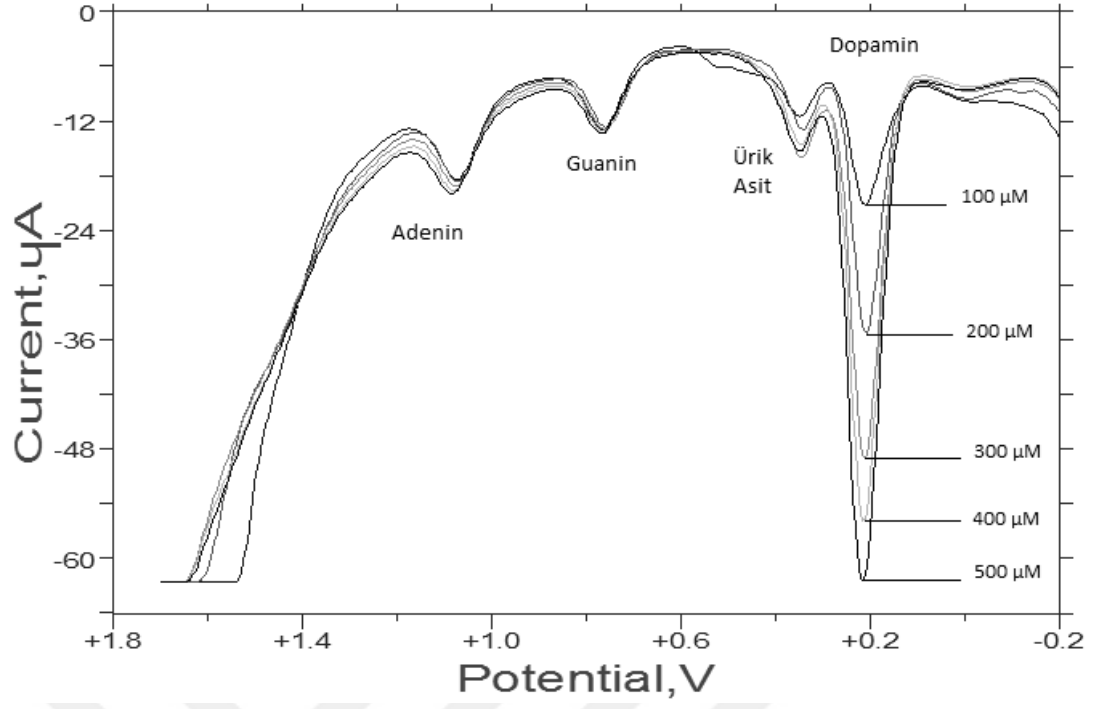
Aynı ortamda bulunan guanin, adenin, dopamin ve ürik asit elektrot yüzeyini kirletebilmekte ya da girişim yapabilmektedir. Optimum şartlarda hazırlanan nanokompozit elektrot ile bu etkilerin ortadan kalktığını göstermek için aynı ortamda bulunan analitlerden birinin derişimi artırılarak diğerleri sabit tutulmuştur. Her bir analit 100 µM olacak şekilde bir karışım hazırlanmış ve yanıtlar DPV tekniği ile incelenmiştir. Artan guanin derişimine karşılık yalnızca guanine ait pik akımlarının arttığı, diğer bileşenlerin pik akımlarının ise değişmediği gözlenmiştir. Buna bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiğinde ise guanin pik akımlarının 100-400 µM derişim aralığında oldukça doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Aynı işlem, adenin, ürik asit ve dopamin içinde tekrarlanmış ve analitlerin derişim artışlarının diğer analitlerinin pik akımlarını değiştirmedeği gösterilmiştir.



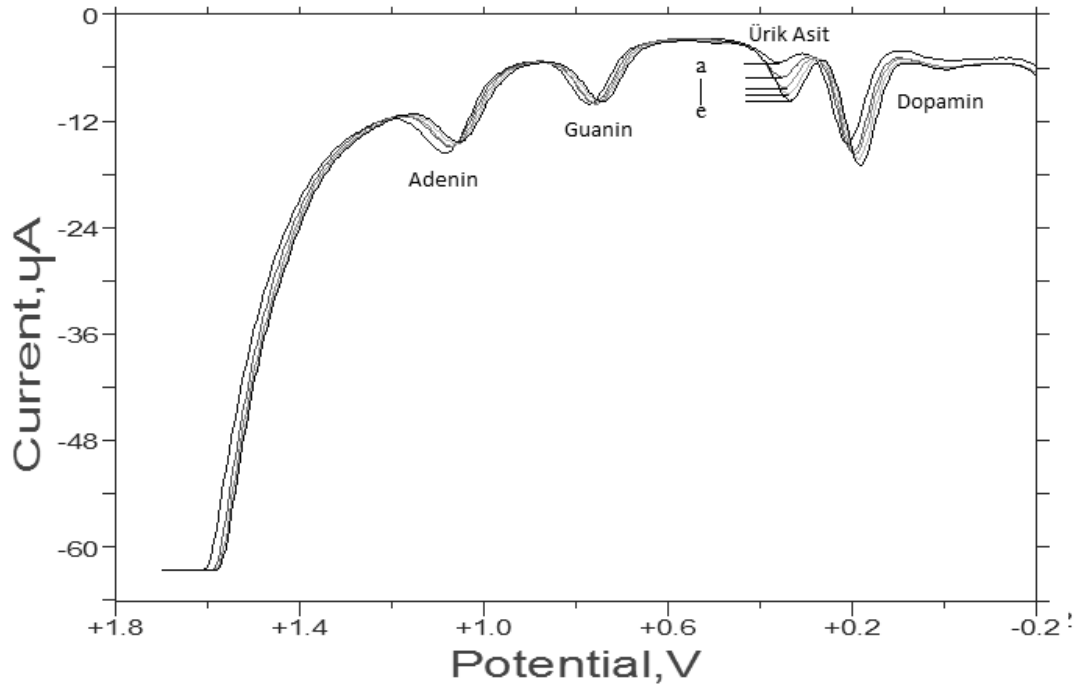
Şekil 4.45. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 μM’lık guanine, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda a) 100, b) 200, c) 300, d) 400, e) 500μM guanine yanıtları



Şekil 4.46. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 μM’lık guanine, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan adenin derişim yanıtları



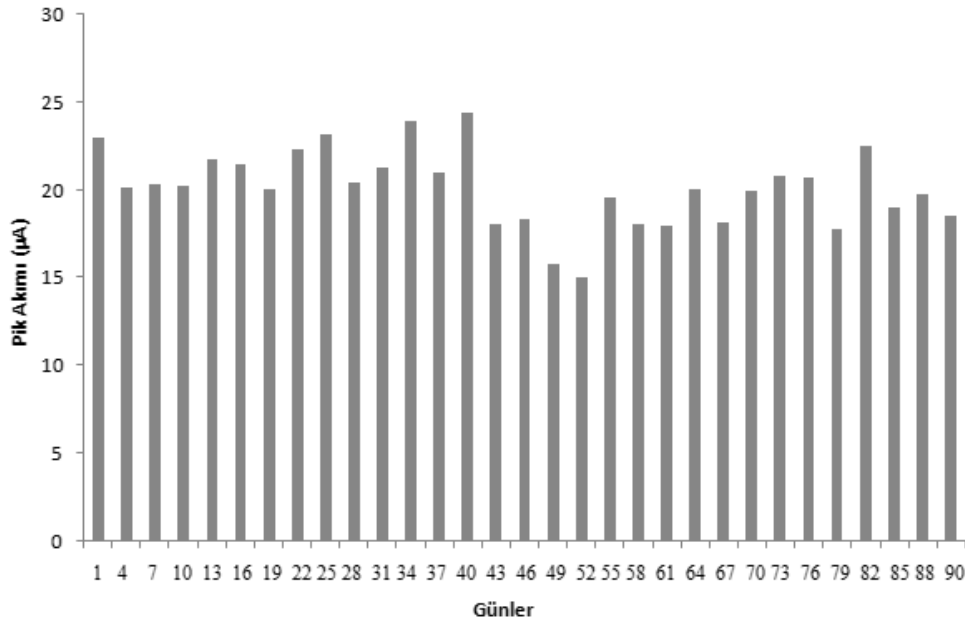
Şekil 4.47. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 μM ’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan dopamin derişim yanıtları



Şekil 4.48. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de 100 μM ’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda **a)** 100, **b)** 200, **c)** 300, **d)** 400 ve **e)** 500 μM ürik asit yanıtları

4.2.7. Kararlılık

Optimum şartlarda hazırlanan nano-Au/PNMPy/GC elektrodun zamanla guanin yanıtlarını incelemek amacıyla, optimize nanokompozit elektrodun üçer günlük aralıklarla guanin (100 μ M) yanıtları ölçülmüştür. Hazırlanan elektrot kullanılmadığı zaman PBS pH 5 içerisinde bekletilmiştir. Aşağıdaki diyagramda her sütun 3 guanin ölçümünün ortalamasıdır. 90 günün sonunda guanin yanıtlarında önemli bir azalma olmadığı görülmüştür.

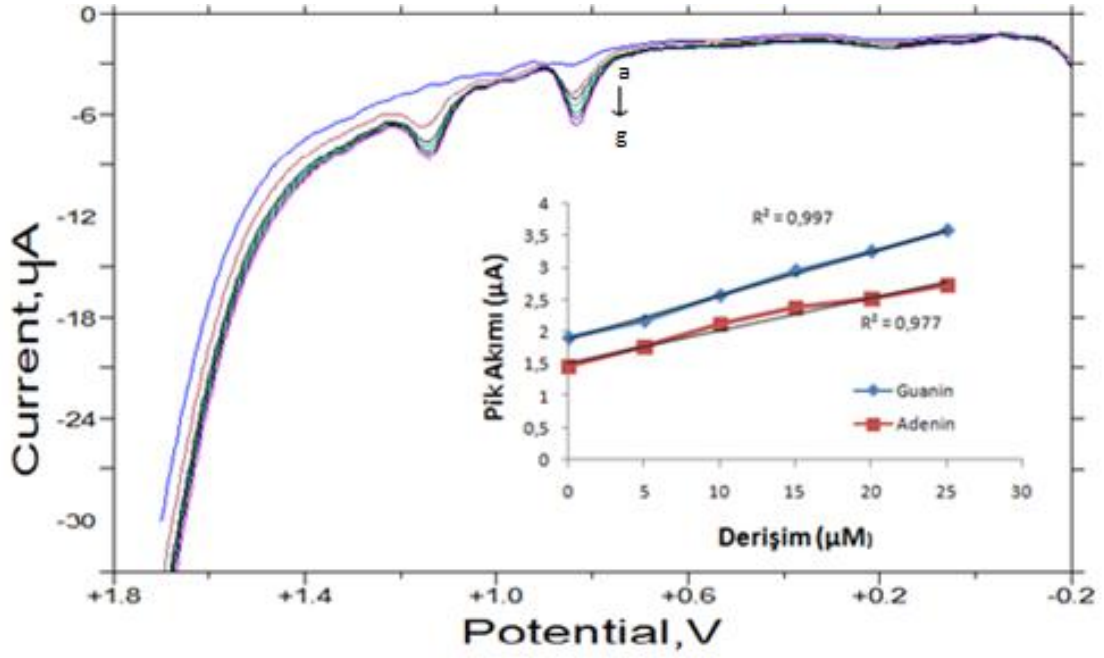


Şekil 4.49. Optimize elektrodun kararlılığı

4.2.8. DNA Örnekleri

Hazırlanan nanokompozit elektrot ile balık sperm DNA'sındaki guanin ve adenin derişimlerini hesaplayabilmek için standart katma yöntemi uygulanmıştır. Çift sarmal DNA'dan tek sarmal DNA eldesi termal denatürasyon ile sağlanmıştır.

10 mg balık spermine ait DNA 1 mL saf suda çözüldükten sonra kaynamakta olan su banyosuna yerleştirilmiş ve bir saatin sonunda buz banyosuna alınarak denatürasyon tamamlanmıştır. Denatürasyonu tamamlanan çözeltiden 50 μ L alınarak PBS (pH 5) ile son hacim 5 mL olacak şekilde seyreltilmiştir. Bu çözeltinin optimum koşullarda hazırlanan nanoAu/PNMPy/GC elektrot ile DPV'si alınmıştır. Aynı çözelti üzerine her seferinde, derişim 5 μ M guanin ve 5 μ M adenin olacak şekilde enjeksiyonlar yapılmış ve standart katma yöntemiyle DNA'daki guanin ve adenin derişimleri hesaplanarak, G/A bulunmuştur.

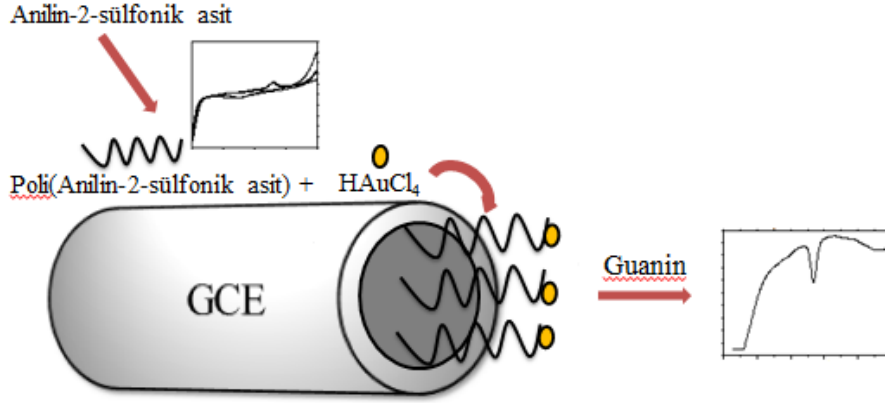


Şekil 4.50. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 5’de **a)** zemin, **b)** 50µL ssDNA, **c)** 5 µM Guanin ve Adenin, **d)** 10 µM Guanin ve Adenin, **e)** 15 µM Guanin ve Adenin, **f)** 20 µM Guanin ve Adenin, **g)** 25 µM Guanin ve Adenin DPV yanıtları

Kalibrasyon grafiklerinden; balık spermine ait DNA’daki guanin derişimi 27,78 µM, adenin derişimi ise 30,5 µM olarak bulunmuştur. Guanin derişiminin adenin derişimine oranı ise 0,9108 olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon grafiklerinde oldukça yüksek R^2 değerlerleri elde edilmesine rağmen bulunan bu oran literatürle uyuşmamaktadır.

4.3. Altın Nanoparçacık Modifiye Poli (Anilin-2-Sülfonik Asit) Elektrot

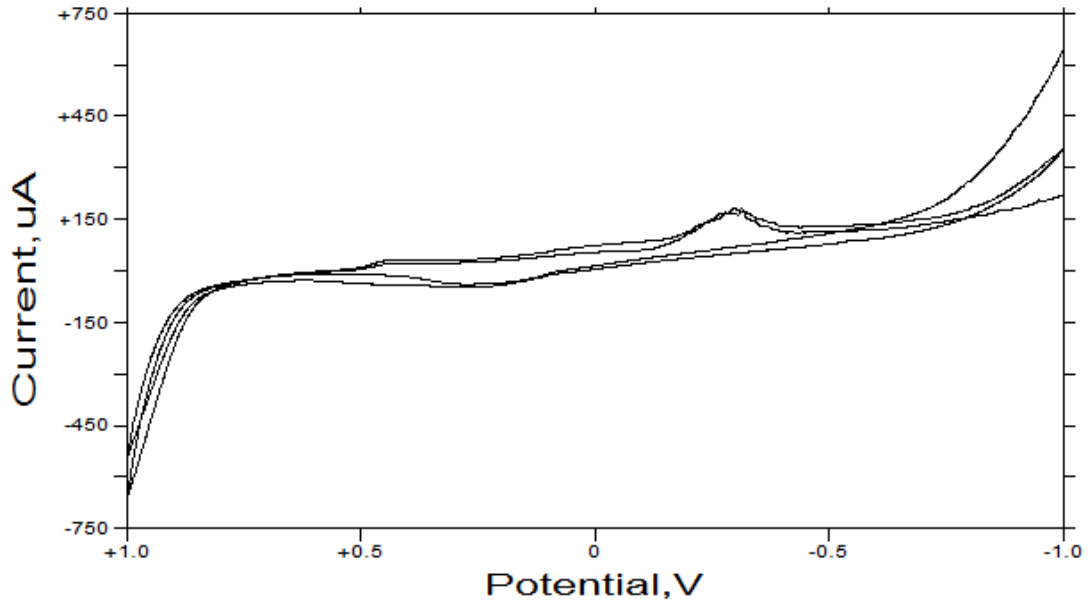
GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon yöntemi ile oluşturulan poli(anilin-2-sülfonik asit) (PASA) filmi üzerine çevrimli voltametri yöntemiyle altın nanoparçacıkları modifiye edilerek nano kompozit elektrot hazırlanmıştır. Aşağıdaki şekilde hazırlanan elektrot şematik olarak gösterilmiştir.



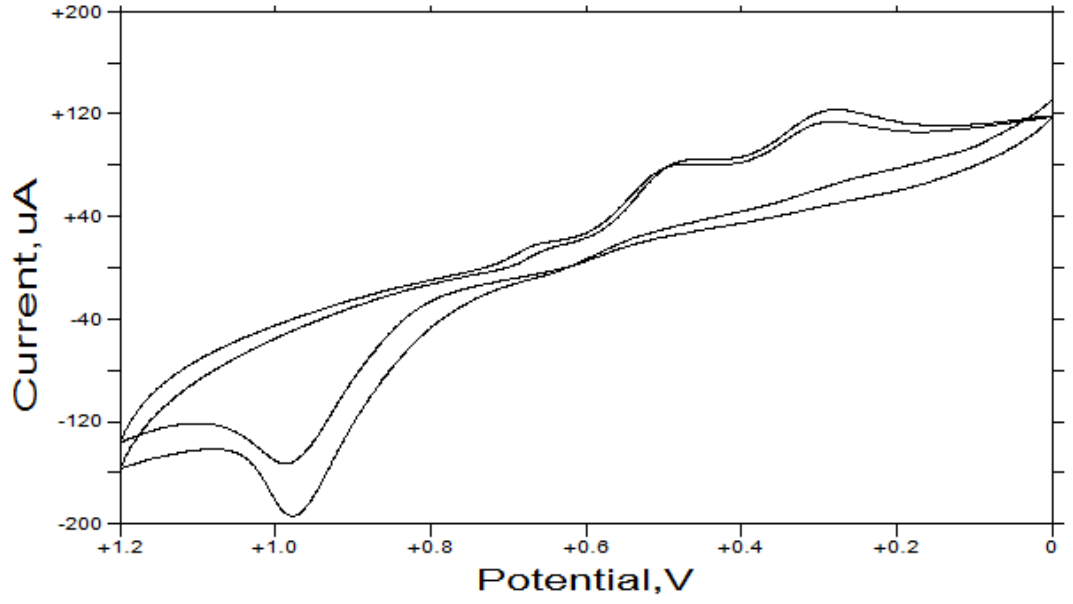
Şekil 4.51. Altın nanoparçacık modifiye poli(anilin-2-sülfonik asit) elektrodun şematik gösterimi

4.3.1. Altın Nanoparçacık Modifiye Poli (anilin-2-sülfonik asit) Elektrodun Hazırlanması

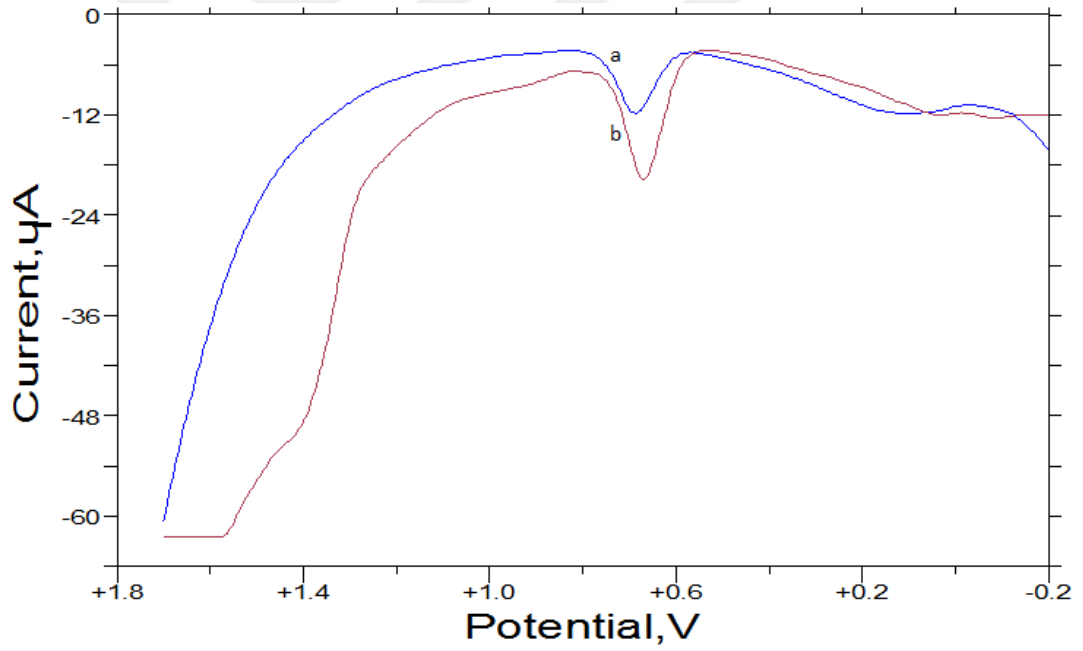
0,2 M KCl içerisinde 30 mM monomer çözeltisinden GCE yüzeyinde CV tekniği ile 4 çevrimlik film oluşturularak PBS pH 7’de 100 µM guanin yanıtları incelenmiştir. Ayrıca, polimerik film üzerine 0,5 M H₂SO₄ içerisinde 2 mM HAuCl₄ çözeltisinden 4 çevrimlik altın nanoparçacık film kaplanmış ve PBS (pH 7)’de 100 µM guanin yanıtları incelenmiştir. Polimerik film ve nanokompozit film için söz konusu guanin yanıtları kıyaslandığında, nanokompozit filmin guanin yanıtlarının daha büyük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.52. 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinin (destek elektroliti 0,2 M KCl) GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı



Şekil 4.53. 0,5 M H_2SO_4 içerisinde 2 mM HAuCl_4 çözeltisinin PASA/GCE yüzeyinde çevrimli voltamogramı

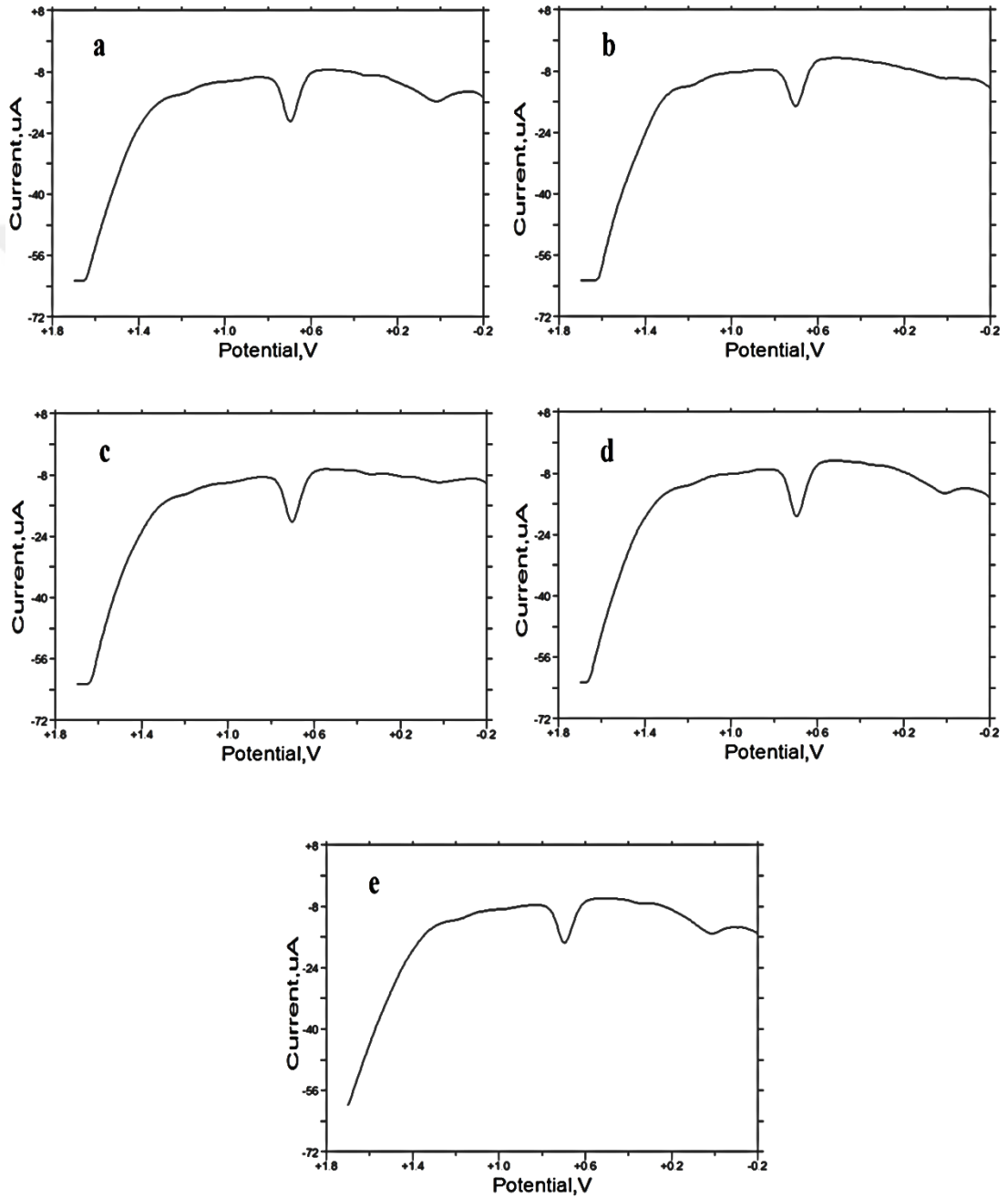


Şekil 4.54. **a)** 0,2 M KCl içerisinde 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 4 çevrim hazırlanan GCE'un, **b)** 0,2 M KCl içerisinde 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 4 çevrim hazırlanıp üzerine 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden 4 çevrim nano-Au kaplanan GCE'un 100 μM guanin yanıtları

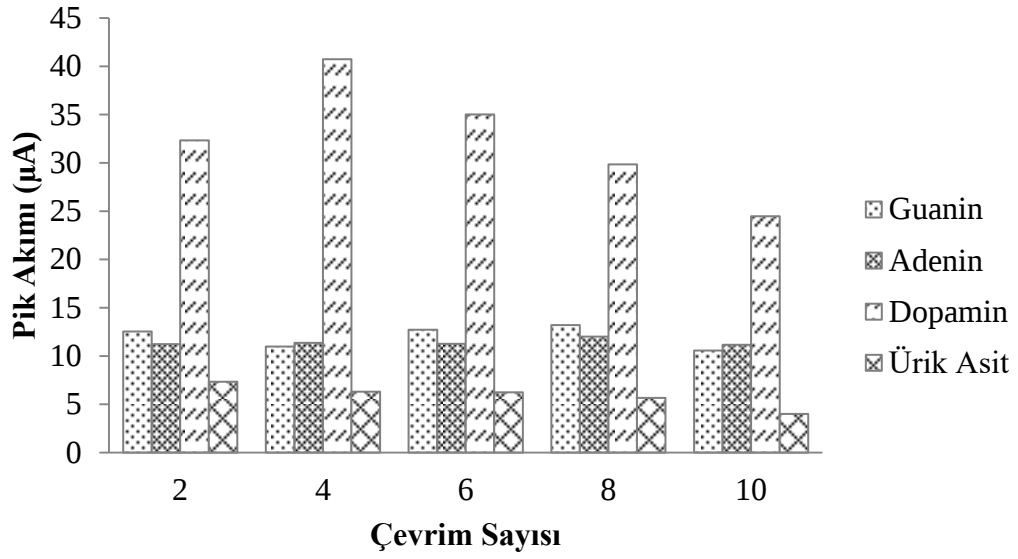
4.3.2. Film Kalınlığının Etkisi

Camsı karbon elektrot yüzeyinde yapılan nanokompozit film ile guanin, adenin, dopamin ve ürik asit pik potansiyellerinin çakışmadığı ve çıplak / polimerik film kaplı elektrot yüzeyine göre guanin yanıtının daha büyük olduğu belirlendikten

sonra guanin yanıtları üzerine elektropolimerik filmin kalınlığının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 0,2 M KCl içerisinde 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 2, 4, 6, 8 ve 10 çevrimlik filmler oluşturularak, her birinin üzerine 2 mM HAuCl₄ çözeltisinden 4 çevrimlik altın nanoparçacık kaplanmış ve ilgili analitlerin yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar kıyaslandığında, guanin yanıtının 8 çevrim olarak hazırlanan filmde daha büyük olduğu görülmüştür.



Şekil 4.55. 0,2 M KCl içerisinde 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden **a)** 2, **b)** 4, **c)** 6, **d)** 8 ve **e)** 10 çevrim olarak hazırlanıp üzerine nano-Au kaplanan elektrodun 100 μ M guanin yanıtları

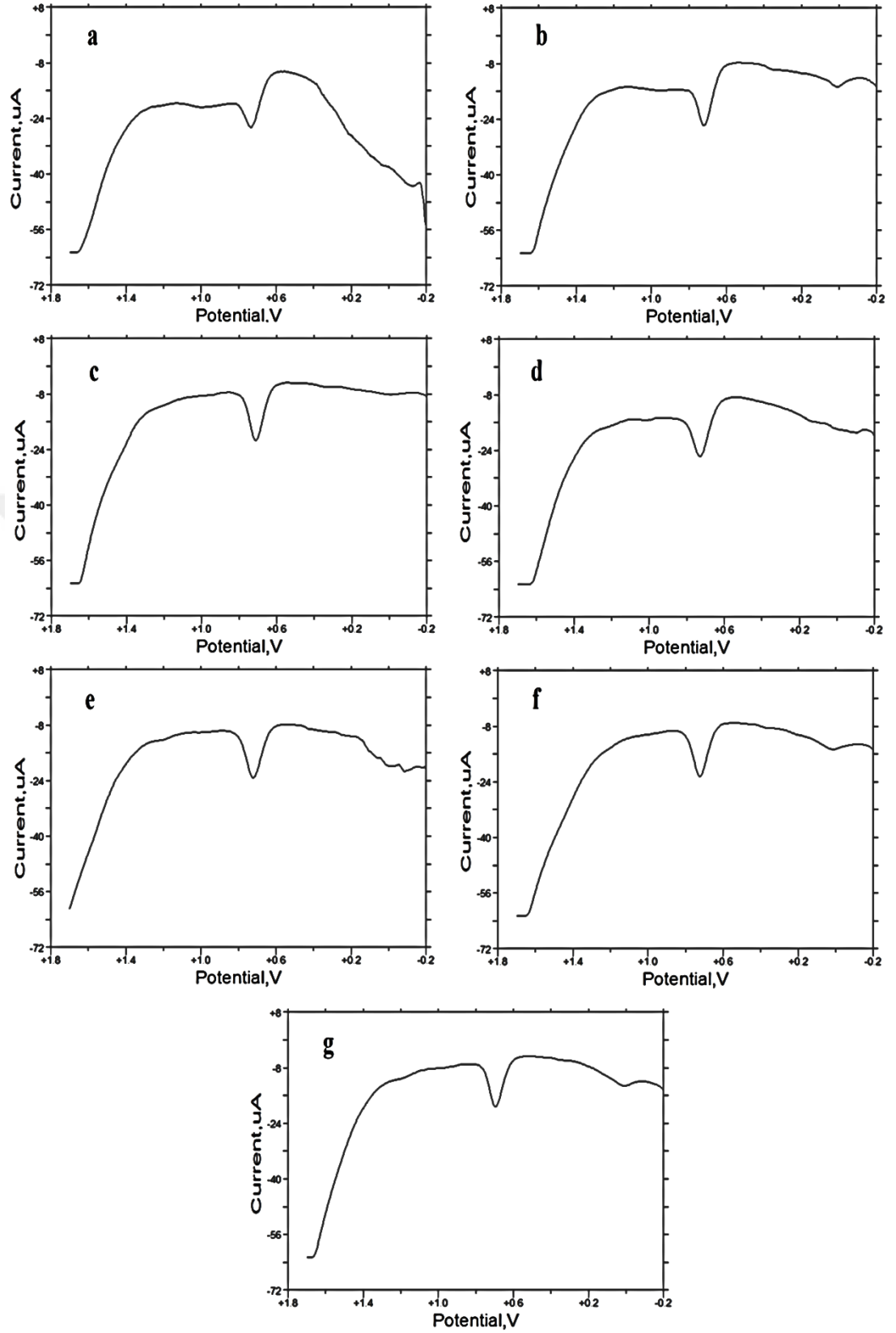


Şekil 4.56. Çevrim sayısının guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

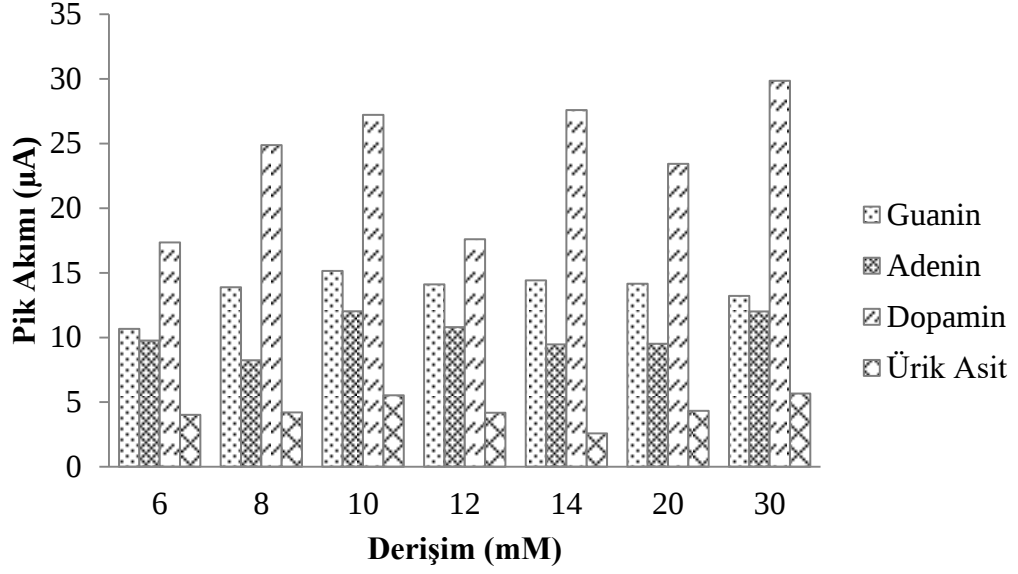
4.3.3. Monomer Derişiminin Etkisi

Film kalınlığı optimize edildikten sonra, kompozit elektrot yanıtına monomer derişiminin etkisini incelemek için, farklı derişimlerde monomer çözeltileri ile elektropolimerik filmler hazırlanmıştır.

0,2 M KCl içerisinde 6, 8, 10, 12, 14, 20 ve 30 mM olarak hazırlanan monomer çözeltilerinden 8 çevrimlik poli(anilin-2-sülfonik asit) filmi oluşturularak üzerine 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden 2 çevrim nano-Au kaplanmış ve bu elektrotların 100 μM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları ayrı ayrı incelenmiştir. Guanin yanıtları kıyaslandığında, 10 mM monomer çözeltisinden hazırlanan nanokompozit elektrodun guanin yanıtının daha büyük olduğu görülmüştür.



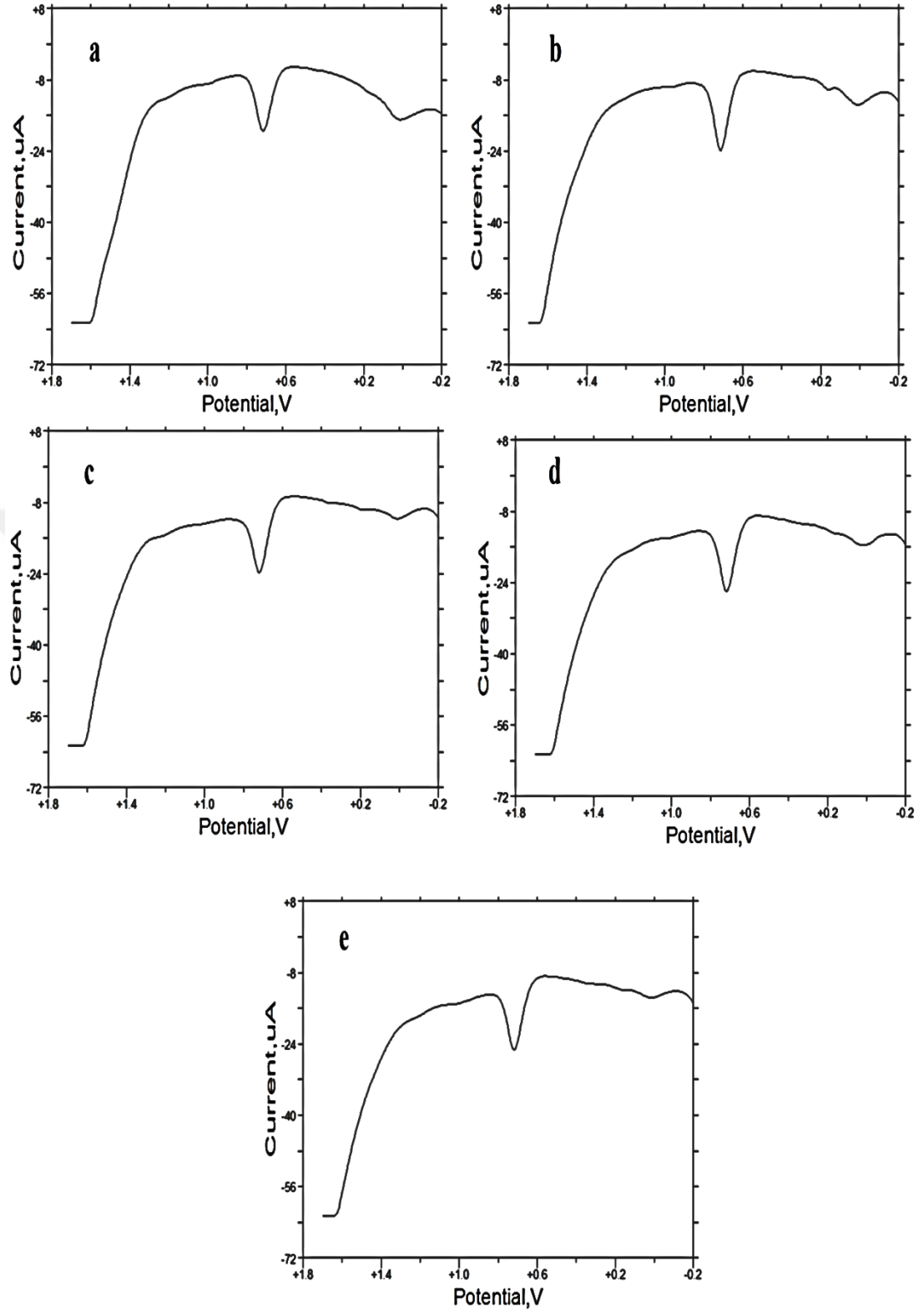
Şekil 4.57. 0,2 M KCl içerisinde a) 6, b) 8, c) 10, d) 12, e) 14, f) 20 ve g) 30 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 8 çevrim olarak hazırlanıp üzerine nano-Au kaplanan elektrodun 100 μ M guanin yanıtları



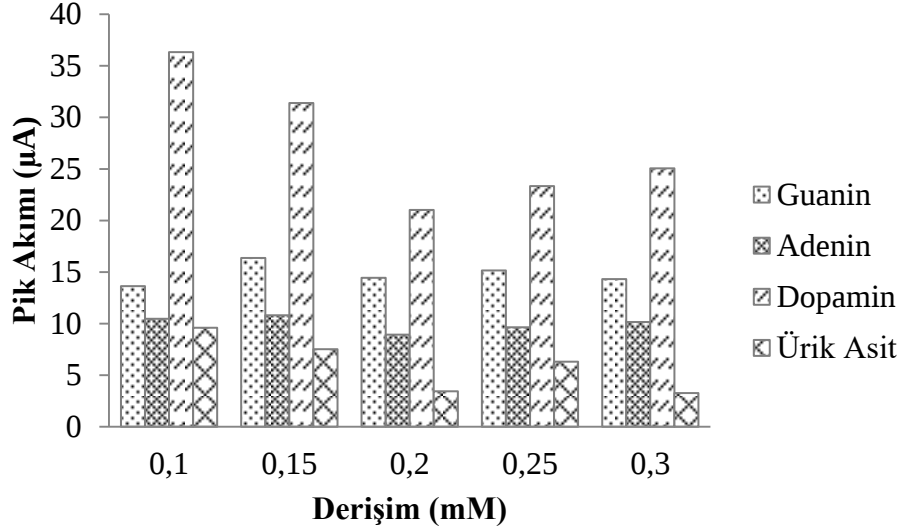
Şekil 4.58. Monomer derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

4.3.4. Polimerizasyon Ortamındaki Destek Elektrolit Derişiminin Etkisi

Film kalınlığı ve monomer derişimi optimize edildikten sonra, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 ve 0,3 M KCl içerisinde hazırlanan 10 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 8 çevrimlik filmin üzerine 2 mM HAuCl₄ çözeltisinden 2 çevrimlik film kaplanarak hazırlanan elektrotların, 100 μM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları incelenmiştir. Sonuçlar kıyaslandığında, 0,15 M KCl ortamında hazırlanan elektrodun guanin yanıtlarının daha büyük olduğu görülmüştür.



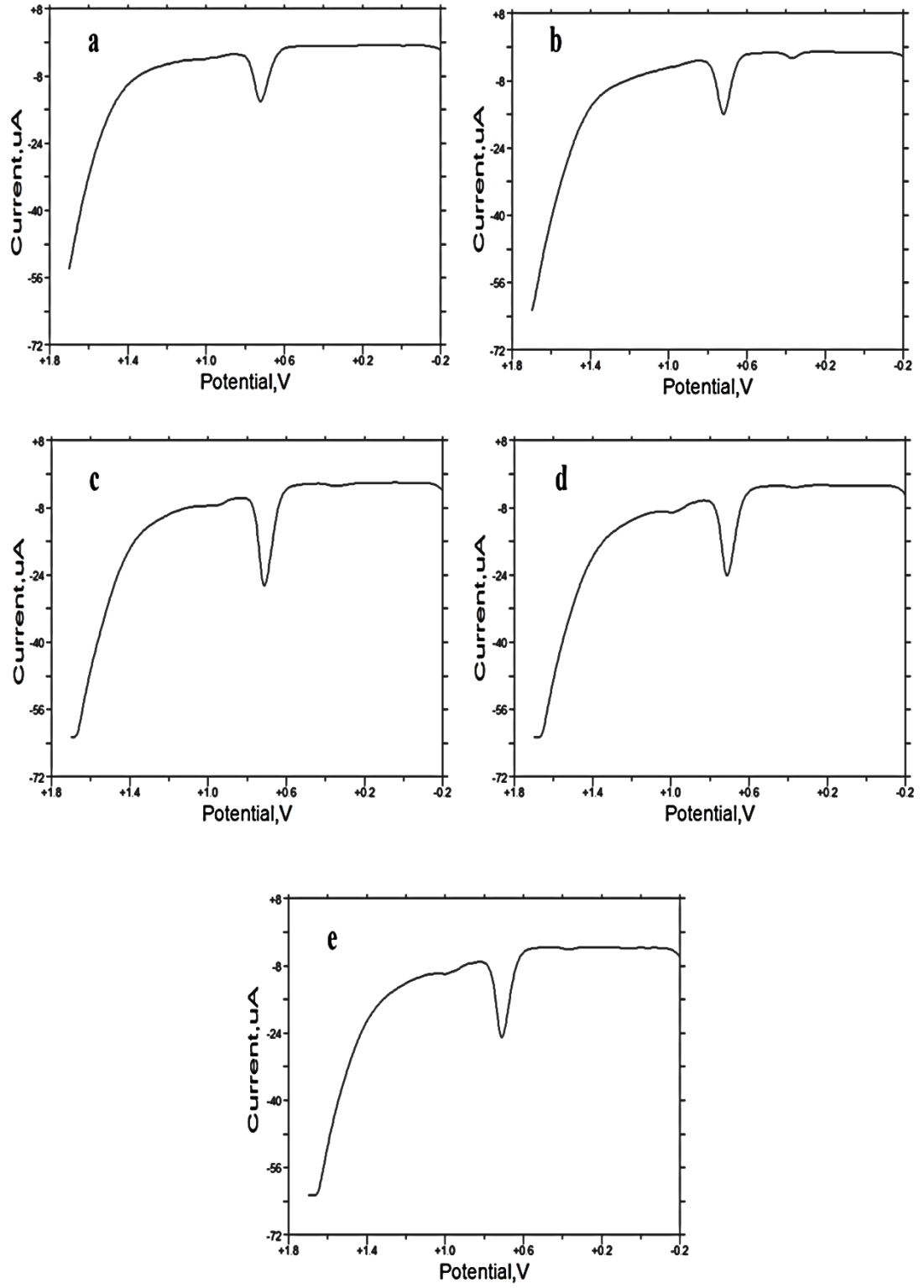
Şekil 4.59. a) 0,1 M, b) 0,15 M, c) 0,2 M d) 0,25 M, e) 0,3 M KCl içerisinde 10 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 8 çevrim olarak hazırlanıp üzerine nano-Au kaplanan elektrodun 100 μ M guanin yanıtları



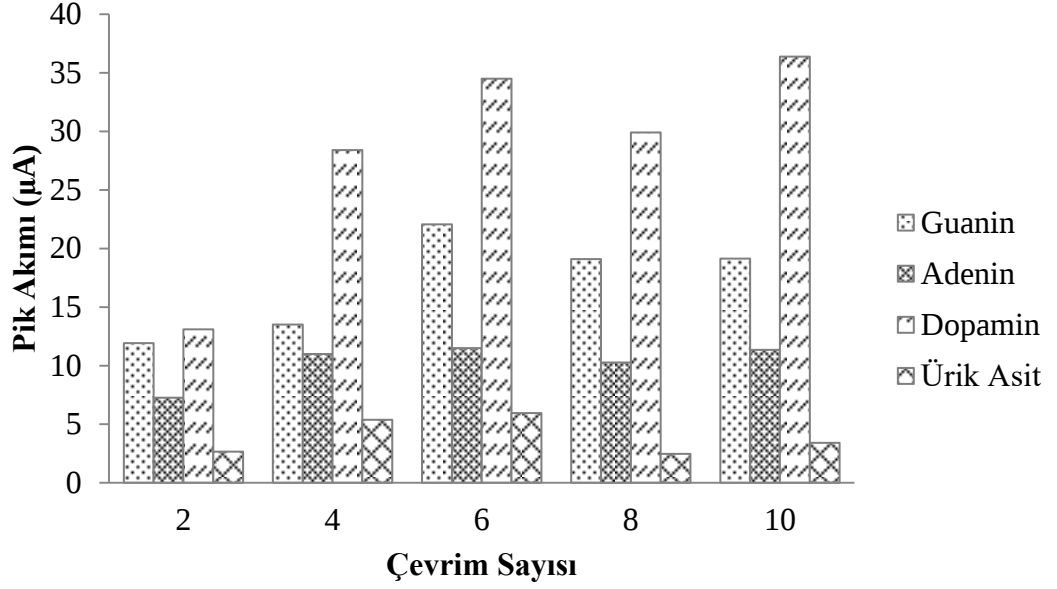
Şekil 4.60. Destek elektrolit derişiminin guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine etkisi

4.3.5. Altın Nanoparçacık Kalınlığının Etkisi

Film kalınlığı, monomer derişimi ve destek elektrolit derişimi optimize edildikten sonra, 0,15 M KCl içerisinde 10 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 8 çevrim olarak hazırlanan film üzerine 2, 4, 6, 8 ve 10 çevrim 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden nano-Au kaplanmış ve bu şekilde hazırlanan elektrotların 100 μM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlardan 6 çevrim olarak hazırlanan filmin, guanin yanıtının daha büyük olduğu görülmüştür.



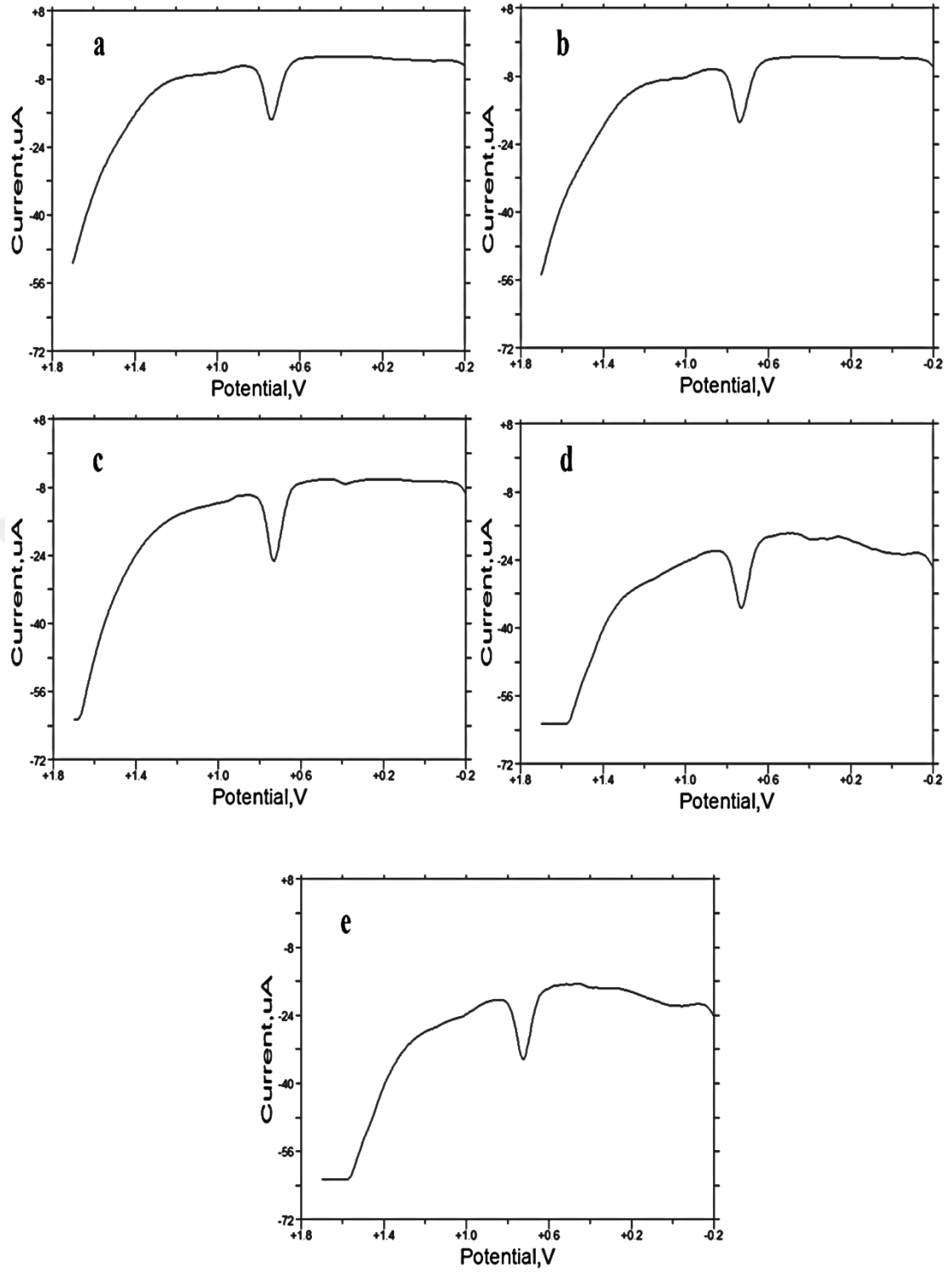
Şekil 4.61. PASA film üzerine 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden a) 2, b) 4, c) 6, d) 8, e) 10 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun $100 \mu\text{M}$ guanin yanıtları



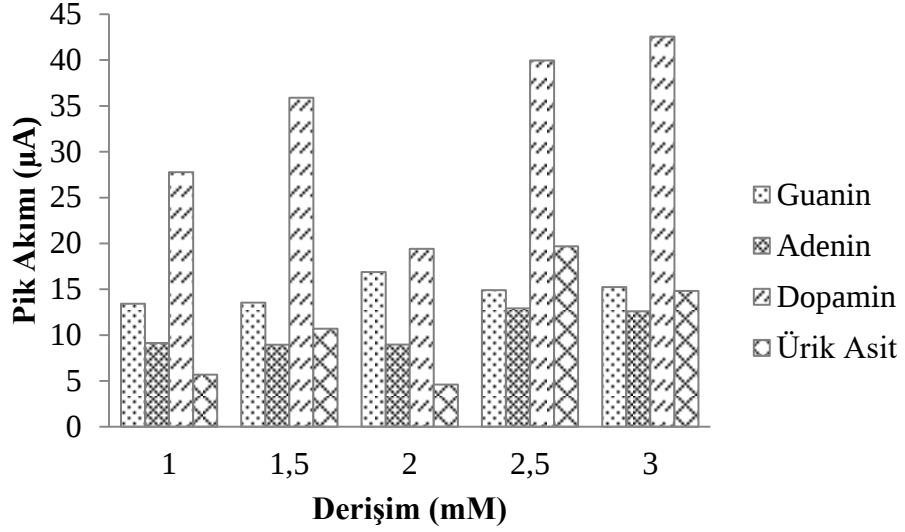
Şekil 4.62. Guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtı üzerine çevrim sayısının etkisi

4.3.6. H_{Au}Cl₄ Derişimin Etkisi

Film kalınlığı, monomer derişimi, destek elektrolit derişimi ve altın nanoparçacık kalınlığı optimize edildikten sonra 0,15 M KCl içerisinde 10 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 8 çevrim olarak hazırlanan filmin üzerine 6 çevrim 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM ve 3 mM H_{Au}Cl₄ çözeltisinden nano-Au kaplanarak hazırlanan elektrotların, 100 µM guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları incelenmiştir. Elde edilen voltamogramlardan, 2 mM H_{Au}Cl₄ çözeltisi kullanılarak hazırlanan filmin guanin yanıtının daha büyük olduğu görülmüştür.



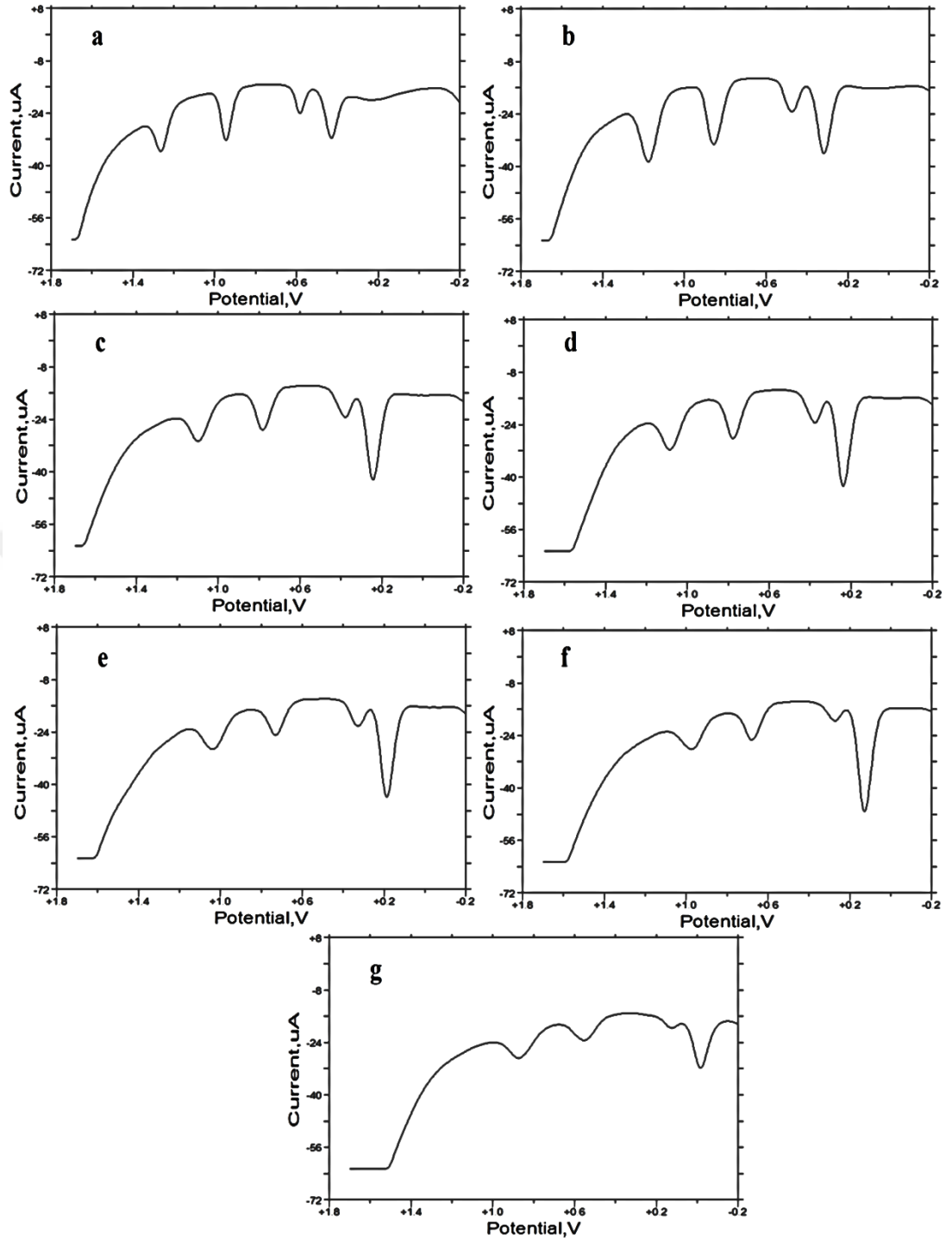
Şekil 4.63. PASA film üzerine a) 1 mM, b) 1,5 mM, c) 2 mM, d) 2,5 mM, e) 3 mM HAuCl₄ çözeltisinden 6 çevrim nano-Au kaplanan elektrodun 100 μM guanin yanıtları



Şekil 4.64. Guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları üzerine HAuCl_4 derişiminin etkisi

4.3.7. pH Etkisi

Film kalınlığı, monomer derişimi, destek elektrolit derişimi, altın nanoparçacık kalınlığı ve HAuCl_4 derişimi optimize edildikten sonra 0,15 M KCl içerisinde 10 mM anilin-2-sülfonik asit çözeltisinden 8 çevrim olarak hazırlanan filmin üzerine 2 mM HAuCl_4 çözeltisinden 6 çevrim nano-Au kaplanarak hazırlanan elektrotların, farklı pH'larda hazırlanan 100 μM 'lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışım ortamındaki guanin yanıtları DPV tekniği ile incelenmiştir. Voltamogramlar kıyaslandığında pH 4'te guanine yanıtının en büyük olduğu görülmektedir.

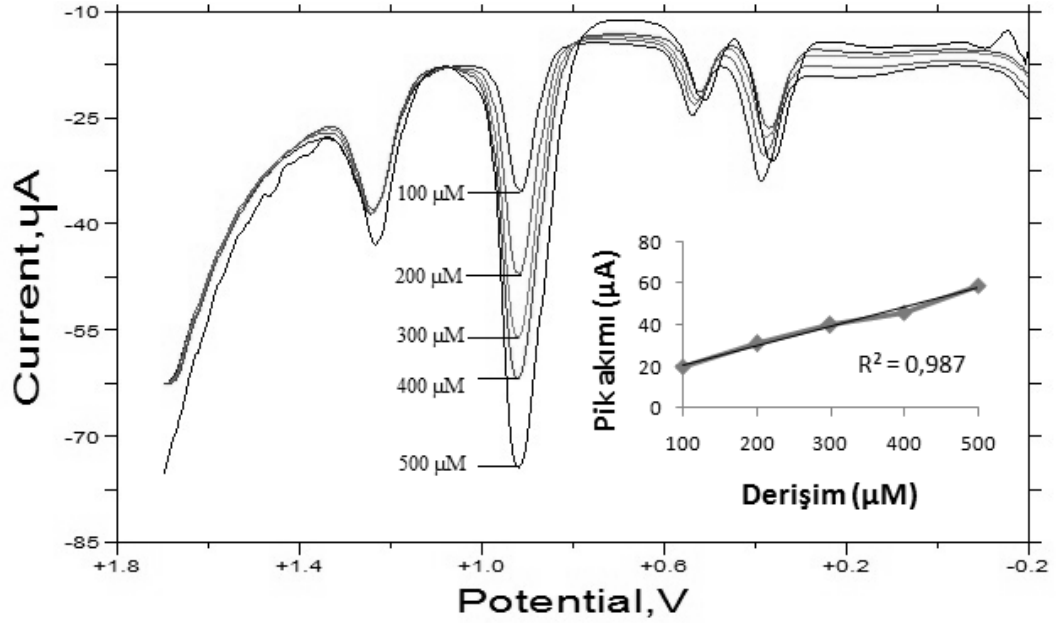


Şekil 4.65. Optimize elektrodun a) pH 3, b) pH 4, c) pH 5, d) pH 6, e) pH 7, f) pH 8, g) pH 9’da 100 μM ’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışıma ait DPV yanıtları

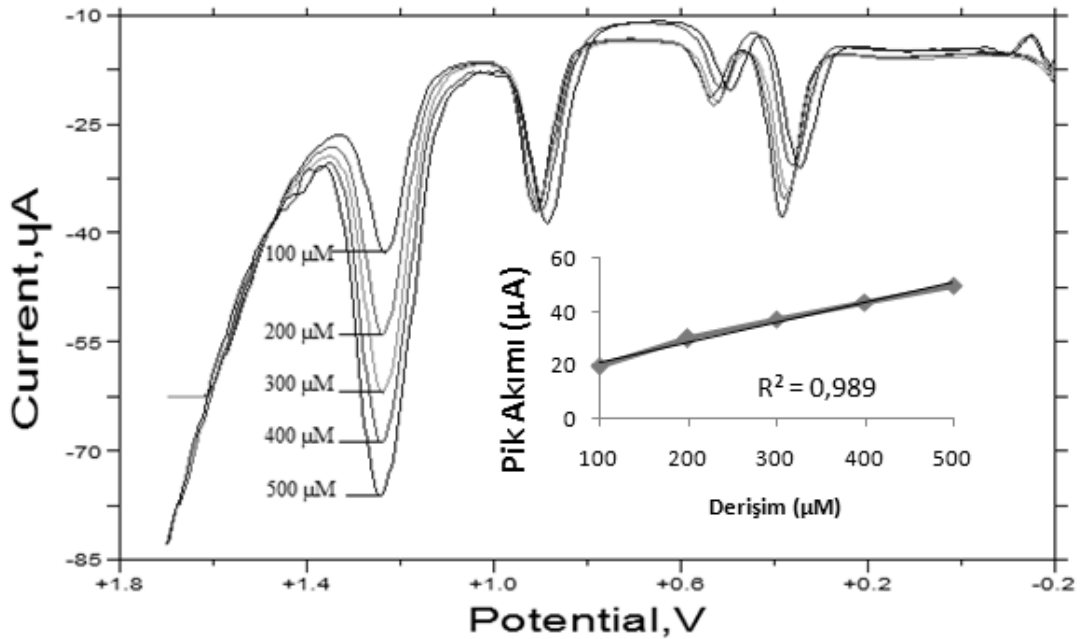
4.3.8. Guanin, Adenin, Ürik Asit ve Dopaminin Eşzamanlı Tayini

Optimize nano-Au/PASA/GC elektrodun, guanin, adenin, dopamin ve ürik asitin eşzamanlı tayininde kullanılabilirliğinin test edilmesi amacıyla, her bir analit derişiminin 100 μM olduğu çözelti hazırlanmış ve yanıtlar incelenmiştir. Artan guanin derişimi ile guanin pik akımlarının arttığı, diğer analitlerin pik akımlarının ise

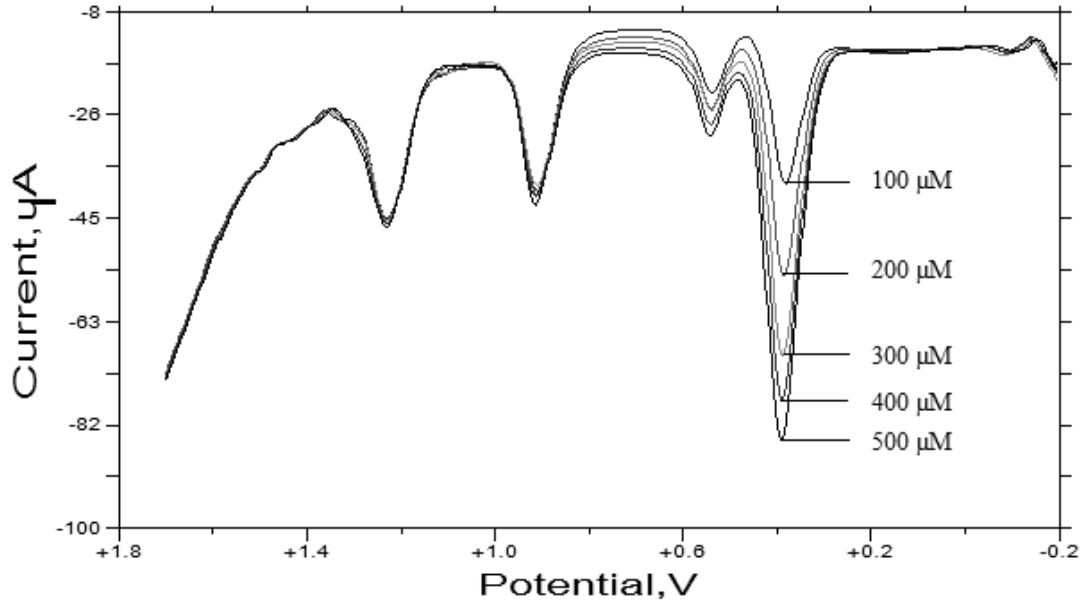
değişmediği gözlenmiştir. Buna bağlı olarak elde edilen kalibrasyon grafiği, guanin pik akımlarının oldukça doğrusal bir şekilde arttığını göstermiştir. Aynı işlem adenin, ürik asit ve dopamin için de tekrarlanmış ve ilgili analitin derişim artışına paralel olarak yanıtının arttığı, diğer analitlerin pik akımlarının ise değişmediği gözlenmiştir.



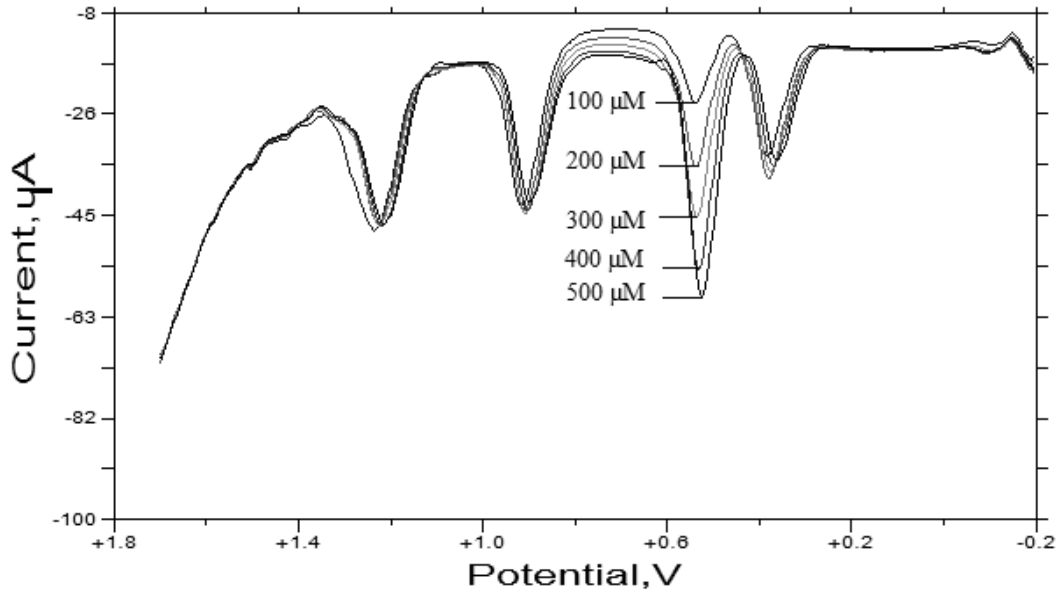
Şekil 4.66. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4’de 100 µM’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan guanin derişim yanıtları



Şekil 4.67. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4’de 100 µM’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan adenin derişim yanıtları



Şekil 4.68. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4’de 100 μM ’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan dopamin derişim yanıtları



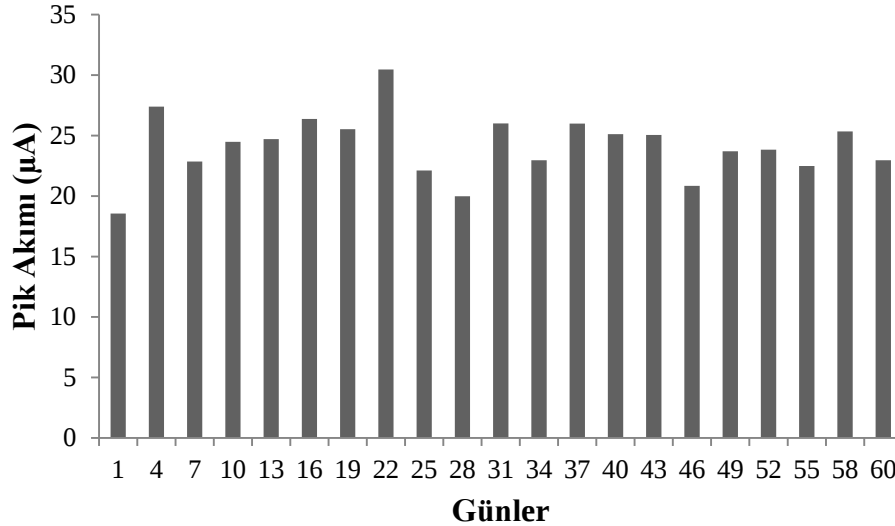
Şekil 4.69. Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4’de 100 μM ’lık guanin, adenin, ürik asit ve dopamin içeren karışımda artan ürik asit derişim yanıtları

4.3.9. Kararlılık

Optimum şartlarda hazırlanan sensörün ne kadar süre ile incelenen analite yanıt verdiğini araştırmak amacıyla, optimize nano-Au/PASA/GC elektrodun üzer

gün ara ile 100 μ M guanin yanıtları incelenmiş ve 60. gün sonunda da hazırlanan elektrodun guanine yanıt verdiği gözlenmiştir.

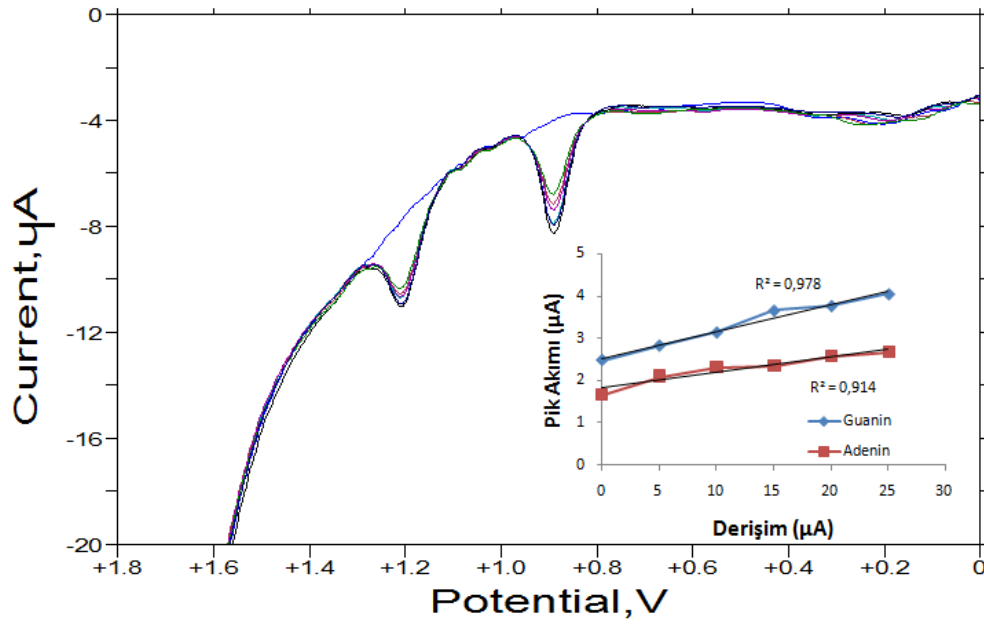
Optimize elektrot kullanılmadığı zamanlarda PBS (pH 4) içerisinde bekletilmiştir. Aşağıdaki grafikte guanin yanıtları gün bazında gösterilmiş olup, her sütun 3 guanin ölçümünün ortalamasını temsil etmektedir.



Şekil 4.70. Optimize elektrodun kararlılığı

4.3.10. Optimum Elektrodun DNA uygulaması

Diğer nanokompozit elektrotlarda uygulanan DNA baz derişimlerinin hesaplanmasında kullanılan prosedür, bu elektrot için de uygulanmıştır. 10 mg çift sarmal balık sperm DNA'sı 1 mL saf suda çözündükten sonra termal denatürasyon ile tek sarmal DNA'ya denatürüze edilmiştir. Optimize nanoAu/PASA/GC elektrodun, 50 μ L ssDNA'nın, 5 mL PBS (pH 4)'ye seyreltilmesiyle hazırlanan çözeltideki DPV'si alınmıştır. Aynı çözelti üzerine her defasında 5 μ M guanin ve 5 μ M adenin olacak şekilde enjeksiyonlar yapılarak, standart katma yöntemi ile DNA'daki guanin ve adenin derişimleri bulunmuş, guanin derişiminin adenin derişimine oranı hesaplanmıştır.



Şekil 4.71.Optimum şartlarda hazırlanan elektrodun PBS pH 4'te **a)** zemin, **b)** 50μL ssDNA, **c)** 5 μM, **d)** 10 μM, **e)** 15 μM, **f)** 20 μM **g)** 25 μM Guanin ve Adenin DPV yanıtları

Standart ekleme yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinden; guanin derişimi 39,42 μM ve adenin derişimi ise 50,5 μM olarak hesaplanmıştır. Balık sperm DNA baz dizisindeki guanin derişiminin adenin derişimine oranı ise 0,7805 olarak hesaplanmıştır. Bulunan bu oranın, litaratür ile oldukça uyumlu olduğu görülmüştür.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İletken polimerler oluşturduğu bilinen anilin, pirol ve türevleri ile ilgili yapılan pekçok sensör çalışması mevcuttur. Parçacık boyutunun kontrol edilebilir olması, kimyasal dayanıklılıkları, yüksek katalitik aktiviteleri ve yüzeye tutunabilirlikleri gibi üstünlükleri sebebiyle, bazı soy metal nanoparçacıkları sensör duyarlılığını artırmak amacıyla kullanılabilir. Bu amaçla camı karbon elektrot yüzeyinde 4 çevrim olarak hazırlanan polianilin, 8 çevrim olarak hazırlanan poli(anilin-2-sülfonik asit) polimerlerinin üzerine çevrimli voltametri yöntemi ile 6 çevrim altın nanoparçacıklar modifiye edilmiştir. Çevrimli voltamogramlar incelendiğinde; artan çevrim sayısı ile birlikte pik potansiyel ve akımların değiştiği ancak yok olmadığının görülmesi GCE yüzeyinde iletken yapıların oluştuğunun bir göstergesidir. Hazırlanan nanokompozit elektrot ile guanin, adenin, dopamin ve ürik asit yanıtları DPV tekniği ile incelendiğinde, ilgili dört türün yükseltgenme piklerinin birbiriyle çakışmıyacak şekilde ayrıldığı ve nanoparçacık içermeyen elektropolimerik sensöre göre yanıtların arttığı gözlenmiştir. Bu bağlamda; optimum çevrim sayısının az olması nedeniyle nanoAu/PA/GC elektrot, nanoAu/PASA/GC elektroda göre daha kolay hazırlanmaktadır. Anilin monomeri için elektropolimerizasyon potansiyel aralığı 0 V ile (+1,7 V), anilin-2-sülfonik asit monomeri için ise (-1,0 V) ile (+1,0 V)'dur. Anilin monomeri daha dar bir potansiyel aralığında polimerleşebildiği için daha kolay ve kısa sürede polimerleşmesi sebebiyle avantajlıdır. Aynı prosedürle hazırlanan nanoAu/PNMPy/GC elektrodunda ise nanoparçacık içermeyen elektropolimerik sensöre göre yanıtların daha düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle elektrot yüzeyine altın nanoparçacık ve polimerik film 8 çevrim olarak eş zamanlı kaplanmıştır. Hazırlanan nanokompozit elektrodun guanin yanıtları iki tabaka (PNMPy/nanoAu) ve tek tabaka (PNMPy) olarak hazırlanan elektrotlarla kıyaslandığında, eş zamanlı polimerizasyonla hazırlanan elektrodun guanin yanıtlarının daha büyük olduğu görülmüştür. Tek basamaklı elektrokimyasal biriktirme yöntemiyle hazırlanan bu sensör daha az işlem basamağı gerektirmesi ve daha kısa sürede hazırlanmasıyla nanoAu/PA/GC ve nanoAu/PASA/GC elektroda göre daha avantajlıdır.

Bir ya da iki basamaklı biriktirme ile hazırlanmaları, oda sıcaklığında polimerleşebilmeleri, çevrim sayısı ile yüzeydeki kalınlıklarının kontrol edilebilir olması nanokompozit karakterdeki bu elektrotların en büyük avantajlarıdır.

Her bir elektrot için optimum film ve altın nanoparçacık kalınlıklarına karar verildikten sonra sensör karakteristiklerini etkileyen parametreler (monomer derişimi, polimerizasyon ortamındaki destek elektroliti derişimi, HAuCl_4 derişimi ve pH) sistematik olarak incelenmek suretiyle, optimizasyon yapılmıştır. Öncelikle polimerik filmin morfolojisine etki edebilecek parametrelerin optimizasyonu tamamlanmıştır. Kıyaslamalarda 100 μM guanin yanıtları esas alınmıştır.

- Anilin için optimum monomer derişimi 25 mM, *N*-metil pirol için 30 mM ve anilin-2-sülfonik asit için ise 10 mM olarak belirlenmiştir.
- Polimerizasyon ortamındaki destek elektroliti derişimi için bulunan optimum değerler ise anilin, *N*-metil pirol ve anilin-2-sülfonik asit monomerlerinde sırayla 0,1 M, 0,2 M, ve 0,15 M olarak belirlenmiştir.
- Altın nanoparçacık kaplaması sırasında kullanılan HAuCl_4 derişimi için bulunan optimum değerler ise; PA/GCE için 2,5 mM, PNMPy/GCE için 1,5 mM, PASA/GCE için ise 2 mM olarak bulunmuştur. Burada maliyet açısından kıyaslama yapıldığında PNMPy/GCE daha düşük derişimde altın gerektirmesi sebebiyle, PASA/GCE ise daha az miktarda monomer gerektirmesi sebebiyle daha avantajlıdır.

Nanokompozit elektrodun hazırlanması sırasındaki tüm parametreler optimize edildikten sonra guanin için ölçüm ortamı olan farklı pH'lardaki 0,1 M PBS'nin guanin yanıtı üzerine etkisi incelenmiştir. Bu ölçümler ortamda her bir analit (guanin, adenin, dopamin, ürik asit) 100 μM olacak şekilde hazırlanan çözeltilerde gerçekleştirilmiştir. NanoAu/PA/GCE ve nanoAu/PNMPy/GCE için pH 5, NanoAu/PASA/GCE için ise pH 4 olarak belirlenmiştir. Ayrıca artan pH ile birlikte hidrojen iyonu derişiminin azalmasından dolayı pik potansiyelleri pH arttıkça daha negatif kaymıştır.

Optimizasyonu tamamlanan elektrotların kararlılık testleri incelendiğinde ise; nano Au/PA/GC ve nano Au/PNMPy/GC elektrodu için 90 gün, nanoAu/PASA/GC elektrodu için 60 gün süre ile sınırlandırılmıştır. 90 gün sonunda guanin yanıtındaki

azalma nanoAu/PA/GCE için % 26,83, nanoAu/PNMPy/GCE için ise % 19,12 olarak hesaplanmıştır. NanoAu/PASA/GC ise 60. gün sonunda guanin yanıtlarında %23,7' lik bir artış olduğu görülmektedir. Bu artışın PBS içerisinde bekletilen elektrodun yüzey morfolojisinin değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bağlamda bakıldığında nanoAu/PASA/GC elektrot guanin yanıtında azalma olmaması sebebiyle daha avantajlıdır. Ayrıca literatürdeki çalışmalara bakıldığında kararlılık deneyi maksimum 45 gün ile sınırlandırılmış ve guanin yanıtındaki azalma %10 olarak belirtilmiştir [44]. Her üç nanokompozit elektrot için elektropolimerik filmlerin camsı karbon elektrot yüzeyine kuvvetle tutunduğu, elektrot yüzeyinden uzun süre düşmediği ve bir aşınmaya uğramadığı düşünülmektedir. Ayrıca hazırlanan nanokompozit elektrotlar ile en az 270 kez ölçüm alınabilmektedir.

Optimize elektrotlar ile balık sperm DNA'sındaki guanin ve adenin derişimlerinin hesaplanmasında ise standart katma yöntemi kullanılmıştır.

- NanoAu/PA/GC elektrot için balık sperm DNA'sındaki guanin derişimi 18,497 μM ve adenin derişimi 23,61 μM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.30). Guanin derişiminin adenin derişimine oranı ise 0,7834 olarak hesaplanmıştır. Literatürde bu değerin 0,77 [36,37,46] olduğu düşünüldüğünde nano Au/PA/GC elektrot ile DNA baz derişimleri oranı % 1,71'lik hata ile yapılabilmektedir. Aynı zamanda elde edilen sonuçlardan; hazırlanan nanokompozit elektrot ile yanıt alınan en düşük guanin derişiminin de yaklaşık 18,5 μM olduğu görülmektedir.
- NanoAu/PASA/GC elektrot için balık sperm DNA'sındaki guanin derişimi 39,42 μM , adenin derişimi 50 μM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.71). Guanin derişiminin adenin derişimine oranı ise yine literatürdeki değere çok yakın bir sonuç olan 0,7805 olduğu görülmektedir. Hazırlanan bu nanokompozit karakterdeki elektrot ile DNA baz oranları % 1,34'lük hata ile hesaplanabilmektedir.
- NanoAu/PNMPy/GC elektrot için balık sperm DNA'sındaki guanin derişimi 27,78 μM , adenin derişimi ise 30,5 μM olarak hesaplanmıştır. Guanin derişimi adenin derişimine oranlandığında bulunan 0,9108 oranı literatürdeki değerden sapmaktadır. Bunun sebebinin adenin derişimi için elde edilen grafiğin doğrusallığının düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu

nanokompozit elektrot ile de balık sperm DNA'sındaki baz oranları % 15,46'lık hata ile hesaplanmıştır.

Çalışılan üç nanokompozit elektrot içerisinde en düşük hata ile balık sperm DNA'sındaki baz oranlarının hesaplamasının yapılabilmesi ile NanoAu/PASA/GC elektrot öne çıkmaktadır. Aynı zamanda bu hata payı literatürdeki bir çok çalışmadan daha avantajlıdır. [41-44,46,48,49]

Sonuç olarak çalışmada tasarımı yapılan elektropolimerik nanokompozit elektrotlar ile balık sperm DNA'sında ölçümler yapılması mümkün olmuştur. Literatürde guanin, adenin, dopamin ve ürik asidin eş zamanlı tayinine yönelik olarak, son üç yıl içerisinde iki adet çalışma bulunmaktadır [30,40]. Yapılan bu çalışmalarda, elektrot hazırlama yöntemi, ya kimyasal polimerizasyon ya da karmaşık elektrokimyasal işlem basamakları gerektirmekte ve yapılan çalışmaların sadece bir tanesinde gerçek DNA örnekleri ile ilgili uygulama bulunmaktadır. Bu bağlamda hazırlanan nanokompozit elektrotların kolay hazırlanabilir olmaları ve ilgili dört türün eş zamanlı tayinine olanak sağlamaları sayesinde, literatürdeki kısıtlı sayıdaki çalışmalara önemli alternatifler oluşturduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] K. Huang, D. Niu, J. Sun, C. Han, Z. Wu, Y. Li, X. Xiong, *Novel Electrochemical Sensor Based On Functionalized Graphene For Simultaneous Determination Of Adenine And Guanine in DNA*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 82: (2011); 543-549
- [2] A. Yari, S. Derki, *New MWCNT-Fe₃O₄@PDA-Ag Nanocomposite as a Novel Sensingelement of an Electrochemical Sensor for Determination of Guanine and Adenine Contents of DNA*, **Sensors and Actuators B**, 227: (2016); 456–466
- [3] F. Xiao, F. Zhao, J. Li, L. Liu, B. Zeng, *Characterization of Hydrophobic Ionic Liquid-Carbon Nanotubes-Gold Nanoparticles Composite Film Coated Electrode and Simultaneous Voltametric Determination of Guanine And Adenine*, **Electrochim. Acta**, 53: (2008); 7781-7788
- [4] R.M. Wightman, L.J. May, A.C. Micheal, *Detection of Dopamine Dynamics in The Brain*, **Anal Chem**, 60: (1988); 769A-779A
- [5] S. Kursun, A. Pasahan, B.Z. Ekinici, E. Ekinici, *Electropolymerized Polytyramine Film For The Selective Determination of Uric Acid*, **Polymer-Plastics Technology And Engineering**, 12: (2012); 1209-1212
- [6] S. Kursun, B.Z. Ekinici, A. Pasahan, E. Ekinici, *Preparation and Properties of Amperometric Uric Acid Sensor Based on Poly(2-aminophenol)*, **J. Appl. Polym. Sci.**, 120: (2011); 406-410
- [7] A. Ferancová, S. Rengaraj, Y. Kim, J. Labuda, M. Sillanpää, *Electrochemical Determination of Guanine and Adenine by CdS microspheres modified electrode and evaluation of damage to DNA pürine bases by UV radiation*, **Biosensors and Bioelectronics**, 26: (2010) 314-320
- [8] B. Rezaei, H. Khosropour, A.A. Ensafi, M. Dinari, A. Nabiyan, *A New Electrochemical Sensor For the Simultaneous Determination of Guanine And Adenine: Using A NiAl-Layered Double Hydroxide/Graphene Oxide-Multi Wall Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrode*, **RSC, Adv**, 5: (2015); 75756-75765
- [9] F. Xiao, F. Zhao, J. Li, L. Liu, B. Zeng, *Characterization of Hydrophobic Ionic Liquid-Carbon Nanotubes-Gold Nanoparticles Composite Film Coated Electrode And The Simultaneous Voltammetric Determination of Guanine And Adenine*, **Electrochimica Acta**, 53: (2008); 7781-7788
- [10] N.F. Atta, M. F. El-Kady, *Novel Poly(3-Methylthiophene)/Pd, Pt Nanoparticle Sensor: Synthesis, Characterization And Its Application To The Simultaneous Analysis Of Dopamine And Ascorbic Acid in Biological Fluids*, **Sens Actuators B**, 145: (2010); 299-310
- [11] T. Gündüz, *İnstrümental Analiz*, Ankara, 2007;
- [12] A. Yıldız, Ö. Genç, *Enstrümental Analiz*, Ankara, 1993; 341-398

- [13] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, 563-670
- [14] P. Çekirdek, Voltametrik Metotlarla Ditiyofosfonat Anyonlarının Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 2005
- [15] <http://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/teaching-notes/linear-sweep-and-cyclic-voltametry-the-principles>
- [16] S. Güney, “Modifiye Elektrotların Geliştirilmesi ve Voltametrik Tayinlerde Kullanılmalarının İncelenmesi”, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2010
- [17] Hardcastle, J. L., Murcott, G. G. and Compton, R. G., 20 *Sonoelectroanalysis: Ultrasonically Facilitated Liberation And Determination of Copper in Whole Blood, Electroanalysis*, 12: 559-563
- [18] Kruusma, J., Nei, L., Hardcastle, J. L., Compton, R. G., Lust, E. and Keis, H., 2004. *Sonoelectroanalysis: Anodic stripping voltammetric determination of cadmium in whole human blood, Electroanalysis*, 16, 399-403
- [19] E. Kılıç, F. Köseoğlu, H. Yılmaz, enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, Türkiye, 1998, 656-657
- [20] N.K. Chaki, K. Vijayamohanan, *Self Assembled Monolayers as a Tunable Platform for Biosensor Applications, Biosensors&Bioelectronics*, 17, (2002); 1-12
- [21] R. W. Murray, A.G. Ewing, R.A. Durst, *Chemically Modified Electrodes. Molecular Design For Electroanalysis, Anal. Chem.*, 59: (1987); 379A-390A
- [22] A. J. Downard, *Electrochemically Assisted Covalent Modification of Carbon Electrodes, Electroanalysis*, 12: (2000); 1085-1096
- [23] A.Walcarius, *Electrochemical applications of silica-based organico/inorganic hybrid materials, Chemistry of Materials*, 13: (2001);3351-3372
- [24] S. Kurşun, A. Paşahan, B. Z. Ekinci, E. Ekinci, *Electropolymerized Polytyramine Film for the Selective Determination of Uric Acid, Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 51: (2012); 1209-1212
- [25] J. M. Zen, *Recent Updates of Chemically Modified electrodes in Analytical Chemistry, Electroanalysis*, 15: (2003); 1073-1087
- [26] G. Sağlıkoğlu, Nitroimidazol Türevi Antibakteriyel Etkili İlaç Aktif Maddelerinin Dozaj Formlarından Modifiye ve Modifiye Edilmemiş Elektrotlarda Voltametrik Teknikler ile Kantitatif Analizi, Doktora Tezi, 2011, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
- [27] Stetter J., Penrose W., *Understanding Chemical Sensors and Chemical Sensors Arrays; Past, Present and Future, Sensors Update*, 10: (2002); 189-229
- [28] Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B., *Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications, Angew. Chem.Int. De.Engl.*, 30: (1991);516-539

- [29] E. Kecha, İ. Küfrevioğlu, *Biyokimya*, İstanbul, 2009, 195-206
- [30] H. Li, X. Wang, Z. Yu, *Electrochemical Biosensor For Sensitively Simultaneous Determination of Dopamine, Uric Acid, Guanine and Adenine Based on Poly-Melamine and Nano Ag Hybridized Film-Modified Electrode*, **J. Solid State Electrochem**, 18: (2014); 105-113
- [31] E. Palecek, F. Jelen *Electrochemistry of Nucleic Acids*, Czech Republic, 73-173
- [32] S. Kurşun, Bazı Fenol Türevli Elektropolimerik Filmlerin Ürik Asit Seçiciliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, 2010
- [33] N. A. El-Maali, D. Abd El-Hady, *Square-wave stripping voltammetry of uranium(VI) at the glassy carbon electrode. Application to some industrial samples*, **Electroanalysis**, 11: (1999); 201-206.
- [34] S. K. Ayazli, B. Z. Ekinici, E. Ekinici, *DNA Base Sensor Characteristics of Polymeric Nanocomposite Electrode*, **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, 65: (2016); 105-110
- [35] M. M. Gvozdenović¹, B. Z. Jugović, J. S. Stevanović, T. Lj. Trišović, B. N. Grgur, *Electrochemical Synthesis of Electroconducting Polymers*, **Hem. Ind.** 68 (2014); 673–684
- [36] L. Svorc, K. Kalcher, *Modification-Free Electrochemical Approach For Sensitive Monitoring of Purine DNA Bases: Simultaneous Determination Of Guanine And Adenine in Biological Samples Using Boron-Doped Diamond Electrode*, **Sensors and Actuators B**, 194: (2014); 332– 342
- [37] K. J. Huang , L. Wang, H. B. Wang, T. Gan, Y. Y. Wu, J. Li, Y.M. Liu, *Electrochemical Biosensor Based on Silver Nanoparticles–Polydopamine–Graphene Nanocomposite For Sensitive Determination of Adenine and Guanine*, **Talanta** 114: (2013); 43–48
- [38] A. Kutluay, M. Aslanoglu, *Electrocatalytic Oxidation of Isoproterenol and its Voltammetric Determination in Pharmaceuticals and Urine Samples Using a Poly(1-methylpyrrole)-DNA Modified Electrode*, **Acta Chim. Slov.** 57: (2010); 157–162
- [39] M. Aslanoglu, A. Kutluay, S. Karabulut, S. Abbasoglu, *Voltammetric Determination of Adrenaline Using a Poly(1-Methylpyrrole) Modified Glassy Carbon Electrode*, **Journal of the Chinese Chemical Society**, 55: (2008); 794-800
- [40] L. M. Niua, K. Q. Liana, H. M. Shia, Y. B. Wub, W. J. Kanga, S. Y. Bi, *Characterization of an Ultrasensitive Biosensor Based On A Nano-Au/DNA/Nano-Au/Poly(SFR) Composite And its Application in The Simultaneous Determination of Dopamine, Uric Acid, Guanine, and Adenine*, **Sensors and Actuators B: Chemical**, 178: (2013); 10-18
- [41] Y. S. Gao, J. K. Xu, L. M. Lu. P. Wu, K. X. Zhang, T. Nie, X. F. Zhu, Y. Wua, *Overoxidized Polypyrrole/graphene Nanocomposite With Good Electrochemical Performance as Novel Electrode Material for the Detection of Adenine and Guanine*, **Biosensors and Bioelectronics**, 62: (2014); 261–267

- [42] Y. Fan, K. J. Huang, D. J. Niua, C. P. Yang, Q. S. Jing, *TiO₂-graphene Nanocomposite for Electrochemical Sensing of Adenine and Guanine*, **Electrochimica Acta**, 56: (2011); 4685–4690
- [43] A. A. Ensafi, M. M. Abarghoui, B. Rezaei, *A New electrochemical Sensor Based on Porous Silicon Supported Pt-Pd Nanoalloy for Simultaneous Determination of Adenine and Guanine*, **Sensors and Actuators B**, 204: (2014); 528–535
- [44] S. Chatterjee, A. Chen, *Facile Electrochemical approach for the Effective Detection of Guanine*, **Electrochemistry Communications**, 20: (2012); 29–32
- [45] Z. Wang, S. Xiao, Y. Chen, *β -Cyclodextrin Incorporated Carbon Nanotubes-Modified Electrodes for Simultaneous Determination of Adenine and Guanine*, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 589: (2006); 237–242
- [46] S. Shahrokhian, S. Rastgar, M.K. Amini, M. Adeli, *Fabrication of a modified electrode based on Fe₃O₄NPs/MWCNT nanocomposite: Application to simultaneous determination of guanine and adenine in DNA*, **Bioelectrochemistry**, 86: (2012); 78–86
- [47] S. Pruneanu, A. R. Biris, F. Pogacean, M. Coroş, G. K. Kannarpady, F. Watanabe, A. S. Biris, *The Study of Adenine and Guanine Electrochemical Oxidation Using Electrodes Modified with Graphene-platinum Nanoparticles Composites*, **Electrochimica Acta**, 139: (2014); 386–393
- [48] X. Zhang, X. Liang, M. Xu, X. Bao, F. Wang, Z. Yang, *Electrodeposit Nanocopper Oxide on Glassy Carbon Electrode for Simultaneous Detection of Guanine and Adenine*, **J Appl Electrochem**, 42: (2012); 375–381
- [49] H. Liu, G. Wang, D. Chen, W. Zhang, C. Li, B. Fang, *Fabrication of Polythionine/NPAu/MWNTs Modified Electrode for Simultaneous Determination of Adenine and Guanine in DNA*, **Sensors and Actuators B**, 128: (2008); 414–421

7. ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Sezen KURŞUN AYAZLI

Doğum Yeri ve Tarihi: Susurluk, 22 Haziran 1984

Adres: İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

E-Posta: sezenkursun@gmail.com

Lisans: İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü, 2007.

Yüksek Lisans: İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, 2010

Mesleki Deneyim: İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi (2007-Devam ediyor)

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR

S. K. Ayazli, B. Z. Ekinci, E. Ekinci, *DNA Base Sensor Characteristics of Polymeric Nanocomposite Electrode*, **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, 65: (2016); 105-110

YAYIN LİSTESİ

1. S. Kurşun, B. Z. Ekinci, A. Paşahan, E. Ekinci, Preparation and Properties of Amperometric Uric Acid Sensor Based on Poly(2-aminophenol), **JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE**, Volume 120, Issue 1, pages 406–410, 5 April 2011
2. S. Kurşun, B. Z. Ekinci, A. Paşahan, E. Ekinci, Poly (3-aminophenol) Film as a Uric Acid-Selective Electrode, **International Journal of Polymeric Materials**, Volume 60, Issue 6, 2011
3. S. Kurşun, A. Paşahan, B. Z. Ekinci, E. Ekinci, Electropolymerized Polytyramine Film for the Selective Determination of Uric Acid, **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, Volume 51, Issue 12, 2012

Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

1. Poli(2-aminofenol) Elektrodun Ürik Asit Seçiciliğinin İncelenmesi
Sezen KURŞUN, Bilge ZABCI EKİNCİ, Aziz PAŞAHAN, Ergun EKİNCİ
23.Ulusal Kimya Kongresi, 16-20 Haziran 2009, PP-067, Sivas
2. Ürik Asit Seçici Elektrot Olarak Politiramin Filmi
Sezen KURŞUN, Aziz PAŞAHAN, Bilge ZABCI EKİNCİ, Ergun EKİNCİ
24.Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran – 2 Temmuz 2010, PP111, Zonguldak
3. Poli(3-aminofenol) Elektrodunun Ürik Asit Seçiciliğinin İncelenmesi
Sezen KURŞUN, Aziz PAŞAHAN, Bilge ZABCI EKİNCİ, Ergun EKİNCİ
24.Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran – 2 Temmuz 2010, PP112, Zonguldak

PROJELER

1. Elektropolimerik Ürik Asit Sensörlerinin Geliştirilmesi, Bursiyer, TÜBİTAK
108T227, 2008